

Reducción en la actividad de transactivación y transrepresión de PPAR α en un modelo experimental de síndrome metabólico por fructosa dietética

Núria Roglans, Laia Vilà y Juan Carlos Laguna

Unidad de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

Introducción. Dietas ricas en fructosa producen, en roedores, hipertrigliceridemia y esteatosis hepática. En el presente estudio, quisimos valorar cómo afectaba la administración de este hidrato de carbono a la actividad hepática de transactivación y transrepresión del receptor activado por proliferadores peroxisómicos α (PPAR α).

Material y métodos. Se aleatorizó a 24 ratas Sprague-Dawley en 3 grupos de tratamiento: control, fructosa y glucosa (10% peso/volumen [p/v] hidrato de carbono en agua de bebida, durante 14 días). En plasma se valoraron los valores de triglicéridos, ácidos grasos libres, glucosa, insulina y leptina. En tejido hepático se determinó: contenido de triglicéridos, actividad de betaoxidación de los ácidos grasos, valores de expresión (ARN mensajero, proteína y actividad de unión proteína-ADN) de los genes objeto de nuestro estudio.

Resultados. La administración de fructosa produjo un incremento de 1,9 y 1,8 veces en los valores de triglicéridos plasmáticos y hepáticos, respectivamente. Las concentraciones de leptina se

incrementaron 2,4 veces en estos animales, sin que apareciera hiperglucemia ni resistencia a la insulina. La actividad de transactivación de PPAR α se redujo, así como la actividad de betaoxidación hepática de los ácidos grasos (48%). La actividad de transrepresión de PPAR α también se redujo en estos animales, y se produjo un incremento del 30% en la actividad del factor NF- κ B en las ratas fructosa frente a animales control. Estos resultados no se observaron tras la administración de glucosa; no obstante, los 2 hidratos de carbono modificaron de forma similar la expresión hepática de factores de transcripción y enzimas clave implicados en la síntesis de ácidos grasos.

Conclusiones. La hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática inducida por la ingesta de fructosa son el resultado de una reducción en el catabolismo hepático de los ácidos grasos asociado a un déficit de actividad PPAR α .

Palabras clave:

Hipertrigliceridemia. Esteatosis hepática. Leptina. Fructosa. PPAR α .

REDUCTION IN PPAR α TRANSACTIVATION AND TRANSREPRESSION ACTIVITY IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF METABOLIC SYNDROME INDUCED BY DIETARY FRUCTOSE

Introduction. In rodents, high-fructose diets induce hypertriglyceridemia and hepatic steatosis. In the present study, we investigated whether fructose administration modulates the transactivating and transrepressing activity of the

Este trabajo ha sido financiado en parte por Red Temática FIS G03/181 y una Beca de Investigación Básica SEA/FEA 2005.

Correspondencia: Dr. J.C. Laguna.
Unidad de Farmacología. Departamento de Farmacología y Química Terapéutica.
Avda. Diagonal, 643. 08028 Barcelona. España.
Correo electrónico: jclagunae@ub

Recibido el 27-9-2006 y aceptado el 2-10-2006.

hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α).

Material and methods. Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomized to 3 treatment groups: control, fructose and glucose groups (10% w/v carbohydrate in drinking water for 14 days). Plasma levels of triglycerides, non-esterified fatty acids, glucose, insulin, and leptin were measured. Triglyceride content, fatty acid β -oxidation activity, and expression (mRNA levels, AND protein and DNA-protein binding activity) of the studied genes were determined in liver samples.

Results. Fructose administration produced a 1.9 and 1.8-fold increase in plasma and hepatic triglyceride levels, respectively. Leptin levels were increased 2.4-fold in these animals, without hyperglycemia or insulin resistance. Both PPAR α transactivating activity and hepatic fatty acid β -oxidation activity (48%) were reduced in fructose-administered rats. The transrepressing activity of PPAR α was also reduced and, as a consequence, nuclear factor kB activity was increased (30%) in fructose-fed rats compared with that in control animals. These changes were not observed in glucose-administered rats, although both carbohydrates produced similar changes in hepatic expression of the transcription factors and enzymes involved in fatty acid synthesis.

Conclusions. Hypertriglyceridemia and hepatic steatosis induced by fructose intake result from reduced hepatic catabolism of fatty acids associated with deficient hepatic PPAR α activity.

Key words:

Hypertriglyceridemia. Hepatic steatosis. Leptin. Fructose. PPAR α .

Introducción

La prevalencia del síndrome metabólico está incrementándose a nivel mundial¹, con un aumento paralelo del riesgo de desarrollar diabetes mellitus y enfermedad cardiovascular, así como de la mortalidad asociada a estas enfermedades². Aunque es poco factible que exista una causa única de esta tendencia, factores ambientales (dieta, actividad física, estrés, etc.), junto con factores genéticos de predisposición se encuentran probablemente involucrados. Paralelamente al incremento en el consumo de energía total producido durante las últimas décadas, se ha producido también en todo el mundo un cambio en el tipo de nutrientes consumidos, con un consumo aumentado de fructosa, sobre todo debido a la mayor ingesta de refrescos y otros

tipos de bebidas con un alto contenido en fructosa³. Una vez absorbida, la fructosa dietética es captada mayoritariamente por el hígado, en donde promueve la síntesis de triglicéridos y la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Sin embargo, la modificación en la síntesis de ácidos grasos no explica en su totalidad la elevada producción de triglicéridos⁴. En consecuencia, no conocemos en su totalidad los mecanismos que causan la alteración en el metabolismo lipídico hepática producida por dietas ricas en fructosa.

La rata es un buen modelo para estudiar el metabolismo humano de la fructosa⁵. Una dieta rica en fructosa induce en la rata alteraciones metabólicas similares a las encontradas en el síndrome metabólico, por lo que la rata alimentada con fructosa es un modelo aceptado de síndrome metabólico. Sin embargo, mientras que los diseños experimentales que utilizan proporciones de fructosa del 50% o superiores en dietas sólidas inducen hipertrigliceridemia y una marcada resistencia a la insulina^{6,7}, las dietas que incorporan fructosa al 10% (peso/volumen) en el agua de bebida por períodos cortos inducen hipertrigliceridemia e hígado graso, sin modificar los valores plasmáticos de glucosa e insulina^{8,9}. Dado que es bien conocido que tanto los valores elevados de hidratos de carbono como la hiperinsulinemia crónica incrementan la síntesis lipídica hepática y la producción de VLDL¹⁰, escogimos la segunda aproximación dietética (fructosa al 10% peso/volumen [p/v] en el agua de bebida) para examinar los efectos de la fructosa en el metabolismo hepático de los ácidos grasos sin la interferencia producida por los efectos de la hiperinsulinemia.

En estudios previos utilizando este mismo modelo experimental hemos demostrado que la administración de fructosa a ratas produce una marcada reducción en la betaoxidación hepática de ácidos grasos y en los valores de ARN mensajero (ARNm) para el receptor activado por proliferadores peroxisómicos α (PPAR α)⁹. En el presente trabajo, demostramos que la administración de fructosa al 10% (p/v) en el agua de bebida de ratas reduce la actividad de transactivación y transrepresión de PPAR α , sin que se afecten los valores hepáticos de proteína PPAR α . Como consecuencia, la fructosa deprime la oxidación hepática de ácidos grasos e incrementa la actividad del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B. Estos cambios no se observaron en ratas a las que se administró glucosa al 10% (p/v) en el agua de bebida. Dado que la ingestión de ambos hidratos de carbono produjo cambios similares en la expresión hepática de factores de transcripción y enzimas impli-

cados en la síntesis de ácidos grasos, concluimos que la hipertrigliceridemia y la esteatosis hepática inducidas por la ingestión de fructosa son consecuencia de la reducción en el catabolismo de ácidos grasos.

