



ORIGINAL

Papel de PP2A en el control de la expresión de PPAR α por fructosa en células FaO de hepatoma de rata[☆]

Alba Rebollo^{a,b}, Marta Alegret^{a,b,c}, Núria Roglans^{a,b,c} y Juan Carlos Laguna^{a,b,c,*}

^a Unitat de Farmacologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

^b Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, España

^c CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), Instituto de Salud Carlos III, España

Recibido el 19 de enero de 2012; aceptado el 20 de enero de 2012

Disponible en Internet el 29 de febrero de 2012

PALABRAS CLAVE

Fructosa;
Peroxisome
proliferator-
activated receptor α ;
Proteína fosfatasa 2 A

Resumen

Introducción: La suplementación de la dieta con un 10% (p/v) de fructosa en el agua de bebida durante 14 días en ratas produce hipertrigliceridemia y esteatosis hepática como consecuencia de una reducción en la expresión y en la actividad transcripcional de PPAR α en el hígado. En el presente trabajo hemos estudiado en un modelo *in vitro*, la línea celular FaO, el posible mecanismo por el cual la fructosa reduce la expresión de PPAR α .

Material y métodos: Las células FaO se incubaron en ausencia o presencia de fructosa 25 mM. Se obtuvieron extractos totales y nucleares para la determinación de los niveles relativos de ARNm por RT-PCR, y de proteínas por Western Blot, de aquellas enzimas y factores de transcripción implicados en las alteraciones producidas por la fructosa. Asimismo, se valoró la actividad PP2A.

Resultados: La incubación con fructosa redujo la expresión de PPAR α y sus genes diana ACO y CYP4A1, e incrementó los niveles de proteína ChREBP y ARNm de su gen diana L-PK. El inhibidor de PP2A ácido okadaico anuló el incremento de la actividad PP2A mediado por la fructosa y evitó parcialmente la inducción de L-PK, pero no modificó la reducción de la expresión de PPAR α , ni tampoco la de ACO y CYP4A1.

Conclusiones: El aumento de los niveles de proteína ChREBP y de ARNm de L-PK, así como la represión de PPAR α mediados por la fructosa, se reproducen en la línea celular FaO tratada con fructosa 25 mM. Los experimentos realizados en presencia de ácido okadaico sugieren que la activación de PP2A por metabolitos de la fructosa no juega un papel relevante en la reducción de la expresión de PPAR α producida por la fructosa.

© 2012 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

[☆] Una comunicación referente a esta línea de trabajo, titulada «Papel de PP2A en el control de la expresión de PPAR α por fructosa en células FaO de hepatoma de rata», fue presentada en el XXIII Congreso de la SEA (Córdoba 2010) y galardonada con una Mención Especial.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jclagunae@ub.edu (J.C. Laguna).

KEYWORDS

Fructose;
Peroxisome
proliferator-activated
receptor α ;
Protein phosphatase
2A

Role of PP2A in fructose mediated expression of PPAR α on rat hepatoma FaO cells**Abstract**

Introduction: The addition of fructose in drinking water (10% w/v) for two weeks to rats induces hypertriglyceridemia and fatty liver by reducing the expression and transcriptional activity of PPAR α in liver. Using an *in vitro* model, hepatoma FaO cells, we have studied the possible mechanism underlying the fructose-mediated reduction of PPAR α expression.

Material and methods: FaO cells were incubated with or without 25 mM fructose. Total and nuclear extracts were obtained and used to assess the relative levels of specific mRNAs by RT-PCR, and proteins by Western Blot, of those enzymes and transcription factors involved in fructose-induced alterations. PP2A activity was also determined.

Results: Fructose treatment reduced PPAR α mRNA levels. Consequently, the expression of ACO and CYP4A1, two PPAR α target genes, also decreased. Incubation of FaO cells with fructose increased both protein levels of ChREBP and mRNA levels of L-PK. Okadaic acid, a PP2A inhibitor, blunted the fructose-induced increase in PP2A activity, and partially prevented the fructose-mediated induction of L-PK expression, but it did not modify the effect of fructose on PPAR α and its target genes.

