

Activación de PP2A y alteraciones metabólicas inducidas por la ingestión de fructosa en forma líquida

Laia Vilà, Juan Carlos Laguna, Marta Alegret y Núria Roglans

Unitat de Farmacologia. Facultat de Farmàcia. Universitat de Barcelona. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM). Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB). Barcelona. España.

Introducción. Dietas ricas en fructosa producen, en ratas, hipertrigliceridemia y esteatosis hepática, como consecuencia de una reducción en la actividad transcripcional del receptor activado con proliferadores peroxisómicos alfa (PPAR α), junto con un estado de resistencia parcial a la leptina. En el presente trabajo, hemos estudiado cómo la fructosa afecta en el ámbito molecular al control del metabolismo energético hepático.

Material y métodos. Se distribuyeron de forma aleatorizada a 16 ratas Sprague-Dawley macho en 2 grupos: control y fructosa (10% peso/volumen en agua de bebida, durante 14 días). Adicionalmente, se distribuyó a 12 ratas en 3 grupos: control, fructosa y fructosa + 1 β -D ribofuranósido de 5-aminoimidazol 4-carboxamida (AICAR) (500 mg/kg/día, los últimos 3 días de dieta fructosa). Se valoraron los valores plasmáticos de triglicéridos, glucosa, leptina, insulina y adiponectina. En el ámbito hepático se determinaron: contenido de triglicéridos y ceramidas, actividad de β -oxidación, actividad AMPK (AMP activada proteína cinasa), proteína fosfatasa 2A (PP2A) y valores de expresión proteica y de ácido ribonucleico mensajero de diferentes genes implicados en el metabolismo energético.

Conflictos de intereses: no existen.

Este trabajo ha sido financiado por una beca FEA/SEA Manuel de Oya, investigación en Nutrición, convocatoria 2007 y por los proyectos FIS PI070875//PI060247.

Correspondencia: Dr. J.C. Laguna Egea.
Departament de Farmacología. Facultat de Farmàcia.
Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: jclagunae@ub.edu

Recibido el 21-1-2009 y aceptado el 2-2-2009.

Resultados. Las ratas del grupo fructosa presentaron hipertrigliceridemia ($\times 1,3$), hiperleptinemia ($\times 1,9$) e hiperadiponectinemia ($\times 1,7$), incremento en los triglicéridos ($\times 1,6$) y ceramidas hepáticas y en la formación de complejos PPAR α -FoxO1. La administración de AICAR, aunque incrementó en un 30% la actividad AMPK hepática, no revirtió ninguna de las alteraciones descritas. En ratas fructosa no sometidas a ayuno antes del sacrificio, se detectó en hígado un marcado incremento en la subunidad catalítica de PP2A ($\times 1,6$) y en la capacidad de unión de ChREBP ($\times 1,4$).

Conclusiones. El déficit de oxidación de ácidos grasos producido por el consumo de fructosa en forma líquida no es reversible por activación de la AMPK hepática. La activación de PP2A tras la ingesta de fructosa es la alteración molecular determinante en la aparición de los cambios metabólicos inducidos por este monosacárido.

Palabras clave:
Leptina. Fructosa. AMPK. AICAR. PP2A. FoxO1.

PP2A ACTIVATION AND LIQUID FRUCTOSE-INDUCED METABOLIC CHANGES

Introduction. Administration of fructose-enriched diets to rats induces hypertriglyceridemia and hepatic steatosis as a result of reduced PPAR α transcriptional activity and partial leptin resistance. In the present work, we studied how fructose alters the control of hepatic energy metabolism at the molecular level.

Material and methods. Sixteen Sprague-Dawley male rats were randomised to 2 treatment groups: control and fructose (10% w/v fructose in drinking

water for 14 days). Additionally, 12 rats were distributed into 3 groups: control, fructose, and fructose+AICAR (500 mg/kg/day, in the last 3 days of fructose administration). Plasma levels of triglycerides, glucose, leptin, insulin and adiponectin were measured. Triglyceride and ceramide content, fatty acid β -oxidation activity, AMPK and PP2A activity and expression of mRNA and protein levels of genes involved in energy metabolism were determined in liver samples.

Results. Fructose-fed rats showed high plasma concentrations of triglycerides ($\times 1.3$), leptin ($\times 1.9$) and adiponectin ($\times 1.7$), an increase in hepatic triglycerides ($\times 1.6$) and ceramides and in the formation of PPAR α -FoxO1 complexes. AICAR administration, despite increasing hepatic AMPK activity ($\times 1.3$), modified none of the above mentioned alterations. In livers of non-fasted fructose-fed rats, there was a marked increase in the expression of the catalytic subunit of PP2A ($\times 1.6$) and in the binding of ChREBP ($\times 1.4$).

Conclusions. The deficit in liver fatty acid oxidation induced by fructose ingestion in liquid form is not reversed by the activation of AMPK. PP2A activation by fructose ingestion is the key molecular event in the production of fructose-related metabolic changes.

Key words:
Leptin. Fructose. AMPK. AICAR. PP2A. FoxO1.

Introducción

El consumo de fructosa constituye una parte importante de la ingesta calórica total en las dietas occidentales, básicamente debido al aumento del consumo de bebidas refrescantes que contienen valores altos de fructosa. Durante las últimas 2 décadas, el incremento en el consumo de fructosa ha coincidido con un aumento en la prevalencia de obesidad y síndrome metabólico, importantes factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular^{1,2}. Ha habido un intenso debate para determinar si la masiva incorporación de fructosa en las dietas occidentales representa sólo otro ingrediente de alto valor calórico o si, además de esto, la fructosa provoca cambios cualitativos en el metabolismo energético que favorecen la aparición de enfermedades metabólicas^{3,4}. Además, la fructosa incluida en la dieta en forma líquida provoca hipertrigliceridemia en un grado mayor que si ésta se administra en forma sólida⁵. Un aumento del 10% de la energía total obtenida en la dieta en forma de hidratos de carbono no es suficiente para inducir hipertri-