Material y métodos

Animales y diseño experimental

Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley (Criffa, Barcelona) que se mantuvieron durante 5 días con agua y comida ad libitum, a temperatura y humedad constante, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Tras el período de aclimatación, los animales se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos de 8 animales cada uno: un grupo control, un grupo suplementado con fructosa (fructosa) y un grupo suplementado con glucosa (glucosa). Ambos hidratos de carbono se administraron en el agua de bebida en forma de solución al 10% (peso/volumen) durante 2 semanas. Los animales control no recibieron ningún suplemento de hidratos de carbono. Se sacrificó a los animales por decapitación bajo anestesia por uretano entre las 9-10 horas. Todo el proceso se realizó de acuerdo con la guía establecida por el Comité de Bioética de la Universidad 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 recolectaron en el momento del sacrificio en tubos con EDTA al 5%; el plasma se obtuvo por centrifugación y se conservó a -80°C hasta su utilización. Los hígados de las ratas se extrajeron y perfundieron en tampón 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 30 mM EDTA, 50 mM KH_2PO_4 , pH 7,4; 0,5 g de tejido hepático de cada rata se homogenizó en el mismo tampón para obtener la fracción de sobrenadante posnuclear, que se conservó a -80°C hasta su utilización; se congeló 10-100 mg de tejido hepático en N_2 líquido de forma inmediata y conservados a -80°C , hasta su utilización para la extracción del ARN total. Dos muestras adicionales de tejido hepático (250 mg) se conservaron 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, glucosa, insulina y leptina

Las concentraciones plasmáticas de triglicéridos, ácidos grasos libres (AGL) y glucosa se midieron mediante los ensayos colorimétricos de Wako Chemicals GmbH (Neuss, West Germany) Triglyceride L-Type, NEFAC y Glucose kit, respectivamente. La concentración plasmática de insulina y de leptina se determinó por radioinmunoanálisis (RIA) usando los kits comerciales RPA547 de Amersham Biosciences Europe GMBH y RL83K de Linco Research (Missouri, USA), respectivamente. Los lípidos hepáticos se extrajeron y midieron según se describe previamente⁹.

Ensayos enzimáticos

La actividad hepática de betaoxidación de ácidos grasos se determinó según el método descrito previamente¹¹, utilizando 30 μg del sobrenadante posnuclear como muestra.

Preparación y análisis del ARN

El ARN total se aisló mediante el reactivo Ultraspec (Biotech, Houston, USA), 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 previamente⁹. El ADNc monohebra se sintetizó a partir de 1 μg de ARN total hepático, utilizando como cebadores 125 ng de hexámeros aleatorios y 200 U M-MLV-Reverse-Transcriptase (RT) en un tampón 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), con 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM DTT, 20 U RnaseOut y 500 μM de cada dNTP en un volumen total de 20 μl . La reacción de RT se realizó durante 60 min a 37°C . La reacción de PCR se realizó utilizando una alícuota de 5 μl de la mezcla de reacción de RT, 0,5 μg de cada uno de los cebadores sentido y antisentido, 200 μM dNTPs, 1 U Taq DNA polimerasa y 1,25 μCi a-[^{32}P]-dATP en 20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 2,5 mM MgCl_2 (volumen final de 50 μl). Para evitar anillamientos inespecíficos, el ADNc y la Taq polimerasa los dNTPs se separaron de los cebadores mediante un tapón de parafina. En la fase de desnaturalización inicial, la parafina funde a 60°C , lo que permite la mezcla de los componentes de la reacción. La reacción de PCR se realizó en un aparato MJ Research Thermocycler equipado con un sistema Peltier y sonda de temperatura. Después de la desnaturalización de los cebadores y el ADNc a 94°C durante 1 min, el programa cíclico se realizó como sigue: 92°C durante 1 min, 60°C (63°C para SREBP-1C) durante 1 min y 15 s y 72°C durante 1 min y 50 s. En el último ciclo, se realizó una extensión final de 5 min a 72°C . Para confirmar la ausencia de contaminación, en cada experimento se incluyeron controles negativos. Se han realizado experimentos preliminares para determinar las condiciones de amplificación exponencial para todos los genes estudiados, calculando el rango de número de ciclos entre los cuales se produce una relación lineal entre el ARN incorporado y el producto final. Para el conjunto de cebadores, se realizó una progresión de ciclos de PCR (con el resto de las condiciones fijas), a fin de determinar el número óptimo de ciclos. El mismo procedimiento se siguió para determinar las concentraciones de ARN¹². Se utilizó la adenosina fosforribosil transferasa (APRT) como control interno, coamplificando con las secuencias valoradas en el mismo tubo, excepto en el caso de la ácido graso sintasa (FAS), esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD1), piruvato cinasa hepática (LPK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6PC). Estas secuencias se amplificaron en paralelo con APRT, en duplicado y en tubos separados. El número de ciclos, las secuencias de los cebadores y los productos resultantes de PCR se muestran en la tabla 1. Se sometieron 5 μl de cada mezcla de reacción de PCR a electroforesis al 5% en gel de poliacrilamida en 1xTBE. Los geles se secaron, se autorradiografiaron en película RX-OMAT S Kodak, y se cuantificaron por rastreo vídeo-densitométrico (programa IMAT program, Servicios Científico Técnicos, Universidad de Barcelona). Los valores de ARNm siempre se expresaron en función de su relación con los valores de ARNm para APRT.

Aislamiento de los extractos nucleares y de la proteína total

Los extractos nucleares se aislaron por el método de Helenius¹³, con algunas modificaciones. Brevemente, los tejidos hepáticos se pesaron y homogenizaron en un homogenizador Potter Elvehjem en 4 volúmenes (p/v) de tampón hipotónico que contenía 0,25 M sacarosa, 10 mM Hepes, pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (0,2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0,5 mM ditiotretitol, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinina, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptina, 100 mM NaF y 1 mM ortovanadato). Los homogenizados se incubaron en hielo 10 min y se centrifugaron a 25.000 \times g durante 15 min. Los *pellets* se lavaron con 4V del mismo tampón hipotónico y se cen-

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos usados para la reacción de PCR

	N.º GenBank™	Secuencias específicas	Producto de PCR (bp)	Ciclos amplificación
APRT	L04970	Forward: 5'-AGCTTCCCGGACTTCCCATC-3' Reverse: 5'-GACCACTTTCTGCCCGGTTTC-3'	329 bp	23
ChREBP	AB074517	Forward: 5'-CCCGGATTCGGACTCGGATAC-3' Reverse: 5'-TGAGTGTCCGATCGATGCTGC-3'	200 bp	23
FAS	M76767	Forward: 5'-GTCTGCAGCTACCCACCCGTG-3' Reverse: 5'-CTTCTCCAGGGTGGGGACCAG-3'	214 bp	20
GK	J04218	Forward: 5'-AGAAGGAGATGGACCGTGGCC-3' Reverse: 5'-TCCCTTCTGCTCCAGCGGCT-3'	421 bp	23
L-CPT-I	L07736	Forward: 5'-TATGTGAGGATGCTT-3' Reverse: 5'-CTCGGAGAGCTAAGCTTG-3'	629 bp	23
LPK	M11709	Forward: 5'-TATGGCGGACACCTTCTGGA -3' Reverse: 5'-GCTGAGTGGGAGGTTGCAAA-3'	250 bp	23
PPAR α	M88592	Forward: 5'-GGCTCGGAGGGCTCTGTATC-3' Reverse: 5'-ACATGCACTGGCAGCAGTGG-3'	654 bp	23
SCD1	J02585	Forward: 5'-GCTCATCGCTTGTGGAGCCAC-3' Reverse: 5'-GGACCCAGGAAACCAGGAT-3'	521 bp	18
SREBP1C	L16995	Forward: 5'-TCACAGATCCAGCAGTCCCC-3' Reverse: 5'-GGTCCCTCCACTCACCAGGT-3'	180 bp	23

