

**VNiVERSiDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE FARMACiA**  
**DEPARTAMENTO DE FiSiOLOGfa Y FARMACOLOGfa**



**VNiVERSiDAD**  
**DE SALAMANCA**

**TESiS DOCTORAL**

**USO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLULAS  
HEPÁTICAS DE RATA EN LA INVESTIGACIÓN DE LAS  
ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES  
DIRECTAS DE DOS TIAZOLINDIONAS,  
PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA**

**DOCTORADO EUROPEO**

**M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García**  
**2010**

**VNIVERSIDAD DE SALAMANCA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA**

## **TESIS DOCTORAL**

**USO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLULAS  
HEPÁTICAS DE RATA EN LA INVESTIGACIÓN DE LAS  
ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES  
DIRECTAS DE DOS TIAZOLINDIONAS,  
PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA**

**DOCTORADO EUROPEO**

Memoria que presenta  
**Dña. M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García**  
para optar al Grado de Doctor  
por la Universidad de Salamanca

**Salamanca, 26 de Julio de 2010**

D. **Rafael Jiménez Fernández**, Director del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, certifica que la presente Memoria, elaborada por **Dña. M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca y a la Mención de Doctorado Europeo por la Universidad de Salamanca, con el título: **“Uso de la técnica de perfusión de células hepáticas de rata en la investigación de las acciones metabólicas y mitocondriales directas de dos tiazolindionas, pioglitazona y rosiglitazona”**, ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. D. M. Yehia El-Mir El Halak** en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expide y firma la presente certificación en Salamanca a veintiséis de Julio de 2010.

Fdo: D. Rafael Jiménez Fernández

**D. M. Yehia El-Mir El Halak**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca AUTORIZA la presentación de la Memoria realizada por **Dña. M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca y a la Mención de Doctorado Europeo, con el título: **“Uso de la técnica de perfusión de células hepáticas de rata en la investigación de las acciones metabólicas y mitocondriales directas de dos tiazolidionas, pioglitazona y rosiglitazona”**, que ha sido realizada bajo su dirección, en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca. Y para que así conste, expide y firma la presente autorización en Salamanca a veintiséis de Julio de 2010.

Fdo: D. M. Yehia El-Mir El Halak

### **Este trabajo ha sido financiado con cargo a los siguientes proyectos**

**“Uso de la técnica de perfusión de células para la investigación de los efectos metabólicos directos en hígados de rata de los nuevos fármacos antidiabéticos orales tiazolidindionas, en monoterapia o en terapia combinada con metformina, y estudios clínicos en pacientes diabéticos humanos”**

Investigador Principal: M. Yehia El-Mir El Halak

Entidad Financiadora y Referencia del Proyecto: Junta de Castilla y León (Ref.: SA31/04)

Periodo: Año 2004

**“Uso de la técnica de perfusión de células para investigar los efectos metabólicos DIRECTOS en hígados de rata de los antidiabéticos orales tiazolidindionas, en monoterapia o en terapia combinada con metformina”**

Número de investigadores participantes: 5

Investigador Principal: M. Yehia El-Mir El Halak

Entidad Financiadora y Referencia: Ministerio de Sanidad y Consumo, Fondo de Investigación

Sanitarias, Instituto Carlos III (Ref. PI070526)

Periodo: 3 años 2008-2010.

### **Beca pre-doctoral**

La doctoranda ha disfrutado durante la realización de la Tesis de una Beca de Formación de Personal Investigador otorgada por la Junta de Castilla y León de una duración de 4 años (Orden EDU/1453/2005), concedida en Junio de 2006.

### **Trabajos científicos publicados durante este período**

Detaille D, Sanchez C, **Sanz N**, Lopez-Novoa JM, Leverve X, El-Mir MY. “Interrelation between the inhibition of glycolytic flux by silibinin and the lowering of mitochondrial ROS production in perfused rat hepatocytes”. Life Sciences 82 (2008) 1070–1076

### **Parte de los resultados incluidos en esta Memoria han sido**

#### **Presentados a los siguientes Congresos**

XXXII Congreso de la “Asociación Española para el Estudio del Hígado, Madrid, Spain (February 21-23, 2007) (XXXII Congress of Spanish Association for the Study of the Liver)

43rd Annual Meeting of “The European Association for the Study of Diabetes”, Amsterdam, Netherlands (September 18-21, 2007)

XXXIII Congreso de la “Asociación Española para el Estudio del Hígado, Madrid, Spain (February 20-22, 2008) (XXXIII Congress of Spanish Association for the Study of the Liver)

XXXIV Congreso de la “Asociación Española para el Estudio del Hígado, Madrid, Spain (February 25-27, 2009) (XXXIV Congress of Spanish Association for the Study of the Liver)

3rd International Congress on “PREDIABETES and the METABOLIC SYNDROME”, Nice, France, (April 1-4, 2009)

XXXV Congreso de la “Asociación Española para el Estudio del Hígado, Madrid, Spain (February 17-19, 2010) (XXXV Congress of Spanish Association for the Study of the Liver)

12th European Congress of Endocrinology, Prague, Czech Republic (April 24-28, 2010)

Spanish and Portuguese Congress on Free Radicals, Salamanca, Spain (May 15-17, 2010)

### **Publicados en forma de resúmenes en Revistas Científicas**

*Gastrología y Hepatología* (2007) vol. 30, pp 147-148

*Diabetologia* (2007) volume 50, supplement 1, pp S355

*Gastroenterología y Hepatología* (2008) vol. 31 (Supl 1): 121-122

*Gastroenterología y Hepatología* (2009) Vol. 32, Especial Congreso 1: 140

*Journal of Diabetes* (2009) Vol. 1, Supp. 1: A195

*Gastroenterología y Hepatología* (2010) Vol. 33, Especial Congreso 1: 174-175

*Gastroenterología y Hepatología* (2010) Vol. 33, Especial Congreso 1: 171

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas, a las cuales quisiera expresar mi más profundo agradecimiento:

*En primer lugar, a mi director, maestro y “padre científico”, el Dr. Yehia El-Mir. Gracias por todas tus enseñanzas científicas en el campo del metabolismo, el hígado y la ciencia de la fisiología como integradora de muchas materias. Gracias por tu inagotable optimismo, por la confianza que depositas en todas las personas, por tu gran capacidad de hacer sacar a cada uno lo mejor de si mismo, por tu fuente de ideas infinita y por tener siempre abierto el laboratorio a todas las personas y proyectos que se nos acercan.*

*A mis dos grandes compañeros de laboratorio, el Dr. Dominique Detaille y el futuro Dr. Carlos Sánchez Martín. Si echo la vista para atrás, hace más de 5 años, me parece que hemos pasado por una batalla heroica y hemos salido juntos victoriosos. Por cómo nos hemos metido juntos en los nuevos proyectos, las nuevas técnicas y los hemos sacado adelante, gracias a la ayuda mutua y la proposición de ideas y sugerencias que nos han hecho crecer en todos los sentidos.*

*A los Doctores Fernando Gómez Peralta y José María Recio Córdova, médicos especialistas en el área de Endocrinología, por su constante apoyo, entusiasmo y energía que ponen en nuestra colaboración. También les agradezco haber aceptado formar parte del tribunal de mi Tesis.*

*Al Dr. José Miguel López Novoa por su gran apoyo en cuanto a espacio, infraestructuras, instalaciones y asesoramiento que nos ha mostrado en los momentos difíciles y siempre. Gracias por aceptar ser miembro del tribunal de mi Tesis.*

*A las Doctoras Gloria R-Villanueva y Roula Naboulsi por su siempre disposición a ayudar.*

*Al Dr. Rafael Jiménez por su ayuda administrativa, su asesoramiento y gran generosidad al habernos cedido una parte del equipo de la HPLC, básico y necesario en el desarrollo de nuestros proyectos de investigación. Gracias por aceptar ser miembro del tribunal de mi Tesis.*

*A todo el grupo del Dr. José Miguel Novoa, los cuales además de ser compañeros de laboratorios y pasillo, me aceptaron y trataron como casi una más de su grupo cuando comencé en el laboratorio S-16 y de los cuales, me llevo importantes amistades. Gracias a Alicia, Fernando, Ana Morales, Neli, Carlos, Fran y Anette, por estar siempre dispuestos a ayudar y solucionar cualquier problema, por pequeño que sea. Gracias a todas las personas que han pasado por el grupo y ya se han ido: Miguel, Soraya, Patri, Fernando Dorado y Gabriela, mis compañeros del laboratorio S-15; Maite, Bego y Dele. A los compañeros que ya estaban cuando yo llegué, los que se incorporaron conmigo o los que llegaron después: Isabel, Ana, José Manuel, Penélope, María, Bárbara, Laura, Moisés, Ludovico, Sandra y Omar. Gracias a Rebeca y a Yaremi, a las que quiero mucho.*

*Al Dr. Xavier Lerverve, Director del INSERM U844 de la Universidad de Grenoble I, por toda la ayuda y apoyo. Quiero agradecerle su acogida en su centro de investigación en la realización de la estancia pre-doctoral que realicé en 2008 y el asesoramiento que recibí de él y de todo el equipo humano que constituyen el Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée de Grenoble. Principalmente, quiero mostrar mi agradecimiento al Dr. Uwe Schlattner, por su apoyo y ayuda en los inicios de mi investigación de la AMPK durante mi estancia y por haber aceptado ser miembro del Tribunal de mi*

*Tesis, para poder así optar al título de Doctorado Europeo. A Guillaume, por la ayuda que me prestó en ese momento y su total disposición siempre; a Sarah, por su ayuda administrativa; a todos los profesores, investigadores y estudiantes: Cécile, Eric Fontaine, Malgorzata, Sacnicte, Claire, Anna, Fred, Nellie y Bruno, por hacer de mi estancia un momento inolvidable de mi vida. Quiero agradecer muy especialmente al Dr. Rouland Favier, en su memoria, su excelente formación en la medida de los complejos respiratorios, su enorme disposición a ayudar y su gran cercanía.*

*Al Dr. Emilio Fernández, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la USAL, por la enorme ayuda y asesoramiento que nos ha prestado en la puesta a Punto del ciclo de las Pentosas-fosfato en nuestro laboratorio. Así como a los doctores Enrique Villar, Juan Pedro Bolaños y Angeles Almeida, del mismo Departamento, por permitirme el uso de sus instalaciones y su gran amabilidad. También agradezco al Dr Carlos Vicario Abejón, bioquímico del Instituto Cajal de Madrid que se formó en este Departamento de la Universidad de Salamanca, haber aceptado ser miembro del tribunal de mi Tesis.*

*A todos los compañeros que han pasado intermitentemente por nuestro laboratorio: Alicia, Isaac, Saida, Elvis, Carmen y Carmen, Sonia y Mehdi; gracias por curiosidad científica y compañía. También a mis compañeros del departamento: Alba y Pablo.*

*A Maribel, por todas las dudas que me ha resuelto con paciencia y mucha eficacia y a todos los integrantes del equipo del Animalario: Luis, José Fernando, Juan, Elena, Jorge y Paco.*

*A mis padres, que desde que era casi un bebé me concedieron toda la libertad para que eligiese e intentase hacer todo lo que me propusiese en la vida, estando siempre ahí para aconsejarme y ayudarme si me equivocaba en el camino. A mi hermano Luis, que aporta un toque de sensibilidad a mi vida y a mis incansables abuelos, los que están y los que ya se fueron. A toda mi familia, en especial a mis tías, que siempre tienen para mí una sonrisa en su cara.*

*A todas mis amigas y amigos, especialmente: Martita, Cristina, la “Cachorri”, Bea, Soraya, Vanessa, Mónica, Vir, Myri y Oskitar; con los que he crecido, he discutido, he viajado, me he hecho mayor, hemos descubierto cosas nuevas, nos hemos vuelto a equivocar y hemos disfrutado tanto juntos. Con una mención especial al “tridente cherif”: Elen, Anita, nuestra estrella y nuestros “Mortal Fridays”.*



*A mis padres*

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
iNVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSiGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

*ABREVIATURAS*

AA	acetoacetato
AAT	alanina-aminotransferasa
ACC	acetil-CoA-carboxilasa
AdH	alcohol-deshidrogenasa
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina-5'-difosfato
AMP	adenosina-5'-monofosfato
AMPc	adenosina-5'-monofosfato cíclico
AMPK	proteína-quinasa activada por el AMP
AMPKK	proteína-quinasa quinasa activada por el AMP
AGE	productos finales de glicosilación avanzada
ALE	productos finales de lipoxidación avanzada
AOS	sistemas antioxidantes
ATP	adenosina-5'-trifosfato
ATPasa	ATP-sintasa
BSA	seroalbúmina bovina
CAT	catalasa
$\alpha$ -CG	$\alpha$ -cetoglutarato
DHA	dihidroxiacetona
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
DM	diabetes mellitus
DMSO	dimetilsulfóxido
1,3-DPG	1,3-difosfoglicerato
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EEM	error estándar de la media
EGTA	ácido etilenglicol-bis-( $\beta$ -aminetiléter)-N,N,N',N'-tetracético
FAD <sup>+</sup>	flavina adenina dinucleótido oxidado
FADH <sub>2</sub>	flavina adenina dinucleótido reducido
F1,6bP	fructosa 1,6-bifosfato
F2,6bP	fructosa 2,6-bifosfato
F1,6bPasa	fructosa 1,6-bifosfatasa
F2,6bPasa	fructosa 2,6-bifosfatasa
FK	fructoquinasa
F1P	fructosa 1-fosfato
F6P	fructosa 6-fosfato
GA	gliceraldehído
GAP	gliceraldehído 3-fosfato
GAPdH	gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa
GDP	guanidina-5'-difosfato
GK	glucoquinasa
GKRP	proteína reguladora de la glucoquinasa
GLP-1	péptido similar al glucagón
GlycK	glicerato-quinasa
GlyK	glicerol-quinasa
GNG	gluconeogénesis
GOT	glutamato oxaloacetato-transaminasa
GP	glucógeno-fosforilasa
G1P	glucosa 1-fosfato
G3P	glicerol 3-fosfato
G6P	glucosa 6-fosfato
G6Pasa	glucosa 6-fosfatasa
G6PdH	glucosa 6-fosfato-deshidrogenasa
G3PdHc	glicerol 3-fosfato-deshidrogenasa citosólica
G3PdHm	glicerol 3-fosfato-deshidrogenasa mitocondrial
GPK	glucógeno-fosforilasa quinasa
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GS	glucógeno-sintasa
GSH	glutación

GSK-3	glucógeno-sintasa quinasa 3
GTP	guanidina-5'-trifosfato
HbA <sub>1c</sub>	glucohemoglobina del tipo 1C
HCl	ácido clorhídrico
HDL	lipoproteína de alta densidad
HK	hexoquinasa
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
IRS-1	substrato 1 del receptor de la insulina
IRS-2	substrato 2 del receptor de la insulina
$J_{2GLP}$	flujo metabólico global
$J_{Glucosa}$	flujo gluconeogénico o flujo de producción de glucosa
$J_{L+P}$	flujo glucolítico o flujo de producción de lactato+piruvato
$JO_2$	respiración celular o consumo de oxígeno
$K^+$	ion potasio
KCl	cloruro de potasio
$KH_2PO_4$	dihidrogenofosfato de potasio
$K_2HPO_4$	hidrogenofosfato de potasio
$K_i$	constante de inhibición
$K_m$	constante de afinidad
KOH	hidróxido de potasio
LdH	lactato-deshidrogenasa
LDL	lipoproteína de baja densidad
L+P	lactato+piruvato
MDA	malondialdehído
MdH	malato-deshidrogenasa
$Mg^{2+}$	ion magnesio
$MgSO_4$	sulfato de magnesio
MOPS	ácido 3 (N-morfolino)-propano sulfónico
NaCl	cloruro de sodio
$NAD^+$	nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
$NADP^+$	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
$NaHCO_3$	bicarbonato sódico
NF- $\kappa$ B	factor nuclear $\kappa$ B
$NH_4^+$	ion amonio
NOS	sintasa del óxido nítrico
OAA	oxalacetato
$\beta$ OH	$\beta$ -hidroxibutirato
$\beta$ OHdH	$\beta$ -hidroxibutirato-deshidrogenasa
$O_2$	oxígeno
PBS	tampón fosfato salino
PC	piruvato-carboxilasa
1p5c	1-pirrolina-5-carboxilasa
PdH	piruvato-deshidrogenasa
1p5dH	1-pirrolina-5-carboxilasa deshidrogenasa
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPCK	fosfoenolpiruvato-carboxiquinasa
PFK-1	fosfofructoquinasa 1
PFK-2	fosfofructoquinasa 2
PG	prostaglandinas
2-PG	2-fosfoglicerato
3-PG	3-fosfoglicerato
PGI	fosfoglucoisomerasa
PGK	fosfoglicerato-quinasa
PGM	fosfoglicerato-mutasa
Pi	fosfato inorgánico
PI3,4,5TP	fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PIO	pioglitazona
PK	piruvato-quinasa

PKA	proteína-quinasa A
pKa	constante de disociación
PPAR $\alpha\beta\gamma$	receptor inductor de la proliferación de los peroxisomas
ProdH	prolina-deshidrogenasa
PYR	piruvato
RCR	ratio de control respiratorio
REL	retículo endoplásmico liso
ROS	especies reactivas de oxígeno
ROSI	rosiglitazonas
SB	silibinina
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SOD	superóxido-dismutasa
STZ	estreptozotocina
tBH	tert-butil-hidroperóxido
TK	trioquinasa
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenodiamina
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral $\alpha$
TPI	triosa fosfato-isomerasa
TRA-HCl	trietanolamonio clorhidrato
Trans	transaminasa
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TZDs	tiazolidindionas o glitazonas
UDP-Glc	uridina difosfato glucosa
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad
$\Delta\Psi$	diferencia de potencial entre una y otra parte de la membrana mitocondrial interna

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
INVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

# ÍNDICE

<b>OBJETIVO</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>EL HÍGADO</b>	<b>5</b>
<b>1. Fisiología del Hígado</b>	5
<b>2. Las Células Hepáticas</b>	6
2.1. El Hepatocito	6
2.2. Otras células Hepáticas	6
<b>3. Funciones del Hígado</b>	6
3.1. Metabolismo de los lípidos	6
3.2. Metabolismo de las proteínas	7
3.3. Metabolismo de los hidratos de carbono	7
<b>4. Organización y regulación de las vías metabólicas</b>	7
4.1. Concepto de estado estacionario	7
4.2. Metabolismo hepático	8
4.3. Organización y regulación de las vías metabólicas de glucólisis y gluconeogénesis	9
4.3.1. El cruce de la glucosa 6-fosfato y el ciclo G6P-Glucosa	12
4.3.2. El ciclo F1,6bP-F6P y la enzima bifuncional	13
4.3.3. El cruce del piruvato y el ciclo PEP-Piruvato	14
<b>5. Control integrado de la gluconeogénesis</b>	17
5.1. Control de la gluconeogénesis por la glucosa	17
5.2. Control de la gluconeogénesis por las hormonas pancreáticas	17
5.3. Control de la gluconeogénesis por el metabolismo energético	18
<b>6. Control transcripcional de la gluconeogénesis</b>	18
<b>LA MITOCONDRIA</b>	<b>19</b>
<b>1. La mitocondria: descubrimiento y estructura</b>	19
<b>2. La fosforilación oxidativa</b>	20
2.1. La cadena respiratoria	20
2.1.1. El complejo I: NADH - ubiquinona oxidorreductasa	22
2.1.2. El complejo II: succinato - ubiquinona oxidorreductasa	22
2.1.3. El complejo III: complejo bc1 (ubiquinol - citocromo c reductasa)	22
2.1.4. El complejo IV: citocromo c oxidasa (citocromo aa3)	23
2.1.5. El complejo V: F0F1-ATP sintasa	23
2.2. La teoría quimio-osmótica de Mitchell	24
2.2.1. ¿Qué sistemas aprovechan la fuerza protón motriz?	25
2.2.2. La respiración mitocondrial	26
2.2.3. ¿Qué controla la cadena respiratoria?	26
2.2.4. Modificaciones del rendimiento de la Fosforilación Oxidativa	28
<b>3. Síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS)</b>	29
<b>4. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP)</b>	31

4.1. El fenómeno de la transición de la permeabilidad	31
4.2. Estructura y regulación del PTP	31
<b>ESTRÉS OXIDATIVO</b>	<b>33</b>
<b>1. Definición</b>	33
<b>2. Fuente de las Especies Reactivas</b>	33
2.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)	34
2.2. Especies reactivas de nitrógeno (RNS)	35
<b>3. Sistemas antioxidantes</b>	35
3.1. Sistemas enzimáticos	35
3.2. Sistemas no enzimáticos	36
<b>4. Acción de ROS</b>	37
<b>5. Estrés oxidativo y diabetes</b>	38
<b>DIABETES MELLITUS TIPO 2</b>	<b>40</b>
<b>1. Introducción a la diabetes mellitus tipo 2</b>	40
<b>2. Diabetes Mellitus ó la nueva epidemia del siglo XXI</b>	41
<b>3. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2</b>	42
3.1. Secreción alterada de insulina en la diabetes mellitus tipo 2	43
3.1.1. Funcionamiento normal de las células- $\beta$ en individuos sanos	43
3.1.2. Funcionamiento alterado de las células- $\beta$ en diabéticos tipo 2	44
3.2. Resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2	45
3.2.1. Transducción de la señal de insulina en condiciones normales	45
3.2.2. Resistencia periférica a la insulina en la DM2	46
<b>4. Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2</b>	47
4.1. Secretagogos de insulina	48
4.1.1. Sulfonilureas	48
4.1.2. Glinidas	48
4.2. Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas	49
4.3. Miméticos de incretinas	49
4.4. Insulina	49
4.5. Sensibilizadores de la acción de insulina	50
4.5.1. Biguanidas	50
4.5.2. Tiazolidinadionas o glitazonas	50
4.6. Terapia combinada en diabetes mellitus tipo 2	53
<b>PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA</b>	<b>54</b>
<b>1. Bioquímica</b>	54
<b>2. Comercialización y Posología</b>	55
<b>3. Farmacocinética</b>	57
3.1. Absorción	57
3.2. Distribución	58
3.3. Metabolismo	58
3.4. Eliminación	59
3.5. Farmacocinética en grupos de riesgo	59
<b>4. Seguridad y tolerancia</b>	60
<b>5. Mecanismo de acción</b>	61
<b>6. Efecto antidiabético</b>	63



6.1. Efecto sobre el metabolismo de glúcidos	63
6.2. Efecto sobre el metabolismo de lípidos	64
6.3. Resistencia a la insulina	65
6.4. Función y estructura pancreática	66
6.5. Efecto sobre la composición corporal	66
<b>7. Efectos directos</b>	<b>66</b>
<b>8. Otros efectos fisiológicos</b>	<b>67</b>
8.1. Estrés oxidativo	67
8.2. Efectos cardiovasculares	67
8.2.1. Efecto anti-inflamatorio	67
8.2.2. Función endotelial	68
8.2.3. Eventos macro-vasculares	68
8.3. Efecto sobre la quinasa dependiente del AMP (AMPK)	69
8.4. Nefropatía diabética	70
8.5. Glitazonas y psoriasis	70
8.6. Síndrome de ovario poliquístico	70
8.7. Efecto sobre la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)	70
8.8. Efecto sobre el sistema nervioso	71
8.9. Efecto anticancerígeno	71
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>72</b>
<b>I. Animales: Tipo y Alimentación</b>	<b>73</b>
<b>II. Técnicas Experimentales</b>	<b>74</b>
<b>1. Aislamiento de hepatocitos</b>	74
1.1. Principio	74
1.2. Procedimiento de aislamiento	74
1.3. Apreciación de la suspensión celular	76
1.3.1. Apreciación cualitativa	76
1.3.2. Apreciación cuantitativa	77
<b>2. Preparación de mitocondrias aisladas</b>	77
2.1. Principio	77
2.2. Procedimiento de aislamiento	77
2.3. Determinación de la concentración de las proteínas mitocondriales	78
<b>III. Modelos Experimentales</b>	<b>79</b>
<b>1. Modelo experimental de hepatocitos aislados en perfusión</b>	79
1.1. Principio	79
1.2. Cámaras de perfusión	81
1.3. Termostato del sistema	82
1.4. Depósito central	82
1.5. Bombas peristálticas	83
1.6. Captadores de presión	83
1.7. Sistema de reoxigenación	83
1.8. Procedimiento	84
<b>2. Incubación de hepatocitos aislados en viales cerrados</b>	85
<b>3. Técnica de fraccionamiento celular</b>	86
3.1. Separación del medio intracelular y extracelular	86
3.2. Separación del medio citosólico y mitocondrial	87
<b>4. La oxigrafía: técnica de estudio utilizada con hepatocitos intactos y mitocondrias aisladas</b>	88
4.1. Fundamento de la Oxigrafía	88

4.2. Medida de la respiración	90
4.2.1. Medida de la respiración en mitocondrias aisladas	90
4.2.2. Medida de la respiración en hepatocitos intactos	91
<b>IV. Determinaciones analíticas</b>	<b>92</b>
<b>1. Principios de las determinaciones analíticas de los metabolitos extracelulares</b>	<b>92</b>
1.1. Determinación de la glucosa	92
1.2. Determinación del lactato	93
1.3. Determinación del piruvato	93
<b>2. Principios de las determinaciones analíticas de los metabolitos intracelulares</b>	<b>94</b>
2.1. Determinación de la glucosa 6-fosfato y de la fructosa 6-fosfato	94
2.2. Determinación de la dihidroxiacetona fosfato	95
2.3. Determinación del fosfoenolpiruvato y del 3-fosfoglicerato	95
<b>3. Cuantificación de los nucleótidos adenílicos</b>	<b>96</b>
<b>4. Medida de las actividades enzimáticas</b>	<b>97</b>
4.1. Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa)	97
4.2. Piruvato quinasa	98
4.3. Determinación de la concentración de proteínas	100
<b>5. Técnicas de medida utilizadas con las mitocondrias aisladas</b>	<b>101</b>
5.1. Determinación de la relación ATP/O	101
5.2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	102
5.3. Medida de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales	103
5.3.1 Medida de la actividad del complejo I: NADH-ubiquinona oxido-reductasa	104
5.3.2 Medida de la actividad del complejo II: succinato-ubiquinona oxidoreductasa	104
5.3.3 Medida de la actividad del complejo III: complejo bc1 (ubiquinol-citocromo c reductasa)	104
<b>6. Medida de la capacidad de retención de calcio (CRC)</b>	<b>105</b>
6.1 Medida de CRC en mitocondrias hepáticas	105
6.2 Medida de CRC en hepatocitos permeabilizados	106
<b>V. Tratamiento estadístico</b>	<b>107</b>

<b>RESULTADOS~ EFECTOS DIRECTOS DE LAS GLITAZONAS, PIOTGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA, SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO</b>	<b>108</b>
<b>1. Estudio de los efectos metabólicos globales de pioglitazona y rosiglitazona a partir de distintos sustratos en hepatocitos de rata en perfusión</b>	<b>109</b>
1.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global de DHA	109
1.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global de la fructosa	115
1.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global del glicerol	119
1.4. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global del lactato más piruvato (lactato/piruvato)	121
<b>2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis hepática a partir de DHA, fructosa y glicerol</b>	<b>124</b>
2.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de DHA	124
2.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de fructosa	125

2.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de glicerol	126
2.4. Papel de la relación ATP/ADP celular en el efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de DHA, fructosa y glicerol	127
2.5. Activación directa de la actividad de la piruvato quinasa por pioglitazona y rosiglitazona	131
<b>3. Inhibición de la gluconeogénesis por pioglitazona y rosiglitazona a partir de todos los sustratos utilizados (DHA, fructosa, glicerol y lactato+piruvato) en hepatocitos de rata en perfusión</b>	<b>133</b>
3.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de DHA	133
3.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de fructosa	135
3.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de glicerol	137
3.4. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de lactato+piruvato	138
<b>4. Efecto anti-glucagón de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo de la DHA</b>	<b>140</b>
4.1. Efecto antiglucagón de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis	140
4.2. Investigación del posible efecto antiglucagón de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis	142
<b>5. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de la glucosa-6-fosfatasa</b>	<b>144</b>
<b>6. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucógenolisis</b>	<b>146</b>
6.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el flujo de glucosa	146
6.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de la glucosa liberada por la glucógenolisis	147
6.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el flujo metabólico total producido por el metabolismo de la glucosa liberada del glucógeno hepático	149
<b>7. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la respiración en hepatocitos intactos</b>	<b>151</b>
<b>RESULTADOS~EFECTOS DIRECTOS DE LAS GLITAZONAS, PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA, SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO</b>	<b>153</b>
<b>1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la respiración mitocondrial</b>	<b>154</b>
<b>2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa</b>	<b>162</b>
2.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con glutamato/malato (GM)	163
2.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con succinato/malato (SM)	164
2.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con glutamato/succinato/malato (GSM)	165
<b>3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS)</b>	<b>167</b>
<b>4. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de los complejos respiratorios I, II y III</b>	<b>174</b>
4.1. Actividad del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial	174
4.2. Actividad del complejo II de la cadena de transporte mitocondrial	175

4.3. Actividad del complejo III de la cadena de transporte mitocondrial	176
<b>5. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la apertura del poro de transición mitocondrial (PTP)</b>	<b>178</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>180</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>202</b>
<b>RESUMEN DOCTORADO EUROPEO ~</b>	
<b>RÉSUMÉ DOCTORAT EUROPÉEN</b>	<b>205</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>230</b>

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
iNVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCÓNDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

***OBJETIVO***

Nuestro grupo de investigación está inmerso en el estudio del metabolismo energético y oxidativo hepático, así como su influencia por distintas sustancias con propiedades antioxidantes y/o antidiabéticas, como la silibinina, la metformina, las glitazonas y el resveratrol. Realizamos esta investigación mediante diversas técnicas, entre las cuales destaca la técnica de perfusión de células, la cual fue inventada inicialmente por los doctores Van der Meer y Tager de la Universidad de Amsterdam en 1976 (**Van der Meer y Tager, 1976**) y modificada posteriormente por Groen y Tager en 1983 (**Groen y cols., 1983**). Precisamente, para llevar a cabo el estudio de las acciones metabólicas directas de las dos glitazonas actualmente disponibles en el mercado, pioglitazona y rosiglitazona, usamos la técnica de perfusión de hepatocitos, la única técnica de este tipo que existe en España y que fue instalada en nuestro laboratorio por el Dr. El-Mir (**El-Mir y cols., 2004; Guigas y cols., 2007**). A este respecto, numerosos estudios han avalado la gran utilidad de la técnica de perfusión de células para el estudio del metabolismo energético y oxidativo hepático y su influencia por diferentes sustancias y medicamentos (**Leverve y cols., 1985, 1986, 1987; Argaud y cols., 1991; 1993**).

Pioglitazona (PIO) y Rosiglitazona (ROSI) son dos antidiabéticos orales pertenecientes a la clase de las tiazolidindionas o glitazonas, que se utilizan ampliamente en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Estos antidiabéticos ejercen su principal acción hipoglucemiante a medio y largo plazo de forma indirecta mediante la activación selectiva de los receptores nucleares PPAR $\gamma$ , los cuales son muy abundantes en el tejido adiposo pero no tanto en el hígado y el músculo esquelético, principales tejidos junto con el adiposo donde se manifiesta la resistencia a la insulina en este tipo de diabetes (**Cortés y cols., 2005**). Por lo tanto, se ha propuesto que las glitazonas sean capaces de actuar a nivel hepático y muscular, donde se ha demostrado que también ejercen efectos beneficiosos antidiabéticos muy rápidos y en un corto período de tiempo, independientemente de la activación de PPAR $\gamma$  (**Girard, 2001., Brunmair y cols., 2001**). Las tiazolidinadionas tienen un papel fuertemente consolidado en el tratamiento de la DM2 como sensibilizadores a la acción de la insulina y protectores de la función de las células- $\beta$  del páncreas, además ejercen muchos efectos beneficiosos sobre las complicaciones secundarias de la DM2, debido a sus propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes (**Stumvoll, 2003; Wyne, 2003**). Dada la estrecha relación que existe entre el metabolismo energético y oxidativo, consideramos también que es importante investigar los efectos directos e independientes de la activación de PPAR $\gamma$  de estas dos glitazonas sobre la respiración celular y diversos parámetros de la función mitocondrial.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente y que el hígado es el órgano más importante en la regulación del metabolismo, **nos proponemos los siguientes objetivos para desarrollar este trabajo:**

**1.** Investigar los efectos metabólicos agudos y directos de pioglitazona y rosiglitazona en hepatocitos de rata perfundidos con distintos sustratos. Para ello habrá que cumplir los siguientes objetivos parciales:

1.1. Investigar el efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo hepático: la glucólisis y la gluconeogénesis en hepatocitos de rata en perfusión.

1.2. En caso de encontrar un efecto de estas dos glitazonas sobre la glucólisis o la gluconeogénesis, investigar el lugar de acción de ambos medicamentos.

**2.** Investigar los efectos anti-glucagón de pioglitazona y rosiglitazona en hepatocitos de rata en perfusión.

**3.** Investigar los efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo del glucógeno en hepatocitos de rata en perfusión.

**4.** Investigar los efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre la función mitocondrial:

4.1. Investigar los efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre la respiración celular.

4.1. Investigar los efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre el rendimiento de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas de hígados de ratas.

4.2. Investigar los efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígados de ratas.

4.3. Investigar los efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de los complejos respiratorios I, II y III en mitocondrias aisladas de hígados de ratas.

**5.** Investigar la modulación que ejercen pioglitazona y rosiglitazona sobre la apertura del poro de transición mitocondrial (PTP) en hepatocitos permeabilizados y en mitocondrias aisladas de hígados de ratas.

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
INVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

***¡NTR0DVCCiÓN***

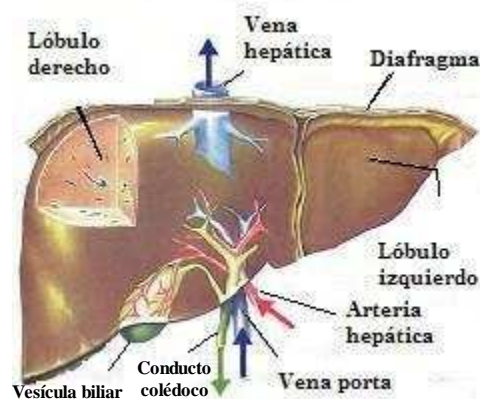


# El Hígado

## 1. Fisiología del hígado (Guyton Hall, 2001)

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo: en el adulto tiene un peso medio que oscila entre 1.200 y 1.500 gramos y representa alrededor de 1/15 del peso total del cuerpo. Se diferencia de la mayoría de los restantes órganos en que su aporte sanguíneo es doble: la arteria hepática suministra sangre procedente de la circulación general, mientras que la vena porta le envía sangre del bazo, del estómago, del páncreas y, sobre todo, del intestino, lo que le permite recibir los elementos nutritivos absorbidos por este último antes de su paso a la circulación general. Toda la sangre que alcanza el hígado por esta doble vascularización se mezcla en los sinusoides hepáticos y es drenada por las venas centrilobulillares que convergen para formar la vena suprahepática (Figura 1).

Figura 1. Visión general del hígado y su vascularización



A nivel celular, el hígado está formado en su mayor parte por láminas de hepatocitos, los cuales se anastomosan entre sí dejando espacios vasculares libres, de forma heterogénea, denominados sinusoides. Entre hepatocitos adyacentes, se encuentra un pequeño espacio formado por una invaginación de sus propias membranas plasmáticas que constituye el canaliculo biliar, en el cual se forma la bilis primaria y que se vierte al conducto biliar.