Conclusions: Both the increase in ChREBP and L-PK expression, and the decrease in PPAR α mRNA levels were reproduced in FaO cells incubated with 25 mM fructose. Experiments performed in the presence of okadaic acid suggest that activation of PP2A by intermediary metabolites of fructose is not involved in fructose-mediated decrease of PPAR α expression.

© 2012 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

En las últimas décadas, la prevalencia de obesidad y síndrome metabólico ha alcanzado proporciones prácticamente epidémicas en los países occidentales¹. Este hecho se ha relacionado, entre otros, con factores ambientales como la reducción de la actividad física o el cambio en los hábitos dietéticos de la población². Además del aumento de la ingesta calórica total, se ha observado un cambio en el tipo de nutrientes que constituyen la dieta, cobrando especial importancia el aumento del consumo de fructosa que ha tenido lugar en los últimos 30 años, principalmente como edulcorante de bebidas refrescantes^{3,4}. En este sentido, varios estudios relacionan el consumo de fructosa con la aparición de obesidad⁵ y alteraciones metabólicas como la hipertrigliceridemia^{6,7}.

En trabajos previos observamos que la suplementación de la dieta con un 10% de fructosa (p/v) en el agua de bebida durante 14 días produce hipertrigliceridemia y esteatosis hepática en ratas Sprague Dawley macho^{8,9}. Para ello, es necesaria la conjunción de dos factores: en primer lugar, la activación de la síntesis de los ácidos grasos por un aumento de la expresión y actividad del factor de transcripción ChREBP (*carbohydrate response element-binding protein*), mediado a su vez por un aumento de la expresión de la proteína fosfatasa 2 A (PP2A), y en segundo lugar, la reducción de la expresión y de la actividad transcripcional de PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*), que conduce a la disminución del catabolismo de los ácidos grasos.

En el presente estudio se ha utilizado una línea celular de hepatoma de rata, las células FaO, con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares responsables de la reducción de la expresión de PPAR α mediada por la fructosa. Los resultados muestran que este efecto es independiente de la activación de la fosfatasa PP2A.

Material y métodos**Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular de hepatoma de rata FaO, adquirida en la *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). Las células se cultivaron en medio DMEM *low glucose* (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de FBS Gold (PAA) y antibiótico (100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin, Gibco, Invitrogen). Para el tratamiento de las células, la proporción de suero se redujo al 1% y las células se incubaron en ausencia (medio control) o presencia de fructosa (Sigma) a una concentración 25 mM (medio fructosa) durante 24 h.

El inhibidor ácido okadaico (Sigma) fue utilizado a una concentración 20 nM, realizando un pre-tratamiento de 30 min previo a la adición de fructosa en el medio.

Análisis de ARNm

Para el aislamiento del ARN total de las células se utilizó el reactivo de Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN se realizó mediante la lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (PerkinElmer, Lambda 45). Se verificó la integridad del ARN sometiéndolo a una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio para la visualización de las bandas de ARN ribosomal 18S y 28S.

Los niveles relativos de ARNm fueron determinados mediante la reacción de la transcriptasa inversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 0.5 μ g de ARN total utilizando 125 ng de oligonucleótidos inespecíficos (*random hexamers*, Roche Diagnostics), 500 μ M de cada

dNTP (Sigma), 200 U de la enzima transcriptasa inversa (M-MVL-RT) y 20 U de RNasa Out (Invitrogen), en un tampón que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, todo ello en un volumen final de 20 µl. La reacción de la transcriptasa inversa se realizó sometiendo las muestras a las siguientes etapas: 5 min a 65 °C, 5 min a 4 °C, 2 min a 37 °C, 10 min a 25 °C, 50 min a 37 °C y 15 min a 70 °C.