trifugaron a 10.000 \times g durante 10 min. Los *pellets* resultantes se resuspendieron con 2 volúmenes de tampón 20 mM Hepes, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 25% glicerol que contenía los mismos inhibidores de proteasas y fosfatasa antes mencionados. Posteriormente, se añadió gota a gota un volumen de tampón rico en sales (20 mM Hepes, pH 7,9, 1,5 mM MgCl₂, 1,2 M KCl, 0,2 mM EDTA, 25% glicerol e inhibidores de proteasas y fosfatasa) y se mantuvo la suspensión en agitación durante 30 min. Tras centrifugación a 25.000 \times g durante 30 min. Se guardaron los sobrenadantes a -80 °C hasta su utilización. Todo el proceso se llevó a cabo a 4 °C. La proteína posnuclear se obtuvo por homogeneización de 200 mg de tejido hepático en un tampón 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaF, 1% Igepal, 0,1 μ g/ml ácido ocaído, 1 mM ortovanadato, 1 mM PMSF y 2 μ g/ml leupeptina. Los homogenizados se mantuvieron 30 min a 4 °C y se centrifugaron a 15.000 \times g durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes se guardaron en alícuotas a -80 °C. La cuantificación de la concentración proteica de cada fracción se realizó mediante el método de Bradford¹⁴.

Ensayo de retardación de la movilidad electroforética (EMSA)

Las secuencias de los oligonucleótidos de doble cadena utilizadas fueron las siguientes: oligonucleótido *consensus* del factor nuclear κ B (NF- κ B) 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' (Promega, Madison, USA); elemento de respuesta a PPAR (PPRE situado en la posición -266 /-290 del promotor del gen de la L-CPTI) 5'-AGTACGGGCATGGAGCAAAGAGCT-3'. Se marcaron radiactivamente los oligonucleótidos mediante la siguiente reacción: 2 μ l de cada oligonucleótido (1,75 pmol/ μ l), 2 μ l del tampón cinasa 5, 5 U de la enzima T4 polinucleótido cinasa y 3 μ l de [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol a 10 mCi/ml, Amersham) incubado a 37 °C durante 2 h. La reacción se paró añadiendo 90 μ l de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 y 1 mM EDTA). Para separar la sonda marcada del ATP no unido se eluyó la mezcla de reacción en una columna Nick (Pharmacia, Sant Cugat, España) siguiendo las instrucciones del fabricante; 8 μ g de extracto nuclear se incubaron durante 10 min en hielo con el tampón de unión (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 25 mM KCl, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA, pH 8,0, 5% glicerol, 5

mg/ml BSA y 50 μ g/ml poly(dI-dC)) en un volumen final de 15 μ l. La sonda marcada (aproximadamente 60.000 cpm) se añadió a la reacción y se incubó 20 min a temperatura ambiente (NF- κ B a 4 °C). En los ensayos de competición se incubó 15 min en hielo con el oligonucleótido específico no marcado antes de añadir la sonda marcada radiactivamente. En los ensayos de superretardación, los anticuerpos específicos se añadieron antes de la sonda marcada y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Los complejos proteína-ADN se sometieron a electroforesis a 4 °C en un gel de poliacrilamida del 5% y posteriormente se realizó una autorradiografía. Los anticuerpos de PPAR α , RXR α , P65 y Oct-1 (octamer motif-1 transcription factor) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Ensayos de Western blot

Treinta μ g de sobrenadante posnuclear (para el precursor de SREBP1c) o 40 μ g de extracto nuclear (para PPAR α , SREBP1c maduro y ChREBP) procedentes de hígado de rata se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 10% (8% para SREBP1c). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana Immobilon polyvinylidene difluoride (PVDF) (Millipore, a Bedford, MA) y se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con un 5% de leche en polvo desnatada en TBS-0,1% Tween-20. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios: anti-PPAR α (dilución 1:1000)¹⁵, anti-SREBP1 (ambas formas a dilución 1:200) y anti-ChREBP (dilución 1:500) en solución de bloqueo a 4 °C durante toda la noche. Seguidamente, y tras varios lavados, se incubaron las membranas con los correspondientes anticuerpos secundarios (dilución 1:3000). La detección se realizó usando el *kit* de quimiluminiscencia ECL de Amersham Biosciences. Como control de carga se tiñeron las membranas con rojo Ponceau S¹⁶. El tamaño de las proteínas detectadas se estima gracias a los marcadores de peso molecular (Invitrogen, Life Technologies). Todos los anticuerpos son de Santa Cruz Technologies.

Coinmunoprecipitación

Cincuenta μ g de extracto nuclear se incubaron con 4 μ g de anticuerpo anti-p65 en un volumen final de 0,5 ml en tampón

Tabla 2. Análisis de lípidos, glucosa, insulina y leptina. Valores de ingesta, bebida y peso corporal

	Control	Fructosa	Glucosa
Triglicéridos (mg/dl)	101 \pm 13	190 \pm 48 ^a	90,8 \pm 24
Triglicéridos hepáticos (mg TG/g prot)	33,5 \pm 5,1	61,2 \pm 19,2 ^b	43,3 \pm 6,2
Leptina (ng/ml)	1,44 \pm 0,2	3,45 \pm 1,66 ^c	1,98 \pm 0,83
Glucosa (mg/dl)	124 \pm 15	130 \pm 14	132 \pm 22
Insulina (ng/ml)	2,41 \pm 0,65	2,15 \pm 0,64	1,90 \pm 0,61
AGL (μ mol/l)	365 \pm 50	428 \pm 94	526 \pm 102 ^c
Ingesta (ABC) (g/14 días/jaula)	633 \pm 33	551 \pm 17 ^b	496 \pm 43 ^a
Bebida (ABC) (ml/14 días/jaula)	779 \pm 119	1.896 \pm 332 ^b	1.899 \pm 324 ^b
Peso final (ABC) (g/14 días/rata)	3.568 \pm 151	3.556 \pm 180	3.460 \pm 138

Resultados expresados como media \pm desviación estándar para n= 6 animales por grupo de tratamiento. La ingesta y la bebida se expresan como la media \pm desviación estándar por jaula de 2 animales. ^ap < 0,01; ^bp < 0,001; ^cp < 0,05.

PBS (10 mM) y 2% de albúmina (BSA) durante 6 h a 4 °C. Los inmunocomplejos se obtuvieron incubando las muestras con una suspensión de proteína A-agarosa (Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4 °C y en agitación constante. Los *pellets* de proteína A-agarosa se recogieron tras centrifugarlos y se lavaron 3 veces con PBS e inhibidores de proteasas. Tras la última centrifugación los *pellets* se resuspendieron con 60 μ l de tampón de carga y se hirvieron a 100 °C durante 5 min. Una alícuota del sobrenadante se sometió a electroforesis al 10% SDS y se prosiguió con el Western blot usando como anticuerpo primario el anti-PPAR α .

Estadística

Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar. Las muestras de plasma se analizaron por duplicado. Las diferencias estadísticamente significativas se valoraron mediante la prueba de la t de Student para muestras no apareadas o la prueba de ANOVA (con análisis a posteriori), usando el programa informático GraphPad InStat (GraphPad Software V2.03). Cuando el número de muestras era pequeño o las varianzas eran no homogéneas se aplicó una prueba no paramétrica (prueba de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis). Se consideró significación estadística un valor de p < 0,05.