gliceridemia, a menos que este 10% se consuma en forma líquida y sea rico en monosacáridos⁶. Además, en una revisión reciente de Bray et al⁷, los autores explican que en modelos de obesidad y resistencia a la insulina en roedores, el consumo de fructosa, añadida en el agua de bebida, induce a los roedores el deseo de consumir soluciones edulcoradas y calóricas, lo que reduce el consumo de comida sólida, aunque no en un grado suficiente como para prevenir un equilibrio calórico positivo y, por lo tanto, la aparición de obesidad. Respecto a este tema tan importante, todavía falta conocer el mecanismo molecular encargado de las alteraciones metabólicas provocadas por la ingestión de fructosa.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la administración de fructosa al 10% en el agua de bebida a ratas macho provoca hiperleptinemia y un estado de resistencia a la leptina, debidas a una disfunción parcial en el factor de transcripción STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-3*). Las ratas suplementadas con fructosa, aun presentando valores elevados de leptina en plasma, no presentan diferencias en la expresión proteica de STAT3 fosforilada en serina (STAT-PSer⁷²⁷), forma con máxima actividad transcripcional, respecto las ratas control. Esta falta de actividad puede explicar los cambios metabólicos inducidos por la fructosa cuando ésta se toma en forma líquida⁸. Aunque no hay pruebas experimentales de que este fenómeno también ocurra en humanos, hay estudios que explican que la administración de fructosa al 20% en solución, a varones sanos voluntarios durante 4 semanas, induce, entre otros efectos, un incremento significativo de la concentración plasmática de la leptina⁹. Igualmente, hemos demostrado que la administración de fructosa en el agua de bebida a ratas macho Sprague-Dawley provoca un estado de resistencia parcial a la leptina como consecuencia de la falta de fosforilación y activación de STAT3-PSer⁷²⁷ y AMPK (AMP activada proteína cinasa). La falta de estas actividades se debe al déficit de activación de *Janus activated kinase 2* (JAK-2) y a una disfunción en la activación del receptor de la leptina que tiene como consecuencia la falta de actividad de la vía de las *mitogen activated protein kinase* (MAPK)¹⁰.

En el presente estudio, demostramos que el déficit de oxidación de ácidos grasos producido por el consumo de fructosa en forma líquida no es reversible por activación de la AMPK hepática. Igualmente, aportamos datos experimentales que indican que la activación de la proteína fosfatasa

2A (PP2A) tras la ingesta de fructosa es la alteración molecular determinante en la aparición de los cambios metabólicos inducidos por este monosacárido.

Material y métodos

Animales y diseño experimental

Para este estudio, se utilizaron 16 ratas macho Sprague-Dawley que fueron proporcionadas por Harlan (Barcelona [España]) y se mantuvieron con agua y comida ad libitum, a temperatura y humedad constante con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Despues de 5 días, se distribuyó a los animales de forma aleatorizada en 2 grupos: un grupo control y un grupo suplementado con fructosa (fructosa). La fructosa se proporcionó en el agua de beber en forma de solución al 10% (peso/volumen) durante 2 semanas. Los animales control no recibieron ningún suplemento de hidratos de carbono. Los animales se sacrificaron por decapitación con anestesia por isoflurano entre las 10.00 y la 11.00 h, con o sin ayuno de 2 h previo al sacrificio.

Para los experimentos con AICAR, los animales se distribuyeron de forma aleatorizada en 3 grupos de 4 animales cada uno: un grupo control, un grupo suplementado con fructosa y un grupo suplementado con fructosa al que se le administró, vía subcutánea, una dosis de 500 mg/kg/día de AICAR los últimos 3 días de tratamiento. Las condiciones del estudio fueron las mismas descritas anteriormente. Todo el proceso se realizó de acuerdo con la guía establecida por el Comité de Bioética de la Universitat de Barcelona, según se indica en la Ley (5/1995) (21 de julio) de la Generalitat de Catalunya.

Preparación de muestras

Las muestras sanguíneas se recogieron en el momento del sacrificio de los animales, en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 5%; el plasma se obtuvo por centrifugación y se conservó a -20 °C hasta su utilización. Los hígados de las ratas se extrajeron y perfundieron en cloruro sódico (NaCl) 0,9%; 1 g de tejido hepático de cada rata se homogeneizó en tampón 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 30 mM EDTA, 50 mM KH₂PO₄, pH 7,4 para obtener la fracción de sobrenadante posnuclear, que se conservó a -80 °C hasta su utilización. Se congelaron 10-100 mg de tejido hepático en N₂ líquido de forma inmediata y conservados a -80 °C hasta su utilización para la extracción del ácido ribonucleico (ARN) total. Se conservaron 2 muestras adicionales de tejido hepático (250 mg) a -80 °C para la cuantificación de los lípidos hepáticos y para la obtención de los extractos nucleares y de proteína total.

Análisis de lípidos, leptina y adiponectina

Los valores plasmáticos de triglicéridos se midieron mediante el ensayo colorímetro de Wako Chemicals GmbH (Neuss [Alemania]) Triglyceride L-Type kit. Los valores plasmáticos de leptina y adiponectina se determinaron con el kit RL83K RIA y MADP-60HK RIA, respectivamente, ambos de Linco Research (Missouri [Estados Unidos]). Los lípidos hepáticos se extrajeron y midieron según se describe previamente¹¹.

Ensayos enzimáticos

β-oxidación de los ácidos grasos. La actividad hepática de β-oxidación de ácidos grasos se determinó según el método descrito previamente¹², utilizando 30 µg de sobrenadante posnuclear de hígado de rata como muestra.

5'-AMP-activada proteína cinasa. AMPK se estudió en la fracción 6% de glicol polietileno (PEG) 8000 analizando la incorporación de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP en el péptido SAMS (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY [Estados Unidos]), tal como describen Kudo et al¹³. Brevemente, se homogeneizaron 100 mg de tejido congelado en 0,4 ml de tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,25 mM de manitol, 1 mM de ácido etilenglicoltriacético (EGTA), 1 mM de EDTA, 1 mM de DDT, 50 mM de floruro sódico (NaF), 1 mM de fenilmetsulfonil flúor (PMSF), 5 mM de ortovanadato y 1 mM de benzamidina. El homogenizado se centrifugó a 14.000 xg durante 20 min a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se llevó hasta un 2,5% (w/v) PEG 8000 utilizando una solución stock 25% (w/v) PEG 8000. La mezcla se mantuvo en agitación durante 10 min y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se llevó a un 6% PEG 8000. Despues de la centrifugación, el *pellet* se lavó con tampón de homogeneización al 6% de PEG 8000 y posteriormente se resuspendió en tampón 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 1 mM de DDT, 50 mM de NaF, 1 mM de PMSF, 1 mM de benzamidina, 0,02% azida sódica y 10% glicerol. La concentración proteica de cada muestra se estudió mediante el método Bradford¹⁴.