La reacción de PCR se llevó a cabo usando 5 µl del producto de la reacción de RT, 0,5 µg de cada oligonucleótido específico (sentido y antisentido), 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) y 0,25 µCi de α-[³²P]dATP (PerkinElmer) en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,5 y 2,5 mM MgCl₂, en un volumen final de reacción de 50 µl. Para evitar hibridaciones inespecíficas, el ADNc y la enzima fueron separados de los oligonucleótidos específicos y los dNTP mediante una capa de parafina que funde cuando la reacción alcanza los 55-60 °C, permitiendo entonces que todos los reactivos entren en contacto.

La reacción de PCR se realizó en un Termociclador MJ Research (Ecogen) y consta de las siguientes fases: 1) desnaturalización de los oligonucleótidos y ADNc a 94 °C durante 1 min; 2) n ciclos de amplificación. Cada ciclo consiste en una desnaturalización a 92 °C, 1 min, seguida de una hibridación con los oligonucleótidos específicos, a 60 °C 1 min y 15 s y una etapa de síntesis a 72 °C 1 min 50 s, 3) etapa de síntesis final, a 72 °C 5 min. Se diseñaron estudios previos con el fin de establecer las condiciones óptimas de amplificación de los diferentes genes a estudiar, determinando el número de ciclos y la cantidad de ARN necesaria para que la relación ARN/producto final fuera lineal y trabajáramos siempre por debajo de las condiciones de saturación. Para normalizar los resultados se usó el gen control APRT. El número de ciclos de amplificación utilizados en cada caso, así como las secuencias de los oligonucleótidos específicos para cada gen y el tamaño del producto de PCR, se describen en la [tabla 1](#). Cinco microlitros de la reacción de PCR se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%, los productos de amplificación fueron escaneados (Personal Molecular Imager, Bio Rad) y se cuantificaron las bandas radiactivas con el software Quantity One (BioRad). Todos los resultados se expresan como los valores de ARNm de cada uno de los genes estudiados normalizados por los valores de ARNm del gen control, APRT.

Ensayo de Western Blot

Los extractos nucleares de células FaO se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Andrews y Faller¹⁰, y la concentración proteica se determinó siguiendo el método de Bradford¹¹.

Así, 30 µg de extractos nucleares se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon polyvinylidene difluoride (PVDF) (Millipore) y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente en solución de TBS-0,1% Tween-20 con un 5% de leche en polvo desnatada. Posteriormente, las membranas se incubaron con anticuerpo primario anti-ChREBP (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:500 en la misma solución de bloqueo durante unas 16 h a 4 °C. Después de 4 lavados de 5 min cada uno, la membrana se puso a contactar con anticuerpo secundario anti-goat (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:3.000 durante 1 h a temperatura ambiente. La detección se realizó utilizando el reactivo ECL chemiluminescence kit HRP (Amersham Biosciences) y las bandas de proteína fueron cuantificadas mediante el programa Quantity One (Bio Rad). Para el control de carga las membranas se incubaron con β-actina (Sigma-Aldrich). El tamaño de las proteínas se comprobó utilizando marcadores de peso molecular (Invitrogen).

Actividad PP2A

Para la realización del ensayo de actividad PP2A se aisló dicha proteína mediante la técnica de inmunoprecipitación, y posteriormente se evaluó su actividad fosfatasa mediante el kit colorimétrico Sensolyte pNPP Protein Phosphatase Assay Kit (Anaspec).

Los extractos celulares se obtuvieron según las recomendaciones del fabricante del kit, y la concentración proteica se analizó por el método de Bradford¹¹. Para la inmunoprecipitación, se partió de 100 µg de proteína y se añadieron 4 µg de anticuerpo anti-PP2A (Millipore). La mezcla se llevó a un volumen final de 500 µl con tampón TBS que contenía un 2% (p/v) de BSA, y se dejó en rotación durante 2 h a 4 °C. Pasado este tiempo, se añadieron 50 µl de proteína A/G agarosa (Santa Cruz) y la nueva mezcla se incubó durante unas 16 h a 4 °C, en rotación constante. Posteriormente se realizaron 3 lavados del complejo proteína PP2A-anticuerpo-proteína A/G agarosa con 700 µl de tampón TBS, centrifugando a 1.000 g durante 5 min y a 4 °C para descartar el sobrenadante. Tras el último lavado se añadieron 60 µl de Assay Buffer y 60 µl de la mezcla de reacción pNPP (preparados según instrucciones del fabricante) a dicho complejo, incubando las muestras durante 45 min a temperatura ambiente y en rotación constante para permitir la defosforilación del sustrato pNPP. Por último, se realizó una centrifugación de la mezcla de reacción a 1.000 g durante 5 min y a temperatura ambiente, y 80 µl de los sobrenadantes se transfirieron