Resultados

Las ratas alimentadas con fructosa son hipertriglicéridémicas e hiperleptinémicas y muestran esteatosis hepática en comparación a las ratas alimentadas con glucosa, aun consumiendo la misma cantidad de energía. Tras 14 días de ingestión de hidratos de carbono, las ratas alimentadas con fructosa mostraron un incremento de 1,9 y 2,4 veces en los valores de triglicéridos y leptina plasmáticos, respectivamente. El contenido hepático de triglicéridos también se vio incrementado en estos animales (1,8 veces respecto a los animales control). La administración de glucosa al 10% en el agua de bebida no produjo estos incrementos. No obstante, ambos grupos de animales consumieron cantidades similares de dieta (13% menos de ingesta las ratas fructosa y el 22% menos las ratas glucosa frente a control) y de agua rica en hidratos de carbono (2,4 veces más en los dos grupos de ani-

males frente a grupo control). Ni el peso final de los animales, ni los valores de insulina y glucosa plasmáticos se modificaron en ningún grupo de estudio; sólo la administración de glucosa provocó un incremento en los valores de AGL que fue de 1,4 veces (tabla 2).

La fructosa y la glucosa producen cambios similares en factores de transcripción hepáticos que controlan la síntesis de ácidos grasos. Los valores de ARNm para SCD1, enzima que controla la biosíntesis hepática de ésteres de colesterol y triglicéridos¹⁷, se vieron incrementados 4 y 5,1 veces en los animales a los que se administró fructosa y glucosa, respectivamente, respecto a los animales del grupo control. El ARNm de FAS, enzima que regula la síntesis de ácidos grasos saturados¹⁸, se vio incrementado tanto en los animales tratados con fructosa como glucosa frente al grupo control (4,4 y 2,5 veces, respectivamente) (fig. 1A y B). Sin embargo, los valores de ARNm y proteína de SREBP1c, factor de transcripción clave en el control de la síntesis de ácidos grasos en el hígado¹⁹, no se modificaron en ningún grupo de tratamiento (fig. 1C y D). Los valores de ARNm de GK (glucocinasa), gen regulado directamente por SREBP1c²⁰, tampoco se vieron modificados tras la ingesta de hidratos de carbono (fig. 1E). Por el contrario, la expresión de ChREBP, otro factor de transcripción implicado directamente en la regulación transcripcional de genes lipogénicos por hidratos de carbono en el hígado¹⁹, se incrementó tras la administración de fructosa y glucosa, así como los niveles de ARNm de LPK, gen regulado directamente por ChREBP²¹, que incrementaron 2 veces en los animales a los que se administró fructosa y 3,5 veces en los tratados con glucosa con respecto las ratas control (fig. 2A y B). La activación transcripcional de ChREBP producida por los 2 hidratos de carbono incrementó de forma similar la expresión hepática de genes lipogénicos tras el tratamiento; no obstante,

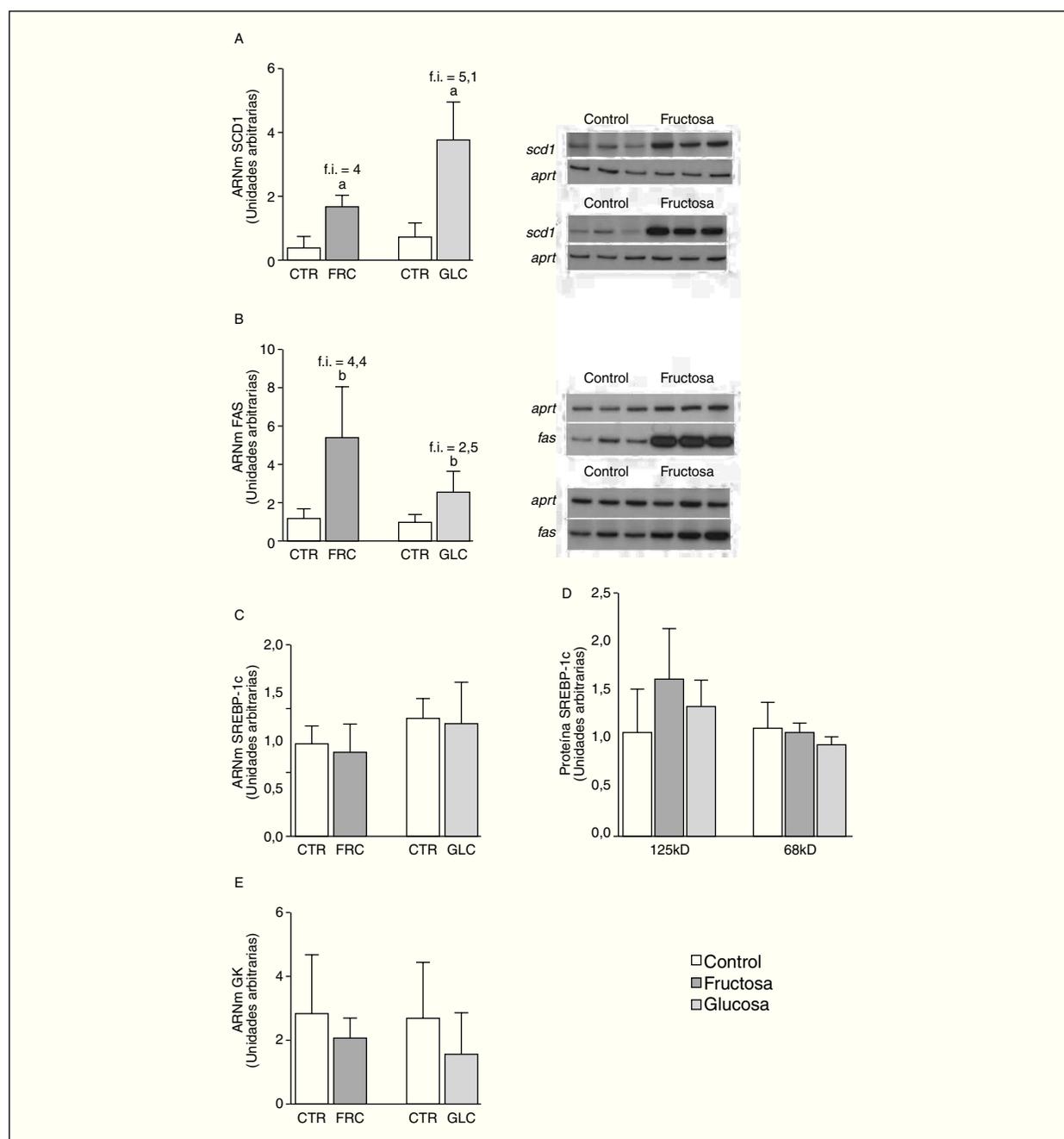


Figura 1. Niveles de expresión de enzimas clave implicadas en la síntesis de ácidos grasos y SREBP tras la administración de hidratos de carbono. A: niveles relativos de ARNm para el gen *scd1* en muestras hepáticas de animales control (CTR) y animales tratados con fructosa (FRC) y con glucosa (GLC). Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. A la derecha del gráfico se muestra una autorradiografía representativa de la determinación por RT-PCR para 3 animales CTR y 3 animales tratados con FRC y GLC. B: niveles relativos de ARNm para el gen *fas* en muestras hepáticas de animales CTR y animales tratados con FRC y GLC. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. A la derecha del gráfico se muestra una autorradiografía representativa de la determinación por RT-PCR para 3 animales control y 3 animales tratados con FRC y GLC. C: niveles relativos de ARNm para el gen *srebp-1c* en muestras hepáticas de animales CTR y animales tratados con FRC y GLC. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. D: niveles de proteína SREBP-1c, forma precursora (125 KD) y forma madura (68 KD), en muestras hepáticas de animales CTR y animales tratados con FRC y GLC. E: niveles relativos de ARNm para el gen *gk* en muestras hepáticas de animales CTR y animales tratados con FRC y GLC. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. Todos los resultados están expresados en unidades arbitrarias. ^ap < 0,001. ^bp < 0,01. ^cp < 0,05. f.i.: fold induction.