La reacción para analizar la actividad AMPK se realizó a 30 °C durante 5 min en un volumen final de 25 µl compuesto por 40 mM de HEPES-NaOH (pH 7,0), 80 mM de NaCl, 8% de glicerol, 0,8 mM de EDTA, 200 µM de péptido SAMS, 0,8 mM de DTT, 5 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂), 200 µM de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP, 200 µM de 5'-AMP y 0,5 µg de la fracción proteica 6% PEG 8000. La reacción se inició con la adición de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP/Mg. Despues de la incubación a 30 °C, se añadieron 15 µl del producto de reacción a filtros de papel Whatman P81 que se lavaron 4 veces con ácido fosfórico 150 mM durante 30 min. El último lavado se realizó con acetona, los filtros se dejaron secar y se contaron en un contador de centelleo. El blanco de la reacción se realizó utilizando todos los componentes y añadiendo proteína inactivada. La actividad AMPK se calculó como la diferencia entre la radioactividad de las muestras, menos la del blanco. Se han realizado experimentos preliminares para determinar los tiempos óptimos de incubación y para establecer la cantidad de proteína a utilizar.

Determinación del contenido hepático de diacilglicerol y ceramidas

El contenido hepático de ceramidas se determinó mediante el método de la diacilglicerol cinasa¹⁵. Los lípidos se extrajeron a partir de 100 mg de tejido con 600 µl de cloroformo, metanol y HCl 1N (100:100:1). Tras la agitación y la centrifugación posterior, la fracción clorofórmica se evaporó bajo corriente de N₂. Los lípidos secos se resuspendieron con 300 µl de KOH 0,1 N en metanol y se incubaron 1 h a 37 °C para eliminar el diacilglicerol. Tras añadir 300 µl de PBS, se repitió la extracción. Finalmente, los lípidos se resuspendieron en 100 µl de tampón de reacción (150 µg/100 µl cardiolipina, 280 µmol/l de ácido dietilenetriamipentacético, 51 mmol/l de octil β-D-glucopiranosa, 50 mmol/l de NaCl, 51 mmol/l de imidazol, 1 mmol/l de EDTA, 12,5 mmol/l de MgCl₂, 2 mmol/l de ditiotreitol, 0,7% de glicerol, 70 µmol/l de β-mercaptoetanol, 500 µmol/l de ATP y 5 µCi/100 µl ($\gamma^{32}\text{P}$)ATP) y 35 ng de la enzima diacilglicerol cinasa. Las muestras se incubaron a 30 °C durante 30 min. La reacción se paró con la adición de 170 µl de tampón de parada (135 mM de NaCl, 1,5 mM de CaCl₂, 0,5 mM de glucosa y 10 mM de Hepes pH 7,2) y 30 µl de EDTA 100 mM. Los lípidos se extrajeron nuevamente con 1 ml de cloroformo, metanol, 1N HCl (100:100:1) y tras resuspender los *pellets* con 50 µl de cloroformo, se car-

garon en placas de sílica-gel (TCL Plates, Whatman), usando una solución de cloroformo:metanol:ácido acético (65:15:5) como solvente para fluir. Las placas se expusieron a un film fotográfico para interpretar los resultados.

Para la determinación del DAG, se omitió la hidrólisis alcalina de 1 h a 37 °C para eliminar el DAG de las muestras y se siguió el mismo protocolo descrito antes.

Preparación y análisis del ARN

El ARN total se aisló mediante el reactivo Trizol® (Invitrogen Biotechnologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores relativos de cada ARN específico se determinaron por la reacción de la transcriptasa reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) tal como se ha descrito previamente¹¹. Se utilizó *aprt* (adenosil fosforibosil transferasa) como control interno. Los oligonucleótidos específicos utilizados fueron: *aprt*, sentido: 5'-AGCTTCCCGGACTTCCCCATC-3', antisentido: 5'-GACCACTTCTGCCCCGGTTC-3', tamaño amplificado 329bp; *L-piruvato cinasa*, sentido: 5'-TATGGCGGA-CACCTCCTGGA-3', antisentido: 5'-GCTGAGTGGGGAGGTT-GCAA-3', tamaño amplificado 259bp.

Aislamiento de los extractos nucleares y la proteína total

Los extractos nucleares y de proteína total se obtuvieron según el método descrito previamente¹⁰. La cuantificación de la concentración proteica de cada fracción se realizó mediante el método de Bradford¹⁴.

Ensayos de Western blot

Se sometieron 30 µg de proteína total (para PP2A) o extractos nucleares hepáticos (para ChREBP) a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas immobilon polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Millipore, a Bedford, MA [Estados Unidos]) y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución de TBS-0,1% Tween-20 con un 5% de leche en polvo desnata. Las membranas se incubaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente⁸. La detección se realizó utilizando el reactivo ECL de quimioluminiscencia kit HRP (Amersham Biosciences). Como control de carga se incubaron las membranas con β-actina o β-tubulina (Sigma-Aldrich). El tamaño de las proteínas se comprobó utilizando marcadores de peso molecular (Invitro-

gen, Life Technologies). Todos los anticuerpos se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA [Estados Unidos]).

Coinmunoprecipitación

Los ensayos de coinmunoprecipitación se realizaron a partir de 50 µg de extractos nucleares, tal como se ha descrito anteriormente¹⁶.

Ensayo de retardación de la movilidad electroforética

Para la determinación de la actividad de unión del ChREBP al ácido desoxirribonucleico (ADN), se utilizó el oligonucleótido siguiente: 5-tcctgcgtggcacaggcggtgcacc-3'. El ensayo de retardación de la movilidad electroforética (EMSA) se realizó tal como se describe previamente⁸. Para los ensayos de superretardación (*superShift*), los anticuerpos se añadieron 30 min antes que la sonda marcada radiactivamente. Todos los anticuerpos utilizados se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA [Estados Unidos]).

Estadística

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. Las muestras de plasma se estudiaron por duplicado. Las diferencias estadísticas se valoraron mediante la prueba de la t de Student para muestras no apareadas, utilizando el programa informático GraphPad InStat (GraphPad Software V2.03). Cuando el número de muestras era pequeño o las desviaciones no fueron homogéneas, se aplicó un test no paramétrico (Mann-Whitney o Kruskal-Wallis). Se consideró significación estadística un valor de $p < 0,05$.