## **2. Las células hepáticas**

### **2.1. El Hepatocito**

Las células parenquimales hepáticas o hepatocitos son las unidades funcionales principales del hígado. Son células poliédricas de 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro. Representan alrededor del 65% de las células hepáticas y ocupan casi el 80% del volumen parenquimal. Presentan una polaridad muy marcada debido a que poseen una membrana celular con tres regiones de distinta especificidad morfológica y funcional.

### **2.2. Otras Células Hepáticas**

Las células hepáticas no parenquimales constituyen el 35% de la población celular del hígado y se caracterizan por su baja actividad metabólica. Aparte de los *fibroblastos* y de las *células ductulares*, las *células sinusoidales* ocupan el mayor volumen hepático de las células hepáticas no parenquimales. Las células sinusoidales se pueden clasificar en: células endoteliales, células de Kupffer, células de Ito y células "Pit", encontrándose en una proporción de 44,4%; 33,3%; 10-25% y 5% respectivamente.

## **3. Funciones del Hígado**

Las funciones básicas del hígado se pueden resumir en:

- detoxificación de la sangre y eliminación de fármacos y de hormonas, como la tiroxina y las hormonas esteroideas
- síntesis de ácidos biliares y excreción de pigmentos biliares
- metabolismo proteico, lipídico y de hidratos de carbono
- almacenamiento de vitaminas y de hierro, en forma de ferritina
- producción de factores de coagulación, como el fibrinógeno o la protrombina

### **3.1. Metabolismo de los lípidos**

Casi todas las células del organismo metabolizan los lípidos pero algunos aspectos fundamentales del metabolismo de los lípidos tienen lugar en el hígado. Las funciones concretas del hígado en el metabolismo de los lípidos son:

- $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos para aportar energía a otros tejidos corporales como el músculo esquelético y el corazón
- formación de la mayor parte de las lipoproteínas
- biosíntesis de grandes cantidades de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos
- síntesis de grasas a partir de proteínas y de hidratos de carbono

De todas estas funciones, la  $\beta$ -oxidación hepática de los ácidos grasos puede considerarse entre las más importantes, debido a su importancia para la gluconeogénesis hepática a partir del ATP que se genera en este proceso.

### **3.2. Metabolismo de las proteínas**

El organismo no puede prescindir de los servicios del hígado en el metabolismo de las proteínas durante más de unos días sin consecuencias muy graves e incluso mortales, al contrario de lo que ocurre con en el metabolismo glucídico y lipídico. Las funciones más importantes del hígado en el metabolismo proteico son:

- desaminación de los aminoácidos
- síntesis de urea para eliminar el amoníaco de los líquidos corporales
- síntesis de proteínas plasmáticas
- interconversión de los distintos aminoácidos y síntesis de otros compuestos a partir de los aminoácidos

### **3.3. Metabolismo de los hidratos de carbono**

En el metabolismo de los hidratos de carbono, el hígado realiza las siguientes funciones:

- almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno
- conversión de galactosa y fructosa en glucosa
- gluconeogénesis
- síntesis de compuestos químicos importantes a partir de los intermediarios del metabolismo de los hidratos de carbono

## **4. Organización y regulación de las vías metabólicas de la glucosa**

Los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía para el hombre. Los monosacáridos, sus productos digestivos finales, llegan al hígado por la circulación portal para ser metabolizados en su mayor parte (60%). Aunque en todas las células del organismo se producen algunas de las transformaciones metabólicas de los glúcidos, el hígado es el órgano que controla mayoritariamente la homeostasis de la glucosa. Las principales vías metabólicas implicadas en el metabolismo hepático de la glucosa son la glucólisis y la gluconeogénesis.

### **4.1. Concepto de estado estacionario**

Los seres vivos se caracterizan por mantener su composición interna relativamente invariable a pesar del intercambio continuo de nutrientes y energía con el ambiente. Para describir el concepto de estado estacionario, vamos a considerar una vía metabólica simple que convierta un sustrato (A) en un producto (E) (**Figura 2**). En el

estado estacionario (o estado estable metabólico), el flujo a través de la vía metabólica ( $J_{A \rightarrow E}$ ) es constante y las velocidades de cada una de las reacciones enzimáticas son iguales, por lo tanto, las concentraciones de todos los intermediarios de la vía metabólica son también constantes, debido a que se forman y se destruyen a igual velocidad.



Figura 2. Esquema de una vía metabólica simple

En el estado estacionario, la velocidad de formación de B por la primera reacción ( $\epsilon_1$ ) es igual a la velocidad de su consumo por la segunda reacción ( $\epsilon_2$ ) y así sucesivamente. Los flujos a través de las distintas etapas de la vía son iguales ( $J_{A \rightarrow E} = J_{\epsilon_1} = J_{\epsilon_2} = J_{\epsilon_3} = J_{\epsilon_4}$ ) y las concentraciones del sustrato, del producto y de los intermediarios de la vía son constantes.

## 4.2. Metabolismo hepático

El hígado es el órgano principal que interviene en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, mediante su liberación a la circulación sanguínea o su captación y posterior almacenamiento. Este equilibrio entre el uso y la síntesis de la glucosa está controlado sutilmente por multitud de factores, entre los que destacan, las concentraciones de sustratos y productos de las distintas vías metabólicas así como la situación hormonal y nutritiva del organismo (Hue, 2001). En el período post-prandial, cuando hay comida en exceso, el hígado almacena la glucosa en forma de glucógeno, principalmente por vía indirecta, lo que requiere su conversión previa en compuestos de 3 carbonos (lactato, piruvato,...) (Radziuk y Pye, 2001). Puede también, eventualmente, convertir la glucosa en ácidos grasos por la vía de la lipogénesis “de novo” (Hellerstein y cols., 1996). En períodos de ayuno, el hígado produce glucosa con el fin de mantener la glucemia y su depósito en los tejidos extrahepáticos, en particular, los que utilizan exclusivamente la glucosa como sustrato oxidativo (retina, glóbulos rojos...). La glucosa liberada por el hígado puede provenir de dos fuentes diferentes: de la glucogenolisis y de la gluconeogénesis a partir de precursores no glucídicos.

La glucólisis ocurre en el citosol de todas las células mientras que la gluconeogénesis tiene lugar, exclusivamente en el hígado y la corteza renal, los dos únicos tejidos que poseen la maquinaria enzimática necesaria para este proceso. Sin embargo, se ha demostrado que la enzima glucosa-6-fosfatasa también está presente en el intestino delgado, lo que hace de este tejido un tercer sitio gluconeogénico posible (Croset y cols., 2001). Como las reservas de glucógeno hepático son limitadas (alrededor de 75 g en el hombre adulto sano), la contribución relativa de la gluconeogénesis a la producción hepática de glucosa aumenta durante el ayuno. En condiciones fisiológicas

normales (excepto ayuno prolongado) el hígado contribuye al flujo gluconeogénico total en mayor proporción que la corteza renal (Gerich y cols. 2001). Al contrario de la glucólisis, que permite generar de 2 a 3 moléculas de ATP por hexosa oxidada según la procedencia de los carbonos (glucosa o glucógeno respectivamente), la gluconeogénesis es un proceso consumidor de energía. En situación de ayuno, la mayor parte de la energía necesaria para esta vía endergónica procede de la oxidación hepática de los ácidos grasos por medio de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial.

### **4.3. Organización y regulación de las vías metabólicas de glucólisis y gluconeogénesis**

Las vías metabólicas de la glucólisis y de la gluconeogénesis constituyen redes enzimáticas complejas (Figura 3) que no pueden dissociarse porque poseen varias etapas comunes reversibles próximas al equilibrio. La orientación del flujo metabólico entre la glucólisis y la gluconeogénesis depende de las enzimas que constituyen las etapas claves del control de la vía, ya que catalizan reacciones opuestas y alejadas del equilibrio termodinámico. Por tanto, un flujo neto tiene lugar cuando el resultado de los flujos a través de las etapas claves de la vía glucolítica o gluconeogénica no es nulo. La existencia de ciclos metabólicos constituye un sistema, gracias al cual la velocidad y la dirección de los flujos pueden modularse por variaciones muy finas de la concentración de los distintos efectores de una o varias enzimas del ciclo y/o por modificaciones covalentes de éstas. Este sistema de regulación singular conlleva un coste energético, consecuencia del mantenimiento de una elevada velocidad de reciclaje a través de estos bucles metabólicos

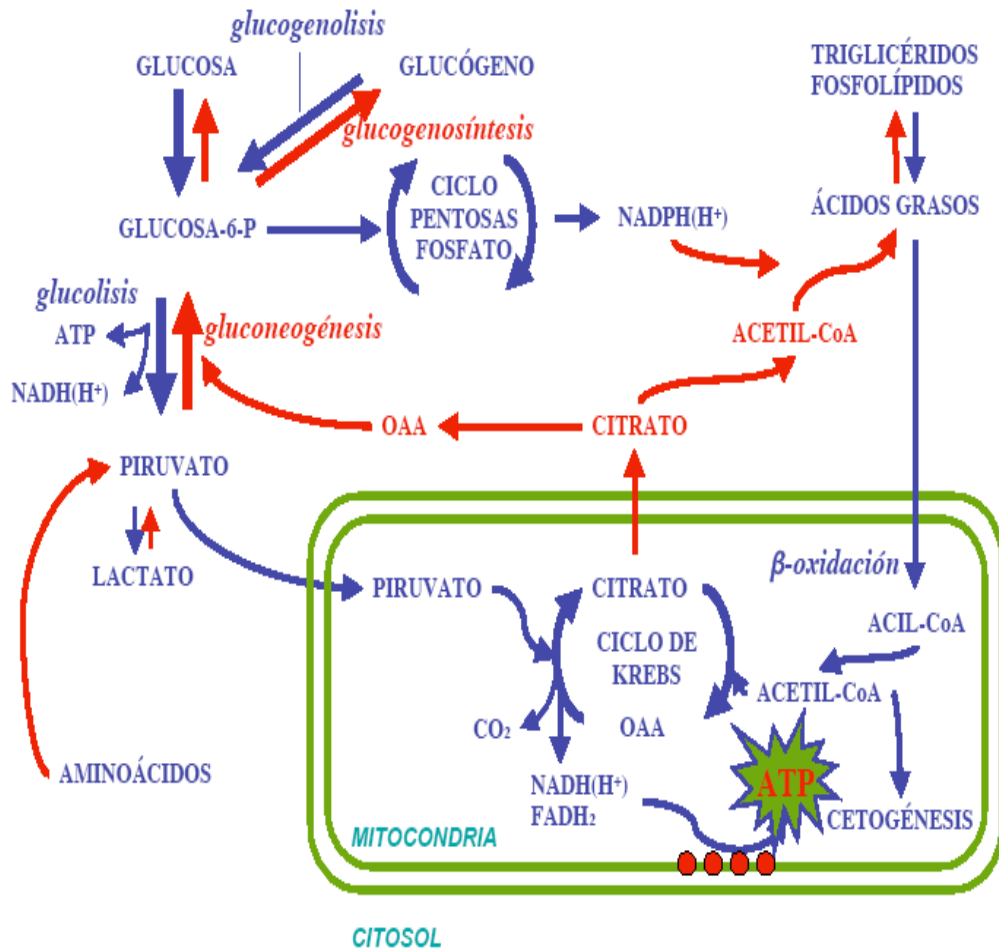


Figura 3. Integración del metabolismo global en la célula

ATP: adenosina-5'-trifosfato; CoA: coenzima A; CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono; FADH<sub>2</sub>: flavina adenina dinucleótido reducido; Glucosa-6-P: glucosa-6-fosfato; NADH(H<sup>+</sup>): nicotinamida adenina dinucleótido reducido; NADPH(H<sup>+</sup>): nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; OAA: oxalacetato

Tres bucles metabólicos se localizan a distintos niveles de la vía de la GNG/glucólisis: el bucle de la glucosa-6-fosfato (G6P) - glucosa, llamado “ciclo de las glucosas”; el bucle de la fructosa-6-fosfato (F6P) – fructosa-1,6-bifosfato (F1,6bP), llamado “ciclo de las fructosas” y el bucle del fosfoenolpiruvato (PEP) - piruvato (Figura 4).

Cada uno de estos ciclos constituye una etapa sensible a múltiples regulaciones y desempeña un papel determinante en el control de estas dos vías metabólicas indisolubles.

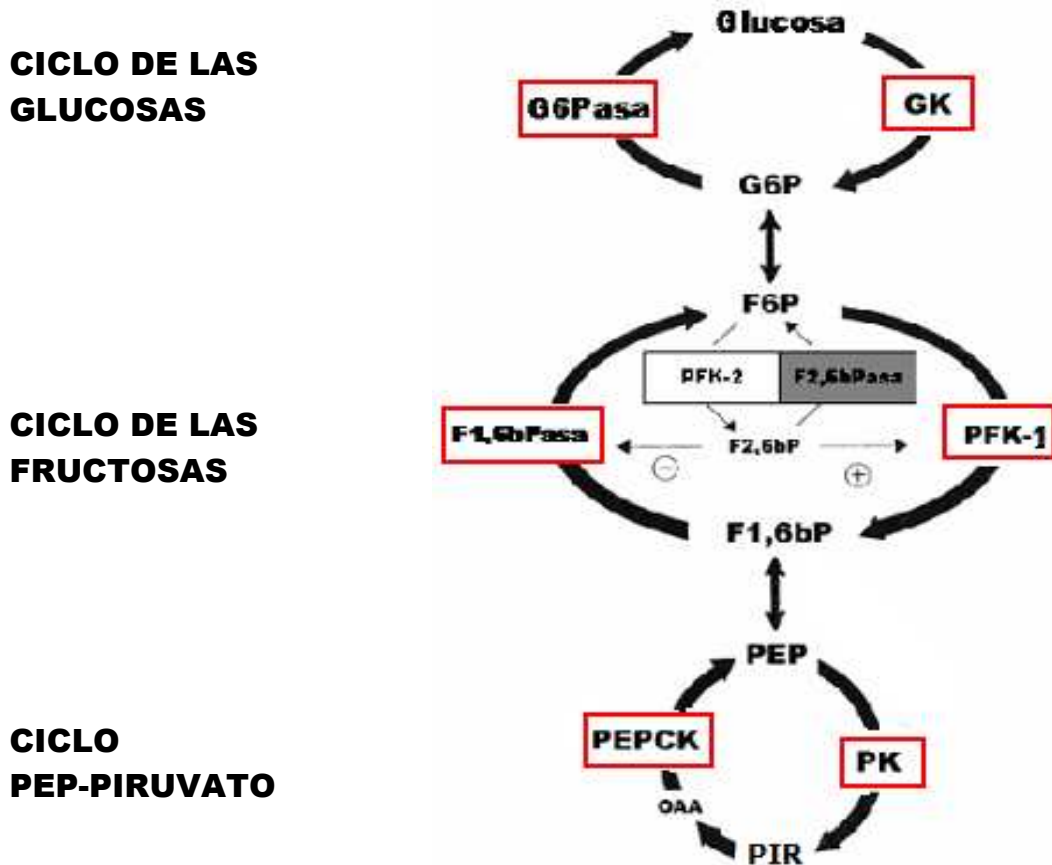


Figura 4. Ciclos metabólicos de la vía glucolítica y gluconeogénica

F6P: fructosa 6-fosfato; F2,6bP: fructosa 2,6-bifosfato; F1,6bPasa: fructosa 1,6-bifosfatasa; F2,6bPasa: fructosa 2,6-bifosfatasa; GK: glucoquinasa; G6Pasa: glucosa 6-fosfatasa; G6P: glucosa 6-fosfato; OAA: oxalacetato; PC: piruvato carboxilasa; PEP: fosfoenolpiruvato; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; PFK-1: fosfofructoquinasa-1; PFK-2: fosfofructoquinasa-2; PK: piruvato quinasa.

Para aumentar aún más la complejidad, algunos de los intermediarios de la GNG/glucolisis son comunes con otras vías metabólicas distintas y algunas de las enzimas claves se localizan también en compartimentos intracelulares distintos (retículo endoplásmico, núcleo, mitocondria) con propiedades y/o regulaciones muy particulares. Además, en el hígado existen diferentes zonas metabólicas, de modo que la distribución cuantitativa de las enzimas de las dos vías varía según la localización proximal o distal de las células a lo largo del eje vascular hepático (Jungermann y Kietzmann, 1996).

4.3.1. El cruce de la glucosa 6-fosfato y el ciclo G6P-Glucosa

El ciclo de las “glucosas” no se trata de un bucle metabólico exclusivo de la vía de la GNG/glucólisis ya que la G6P se sitúa en el cruce de otras vías metabólicas importantes, como la vía de las pentosas fosfatos (Figura 5). Por tanto, la concentración de este metabolito no se controla únicamente por la actividad de las dos enzimas “espejos” del ciclo sino también por la velocidad de las otras reacciones que lo utilizan o lo producen.

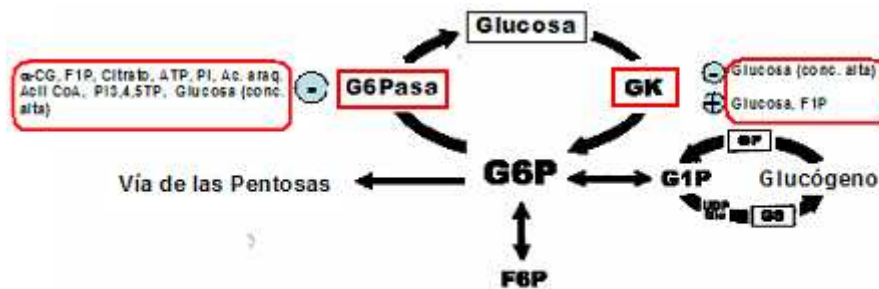


Figura 5. El cruce de la glucosa 6-fosfato y los principales efectores del ciclo de las "glucosas"

Ac. ara.: ácido araquidónico; ATP: adenosina trifosfato; α-CG: α-cetoglutarato; F1P: fructosa 1-fosfato; F6P: fructosa 6-fosfato; GK: glucoquinasa; G6Pasa: glucosa 6-fosfatasa; G1P: glucosa 1-fosfato; G6P: glucosa 6-fosfato; GP: glucógeno fosforilasa; GS: glucógeno sintasa; Pi: fosfato inorgánico; PI3,4,5TP: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato; UDP-Glc: uridina difosfato glucosa.

Delimitaremos nuestro enfoque al cuadro estricto de la GNG/glucólisis y a la regulación de las dos enzimas constitutivas del ciclo G6P-glucosa, la glucoquinasa (GK) y la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa).

**Glucoquinasa**

La GK hepática constituye la primera enzima de la glucólisis. De la familia de las hexoquinasas (hexoquinasa IV), esta enzima cataliza la fosforilación de la glucosa a G6P y posee características cinéticas particulares. Al contrario que los otros tipos de hexoquinasas, la GK posee una  $K_m$  elevada para la glucosa (~10-12 mM) y no se inhibe directamente a concentración fisiológica por su producto, la G6P ( $K_i = 60$  mM) (Printz y cols. 1993). En el control de la actividad de la GK interviene una proteína reguladora denominada GKR (glucokinase regulatory protein) (Vandercammen y Van Schaftingen, 1990). En presencia de concentraciones bajas de glucosa, la afinidad de la GKR por la GK es alta y su unión provoca la inactivación de la GK. Al contrario, un aumento en la concentración de glucosa disminuye la afinidad de GKR por la GK, lo que permite que la GK libre pueda iniciar la vía glucolítica por fosforilación de la glucosa (Agius, 1998).



### Glucosa 6-fosfatasa

La G6Pasa posee múltiples funciones, pero principalmente cataliza la reacción de la hidrólisis de la G6P en glucosa y Pi (Foster y Nordlie, 2002). Se localiza intracelularmente en la cara luminal del retículo endoplásmico (Van Schaftingen y Gerin, 2002).

Los trabajos realizados “*in vitro*” en microsomas aislados demostraron que la G6Pasa puede inhibirse por distintos metabolitos como el  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -CG), la F1P, el citrato, el ácido araquidónico o algunos ésteres de acil CoA. La insulina ejerce un efecto inhibitorio, probablemente por medio del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI3,4,5TP), mientras que el glucagón eventualmente la activa. También ejercen un efecto inhibitorio el ATP, el Pi y su producto, la glucosa, aunque las  $K_i$  de la enzima para su producto es superior a las concentraciones fisiológicas “*in vivo*” (Nordlie, 1976; Arion y cols., 1972).

#### 4.3.2. El ciclo F1,6bP-F6P y la enzima bifuncional

La fructosa 1,6-bifosfatasa (F1,6bPasa) y la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) componen el ciclo de las “fructosas”. Sin embargo, la enzima bifuncional (fructosa 2,6-bifosfatasa y fosfofructoquinasa-2) es la principal reguladora de este bucle metabólico. La enzima bifuncional se caracteriza porque cataliza dos reacciones opuestas que permiten controlar la concentración de la fructosa 2,6-bifosfato (F2,6bP), el principal efector alostérico de las dos enzimas F1,6bPasa y PFK-1 (Figura 6).

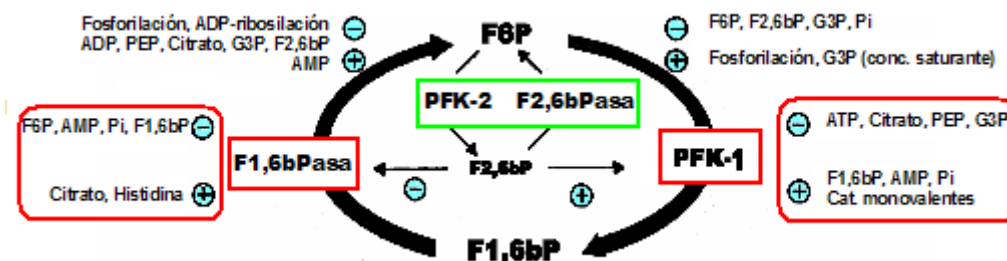


Figura 6. El ciclo de las "fructosas" y sus principales efectores

ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; F1,6bPasa: fructosa 1,6-bifosfatasa; F2,6bPasa: fructosa 2,6-bifosfatasa; F6P: fructosa 6-fosfato; F1,6bP: fructosa 1,6-bifosfato; F2,6bP: fructosa 2,6-bifosfato; G3P: glicerol 3-fosfato; PFK-1: fosfofructoquinasa-1; PFK-2: fosfofructoquinasa-2; PEP: fosfoenolpiruvato; Pi: fosfato inorgánico.

### ***Fosfofructoquinasa-1***

La fosfofructoquinasa de tipo 1 (PFK-1) constituye una de las enzimas claves de la glucólisis ya que cataliza la fosforilación de la F6P en F1,6bP. La PFK-1 parece ser exclusivamente citosólica y presenta una cinética de tipo sigmoide con un  $S_{0.5}$  próximo a 50  $\mu\text{M}$  para la F6P. Se regula alostéricamente por varios efectores: es inhibida principalmente por el ATP, pero también por el citrato, el PEP y el G3P; sus efectores positivos son la F2,6bP, el AMP y el Pi, estos últimos actúan de forma sinérgica con el sustrato de la reacción, la F6P (Hue L, 1981). Los cationes monovalentes como el potasio ( $\text{K}^+$ ) o el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) activan también a la enzima y disminuyen la inhibición alostérica inducida por el ATP (Otto y cols., 1976).

### ***Fructosa 1,6-bifosfatasa***

La fructosa 1,6-bifosfatasa hepática (F1,6bPasa) es una enzima clave en la gluconeogénesis, al catalizar la conversión irreversible de F1,6bP en F6P y en Pi. Presenta una cinética michaeliana con una  $K_m$  próxima a 5  $\mu\text{M}$  para su sustrato y una localización intracelular perinuclear (Sáez y cols., 1996). Los principales factores que intervienen en el control de su actividad son las concentraciones de sus principales inhibidores: el AMP y la F2,6bP que actúan de forma sinérgica, sus productos, así como su sustrato, pero éste último solamente a concentraciones suprafisiológicas (Hue L, 1981). Los raros activadores identificados de la F1,6bPasa son el citrato y la histidina.

### ***Enzima bifuncional (PFK-2/F2,6bPasa)***

Como se ha mencionado anteriormente, la regulación del ciclo de las “fructosas” se basa esencialmente en la F2,6bP, un efector alostérico cuya concentración intracelular se controla sutilmente por la enzima bifuncional PFK-2/F2,6bPasa.

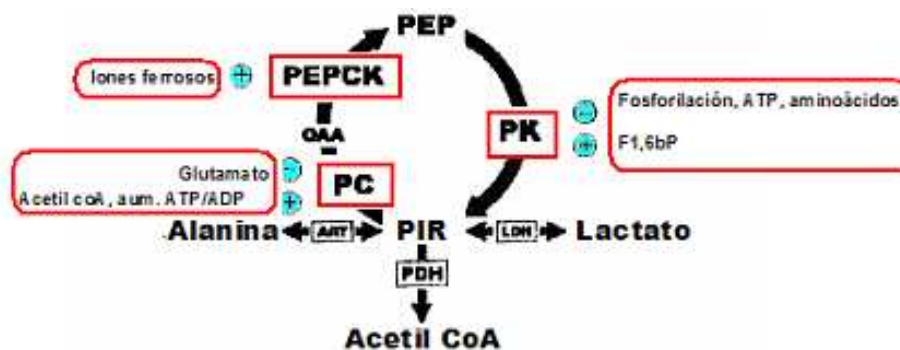
Esta enzima puede ser fosforilada en el residuo serina por la proteína quinasa A (PKA) (proteína quinasa dependiente del AMPc) lo que afecta a la actividad de sus dos dominios catalíticos: quinasa y bifosfatasa (Pilkis y cols., 1995). Esta fosforilación induce una inhibición de la PFK-2 acompañada de una activación de la F2,6bPasa. Esta doble acción produce una disminución de la concentración de la F2,6bP, el efector alostérico principal de este bucle enzimático. La enzima bifuncional puede también ser regulada por ADP-ribosilación en el residuo arginina, lo que impide su fosforilación y se traduce en una disminución de la actividad de la PFK-2 (Kurland y Pilkis, 1995).

De manera individual, la actividad de la PFK-2 es inhibida por sus dos productos, la F2,6bP y el ADP, así como por el citrato, el PEP y el glicerol 3-fosfato (G3P) y activada por el AMP (Van Schaftingen y cols., 1981). Por otro lado, la F2,6bPasa es inhibida por el producto (F6P) y el sustrato (F2,6bP) de la reacción que cataliza (Van Schaftingen y cols., 1982) y por el fosfato inorgánico (Pi) y el glicerol-3-fosfato (G3P), aunque estos dos últimos efectores inhiben a concentración fisiológica y activan a concentración saturante (Stewart y cols., 1985).

### 4.3.3. El cruce del piruvato y el ciclo PEP-Piruvato

El ciclo PEP-Piruvato, al igual que el de las “glucosas”, no se limita únicamente a la vía de la GNG/glucólisis. En concreto, el piruvato además de su carboxilación en oxalacetato por la piruvato carboxilasa (PC), también puede sufrir una descarboxilación oxidativa en acetyl CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH), puede ser transaminado en alanina por la alanina aminotransferasa (AAT) o reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH), todo ello en función del potencial redox celular.

El ciclo PEP-piruvato se puede reducir a tres reacciones distintas (**Figura 7**): la formación de piruvato la cataliza la piruvato quinasa (PK), mientras que la producción de PEP comprende dos reacciones, catalizadas por la piruvato carboxilasa (PC) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Este ciclo metabólico posee la peculiaridad de su compartimentación (en la rata, la PK y la PEPCK son citosólicas mientras que la PC es exclusivamente mitocondrial), por lo tanto, depende también de los transportadores de piruvato y de malato.



**Figura 7. El ciclo PEP-Piruvato y los principales efectores enzimáticos**

AAT: alanina aminotransferasa; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; F1,6bP: fructosa 1,6-bifosfato; LDH: lactato deshidrogenasa; OAA: oxalacetato; PC: piruvato carboxilasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; PEP: fosfoenolpiruvato; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; PK: piruvato quinasa.

#### **Piruvato quinasa**

La L-Piruvato quinasa es la isoforma hepática de la última enzima de la glucólisis, muy importante en el control de esta ruta. Cataliza la reacción unidireccional que lleva a la formación de piruvato y de ATP (por fosforilación oxidativa a nivel de sustrato) a partir de PEP y ADP. La PK constituye un clásico ejemplo de enzima alostérica por excelencia. Esta enzima presenta una cinética de tipo sigmoide y su actividad, por su

elevado  $S_{0.5}$  para el PEP (superior a 1 mM), depende estrechamente de la concentración de éste. La enzima, cuya acción requiere la presencia de cationes monovalentes, se activa principalmente por la F1,6bP y se inhibe por uno de sus productos, el ATP, así como por el acetil CoA y los ácidos grasos de cadena larga (Hue L, 1981).

Es la única enzima del ciclo PEP-Piruvato que puede ser fosforilada: su fosforilación en un residuo serina por la quinasa dependiente del AMPc (PKA) la inhibe, disminuyendo su afinidad por sus principales efectores positivos, el PEP y la F1,6bP (Engstrom L, 1978).

### ***Piruvato carboxilasa***

La piruvato carboxilasa (PC) y la PEPCK constituyen las dos enzimas de la primera etapa de la gluconeogénesis a partir del piruvato oponiéndose a la PK. En el hombre, como en la rata, la localización de la PC es exclusivamente mitocondrial y la enzima que requiere la presencia de la coenzima biotina, después del transporte intramitocondrial del piruvato, cataliza la reacción exergónica de conversión de éste en oxalacetato (OAA) (Jitrapakdee y Wallace, 1999).

La enzima posee una  $K_m$  para el piruvato próxima a las concentraciones fisiológicas (0,14 mM), por lo que su actividad depende estrechamente de la concentración de su sustrato (Hue L, 1981). Está regulada también por efectores, que en su mayoría poseen efectos opuestos sobre la PDH. Se activa por el acetil CoA y por una alta relación ATP/ADP. Al contrario, el glutamato es su efector negativo más potente.

### ***Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa***

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) cataliza la reacción exergónica que lleva a la síntesis del PEP a partir del OAA y del GTP. Se considera generalmente como la segunda enzima de la gluconeogénesis. Esta enzima está distribuida de manera relativamente equiparable entre el compartimento citosólico y el mitocondrial en el hombre, mientras que su localización en la rata es mayoritariamente citosólica (Lardy y Hughes, 1984).

Como su  $K_m$  es próxima a las concentraciones intracelulares de OAA (del orden de micromolar), su actividad está principalmente controlada por la disponibilidad de su sustrato (Hue, 1981) y puede verse influida por el estado redox de los grupos tioles de la proteína y por la presencia de algunos iones ferrosos activadores (Lardy y Hughes, 1984).

## **5. Control integrado de la gluconeogénesis**

La gluconeogénesis hepática se controla por el suministro y la disponibilidad de sustratos formadores de glucosa, por la glucosa que es su producto final, por el estado hormonal del organismo y finalmente, por el estado energético celular.

### **5.1. Control de la gluconeogénesis por la glucosa**

Estudios sobre hepatocitos aislados han demostrado que la glucosa a unas concentraciones poco elevadas, entre 2 y 5 mM, estimula la gluconeogénesis a partir del glicerol, acelerando la reoxidación de los equivalentes reducidos por medio de la lanzadera G3P-DHAP y a partir del lactato+piruvato, aumentando el flujo a través de la PC y de la PEPCK (Rigoulet y cols., 1987). Por el contrario, a partir de concentraciones superiores o iguales a 10 mM, la gluconeogénesis se inhibe por su producto final, lo que se explica por la acumulación progresiva de F2,6bP (Hue y cols., 1984).

### **5.2. Control de la gluconeogénesis por las hormonas pancreáticas**

La gluconeogénesis se regula por las hormonas pancreáticas que actúan por medio de una modulación de la concentración intracelular en AMPc.

En situación de ayuno, el glucagón estimula la gluconeogénesis por una cascada de fosforilación dependiente del AMPc. De forma global se asume que la acción del glucagón implica una inactivación de la PK y de la PFK-2 y una activación de la F2,6bPasa (Pilkis y cols., 1988; Jiang y Zhang, 2003). De este modo el glucagón disminuye el nivel celular de F2,6bP inhibiendo la glucólisis y activando la gluconeogénesis. Hay que destacar que el control de la gluconeogénesis por el glucagón difiere en función de los sustratos. Cuando se utiliza como precursor el lactato+piruvato la mayor parte del control se efectúa a través de la PC (Groen y cols., 1983). El Prof. Lerverve demostró que en presencia de DHA como sustrato, las enzimas del ciclo PEP-Piruvato tienen poco efecto en el control de la gluconeogénesis y que la distribución del control se efectúa entonces entre el ciclo de las "fructosas" y de las "glucosas" (Ichai y cols., 2001).

La insulina, inhibe clásicamente la gluconeogénesis por un efecto antagónico al glucagón a nivel del AMPc, impidiendo así la inactivación de la PK y de la PFK-2 y la activación de la F2,6bPasa, acciones estimuladas por el glucagón (Pilkis y cols., 1988; Barthel y Schmoll, 2003). Así, la insulina aumenta la concentración del efector alostérico F2,6bP.

### **5.3. Control de la gluconeogénesis por el metabolismo energético**

Los metabolismos energéticos y glucídicos están estrechamente vinculados por las modificaciones de las relaciones ATP/ADP y NADH/NAD<sup>+</sup> citosólicas.

Generalmente, el ATP y el AMP actúan en sentido opuesto. El ATP estimula la gluconeogénesis por un aumento de la relación ATP/ADP, a nivel de la PC y/o por una inhibición de la PK. Mientras que el ADP la inhibe, actuando como un efector positivo de las dos fosfofructoquinasas (PFK-1 y PFK-2) (Newsholme y Leech, 1983).

Las variaciones del potencial redox celular, que se traducen en una modificación de la relación NADH/NAD<sup>+</sup> citosólico, también regulan la gluconeogénesis a través de dos enzimas: la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (cataliza la conversión de G3PDH en 1,3-bisfosfoglicerato) y la piruvato carboxilasa (PC). La relación de la concentración de NADH y el NAD<sup>+</sup> determina la orientación del flujo a través de G3PDH porque esta enzima funciona en condiciones cercanas al equilibrio. Además, un aumento del potencial redox puede también activar el flujo a través de la PC, ya que el piruvato y el oxalacetato intervienen en el transporte de los equivalentes reducidos entre el citosol y la mitocondria.

Por último, el citrato y el acetil CoA establecen un vínculo entre el ciclo de Krebs y la gluconeogénesis mediante una activación de la gluconeogénesis. Sus acciones son complementarias: el citrato actúa sobre el ciclo de las “fructosas” inhibiendo las dos fosfofructoquinasas (PFK-1 y PFK-2) y el acetil CoA ejerce su acción sobre el ciclo PEP/piruvato, estimulando la PC (Hue L, 1981).

## **6. Control transcripcional de la gluconeogénesis**

En términos de fisiología integrada, la regulación transcripcional constituye una parte crucial del control de la glucólisis y de la gluconeogénesis. El estado nutricional del organismo así como algunas hormonas (la insulina, el glucagón o los glucocorticoides) producen una modificación significativa del contenido hepático en enzimas glucolíticas y gluconeogénicas a largo plazo, mediante modificaciones post-transcripcionales. Actualmente se asume que un período de ayuno prolongado induce la expresión de las principales enzimas de la gluconeogénesis (PEPCK, PC y G6Pasa) y disminuye aquella de las enzimas glucolíticas (GK, PFK-2 y PK) (Pilkis y Granner, 1992). Por último, la insulina y el glucagón ejercen efectos antagónicos sobre el nivel de expresión de algunos genes: la insulina induce la expresión de la PK y de la GK y reprime la de la PEPCK y la de la G6Pasa (Barthel y Schmoll, 2003), mientras que el glucagón y el AMPc funcionan de forma opuesta a la insulina disminuyendo la expresión de la PK y de la GK y sobreexpresando la G6Pasa (Nordlie y cols., 1999).