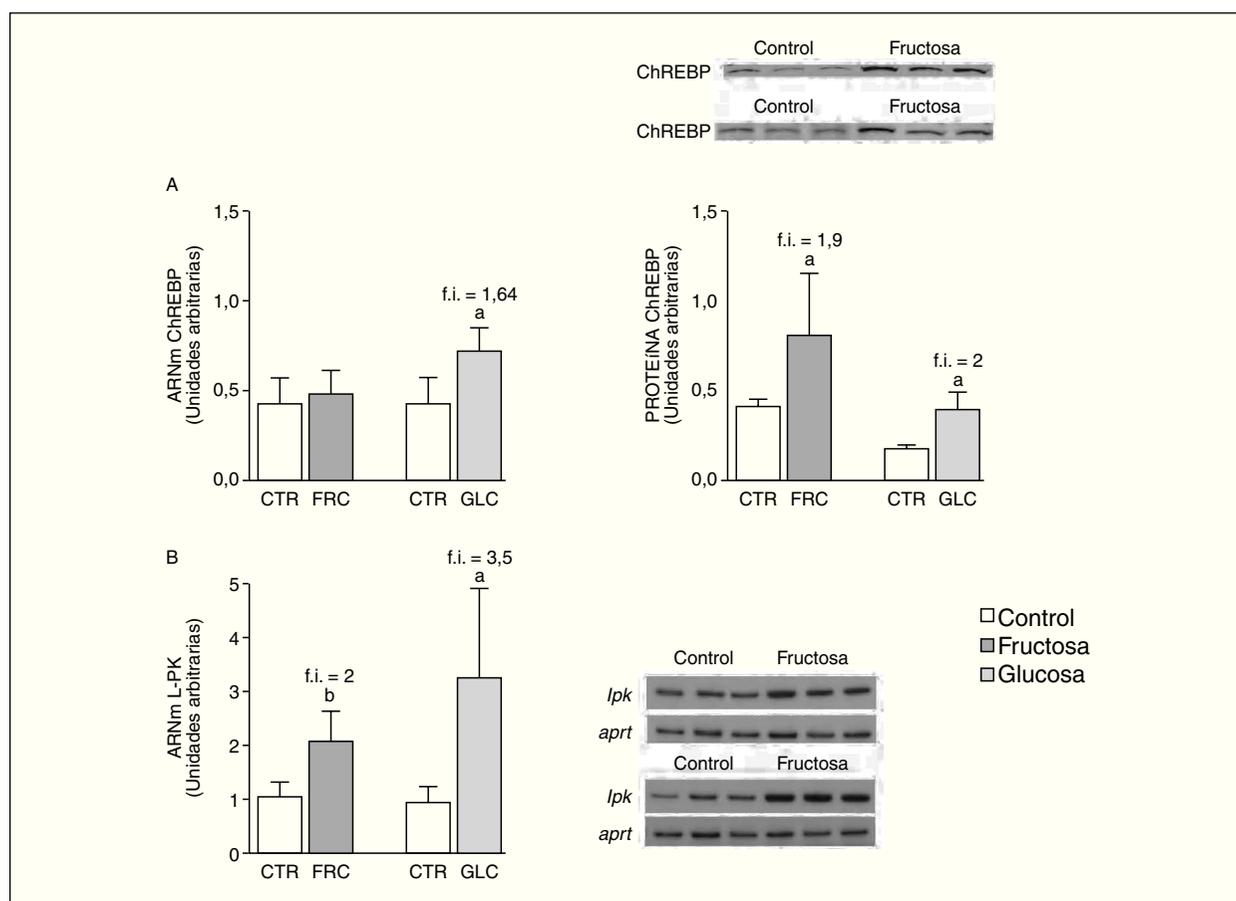


Figura 2. Niveles de expresión hepática de ChREBP y LPK tras la administración de hidratos de carbono. A: niveles relativos de ARNm y de proteína para ChREBP en muestras hepáticas de animales control (CTR) y animales tratados con fructosa (FRC) y con glucosa (GLC). Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. En la parte superior del gráfico derecho se muestra una autorradiografía representativa de la determinación, por Western blot, de los valores de proteína para 3 animales de cada grupo de tratamiento. B: niveles relativos de ARNm para el gen *lpk* en muestras hepáticas de animales CTR y animales tratados con FRC y GLC. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. En la parte derecha del gráfico se muestra una autorradiografía representativa de la determinación, por RT-PCR, para 3 animales de cada grupo de tratamiento. Todos los resultados están expresados en unidades arbitrarias. ^ap < 0,05. ^bp < 0,01. f.i.: fold induction.

sólo los animales tratados con fructosa mostraron hipertrigliceridemia y esteatosis hepática (tabla 2).

La administración de fructosa produce una marcada reducción de la actividad de betaoxidación hepática de ácidos grasos por disminución de la actividad transcripcional de PPAR α . La administración de fructosa al 10% en el agua de bebida produjo una marcada reducción de los valores de ARNm de PPAR α (46%) y de L-CPT-I (73%). Estos cambios no se observaron en los animales que bebieron glucosa (fig. 3A y B). Como consecuencia de ello, la actividad de betaoxidación hepática de los ácidos grasos disminuyó un 48% en el grupo tratado con fructosa frente al grupo control (fig. 4A). Cuando se determinaron los valores hepáticos de

proteína PPAR α no se observaron diferencias entre los animales tratados con fructosa y los controles, lo que sugiere un déficit en la actividad transcripcional de PPAR α , pero no en su expresión hepática (fig. 4B). Por ello se determinó la actividad de unión de extractos nucleares de ratas control y ratas tratadas con fructosa a un oligonucleótido PPRE presente en la región promotora del gen de la L-CPT-I. Tal y como se puede observar en la figura 4C, aparecen 3 bandas de unión específicas (I, II y III) que en presencia de un exceso de sonda no marcada desaparecen (I, II, III) o se retardan al incubarse con un anticuerpo anti-PPAR α (banda II, III); concretamente, la intensidad de la banda II se redujo un 64% y la banda III un 43% en los anima-