Resultados

La administración de AICAR revierte el déficit de oxidación de ácidos grasos inducido por fructosa

Las ratas suplementadas con fructosa al 10% presentan un incremento en el consumo de agua ($\times 1,7$), sin presentar cambios significativos en el peso corporal ni en el consumo de dieta sólida. Las ratas del grupo fructosa son hipertrigliceridémicas ($\times 1,3$) y presentan concentraciones plasmáticas elevadas de leptina ($\times 1,9$) y adiponectina ($\times 1,7$).

Tabla 1. Parámetros analíticos en ratas control (CTR) y ratas suplementadas con fructosa en forma líquida (FRC)

	CTR	FRC
ABC peso corporal (g/14 días/rata)	3,325 ± 175,6	3,416 ± 99,5
ABC bebida consumida (ml/14 días/2 ratas)	821 ± 98,6	1,440 ± 175,24 ^b ($\times 1,7$)
ABC dieta consumida (g/14 días/2 ratas)	528,3 ± 37	496,7 ± 26,6
Oxidación ácidos grasos (nmol/min/mg proteína hepática)	0,43 ± 0,05	0,35 ± 0,04 ^a ($\times 0,8$)
Triglicéridos hepáticos (mg/g hígado)	3,55 ± 0,57	5,11 ± 1,3 ^a ($\times 1,4$)
Triglicéridos plasmáticos (mg/dl)	111 ± 28	153 ± 19 ^b ($\times 1,37$)
Leptina (ng/ml)	1,59 ± 0,45	2,97 ± 1,30 ^a ($\times 1,9$)
Adiponectina (µg/ml)	3,66 ± 0,88	6,36 ± 0,9 ^b ($\times 1,7$)

ABC: área bajo la curva.

^ap < 0,05.

^bp < 0,01 frente a CTR.

Tabla 2. Efecto del AICAR en la actividad AMPK, la hipertrigliceridemia y la oxidación hepática de los ácidos grasos

	CTR	FRC	FRC + AICAR
Oxidación de ácidos grasos (nmol/min/mg proteína hepática)	0,7 ± 0,05	0,5 ± 0,03 ^a (×0,7)	0,5 ± 0,07
Triglicéridos hepáticos (mg/g hígado)	4,8 ± 0,9	8,8 ± 2,7 ^a (×1,8)	6,1 ± 2,2
Triglicéridos plasmáticos (mg/dl)	51 ± 8	84 ± 14 ^a (×1,6)	79 ± 12
Actividad AMPK ^b (cpm/μg proteína/min)	9,676	9,786	12,202 (×1,3)

AICAR: 1 β-D ribofuranósido de 5-aminoimidazol 4-carboxamida; AMPK: AMP activada proteína cinasa; CTR: ratas control; FRC: ratas suplementadas con fructosa en forma líquida.

^ap < 0,05 frente a CTR.

^bValores obtenidos a partir de un *pool* de muestras de n = 6 animales diferentes por grupo.

Además, las ratas del grupo fructosa presentan unos valores de triglicéridos hepáticos elevados (×1,6) y una reducción en la actividad de β-oxidación de los ácidos grasos (×0,8) (tabla 1). Leptina y adiponectina controlan el catabolismo de los ácidos grasos y la producción de glucosa en el tejido hepático, en parte a través de la activación de AMPK¹⁷. Nuestro grupo ha demostrado anteriormente que las ratas del grupo fructosa no presentan cambios en la expresión proteica de la forma fosforilada y activa de AMPK (AMPK-PThr) en el ámbito hepático⁸, así como en su actividad específica¹⁰.

Para determinar el papel de la actividad AMPK en el control de la oxidación de ácidos grasos hepáticos, administramos AICAR a un grupo de ratas macho suplementadas con fructosa líquida. AICAR es un análogo del AMP capaz de activar de forma directa AMPK^{18,19}. Aunque la administración de AICAR produjo un incremento de un 30% en la actividad hepática de AMPK, no produjo ninguna modificación en la hipertrigliceridemia y el déficit de oxidación de ácidos grasos inducido por fructosa (tabla 2).

La reducción en la actividad PPARα inducida por fructosa se relaciona con la actividad FoxO1

La fructosa reduce la actividad del receptor alfa del activador-proliferador del peroxisoma (PPARα) hepática⁸. Qu et al²⁰ han demostrado que hámsters alimentados con una dieta sólida con un 60% de fructosa presentan un incremento en la forma activa del factor nuclear FoxO1. La activación de FoxO1 se relacionó con un descenso en el aclaramiento plasmático de triglicéridos en estos animales, y se revirtió con la administración de un agonista PPARα, el fenofibrato. El mecanismo encargado de este efecto fue la actividad de transpresión de PPARα sobre la actividad transcripcional de FoxO1, tras la interacción física entre las