# LA MITOCONDRIA

## 1. La mitocondria: descubrimiento y estructura

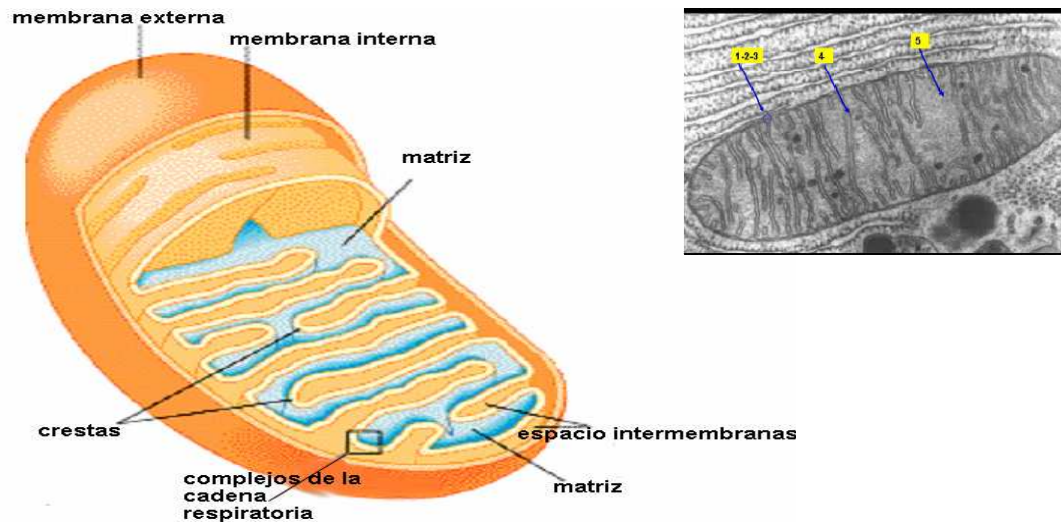
Kölliker inició, hace casi 150 años, las primeras investigaciones científicas sobre la mitocondria describiendo la morfología de estos orgánulos en el tejido muscular. El descubrimiento de Eugene Kennedy y Albert Lehninger en 1948 de que la mitocondria es el sitio donde se realiza la fosforilación oxidativa en los organismos eucariotas, marcó el inicio de la fase moderna de los estudios sobre la transferencia de energía biológica. Los estudios sobre la mitocondria se han visto recompensados gracias a la atribución de varios premios Nobel: en primer lugar a Peter Mitchel en 1978 por su teoría quimio-osmótica y después a Boyer y Walker por el estudio de la estructura y el funcionamiento de la ATP sintasa.

Las **mitocondrias** son organelas intracelulares situadas en el citoplasma de las células eucariotas. El número de mitocondrias por célula varía según el tipo celular. Sea cual sea su forma, la mitocondria presenta una ultraestructura estándar: tiene dos membranas que determinan dos cavidades. La membrana mitocondrial **externa** separa el espacio intermembranoso del citosol. La membrana mitocondrial **interna** separa la matriz mitocondrial del espacio intermembranoso.

La **membrana interna** delimita una cavidad central, llamada matriz mitocondrial, que contiene las enzimas del ciclo de Krebs y de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el genoma mitocondrial. En algunas zonas el espacio intermembranoso no existe, son puntos de contacto entre las dos membranas. La membrana interna se distingue por tener numerosos repliegues, las crestas mitocondriales, que aumentan de manera considerable su superficie. Además, posee una proporción importante de cardiolípidos (20% de los lípidos totales de esta membrana) los cuales le confieren una impermeabilidad importante frente a los iones, de manera que todos los intercambios se realizan mediante transportadores específicos para los metabolitos. Esta membrana es el punto donde tiene lugar la **fosforilación oxidativa**, ya que contiene los cuatro complejos de la cadena de transporte de electrones ( $e^-$ ) y la ATP sintasa.

Al contrario de la membrana interna, la **membrana externa** no presenta repliegues y contiene en gran abundancia una proteína especial conocida como la porina o Voltage-Dependant Anion Channel (VDAC). Las porinas forman grandes canales anclados en la bicapa lipídica que permiten el paso de todas las moléculas con peso molecular inferior a 5 kDa.

Aunque esté rodeada de una doble barrera, la mitocondria mantiene relaciones funcionales con otros componentes celulares como el citoplasma, el retículo endoplásmico, el citoesqueleto o el núcleo.



**Figura 8. Estructura y ultraestructura, por microscopía electrónica, de la mitocondria**

## **2. La fosforilación oxidativa**

La fosforilación oxidativa consiste en la oxidación de los equivalentes de reducción acoplada a la síntesis de ATP a partir de ADP. Los equivalentes de reducción (NADH, FADH<sub>2</sub>) obtenidos por descarboxilación del piruvato, β-oxidación de ácidos grasos o en el ciclo de Krebs, se oxidan por las enzimas de la cadena respiratoria de transferencia de electrones con la consiguiente obtención de energía. Dicha energía se utilizará para bombear protones (H<sup>+</sup>) hacia el exterior de la matriz mitocondrial constituyendo así un gradiente de H<sup>+</sup> que se utiliza para la síntesis de ATP a partir de ADP, mediante el complejo enzimático ATP-sintasa (complejo V).

### **2.1. La cadena respiratoria**

La cadena respiratoria es una estructura multiproteica cuya naturaleza se ha determinado principalmente por 3 métodos: la utilización de inhibidores, el estudio de estados respiratorios estacionarios definidos por Britton Chance (**Chance y cols., 1956**) y el aislamiento de los diferentes complejos que la constituyen.



Consta de la **ATP sintasa** y de **cuatro complejos** transportadores de electrones formados por alrededor de cincuenta polipéptidos. Cada uno de estos complejos contiene agrupamientos prostéticos involucrados en una serie de reacciones de oxido-reducción. Los pares redox son únicamente transportadores de electrones (como  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ ), o transportadores de electrones y de protones (es el caso de las flavinas y de las quinonas).

En la mayoría de los organismos, tres de los complejos de la cadena respiratoria son sitios de acoplamiento donde la transferencia de electrones está asociada a una expulsión de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranoso (complejo I, III, IV). La energía que lleva este gradiente se emplea por el complejo V para la síntesis de ATP.

Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e  
Figure 21.30

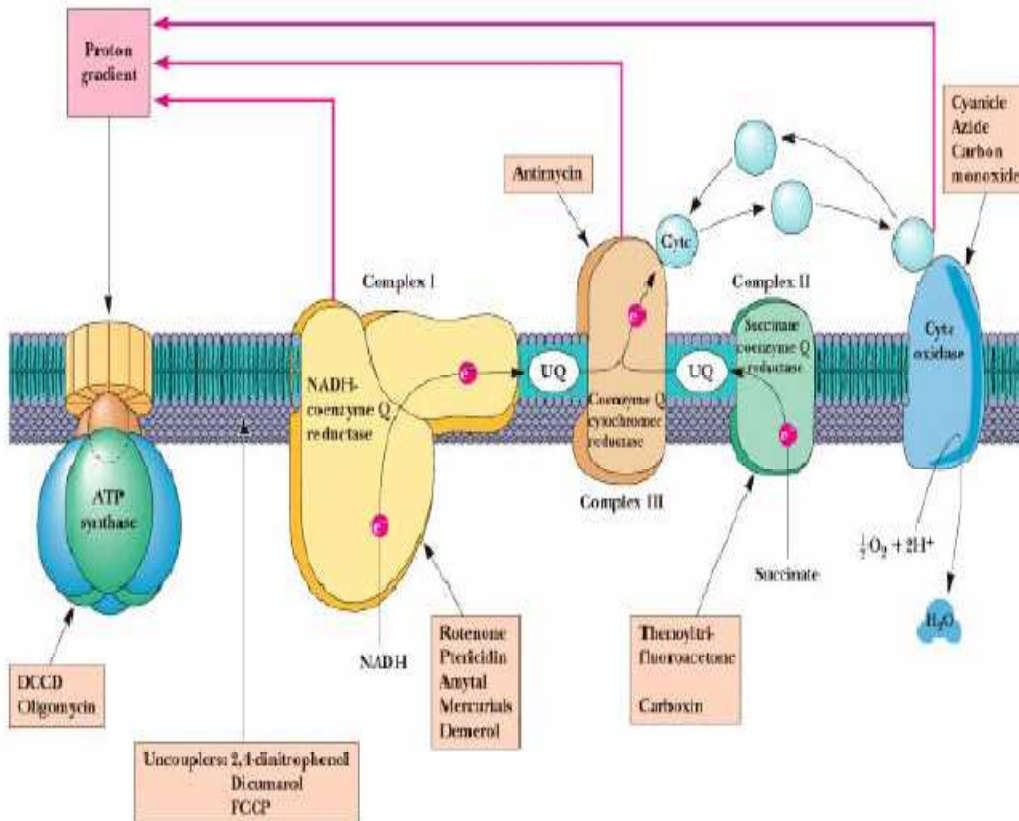


Figura 9. Esquema de la cadena respiratoria y de la ATP-sintasa

ATP: adenosina-5'-trifosfato; Cyt C: citocromo c;  $e^-$ : electrón;  $\text{H}^+$ : protón;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : agua; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido;  $\text{O}_2$ : oxígeno;  $\text{P}_i$ : fosfato inorgánico; UQ: ubiquinona

**Inhibidores complejo I:** amital, demerol, mercurials, ptericidina, rotenona; **inhibidores complejo II:** carboxina, thenoyltrifluoroacetona; **inhibidores complejo III:** antimicina A; **inhibidores complejo IV:** azida; cianuro; CO: monóxido de carbono; **inhibidores ATP-sintasa (-asa):** DCCD: N,N'-diciclohexilcarbodiimida, oligomicina; **desacopladores:** DNP: 2,4-dinitrofenol; dicumarol; FCCP (carbonil cianida p-trifluorometoxi-fenilhidrazona)

### 2.1.1. El complejo I: NADH - ubiquinona oxidorreductasa

Es el complejo de la cadena respiratoria que cataliza la primera etapa de transferencia de electrones, cediendo dos electrones desde el NADH a la ubiquinona, acoplada a una transferencia vectorial de protones ( $H^+$ ) a través de la membrana mitocondrial interna (Schultz y cols., 2001; Weiss y cols., 1991). Está generalmente admitido que la estequiometría del acoplamiento entre la transferencia de electrones y el flujo de protones sería igual a  $2 H^+$  expulsados por electrón, por lo tanto,  $4 H^+$  por molécula de NADH oxidado.

La transferencia de electrones a la quinona está inhibida por diferentes moléculas como el amital, la rotenona y la piericidina (Degli Esposti 1998, Ino y cols., 2003)

### 2.1.2. El complejo II: succinato - ubiquinona oxidorreductasa

Este complejo está compuesto de cuatro sub-unidades proteicas (Lancaster 2002):

- dos subunidades hidrófilas que contienen el sitio de fijación de ácidos dicarboxílicos
- dos subunidades hidrófobas ancladas a la membrana mitocondrial interna, que contienen el citocromo b y el sitio de fijación a la ubiquinona

La succinato-ubiquinona oxidorreductasa cataliza la reoxidación del succinato en fumarato, que se traduce en la transformación de  $FADH_2$  en FAD y como consecuencia, dos electrones se transfieren así al complejo  $bc_1$  (complejo III) por medio de un *pool* de ubiquinona que difunde al interior de la fase lipídica de la membrana mitocondrial interna. Esta transferencia de electrones no está asociada a la expulsión de protones (Ohnishi y cols., 2000; Hederstedt 2003a, 2003b).

### 2.1.3. El complejo III: complejo $bc_1$ (ubiquinol - citocromo c reductasa)

Distintos sistemas permiten la reducción de las quinonas: los complejos I, II y también dos deshidrogenasas (la  $\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa y una flavoproteína implicada en la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos). Las quinonas reducidas en quinoles constituyen un *pool* de coenzimas libres en la fase lipídica de la membrana mitocondrial interna y juegan un importante papel como lanzaderas de los equivalentes de reducción entre todos estos complejos proteicos membranosos y el complejo  $bc_1$ . Este último complejo, permite una transferencia de electrones a un segundo transportador móvil situado en el espacio intermembranoso: el citocromo c, que transporta los electrones hasta el complejo IV de la cadena respiratoria. Es un proceso asociado a una expulsión de protones, lo que hace del complejo  $bc_1$  el segundo sitio de acoplamiento entre

transferencia de  $e^-$  y bombeo de  $H^+$ . La transferencia de electrones por este complejo se inhibe por el mixotiazol y la antimicina

#### 2.1.4. El complejo IV: citocromo c oxidasa (citocromo $aa_3$ )

Este complejo cataliza la última reacción de oxido-reducción de la fosforilación oxidativa. El complejo IV oxida al citocromo c y los electrones se transfieren al oxígeno que es el último aceptor de  $e^-$  de la cadena respiratoria. Al contrario que la transferencia de  $e^-$  que tiene lugar en los complejos I y III, la transferencia de electrones del citocromo c al oxígeno es irreversible. El oxígeno recibe los  $e^-$  y se transforma en agua. En esto consiste el consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) en la respiración. Esta es una reacción muy exotérmica y la energía liberada se emplea para la expulsión de  $H^+$  hacia el espacio intermembranoso (Wikstrom, 2004).



#### 2.1.5. El complejo V: $F_0F_1$ -ATP sintasa

Las ATP sintasas (ATPasa) están presentes en las membranas transductoras de energía, como las membranas de mitocondrias, de cloroplastos y también en la membrana plasmática de los procariontes. Recientemente, también se han localizado sobre las membranas plasmáticas de numerosas células, como los hepatocitos y los adipocitos. Aunque en esta localización las ATPasas parecen tener una modesta actividad sintetizadora de ATP, juegan un papel muy importante en la señalización celular y limitan la acumulación de gotitas de triglicéridos intracitosólicos (Arakaki y cols., 2007).

Este complejo está constituido por 3 dominios distintos: un dominio hidrosoluble  $F_1$  que contiene los sitios catalíticos, un dominio  $F_0$  membranoso que forma el canal de protones y un dominio que permite el anclaje de  $F_1$  a la membrana. El dominio membranoso  $F_0$  es un oligómero de subunidades  $c$  que giran cuando se produce el paso de protones del espacio intermembranoso a la matriz. El dominio  $F_1$  fue purificado en 1961 por Racker (Racker, 1961) y está constituido por 5 subunidades diferentes:  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ . Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  contienen los sitios de fijación de los nucleótidos adenílicos y los sitios catalíticos están situados en cada una de las subunidades  $\beta$ .

La  $F_0F_1$ -ATP sintasa asocia el bombeo de protones desde el espacio transmembranario hasta la matriz mitocondrial a la síntesis de ATP a partir del ADP. Este complejo permite convertir el gradiente electroquímico de protones en una energía química transportada por las moléculas de ATP. Se trata de un mecanismo reversible.

Numerosas moléculas fisiológicas o artificiales actúan sobre la ATPasa. Lo más frecuente suele ser que se trate de moléculas inhibitoras como la oligomicina, que actúa sobre la actividad de la sub-unidad  $F_0$  (Hong y Pedersen, 2008).

## **2.2. La teoría quimio-osmótica de Mitchell**

En 1961, Peter Mitchell propuso una teoría denominada teoría quimio-osmótica que ha resultado ser la más adecuada para explicar el proceso de transducción de la energía en la mitocondria (Mitchel, 1961). Las bases de esta teoría se pueden resumir en tres postulados:

- La membrana mitocondrial interna posee una conductividad débil para la mayoría de las sustancias cargadas y es muy poco permeable a los protones.
- Los complejos de la cadena respiratoria están dispuestos de manera asimétrica en la membrana interna, constituyendo entidades individuales que asocian la transferencia de electrones a una expulsión orientada de protones haciendo el espacio intermembranoso. Así permiten el establecimiento de un gradiente electroquímico de protones entre las dos caras de la membrana mitocondrial interna.
- La diferencia de potencial entre las dos fases acuosas de una y otra parte de la membrana mitocondrial interna es el único intermediario energético entre los distintos sistemas transformadores de energía estructuralmente independientes. Proporciona la energía necesaria a los transportes activos secundarios y a la síntesis de ATP.

La oxidación de los equivalentes reducidos (NADH y/o  $FADH_2$ ) por el oxígeno, a nivel de la cadena respiratoria, está acoplada a una transferencia vectorial de protones desde la matriz hacia el espacio intermembranoso generando un gradiente electroquímico de protones, que se descompone en una diferencia de potencial eléctrico transmembranoso ( $\Delta\psi$ ) y en un gradiente de pH ( $\Delta pH$ ) entre un lado y otro de la membrana mitocondrial interna. El gradiente electroquímico de protones, normalmente expresado en término de fuerza protón motriz ( $\Delta p$ ), constituye una fuerza que empuja los protones para volver a entrar a la matriz mitocondrial. Cuando los protones regresan a la matriz mitocondrial, a través de la subunidad transmembranosa  $F_0$  de la ATPasa, la energía que liberan se utiliza para la síntesis de ATP por parte de la subunidad hidrosoluble  $F_1$  de la ATPasa.

Además, la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los protones no es absoluta y una parte del gradiente electroquímico de protones se disipa en forma de calor por el retorno pasivo de los protones (leak) hacia la matriz sin pasar por la ATP sintasa.

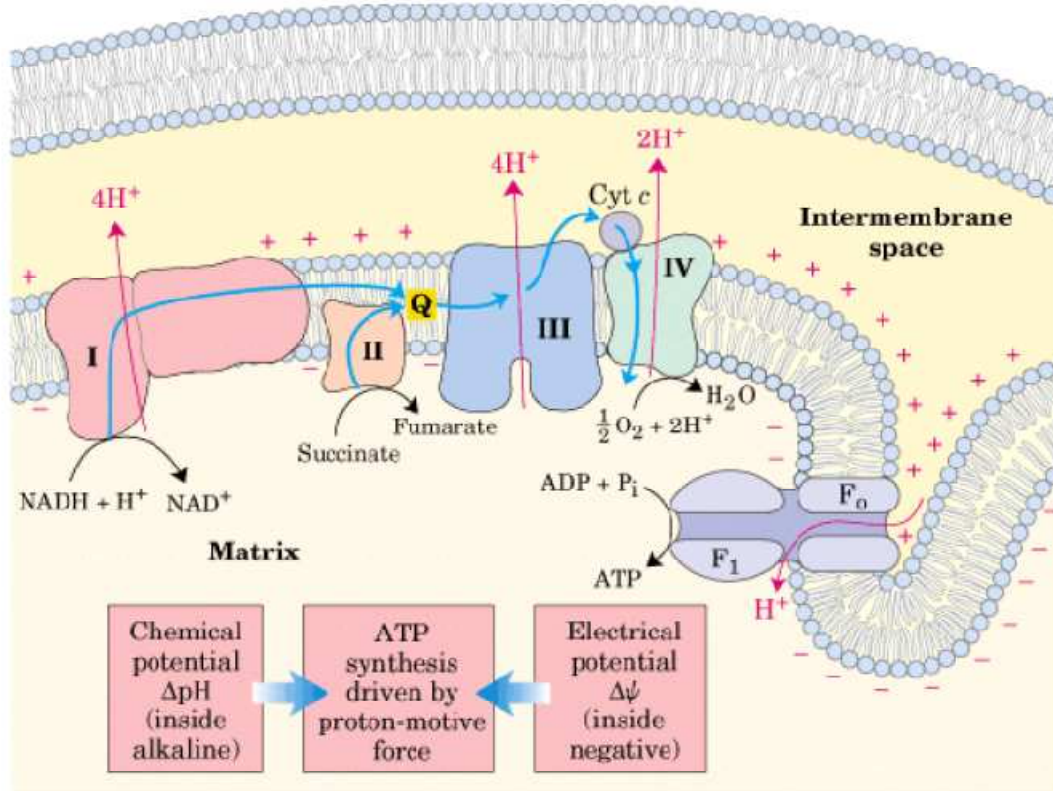


Figura 10. Teoría quimiosmótica de Mitchel

El bombeo de protones (H<sup>+</sup>) a través de la cadena de transporte de electrones, que acompaña a la transferencia de e<sup>-</sup> en el complejo I, III y IV) crea una fuerza protón-motriz (Δp), suma de las contribuciones de un potencial químico (ΔpH) y un potencial eléctrico (Δψ), que sirve como almacén de energía para la síntesis de ATP por acción de la ATPasa-complejo V

ATP: adenosina-5'-trifosfato; ADP: adenosina-5'-difosfato; Cyt C: citocromo c; F<sub>0</sub>: subunidad F<sub>0</sub> de la ATP-asa; F<sub>1</sub>: subunidad F<sub>1</sub> de la ATP-asa; H<sup>+</sup>: protón; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: agua; NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido; O<sub>2</sub>: oxígeno; P<sub>i</sub>: fosfato inorgánico; Q: ubiquinona

### 2.2.1. ¿Qué sistemas aprovechan la fuerza protón motriz?

La fuerza protón motriz se utiliza en primer lugar para la síntesis de ATP, sin embargo, además de esta función principal numerosos transportadores activos utilizan esta energía, como: la lanzadera del glutamato-malato (que permite la entrada del NADH citosólico hacia la matriz) y la translocasa (esencial para el intercambio de nucleótidos entre el medio extra e intracelular).

### 2.2.2. La respiración mitocondrial

El **estado 4** se define como la respiración mitocondrial debida a la fuga o entrada pasiva de protones desde el citosol a la matriz mitocondrial. En este estado respiratorio, se incluye la actividad de las ATPasas contaminantes. Los equivalentes de reducción (NADH y FADH<sub>2</sub>) se oxidan en los complejos respiratorios I y II, respectivamente y pueden ser generados por la adición de glutamato/malato (produce NADH) o succinato/malato (origina FADH<sub>2</sub>) gracias a la acción de las lanzaderas malato/aspartato y glicerol 3-fosfato, respectivamente.

El **estado 3** de la respiración refleja simultáneamente la respiración mitocondrial en estado fosforilante en presencia de ADP y también la respiración del estado 4 ocasionada por la pérdida de energía (fuga de H<sup>+</sup>).

El **ratio de control respiratorio (RCR)** representa la relación entre el estado 3 y el estado 4 de la respiración (estado3/estado4). Esta relación disminuye cuando aumenta el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Este parámetro permite evaluar la calidad de la preparación mitocondrial de manera que, una buena preparación de mitocondrias tendrá un RCR>7 con glutamato/malato y un RCR>5 con succinato/malato.

Por otra parte, los **desacopladores protonóforos** permeabilizan la membrana mitocondrial interna a los protones desacoplando así la respiración (transporte de e<sup>-</sup> y consumo de oxígeno) de la fosforilación. Por tanto, se disipa el potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) y los protones entran en la matriz mitocondrial directamente a través de la membrana sin producir ATP. En esta situación, hay inhibición de la síntesis de ATP asociada a un aumento importante de la respiración con el fin de re-establecer el gradiente de protones y el  $\Delta\psi$  (estado desacoplado).

La **oligomicina** inhibe la síntesis de ATP mediante la inhibición directa de la ATPasa. En este caso, se inhibe la respiración asociada a la fosforilación de ADP y se mantiene la respiración del estado 4 controlada únicamente por la entrada pasiva de protones del citosol a la matriz mitocondrial (**estado 4 real**).

### 2.2.3. ¿Qué controla la cadena respiratoria?

Históricamente, el concepto que permite estudiar el control de una vía metabólica se basa en la existencia de una *etapa limitante* irreversible, cuya velocidad se impondría a toda la vía metabólica a la que pertenece. Los primeros estudios sobre los mecanismos de regulación de la fosforilación oxidativa consideraban dos etapas como controladoras:

- La **citocromo c oxidasa (complejo IV)**: la reacción catalizada por esta enzima en la cadena respiratoria no funciona en condiciones cercanas al equilibrio termodinámico (Erecinska e Wilson, 1982). Por lo tanto, los factores que influyen en la velocidad de esta reacción regulan la velocidad de la fosforilación oxidativa, como es el caso de las variaciones de las concentraciones de oxígeno, de ATP, de ADP, de Pi o también las variaciones de pH (Brown, 1992; Kadenbach y cols., 1998). La citocromo c oxidasa posee, en su subunidad IV, un sitio de regulación alostérica por el ATP y/o el ADP. El enlace de estos dos efectores es independiente de la fuerza protón motriz (Kadenbach y cols., 1999).

- El **transportador de los nucleótidos adenílicos**: la entrada de ADP<sup>3-</sup> y la salida de ATP<sup>4-</sup> dirigidas por la translocasa de nucleótidos de adenina está lejos del equilibrio termodinámico (Wanders y cols., 1981).

Sin embargo, un acercamiento más general ha permitido mostrar que en una red metabólica el control metabólico no está limitado a una sola etapa enzimática sino que está distribuido en el conjunto de toda la vía metabólica. Así resulta que:

- El control de la fosforilación oxidativa no se atribuye a una sola etapa enzimática sino que está dividido entre un cierto número de etapas de la red. Por ejemplo, con succinato, cuando la producción del ATP es máxima (estado 3 de respiración), el control de la respiración está esencialmente llevado a cabo por el transportador de los nucleótidos adenílicos, el transportador de los dicarboxilatos y la citocromo c oxidasa, de manera que, a mayor cantidad de ADP disponible, mayor es la respiración.

- La distribución del control no es un parámetro fijo, sino que varía en función del estado estacionario considerado. En ausencia de fosforilación (estado 4 de la respiración), la respiración está controlada principalmente por la entrada pasiva de los protones en la matriz mitocondrial (Groen y cols., 1982) y por la cadena respiratoria (Brand y cols., 1988). Cuando la velocidad de respiración es intermediaria entre el estado 4 y el estado 3 (situación próxima a la condición fisiológica), la distribución del control evoluciona en función de la actividad del sistema consumidor de ATP utilizado (sistema hexoquinasa), que también es parte del control global de la respiración. En estas condiciones, la velocidad de la respiración depende de la hidrólisis del ATP, de la actividad del transportador de los nucleótidos adenílicos, del suministro en sustratos de la cadena respiratoria y de la fuga (*leak*) de H<sup>+</sup> de la membrana mitocondrial interna.

#### 2.2.4. Modificaciones del rendimiento de la Fosforilación Oxidativa

El rendimiento o la eficacia del acoplamiento entre la respiración mitocondrial y la síntesis de ATP se ha estudiado ampliamente durante los últimos 50 años. Se expresa mediante una estimación de la relación P/O que representa el número de moléculas de ATP formadas por moléculas de oxígeno reducidas. En los primeros experimentos en mitocondrias aisladas de rata se medía una relación igual a 3 cuando los electrones se aportaban a la cadena respiratoria a nivel del complejo I y una relación igual a 2 cuando entraban en el complejo II. Esta estimación, basada en medidas experimentales, se justifica por el hecho de que se necesitan 3 H<sup>+</sup> para la síntesis de una molécula de ATP y un protón más se consume en la exportación del ATP al exterior de la matriz. Hacen falta, por lo tanto, 4 protones para la transporte de una molécula de ATP fuera de la mitocondria. La oxidación de los sustratos respiratorios a partir del complejo I de la cadena respiratoria expulsa 12 electrones hacia el espacio intermembranoso, contra los 8 electrones exportados cuando se trata del aporte de sustratos al complejo respiratorio II. Encontramos una relación de 12/4=3 y 8/4=2 de moléculas de ATP formadas por molécula de oxígeno reducida, según que los electrones pasen por dos o tres sitios de acoplamiento en la cadena respiratoria.

Estudios posteriores han indicado que estas relaciones eran en realidad inferiores a los valores de 3 y 2, cercanas a 2,5 y 1,5 (Hinkle y cols., 1991; Lee y cols., 1996). Gracias a estos estudios se demostró que una parte de la fuerza protón-motriz generada por la cadena respiratoria “*se perdía*” para la síntesis de ATP, debido a un cierto grado de “*desacoplamiento*” entre la oxido-reducción y la fosforilación del ADP. A partir de aquí, numerosos trabajos han demostrado que la fuerza protón-motriz también se utilizaba para otros fines diferentes a los de la síntesis de ATP, sobre todo para los procesos de transporte activo. Una parte de esta fuerza se disipa a través de proteínas desacoplantes y la energía liberada es restaurada en forma de calor. Existe un cierto grado de fugas de protones a través de la membrana mitocondrial interna “*leak*” y también un fenómeno de patinaje a nivel del complejo IV “*slipping*” que intervienen en la disminución del rendimiento de la fosforilación oxidativa. A estos fenómenos inicialmente se les consideró como de “*energía desperdiciada*”, pero en realidad poseen una considerable importancia fisiológica y están finamente regulados.

##### ***Permeabilidad de membrana a los protones (proton leak)***

Si la fuerza protón motriz permite la síntesis de ATP, generando un flujo de protones a través de la ATP sintasa, las membranas biológicas son más o menos permeables y una cierta cantidad de protones es susceptible de escapar a la ATP sintasa y de volver a entrar en la matriz sin participar en la síntesis de ATP. Este proceso contribuye a la disipación de la energía almacenada en forma de gradiente de protones, de manera que, a mayor fuga de protones, menor es la fosforilación oxidativa.



La permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los protones puede aumentarse, de manera artificial, utilizando desacopladores protonóforos como 2,4 dinitrofenol (DNP) o el carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). Estos agentes desacoplantes colapsan el potencial de membrana y activan la cadena respiratoria al máximo.

#### ***Patinaje de las bombas de protones (slipping)***

El “*slipping*” es una pérdida de la eficacia de las bombas de protones, debida a un desacoplamiento parcial y variable de las reacciones químicas (transferencia de electrones o síntesis de ATP) y del transporte de protones.

Azzone y sus colaboradores observaron que la citocromo c oxidasa podía cambiar de estequiometría a medida que la concentración de sustrato aumentaba. En presencia de una mayor cantidad de sustrato, el consumo de oxígeno se elevaba sin modificación de la fuerza protón-motriz. Esta disociación no estaba ligada a un aumento de “*leak*”, pero sí a la bajada de la relación de los H<sup>+</sup> expulsados sobre los electrones donados al oxígeno en el complejo IV (Azzone y cols., 1985). A este mecanismo de desacoplaje “intrínseco” le denominaron como “*slipping*”, por ser una bomba que patina en su acción. El NO, por ejemplo, posee la capacidad de reducir el “*slipping*” del complejo IV (Clerc y cols., 2007).

También es posible una modificación de la estequiometría de la ATP sintasa. En presencia de almitrina, la relación P/O disminuye sin modificación del consumo de oxígeno, del potencial redox o del potencial de membrana de las mitocondrias de levaduras. Esta pérdida del rendimiento se corresponde con un cambio en la estequiometría de la ATP sintasa (Rigoulet y cols., 1989).

### **3. Síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Hace 40 años varios estudios pusieron en evidencia que las mitocondrias constituían una zona de producción elevada de radicales libres (Boveris y Chance, 1973). Posteriormente se demostró que el principal radical libre producido por ellas era el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), pero el radical libre liberado por la mitocondria era el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La transformación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno lo realiza una superóxido dismutasa mitocondrial. Más recientemente, los estudios se han centrado en localizar el sitio preciso de formación del anión superóxido. Se sabe que existen dos sitios fundamentales de formación: el complejo I y el complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los ROS se producen en condiciones de alto potencial de membrana, en aquellas condiciones donde el consumo de la fuerza protón-motriz es débil (por disminución de la síntesis de ATP, por ejemplo). La producción de ROS por la mitocondria juega un papel fisiológico muy importante

dentro de la señalización celular. El exceso en su producción está ligado a daños sobre el ADN, las proteínas o los lípidos que están implicados en el envejecimiento celular, pero también en diferentes patologías degenerativas neurológicas, e incluso la diabetes (Tahara y cols., 2009).

El complejo I mitocondrial es el principal sitio de producción de ROS, de acuerdo a dos modelos:

- el primero se corresponde con una disponibilidad elevada en NADH junto con una fuerza protón-motriz muy elevada. El anión superóxido arrebató un electrón a una flavina muy reducida constituyente del complejo I;
- el segundo modelo se explica por un pool de coenzima Q muy reducido que induce el **flujo reverso de electrones** hacia el complejo I. Este flujo reverso se acompaña de la producción de anión superóxido (Murphy, 2009).

La rotenona, inhibidor del complejo I, aumenta la producción de ROS según el primer modelo en presencia de una concentración elevada de NADH. Al contrario, inhibe fuertemente la producción de ROS por flujo reverso (Batandier y cols., 2002). Esta misma inhibición la realiza la metformina (Batandier y cols., 2006).

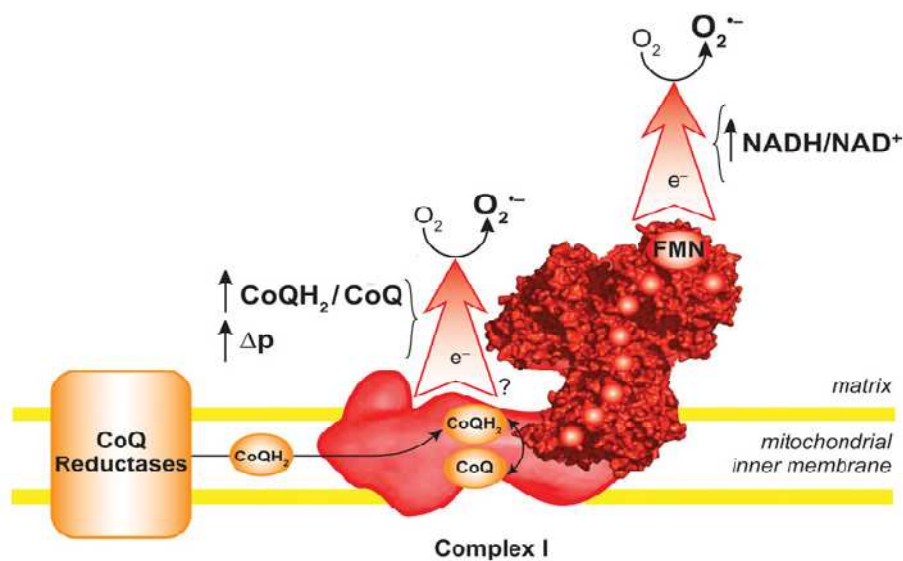


Figura 10. Producción de  $O_2^-$  por el complejo I

Mediante el primer mecanismo explicado, el componente FMN del complejo I produce grandes cantidades de  $O_2^-$  en respuesta a un "pool" muy reducido de NADH. Una elevada fuerza protón-motriz y un "pool" de CoQ reducido inducen el flujo reverso de  $e^-$  en un sitio desconocido del complejo I, pero que se sospecha que está situado en una zona próxima al sitio de unión del CoQ.

## **4. El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP)**

### **4.1. El fenómeno de la transición de la permeabilidad**

El fenómeno de la transición de la permeabilidad se puede definir como un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial a todas las moléculas con peso molecular inferior a 1,5 kDa. Este fenómeno se traduce en un desmoronamiento de la fuerza protón-motriz y de los principales gradientes iónicos de la mitocondria, acompañados por una depleción en compuestos matriciales (sustratos, nucleótidos adenílicos y piridínicos). Durante mucho tiempo se consideró a este fenómeno como un artefacto causado por una alteración de las mitocondrias. Pero gracias a numerosos trabajos de investigación se ha demostrado que este proceso se regula mediante la modulación de la apertura de un canal proteico de alta conductancia en la membrana mitocondrial interna: el poro de transición de la permeabilidad.