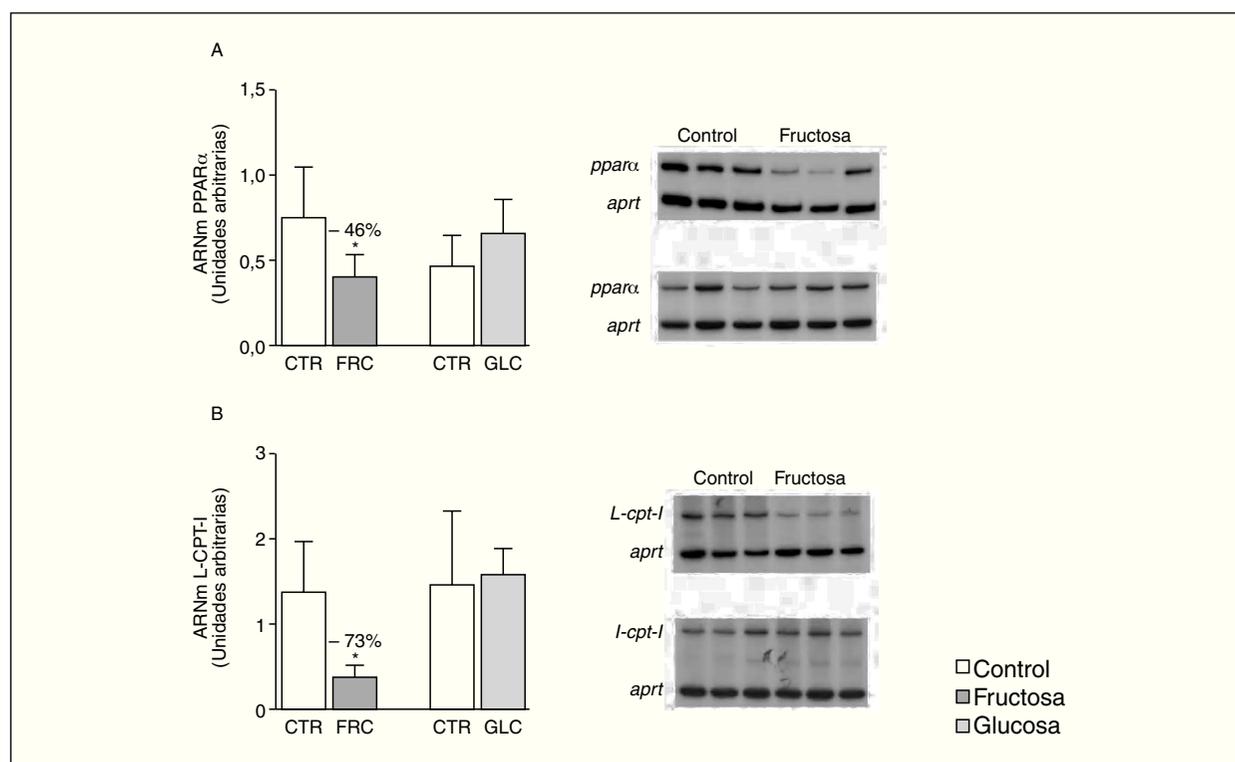


Figura 3. Determinación de los valores de ARNm para PPAR α y L-CPT-I en hígado de ratas alimentadas con hidratos de carbono. A: niveles relativos de ARNm para el gen *ppara* en muestras hepáticas de animales control (CTR) y animales tratados con fructosa (FRC) y con glucosa (GLC). Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. En la parte derecha del gráfico se muestra una autorradiografía representativa de la determinación, por RT-PCR, para 3 animales de cada grupo de tratamiento. B: niveles relativos de ARNm para el gen *l-cpt-I* en muestras hepáticas de animales CTR y animales tratados con FRC y con GLC. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. En la parte derecha del gráfico se muestra una autorradiografía representativa de la determinación, por RT-PCR, para 3 animales de cada grupo de tratamiento. Todos los resultados están expresados en unidades arbitrarias y se han normalizado por los valores de ARNm del gen control *aprt*. *p < 0,01.

les tratados con fructosa, confirmando que ésta es capaz de reducir la actividad transcripcional de PPAR α en el hígado (fig. 4C y D).

La fructosa produce una reducción de la actividad transpresora de PPAR α en el hígado. El PPAR α también puede unirse físicamente a diferentes factores de transcripción y reprimir su actividad transcripcional. El mecanismo de transrepresión implica una acción bidireccional entre PPAR α y otros factores de transcripción²². Por ello, en nuestro estudio quisimos determinar si la administración de fructosa disminuía la actividad transpresora de PPAR α , y valorar la interacción fisiológica entre PPAR α y el factor de transcripción NF- κ B en extracto nuclear de tejido hepático; el NF- κ B es una conocida diana de la actividad transpresora de PPAR α ²². Se realizaron estudios de coimmunoprecipitación (fig. 5A) que mostraron una unión de PPAR α a p65 (uno de los componentes principales de NF- κ B) menor en las ratas tratadas con fructosa

que en los animales control, lo que indica que la fructosa reduce la actividad transpresora de PPAR α . Al analizar la capacidad de unión de los extractos nucleares a un elemento de respuesta a NF- κ B, aparecieron 2 bandas específicas (I y II) que, en presencia de un exceso de sonda no marcada, desaparecen. Asimismo, al incubar con un anticuerpo anti-p65 la banda I desaparece parcialmente (fig. 5B); concretamente, la intensidad de esta banda I se incrementó un 30% en los extractos nucleares de los animales tratados con fructosa frente a los control, lo que sugiere que la activación de NF- κ B por parte de la fructosa se debe a una reducción de la actividad transpresora de PPAR α en el hígado. Estos resultados no se observaron en las ratas tratadas con glucosa (resultados no mostrados).

Discusión

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que la administración

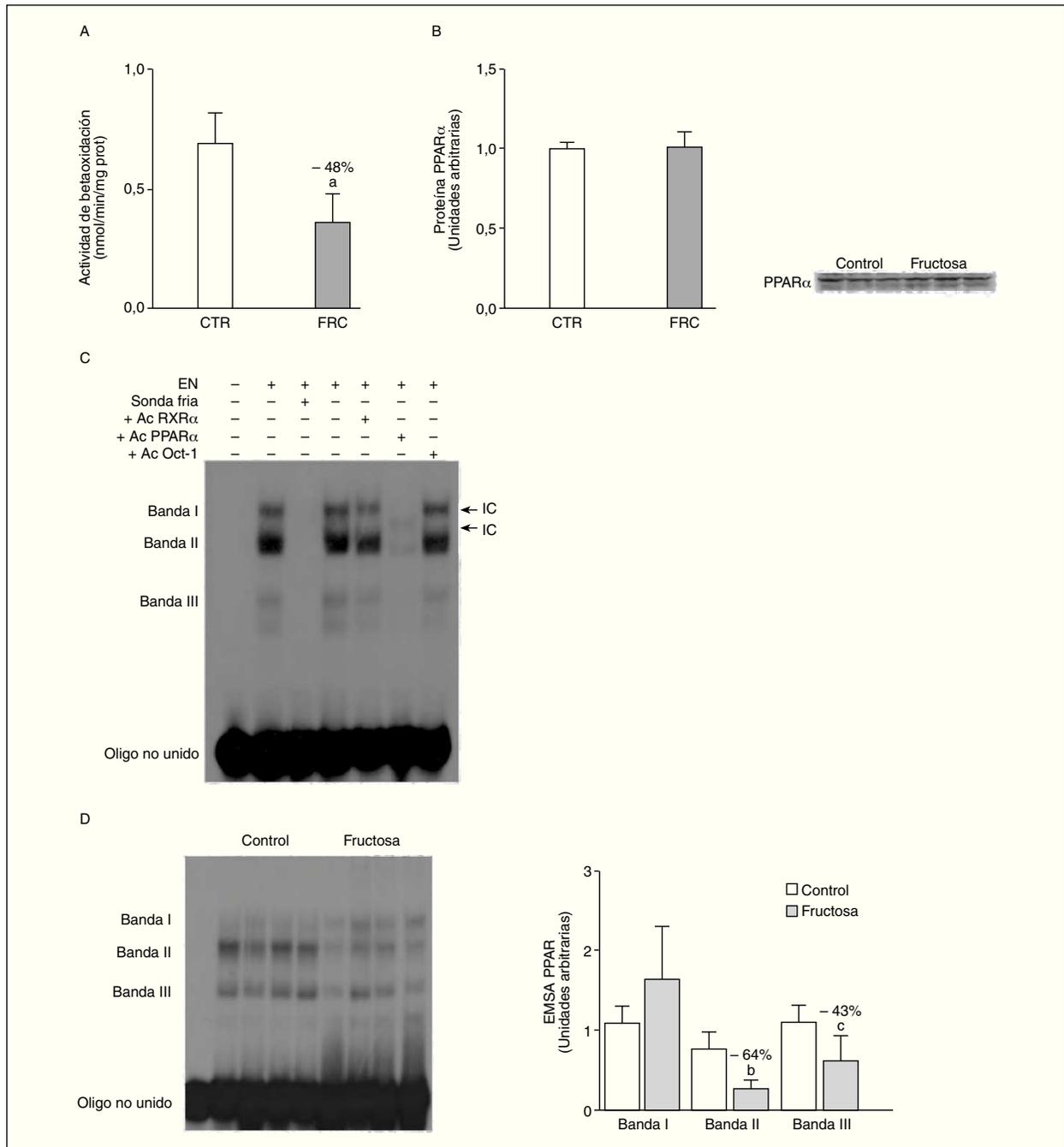


Figura 4. Efecto de la fructosa sobre la oxidación hepática de los ácidos grasos y la actividad de unión PPAR α . **A:** actividad de beta-oxidación de los ácidos grasos expresada en nmol de palmitoil-CoA oxidado/min/mig de sobrenadante posnuclear, en hígado de ratas control (CTR) y ratas tratadas con fructosa (FRC). Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. **B:** niveles relativos de proteína PPAR α en muestras hepáticas de animales y tratados con FRC. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. A la derecha del gráfico se muestra una autorradiografía representativa de la determinación, por Western blot, de los valores de proteína para 3 animales de un animal control al oligonucleótido PPRE, formando 3 bandas específicas de unión (I, II y III). El anticuerpo anti-Oct-1 se usó para demostrar que los cambios observados tras la incubación con sonda fría, anticuerpo anti-PPAR α y anti-RXR no eran interferencias inespecíficas. **D:** autorradiografía representativa del ensayo de EMSA para 4 animales CTR y 4 tratados con FRC donde se muestran las 3 bandas específicas de unión PPRE-extracto nuclear. A la derecha, gráfico con la cuantificación, en unidades arbitrarias, de la intensidad de cada una de las bandas. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. ^ap < 0,001. ^bp < 0,01. ^cp < 0,05.