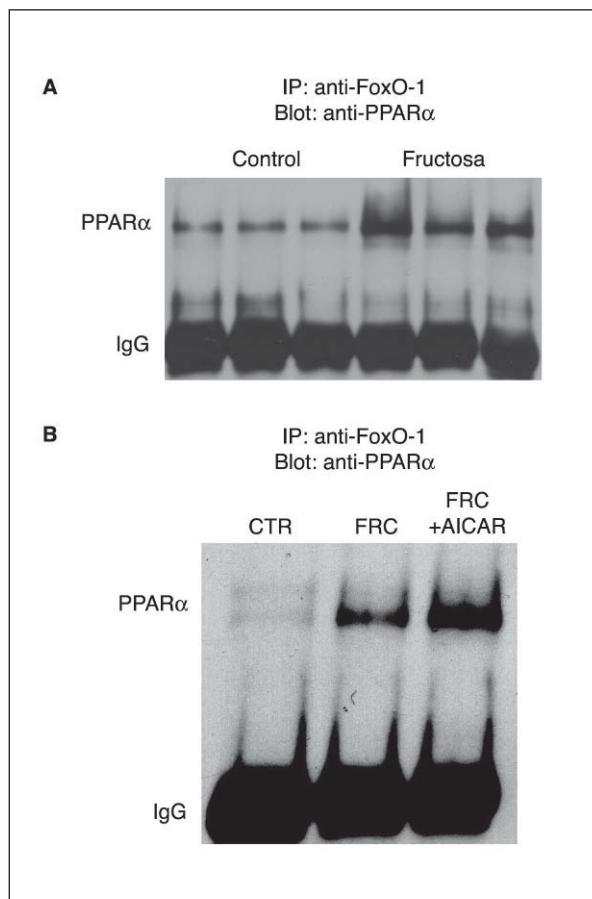


Figura 1. Coimmunoprecipitación del receptor alfa del activador-proliferador del peroxisoma (PPARα) y FoxO1 en muestras hepáticas de ratas suplementadas con fructosa (FRC). A. Extractos nucleares de 3 controles (CTR) y de 3 FRC que se sometieron a immunoprecipitación con anticuerpo anti-FoxO1 asociado a partículas de proteína A agarosa. Los immunoprecipitados se sometieron a SDS-PAGE y se inmunorrevolvió con anticuerpo anti-PPARα. Muestras del resto de animales utilizados en el estudio proporcionaron resultados similares. B. Extractos nucleares obtenidos por muestreo de cada muestra individual de ratas CTR, FRC y tratadas con 1 β-D ribofuranósido de 5-aminoimidazol 4-carboxamida (AICAR) (FRC + AICAR) se trataron tal como se describe en el apartado A.

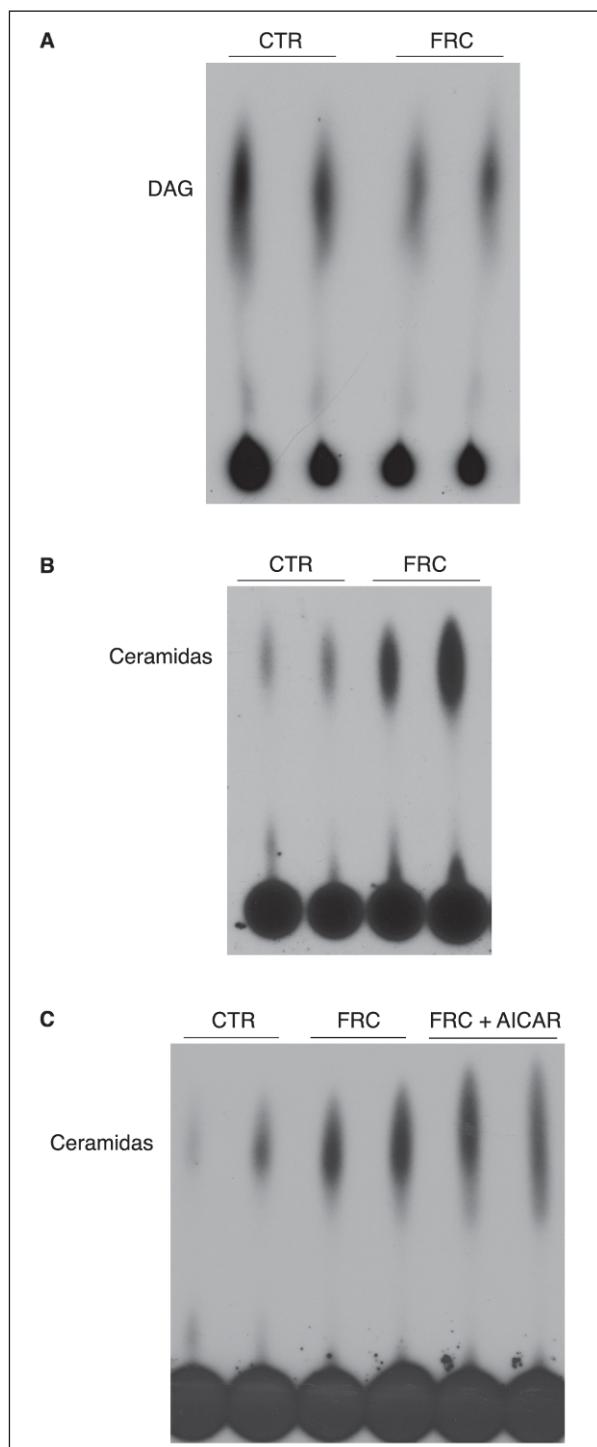


Figura 2. Valores de diacilglicerol (DAG) y ceramida en hígados de ratas suplementadas con fructosa (FRC). Se prepararon extractos lipídicos y se valoró la presencia de DAG y ceramida, como se detalla en el apartado Materiales y métodos. Se muestran fosfoimágenes del DAG (A) y la ceramida (B y C) presente en muestras hepáticas representativas, obtenidas por muestreo de 6 muestras individuales de ratas CTR, FRC y tratadas con 1 β -D ribofuranósido de 5-aminoimidazol 4-carboxamida (AICAR) (FRC + AICAR). CTR: control.

formas activadas de ambos receptores²⁰. Dado que los mecanismos de transrepresión pueden ser bidireccionales^{16,18}, determinamos si se producía una situación similar en el hígado de ratas suplementadas con fructosa en forma líquida al 10% p/v. Como se puede apreciar en la figura 1A, experimentos de coinmunoprecipitación indicaron que la administración de fructosa en forma líquida incrementó la formación de complejos PPAR α -FoxO1 en el hígado, en comparación con los animales control. Este efecto de transrepresión por interacción física de FoxO1 sobre PPAR α sería la causa directa de la reducción en la actividad hepática de oxidación de ácidos grasos producida por la ingestión de fructosa. FoxO1 es inactivado por fosforilación en un residuo de Ser a través de la actividad proteína cinasa B o Akt²¹. A su vez, Akt es activada por fosforilación en un residuo de Ser por la cinasa activada de JAK-2. En consecuencia, el exceso de actividad FoxO1 derivaría también del déficit de señalización de la leptina a través de JAK-2 que hemos demostrado previamente (JAK-2). Es interesante señalar que la administración de AICAR no fue capaz de modificar la interacción entre FoxO1 y PPAR α (fig. 1B).

El hígado de ratas suplementadas con fructosa presenta una acumulación de ceramidas

El ácido palmítico es un precursor de la síntesis de novo de ceramidas²². Dado que la fructosa reduce la oxidación hepática de ácidos grasos e incrementa su síntesis, determinamos si el exceso de ácidos grasos hepáticos comportaba un incremento en la síntesis no sólo de triglicéridos, sino también de otras especies lipídicas. Como se observa en la figura 2A, aunque la cantidad hepática de diacilglicerol fue similar entre las ratas control y las tratadas con fructosa, sí que se produjo un incremento marcado en el contenido hepático de ceramida en las ratas suplementadas con fructosa (fig. 2B). Por otra parte, el tratamiento con AICAR no redujo de forma apreciable el contenido hepático de ceramida en los animales suplementados con fructosa (fig. 2C).