Tabla 1 Oligonucleótidos específicos utilizados para la reacción de PCR

Genes	Acceso GenBank	Secuencias sentido y antisentido	Producto PCR (bp)	Ciclos amplificación
ACO	NM017340	5'-ACTATATTTGGCCAATTTGTG-3' 5'-TGTGGCAGTGGTTTCCAAGCC-3'	195	24
APRT	L04970	5'-AGCTTCCCGGACTTCCCATC-3' 5'-GACCACTTCTGCCCGGTTTC-3'	329	21-24
CYP4A1	NM175837	5'-CTGGCTTCTCCTCAAGTGGCCT-3' 5'-TTGCTTCCCCAGAACCATCGA-3'	509	25
L-PK	M11709	5'-TATGGCGGACACCTTCTGGA-3' 5'-GCTGAGTGGGGAGGTTGCAA-3'	250	21
PPARα	M88592	5'-GGCTCGGAGGGCTCTGTCATC-3' 5'-ACATGCACTGGCAGCAGTGGGA-3'	654	25

a una placa de 96 pocillos. El grado de defosforilación del sustrato en las distintas muestras se determinó por lectura de su absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Benchmark Plus, Bio Rad).

Estadística

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. Las diferencias significativas se establecieron mediante la prueba de Student's o bien mediante una ANOVA con contraste a posteriori con la prueba de comparación múltiple de Tukey. El nivel de significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

Resultados

La fructosa reduce la expresión de PPAR α y de sus genes diana en la línea celular FaO

La incubación de las células FaO con fructosa a una concentración 25 mM durante 24 h redujo un 50% los niveles de ARNm correspondientes a PPAR α (fig. 1A). Del mismo modo, la expresión de las enzimas ACO (Acil-CoA oxidasa) y CYP4A1 (citocromo P450 4A1), ambos genes diana de PPAR α , se vio reducida en un 12 y un 56%, respectivamente (figs. 1B y C).

El tratamiento de las células FaO con fructosa produce un incremento de los niveles de proteína ChREBP y de ARNm de L-PK

Al igual que sucede *in vivo*⁸, en la línea celular FaO la fructosa aumenta los niveles de proteína ChREBP en el núcleo (1,4X) (fig. 2A). Asimismo, la expresión del gen diana de ChREBP, piruvato cinasa hepática (*liver pyruvate kinase*, L-PK), se vio incrementada 1,9 veces por la adición de fructosa al medio (fig. 2B).

El efecto de la fructosa sobre PPAR α es independiente de la activación de PP2A

Está ampliamente descrito que los hidratos de carbono como la glucosa o la fructosa activan, a través de su metabolito intermediario xilulosa-5-fosfato, la proteína PP2A. Una vez activa, PP2A defosforila a ChREBP, promoviendo su localización nuclear y su unión al ADN, pudiendo activar así la transcripción de sus genes diana, como L-PK^{12,13}. Con el fin de averiguar si existe una relación entre el aumento de la actividad PP2A y el descenso de la expresión de PPAR α se utilizó un inhibidor de la proteína PP2A, el ácido okadaico, a una concentración 20 nM¹⁴.