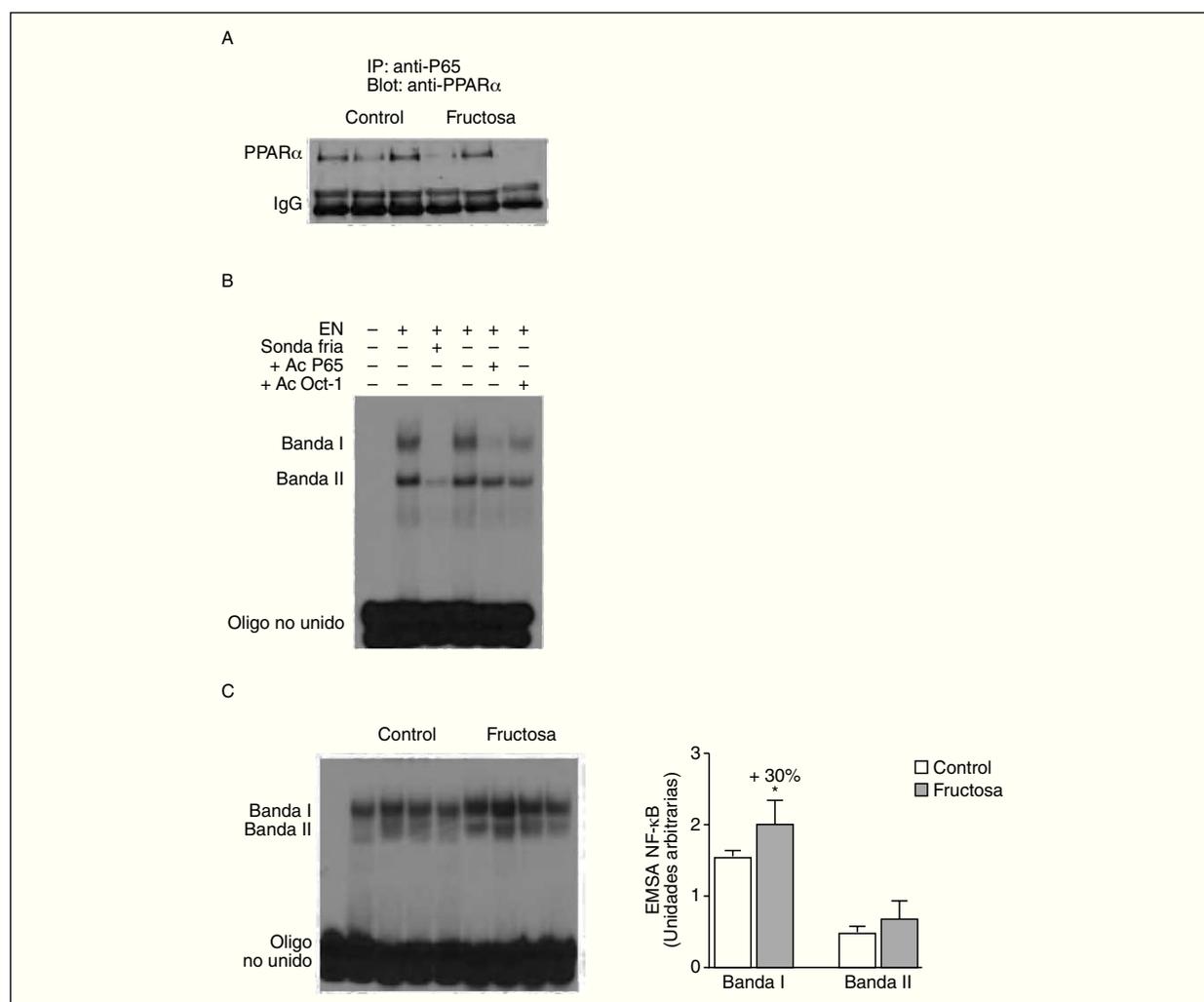


Figura 5. Efecto de la fructosa sobre la actividad transrepresora de PPAR α y NF- κ B. A: inmunoprecipitación de un anticuerpo anti-p65 con *pellets* de proteína-A-agarosa y posterior Western blot que revela un anticuerpo anti-PPAR α . Se muestra una autorradiografía representativa del Western blot para 3 animales por grupo de tratamiento. B: ensayo de EMSA donde se muestra la capacidad de unión de los extractos nucleares hepáticos de un animal control al oligonucleótido NF- κ B, formando dos bandas específicas de unión (I y II). El anticuerpo anti-Oct-1 se usó para demostrar que los cambios observados tras la incubación con sonda fría y anticuerpo anti-p65 no eran interferencias inespecíficas. C: autorradiografía representativa del ensayo de EMSA para 4 animales control y 4 tratados con fructosa donde se muestran las 2 bandas específicas de unión NF- κ B-extracto nuclear. A la derecha, gráfico con la cuantificación, en unidades arbitrarias, de la intensidad de cada una de las bandas. Los resultados corresponden a la media \pm desviación estándar para n = 6 animales por grupo de tratamiento. *p < 0,05.

de fructosa al 10% en el agua de bebida producía, en la rata, una reducción de los valores de ARNm de PPAR α y L-CPT-I hepáticos y de la actividad de betaoxidación de los ácidos grasos⁹. El presente estudio nos ha permitido confirmar los resultados previos y profundizar sobre los posibles mecanismos mediante los cuales la fructosa modifica la expresión hepática de PPAR α .

Hemos demostrado que la administración de fructosa reduce la actividad de transactivación y transrepresión de PPAR α sin modificar su conteni-

do proteico hepático. Como resultado de esta reducción en la actividad transcripcional de PPAR α , los valores de ARNm de sus genes diana, L-CPT-I²³ y el mismo PPAR α ²⁴, se redujeron. En el caso de L-CPT-I, la reducción del ARNm posiblemente está relacionada con la reducción de los valores de enzima activa y de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, proceso catabólico directamente controlado por L-CPT-I²³. La acumulación de ácidos grasos no metabolizados en el hígado (ligandos naturales de PPAR α)²⁵ es probablemente causante de

los valores constantes de proteína PPAR α que se observan en los hígados de las ratas tratadas con fructosa, a pesar de la reducción de los valores de ARNm de este gen, dado que el receptor PPAR α se estabiliza mediante unión al ligando²⁶.

La glucosa, a altas concentraciones, regula negativamente la expresión de PPAR α en células pancreáticas- β aisladas²⁷. Es posible que los diferentes efectos producidos por los 2 hidratos de carbono sobre el PPAR α en el hígado sean un fenómeno farmacocinético debido a la diferente distribución corporal y de utilización que tienen la fructosa y la glucosa. Mientras la glucosa es usada en distintos tejidos extrahepáticos como fuente de energía, incluidos el cerebro y el músculo esquelético, la fructosa es utilizada casi exclusivamente en el hígado⁵, hecho que conlleva un mayor metabolismo hepático de la fructosa frente al de la glucosa en este tejido. En concordancia, sólo los animales alimentados con glucosa mostraron un incremento de los valores de AGL plasmáticos, probablemente debido a un cambio en el consumo de ácidos grasos por glucosa como fuente de energía en músculo esquelético, principal tejido consumidor de ácidos grasos.