La fructosa en forma líquida incrementa la actividad PP2A hepática

Las ceramidas se comportan como activadores de la PP2A²³. La fructosa y otros hidratos de carbono, a través de un metabolito común, la xilulosa-5-fosfato, son también potentes activadores de la PP2A²⁴. Aunque la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP), controlada por PP2A, y de la L-pi-

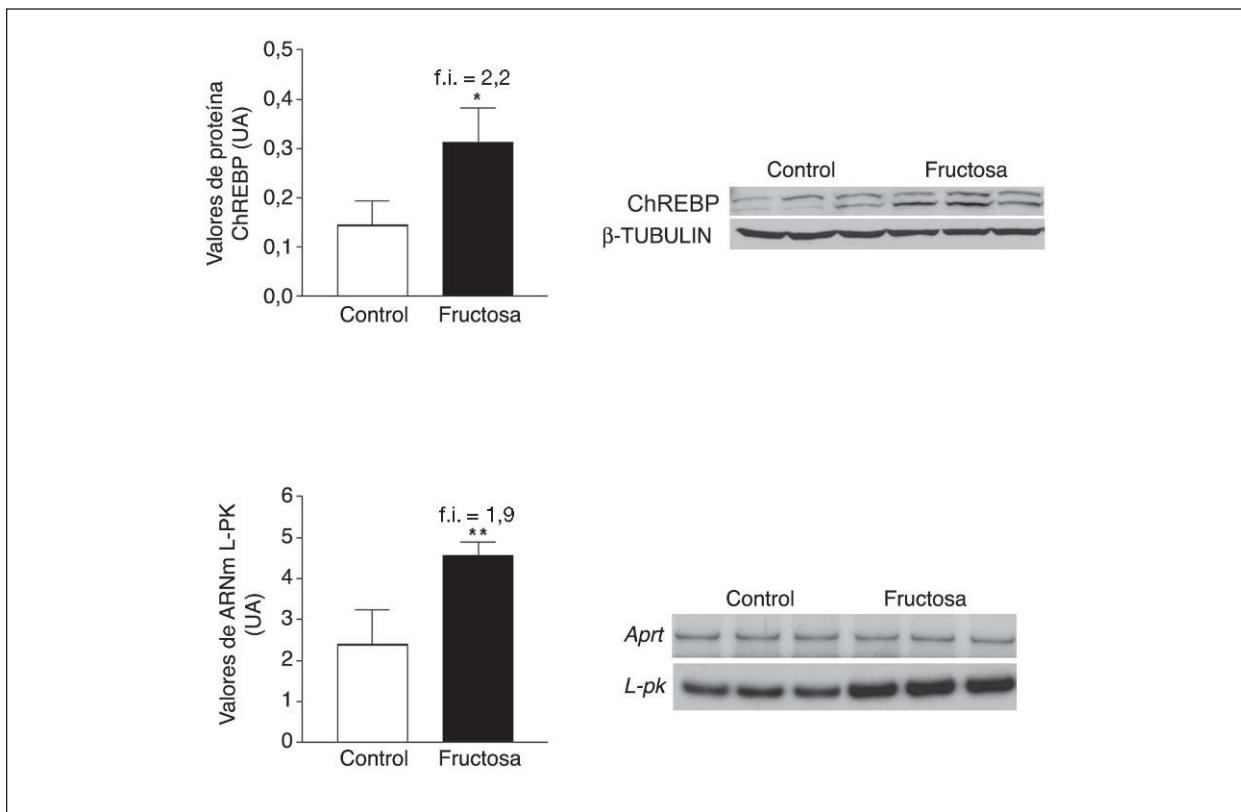


Figura 3. Expresión de ChREBP y L-piruvato cinasa (L-PK) en muestras hepáticas de ratas suplementadas con fructosa. A. Gráfica de los valores proteicos de ChREBP en tejido hepático. Cada barra representa la media ± desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. En la parte derecha de la gráfica se puede observar la autorradiografía representativa del ensayo de Western-blot, en el que se observan las bandas correspondientes a 3 ratas control y 3 ratas suplementadas con fructosa. La cantidad de proteína cargada se confirmó por el método de Bradford, y la uniformidad de carga en cada línea mediante la determinación de la señal de la proteína β -tubulina. B. Valores relativos de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para la L-PK en muestras hepáticas control y fructosa. Cada valor representa la media ± desviación estándar de n = 6 animales por grupo, expresado en unidades arbitrarias (UA). *p < 0,05. **p < 0,01.

ruvato cinasa^{24,25}, gen diana de ChREBP, se vio incrementada en el hígado de las ratas alimentadas con fructosa (fig. 3), no fuimos capaces de detectar ningún incremento en la expresión de la subunidad catalítica de PP2A.

Para evitar el posible efecto en los valores hepáticos de xilulosa-5-fosfato de las 2 h de ayuno, determinamos la expresión de la subunidad catalítica de PP2A y la actividad de unión del ChREBP en muestras hepáticas de ratas suplementadas con fructosa y sacrificadas sin ayuno previo. En estas condiciones, la administración de fructosa produjo un incremento en la expresión de la subunidad catalítica de PP2A ($\times 1,6$) (fig. 4A). La incubación de extractos nucleares hepáticos con un oligonucléotido que mimetiza el elemento de respuesta a ChREBP produjo 2 bandas específicas, cuya intensidad disminuyó en presencia de un exceso de oligonucléotido no marcado (fig.

4B). Asimismo, ambas bandas contenían proteína ChREBP, ya que se vieron superretardadas cuando los extractos se incubaron en presencia de un anticuerpo específico anti-ChREBP. Como se puede apreciar en la figura 4B, la intensidad de la banda II se incrementó de una forma marcada ($\times 1,4$) en los extractos nucleares provenientes de ratas suplementadas con fructosa. En conjunto, estos resultados indican que la ingestión de fructosa en forma líquida incrementa la actividad PP2A hepática.