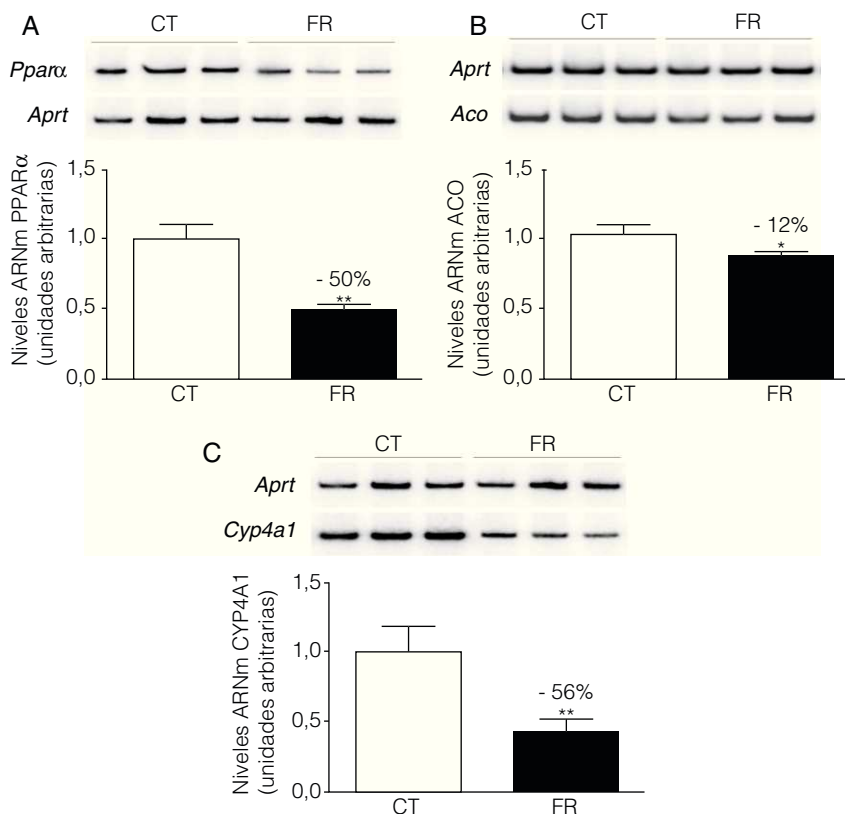


Figura 1 La fructosa reduce la expresión de PPAR α y sus genes diana en células FaO. Ensayo de RT-PCR para los genes PPAR α (A), ACO (B) y CYP4A1 (C) en células FaO incubadas en ausencia (condición control, CT) o presencia de fructosa 25 mM (condición fructosa, FR) durante 24 h. Las gráficas muestran los niveles relativos de ARNm correspondientes a cada gen, normalizados por los niveles de ARNm del gen control, APRT, y expresados como la media \pm desviación estándar para n=4 muestras por grupo de tratamiento (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a la condición control).