Nuestros resultados muestran que la administración de fructosa y glucosa en el agua de bebida produce incrementos similares en la expresión de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos y de ChREBP. Esto está en concordancia con otros estudios previos que muestran un incremento en la síntesis *de novo* de triglicéridos VLDL en ratas alimentadas con fructosa o glucosa en el agua de bebida⁸. Así, el hecho de que sólo los animales que consumieron fructosa presenten hipertrigliceridemia y esteatosis hepática podría atribuirse a la disminución de la oxidación hepática de los ácidos grasos debida al déficit de actividad PPAR α . En situaciones experimentales similares, la reducción de la expresión de PPAR α ²⁸⁻³⁰ o de su actividad transcripcional³¹ está estrechamente asociada a un incremento de los triglicéridos hepáticos y a hipertrigliceridemia.

La hiperglucemia sostenida promueve el estrés oxidativo y la activación de factores de transcripción proinflamatorios como el NF- κ B en células mononucleares³². El consumo de altas cantidades de fructosa (60% p/v en la dieta) también induce al estrés hepático y de otros tejidos junto con la resistencia a la insulina y la desregulación del metabolismo lipídico³³. Nuestros resultados indican que la ingesta de fructosa, en ausencia de resistencia a la insulina, es también capaz de producir estrés hepático mediante el incremento de la actividad NF- κ B.

Esta respuesta es consecuencia de la disminución en la actividad transrepresora de PPAR α producida por la administración del hidrato de carbono.

En las últimas décadas se viene observando una tendencia por parte de la población a aumentar el consumo energético, en forma de dietas hipercalóricas, ricas en fructosa. Este incremento coincide con una mayor prevalencia de obesidad y síndrome metabólico³. Además, la fructosa administrada en forma líquida produce una hipertrigliceridemia mayor que cuando se administra en forma de dieta sólida¹⁰. Un incremento del 10% en la ingesta de energía, en forma de hidratos de carbono, no parece ser suficiente para inducir hipertrigliceridemia a no ser que se administre en forma líquida rica en monosacáridos^{10,34}. En una revisión reciente de Bray et al³⁵ se muestra que en modelos de roedor con obesidad y resistencia a la insulina, el consumo de fructosa en el agua de bebida induce al deseo de seguir consumiendo bebidas edulcoradas, reduciendo de forma insuficiente la ingesta de comida sólida, produciendo así un balance calórico positivo y el desarrollo de obesidad. En el presente trabajo, tras 14 días de tratamiento, las ratas que consumieron fructosa no mostraron modificaciones en el incremento de su peso corporal con respecto a las ratas control, posiblemente por la corta duración del experimento; sin embargo, las ratas a las que se administró fructosa comieron menos dieta sólida (13%) que las tratadas con glucosa (22%), respecto los animales control, aun bebiendo la misma cantidad de hidratos de carbono. Nuestros resultados indican que esta situación podría explicarse por un estado de resistencia a la leptina producido por la administración de fructosa, ya que los valores plasmáticos de esta hormona se vieron fuertemente incrementados en el grupo fructosa con respecto al grupo control. Esto nos lleva a pensar que estos cambios observados tras la administración de fructosa en rata serían previos a la aparición de obesidad y resistencia a la insulina, lo que sugiere que el hígado es un órgano clave en el desarrollo de las alteraciones metabólicas producidas por el consumo de fructosa.

Bibliografía

1. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults. Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002;287:356-9.
2. Isomaa B, Almgren 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. 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.

4. Fried SK, Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2003;78 Suppl:873S-80S.
5. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 1993;58 Suppl:754S-65S.
6. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metabol.* 2002;282:E1180-E90.
7. Nagata R, Nishio Y, Sekine O, Nagai Y, Maeno Y, Ugi S, et al. Single nucleotide polymorphism (-468 Gly to Ala) at the promoter region of sterol regulatory element-binding protein-1c associates with genetic defect of fructose-induced hepatic lipogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279:29031-42.
8. Park J, Lemieux S, Lewis GF, Kuksis A, Steiner G. Chronic exogenous insulin and chronic carbohydrate supplementation increase de novo VLDL triglyceride fatty acid production in rats. *J Lipid Res.* 1997;38:2529-36.
9. Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vázquez M, Adzet T, et al. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor α expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302:232-9.
10. Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: modifying factors and implications for cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:33-40.
11. Lazarow PB. Assay of peroxisomal β -oxidation of fatty acids. *Meth Enzymol.* 1981;72:315-9.
12. Gause WC, Adamovicz J. Use of PCR to quantitate relative differences in gene expression. In: Dieffenbach CW, Dveksler GS, editors. *PCR primer. A laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1995.
13. Helenius M, Hänninen M, Lehtinen SK, Salminen A. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF κ B transcription factor in mouse cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:487-98.
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. Lemberger T, Saladin R, Vázquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, et al. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor α gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J Biol Chem.* 1996;271:1764-9.
16. Román J, Giménez A, Lluís JM, Gassó M, Rubio M, Caballeria J, et al. Enhanced DNA binding and activation of transcription factors NF κ B and AP-1 by acetaldehyde in HEPG2 cells. *J Biol Chem.* 2000;276:14684-90.
17. Miyazaki M, Kim Y-C, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem.* 2000;275:30132-8.
18. Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids.* 2004;39:1045-53.
19. Dentin R, Girard J, Postic C. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie.* 2005;87:81-6.
20. Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, et al. SREBP-1c mediates the insulin dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem.* 2004;279:30823-9.
21. Yamashita H, Takenoshita M, Sakurai M, Bruick RK, Henzel WJ, Shillinglaw W, et al. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:9116-21.
22. Planavila A, Laguna JC, Vázquez-Carrera M. Nuclear Factor kappa B activation leads to down regulation of fatty acid oxidation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2005;280:17464-71.
23. Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DT, Kelly DP. The peroxisomal proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:11012-6.
24. Gebel T, Arand M, Oesch F. Induction of the peroxisome proliferator activated receptor by fenofibrate in rat liver. *FEBS Lett.* 1992;309:37-40.
25. Reddy JK, Hashimoto T. Peroxisomal α -oxidation and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α : An adaptive metabolic system. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:193-230.
26. Hirotani M, Tsukamoto T, Bourdeaux J, Sadano H, Osumi T. Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor α by the ligand. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288:106-10.
27. Roduit R, Morin J, Massé F, Segall L, Roche E, Newgard CB, et al. Glucose down-regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor- α gene in the pan-creatic β -cell. *J Biol Chem.* 2000;275:35799-806.
28. Sanguino E, Ramón M, Michalik L, Wahli W, Alegret M, Sánchez RM, et al. Lack of hypotriglyceridemic effect of gemfibrozil and age-related changes in rat liver PPAR α . *Biochem Pharmacol.* 2004;67:157-66.
29. Costet P, Legendre C, Moré J, Edgar A, Galtier P, Pineau T. Peroxisome Proliferator-Activated receptor α -isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis. *J Biol Chem.* 1998;273:29577-85.
30. Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, et al. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). *J Biol Chem.* 1998;273:5678-84.
31. Galli A, Pinaire J, Fischer M, Dorris R, Crabb DW. The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor α is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem.* 2001;276:68-75.
32. Rudofsky Jr G, Reismann P, Schiekofer S, Petrov D, Von Eynatten M, Isermann B, et al. Reduction of postprandial hyperglycemia in patients with type 2 diabetes reduces NF- κ B activation in PBMCs. *Horm Metab Res.* 2004;36:630-8.
33. Kelley GL, Allan G, Azhar S. High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation. *Endocrinology.* 2004;145:548-55.
34. Parks EJ, Hellerstein MK. Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: historical perspective and review of biological mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:412-33.
35. 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.