Los primeros investigadores que se dedicaron a estudiar la regulación de este fenómeno de la transición de la permeabilidad fueron Hunter y Haworth mediante el empleo de distintos compuestos fisiológicos (Haworth y cols., 1979; Hunter y cols., 1979a, 1979b). Estos científicos observaron que solamente el  $\text{Ca}^{2+}$  era suficiente para inducir la transición de la permeabilidad. Los otros compuestos eran o bien potenciadores de la acción del  $\text{Ca}^{2+}$  (Pi, ácidos grasos libres, oxidación del NADH), o bien inhibidores de su acción ( $\text{H}^+$ , magnesio, estroncio, ADP y la reducción del NAD).

La hipertrofia mitocondrial se atribuye a la entrada de moléculas osmóticamente activas y de agua a la matriz mitocondrial. Este fenómeno, por lo tanto, entraña una disminución de la presión oncótica asociada a la presencia de compuestos de menos de 1,5 kDa de peso molecular.

La liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  ligada al abultamiento mitocondrial no interviene ni en el uniporte, ni el intercambiador de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ . Este fenómeno, que puede llegar a provocar una ruptura total de la membrana mitocondrial externa, se revierte por la adición de quelantes del  $\text{Ca}^{2+}$ . Las mitocondrias van a responder de manera heterogénea a la transición de la permeabilidad confiriendo a este proceso un carácter auto-catalítico en el que el cambio de una mitocondria induce lo mismo en su vecina.

### **4.2. Estructura y regulación del PTP**

Hasta el día de hoy, todavía no se ha definido completamente la naturaleza molecular de este poro, si bien no se pone en duda su implicación en los procesos de muerte celular. Parece que el PTP se trata de un complejo multiproteico, con numerosas

proteínas candidatas a constituirlo, como porinas, las proteínas de la familia BAX-Bcl2, el transportador mitocondrial de los nucleótidos adenílicos y el complejo I de la cadena respiratoria.

El  $\text{Ca}^{2+}$  es el inductor suficiente y necesario para la apertura del PTP, aunque no es el único catión divalente que puede modular la apertura del PTP. La cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  necesaria para inducir esta apertura varía según el órgano y tejidos considerados y según la presencia o no de activadores o inhibidores del PTP. Existen 2 sitios de unión para los cationes divalentes a nivel del PTP (**Bernardi y cols., 1993**):

- existe un sitio en la matriz mitocondrial sobre el que se va a fijar el  $\text{Ca}^{2+}$  y va a ejercer su efecto activador de apertura del poro. Sobre este sitio también se pueden fijar el manganeso y el estroncio
- el segundo sitio de fijación de cationes se localiza sobre la cara externa de la membrana mitocondrial interna. La apertura del poro se ve favorecida por valores de pH próximos a los fisiológicos (**Nicolli y cols., 1993**) e inhibida por aquellos valores de pH ácidos (**Bernardi y cols., 1992**).

# ESTRÉS OXIDATIVO

## 1. Definición

El estrés oxidativo se define como “una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de especies reactivas del oxígeno como una disminución en los sistemas de defensa”.

## 2. Fuente de las Especies Reactivas

Hay varios tipos diferentes de especies reactivas: *especies reactivas de oxígeno (ROS)*, *especies reactivas de cloro (RCN)* y *especies reactivas de nitrógeno (RNS)*. Estas especies reactivas son productos normales del metabolismo celular y son necesarias, a bajas concentraciones, para mantener el estado redox celular, la función celular y la señalización intracelular (Pérez-Matute y cols., 2009). Por ejemplo, intervienen en la defensa del organismo frente a agentes infecciosos. El estrés oxidativo aparece cuando existe una sobreproducción de ROS/RCN/RNS no compensado por los sistemas anti-oxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. El exceso de radicales libres daña la estructura y función de componentes celulares como los lípidos, proteínas o el ADN. Debido a esto, el estrés oxidativo está implicado en la etiología de varias enfermedades humanas y en procesos de envejecimiento.

Los radicales libres se definen como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en sus orbitales atómicos o moleculares (Halliwell y Gutteridge, 1999). Estos electrones desapareados le confieren al radical libre un elevado grado de reactividad con otras moléculas.

### 2.1. Especies reactivas de oxígeno (ROS)

Los radicales libres derivados del oxígeno constituyen el tipo más importante de radicales libres formados por los organismos.

El **anión superóxido ( $O_2^-$ )** se considera como el principal ROS y puede interactuar con otras moléculas para generar ROS “secundarios” (Valko y cols., 2005). Se genera en la mitocondria por una fuga prematura de electrones hacia el oxígeno durante la transducción de energía. Del 1-3% de todos los electrones de la cadena de transporte “*se fugan*” en los complejos respiratorios I y III para generar superóxido en lugar de reducir completamente el oxígeno a agua. El **radical hidroxil ( $OH^\cdot$ )** posee una gran reactividad y una vida media “*in vivo*” muy corta, de  $10^{-9}$  segundos. El **peróxido**

**de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )** es otra especie reactiva de oxígeno importante, al igual que el **oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )**.

Los peroxisomas producen únicamente  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pero no superóxido, en condiciones fisiológicas normales (Valko y cols., 2004). Los **peroxisomas** constituyen un lugar muy importante de consumo de oxígeno en las células y este elevado consumo les lleva a producir  $\text{H}_2\text{O}_2$  con el que oxidan diferentes moléculas. Esta organela también contiene **catalasa**, que descompone el peróxido de hidrógeno y evita su acumulación muy tóxica. Por lo tanto, en el peroxisoma se mantiene un delicado equilibrio entre la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su descomposición. Cuando estas organelas sufren algún daño, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sale al citosol contribuyendo en los fenómenos del estrés oxidativo.

Las **células fagocíticas**, como los neutrófilos, y las **endoteliales** poseen en su membrana plasmática la enzima **NAD(P)H oxidasa** que produce el radical superóxido necesario para la destrucción bacteriana (Decourse y cols., 2005).

Otros sistemas enzimáticos capaces de transferir electrones al oxígeno molecular para formar el radical superóxido incluyen: **ciclooxigenasas, lipoxigenasas, citocromo P450 reductasa y la xantina oxidasa (XO)** (Selemidis y cols., 2008).

## 2.2. Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

El **óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ )** es una molécula pequeña que contiene un electrón desapareado y se produce por acción de enzimas óxido nítrico sintasas específicas (NOSs) encargadas de metabolizar la arginina a citrulina (Ghafourifar y cols., 2005). Es un radical libre muy abundante que interviene en numerosos procesos fisiológicos como, neurotransmisión, regulación de la presión sanguínea, mecanismos de defensa, relajación del músculo liso y regulación inmunitaria. El  $\text{NO}^{\cdot}$  tiene una vida media en medio acuoso de tan solo unos segundos, sin embargo, al ser soluble tanto en medio acuoso como lipídico puede difundir rápidamente a través del citoplasma y las membranas plasmáticas. En el medio extracelular va a reaccionar con el oxígeno y el agua para formar aniones nitratos y nitritos.

La sobreproducción de RNS también se denomina estrés nitrosativo (Ridnour y cols., 2004) y produce reacciones de nitrosilación que alteran la estructura y función normal de las proteínas.

Durante los procesos inflamatorios, las **células del sistema inmune** forman anión superóxido y óxido nítrico. En estas condiciones, ambas especies reactivas pueden interaccionar juntas para formar cantidades significantes de una molécula aún más perjudicial: **el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot}$ )**. Se trata de un agente oxidante muy activo que puede provocar daño en el ADN y oxidación de los lípidos (Carr y cols., 2000).

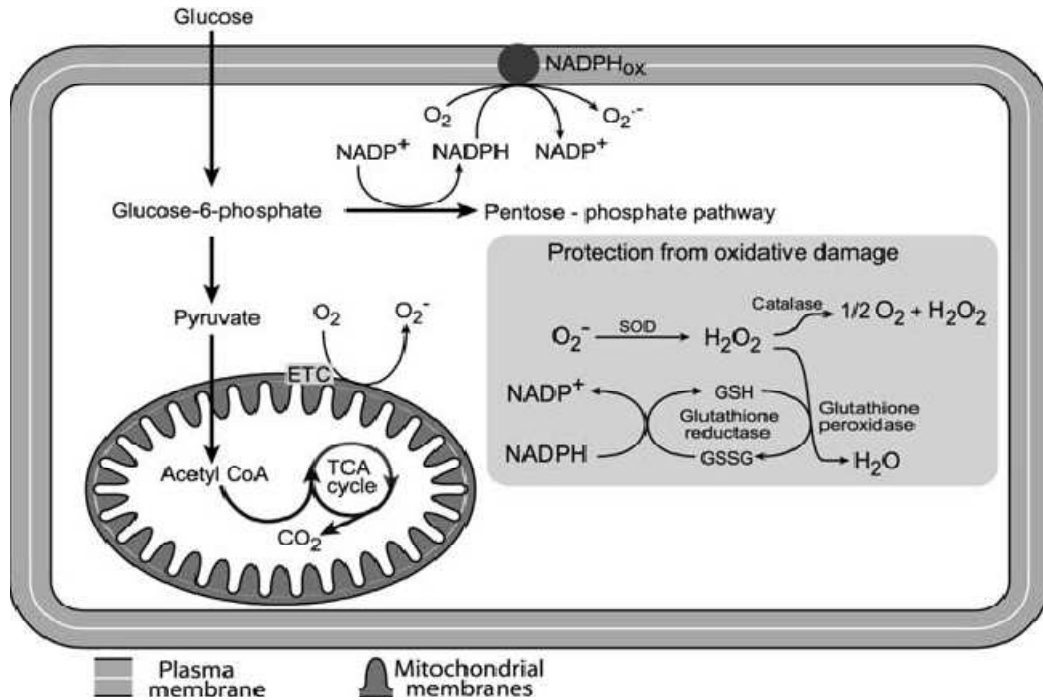


Figura 11. Principales sitios celulares de producción ROS y sistemas antioxidantes naturales

La célula produce ROS a través del metabolismo de la glucosa: en la mitocondria, mediante la cadena de transporte de e<sup>-</sup> (ETC) en los complejo I y III; en la membrana plasmática por el sistema NADPH oxidasa-NADPH<sub>ox</sub>. Los principales sistemas antioxidantes mitocondriales son la superóxido dismutasa (SOD), glutatión reductasa, glutatión peróxidasa y catalasa

TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs; NADPH<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado; NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

### 3. Sistemas antioxidantes

Un antioxidante se define como “cualquier sustancia que presente a bajas concentraciones en comparación con los sustratos sensibles a oxidarse, es capaz de retrasar o prevenir significativamente la oxidación de estos sustratos” (Pérez-Matute y cols., 2009). Los sistemas de defensa antioxidante se pueden dividir en sistemas enzimáticos y no enzimáticos

#### 3.1. Sistemas enzimáticos

Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente: la **superóxido dismutasa (SOD)** dismuta el O<sub>2</sub><sup>-</sup> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la **catalasa (CAT)** transforma al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> y agua, la **glutatión peroxidasa (GPx)** cataliza la reducción de peróxidos a alcoholes, la **glutatión reductasa (GR)** y la **glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PdH)**. Existen otras

enzimas como las quinonas reductasas y hemo-oxigenasa, que pueden prevenir la formación de ROS mediante el reciclado de electrones (Valko y cols., 2007).

La SOD existe en 2 formas en la célula. En las mitocondrias está presente como un enzima que contiene manganeso. En el citoplasma de la célula, el cobre y el zinc son los metales principales que existen en la estructura de la SOD. La presencia de la SOD en ambos lugares, en la mitocondria y el citoplasma, asegura que mucho del superóxido sea convertido en peróxido de hidrógeno.

La GPx reduce los lipoperóxidos y otros hidroperóxidos a sus correspondientes compuestos hidroxilados utilizando el glutatión como donador de hidrógeno



### 3.2. Sistemas no enzimáticos

Entre las defensas antioxidantes no enzimáticas ocupa un lugar predominante el **glutatión (GSH)**. Esta pequeña molécula protege a la célula contra diferentes especies oxidantes y se ha comprobado que participa muy activamente en numerosos desórdenes neurodegenerativos (Klatt y Lamas, 2000). El glutatión es muy abundante en el citosol, núcleo y la mitocondria. Al sintetizarse en el citosol se necesitarán transportadores en la membrana mitocondrial para transportarlo a su interior. Su forma oxidada es GSSG. El GSSG se acumula en las células y la relación GSH/GSSG predice muy bien el grado de estrés oxidativo que sufren los organismos. Concentraciones muy elevadas de GSSG daña a muchas enzimas y es tóxica para las células. El modo de acción según el cual el glutatión ejerce su acción antioxidante es el siguiente (Masella y cols, 2005):

- el glutatión es el cofactor de varias enzimas detoxificantes como la GPx y la glutatión transferasa
- participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática
- es capaz de enmascarar los radicales OH<sup>•</sup> y <sup>1</sup>O<sub>2</sub> directamente, detoxificando el peróxido de hidrógeno por la acción catalítica de la GPx
- también tiene la capacidad de regenerar otros sistemas antioxidantes como las vitaminas C y E

Tanto el GSH como otras moléculas que contienen tioles en su estructura, poseen un alto poder reductor y propiedades antioxidantes, ya que pueden cederle un electrón a los ROS disminuyendo de esta forma su reactividad. Se dice que este tipo de compuestos de bajo peso molecular actúan como “atrapadores” de radicales libres. Entre ellos podemos citar a la tiorredoxina (Trx), al ubiquinol, a la vitamina C, a las vitaminas liposolubles A y E y a los flavonoides.



## **4. Acción de ROS**

En 1954 una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los ROS eran agentes tóxicos e inductores de enfermedades (**Gerschman, 1954**). Los ROS, por su alta inestabilidad atómica colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola y haciéndola perder de esta manera su función específica en la célula.

### ***Lípidos***

Si se trata de los lípidos, se dañan las estructuras ricas en ellos como las membranas celulares y las lipoproteínas (**Stark, 2005**). En las membranas celulares, se altera su permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular y en las lipoproteínas, la oxidación de las LDL desemboca en la formación de la placa ateromatosa. El producto final de la peroxidación de los lípidos es el malondialdehído (MDA), mutagénico para las bacterias y las células de mamíferos y carcinogénico en ratas.

### ***Proteínas***

Las cadenas laterales de los aminoácidos, en particular los residuos de cisteína y metionina, son oxidados por los ROS/RNS. Así se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones (**Ponczek e Wachowicz, 2005**).

### ***ADN***

Otra molécula que es dañada por los ROS es el ADN (**Skinner y Turker, 2005**). El radical OH reacciona y daña las bases púricas y las pirimidínicas del ADN, así como el esqueleto formado por la desoxirribosa. Una modificación del material genético prolongada en el tiempo constituye el primer paso en la evolución de la mutagénesis, carcinogénesis y envejecimiento.

### ***Productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs)***

Los AGEs derivan de una reacción no enzimática entre carbohidratos y proteínas, llamada reacción de Maillard. Los productos intermediarios de esta reacción (Amadori, Bases de Schiff y productos de Maillard) son muy inestables y cumplen un papel importante en la fisiopatología de diversas enfermedades. Se acumulan en el cuerpo con la edad y se encuentran en concentraciones elevadas en los pacientes con diabetes. En esta población su acumulación conduce a la disfunción endotelial. Estos productos también se encuentran en altas concentraciones en pacientes con insuficiencia renal y en individuos sometidos a altos niveles de agresión oxidativa. Los AGEs que han sido mejor caracterizados químicamente en el hombre son la pentosidina y la carboximetil-lisina (**Dalle-Donne y cols., 2005**).

## **5. Estrés oxidativo y diabetes**

La diabetes, especialmente, la diabetes tipo 2 es una patología donde el estrés oxidativo juega un papel muy importante. De hecho, la diabetes se caracteriza por un aumento crónico y creciente de los estímulos que favorecen el estrés oxidativo y por una disminución progresiva de la eficacia de los sistemas antioxidantes. Se ha propuesto al estrés oxidativo como una hipótesis unificadora que enlaza distintos desórdenes moleculares en la diabetes tipo 2 (Evans y cols., 2002). La importancia teórica del estrés oxidativo en la diabetes destaca por su impacto sobre la disfunción metabólica y el sistema vascular. Por tanto, las células pancreáticas que producen insulina (estas células presentan el más bajo potencial secuestrador de ROS (García y cols., 2005)) así como sus células dianas (adiposas o musculares) pueden verse afectadas, como también los elementos de la sangre y distintos tipos celulares en los vasos sanguíneos implicados en las complicaciones de la diabetes. Por ejemplo, el estrés oxidativo puede disminuir la internalización de la insulina en las células endoteliales (Bertelsen y cols., 2001) e interferir con la transferencia de la hormona desde el plasma hasta el tejido. En las células dianas, el estrés oxidativo puede reducir la translocación del Glut4, limitando la capacidad de transporte de la glucosa en las células musculares (Rudich y cols., 1998).

### ***Hiper glucemia y estrés oxidativo***

- Los excesivos niveles de glucosa que llegan a la célula diana aumentan la glucólisis y por tanto, el consiguiente flujo de piruvato hacia la mitocondria aumenta la síntesis de ATP y el potencial de membrana mitocondrial  $\Delta\Psi_m$ . Este aumento de  $\Delta\Psi_m$  lleva a un incremento en la producción de radicales libres (Leverve, 2003), en especial del radical superóxido, que normalmente es neutralizado por la SOD mitocondrial. Cuando esta neutralización es insuficiente, el exceso de superóxido activa la mayoría de las vías mediadas por los radicales libres presentes en las complicaciones de la DM 2, incluidas las vasculares (Da Ros y cols., 2004a).

- La hiperglucemia desacopla la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) mitocondrial, desviando la generación de NO a la producción de radical superóxido. La combinación de estrés oxidativo y nitrosativo da como resultado la formación de peroxinitritos que inhiben irreversiblemente la respiración mitocondrial a través del núcleo hierro-sulfuro (Fe-S) de los complejos I y II de la cadena respiratoria (Brodsky y cols., 2002). Todo ello podría explicar la deficiente regulación del consumo de oxígeno observada en la diabetes (Wiernsperger, 2003).

- La hiperglucemia puede estimular la producción de radicales libres mediante la autooxidación de la glucosa en presencia de metales de transición.
- En condiciones de hiperglucemia se activa la ruta de los polioles, responsable de la detoxificación de aldehídos a alcoholes, que consume grandes cantidades de NADPH. El NADPH es el principal cofactor en la regeneración del glutatión y es una defensa antioxidante a nivel celular (Shah y cols., 2007).

### ***Disfunción mitocondrial en la diabetes tipo 2***

La producción exacerbada de ROS por parte de las mitocondrias en la DM 2 hace que las mitocondrias pierdan su capacidad de síntesis del ATP y se alteren las bombas de sodio-potasio ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ) de la membrana plasmática. El resultado es una hinchazón celular y la liberación del citocromo c a través de los poros mitocondriales hacia el citosol donde activa la ruta de las caspasas e induce la apoptosis celular (Cusimano y cols., 2009).

Esta disfunción de las mitocondrias típica de la diabetes tipo 2 está relacionada con las complicaciones de la enfermedad, como la enfermedad renal (Forbes y cols., 2008) y la disminución en la oxidación fosforilativa que se observa en el músculo esquelético (Civitarese y Ravussin, 2008).

### ***Otras fuentes de producción de radicales libres en la diabetes tipo 2***

- La insulina a concentraciones elevadas típicas de la DM 2 produce  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante su unión con el receptor y la estimulación del sistema nervioso simpático, para inactivar también a la catalasa (Mahadev y cols., 2001).
- La angiotensina II, la insulina y los lípidos estimulan también, al igual que la glucosa, la NAD(P)H oxidasa (Griendling e Ushio-Fukai, 2000).
- Niveles de colesterol alto, mediante la activación de la xantina oxidasa, estimulan la producción endotelial del superóxido (Ohara y cols., 1993).
- En la obesidad, la acumulación citosólica de triglicéridos y el estrés oxidativo concomitante han sido propuestos como el vínculo entre la aterosclerosis, la disfunción endotelial y el fallo pancreático (Bakker y cols., 2000).
- Hormonas producidos por los adipocitos, como la leptina, pueden también aumentar los ROS (Yamagishi y cols., 2001).

## DIABETES MELLITUS TIPO 2

### 1. Introducción

En el año 1997, la Asociación Americana de Diabetes (ADA) propuso una nueva clasificación para la diabetes junto con nuevos criterios para la detección y el diagnóstico de la enfermedad (ADA, 1997). Dicha propuesta coincidió con la realizada en un informe provisional de un grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud publicado en 1998 (Alberti y cols, 1998). La clasificación actual, según lo propuesto por la ADA y la OMS, establece varias categorías:

a) *Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1)*: engloba a la anteriormente denominada diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID). En este tipo de diabetes la principal alteración que aparece es el fallo funcional de las células- $\beta$  pancreáticas, lo que conduce a la carencia progresiva de insulina. La mayoría de los casos diagnosticados de DM 1 se deben a procesos autoinmunes que destruyen las células- $\beta$  del páncreas y en menor medida, a procesos idiopáticos.

b) *Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2)*: se corresponde con la conocida antes de la nueva clasificación como diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID). La clasificación actual abandonó esta denominación porque la mayoría de los pacientes con DM 2 tratados con insulina no son dependientes de ella, aunque la necesiten para obtener un buen control metabólico. Se trata de una enfermedad multifactorial definida por una resistencia a la insulina que, generalmente, suele asociarse a un déficit relativo de ésta. Aunque no contribuyen ambos factores por igual a la aparición de la DM 2, en cada caso individual predomina un factor sobre el otro.

En clínica, la diabetes tipo 2 se caracteriza por una hiperglucemia crónica definida por una tasa de glucosa en sangre superior a  $1,26 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  en ayunos ( $7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) o a  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $11.1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) dos horas después de una carga oral de glucosa.

Es la forma más común de diabetes mellitus, representando el 90-95 % de todos los casos. Aunque puede aparecer en cualquier etapa de la vida, generalmente comienza después de los 40 años. Existen evidencias considerables a favor de una fuerte predisposición genética, aunque este factor genético es complejo. También se sabe que están implicados factores ambientales los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad en sujetos susceptibles de padecerla. Así, la obesidad es un factor frecuentemente asociado a la DM 2 presentándose hasta en el 80 % de los pacientes, junto con un aumento en el porcentaje de grasa en la región abdominal. Por

este motivo recientemente se ha acuñado el término *diabesidad* para referirse a la DM 2. El riesgo de desarrollar este tipo de diabetes aumenta con la edad, el peso y la falta de actividad física. Son más propensos a padecerla mujeres con antecedentes de diabetes gestacional y sujetos con hipertensión o dislipidemia.

c) *Otros tipos de diabetes:* incluyen a las anteriormente denominadas diabetes secundarias y a las causadas por defectos genéticos. Este grupo comprende defectos genéticos de la funcionalidad de las células- $\beta$ , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, diabetes inducida por fármacos o por agentes infecciosos, formas infrecuentes de diabetes mediadas por procesos inmunes, otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados con diabetes y la diabetes gestacional.

## **2. Diabetes Mellitus o la nueva epidemia del siglo XXI**

En el año 2000 aproximadamente 171 millones de personas en todo el mundo padecían diabetes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que este número se doblará en los próximos 30 años, alcanzando un total de 366 millones de enfermos. Esta predicción se ha hecho en base al supuesto de que en esa fecha la población mundial habrá aumentado, estará más envejecida y será más sedentaria y obesa (Wild y cols., 2004).

Varias estrategias se han desarrollado para prevenir la DM 1 pero ninguna ha resultado efectiva, por ello, la prevención de la diabetes tipo 1 continúa siendo un objetivo primordial para las autoridades sanitarias. Sin embargo, simples modificaciones en el estilo de vida sí han resultado efectivas en la prevención o el retraso del comienzo de la diabetes tipo 2, como son por ejemplo, un aumento de la actividad física, una dieta sana y equilibrada, pérdida peso y abandono del hábito de fumar.

La diabetes es una de las enfermedades con mayor impacto socio-sanitario, no sólo por su elevada frecuencia, sino sobre todo por las consecuencias de las complicaciones crónicas que conlleva. Tanto la diabetes como sus complicaciones tardías tienen importantes consecuencias económicas individuales, familiares, sobre los sistemas sanitarios y sobre el país. Por ejemplo, el coste nacional que la diabetes supuso para los Estados Unidos en 2007 sobrepasó los 174 billones de dólares, de ellos 116 billones de dólares se emplearon en sufragar los gastos directos de la diabetes y el resto se correspondió con la pérdida de la productividad del país (ADA, 2008). Un riesgo importante añadido a la diabetes tipo 2 es que se diagnostica tardíamente con respecto a su comienzo.

Prevalencia de la diabetes

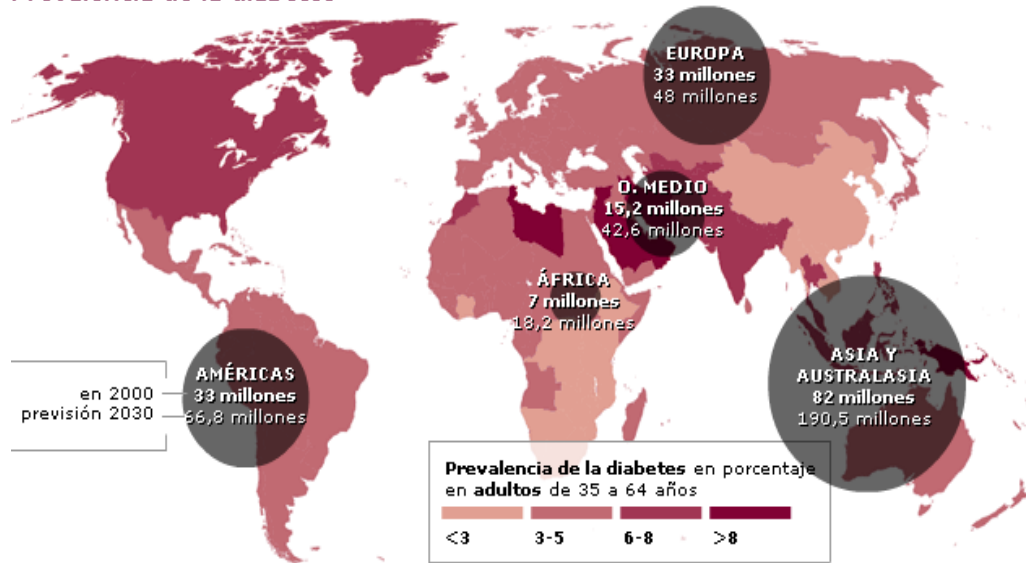


Figura 12. Prevalencia mundial de la diabetes (las cifras en cursiva indican el porcentaje de aumentos de personas con la afección)

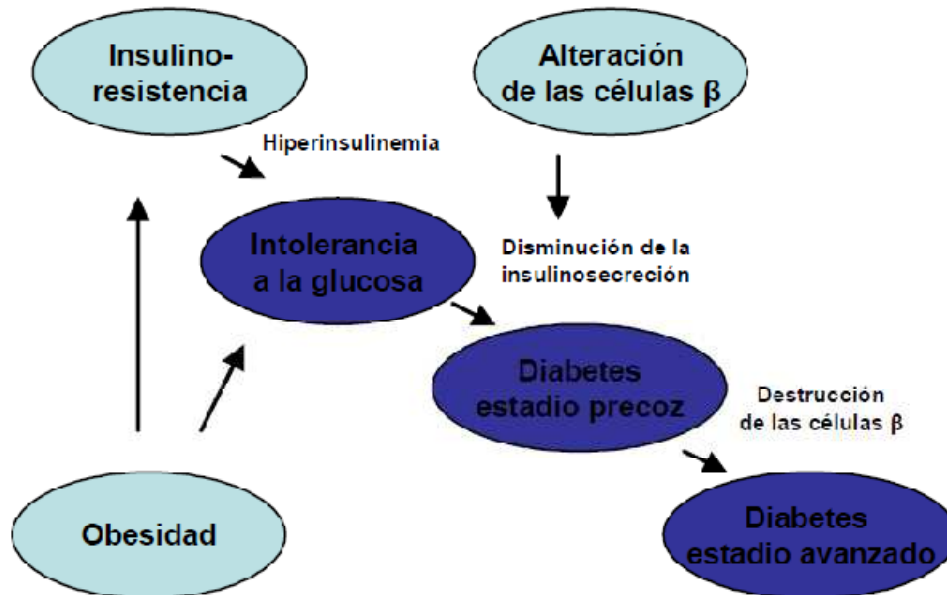
### 3. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2

A pesar de períodos sucesivos de alimentación y de ayuno, la glucemia de un individuo sano está constantemente regulada y se mantiene en una escala estrecha de valores entre 80-100 mg/dl.

Los individuos con diabetes tipo 2 manifiestan múltiples trastornos en la homeostasia de la glucosa, con inclusión de: 1) alteración en la secreción de insulina (se produce una pérdida de la primera fase de secreción de insulina); 2) resistencia a la insulina en músculos, hígado y adipocitos; 3) anormalidades en la captación esplácnica de glucosa.

Está ampliamente aceptado que en la DM 2 se dan alteraciones tanto en la secreción de insulina como en su acción, si bien existe una gran controversia sobre la primacía de uno de estos factores en las alteraciones metabólicas asociadas a la DM 2 (Evans y cols., 1999; Das y Elbein, 2006). La secuencia patológica de la DM 2 es compleja y comprende varios elementos diferentes que interactúan entre sí para degenerar en la enfermedad. En la mayoría de los casos lo primero que aparece en la evolución de la DM 2 (en el inicial estado de prediabetes) es resistencia a la insulina. De esta forma, para compensar el déficit en su acción y mantener la tolerancia normal a la glucosa se produce un gran aumento en su secreción que conduce a un estado de **hiperinsulinemia**. Sin embargo, con el transcurso de la enfermedad la función de las

células- $\beta$  se desgasta y la intolerancia a la glucosa progresa a diabetes, inicialmente caracterizada por hiperglucemia post-pandrial, derivando posteriormente a hiperglucemia en ayunas (Lebovitz HE., 2001a).



### 3.1. Secreción alterada de insulina en la diabetes mellitus tipo 2

#### 3.1.1. Funcionamiento normal de las células- $\beta$ en individuos sanos

El mecanismo normal para la estimulación por parte de la glucosa de la secreción de insulina en las células beta del páncreas comprende los siguientes pasos. La membrana plasmática de la célula beta contiene un canal de potasio ( $K^+$ ), cuya función se regula por la relación citoplasmática ATP:ADP y un canal de calcio ( $Ca^+$ ) dependiente de voltaje. Cuando la glucosa en plasma es baja, el canal de  $K^+$  se abre y sale el potasio de las células- $\beta$ , la membrana plasmática se halla apropiadamente polarizada y el canal de  $Ca^+$  se cierra. A medida que aumenta la glucosa en plasma, se incrementa la relación ATP:ADP, lo cual causa el cierre de los canales de  $K^+$  dependientes de ATP. El cierre de estos canales provoca la despolarización de la membrana plasmática adyacente, lo que da por resultado la apertura de los canales de  $Ca^+$  dependientes de voltaje de esa porción de la membrana despolarizada. A través de ellos entra el calcio desde el compartimento extracelular hasta el interior de las células- $\beta$  y el aumento de la concentración citosólica del ión calcio aumenta linealmente la

liberación de la insulina desde los gránulos de las células beta hacia el compartimento plasmático (Fuhlendorff y cols., 1998; Lebovitz y Melander, 2004).

### 3.1.2. Funcionamiento alterado de las células- $\beta$ en diabéticos tipo 2

La resistencia a insulina es un rasgo patogénico común de la DM 2. Sin embargo, la hiperglucemia no se desarrollaría si no existiera un defecto concomitante en la secreción de insulina. El fallo en la secreción de insulina resulta, principalmente, en anomalías en la función y la supervivencia de las células- $\beta$  pancreáticas (Rhodes, 2005). Estos defectos funcionales aparecen temprano en la historia natural de la diabetes y se caracterizan por pérdida en la liberación de insulina en la primera fase y una secreción anormal de insulina basal. La alteración de la actividad endocrina del páncreas no se limita exclusivamente a una disfunción de las células- $\beta$ , sino también a una alteración de las células- $\alpha$  pancreáticas. Las células- $\alpha$  alteradas no son inhibidas por el estímulo de la glucosa y siguen produciendo glucagón. En la diabetes tipo 2, por tanto, puede alcanzarse una pérdida de la funcionalidad de las células  $\alpha$  y  $\beta$  de más del 50% (Porte y Khan., 1995).

Se han implicado a diversos factores genéticos y a factores adquiridos en la alteración progresiva de la secreción de insulina:

- La glucosa, el principal regulador de la producción y secreción de insulina, ejerce efectos negativos cuando se presenta en cantidades excesivas, como ocurre en la hiperglucemia en ayunas (>140 mg/dl). Una hiperglucemia prolongada en el tiempo puede derivar en el fenómeno conocido como **glucotoxicidad**. La hiperglucemia crónica inhibe la transcripción del gen de la insulina mediante cambios en la actividad de factores de transcripción específicos de células- $\beta$ . Asimismo, la hiperglucemia afecta nocivamente a la masa de células- $\beta$ , al inducir apoptosis sin que se produzca un aumento compensatorio en su proliferación (Kaiser y cols., 2003; Donath y Halban, 2004).
- El aumento plasmático de ácidos grasos libres, conocido como **lipotoxicidad**, también está implicado en la alteración de la función de las células- $\beta$ . La exposición crónica de las células- $\beta$  a valores altos de Acil- CoA inhibe la secreción de insulina y estimula la síntesis de ceramida. La ceramida estimula la sintasa del óxido nítrico y el aumento del óxido nítrico activa la expresión de citocinas inflamatorias (interleucina-1 y factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), compuestos que alteran la función y promueven la apoptosis de las células- $\beta$  (Shimabukuro y cols., 1998; McGarry JD, 2002; Bays y cols., 2004).
- La **amilina (polipéptido amiloide de los islotes)** también interviene en el deterioro progresivo de las células- $\beta$  en la diabetes tipo 2, al ser el precursor de los depósitos amiloides que se observan a menudo en la diabetes. Es posible que valores plasmáticos



altos de ácidos grasos libres y la hipersecreción de amilina interactúan de manera sinérgica para alterar la secreción de insulina y causar la lesión de las células- $\beta$  (Kahn y cols., 1999).

- El **número de células- $\beta$**  dentro del páncreas es un factor determinante de la cantidad de insulina que se secreta. Normalmente se produce una reducción modesta (20 a 40 %) en la masa de células- $\beta$  en diabéticos tipo 2 de larga duración (Butler y cols., 2003). Sin embargo, no se han identificado los factores que causan esta disminución. Como posible causa se ha propuesto una disminución en la formación de nuevos islotes a partir de conductos exocrinos del páncreas (Finegood y cols., 2001; Janson y cols., 2002).

- Un **crecimiento fetal alterado y bajo peso al nacer** se vinculan con una alteración en la secreción de insulina y/o con una reducción en la masa de células- $\beta$  (Eriksson UJ., 1996).

### **3.2. Resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2**

El mal funcionamiento de alguno de los mecanismos fundamentales en el mantenimiento de la homeostasia de la glucosa, expuestos anteriormente, va a desencadenar la resistencia a la insulina.