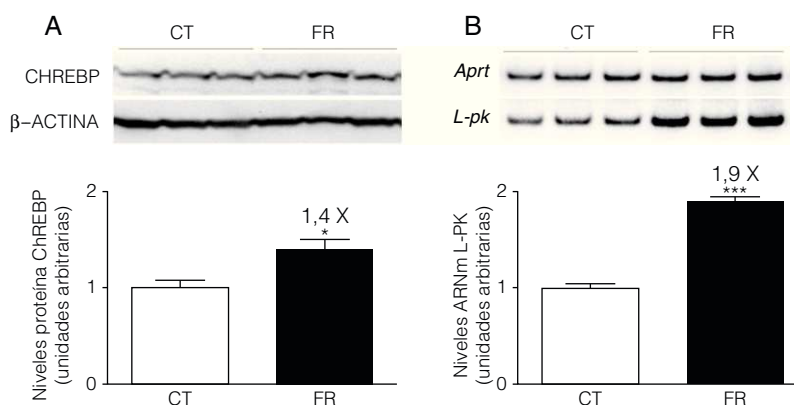


Figura 2 La fructosa aumenta la expresión de ChREBP y L-PK en células FaO. A) Gráfica de los niveles proteicos de ChREBP en extractos nucleares de células FaO incubadas en ausencia (condición control, CT) o presencia de fructosa 25 mM (condición fructosa, FR) durante 24 h. Cada barra representa la media \pm desviación estándar para $n=4$ muestras por grupo de tratamiento. En la parte superior de la gráfica se puede observar la autorradiografía representativa del ensayo de Western Blot. 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 ($*p < 0,05$ respecto a la condición control). B) Niveles relativos de ARNm de L-PK en muestras de células FaO control (CT) y fructosa (FR), determinados por la técnica de RT-PCR y normalizados por la expresión del gen APRT. Cada valor representa la media \pm desviación estándar de $n=4$ muestras por grupo, expresado en unidades arbitrarias ($***p < 0,001$ respecto a la condición control).

El tratamiento de las células FaO con fructosa aumentó un 29% la actividad de la proteína fosfatasa PP2A, mientras que la adición de ácido okadaico al medio redujo dicha actividad hasta niveles inferiores incluso a los que presentaban las células control, anulando completamente la inducción producida en presencia de fructosa (fig. 3). Por otra parte, la incubación con ácido okadaico produjo una anulación parcial (reducción del 21%) de la inducción de L-PK mediada por la fructosa (fig. 4A), pero no modificó la reducción de la expresión de PPAR α (fig. 4B). Del mismo modo, el ácido okadaico tampoco anuló el efecto de la fructosa sobre la expresión de los genes diana de PPAR α , ACO y CYP4A1 (figs. 4C y D).

Discusión

En trabajos previos^{8,9}, nuestro grupo de investigación demostró que la administración de fructosa al 10% en el agua de bebida a ratas provoca hipertrigliceridemia y esteatosis hepática. Estas manifestaciones tenían lugar como consecuencia de la reducción del catabolismo de los ácidos grasos, mediada por una reducción de la actividad transcripcional de PPAR α , junto con un incremento de la actividad transcripcional de ChREBP, asociado a un aumento de los niveles de proteína PP2A en estos animales.

Las dietas ricas en hidratos de carbono, como la glucosa y la fructosa, aumentan los niveles del metabolito xilulosa-5-fosfato. La xilulosa-5-fosfato activa la proteína fosfatasa PP2A, que a su vez defosforila a ChREBP, promoviendo su translocación al núcleo, donde activa la transcripción de sus genes diana^{12,13}.

Dado que las líneas celulares son herramientas útiles en el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales se produce una determinada alteración, se ha utilizado la línea celular de hepatoma de rata FaO para estudiar la posible implicación de la activación de PP2A en la reducción de la expresión de PPAR α y sus genes diana.

Los resultados del presente trabajo muestran que en esta línea celular se reproducen tanto el incremento de los niveles de proteína ChREBP y ARNm de L-PK, como el descenso de la expresión de PPAR α y sus genes diana —efectos característicos producidos en el hígado de ratas alimentadas con fructosa en el agua de bebida⁸— cuando estas células se incuban en presencia de fructosa 25 mM, constituyendo un buen modelo para el estudio de las alteraciones metabólicas producidas por la fructosa.

Por otra parte, los resultados obtenidos sugieren que el aumento de la expresión de ChREBP y L-PK observados