Discusión

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la administración de fructosa al 10% en el agua de bebida a ratas induce hipertrigliceridemia y esteatosis hepática, junto con un estado de resistencia hepática a la leptina y de hiperleptinemia^{8,10}, y que este estado de resistencia es la causa de la falta de activi-

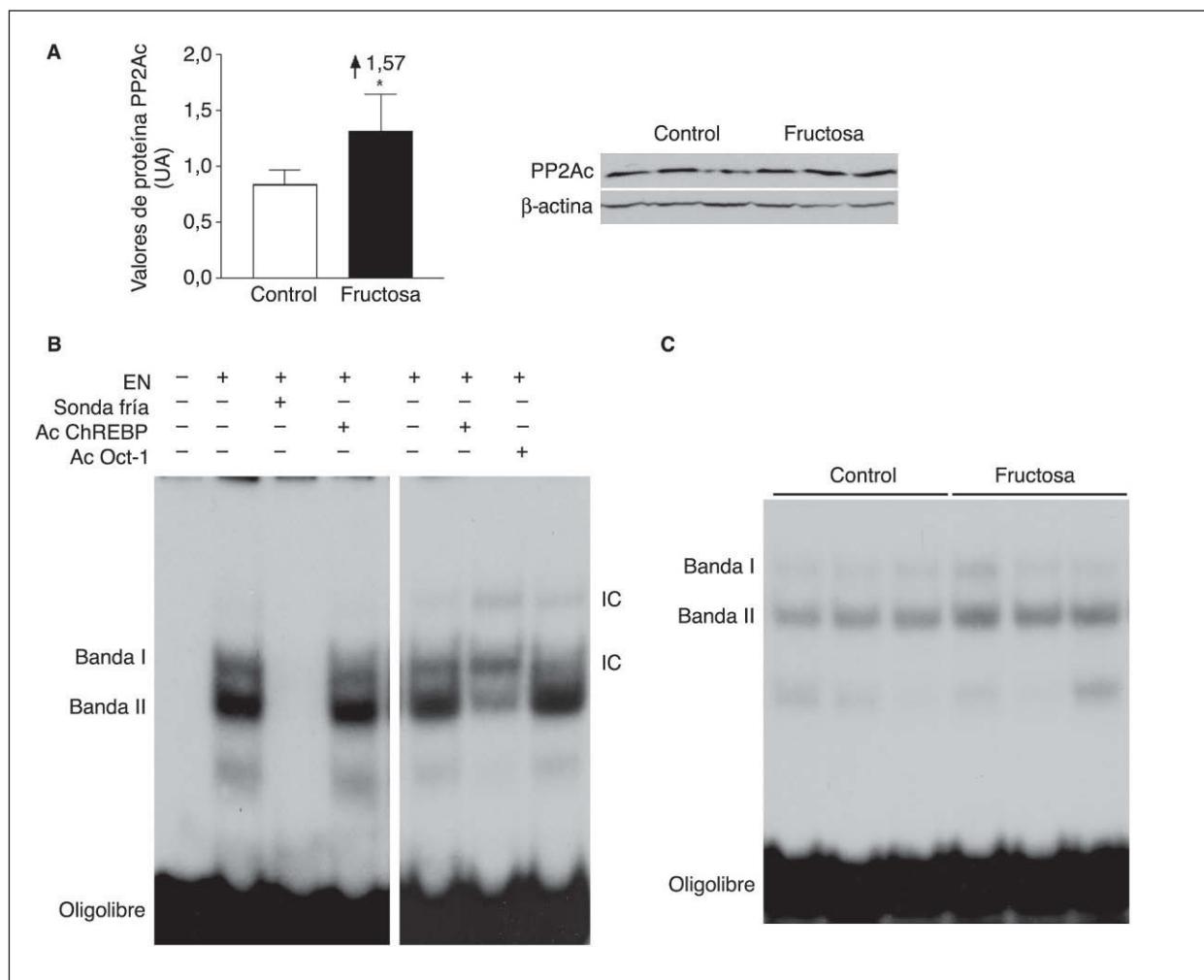


Figura 4. Expresión de la subunidad catalítica de PP2A y actividad de unión de ChREBP en ratas suplementadas con fructosa y sacrificadas sin ayuno previo. Western-blot de la subunidad catalítica, activa, de PP2A en muestras hepáticas de ratas control y suplementadas con fructosa. A. En la parte izquierda de la figura, un diagrama de barras muestra los valores de proteína PP2A, expresados como la media \pm desviación estándar de los valores obtenidos en muestras de 3 controles (barra blanca) y 3 animales suplementados con fructosa (barra negra). La cantidad de proteína cargada se confirmó por el método de Bradford, y la uniformidad de carga en cada línea mediante la determinación de la señal de la proteína β -actina. *p < 0,05. B. Ensayo de retardación electroforética (EMSA) en el que se muestra la unión de extractos nucleares hepáticos (EN) a un oligonucleótido que mimetiza en el elemento de respuesta a ChREBP y la formación de 2 bandas específicas que desaparecen en presencia de un exceso de sonda fría. Las bandas I y II contienen proteína ChREBP al ser superretardadas en presencia de un anticuerpo específico anti-ChREBP. El anticuerpo anti-Oct-1 se usó para demostrar que los cambios en la movilidad de las bandas no se debieron a una interferencia inespecífica por la presencia de inmunoglobulinas en el medio de incubación. C. EMSA en el que se muestra la unión a un oligonucleótido ChREBP de extractos nucleares hepáticos, obtenidos de ratas control y suplementadas con fructosa. IC: inmunocomplejo.

dad de AMPK y PPAR α . Además, hemos proporcionado pruebas de que la diferencia importante entre la ingestión de cantidades similares de fructosa y glucosa en el agua de bebida es el hecho que, mientras ambos azúcares incrementan de forma similar la lipogenia hepática, sólo el primero es capaz de reducir de forma significativa la actividad hepática de β -oxidación de los ácidos grasos. En el presente tra-

bajo, proporcionamos datos experimentales que revelan un posible mecanismo capaz de explicar las alteraciones metabólicas que aparecen en el ámbito hepático cuando se suplementa la dieta de ratas con fructosa al 10% en el agua de bebida.

La reducción en la oxidación hepática de ácidos grasos puede atribuirse a la falta de activación por leptina de 2 proteínas implicadas en el control del

catabolismo de los ácidos grasos: la enzima AMPK y el receptor nuclear PPAR α ^{26,27}. Los resultados obtenidos tras el tratamiento con AICAR indican que, al menos en el tejido hepático, el control de la oxidación de ácidos grasos lo ejerce de forma predominante PPAR α , ya que la activación de AMPK en el hígado de los animales tratados con AICAR no revirtió el déficit oxidativo, ni la hipertrigliceridemia.