#### **3.2.1. Transducción de la señal de insulina en condiciones normales**

La cascada de transducción de la señal de la insulina se inicia con el enlace de la hormona a receptores específicos que están presentes en la superficie celular de todos los tejidos donde actúa la insulina. El receptor de la insulina (IR) es una glucoproteína que consta de dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$  unidas por puentes disulfuro (Ward y cols., 2007). Las subunidades  $\alpha$  extracelulares contienen el dominio de unión con la insulina y las subunidades catalíticas  $\beta$  expresan actividad de quinasa estimulada por la insulina dirigida hacia sus propios residuos de tirosina. La fosforilación de la subunidad  $\beta$  constituye el primer paso en la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa. Después de su activación, la tirosina quinasa del receptor de insulina fosforila proteínas intracelulares específicas, de las cuales las más importantes son las denominadas IRS (sustrato del receptor de la insulina). Estas proteínas sirven como las principales moléculas de acoplamiento en la amplificación de la señal de insulina. Se han identificado varios tipos de IRS, siendo IRS-1 e IRS-2 las que mayoritariamente regulan la señal de la insulina:

- en el músculo, IRS-1 fosforilado y activado por el receptor de la insulina media la unión y activación de la proteína 3-quinasa de fosfatidilinositol (PI3K) implicada en la translocación hacia la membrana plasmática de los receptores de glucosa (GLUT-4), para acelerar la toma de glucosa y

posteriormente la síntesis de glucógeno, de lípidos y de proteínas (Whitehead y cols., 2000; Saltiel y cols., 2001)

- por otra parte, IRS-1 y IRS-2 en el hígado sirven como las principales proteínas implicadas en mediar el efecto de la insulina sobre la producción hepática de glucosa, la gluconeogénesis y la formación de glucógeno (Dong y cols., 2005).

### 3.2.2. Resistencia periférica a la insulina en la DM2

#### *Resistencia hepática a la insulina*

La hiperglucemia en ayunas, típica de la DM 2, se debe en gran parte a una tasa excesiva de producción de glucosa mediante gluconeogénesis en el hígado. En la diabetes tipo 2 existe resistencia hepática tanto a la acción de la insulina como al efecto inhibitorio de la hiperglucemia. Este defecto empeora progresivamente conforme el estado diabético se descompensa en el transcurso del tiempo (Fritsche y cols., 2008). La tasa acelerada de producción de glucosa hepática es el resultado de un aumento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la glucosa-6-fosfatasa (Gastaldelli y cols., 2000; Clore y cols., 2000).

#### *Resistencia muscular a la insulina*

El tejido muscular constituye el principal lugar corporal de utilización de la glucosa estimulada por insulina. Casi el 80 % de la captación corporal de glucosa total ocurre en el músculo esquelético. Por lo tanto, alteraciones en este punto agravan profundamente la homeostasis de la glucosa (Bjornholm y Zierath, 2005)

#### *Resistencia a la insulina y tejido adiposo*

Los adipocitos de diabéticos tipo 2 son altamente resistentes al efecto inhibitorio de la insulina sobre la lipólisis. El aumento plasmático de ácidos grasos libres liberados desde el tejido adiposo puede causar o agravar la resistencia a la insulina en el músculo e hígado y alterar la secreción de insulina por el páncreas (Carpentier y cols., 2000). El resultado de la resistencia a la insulina en tejido adiposo consiste en una movilización de los triglicéridos y sus metabolitos hacia el hígado y músculo, donde van a formar grandes depósitos. Este aumento en el contenido graso de hígado y músculo se correlaciona de manera muy estrecha con la resistencia a insulina en estos tejidos (Goodpaster y cols., 2000; Ryysy y cols., 2000).

### ***Mecanismos celulares y moleculares de la resistencia a la insulina***

La resistencia a la insulina puede relacionarse con defectos en el receptor de la insulina en los tejidos sensibles a ella, en su unión con la insulina y en su posterior activación y transducción de la señal. La hiperglucemia o cualquier otro trastorno asociado a la diabetes tipo 2 altera la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor de insulina (Pratipanawat y cols., 2001). En la DM 2 disminuye la asociación estimulada por insulina de IRS-1 con la subunidad reguladora de PI3K. Como consecuencia, en el músculo se reduce la actividad de la sintasa del glucógeno y la utilización de glucosa (Cusi y cols., 2000). En los adipocitos y tejido muscular de diabéticos tipo 2 el transporte de glucosa hacia su interior se altera gravemente por el deterioro en el transportador de glucosa en estos tejidos, denominado GLUT-4, que es sensible a insulina (Garvey cols., 1998; Cline y cols., 1999; Williams y cols., 2001).

En la diabetes tipo 2, la fosforilación alterada de la glucosa para convertirse en glucosa-6-fosfato es el paso limitante de la tasa de acción de la insulina. En tejido muscular, la capacidad de la insulina para aumentar la actividad de la enzima hexoquinasa-II se reduce por lo que la glucosa que ha entrado al interior celular no puede ser convertida en glucógeno o entrar a la vía glucolítica (Vogt y cols., 2000).

## **4. Tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2**

Los objetivos generales del tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 son:

- eliminar los síntomas mediante la normalización de la glucemia
- prevenir las complicaciones metabólicas agudas
- prevenir, retrasar o minimizar las complicaciones tardías típicas de la enfermedad (retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedad vascular, pie diabético)
- reducir la morbilidad y mortalidad derivadas de la enfermedad vascular

Los cuatro pilares básicos en el tratamiento de la diabetes tipo 2 son la dieta, el ejercicio físico, el tratamiento farmacológico y la educación diabetológica del enfermo.

Los **antidiabéticos orales** utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 son: sulfonilureas, metaglinidas, miméticos de las incretinas, biguanidas, tiazolidindionas e inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas. Por desgracia, normalmente con el transcurso de la enfermedad la terapia oral falla y casi siempre se suele recurrir al tratamiento con insulina para conseguir el adecuado control glucémico.

## **4.1. Secretagogos de insulina**

El deterioro progresivo en la función de células beta se debe a la menor capacidad de la glucosa para cerrar el canal de  $K^+$  dependiente de ATP en la membrana plasmática de las células beta. En los primeros cuatro o cinco años después del inicio de la diabetes tipo 2 clínica, el defecto funcional en la secreción de insulina puede ser atenuado por fármacos que actúan de manera directa sobre este canal de  $K^+$ . Estos fármacos son los secretagogos de insulina, de los cuales existen varias clases diferentes, que se diferencian entre sí por las características del enlace con dicho conducto.

### 4.1.1. Sulfonilureas

Se comercializan desde los años cincuenta y existen muchos tipos disponibles en el mercado: **Glipizida** (*Glucotrol®*) y **glimpirida** (*Amaryl®*) son las sulfonilureas que se prescriben con mayor frecuencia en España.

Las sulfonilureas poseen una acción muy prolongada en el tiempo. Sus principales efectos beneficiosos son una disminución de hiperglucemia en ayunas y de la existente entre un alimento y otro. A causa de su efecto prolongado pueden provocar hipoglucemias graves, aunque ésta es una complicación poco frecuente y suele aparecer en personas de edad avanzada y pacientes con enfermedad cardiovascular o renal. Así, los efectos beneficiosos de las sulfonilureas sobre el control glucémico suceden durante los primeros años después del diagnóstico y disminuyen conforme aumenta la duración de la diabetes. En el estudio UKPDS, el porcentaje de diabéticos tipo 2 que lograron un adecuado control de la glucemia con monoterapia de sulfonilurea disminuyó desde un 50% después de tres años del diagnóstico de la enfermedad, hasta un 34% después de seis años y a un 24% después de los nueve años haberse producido el diagnóstico (**Shorr y cols., 1996; Van Staat y cols., 1997; Turner y cols., 1999**).

### 4.1.2. Glinidas

Las dos metaglinidas disponibles actualmente en España son **repaglinida** (*Prandin®*) y **nateglinida** (*Starlix®*). Las glinidas empiezan a actuar más rápidamente y poseen una duración de acción más corta en el tiempo que la proporcionada por las sulfonilureas (*Jovanovic y cols., 2000; Hanefeld y cols., 2000*). Se toman 30 minutos antes de las comidas y permiten ajustar su dosis a los niveles de glucosa plasmáticos del paciente en ese momento y al contenido estimado en carbohidratos que se va a ingerir (**Triplitt y cols., 2005**).

#### 4.2. Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasas

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas: **acarbosea** (*Glucobay*) y **miglitol** (*Diastabol*, *Plumarol*), actúan inhibiendo de forma competitiva y reversible a las enzimas  $\alpha$ -glucosidasas intestinales localizadas en la superficie acipillada del duodeno y parte alta del yeyuno. Retrasan la absorción de los carbohidratos en el intestino delgado proporcionándole al páncreas un tiempo adicional para que secrete la cantidad de insulina suficiente para normalizar la glucemia post-prandial (Lebovitz HE, 1998; Longo, 2010). Por su mecanismo de acción, reducen la hiperinsulinemia sin producir un aumento de peso ni provocar episodios de hipoglucemia. Pero su uso se acompaña de varios efectos secundarios intestinales como dolor abdominal, diarrea y flatulencia.

#### 4.3. Miméticos de incretinas

La insulina se libera más rápidamente después de una carga oral de glucosa que intravenosa, a este fenómeno se le conoce como “**el efecto incretina**”. Las hormonas incretinas, el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), se liberan desde el tracto intestinal tras la llegada del alimento. La hormona incretina predominante es el GLP-1, el cual, además de estimular la secreción de insulina, suprime la liberación de glucagón, enlentece el vaciamiento gástrico, mejora la sensibilidad a la insulina y reduce el consumo de alimentos. GLP-1 una vez liberado, rápidamente es inactivado por la enzima dipeptil peptidasa (DPP-IV) (Srinivasan y cols., 2008).

El desarrollo muy reciente de miméticos de las incretinas e inhibidores orales de la dipeptil peptidasa-1 ha abierto la puerta a una nueva generación de agentes antihiperglucemiantes (Arulmozhi y Porth., 2006; McKennon y Campbell, 2007). Se han hecho grandes avances en el desarrollo de los *miméticos de incretinas*, como por ejemplo, el exedin-4 (exenatida) y liraglutida. En nuestro país solamente se comercializa **exenatida** (*Byetta*®), mientras que la **liraglutida** (*Victoza*®) se encuentra todavía en fase de investigación. Se ha progresado mucho también en el desarrollo de los *inhibidores de la dipetil peptidasa IV* y actualmente podemos elegir en España entre una amplia batería de fármacos miméticos de las incretinas, tanto en monoterapia como en combinación con metformina: **sitagliptina** (*Januvia*®, *Tesavel*® y *Xelevia*®) y **vildagliptina** (*Icandra*®, *Jalra*® y *Xiliarx*®), respectivamente.

#### 4.4. Insulina

Los diabéticos tipo 2 no dependen del aporte exógeno de insulina para su supervivencia, sin embargo, a medida que se prolonga la enfermedad se produce una disminución progresiva en la producción de insulina que hace que estos pacientes

necesiten la administración de suplementos de insulina para conseguir un adecuado control de la glucemia, especialmente durante situaciones de estrés o enfermedad. Datos extraídos del estudio UKPDS revelan que hasta el 53% de los diabéticos tipo 2 recurren al tratamiento con insulina 6 años después del diagnóstico de la enfermedad y el 75% de ellos necesitan terapia combinada tras 9 años de padecer la DM2 (Wright y cols., 2002).

#### **4.5. Sensibilizadores de la acción de insulina**

##### 4.5.1. Biguanidas

Aunque se comercializan en Europa desde los años cincuenta, durante años han sido fármacos muy cuestionados y debatidos debido a la asociación de algunos agentes de este grupo (**fenformina, butformina**) con cuadros de acidosis láctica. Sin embargo, enfermos tratados con **metformina (Dianben®)** (la única biguanida comercializada en la actualidad en Estados Unidos y Europa) rara vez sufren una hipoglucemia grave.

Actúan aumentando de manera directa la acción de la insulina en células sensibles a ella mediante mecanismos aún no identificados. La metformina actúa principalmente aumentando la sensibilidad a la insulina en el hígado y en este punto, disminuye la producción de glucosa hepática, mientras que su efecto es menor sobre el músculo esquelético (Inzucchi y cols., 1998, Argaud, 1993). La metformina es el primer tratamiento de elección en diabéticos tipo 2 con dislipidemia y sobrepeso, debido a que su tratamiento lleva asociado una ligera pérdida de peso de 1 a 2 kilogramos y disminuye los niveles de colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y los triglicéridos (Inzucchi y cols, 2002). Además, la terapia antidiabética con metformina reduce las complicaciones macrovasculares. Al excretarse principalmente a través de los riñones está contraindicada en pacientes con disfunción renal.

El Dr. El-Mir demostró que la metformina produce inhibición de la respiración celular en hepatocitos intactos, mediante un efecto indirecto dirigido al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (El-Mir, 2000). Estudios posteriores relacionaron la inhibición del complejo I de la cadena mitocondrial por la metformina con la mayoría de sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos (Owen, 2000). Además, también existen algunos estudios que demuestran la existencia de un efecto mitocondrial anti-estrés oxidativo de la metformina (Guigas, 2004).

##### 4.5.2. Tiazolidindionas o glitazonas (TZDs)

En 1982 se demostró por primera vez la existencia de una serie de derivados de las tiazolidindionas que actuaban como nuevos agentes antidiabéticos eficaces en la

reducción de la resistencia a la insulina en animales diabéticos (Sohda y cols., 1982a). El prototipo de esta familia fue la **ciglitazona** (inicialmente conocida por ADD-3878 ó U-63,287), que en modelos de animales no insulino-resistentes normalizó la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la hipertrigliceridemia (Sohda y cols., 1982b). A partir de este momento se comenzó a trabajar en la síntesis y el estudio biológico de una serie de análogos estructurales de la ciglitazona como: **pioglitazona** (AD-4833 ó U-72,107), **rosiglitazona** (BRL-49653C), **troglitazona** (CS-045) y **englitazona** (CP-68722). En 1990 se realizó un estudio de la relación entre la estructura y la actividad biológica de una serie de compuestos donde el fragmento de 1-metilciclohexilmetoxi de la ciglitazona se sustituyó por uno de 2-piridiniletotoxi, que logró una actividad hipoglucémica e hipolipidémica 5 a 10 veces más potente que la ciglitazona. De todos los compuestos estudiados se seleccionó la pioglitazona por ofrecer también una buena respuesta en animales insulino-resistentes.

La ciglitazona provocó toxicidad hepática, al igual que la troglitazona (Rezulin®, Parke-Davis, Sankyo). La troglitazona fue el primer fármaco tipo TZDs introducido en el mercado de Estados Unidos en 1997, sin embargo, se retiró de los mercados de Estados Unidos, Europa y Japón en 2000 debido a que generó toxicidad idiosincrásica del hígado que condujo a fallo hepático. Actualmente se comercializan dos glitazonas: **rosiglitazona** (Avandia®, Smithkline Beecham) y **pioglitazona** (Actos®, Takeda; Lilly), sin que se hayan recogido hasta la actualidad datos significativos de hepatotoxicidad.

Las glitazonas son agonistas selectivos sintéticos de la isoforma  $\gamma$  de los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs). A través de esta activación, controlan la expresión de genes implicados en el control de la diabetes, la diferenciación de adipocitos y la remodelación del tejido adiposo. Son una familia de antidiabéticos orales sensibilizadores a la acción de la insulina que mejoran el control glucémico al reducir la producción hepática de glucosa y aumentar la utilización de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo. Disminuyen los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y ácidos grasos libres, tanto en situación de ayunas como postprandial (O'Moore-Sullivan, 2002). Además, ayudan a preservar la función de células  $\beta$  pancreáticas y por ello retrasan la progresión de la enfermedad (Finegood y cols., 2001; Buchanan y cols., 2003). Las TZDs ejercen sus acciones crónicas a largo plazo a través de la activación de PPAR- $\gamma$ , por lo tanto, sus beneficios terapéuticos no se manifiestan hasta 4 semanas después del inicio del tratamiento. Sin embargo, la acción de las TZDs vía PPAR- $\gamma$  no excluye contribuciones por otros mecanismos diferentes, independientes de la activación de estos receptores. Estos últimos mecanismos se han estudiado muy poco y disponemos de escasos estudios sobre los efectos directos de las glitazonas en hígado y músculo. Las TZDs también pueden prevenir las complicaciones tardías de la DM 2, como las complicaciones secundarias cardiovasculares.

Las glitazonas suelen prescribirse a diabéticos tipo 2 mal controlados con otro tipo de tratamiento. Normalmente se administran en terapia combinada con sulfonilureas o biguanidas. En terapia combinada, sus efectos hipoglucemiantes siguen mejorándose entre 6 y 12 semanas después del inicio del tratamiento (Noble y cols., 2005).

### ***PPAR<sub>S</sub> (Receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas)***

Los receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) comprenden una importante subfamilia perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares hormonales (NHR). Estos factores de transcripción activados por ligandos están implicados en mecanismos biológicos tan diversos como la homeostasia de lípidos y glucosa, el control de la proliferación y la diferenciación celular, la sensibilidad a la insulina y la enfermedad vascular (Kaplan y cols., 2001). El nombre PPAR deriva de la clonación inicial de una isoforma que actuaba como blanco de varios compuestos xenobióticos de los cuales se había observado que inducían proliferación de peroxisomas en el hígado. Esta isoforma, inicialmente aislada, fue denominada PPAR- $\alpha$  y gracias a investigaciones posteriores, el grupo se expandió para incluir a PPAR- $\gamma$  y PPAR- $\beta$ . Estas tres isoformas de PPAR se han identificado en vertebrados inferiores y mamíferos. Los PPARs poseen una distribución determinada en los tejidos y cada una de los tres isoformas diferentes desempeña funciones específicas (Rosen y cols., 2001; Wahli y cols., 2002; Cortes y cols., 2005).

- *PPAR- $\alpha$*  se expresa principalmente en tejido adiposo marrón, hígado, músculo esquelético, intestino, riñón y corazón. Es la diana celular para fibratos, como gemfibrozil, bezafibrato y fenofibrato y también para ligandos naturales como ácidos grasos de cadena larga, sobre todo poliinsaturados (ácido linoleico, ácido eicosapentaenoico). Los genes que activa PPAR- $\alpha$  principalmente participan en procesos catabólicos de lípidos por  $\beta$ -oxidación (Desvergne y cols., 1999).

- *PPAR- $\beta$*  es el receptor menos caracterizado de su familia. Se expresa de forma ubicua en distintos tejidos y órganos. Participa en el transporte reverso del colesterol, cicatrización de heridas, proliferación celular y apoptosis (Oliver y cols., 2001).

- *PPAR- $\gamma$*  es la isoforma de PPAR que se ha estudiado más intensamente. Participa en rutas biológicas de interés básico y clínico como: diferenciación de adipocitos, sensibilidad a insulina, DM 2, cáncer, almacenamiento de lípidos y control de la inflamación.



Existen dos isoformas de PPAR- $\gamma$ : PPAR- $\gamma_1$  y PPAR- $\gamma_2$ , formadas por procesamiento alternativo en el extremo 5' del gen. Mientras muchos tejidos (tejido adiposo, colon, bazo, retina y células hematopoyéticas) expresan PPAR- $\gamma_1$ , PPAR- $\gamma_2$  se expresa principalmente en los adipocitos y en menor medida en hígado, tejido muscular, vasos sanguíneos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos T. La prostaglandina J<sub>2</sub> es un ligando natural de este receptor, que se une a él con gran afinidad (Yu y cols., 1995). Las glitazonas son agonistas sintéticos de PPAR- $\gamma$  que inician sus acciones a largo plazo a través de su activación.

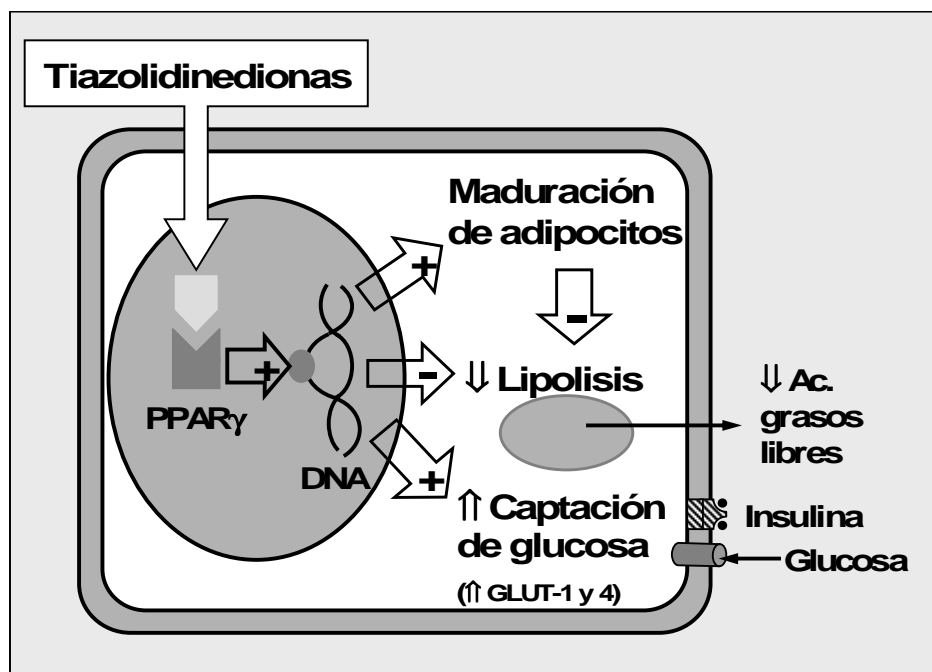


Figura 14. Acciones de las glitazonas a través de la activación de PPAR- $\gamma$

Ac: ácidos; DNA: ADN; GLUT-1: transportador de glucosa dependiente de glucosa en eritrocitos y cerebro; GLUT-4: transportador de glucosa dependiente de insulina en tejido adiposo y músculo

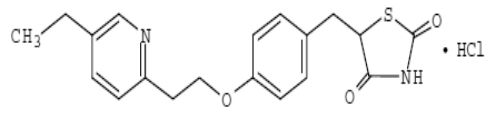
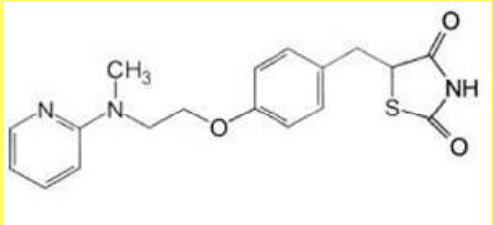
#### 4.6. Terapia combinada en diabetes mellitus tipo 2

Con mucha frecuencia los diabéticos llegan a necesitar más de un fármaco para mantener sus niveles de glucemia dentro de los valores normales. Los laboratorios farmacéuticos han ideado la posibilidad de combinar varios antidiabéticos orales en un mismo comprimido y a este respecto, ya se disponen en los mercados diferentes combinaciones de metformina con glitazonas, metformina con miméticos de incretinas (*Efficib*®, *Eucreas*®, *Icandra*®, *Zomarist*® y *Velmettia*®) y glitazonas con sulfonilureas (*Tandemact*®, *Avaglim*®). Estas formulaciones permiten tratar al mismo tiempo varios aspectos patofisiológicos de la diabetes tipo 2. Por ejemplo, la combinación de glitazonas más sulfonilureas permite atacar a la vez la resistencia periférica a la insulina y el déficit en su secreción (Beaser y cols., 2007).

# PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA

## 1. BIOQUÍMICA

Pioglitazona y rosiglitazona, al estar relacionados química y farmacológicamente con el resto de fármacos de su clase, contienen el anillo típico tiazolidindiona (Perry y Petrie, 1998). Sin embargo, rosiglitazona se diferencia del resto de glitazonas en que posee una cadena lateral aminopiridil (Henry, 1997; Young y cols., 1998).

	PIOGLITAZONA	ROSIGLITAZONA
	[(+)-5-[[4-[2-(5-etil-2-piridinil)etoxi]fenil]metil]-2,-4] tiazolidinadiona monohidrocloruro	[(+)-5-[[4-[2-(5-metil-2-piridinilamino)etoxi]fenil]metil]metil]-2,-4-] (Z)-2-butenedioato (1:1)
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S•HCl	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
<b>Peso molecular</b>	392,90 daltons	357,43 daltons
		

Ambos fármacos se disuelven perfectamente en disolventes orgánicos, como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la N,N-dimetilformamida, son ligeramente solubles en etanol, muy poco solubles en acetona y acetonitrilo, prácticamente insolubles en agua, e insolubles en éter.

## 2. COMERCIALIZACIÓN Y POSOLOGÍA



Figura 15. Comercialización de pioglitazona (Actos®) y rosiglitazona (Avandia®)

Ambas glitazonas están indicadas para el tratamiento de pacientes diabéticos tipo 2, principalmente con sobrepeso:

### En monoterapia:

En aquellos en los que no se alcanza un control adecuado con dieta y ejercicio y que no pueden recibir metformina por contraindicaciones o intolerancia.

### En doble terapia oral en combinación con:

- Metformina, cuando no se consigue un control glucémico adecuado independientemente de la dosis máxima tolerada de metformina en monoterapia.
- Una sulfonilurea, sólo en pacientes que presentan intolerancia a la metformina o en los que la metformina está contraindicada y también en los que no se logra un control glucémico adecuado independientemente de la dosis máxima tolerada de sulfonilurea en monoterapia.
- Pioglitazona también está indicada en combinación con insulina en aquellos pacientes en los que el tratamiento con insulina no permite un control glucémico adecuado y en los que no es apropiado el uso de metformina, debido a contraindicaciones o intolerancia.

### En triple terapia oral en combinación con:

metformina y una sulfonilurea, en aquellos pacientes con un control glucémico inadecuado a pesar de la doble terapia oral.

### ***Pioglitazona***

Actualmente la pioglitazona se comercializa como **Actos®**, una marca registrada por Takeda Chemical Industries, usada bajo licencia por Takeda Pharmaceutical America y Eli Lilly. Actos® fue aprobado en octubre de 2000 por la Comisión Europea para su comercialización válida en toda la Comunidad Europea.

ACTOS® está disponible como comprimidos para administración oral, los cuales contienen 15 mg, 30 mg o 45 mg de pioglitazona hidrocloreto (como base). Se administra una vez al día e independiente de las comidas (*Geerlof y cols., 2000*).

Si se administra en combinación con metformina la dosis es de 15 mg o 30 mg al día y se puede continuar con la dosis habitual de metformina.

En terapia combinada con sulfonilurea también se administra 15 mg o 30 mg al día. Se puede continuar con la dosis habitual de sulfonilurea, reduciéndose la dosis de sulfonilurea si aparece hipoglucemia.

La Comisión Europea permitió el uso de un nuevo fármaco que combina la acción de la pioglitazona hidrocloreto (Actos®) y metformina HCl en julio de 2006 bajo el nombre de **Compact®**. Se administra 2 veces al día un comprimido de 15 mg pioglitazona/850 mg metformina. Ambos fármacos poseen perfiles farmacocinéticos similares, lo cual facilita una co-formulación bioequivalente a su administración por separado. Sus diferentes, pero complementarios mecanismos de acción, ejercen un mayor control sobre la glucemia y reducen el riesgo metabólico y la enfermedad cardiovascular asociada a la DM 2 respecto a su administración en monoterapia (*Seufert, 2006*). También se comercializa la misma formulación bajo el nombre de **Glubrava®** desde diciembre de 2007.

Además, está aprobado el uso en España de una combinación fija en un mismo comprimido de pioglitazona (en forma de hidrocloreto) y de glimepirida a dosis 30 mg/2 mg ó 45 mg/4 mg, respectivamente. Este fármaco se conoce como **Tandemact®** y la Unión Europea aprobó su comercialización en enero de 2007.

### ***Rosiglitazona***

La rosiglitazona, comercializada como **Avandia®** por Glaxo SmithKline Beecham, fue aprobada como tratamiento en la diabetes tipo 2 por la Unión Europea en julio de 2000.

Se comercializa como comprimidos orales de 2mg, 4 mg u 8 mg de maleato de rosiglitazona. El tratamiento con rosiglitazona se suele iniciar con 4 mg al día y se puede incrementar hasta 8 mg al día si se necesita un mejor control

glucémico. Se puede administrar una o dos veces al día independientemente de las comidas.

Se administra a dosis de 4 mg/día en terapia combinada con metformina o sulfonilurea, manteniéndose el otro antidiabético de elección con su dosis habitual.

En octubre de 2003 se aprobó el uso en Europa de rosiglitazona y metformina conjuntas en un solo fármaco. Este nuevo agente antidiabético se comercializa como **Avandamet®** por Glaxo SmithKline Beecham. Está disponible a 4 dosis diferentes: 1 mg/500 mg, 2 mg/500 mg, 2 mg/1000 mg y 4 mg/1000 mg de maleato de rosiglitazona y de hidrocloreuro de metformina, respectivamente. Más recientemente, en junio de 2006, también se aprobó el fármaco **Avaglim®** (Glaxo SmithKline Beecham) que combina 4 mg/4 mg o 8 mg/4 mg de maleato de rosiglitazona y glimepirida, respectivamente.

### **3. FARMACOCINÉTICA** (*Cox y cols., 2000; Eckland, Danhof, 2000; Hanefeld, 2001*)

#### **3.1. Absorción**

##### *Pioglitazona*

La pioglitazona se absorbe bien tras su administración oral y las concentraciones máximas se alcanzan en el hígado, el plasma y el riñón. La biodisponibilidad absoluta media es del 83%, el  $t_{max}$  (tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima) es de 1,5 horas (límites 0,5-3,0) y la constante de absorción se sitúa entre 0,04 y 1,17/h. Con dosis orales únicas de entre 2 y 60 mg, la  $C_{max}$  (concentración máxima plasmática) y el área bajo la curva (AUC) aumentan de manera lineal en relación con la dosis. La concentración máxima en suero oscila entre 101 y 3.500 ng/ml correlativamente a la dosis entre 2 y 60 mg. A dosis de 45 mg de pioglitazona la concentración de compuestos activos totales en suero es de  $1865 \pm 605,3$  ng/ml.

##### *Rosiglitazona*

La absorción de rosiglitazona también es rápida y prácticamente completa, con una biodisponibilidad absoluta próxima al 99% después de administrar una dosis oral de 4 ó de 8 mg. Las concentraciones plasmáticas máximas de rosiglitazona se alcanzan aproximadamente una hora después de la ingesta y son prácticamente proporcionales a la dosis en el intervalo terapéutico. Rosiglitazona administrada a dosis de 8 mg/ml alcanza una concentración máxima en plasma de 603 ng/ml en 0,75 horas. La  $C_{max}$  y el parámetro AUC aumentan de manera lineal las primeras 24 horas después de la administración para luego disminuir exponencialmente los 21 días siguientes.

### **3.2. Distribución**

Tanto la pioglitazona como la rosiglitazona se unen de forma amplia a las proteínas plasmáticas tanto en los animales como en el ser humano (fracción libre < 3%). Además la fijación a proteínas séricas es independiente de la concentración del fármaco para valores comprendidos entre 0,05 y 5 µg/ml. El volumen de distribución de la pioglitazona es de 0,253 l/kg y de la rosiglitazona de 14 litros, debido a la notable fijación a proteínas séricas (>97%).

### **3.3 Metabolismo**

#### ***Pioglitazona***

Pioglitazona sufre un metabolismo hepático significativo por hidroxilación de los grupos metileno alifáticos para formar tres metabolitos (denominados **M-I**, **M-II** y **M-IV**), por oxidación del grupo metilo para formar otro metabolito (**M-V**) y por oxidación de un metabolito (M-IV) que después se transforma en otro metabolito diferente (**M-V**). Aunque el compuesto original tiene una vida media de aproximadamente 9 horas, existen dos metabolitos activos (M-III y M-IV) que contribuyen a ampliar sus efectos hipoglucemiantes al poseer una vida media superior a la del compuesto original.

En el metabolismo de pioglitazona intervienen múltiples isoenzimas del citocromo P450 hepático. Pioglitazona, a diferencia de troglitazona, no inhibe ninguna de las isoenzimas del citocromo P450 que intervienen en el metabolismo de los fármacos (*Yamazaki y cols., 2000*). Esto sugiere que pioglitazona puede tener un potencial de interacciones escaso.

#### ***Rosiglitazona***

Rosiglitazona se metaboliza principalmente en el hígado y el fármaco original se excreta modificado. Todos los metabolitos circulantes son considerablemente menos potentes que el compuesto original. Por tanto, es improbable que contribuyan a la actividad de sensibilización de la insulina de rosiglitazona. En concreto en el hombre, rosiglitazona tiene 16 metabolitos.

Las principales vías de metabolismo son N-desmetilación e hidroxilación seguidas de conjugación con sulfato y ácido glucurónico. Se metaboliza predominantemente por la isoenzima 2C8 del citocromo P450 (CYP), mientras que el CYP 2C9 sólo contribuye

como una vía menor. Al igual que pioglitazona, rosiglitazona tiene un escaso poder de interacción significativo a nivel metabólico con los compuestos metabolizados por las isoenzimas del citocromo P450, al no inhibirlas significativamente.

### **3.4. Eliminación**

#### ***Pioglitazona***

En humanos, tras la administración por vía oral de pioglitazona radiomarcada, la mayor parte de la dosis marcada se recuperó en las heces (55%) y en menor medida en la orina (45%). La semivida media de eliminación plasmática de la pioglitazona inalterada es de cinco a seis horas y para el total de sus metabolitos activos de 16 a 23 horas.

#### ***Rosiglitazona***

El aclaramiento plasmático total de rosiglitazona es aproximadamente 3 l/h y la semivida de eliminación de rosiglitazona es aproximadamente de 3 a 4 horas. La vía principal de eliminación es la urinaria (cerca de dos tercios de la dosis se eliminan por esta vía), mientras que la eliminación fecal constituye un 25%. No se excreta el fármaco inalterado en orina o heces y la rosiglitazona no padece recirculación biliar. El rasgo más característico de la excreción de rosiglitazona en humanos es el largo período de tiempo en que ocurre respecto a la rata y el perro. En estas especies pre-clínicas tras 48 horas, del marcaje radiactivo se recupera el 90 % (**Bolton y cols., 1996**). Sin embargo, en el hombre solamente el 35 % del fármaco administrado se recupera en 48 horas y es necesario esperar hasta una semana para recuperar el 90 %. Este prolongado tiempo de eliminación se debe a la elevada tasa de unión a proteínas plasmáticas y la tasa de eliminación muy lenta de sus metabolitos.

### **3.5. Farmacocinética en grupos de riesgo**

La farmacocinética de pioglitazona y rosiglitazona no difiere significativamente en los voluntarios sanos y en los diabéticos tipo 2. La edad y el sexo no ejercen un efecto significativo en la farmacocinética de ambas glitazonas y no existen diferencias entre razas.

No se ha observado ninguna diferencia clínicamente significativa en la farmacocinética de rosiglitazona en los enfermos con insuficiencia renal o enfermedad renal terminal sometidos a diálisis crónica. Las concentraciones plasmáticas de pioglitazona y sus metabolitos son menores en pacientes con insuficiencia renal que las observadas en individuos con la función renal normal. Sin embargo, la concentración de pioglitazona libre (sin unión a proteínas plasmáticas) se mantiene intacta.

En insuficiencia hepática, aumenta el volumen de distribución de la pioglitazona y la  $C_{max}$  de rosiglitazona.

#### **4. SEGURIDAD Y TOLERANCIA**

No es necesario un ajuste de dosis de ambas glitazonas en pacientes con insuficiencia renal, los tratados con hemodiálisis y las personas de edad avanzada. No deben utilizarse en pacientes con insuficiencia hepática, embarazadas, ni en menores de 18 años.

Los principales efectos secundarios provocados por el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona son una retención de fluido (normalmente se manifiesta como edema periférico) y un aumento en la grasa subcutánea. Estos dos efectos secundarios contribuyen a la ganancia de peso típica que ocurre con el tratamiento de glitazonas. La ganancia de peso es un efecto de clase de las glitazonas que aparece tanto en monoterapia, como en terapia combinada. Suele ser una ganancia de 3-4 kg que ocurre durante los 6 primeros meses de tratamiento y es más pronunciada cuando se combinan las glitazonas con sulfonilureas o insulina (**Rosenblatt y cols., 2001; Raskin y cols., 2001**).