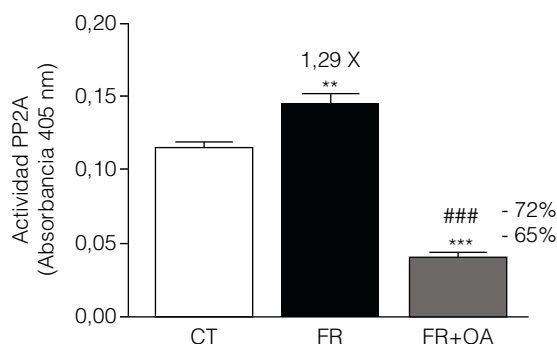


Figura 3 La actividad de la fosfatasa PP2A en células FaO aumenta por el tratamiento con fructosa, efecto que se anula por la adición de ácido okadaico en el medio de cultivo. Ensayo de actividad PP2A en células FaO incubadas en ausencia (condición control, CT), presencia de fructosa 25 mM (condición fructosa, FR) o bien en presencia de fructosa 25 mM y ácido okadaico 20 nM (condición fructosa + ácido okadaico, FR+OA) durante 24 h. La gráfica muestra la absorbancia a 405 nm del sustrato defosforilado por PP2A, expresada como la media \pm desviación estándar para $n=4$ muestras por grupo de tratamiento ($**p < 0,01$ y $***p < 0,001$ respecto a la condición control; $###p < 0,01$ respecto a la condición fructosa).

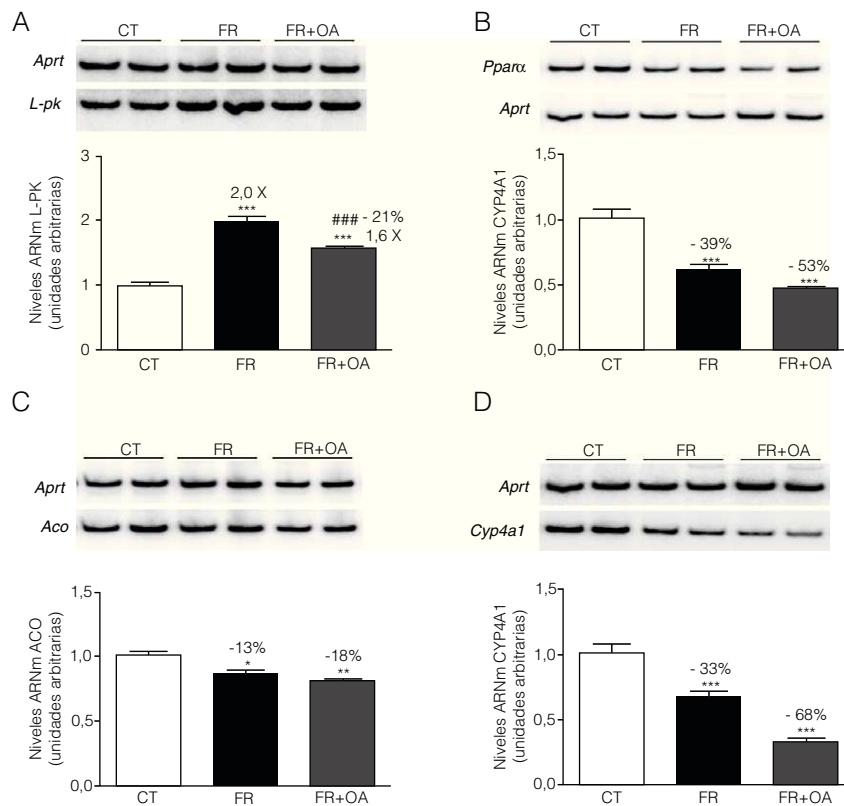


Figura 4 El ácido okadaico anula de forma parcial el efecto de la fructosa sobre la expresión de L-PK, pero no modifica la represión de PPAR α y sus genes diana. Ensayo de RT-PCR para los genes L-PK (A), PPAR α (B) ACO (C) y CYP4A1 (D) en células FaO incubadas en ausencia (condición control, CT), presencia de fructosa 25 mM (condición fructosa, FR), o bien en presencia de fructosa 25 mM y ácido okadaico 20 nM (condición fructosa + ácido okadaico, FR + OA) durante 24 h. Las gráficas muestran los niveles relativos de ARNm correspondientes a cada gen, normalizados por los niveles de ARNm del gen control, APRT, expresados como la media \pm desviación estándar para $n = 4$ muestras por grupo de tratamiento (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto a la condición control; ### $p < 0,01$ respecto a la condición fructosa).