En cualquier caso, la falta de activación de AMPK y PPAR α en el hígado de las ratas suplementadas con fructosa se relaciona con un déficit generalizado en la fosforilación de residuos de Ser/Thr en proteínas clave en la transducción de la señal de la leptina²⁸. Entre ellas, cabe señalar la falta de activación de JAK-2, que redunda en un déficit de activación de Akt y, por consiguiente, en un estado de hiperactivación del factor de transcripción FoxO1²⁸⁻³⁰. Esta situación es finalmente la causa de la transpresión de la actividad de PPAR α , debido a su interacción física con la forma no fosforilada, activa de FoxO1.

El conocimiento existente sobre el metabolismo de hidratos de carbono indicaría que la fosfatasa de residuos de Ser/Thr PP2A es la causa probable de esta situación. El metabolismo de la fructosa produce xilulosa-5-fosfato, un activador de PP2A²⁵. Aunque no detectamos incrementos en la forma activa de PP2A en el hígado de las ratas suplementadas con fructosa, este hecho se debió probablemente a las 2 h de ayuno a las que se sometieron los animales. Cuando se valoró la expresión de la forma activa de PP2A y la actividad de unión del ChREBP, cuya activación depende directamente de PP2A^{24,25} en muestras hepáticas de ratas suplementadas con fructosa y no sometidas a ayuno, los resultados obtenidos indican de hecho una activación de PP2A por la ingestión de fructosa en forma líquida. Igualmente, el hecho de que los hígados de estos animales se encuentren enriquecidos en ceramida, otra molécula activadora de PP2A²³, concuerda con la presencia de PP2A activada. Finalmente, la presencia de ácidos grasos saturados, que presumiblemente se acumularían en el tejido hepático de los animales suplementados con fructosa, debido a la inhibición de la oxidación y el incremento de la síntesis de estos lípidos, contribuiría también a la activación de PP2A³¹. Se ha descrito que la actividad PP2A reprime la expresión de PPAR α y la actividad de Akt y AMPK³¹⁻³³, efectos que contribuirían a las alteraciones metabólicas inducidas por la fructosa. El hecho de que la fructosa se metabolice de forma mayoritaria en el hígado –mientras que la glucosa

se distribuye y metaboliza en otros tejidos– explicaría por qué, a pesar de que la glucosa también origine xilulosa-5-fosfato²⁵, no sea capaz de inducir hiperleptinemia y resistencia hepática a la leptina cuando se ingiere en cantidades equivalentes con la fructosa.

Agradecimientos

Al CIBERDEM, una iniciativa del Instituto de Salud Carlos III.

Bibliografía

1. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2002;76: 911-22.
2. Isomaa B, Almgreen P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2001;24:683-9.
3. Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2006;84: 274-88.
4. Pereira MA. The possible role of sugar-sweetened beverages in obesity etiology: a review of the evidence. *Int J Obesity.* 2006;30: S28-S36.
5. Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: modifying factors and implications for cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:33-40.
6. Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:412-33.
7. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:537-43.
8. Roglans N, Vilà L, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Impairment of hepatic STAT-3 activation and reduction of PPAR α activity in fructose-fed rats. *Hepatology.* 2007;45:778-88.
9. Lê K-A, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:1374-9.
10. Vilà L, Roglans N, Alegret M, Laguna JC. Resistencia a la leptina: eje MAPK-AMPK y fosforilación de STAT-3 en Ser 727 en rata alimentada con fructosa. *Clin Invest Arterioscl.* 2008;20:223-32.
11. Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vázquez M, Adzet T, et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:232-9.
12. Lazarow PB. Assay of peroxisomal β -oxidation of fatty acids. *Meth Enzymol.* 1981;72:315-9.
13. Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuck GD. High Rates of Fatty Acid Oxidation during Reperfusion of Ischemic Hearts Are Associated with a Decrease in Malonyl-CoA Levels Due to an Increase in 5'-AMP-activated Protein Kinase Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase. *J Biol Chem.* 1995;270:17513-20.
14. Bradford MM. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
15. Coll T, Jové M, Rodríguez-Calvo R, Eyre E, Palomer X, Sánchez RM, et al. Palmitate-mediated downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha in skeletal muscle cells involves MEK1/2 and nuclear factor-kappaB activation. *Diabetes.* 2006;55:2779-87.
16. Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Nuclear factor-kappaB activation leads to down-regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2005;280:17464-71.

17. Alessi DR, Sakamoto K, Bayascas JR. LKB1-Dependent Signaling Pathways. *Annu Rev Biochem.* 2006;75:137-63.
18. Yu X, McCorkle S, Wang M, Lee Y, Saha AK, Unger RH, et al. Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia.* 2004;47:2012-21.
19. Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase as a Drug Target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:185-210.
20. Qu S, Su D, Altomonte J, Kamagata A, He J, Perdomo G, et al. PPAR α mediates the hypolipidemic action of fibrates by antagonizing FoxO1. *Am J Physiol Endocrinol Metabol.* 2007;292:E421-E434.
21. Naïmi M, Gautier N, Chaussade C, Valverde AM, Accili D, Van Obberghen E. Nuclear forkhead box O1 controls and integrates key signaling pathways in hepatocytes. *Endocrinology.* 2007;148:2424-34.
22. Merrill Jr AH. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:25843-6.
23. Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res.* 2003;47:383-92.
24. Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol.* 2002;63:2075-80.
25. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metabol.* 2006;4:107-10.
26. Towler MC, Hardie DG. AMP-activated protein kinase in the metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100:328-41.
27. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the toles of PPAR α in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest.* 2006;116:571-80.
28. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical J.* 2006;393:7-20.
29. Howard JK, Flier JS. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metabol.* 2006;17:365-71.
30. Szanto I, Kahn CR. Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:2355-60.
31. Wu Y, Song P, Xu J, Zhang M, Zou MH. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 2007;282:9777-88.
32. Ravnskjaer K, Boergesen M, Dalggaard LT, Mandrup S. Glucose-induced repression of PPAR α gene expression in pancreatic β -cells involves PP2A activation and AMPK inactivation. *J Mol Endocrinol.* 2006;36:289-99.
33. Ugi S, Imamura T, Maegawa H, Egawa K, Yoshizaki T, Shi K, et al. Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2004;24: 8778-89.