Aunque el mecanismo por el que se produce el edema todavía no está claramente dilucidado, resultados obtenidos in vitro y con animales sugieren que la activación de los receptores PPAR- $\gamma$  estimulan la reabsorción de sodio en el túbulo distal de la nefrona (**Guan y cols., 2005**). El riesgo de aparición de edema también aumenta con la adición de insulina a la terapia combinada. El edema asociado a la terapia con glitazonas puede causar o agravar el edema macular diabético y el fallo cardíaco. En Europa, debido a esto, el tratamiento con pioglitazona y rosiglitazona está contraindicado en pacientes con fallo cardíaco en cualquier estado.

Otro efecto secundario que se ha observado asociado al uso de estas dos glitazonas es una reducción en el nivel de marcadores de la formación del hueso y en el depósito de minerales en mujeres postmenopáusicas y en diabéticos ancianos varones (**Kahn y cols, 2006; Berberoglu y cols., 2007; Glintborg y cols., 2008; Vestergaard, 2009**). Sin embargo, la mayoría de fracturas se producen en el húmero, la mano o el pie, sitios diferentes a los asociados a la osteoporosis postmenopáusica.

Troglitazona, la primera glitazona comercializada, fue retirada del mercado en el año 2000 por provocar toxicidad hepática severa. Sin embargo, los datos disponibles



hasta la actualidad sugieren que la hepatotoxicidad de la troglitazona es específica de ese fármaco y no se trata de un efecto de clase.

## **5. MECANISMO DE ACCIÓN**

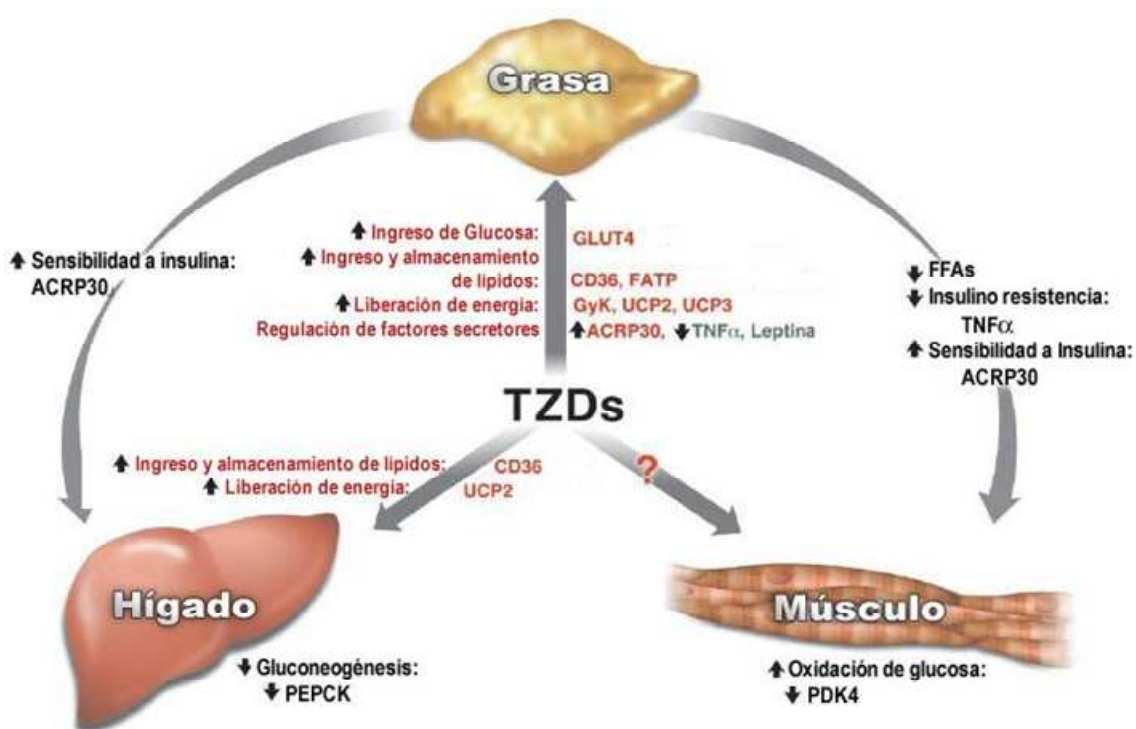
El mecanismo de acción de las glitazonas se basa en la unión a los receptores nucleares PPAR $\gamma$ , que se expresan principalmente en el tejido adiposo, donde actúan principalmente las TZDs (Semple y cols., 2006). Al contrario que ocurre con la mayoría de fármacos y drogas, las glitazonas no actúan uniéndose a receptores de membrana, sino a factores de transcripción en el núcleo celular. En la célula, PPAR $\gamma$  forma un heterodímero con el receptor del ácido retinoico (RXR). La unión y activación de las glitazonas provoca un cambio conformacional en el heterodímero, los complejos co-represores se liberan y el complejo PPAR $\gamma$ -RXR se une a elementos de respuesta (PPRE) en aquellos genes diana donde van a modificar su transcripción (Schoonjans y cols., 1997):

el efecto neto total que producen en el tejido adiposo a largo plazo es la diferenciación de los (pre)adipocitos, los cuales van a captar triglicéridos más rápidamente y no producen lipólisis. Por lo tanto, las glitazonas disminuyen el nivel de ácidos grasos libres que indirectamente activa la captación de glucosa por el músculo esquelético. Basado en su mecanismo de acción, se explica el aumento de peso asociado al tratamiento con las TZDs, gracias al aumento en la cantidad de grasa subcutánea. No obstante y de forma muy interesante, esta ganancia de peso se correlaciona directamente con la disminución en la resistencia a la insulina. Esto se explica por el hecho de que las TZDs disminuyen la cantidad de grasa en tejidos periféricos como el hígado y músculo esquelético, por lo tanto, el tratamiento con glitazonas provoca una redistribución de la grasa desde zonas viscerales a subcutáneas (Bays y cols., 2004). Así, el tratamiento a largo plazo con glitazonas reduce la resistencia periférica a la insulina en músculo esquelético (activando la captación de glucosa) y en hígado (inhibiendo la producción endógena de glucosa por gluconeogénesis) (Natali y Ferranini, 2006).

La afinidad de las glitazonas por el receptor PPAR $\gamma$  varía según cuál sea el tipo de glitazona: la rosiglitazona es la que posee mayor afinidad por el receptor, diez veces más que la pioglitazona, cuya afinidad es 10 veces superior a la de la troglitazona. Esta diferente afinidad por PPAR $\gamma$  relaciona con su actividad biológica y explica las diferencias existentes entre las TZDs en cuanto a su eficacia, seguridad y posología: troglitazona al poseer la afinidad por PPAR $\gamma$  más pequeña es la que se administra en mayor cantidad (400-600 mg/día) (Hauner, 2002).

Pioglitazona también es capaz de unirse y activar al receptor PPAR $\alpha$  (aunque con menos afinidad que la que tiene por PPAR $\gamma$ ), mientras que la rosiglitazona no posee esta característica (Smith U, 2001).

Junto a estos efectos vía PPAR $\gamma$ , pioglitazona y rosiglitazona también ejercen su acción independiente de la activación de PPAR $\gamma$  mediante los denominados efectos **directos agudos**. Este tipo de acción de las glitazonas se ha estudiado menos en relación a las acciones mediadas por la activación de PPAR $\gamma$ , además existen pocas publicaciones recogidas en la literatura científica a este respecto.



**Figura 16: Esquema de las acciones metabólicas de las glitazonas en sus tejidos diana (tejido adiposo, músculo e hígado) y la interrelación que existe entre ambos**

ACRP 30: adiponectina; CD36: cluster differentiation 36 (receptor de trombospondina); FATP: protein transportadora de ácidos grasos; FFAs: ácidos grasos libres; GyK: glicerol quinasa; GLUT-4: transportador de glucosa dependiente de insulina en el tejido adiposo y músculo; PDK4: piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 4; PEPCK: fosfoenolpiruvato quinasa; TNF: FNT- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; UCP-2 y -3: proteína desacoplante 2 y 3

## **6. EFECTOS ANTIDIABÉTICOS**

Las glitazonas son tan efectivas como los demás fármacos que tradicionalmente se han utilizado en el tratamiento de la DM 2 (metformina y sulfonilureas), a la hora de alcanzar y mantener un adecuado control glucémico. Como parámetros de eficacia antidiabética se emplean principalmente los niveles de **hemoglobina glicosilada (HbA1c)** y de **glucosa plasmática en ayunas (FGP)**. La hemoglobina glicosilada es producto de una reacción lenta, no enzimática e irreversible, entre la hemoglobina y la glucosa sanguínea. Esta reacción está directamente relacionada con las concentraciones de glucosa en sangre y tiene en cuenta que la vida media de los eritrocitos es de 120 días. En condiciones normales, la hemoglobina glicosilada refleja la glucemia media del organismo durante los 2-3 meses anteriores al análisis. No se ha conseguido un buen control glucémico cuando los valores de la HbA1c son superiores al 8% y los de glucosa plasmática en ayunas a 126 mg/dl. Ambas glitazonas reducen estos dos parámetros, de forma dosis dependiente, de manera muy similar:

A la dosis que normalmente se prescriben en diabéticos tipo 2 (30 mg/día para pioglitazona y 2 mg/día para rosiglitazona) reducen la HbA1c un 0,8% y 0.9 % y los niveles de FGP un 3,22 mmol/L y 3,19 mmol/L, respectivamente (**Lebovitz y cols., 2001b; Aronoff y cols., 2000**).

Aunque las TZDs no están indicadas como tratamiento de primera elección, algunos estudios han puesto de manifiesto la idea de introducirlas de forma temprana en la terapia antidiabética, tanto en monoterapia como en terapia combinada, para retrasar las futuras complicaciones de la enfermedad. El United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) demostró que el tratamiento tradicional de la diabetes tipo 2 con dieta, sulfonilureas, metformina o insulina no logra que más del 50 % de los diabéticos obtengan un adecuado control glucémico en 3 años y a los 9 años este porcentaje decae hasta el 25 % (**Turner y cols., 1999**). Mientras que en numerosos estudios en los que se ha comparado la eficacia de las TZDs respecto a las sulfonilureas y la metformina se ha comprobado que aunque todos los antidiabéticos reducen en un año de tratamiento la HbA1c de manera muy similar, solamente las glitazonas son capaces de mantener este control glucémico a más largo plazo (**Kahn y cols., 2006; IDF Clinical Guidelines Task Force, 2006**). Esta cualidad de las glitazonas puede deberse a la capacidad que poseen para retrasar la pérdida de la masa de células- $\beta$  pancreáticas y mejorar la sensibilidad a la insulina en tejido periférico (**Barnett, 2009**).

### **6.1. Efectos sobre el metabolismo de glúcidos**

Las glitazonas mejoran la hiperglucemia en la DM 2 al reducir los niveles de glucosa en plasma, activando la utilización periférica de glucosa y disminuyendo la

producción hepática de glucosa. El efecto concreto de las glitazonas sobre las cascadas enzimáticas implicadas en el metabolismo de los glúcidos (glucólisis, gluconeogenesis, metabolismo del glucógeno, efecto regulador del glucagón y la insulina y la ruta de las pentosas fosfato) no se ha investigado profundamente. Los escasos estudios que existen a este respecto fueron realizados en Japón durante la década de los noventa con las glitazonas que primero se descubrieron (englitazona, ciglitazona y troglitazona). En estos experimentos iniciales se investigó su efecto a largo plazo sobre algunas de las enzimas implicadas en el control de este tipo de metabolismo en tejido adiposo, músculo e hígado. Los únicos experimentos que existen sobre las acciones hepáticas directas de las TZDs, independientes de la activación de PPAR $\gamma$ , se realizaron con hepatocitos en incubación o hígado perfundido.

Nishimura y sus colaboradores demostraron que pioglitazona actúa muy rápidamente y de forma dosis-dependiente (1-10  $\mu$ M), inhibiendo la gluconeogenesis en hígado perfundido procedente de ratas controles en ayunas. Estos investigadores también observaron que pioglitazona aumenta el contenido hepático del metabolito fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-bP). Este metabolito es un activador alostérico de la enzima glucolítica fosfofructoquinasa (Nishimura y cols., 1996). En modelos animales de DM 2 (ratas o ratones obesos), el tratamiento con pioglitazona durante varios días (a largo plazo) inhibe la gluconeogénesis y activa la glucolisis hepáticas a través de las enzimas glucosa-6-fosfatasa, glucoquinasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Sugiyama y cols., 1990; Hofmann y cols., 1992). La disminución de la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa que ejerce pioglitazona es dependiente del efecto de adiponectina, a través de la activación hepática a largo plazo de la AMPK (quinasa activada por el AMP) (Kubota y cols., 2006). En ratas Zucker, rosiglitazona también aumenta la expresión de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa a largo plazo en tejido adiposo y muscular, pero a diferencia de pioglitazona, no ejerce ningún efecto sobre esta misma enzima a nivel del hígado (Dana y cols., 2001). Sobre ratas con resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa, rosiglitazona disminuye la expresión de las enzimas glucosa-6-fosfatasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, aumentadas ambas por este tipo de dieta (Yadav y cols., 2009).

## **6.2. Efectos sobre el metabolismo de lípidos**

Las glitazonas reducen la dislipidemia asociada a la resistencia a la insulina de la DM 2. El perfil dislipidémico de la DM 2 se caracteriza por niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y por la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas partículas LDL son susceptibles de oxidarse y transformarse en agentes dañinos capaces de iniciar la lesión aterosclerótica. Los efectos favorables de las tiazolidindionas sobre componentes

importantes de la dislipidemia diabética contribuyen a reducir el riesgo cardiovascular entre pacientes diabéticos tipo 2 (Ovalle y cols., 2002).

Las mayores diferencias que se han encontrado entre rosiglitazona y pioglitazona corresponden al diferente efecto que poseen sobre el perfil lipídico. Ambas glitazonas contrarrestan la dislipidemia diabética aumentando los niveles de HDL-C (pioglitazona con más fuerza) y la concentración de partículas LDL (en mayor medida rosiglitazona respecto a pioglitazona), pero solamente pioglitazona disminuye los triglicéridos circulantes (Goldberg y cols., 2005). En general, la composición de LDL se vuelve menos aterogénica tras el tratamiento con pioglitazona. Mientras pioglitazona no tiene ningún efecto sobre el nivel de colesterol total, rosiglitazona lo aumenta. Por lo tanto, los resultados de los estudios realizados sugieren que el efecto de pioglitazona sobre el perfil lipídico es más favorable que el de rosiglitazona (Herz y cols., 2003; Chiquette y cols., 2004, Deeg y cols., 2007). La posible explicación propuesta para esta diferencia entre rosiglitazona y pioglitazona es la capacidad que tiene pioglitazona de activar el receptor PPAR- $\alpha$ , más implicado en el control del metabolismo lipídico que la forma  $\gamma$  (Qin y cols., 2007).

Recientemente se ha demostrado que el contenido intrahepático de triglicéridos es uno de los factores predictores de resistencia periférica a la insulina más importantes (Korenblat y cols., 2008). Las glitazonas promueven el trasvase de lípidos desde el hígado y músculo hacia el tejido adiposo gracias a la activación en el tejido adiposo de la lipoproteinlipasa, la proteína transportadora de ácidos grasos, la translocasa de ácidos grasos y el receptor de partículas LDL oxidadas. Así, las glitazonas al disminuir la cantidad de triglicéridos en músculo e hígado, aumentan la sensibilidad de estos tejidos a la insulina (Mayerson y cols., 2002; Bajaj y cols., 2003).

### **6.3. Resistencia a la insulina**

Las glitazonas se comercializan como agentes antidiabéticos sensibilizadores a la acción de la insulina. Como tales, por un lado aumentan la toma de glucosa por tejidos periféricos y por otra parte disminuyen el contenido en grasa en hígado y músculo, además mejoran la producción endógena de glucosa hepática mediada por insulina.

Uno de los mecanismos más importantes a través del cual las tiazolidindionas mejoran la sensibilidad a la insulina consiste en que alteran la producción de adipocitocinas en el tejido adiposo. Aumentan sustancialmente la producción de adiponectina (mejora la sensibilidad a la insulina y posee propiedades antiaterogénicas) y también reducen la secreción de las adipocitocinas que debilitan la acción de la insulina (TNF- $\alpha$  y resistina) (Greenfield y cols., 2004; Bajaj y cols., 2004; Gastaldelli y cols., 2007).

#### **6.4. Función y estructura pancreática**

Las glitazonas son capaces de prevenir el comienzo de la DM 2 ó una vez que ésta se ha establecido, retrasan su progresión hacia una enfermedad dependiente de insulina, al preservar la estructura y función de las células- $\beta$  del páncreas. Las glitazonas actúan sobre la lipotoxicidad y el depósito amiloide perjudiciales para las células- $\beta$ . Cuando se trata con pioglitazona o rosiglitazona modelos animales diabéticos tipo 2, las células- $\beta$  liberan mayores niveles de insulina y sufren una granulación (evidencia de una reducción en el estrés) (*Finegoog y cols., 2001; Diani y cols., 2004*). Ambas glitazonas protegen a las células- $\beta$  de la pérdida de la masa celular por apoptosis (*Campbell y cols., 2007; Zeender y cols., 2004*). Una relación pro-insulina respecto a insulina elevada después de las comidas indica una pérdida de la masa celular- $\beta$ , tanto pioglitazona como rosiglitazona disminuyen esta proporción en diabéticos tipo 2, reduciendo el estrés que sufren las células- $\beta$  en esta patología (*Ovalle y cols., 2004; Wallace y cols., 2004*).

#### **6.5. Efecto sobre la composición corporal**

La ganancia de peso de 2-4 kg asociada al tratamiento de la diabetes con las glitazonas se explica de acuerdo a su mecanismo de acción. Sin embargo, curiosamente esta ganancia de peso discurre paralelamente con la mejora en la sensibilidad a la insulina. Esto se explica por el hecho de que las glitazonas más que provocar un aumento de la masa grasa, lo que desatan es una redistribución de la grasa desde la zona visceral a la zona subcutánea, disminuyendo así los depósitos de grasa del hígado y músculo (*Tack y cols., 2006*). Además, remodelan el tejido adiposo e inducen su diferenciación mediante el reemplazo de adipocitos grandes y voluminosos por pre-adipocitos pequeños y más sensibles a la insulina (*Hammarstedt y cols., 2005*).

### **7. EFECTOS DIRECTOS**

Pioglitazona es un agonista de PPAR- $\gamma$  y ejerce la mayoría de sus efectos a través de su activación. Sin embargo, también ejerce efectos directos independientes de la activación de PPAR- $\gamma$ , los cuales prácticamente no se han estudiado y existen pocas referencias en la literatura al respecto.

Troglitazona actúa sobre el metabolismo en el músculo esquelético de una forma directa, aguda e independiente de la activación de PPAR- $\gamma$ . Al igual que las demás TZDs, inhibe la oxidación mitocondrial en músculo esquelético aislado en un corto período de tiempo. Esto supone que se trata de un efecto independiente de la expresión de genes mediada por PPAR- $\gamma$  (*Brunmair y cols., 2001*). En modelos experimentales de ratas sanas, una dosis única de pioglitazona aumenta rápidamente la expresión de

proteína-3-desacoplada (UCP-3) en músculo esquelético aislado in vitro. Este efecto se asemeja a la respuesta aguda frente a ejercicio físico (Brunmair y cols., 2004a).

Pioglitazona afecta directamente la función de las células vasculares humanas: proliferación, ciclo celular, expresión de proteínas, liberación de lactato; independientemente de la activación de PPAR- $\gamma$  y del origen de las células vasculares (Artwohl y cols., 2005a). También tiene la capacidad de reducir de manera directa, tanto la apoptosis endotelial como la expresión de la proteína de choque térmico Hsp-60 (Artwohl y cols., 2005b). En modelos animales hipertensos, pioglitazona de forma espontánea provoca un efecto antihipertensivo mediado por un efecto directo vasopresor y una vasodilatación emparejada a la sensibilidad a la insulina (Verma y cols., 1998).

## **8. OTROS EFECTOS FISIOLÓGICOS**

### **8.1. Estrés oxidativo**

Las glitazonas ejercen una actividad intracelular antioxidante al bloquear distintos mecanismos que en condiciones hiperglucemiantes generan estrés oxidativo. Pioglitazona y rosiglitazona inhiben la enzima óxido nítrico sintasa y reducen la producción de peroxinitrito y anión superóxido en diversos tipos celulares (adipocitos, células endoteliales, células mesangiales), modelos animales de DM 2, otras enfermedades (artritis reumatoide, infarto de miocardio) y también en pacientes diabéticos humanos (Mehta y cols., 2003; Da Ros y cols., 2004b; Calkin y cols., 2005). El estudio DREAM demostró este efecto antioxidante de rosiglitazona en diabéticos humanos, que curiosamente, es AMPK-dependiente e independiente de la activación de los receptores PPAR- $\gamma$  (DREAM trial, 2006; Ceolotto y cols., 2007).

### **8.2. Efectos cardiovasculares**

#### 8.2.1. Efecto anti-inflamatorio

Las glitazonas inhiben la activación de los macrófagos y disminuyen la expresión de citocinas inflamatorias y su liberación por parte de monocitos y macrófagos. Entre otros marcadores pro-inflamatorios, reducen los niveles plasmáticos de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), la proteína anti-fibrinolítica, el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), moléculas de adhesión endotelial (ICAM-1) y metaloproteinasas de la matriz (MMP-9) (Buckingham RE, 2005; Consoli y Devangelio, 2005).

Las propiedades antiinflamatorias de los ligandos de PPAR- $\gamma$ , entre ellos las glitazonas, también pueden ser útiles para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias (*Belvisi y cols., 2006*).

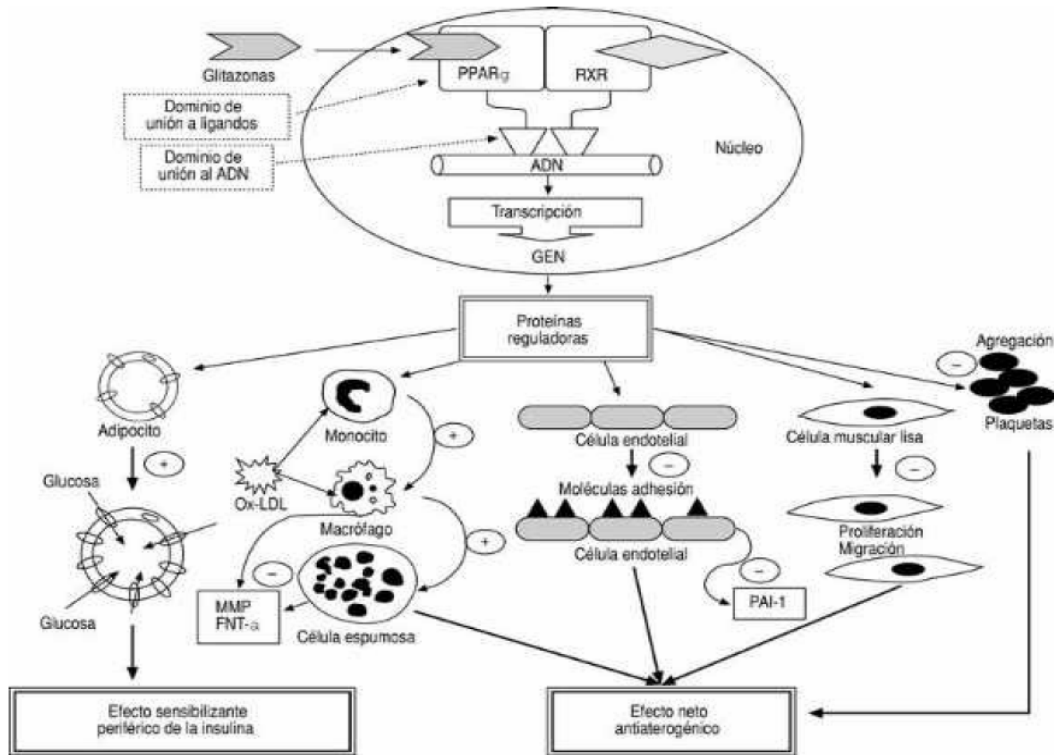
### 8.2.2. Función endotelial

Pioglitazona y rosiglitazona frenan la proliferación y diferenciación de las células endoteliales, a la vez que inhiben a los macrófagos espumosos (*McGuire e Inzucchi, 2008*). Dos ensayos clínicos, CHICAGO Y PERISCOPE, han demostrado el efecto positivo de la pioglitazona sobre la aterosclerosis en diabéticos tipo 2 (*Mazzone y cols., 2006; Nissen y cols., 2008*).

### 8.2.3. Eventos macro-vasculares

El estudio PROactive es el ensayo clínico a largo plazo más largo, grande y completo realizado hasta la actualidad en pacientes diabéticos tipo 2 tratados con pioglitazona, cuyo objetivo consistió en examinar el efecto de pioglitazona a largo plazo sobre los eventos macro-vasculares (*Charbonnel y cols., 2004*). Gracias a este estudio se ha comprobado que pioglitazona reduce significativamente, en un 16 %, la incidencia del infarto de miocardio y la apoplejía. Sin embargo, en el caso de rosiglitazona todavía no existen ensayos clínicos cardiovasculares a largo plazo finalizados y completos. Los insuficientes ensayos de que se disponen arrojan resultados contradictorios sobre la seguridad del tratamiento con rosiglitazona. Nissen y sus colaboradores han relacionado el tratamiento de rosiglitazona con un aumento en la incidencia de infarto de miocardio y de muerte asociada a problemas cardiovasculares (*Nissen y Wolski, 2007*). Sin embargo, el riesgo cardiovascular posiblemente asociado al tratamiento con rosiglitazona no se ha ratificado en otros estudios (*Hanley y cols., 2008; Kahn y cols., 2010*). A causa de esta enorme controversia que existe sobre la seguridad cardíaca de rosiglitazona, la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos y la Administración Estadounidense de Alimentos y Medicamentos han restringido su uso en diabéticos tipo 2 hasta que se dispongan de ensayos cardiovasculares a largo plazo finalizados (*Wong y cols., 2009; Goldfine, 2008*).





**Figura 16. Cascada de señalización celular que conduce al efecto antiaterogénico y sensibilizador a la acción de las glitazonas, mediante activación de PPAR- $\gamma$**

FNT- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ; MMP: Metaloproteinasas de la matriz extracelular ; Ox-LDL: Partículas LDL oxidadas; PAI-1: Factor inhibidor de la activación del plasminógeno; PPAR $\gamma$ : PPAR- $\gamma$ ; RXR: receptor del ácido 9 cis-retinoico

### 8.3. Efecto sobre la quinasa dependiente del AMP (AMPK)

Aunque se ha demostrado que pioglitazona y rosiglitazona activan la AMPK, existe una gran variabilidad entre las dosis y el tipo de glitazonas cuando se trabaja con líneas celulares, modelos animales o pacientes diabéticos tipo 2. Cuando se trata de cultivos celulares (células musculares, fibroblastos y células del túbulo renal), las glitazonas principalmente activan la AMPK mediante mecanismos muy rápidos e independientes de la activación de los receptores PPAR- $\gamma$  (Fryer y cols., 2002; LeBrasseur y cols., 2006; Turturro y cols., 2007). No obstante, estas dos glitazonas también tienen la capacidad de activar a largo plazo la AMPK en los tejidos sensibles a la acción de la insulina (tejido adiposo, hígado y músculo) en animales experimentales y en diabéticos tipo 2 (Saha y cols., 2004; Coletta y cols., 2009).

#### **8.4. Nefropatía diabética**

No existe cura para la nefropatía diabética, sin embargo, sí existen algunas estrategias que atenúan el deterioro progresivo de la función renal en la diabetes. Las tiazolidindionas mejoran la fibrosis tubulointersticial, la albuminuria y la glomeruloesclerosis en modelos animales con nefropatía tanto diabética, como no diabética (Weissgarten y cols., 2006; Toblli y cols., 2009). En pacientes humanos con nefropatía diabética, estos antidiabéticos también corrigen la albuminuria y confieren beneficios cardiovasculares (Yang y cols., 2009).

#### **8.5. Glitazonas y psoriasis**

Los receptores PPAR $\gamma$  se expresan en los queratinocitos humanos y las glitazonas a través de su activación inhiben su proliferación. Se han realizado varios ensayos clínicos en los que se demuestra la eficacia de pioglitazona en el tratamiento de la psoriasis (Shafiq y cols., 2005; Robertshaw y Friedman., 2005).

#### **8.6. Síndrome de ovario poliquístico**

La obesidad, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia típicas de la diabetes mellitus tipo 2 están relacionadas con el hiperandrogenismo que se origina en el síndrome de ovario poliquístico (PCOS). Pioglitazona y rosiglitazona, al igual que otros agentes sensibilizadores a la acción de la insulina como la metformina, mejoran la ovulación, la hiperinsulinemia y el hiperandrogenismo en mujeres que padecen PCOS (Brettenthaler y cols., 2004; Cataldo y cols., 2006; Narsing Rao y cols., 2009).

#### **8.7. Efecto sobre la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)**

La esteatohepatitis no alcohólica es una enfermedad crónica del hígado para la que no existe, hasta la actualidad, una terapia eficaz. Generalmente esta patología suele progresar a fibrosis, cirrosis y cáncer. La resistencia a insulina es uno de los grandes factores de riesgo implicados en la patogénesis de esta enfermedad. La capacidad de las glitazonas de disminuir el depósito de grasa en el hígado y sus acciones anti-inflamatorias han propiciado que se empleen actualmente como terapia de elección de esta enfermedad. Tanto pioglitazona como rosiglitazona en pacientes diabéticos y no diabéticos con enfermedad del hígado graso, normalizan la función hepática, disminuyen el depósito de grasa en el hígado y mejoran significativamente el daño celular de los hepatocitos, la inflamación parenquimal y la fibrosis (Shadid y cols., 2003; Promrat y cols., 2004; Belfort y cols., 2006; Aithal y cols., 2008; Ratzu y cols., 2010). El mecanismo de acción mediante el cual las glitazonas actúan frente a la EHNA no ha sido completamente dilucidado, pero sí se ha demostrado que depende de la acción de la adiponectina sobre el hígado (Da Silva Morais y cols., 2009).

### **8.8. Efecto sobre el sistema nervioso**

Aunque apenas se ha investigado el efecto de las glitazonas sobre el sistema nervioso, sí se han obtenido resultados positivos en el tratamiento de la esclerosis múltiple y Alzheimer en animales de experimentación y humanos, que dan pie a investigaciones futuras y ensayos clínicos a más largo plazo (Escribano y cols., 2009). Pioglitazona modifica el metabolismo y la función mitocondrial en astrocitos en cultivo, protegiéndoles de una muerte celular inducida por hipoglucemia (Dello Russo y cols., 2003). Sobre pacientes con esclerosis múltiple y Alzheimer, rosiglitazona y pioglitazona poseen efectos neuroprotectores, mejorando la memoria y la capacidad cognitiva y reduciendo la activación glial y la atrofia de la materia gris (Sato y cols., 2009; Kaiser y cols., 2009). Incluso la rosiglitazona ha superado un ensayo clínico en fase II para conseguir su autorización en el tratamiento del Alzheimer (Risner y cols., 2006).

### **8.9. Efecto anticancerígeno**

Todas las glitazonas poseen efectos antiproliferativos, antiangiogénicos y proapópticos. Esto supone un posible efecto terapéutico contra el cáncer muy prometedor, aunque esta cualidad se ha investigado en los últimos años y principalmente en líneas celulares cancerígenas y en animales de experimentación. Es necesario, por tanto, una investigación en el hombre para ratificar su efecto anticancerígeno (Knapp y cols., 2006). Se ha comprobado su acción sobre líneas celulares cancerígenas humanas muy variadas y gracias a su estudio se ha descifrado parcialmente el mecanismo de acción de las glitazonas sobre el ciclo celular y la apoptosis que interesantemente, en muchos casos, es independiente de la activación de los receptores PPAR- $\gamma$  (Blanquicett y cols., 2008).

En pacientes humanos se ha ensayado una terapia triple de pioglitazona junto con rofecoxib y trofosfamida contra el angiosarcoma, que resulta eficaz, barata, práctica y se tolera sin riesgo alguno (Vogt y cols., 2003). También se ha comprobado la eficacia anticancerígena en líneas celulares de cáncer de pecho humano de la combinación de rosiglitazona con otros agentes, como los ligandos del receptor del ácido retinoico (Bonofiglio y cols., 2009).

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
iNVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSiGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

*MATERIAL Y MÉTODOS*

## **I. Animales: Tipo y Alimentación**

Para la realización del presente trabajo se utilizaron ratas machos (para evitar las variaciones metabólicas de origen hormonal) de raza Wistar con pesos comprendidos entre los 250 y 300 gramos, procedentes la casa Charles River (Francia) y posteriormente procreados en el animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca.

Los animales fueron alimentados a base de una dieta estandarizada (Harlan Global Diet 2014, Italia), cuyo análisis es el siguiente:

- Agua 12 %
- Proteína cruda 14,5 %
- Grasa cruda 4%
- Fibra 4,5 %
- Ceniza 4,7 %
- Carbohidratos (disponibles)
  - Almidón 51,2 %
  - Azúcar 4,3 %
- Complemento vitamínico-mineral 4,8 %

Los ingredientes de esta dieta incluyen salvado de trigo, trigo, maíz, gluten de maíz, carbonato de calcio, aceite de soja, fosfato de di-calcio, cloruro de sodio, L-Lisina, D,L-Metionina y óxido de magnesio. Además se añadieron como complemento vitamínico-mineral: vitaminas A, D<sub>3</sub>, E, K<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, niacina, ácido  $\alpha$ -pantoténico, ácido fólico, biotina y colina, hierro, manganeso, cinc, cobre, cobalto, yodo y cromo.

Los animales tenían libre acceso tanto al agua como al alimento. Se mantuvieron en una habitación a temperatura y humedad controladas, dotada de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12h/12h) constante. En la mayoría de los experimentos presentados en este trabajo, las ratas se sometían a ayuno durante las 24h anteriores al experimento para agotar el glucógeno hepático y estudiar únicamente el efecto de los sustratos exógenos sobre el metabolismo. Los animales tenían libre acceso al agua también durante este período de ayuno. Los animales fueron tratados, en todo momento, cumpliendo con las condiciones para la ética en el tratamiento y la experimentación dictadas por la Unión Europea (*Directiva 86/609/CEE; relativa a la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos*) y por el Gobierno Español (*Ley 32/2007, del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; esta ley pretende dar cobertura al Real Decreto 1201/2005, del 10 de octubre, sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, que regula directamente la investigación animal; B.O.E. del 21 de Octubre de 2005*).

## II. Técnicas Experimentales

### 1. Aislamiento de hepatocitos

#### 1.1. Principio

Los hepatocitos se aislaron según la técnica de Berry y Friend (**Berry y Friend, 1969**) modificada por Groen y colaboradores (**Groen y cols., 1982**). Esta técnica se basa en una digestión enzimática selectiva de los enlaces de colágeno intercelulares. El hígado se perfunde en dos etapas: primero con una solución Krebs sin calcio (SOLUCIÓN I), y después con una solución Krebs que contiene calcio (SOLUCIÓN II) y además colagenasa (SOLUCIÓN III). La ausencia del calcio en la SOLUCIÓN I de perfusión altera las uniones intercelulares (de tipo desmosoma) cuyo funcionamiento es calcio dependiente, permitiendo así una mejor acción de la colagenasa. En la segunda etapa de aislamiento, la presencia del calcio en la SOLUCIÓN II de perfusión facilita la acción de la colagenasa.