por el tratamiento con fructosa es parcialmente independiente del incremento en la actividad de la proteína PP2A. Confirmando esta teoría, la incubación de las células FaO con fructosa aumenta la actividad de dicha fosfatasa en un 29%, y la adición de ácido okadaico —conocido inhibidor de PP2A— al medio de cultivo, aunque anula la inducción de la actividad PP2A, solo atenúa parcialmente la inducción de L-PK mediada por la fructosa. Aun en presencia de ácido okadaico, la fructosa continúa aumentando la expresión de L-PK, lo que sugiere la existencia de un mecanismo adicional e independiente de PP2A por el cual la fructosa incrementa la expresión de dicha enzima. En este sentido, la fosfatasa PP2A regula la actividad transcripcional de ChREBP a través de su defosforilación, pero existen otras modificaciones postraduccionales de ChREBP, tales como la acetilación o la acetil-glucosaminación, que aumentan su capacidad de unión al ADN y su actividad transcripcional^{15,16}. De este modo, cabe la posibilidad de que la fructosa promueva dichas modificaciones postraduccionales, contribuyendo a la inducción de L-PK.

Ravnskjaer et al.¹⁷ describieron que la glucosa disminuía la expresión de PPAR α en células β pancreáticas a través de la activación de PP2A. Sin embargo, con el presente trabajo se demuestra que este no es el mecanismo por el cual la fructosa reduce la expresión de PPAR α en células hepáticas,

ya que la expresión de dicho factor de transcripción y de sus genes diana no se ve afectada por la adición de ácido okadaico al medio de tratamiento. Recientemente, Boergesen et al.¹⁸ han descrito que el aumento de la actividad del factor de transcripción ChREBP conduce a la represión de PPAR α en células β pancreáticas. Siguiendo con la hipótesis planteada anteriormente, la fructosa, a través de modificaciones postraduccionales independientes de la activación de PP2A, podría estar aumentando la actividad transcripcional de ChREBP, conduciendo a una menor expresión de PPAR α y sus genes diana. No obstante, se requieren más estudios para confirmar que este mecanismo molecular sea el responsable de la represión de PPAR α mediada por la fructosa en el hígado.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el MICINN, proyecto SAF2010-15664.

Autoría

M. Alegret y J.C. Laguna contribuyeron al diseño del presente estudio. La obtención de los resultados

experimentales fue llevada a cabo por A. Rebollo y N. Roglans. Todos los autores contribuyeron a la interpretación de los resultados obtenidos. La redacción y la revisión del manuscrito fueron realizadas por A. Rebollo, M. Alegret y J.C. Laguna.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. 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.
2. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1370–5.
3. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:911–22.
4. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7:251–64.
5. 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.
6. Bantle JP, Raatz SK, Thomas W, Georgopoulos A. Effects of dietary fructose on plasma lipids in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:1128–34.
7. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest*. 2009;119:1322–34.
8. Roglans N, Vila L, Farre M, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, et al. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology*. 2007;45:778–88.
9. Vila L, Roglans N, Alegret M, Sanchez RM, Vazquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology*. 2008;48:1506–16.
10. Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 1991;19:2499.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248–54.
12. Kabashima T, Kawaguchi T, Wadzinski BE, Uyeda K. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:5107–12.
13. Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab*. 2006;4:107–10.
14. Boudreau RT, Hoskin DW. The use of okadaic acid to elucidate the intracellular role(s) of protein phosphatase 2A: lessons from the mast cell model system. *Int Immunopharmacol*. 2005;5:1507–18.
15. Bricambert J, Miranda J, Benhamed F, Girard J, Postic C, Dentin R. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-dependent hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:4316–31.
16. Guinez C, Filhoulard G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, et al. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. 2011;60:1399–413.
17. Ravnskjaer K, Boergesen M, Dalgaard LT, Mandrup S. Glucose-induced repression of PPARalpha gene expression in pancreatic beta-cells involves 3 PP2A activation and AMPK inactivation. *J Mol Endocrinol*. 2006;36:289–99.
18. Boergesen M, Poulsen LC, Schmidt SF, Frigerio F, Maechler P, Mandrup S. ChREBP mediates glucose repression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 2011;286:13214–25.