SOLUCIÓN I	120 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 2,4 mM MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 1,2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 24 mM NaHCO <sub>3</sub> ; pH 7,4
SOLUCIÓN II	500 ml Solución I más 1,3 mM Ca <sup>2+</sup> ; pH 7.4
SOLUCIÓN III	60 ml de Solución II con 20 mg de colagenasa

**Reactivos:** Panreac (KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y Sigma (NaCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, Colagenasa, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O)

#### 1.2. Procedimiento de aislamiento

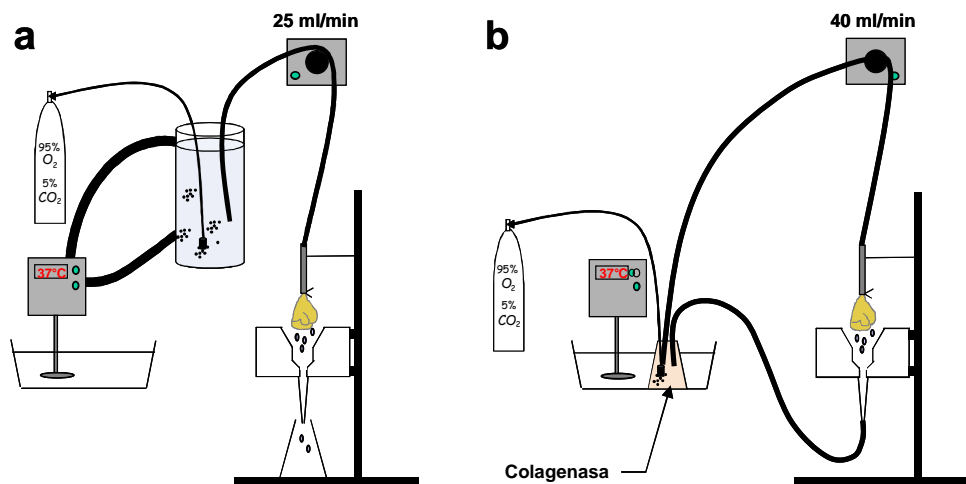
Las ratas se anestesian por inyección intraperitoneal de tiopental sódico (12,5 mg/100 g de peso corporal). Después de realizar una laparotomía ventral media, se inyecta heparina (500 U.I. diluidas en 0,3 ml de la solución I) en la vena peneal para evitar la formación de microtrombosis intrahepáticas que perjudicarían la oxigenación del órgano.

El aislamiento de los hepatocitos se lleva a cabo realizando en primer lugar una **perfusión anterógrada** (vena porta → vena suprahepática) del hígado y a

continuación una **perfusión** en sentido **retrógrado** (vena suprahepática → vena porta), según el procedimiento que se detalla a continuación:

mediante una cánula en la vena porta se perfunde el hígado (*sentido anterógrado*) durante 2 min, a una velocidad de 25 ml/min, con solución I (termostatizada a 37°C y saturada con carbógeno (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>)) con el fin de limpiar el hígado de sangre. A continuación se abre el tórax y la cánula insertada en la vena porta se traslada y se inserta en la vena suprahepática a través de la aurícula derecha del corazón. Comienza así una **perfusión retrógrada** del hígado durante 20 min, para lo cual se liga la vena cava inferior por encima de la vena renal derecha. El hígado se separa minuciosamente del resto del organismo con cuidado de no ser dañado (especialmente por las costillas) y posteriormente se coloca encima de un soporte (**Figura 1a**).

Pasados los 20 minutos, el hígado se perfunde en un sistema recirculante con la solución III (previamente termostatizada a 37°C y saturada de carbógeno) a una velocidad de 40 ml/min hasta el final de la digestión enzimática de los enlaces de colágeno por acción de la colagenasa (**Figura 1b**). El tiempo necesario para obtener una digestión total de los enlaces intercelulares y un aislamiento satisfactorio de los hepatocitos depende de la actividad de la colagenasa, que puede variar dependiendo del lote comercial y del peso del hígado, pero está generalmente comprendido entre 12 y 20 minutos. Una simple observación de la textura y de la morfología del hígado permite evaluar el estado de digestión durante el proceso de aislamiento.



**Figura 1. Sistema de perfusión retrógrado de hígado**

(a) Una vez aislado, el hígado se coloca encima de un soporte y se perfunde en circuito abierto con la solución I termostatizada a 37°C y saturada en carbógeno (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) a una velocidad de 25 ml/min durante 20 minutos. (b) En la segunda fase, el hígado se perfunde en circuito cerrado a una velocidad de 40 ml/min con la solución III en un erlenmeyer donde el líquido está termostatizado y saturado en carbógeno.

Al final de la perfusión con la solución III, el hígado se separa del riñón y de restos de grasa, se coloca dentro de un erlenmeyer con la solución III y se fragmenta rápidamente con varios golpes de tijera para liberar los hepatocitos. Estos fragmentos se agitan en presencia de carbógeno durante 2 minutos, durante los cuales continúa la digestión por la colagenasa. Después, la suspensión celular se filtra a través de un colador de nylon para eliminar los fragmentos no digeridos. El filtrado obtenido se divide en dos fracciones iguales en tubos cilíndricos de centrifugación de 50 ml y se centrifuga (60 g, 4°C, 2 minutos). Al final de esta primera centrifugación a baja velocidad, el sobrenadante de cada tubo se elimina y el sedimento se resuspende en la solución II (previamente saturada en carbógeno y conservada a 4°C en el hielo). A continuación se realiza una segunda centrifugación idéntica a la anterior, al término de la cual, los sobrenadantes se eliminan de nuevo y los dos sedimentos se resuspenden con la solución II pero suplementada con 1% (m/v) de albúmina (BSA). A continuación, los sobrenadantes se unen y se centrifugan por tercera y última vez (60 g, 4°C, 2 minutos). Estas centrifugaciones sucesivas a baja velocidad permiten lavar las células para eliminar la colagenasa y los restos celulares, las células muertas y las células no parenquimales. Finalmente, después de retirar el sobrenadante de la tercera centrifugación, el sedimento celular obtenido se resuspende con un pequeño volumen (8 a 10 ml) de solución II más BSA, se filtra otra vez a través de un colador de nylon y se satura en agitación con carbógeno durante 2 minutos. Antes de su utilización, la suspensión celular se deja en reposo durante una hora a 4°C, lo que permite la estabilización de las membranas.

**Reactivos:** Sigma (albúmina), Hospira (tiopental sódico), Heparina Choay®, Air Liquide (carbógeno)

**Medio instrumental:** Bomba peristáltica 913 Mity Flex de WPI (Reino Unido), baño con termostato de Selecta (Barcelona), tubos de centrifugación Greiner y centrífuga 5810 R de Eppendorf (Alemania)

### 1.3. Apreciación de la suspensión celular

#### *1.3.1. Apreciación cualitativa*

La integridad de los hepatocitos y el rendimiento de la preparación dependen de la exactitud y rapidez de la técnica quirúrgica, de la ausencia de hipertensión hepática, de la buena oxigenación de las células durante todo el proceso de preparación, de la temperatura, del pH, así como de la velocidad y de los tiempos de perfusión, en especial con la colagenasa. La integridad de los hepatocitos se comprueba por la **prueba del azul de Trypan 0,1% (m/v)**. Una tasa de más del 85% de células que excluyan el colorante confirma la buena calidad de la preparación. Los parámetros funcionales, como la respiración celular o la relación ATP/ADP, son los indicadores más fiables de la calidad de las células, pero sólo pueden ser evaluados posteriormente.



### *1.3.2. Apreciación cuantitativa*

Tras la obtención de una suspensión de hepatocitos en la solución II más BSA se realiza, en primer lugar, una estimación de la concentración (mg/ml) de hepatocitos en el medio de suspensión con el fin de determinar la cantidad de células necesarias para realizar el experimento. Después de centrifugar (7.600 g, 2 minutos) 250 µl de suspensión celular, se estima la concentración (mg/ml) de hepatocitos en función del peso del sedimento de hepatocitos obtenido y se expresa en mg de peso seco de hepatocitos estimado por ml. Para ello, se admite que las células están compuestas por un 75% de agua. Esta aproximación tiene la ventaja de dar un valor inmediato con un error máximo del 5% del peso seco real de la suspensión celular.

El peso seco real se obtiene por la diferencia, tras desecación en estufa (24 horas a 100°C), entre el peso de 1 ml de suspensión de hepatocitos y del mismo volumen de la solución II con BSA, que ha sido utilizado para resuspender el sedimento celular final después de la tercera centrifugación. Se obtienen habitualmente entre 500 y 700 mg de peso seco de hepatocitos por hígado aislado, en total, unos 250 a 350 millones de hepatocitos. Según Berry y Friend, 1 mg de peso seco de hepatocitos aislados a partir de hígado de rata en ayunas contiene 465000 células (Berry y Friend, 1969).

Todos los resultados obtenidos con hepatocitos aislados se expresan en *mg de peso seco* (mg PS) de hepatocitos.

## **2. Preparación de mitocondrias aisladas**

Las mitocondrias se aislaron a partir de hígados de ratas Wistar macho de peso corporal medio de 250 g. Los animales tenían acceso *ad libitum* a la comida y al agua.

### 2.1. Principio

El principio del aislamiento de las mitocondrias se basa en la técnica de fraccionamiento de los compuestos celulares por centrifugación diferencial (Klingenberg y Slenczka, 1959; Batandier y cols., 2006).

### 2.2. Procedimiento de aislamiento

La condición ideal de aislamiento de mitocondrias es trabajar con mucha rapidez y a 4 °C, preferiblemente en cámara fría. Con el fin de trabajar lo más rápido posible, aunque el aislamiento no se lleva a cabo en cámara fría, toda la

manipulación con mitocondrias siempre se hace sobre hielo. Dado que la anestesia modifica las propiedades de las membranas mitocondriales, las ratas se sacrifican mediante dislocación cervical. Después de una laparotomía media, el hígado se extrae y se enfría por inmersión dentro de un tampón de homogenización a 4°C. Luego, se corta con ayuda de tijera en trocitos que se lavan con el mismo tampón frío para eliminar los hematíes y el máximo de los depósitos lipídicos. Repartidos en dos fracciones iguales en el tampón de homogenización suplementado con albúmina libre de ácidos grasos para evitar el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, los trozos se homogenizan con un Potter y el homogenado se centrifuga (800 g, 10 minutos, 4°C). Tras esta primera centrifugación a baja velocidad que permite eliminar los restos celulares gruesos, el sobrenadante que contiene las mitocondrias, se recupera y se somete a una nueva centrifugación (8000 g, 10 minutos, 4°C). Después de esta segunda centrifugación, el sobrenadante se elimina y el precipitado mitocondrial obtenido se resuspende en el tampón de homogenización para aclarar las mitocondrias. Una tercera y última centrifugación se efectúa entonces (8000 g, 10 minutos, 4°C). Después de la eliminación del sobrenadante, el precipitado mitocondrial final se pone de nuevo en suspensión con 500 µl del tampón de homogenización y se conserva a 4°C en hielo.

**Tampón de homogenización:** 250 mM Sacarosa (Panreac), 20 mM Tris-HCl (Sigma) y 1 mM EGTA (Sigma), pH 7,2; Seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos (Sigma)

**Medio Instrumental:** Potter de Alamo (Madrid) y centrífuga 5810 R de Eppendorf (Alemania)

### 2.3. Determinación de la concentración de las proteínas mitocondriales

La determinación de la concentración de la suspensión mitocondrial se efectúa antes de cada experimento y se obtiene mediante la determinación cuantitativa de las proteínas contenidas en la suspensión según el método de Biuret (Gornall y cols., 1948) y se expresa en mg de proteínas por ml. La suspensión mitocondrial (25 µl) se solubiliza con 200 µl de colato de sodio 4% (m/v). Después de 10 minutos, se añaden 2,75 ml de NaOH 10% (m/v) y 300 µl de sulfato de cobre 1% (m/v) y la muestra se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras el tiempo de espera, se lee la absorbancia a 540 nm. El conjunto de los resultados se refiere a *mg de proteínas*.

**Reactivos:** Panreac (Hidróxido de sodio,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y Sigma (ácido cólico)

**Medio Instrumental:** Espectrofotómetro Specord 205/Analytik Jena Group (Alemania)

### III. Modelos Experimentales

#### 1. Modelo experimental de hepatocitos aislados en perfusión

##### 1.1. Principio

La técnica de perfusión de hepatocitos fue inventada y puesta a punto por los doctores Van Der Meer y Tager de la Universidad de Amsterdam (Holanda) (*Van Der Meer y Tager, 1976*) y posteriormente fue modificada por Groen y Tager (*Groen y cols., 1983*). Esta técnica es particularmente original y su funcionamiento es delicado, pero tiene una gran capacidad, una resolución muy fina y permite obtener resultados muy fiables y reproducibles.

La perfusión (**Figura 2**) consiste en un sistema abierto, par y simétrico que permite la realización de experimentos de manera apareada en condiciones de tiempo, de medio, de presión y de temperatura estrictamente idénticas. Incluye dos cámaras termostalizadas a 37°C perfectamente simétricas, llamadas “cámaras de perfusión”, donde se colocan los hepatocitos en suspensión. Estas cámaras se alimentan permanentemente, por medio de dos bombas peristálticas, con un medio de perfusión (solución II) que proviene de un depósito central donde se mantiene a 37°C y está saturado con una mezcla de carbógeno (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>). Justo antes de su entrada en las cámaras, este medio pasa a través de un sistema de reoxigenación donde se satura de nuevo con carbógeno. Cada cámara posee una entrada así como una salida para el medio de perfusión. La salida del medio de perfusión denominado “*perifusato*” se efectúa a través de un filtro de acetato de nitrocelulosa de 12 µm de diámetro de poro que permite la salida del perifusato de la cámara con todos sus componentes excepto las células. Las entradas secundarias permiten igualmente el aporte continuo de sustratos y/o productos a probar, mediante jeringas de presión conectadas a sus correspondientes bombas peristálticas.

La ventaja de este original sistema consiste en que la composición del medio de incubación de las células en el interior de las cámaras de perfusión es constante, lo que permite obtener estados metabólicos muy cercanos al estado estacionario. En efecto, como los sustratos se suministran a las células de manera continua y como el medio se renueva permanentemente, no hay ni limitación de sustratos, ni acumulación de productos.

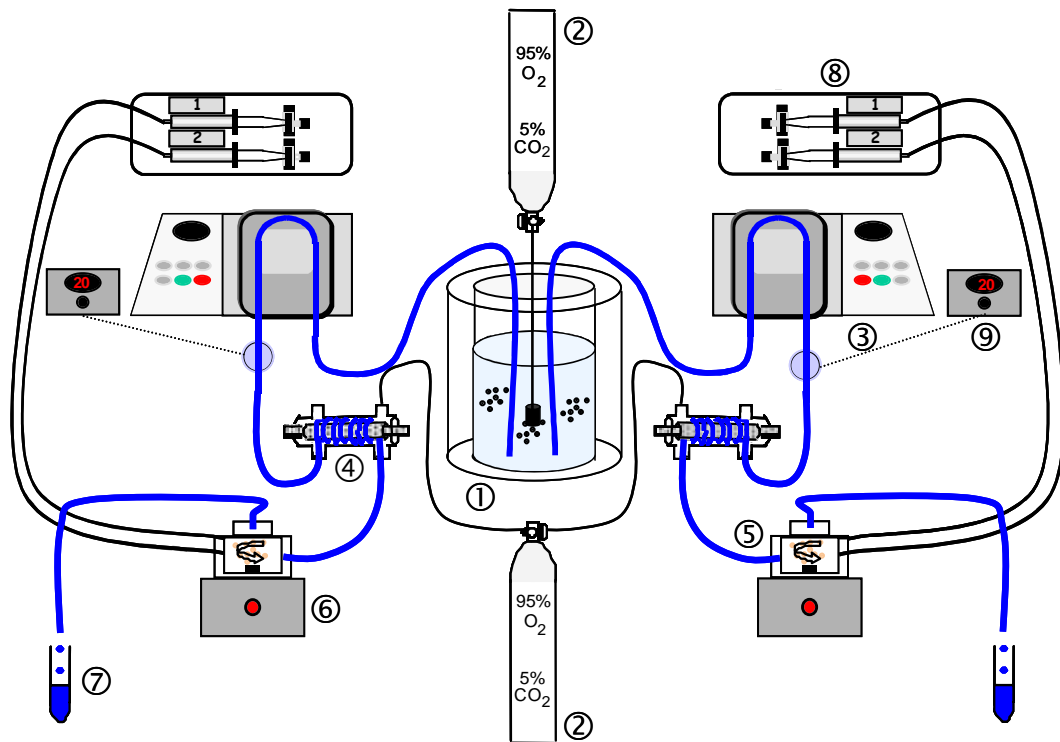


Figura 2. Esquema del sistema de perfusión de hepatocitos

1. Cuba termostatzada que contiene el medio de perfusión 2. Mezcla de carbógeno que permite la saturación en oxígeno del medio de perfusión al nivel de la cuba y del sistema de reoxigenación 3. Bomba peristáltica 4. Sistema de reoxigenación 5. Cámara de perfusión 6. Agitador magnético 7. Recogida del perfusato 8. Jeringas de presión 9. Captor de presión.

Los elementos del sistema de perfusión son:

Dos cámaras de perfusión y cuba termostatzada adquiridas al INSERM E0221, Universidad de Grenoble I (Francia)

Dos agitadores magnéticos de Prolabo Rotamag (Francia)

Dos bombas peristálticas Peri Star de WPI (Reino Unido)

Tres bombas peristálticas con jeringas de presión de Vial Médical (Francia)

Dos bombas peristálticas con jeringas de presión de Master Dual Pump WPI (Reino Unido).

Dos transductores de presión de Harvard Apparatus (Madrid)

Dos pulmones de reoxigenación de Afora (Madrid)

Dos baños María con termostato de Selecta (Barcelona)

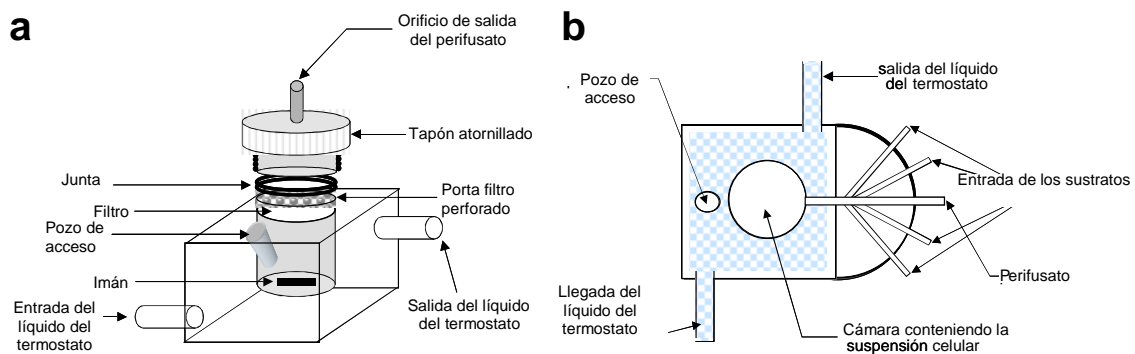
Tubos de silástico de reoxigenación de Dow Corning (Bélgica)

Jeringas de PentaFerte S.p.A. (Italia)

Filtros de acetato de nitrocelulosa de 12  $\mu\text{m}$  de diámetro de Schleicher and Schuell (Alemania).

### 1.2. Cámaras de perfusión

Las cámaras de perfusión constituyen las piezas esenciales del sistema y la supervivencia de las células en su interior depende estrechamente de su calidad (pulido, pegamento utilizado, etc.). Las cámaras están fabricadas en plexiglás y constan de una cavidad, donde las células o tejido se depositan y un compartimento que rodea enteramente dicha cavidad, permitiendo el paso del líquido de termostatización (Figura 3).



**Figura 3. Cámara de perfusión, vista general (a) y vista superior (b)**

La cámara, de un volumen de 15 ml, es cilíndrica y contiene un imán para la agitación de la suspensión celular. La boca de este cilindro está cerrada por un filtro de acetato de nitrocelulosa cuyo diámetro de poro es de 12  $\mu\text{m}$ , manteniéndose en su sitio sin moverse por un porta-filtro. La impermeabilidad del filtro situado en la boca de la cámara se asegura con una junta de látex y el conjunto está cerrado gracias a un tapón de rosca, perforado en su centro, aplicado sobre la boca de la cavidad cilíndrica. El líquido de perfusión filtrado fluye por el orificio situado en el centro del tapón hacia el exterior del sistema, donde puede ser recuperado y se denomina entonces “perfusato”.

La parte superior de la cavidad cilíndrica consta de un orificio encima del cual se aplica una pieza con llave que permite purgar la cámara del aire que podría contener y también extraer muestras de células o tejido del interior de la cámara durante el experimento, para la realización de las diferentes determinaciones analíticas de metabolitos intracelulares.

Además de la entrada principal por la cual entra el medio de perfusión, las cámaras de perfusión tienen cuatro entradas anexas que permiten la administración continua de sustratos y/o drogas, de hormonas y/o inhibidores, por medio de bombas peristálticas que funcionan con jeringas de presión.

Alrededor de la cámara se encuentra un compartimento por el cual circula el líquido de termostatación a 37°C. La cámara de perfusión está colocada encima de un agitador magnético que permite el mantenimiento de las células o tejido en suspensión.

### 1.3. Termostato del sistema

El sistema se termostatiza mediante dos baños-maría con el fin de mantener una temperatura constante de 37°C en las cámaras de perfusión y en el depósito central. El primero, de gran capacidad, sirve para mantener la temperatura del medio de perfusión contenido en el depósito central cercana a 40°C. Esta temperatura superior a la de 37 °C del líquido de perfusión se debe a que hay una pérdida de calor por convección alrededor de 2-3 °C a nivel de los tubos de unión de plástico PVC que enlazan el depósito central y las cámaras de perfusión. El segundo baño-maría, de menor capacidad, sirve para termostatar el sistema de reoxigenación y las cámaras de perfusión.

Regularmente se verifica que la temperatura del perfusato a la salida de las cámaras sea de  $37\pm 1^\circ\text{C}$ .

### 1.4. Depósito central

El medio de perfusión que es la solución II se coloca en un depósito central único de plexiglás, formado por una doble pared que rodea la cuba y que permite la circulación del líquido del termostato para calentar el depósito (**Figura 4**). Este medio se satura permanentemente con la mezcla de carbógeno (95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>).

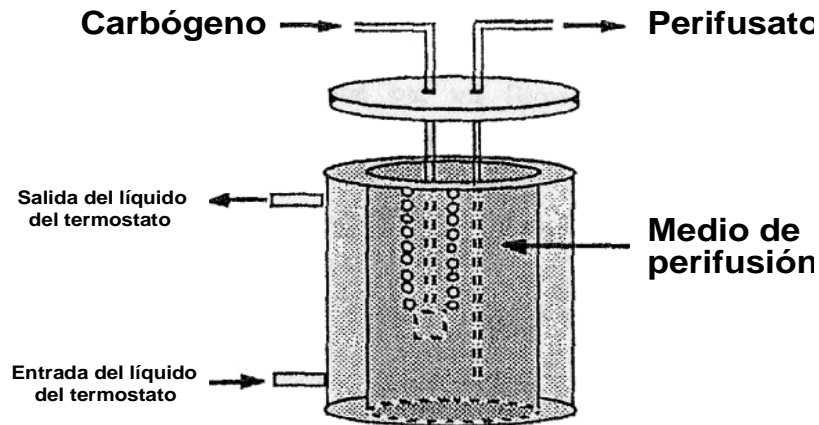


Figura 4. Depósito central del medio de perfusión

### 1.5. Bombas peristálticas

El medio de perfusión se propulsa en el sistema a partir del depósito central mediante dos bombas peristálticas. La velocidad de perfusión es de 5 ml/min y se ajusta de forma precisa antes del comienzo de cada experimento para que sea rigurosamente idéntica en las dos cámaras.

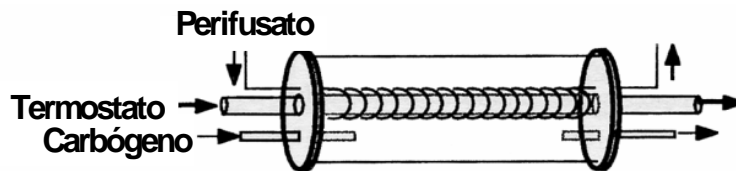
### 1.6. Captores de presión

Por debajo de las bombas peristálticas se encuentran dos captores de presión que permiten medir permanentemente la presión ejercida por el líquido sobre el conjunto del sistema. Esta presión, que es normalmente baja, es un buen criterio de viabilidad celular. En efecto, cuando las células están en mal estado o cuando una condición particular (drogas, inhibidores, etc) ejerce un efecto nocivo sobre ellas, los restos celulares que provienen de las células muertas pueden obstruir los poros de los filtros a la salida de las cámaras de perfusión y provocar así un aumento progresivo de la presión. Los requisitos para evitar este tipo de problema son, evidentemente, utilizar una preparación de células aisladas de buena calidad, mantener una agitación constante y además, cambiar el filtro de manera preventiva al menos una vez durante el experimento. Sin embargo, si surge un problema de presión, se puede realizar un cambio del filtro adicional.

### 1.7. Sistema de reoxigenación

Aunque el medio de perfusión está continuamente saturado con carbógeno a nivel del depósito central, su paso por los tubos de PVC se acompaña por una pérdida de oxígeno y de  $\text{CO}_2$  por difusión a través del plástico. Como la proporción de  $\text{CO}_2$  es crucial para el mantenimiento del pH celular, es indispensable saturar de

nuevo el medio con carbógeno antes de su entrada en las cámaras de perfusión. Este proceso se desarrolla en un sistema de reoxigenación situado justo antes de las cámaras de perfusión (Figura 5).



**Figura 5. Sistema de reoxigenación**

El sistema de reoxigenación está constituido por un cilindro de vidrio, en el cuál circula permanentemente una corriente de carbógeno. El medio de perfusión circula a través de un tubo de silástico, cuya pared muy fina permite los intercambios de gases. Este tubo de silástico por donde circula el medio de perfusión está enrollado alrededor de un tubo de vidrio por el cual circula el líquido del sistema de termostatización. Así, a la salida del sistema de reoxigenación, es decir justo antes de la entrada en las cámaras, el medio de perfusión tiene una temperatura de 37°C y está de nuevo saturado con carbógeno.

**Carbógeno:** Air Liquide (Valladolid)

### 1.8. Procedimiento

Al comienzo del experimento, la suspensión de células (100 a 250 mg de hepatocitos según el tipo de experimento) se deposita a través de la pieza con llave situada encima de cada cámara. Inmediatamente después de haber purgado el aire residual de la cámara y encendido el sistema de agitación a una velocidad suave, las bombas peristálticas se ponen en marcha. La facilidad con la cual se puede hacer variar las concentraciones de sustratos y/o de productos administrados en este sistema de perfusión hace posible la realización de muchos tipos de experimentos:

- titración de concentraciones crecientes de sustrato en presencia de una concentración fija de droga, de hormona o de inhibidores
- estudios cinéticos con concentraciones fijas de sustratos y/o productos a ensayar o bien con concentraciones fijas de sustrato y variables del producto a ensayar



En los experimentos de titración, las células se perfunden en ausencia de sustrato durante los primeros 32-35 minutos, para permitir que se equilibren a la temperatura de 37°C. Al final de este periodo de estabilización, se recoge perfusato y suspensión de células del interior de las cámaras y se cambian los filtros de las dos cámaras de manera preventiva con el fin de eliminar las pocas células muertas presentes en la preparación inicial. Para cada concentración de sustrato estudiado es necesario un tiempo de estabilización de 15 a 20 minutos, según las condiciones, para permitir alcanzar un nuevo estado estacionario. Este último se puede evaluar después, por ejemplo, por la estabilidad del flujo de producción de glucosa.

Para cada estado estacionario, o durante el experimento cuando se realiza una cinética, se puede recoger fácilmente el perfusato a la salida de las cámaras para analizar los diferentes metabolitos extracelulares (glucosa, lactato, piruvato y cuerpos cetónicos) y calcular así el flujo de producción de estos últimos con arreglo a las diferentes condiciones estudiadas. Para los experimentos de titración, el perfusato se recoge durante tres minutos consecutivos en tubos que son inmediatamente conservados a 4°C para eliminar cualquier actividad enzimática contaminante de origen celular. Al final del experimento, estos tubos se calientan a 80°C durante 10 minutos para desnaturalizar las proteínas y las enzimas eventualmente presentes, luego se centrifugan durante 10 minutos a 8000 g y por último se conservan a 4°C. Las determinaciones enzimáticas de los metabolitos se pueden efectuar el mismo día o al día siguiente conservando siempre las muestras a 4 °C, excepto el piruvato que es inestable a la congelación y se determina el mismo día del experimento.

También se pueden tomar muestras de la suspensión celular directamente de las cámaras a través de la pieza con llave para realizar, mediante técnicas de fraccionamiento celular, la separación de las fracciones extracelular e intracelular, así como mitocondrial y citosólica.

Los modelos experimentales se detallarán con más precisión en el apartado “Resultados”.

**Medio instrumental:** Baño con termostato de Bunsen (Madrid) y centrífuga Hermle Z 360 K (Madrid).

## **2. Incubación de hepatocitos aislados en viales cerrados**

Los hepatocitos aislados (entre 5 y 10 mg/ml en 1,8 a 2,5 ml de medio según el tipo de experimento) se incuban en viales cerrados de polipropileno que contienen la solución II (ver aislamiento de hepatocitos) (saturada en carbógeno [95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>])

durante el primer minuto de incubación) y con diferentes sustratos y/o drogas, hormonas o inhibidores específicos, según el protocolo experimental previamente definido. Los hepatocitos se mantienen en suspensión mediante una agitación suave y permanente utilizando un baño-maría termostatzado a 37°C. Dependiendo del protocolo experimental, a distintos tiempos se cogen muestras de células en suspensión. Este modelo experimental se emplea como fase inicial en las siguientes técnicas experimentales:

- medida de la respiración en hepatocitos intactos
- medida de las actividades enzimáticas
- medida de la capacidad de retención cálcica (CRC) de las mitocondrias en hepatocitos permeabilizados

**Medio instrumental:** baño con termostato Memmert (Madrid)

### **3. Técnica de fraccionamiento celular**

La técnica de fraccionamiento celular de hepatocitos permite tener acceso a diferentes compartimentos intracelulares en los cuales se puede medir la concentración de ciertos metabolitos o nucleótidos.

**Reactivos:** Panreac (ácido perclórico, KOH, sacarosa), Sigma (EDTA, MOPS, digitonina) y Wacker® AR 200, Alemania (aceite de silicona)

**Medio instrumental:** centrífuga eppendorf Minispin (Duero Lab, Salamanca)

#### 3.1. Separación del medio intracelular y extracelular

La separación de los medios intracelular y extracelular se realiza por centrifugación simple a través de una capa de aceite de silicona cuya densidad permite únicamente el paso de células enteras.

Antes de empezar el experimento, los tubos eppendorf de 1 ml conservados luego a 4 °C, se preparan con 2 capas superpuestas (de abajo hacia arriba):

- 250 µl de una mezcla de ácido perclórico (10% m/v) y de EDTA (25mM)
- 390 µl de aceite de silicona con una densidad que permite el paso de células enteras

Se toma una muestra (700 µl) de hepatocitos perfundidos que se deposita delicadamente sobre la superficie de la capa de aceite. Luego se centrifuga a 13.500 g durante 1 minuto.

Después de la eliminación del sobrenadante residual y de una parte del aceite, el contenido intracelular solubilizado en la capa inferior de ácido perclórico-EDTA se pone en suspensión con cuidado a través de la capa de aceite gracias a una pipeta Pasteur obstruida. Este método permite asegurarse de que todas las células que han atravesado la capa de silicona han sido desintegradas una vez precipitadas en el ácido perclórico. A continuación, se efectúa una centrifugación a 13.500 g durante 2 minutos para sedimentar los restos membranosos, se extrae el contenido intracelular soluble en el ácido (200  $\mu$ l) a través de la capa de aceite y se neutraliza (pH = 7-7,5) con una mezcla de hidróxido de potasio (KOH 2M) y de ácido morfolino-propano sulfónico (MOPS 0,3M).

Las muestras finales neutralizadas se conservan a -80°C para las subsiguientes determinaciones de los diferentes metabolitos del contenido intracelular.

### 3.2. Separación del medio citosólico y mitocondrial

La separación de los medios mitocondrial y citosólico se obtiene por fraccionamiento celular con digitonina (Zuurendonk y cols., 1979). El principio de este método se basa en la permeabilización selectiva de la membrana plasmática del hepatocito por la digitonina (detergente) que forma complejos con el colesterol que contiene. Se utiliza una concentración de digitonina de 2,46 mg/ml durante un tiempo de contacto con las células de 1 minuto y así se consigue una destrucción de la membrana plasmática sin alteración de la membrana mitocondrial, más bien pobre en colesterol.

Antes de comenzar el experimento, los tubos eppendorf de 2 ml conservados luego a 4°C, se preparan con 3 capas superpuestas (de abajo hacia arriba) de:

- 250  $\mu$ l de una mezcla de ácido perclórico (10% m/v) y de EDTA (25 mM), este último compuesto quela el magnesio y permite así limitar la degradación del ATP celular por actividades ATPásicas magnesio-dependientes contaminantes
- 800  $\mu$ l de aceite de silicona con una densidad que permite únicamente el paso de mitocondrias
- 800  $\mu$ l de una solución de digitonina (2,46 mg/ml) disuelta por calentamiento en un tampón isotónico que permite preservar la integridad mitocondrial (250 mM sacarosa, 3 mM EDTA- $\text{Na}^{2+}$  y 20 mM MOPS; pH 7,2)

Durante el experimento, después del período inicial de estabilización y tras cada estado estacionario, se extrae una muestra (300  $\mu$ l) de hepatocitos perfundidos que se deposita delicadamente en la capa superior del eppendorf. Tras unos 30 segundos de acción de la digitonina, se efectúa una centrifugación a 13.500 g durante 1 minuto lo que permite a las mitocondrias, liberadas de las células por acción del

detergente, atravesar la capa de aceite de silicona y depositarse en el ácido perclórico.

Para obtener el compartimento citosólico, en primer lugar se extrae el sobrenadante (800µl) correspondiente al compartimento citosólico y al medio extracelular, se precipita en el ácido perclórico (4% m/v) y se centrifuga durante 2 minutos a 13.500 g. Al final, se recoge el segundo sobrenadante (700 µl) y se neutraliza con una mezcla de hidróxido de potasio y de MOPS.

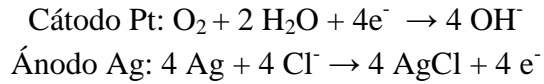
Por otra parte, tras la eliminación del sobrenadante residual y de una parte del aceite, el compartimento mitocondrial solubilizado en la capa inferior del eppendorf con ácido perclórico-EDTA se pone en suspensión a través de la capa de aceite gracias a una pipeta Pasteur obstruida. Luego se centrifuga a 13.500 g durante 2 minutos para sedimentar los restos membranosos. El compartimento mitocondrial soluble en el ácido (200 µl) se extrae entonces a través de la capa de aceite e igualmente se neutraliza con una mezcla de hidróxido de potasio y de MOPS.

Las muestras finales neutralizadas, tanto del compartimento mitocondrial como del citosólico, se conservan a -80°C para las determinaciones analíticas posteriores del contenido citosólico y mitocondrial de nucleótidos adenílicos: ATP, ADP y AMP.

#### **4. La oxigrafía: técnica de estudio utilizada con hepatocitos intactos y mitocondrias aisladas**

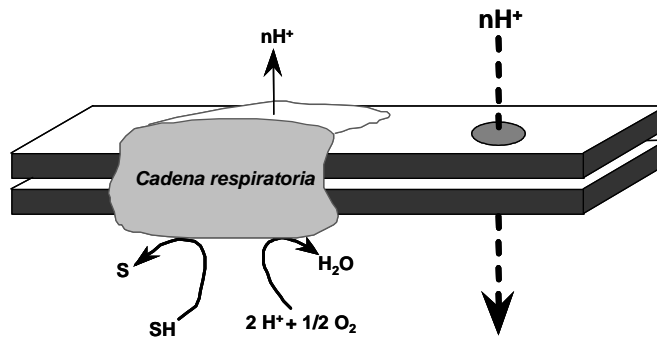
##### 4.1. Fundamento de la Oxigrafía

La medida del consumo del oxígeno de los hepatocitos intactos y de las mitocondrias aisladas se realiza en una cámara de oxigrafía cerrada, con agitación magnética y termostalizada a 37°C, mediante un electrodo que mide de forma continua la concentración del oxígeno en el medio. Este electrodo llamado de Clark está constituido por un cátodo de platino (Pt) polarizado a - 0,7 Voltios y un ánodo de plata (Ag) bañado en una solución de KCl 3 M (actúa como electrolito). El cátodo de platino está recubierto de una membrana fina de teflón semi-permeable que permite la difusión del oxígeno y protege del contacto con agentes químicos perturbadores y el agua. En estas condiciones, la señal que resulta de la reducción del oxígeno en el cátodo de platino es directamente proporcional a la cantidad de oxígeno disuelta en el medio de incubación y entonces se puede medir directamente la velocidad de la respiración celular según los diferentes productos añadidos (**Renger y Hanssum, 2009**). Las reacciones que ocurren son las siguientes:

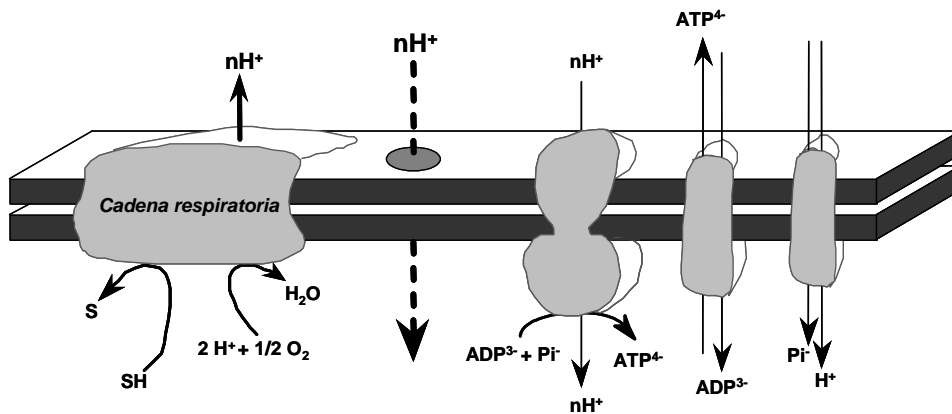


**Reactivo:** KCl (Panreac)

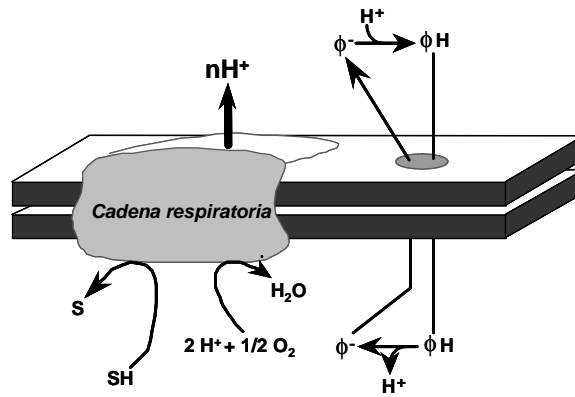
**Medio instrumental:** cámara de oxigrafía (Heito, Francia), electrodo de Clark (OXM 204, Heito, Francia) y registrador (L6512, Linseis, USA)



**Estado 4 de respiración:** la velocidad de la respiración está controlada por la reentrada pasiva o fugas de los protones a través de la membrana mitocondrial interna (*leak ohmico*) y por los otros fenómenos disipadores de energía (*leak no ohmico* y *slipping*).



**Estado 3 de respiración:** en presencia de ADP, las reacciones de oxidación están acoplados a la síntesis de ATP por la F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP sintasa (ATPasa). El equilibrio entre el influjo y el eflujo de protones *via* la membrana mitocondrial interna contribuye al mantenimiento de la fuerza protónmotriz y está asegurado por muchos mecanismos: la cadena respiratoria realiza el eflujo de protones en el espacio intermembranos mientras que el influjo se realiza simultáneamente por la ATPasa, algunos transportadores de la membrana mitocondrial interna y algunas fugas (*leak*). En condiciones fisiológicas, la ATPasa es el elemento que contribuye de manera mayor al retorno de los protones a la matriz mitocondrial.



**Estado desacoplado:** el desacoplador protonóforo cataliza una difusión facilitada de los protones en el sentido de la disipación del gradiente electroquímico de protones. Si la cantidad añadida del desacoplador estimula la velocidad de respiración de manera máxima, el flujo está controlado sólo por el potencial redox y las propiedades cinéticas de la cadena respiratoria.

Esquema 1. Los distintos estados de la respiración

## 4.2. Medida de la respiración

### 4.2.1. Medida de la respiración en mitocondrias aisladas

La medida del consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas se realiza por simple adición de éstas ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) en el tampón de respiración. La medida se inicia con la adición de los sustratos respiratorios: glutamato/malato o succinato/malato, éste último junto con rotenona. En presencia de los sustratos las mitocondrias tienen una respiración basal, llamada **estado 4**, cuya velocidad está controlada por la re-entrada pasiva de los protones a través de la membrana mitocondrial interna. El **estado 3**, que corresponde a la respiración en condición fosforilante, se obtiene con la adición del ADP en presencia de concentración no limitante de fosfato.

Las concentraciones de los diferentes inhibidores o sustratos utilizados cuando se trabaja con las mitocondrias aisladas están indicadas en la tabla siguiente:

Inhibidor / Sustratos	Característica	Concentración
<b>Glutamato/Malato</b>	Sustratos del complejo I de la cadena respiratoria	5 mM / 2,5 mM
<b>Succinato/Malato</b>	Sustratos del complejo II de la cadena respiratoria	5 mM / 0,5 mM
<b>ADP</b>	Sustrato de la ATP sintasa	1 mM
<b>Rotenona</b>	Inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria	1,25 $\mu\text{M}$
<b>DNP</b>	Desacoplador	75 $\mu\text{M}$

<b>Oligomicina</b>	Inhibidor del canal F <sub>0</sub> de la ATP sintasa	1,25 µg.ml <sup>-1</sup>
<b>Antimicina</b>	Inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria	0,15 µg.ml <sup>-1</sup>
<b>TMPD</b>	Par redox sustratos de la citocromo oxidasa	1 mM
<b>Ascorbato</b>		5 mM

La concentración de oxígeno en los diferentes tampones de respiración varía en función del tipo de medio y la temperatura, aunque ésta se ha determinado previamente mediante la oxidación de una cantidad conocida de NADH por las mitocondrias. A título general, para el cálculo tenemos en cuenta lo siguiente: la concentración de oxígeno en el tampón mitocondrial KCl es de 440 nanoátomos O/ml a 37°C y de 480 nanoátomos O/ml a 25°C.

**Tampón de respiración:** 125 mM KCl (Sigma), 20 mM Tris-HCl (Sigma), 1 mM EGTA (Sigma) y 5 mM Pi-Tris (Panreac); pH 7,2 ; 0,1% de seroalbúmina bovina delipidada (Sigma)

**Sustratos e inhibidores:** Sigma (ADP, Ascorbato, DNP, oligomicina, rotenona, TMPD), antimicina (Fluka), glutamato, malato y succinato (Sigma)

#### 4.2.2. Medida de la respiración en hepatocitos intactos

La medida del consumo de oxígeno por los hepatocitos intactos se realiza después de la incubación de las células (10 mg.ml<sup>-1</sup>) en viales cerrados conteniendo 2,5 ml del medio Krebs-Bicarbonato-Calcio. Tras 15 minutos de pre-incubación de los hepatocitos con dihidroxiacetona (DHA) como sustrato, se incuban las células durante 30 minutos con la droga o su vehículo para, finalmente, extraer 2 ml de la suspensión celular previamente saturada con carbógeno durante 1 minuto y transferirlos inmediatamente después a la cámara de oxigrafía. Las concentraciones de los diferentes inhibidores y sustratos utilizados con los hepatocitos intactos están indicadas en la tabla siguiente:

<b>Inhibidor /Sustratos</b>	<b>Característica</b>	<b>Concentración</b>
<b>DHA</b>	Sustrato energético hepatocitos	20 mM
<b>DNP</b>	Desacoplador	100 µM
<b>Oligomicina</b>	Inhibidor del canal F <sub>0</sub> de la ATP sintasa	6 µg.ml <sup>-1</sup>

La concentración de referencia de oxígeno en el medio Krebs/Bicarbonato/Calcio gaseado con carbógeno a 37°C es de 1 mM de O<sub>2</sub>.

**Sustratos e inhibidores:** DHA (Merck-Shuchardt) y Sigma (DNP y oligomicina)

## IV. Determinaciones analíticas

### 1. Principios de las determinaciones analíticas de los metabolitos extracelulares

El análisis de los principales metabolitos extracelulares se realiza por los métodos enzimáticos descritos por Bergmeyer, basados en la transformación del  $\text{NAD}^+$  en NADH o viceversa (Bergmeyer, 1974).

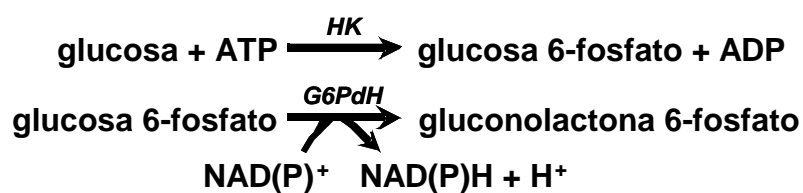
La determinación de la concentración de NADH, que presenta un pico de absorción máximo a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 340 nm, se realiza en espectrofotómetro antes y después de la acción de enzimas en los medios de análisis de composición estandarizada conteniendo las muestras a analizar. El coeficiente de extinción molar del NADH es de  $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Después de la sustracción de la absorbancia del blanco (realizado con el medio de análisis sin enzima) a la de la muestra, la cantidad de NADH calculada corresponde estequiométricamente a la del producto transformado por la enzima utilizada.

Los resultados obtenidos de las concentraciones de los metabolitos en la cubeta del espectrofotómetro se refieren al peso seco de hepatocitos, teniendo en cuenta todas las diluciones previamente efectuadas.

**Medio Instrumental:** Espectrofotómetro Specord 205/Analytik Jena Group (Alemania)

#### 1.1. Determinación de la glucosa

La determinación de la glucosa se basa en la transformación del  $\text{NAD}^+$  en NADH durante una reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PdH).



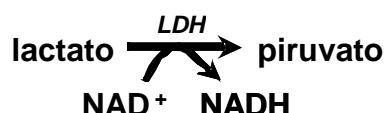
500  $\mu\text{l}$  de la muestra a analizar se deposita en una cubeta de espectrofotómetro que contiene 500  $\mu\text{l}$  de medio de análisis estandarizado. Se realiza una primera lectura y luego la reacción se inicia por adición de 10  $\mu\text{l}$  de la enzima hexoquinasa (HK) diluida al 1/50. Se realiza la segunda lectura 60 minutos después de haber agitado las muestras para homogenizar.



**Medio de análisis:** tampón ETRAM (50 mM TRA-HCl/Sigma; 7,5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /Panreac; 3,75 mM EDTA/Sigma; pH 7,4); 0,5 mM NAD (Roche 10127973001); 0,625 mM ATP (Roche 127531); 0,5 U.I. G6PdH  $\text{NAD}^+$ -dependiente (Roche 10165875001)  
**Enzima:** Hexoquinasa (Roche 11426362001)

### 1.2. Determinación del lactato

La determinación del lactato se basa en la transformación del  $\text{NAD}^+$  en NADH durante una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).

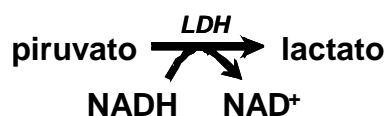


La muestra a analizar (500  $\mu\text{l}$ ) se deposita en una cubeta que contiene 500  $\mu\text{l}$  de medio de análisis estandarizado. La glicina e hidrazina presentes en el medio permiten orientar la reacción en el sentido de la formación de piruvato: la glicina convierte el medio en un medio básico (pH=9) y la hidracina degrada el piruvato formado. Tras realizar una primera lectura, la reacción se inicia por la adición de 6,5  $\mu\text{l}$  de LDH diluida al 1/6 y la segunda lectura se lleva a cabo 90 minutos después de agitar las cubetas.

**Medio de análisis:** 0,75 mM NAD (Roche 10127973001); 0,4 M hidrato de hidracina (Sigma) y 0,4 mM glicina (Sigma)  
**Enzima:** LDH (Roche 10107085001)

### 1.3. Determinación del piruvato

La determinación del piruvato se basa en la transformación del NADH en  $\text{NAD}^+$ . Se mide entonces una disminución del NADH durante la reacción inversa a la del análisis del lactato, igualmente catalizada por la LDH.



Al igual que en las dos determinaciones anteriores, 500  $\mu\text{l}$  de muestra se añaden en una cubeta que contiene 500  $\mu\text{l}$  de medio de análisis estandarizado. Tras agitar y leer en el espectrofotómetro, se inicia la reacción por la adición de 6,5  $\mu\text{l}$  de LDH diluida al 1/20. La cubeta se agita para homogenizar y se realiza la segunda lectura 15 minutos más tarde.

**Medio de análisis:** tampón KPi (50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4; Panreac), 0,2 mM NADH (Sigma)

**Enzima:** LDH (Roche 10107085001)

## 2. Principios de las determinaciones analíticas de los metabolitos intracelulares

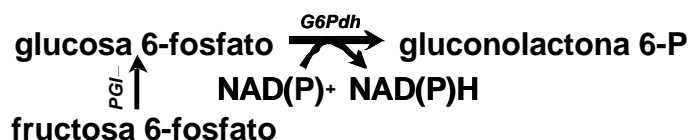
El análisis de los principales intermediarios de la glucólisis/gluconeogénesis se realiza como el de los metabolitos extracelulares presentado previamente, por medio de métodos enzimáticos descritos por Bergmeyer y basados en la transformación del NAD<sup>+</sup> en NADH o viceversa (Bergmeyer, 1974).

La técnica de espectrofluorimetría se utiliza para analizar los metabolitos que se encuentran en concentraciones muy pequeñas ya que es capaz de detectar la fluorescencia de un nanomol de NADH, lo que la convierte en aproximadamente 1000 veces más sensible que la técnica de espectrofotometría. La molécula de NADH o NADPH tiene  $\lambda_{\text{excitación}}$  de 340 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$  de 460 nm. La cantidad de NADH producida o consumida por la reacción estudiada, corresponde a la variación de la altitud del trazado sobre el registrador antes y después de la adición de la enzima. Para cada determinación, se hace una calibración con una cantidad conocida de NADH determinada previamente por espectrofotometría.

**Medio instrumental:** filtros de jeringa 0,22  $\mu\text{m}$  Acrodisc (USA) y espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2500, Tokio (Japón)

### 2.1. Determinación de la glucosa 6-fosfato y de la fructosa 6-fosfato

La determinación de la glucosa 6-fosfato y de la fructosa 6-fosfato se basa en la transformación del NAD<sup>+</sup> en NADH durante dos reacciones sucesivas catalizadas por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PdH) y la fosfoglucoisomerasa (PGI).



La muestra a analizar (60  $\mu\text{l}$ ) se añade en una cubeta de cuarzo que contiene 2 ml de un medio de análisis estandarizado. La cubeta se coloca en el espectrofluorímetro con agitación suave y permanente por medio de un pequeño agitador magnético. Después de la estabilización de la señal, se añade en primer

lugar 10  $\mu$ l de G6PdH NADP-dependiente diluida al 1/10 y cuando esta primera reacción termina, se añade 10  $\mu$ l de PGI diluida al 1/10.

**Medio de análisis:** tampón ETRAM (50 mM TRA-HCl/Sigma; 7,5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /Panreac; 3,75 mM EDTA/Sigma; pH 7,4), NADP (Roche 10128040001), NADH (Sigma)

**Enzimas:** G6PdH-NADP-dependiente (Roche 10127671001) y PGI (Roche 127396)

## 2.2. Determinación de la dihidroxiacetona fosfato

La determinación de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se basa en la transformación del NADH en  $\text{NAD}^+$  durante una reacción catalizada por la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PdH).



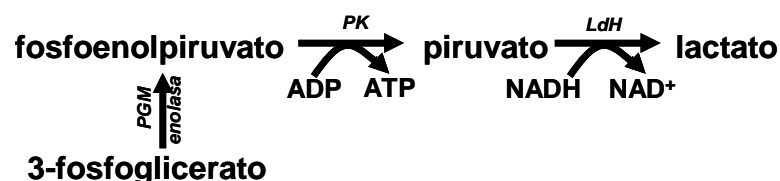
60  $\mu$ l de la muestra se añaden en una cubeta de cuarzo que contiene 2 ml de un medio de análisis estandarizado agitado permanentemente con un agitador magnético. La determinación empieza por la adición de una cantidad conocida de NADH en la cubeta y luego, después de la estabilización de la señal, se añaden 10  $\mu$ l de G3PdH diluida al 1/10. Por último, una vez que la reacción ha terminado, se añade de nuevo el mismo volumen de G3PdH (1/10) para permitir el cálculo de la derivada de la señal debido a la turbidez intrínseca de la enzima.

**Medio de análisis:** tampón ETRAM (50 mM TRA-HCl/Sigma; 7,5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /Panreac; 3,75 mM EDTA/Sigma; pH 7,4), NADP (Roche 10128040001), NADH (Sigma)

**Enzima:** G3PdH (Roche 10127752001)

## 2.3. Determinación del fosfoenolpiruvato y del 3-fosfoglicerato

La determinación del fosfoenolpiruvato (PEP) y del 3-fosfoglicerato (3-PG) se basa en la transformación de NADH en  $\text{NAD}^+$  durante cuatro reacciones sucesivas catalizadas por la fosfoglicerato mutasa (PGM), la enolasa, la piruvato quinasa (PK) y la lactato deshidrogenasa (LDH).



Se añaden 60  $\mu\text{l}$  de la muestra en una cubeta de cuarzo que contiene 2 ml de un medio de reacción estandarizado agitado permanentemente con un agitador magnético. El piruvato se elimina previamente de la muestra por adición de 20  $\mu\text{l}$  de una cantidad conocida de NADH y de 20  $\mu\text{l}$  de una preparación de LDH diluida al 1/10 cuya contaminación por la PK es la más escasa posible. Después de 15 minutos, la reacción empieza por una nueva adición de NADH y después de estabilizarse la señal, se añade 10  $\mu\text{l}$  de PK diluida al 1/10 y 2 mM de ADP. Cuando esta primera reacción acaba, la adición de 10  $\mu\text{l}$  de PGM diluida al 1/100 y de 10  $\mu\text{l}$  de enolasa diluida al 1/5 permite la determinación del 3-PG.

**Medio de análisis:** tampón (20 mM KCl/Sigma; 50 mM TRIS-HCl/Sigma; 27,5 mM  $\text{MgCl}_2$ /Sigma; 3,75 mM EDTA/Sigma; pH 7,4), NADH (Sigma) y ADP (Sigma)

**Enzimas:** LDH (Roche 10107085001), PK (Roche 10128155001), PGM (Sigma) y enolasa (Sigma)

### 3. Cuantificación de los nucleótidos adenílicos

La técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se utiliza para la determinación de los nucleótidos adenílicos: ATP, ADP y AMP, de los compartimientos citosólico y mitocondrial de los hepatocitos perifundidos.

Las muestras a analizar, previamente neutralizadas a un pH entre 6,5 y 7,5 durante las recogidas iniciales, se re-acidifican a un pH cercano a 3 antes de inyectarlas en la columna de HPLC. A pH neutro, dos picos de ATP aparecen porque el  $\text{pK}_a$  de una de las funciones ácidas del ATP es cercano a 6,5 y entonces el ATP existe en dos formas (50% en la forma disociada y 50% en la forma no disociada). En nuestras condiciones, tras el paso por la columna de separación, el tiempo de retención difiere de manera significativa entre los tres compuestos medidos: el ATP es eluido a unos 3 minutos, el ADP a 4 minutos y el AMP a 9 minutos. El tiempo entre cada pico cromatográfico es suficientemente largo para permitir un retorno a la línea de base para cada uno de los compuestos. Esta técnica, a la vez cualitativa y cuantitativa, es muy sensible y se ha demostrado lineal entre 0 y 30 micromoles de ATP.

#### *Principio de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)*

El principio de la HPLC se basa en la separación de las moléculas contenidas en una muestra según sus características físico-químicas (polaridad). La muestra que contiene los nucleótidos a determinar pasa a través de un medio adecuado y sus compuestos se separan, luego se detectan por un espectrofotómetro unido a un registrador-integrador, a una longitud de onda de 254 nm.

La separación se efectúa sobre una fase sólida no polar constituida de una columna llena de sílice, injertada de C 18, termostaticada a 30°C, de 25 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro. Una fase móvil líquida polar la atraviesa a una velocidad de 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Esta fase móvil es un tampón

pirofosfato de sodio 25 mM (pirofosfato de sodio/ácido pirofosfórico) que se ajusta a un pH de 5,75 con una solución saturada en pirofosfato de sodio, luego se filtra con un filtro miliporo de 0.22  $\mu\text{m}$ .

**Reactivos:** Sigma ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , ácido pirofosfórico, acetonitrilo, etanol, ATP, ADP y AMP) y HCl (Panreac)

**Medio instrumental:** Bomba (Gilson), Inyector (Hi-tech Apliccations), Detector (FP-1520, Intelligente Fluorescence Detector, Gilson), Columna (BSD HYPERSIL C18, Thermo Scientific)

**Programa informático:** Biocrom 2000 3.0

## 4. Medida de las actividades enzimáticas

### 4.1. Glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) (Guigas y cols., 2007)

#### Principio



El principio de esta medida se basa en la determinación colorimétrica del fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ) liberado después de la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima G6Pasa según el método de Baginski y colaboradores (Baginski y cols., 1975).

#### Método

La actividad máxima de la G6Pasa se determina en los hepatocitos aislados incubados con Krebs- $\text{Ca}^{++}$  en viales cerrados ( $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) con DHA (20 mM) como sustrato y con los productos a ensayar. Después de 30 minutos de incubación, se extrae una muestra de células y se centrifuga a baja velocidad (1.000 g, 30 s). El sobrenadante se elimina y el precipitado se recoge con una solución de Tris (20 mM; pH 7,3) para inducir un choque osmótico y así liberar la G6Pasa. Una sonicación (15 segundos en el hielo) se realiza también para asegurarse de que la muestra está perfectamente homogeneizada y la enzima liberada de la membrana del retículo endoplasmático. El homogenado obtenido se incuba en viales cerrados durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$  en un medio estandarizado que contiene concentraciones crecientes de G6P (0,5; 1; 2,5; 5; 10 y 20 mM) y con los productos a ensayar, para determinar su “efecto *in vitro*”. Inmediatamente después de la adición del homogenado y también al final de los 10 minutos de incubación, se extrae muestra del vial de incubación y la reacción de hidrólisis de la G6P se para inmediatamente con la precipitación de las proteínas en una solución de ácido perclórico y ascórbico (10% / 2%, p/v) y se conserva en hielo. Posteriormente, la mezcla se centrifuga (13.500 g, 5

min, 4°C) y se conserva en hielo para determinar posteriormente la acumulación del fosfato inorgánico.

De esta forma se puede investigar tanto el efecto “*indirecto*” del producto a ensayar (el producto se añade en la primera incubación) como su efecto “*directo*” (el producto se añade en la segunda incubación).

La actividad de las fosfatasas no específicas se determina en las mismas condiciones por medio de la hidrólisis del  $\beta$ -glicerofosfato en lugar de la G6P.

**Reactivos:** Krebs- $\text{Ca}^{++}$  (solución II aislamiento hepatocitos), DHA (Merck-Schuchardt), Sigma (Trizma-base, G6P,  $\beta$ -glicerofosfato, L-ascórbico), Sacarosa (Panreac) y Ácido perclórico (Fluka)

**Medio instrumental:** centrífuga eppendorf Minispin (Duero Lab, Salamanca) y sonicador (Sartorius, Cabsonic, Alemania)

#### *Determinación del fosfato inorgánico*

El fosfato inorgánico se determina por espectrofotometría. En una cubeta, se añade el molibdato de amonio (1%, p/v) a una muestra del sobrenadante previamente obtenido de las muestras. El complejo fosfomolibdico formado se reduce con el ácido ascórbico a un complejo fosfomolibdoso-molibdico de color azul. La adición casi inmediata del arsenito-citrato (2%, p/v) permite ligar el exceso de molibdato libre. Después de 30 minutos de estabilización, la lectura se efectúa a una longitud de onda de 700 nm frente a un blanco realizado en las mismas condiciones pero después de la inactivación enzimática.

La actividad de la G6Pasa en los homogenados de los hepatocitos se expresa en *nanomoles  $P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de peso seco de hepatocitos o de proteínas*, ya que los niveles de fosfato inorgánico reflejan la cantidad de G6P hidrolizada por la G6Pasa. Una unidad de DO corresponde a 1,027  $\mu\text{moles}$  de fosfato liberado.

**Reactivos:** Sigma (Molibdato de amonio, Na-meta-Arsenito y Na-citrato)

**Medio instrumental:** Espectrofotómetro Specord 205/Analytik Jena Group (Alemania)

#### 4.2. Piruvato quinasa (Detaile y cols., 2008)

##### *Principio*

La determinación de la actividad de la piruvato quinasa se basa en la transformación del NADH en  $\text{NAD}^+$  inducida por la adición al medio celular de

concentraciones crecientes de fosfoenolpiruvato (PEP) (Llorente y cols., 1970; Riou y cols., 1978).



### Método

La actividad máxima de la piruvato quinasa en sus dos isoformas:

no purificada: M-PK predominante en músculo y cerebro  
parcialmente purificada: L-PK, predominante en hígado

se determina en los hepatocitos aislados incubados en viales cerrados ( $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) con DHA (20 mM) como sustrato y con los productos a ensayar. Durante todo el experimento, las muestras se mantienen a una temperatura de  $4^\circ\text{C}$  para evitar la degradación de la enzima.

Después de 30 minutos de incubación, se extrae una muestra de células y se centrifuga a baja velocidad (1000 g, 30 s). El sobrenadante se elimina y el precipitado se recoge con un tampón, denominado A, para ser homogeneizadas rápidamente por sonicación (Ultraturax) durante un minuto con el fin de digerir las células y liberar así la piruvato quinasa sin alterarla ni desnaturalizarla. El homogenado se centrifuga (30000g, 15 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ) y la actividad de la piruvato quinasa no purificada se mide en el sobrenadante.

Para obtener la enzima parcialmente purificada (isoforma L), se añade una muestra del sobrenadante a sulfato de amonio saturado  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se deja durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , luego la mezcla se centrifuga (30000g, 15 minutos,  $4^\circ\text{C}$ ). El precipitado que contiene la forma L-piruvato quinasa se resuspende con el tampón B

**Reactivos:** Krebs- $\text{Ca}^{++}$  (solución II aislamiento hepatocitos), DHA (Merck-Schuchardt), sulfato de amonio (Sigma)

tampón A: 20 mM fosfato de potasio (Panreac), 250 mM sacarosa (Panreac), 1 mM EDTA (Sigma) y 1mM ditiotreitól (Fluka Analytical); pH 7,4

tampón B: 20 mM fosfato de potasio (Panreac), 250 mM sacarosa (Panreac), 30% glicerol (Sigma), 1 mM EDTA (Sigma), 1 mM ditiotreitól (Fluka Analytical) y 50 mM NaF (Sigma); pH 7,4

**Medio instrumental:** centrífuga eppendorf Minispin (Duero Lab, Salamanca), ultraturax (IKA Labortechnik, Alemania) y ultracentrífuga Beckman Optima TL (USA)

### Medida

La medida de la actividad “*in vitro*” de la piruvato quinasa se realiza lo más rápido posible sobre el material fresco. En una cubeta que contiene el tampón C se añade una muestra del sobrenadante que contiene la enzima y se adicionan los siguientes reactivos y enzimas: Mg-ADP, la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH; con el objetivo de degradar todo el piruvato que contenga la muestra antes de iniciar la medida. La actividad o la velocidad de la reacción catalizada por la piruvato quinasa se mide entonces por la adición de cantidades crecientes (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,75; 1,25; 1,75; 2,25 y 4 mM) de PEP a pH 7,4. La desaparición del NADH se evalúa por medida espectrofotométrica a una longitud de onda de 340 nm y se registra durante 2 minutos para poder establecer una pendiente decreciente. La expresión de los valores por la relación de la actividad de la piruvato quinasa a una concentración dada de PEP ( $V$ ) y su actividad máxima a la concentración de 4 mM de PEP ( $V_{\max}$ ) permite normalizar los resultados. La comparación de los resultados expresados por la relación de la actividad  $V_{0,4\text{mM}}/V_{\max}$  permite reflejar exactamente el estado de fosforilación de esta enzima (Claus y cols., 1979).

La actividad de la piruvato quinasa se expresa en *nanomoles·min<sup>-1</sup>·mg<sup>-1</sup> de proteínas*.

**Reactivos:** Sigma (NADH y ADP), PEP (Roche 10108294001), LDH (Roche 10107085001) tampón C: 50 mM TrisHCl (Sigma), 20 mM KCl (Panreac) y 5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Panreac); pH 7,4

**Medio Instrumental:** Espectrofotómetro Specord 205/Analytik Jena Group (Alemania)

### 4.3. Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de la cantidad de proteínas totales en los extractos de hígado se sigue el protocolo del Kit Comercial Colorimétrico “DC Protein Assay” de Bio-Rad Laboratories, basado en el método de Lowry (Lowry y cols., 1951). La reacción se lleva a cabo en placas de 96 pocillos utilizando 5 µl, tanto de muestra como de recta patrón (se realiza con distintas concentraciones de BSA en el tampón de lisis en el que se extraen las proteínas). A continuación se añaden 25 µl del reactivo A (solución alcalina de tartrato de cobre) y 200 µl del reactivo B (reactivo diluido de Folin) (Bio-Rad Laboratorios, Inc., USA.). La mezcla se incuba durante quince minutos, se mide la absorbancia a 720 nm en un lector de placas de ELISA iMark™ Microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) y los resultados se analizan con el programa Microplate Manager® Software (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).



## 5. Técnicas de medida utilizadas con las mitocondrias aisladas

### 5.1. Determinación de la relación ATP/O

*Principio (Fontaine y cols., 1997)*

La relación ATP/O corresponde a la relación entre el flujo de síntesis del ATP y la tasa de consumo de oxígeno en la respiración. Permite evaluar el rendimiento de la fosforilación oxidativa, es decir la eficacia con la cual la energía redox que proviene de la oxidación de los sustratos se convierte en energía que permite la síntesis del ATP. En la práctica consiste en medir simultáneamente los dos flujos. Por ello, es fundamental asegurarse de que la respiración mitocondrial es constante durante el período estudiado.

Para determinar el rendimiento de la fosforilación oxidativa las mitocondrias se incuban a 37 °C en la cámara de oxigrafía junto con los productos a ensayar y mediante la adición de concentraciones crecientes de la enzima hexoquinasa se estimula la respiración y se obtienen diferentes estados estacionarios de fosforilación, en los que se recogen muestras de la suspensión mitocondrial para cuantificar la síntesis de ATP. Estas muestras se ponen inmediatamente en una mezcla de ácido perclórico 10 % y de ácido etilendiamina tetraácetico (EDTA) 25 mM y se mantienen a 4°C para detener así las reacciones enzimáticas. El sobrenadante se neutraliza, se centrifuga y se conserva a 4°C para las determinaciones posteriores.

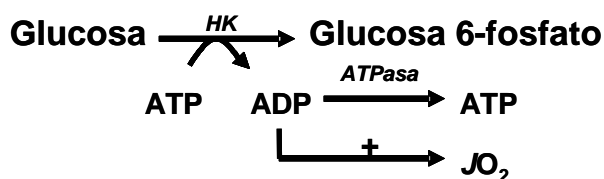
**Tampón utilizado:** idéntico medio al utilizado en la determinación de la respiración en mitocondrias aisladas (3.2.1 de Modelos Experimentales) suplementado con 5 mM Pi-Tris (Panreac), 0,1% de seroalbúmina bovina delipidada (Sigma), 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma), 20 mM glucosa (Panreac), 125 μM ATP (Sigma) y 1 μM rotenona (Sigma)

**Reactivos:** ácido perclórico (Fluka) y EDTA (Sigma)

**Neutralización:** 2M KOH (Panreac) y 0,3 M Acido Morfolinopropanosulfónico (Sigma)

**Medio instrumental:** cámara de oxigrafía (Heito, Francia), electrodo de Clark (OXM 204, Heito, Francia) y registrador (L6512, Linseis, USA)

La producción de ATP se mide de manera indirecta por la medida de la producción de glucosa-6-fosfato:



Así, midiendo los niveles de G6P podemos evaluar la cantidad de ADP formado, que a su vez estimula la respiración y que es teóricamente idéntica a la cantidad del ATP formado por la ATP sintasa.

#### *Determinación de la cantidad de glucosa-6-fosfato (G6P)*

La determinación de la glucosa-6-fosfato se realiza enzimáticamente según el método descrito por Bergmeyer (**Bergmeyer, 1974**). El principio de esta determinación consiste en la transformación de  $\text{NAD}^+$  en NADH que se mide por espectrofotometría. La reacción está catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).



Se recogen 250  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de las muestras neutralizadas y se depositan en 1 ml del medio de determinación. La lectura de la absorbancia ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ ) se hace antes y 20 min después de la adición de la enzima G6PDH (10  $\mu\text{l}$  de la enzima diluida 1/40).

**Medio de análisis:** tampón ETRAM (50 mM TRA-HCl/Sigma; 7,5 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /Panreac; 3,75 mM EDTA/Sigma; pH 7,4) y NAD (Roche 10127973001)

**Enzima:** G6PDH (Roche 10165875001)

**Medio instrumental:** Espectrofotómetro Specord 205/Analytik Jena Group (Alemania)

#### 5.2. Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Votyakova y Reynolds, 2001)

La producción de ROS, concretamente peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), se realiza incubando las mitocondrias (0,25 mg/ml) en 2 ml de volumen del tampón empleado en la medida de la respiración de mitocondrias aisladas, al que se adiciona  $\text{P}_i$  2,5 mM y BSA 0,1 %, los productos a ensayar, 10 unidades/ml de peroxidasa de rábano picante y la sonda fluorescente Amplex Red 2  $\mu\text{M}$ . La producción de ROS se registra durante 5 minutos tras la adición sucesiva de los sustratos respiratorios, rotenona 1,25  $\mu\text{M}$  (como inhibidor del complejo I) y por último, antimicina A 3  $\mu\text{M}$  (inhibidor del complejo III). La adición de rotenona y antimicina A permite cuantificar la producción de ROS por el complejo I y por ambos complejos a la vez (I y III), respectivamente. Esta producción se calcula refiriéndola a un estándar

obtenido con una concentración conocida de  $H_2O_2$  (aproximadamente de 440 picomoles) y se expresa como picomol  $H_2O_2 / min / mg prot.$  El estándar se realiza en presencia de mitocondrias, así se tiene en cuenta también la acción de las defensas antioxidantes endógenas y la posible interacción de la preparación de mitocondrias con la sonda fluorescente.

El **principio** en el que se basa esta medida es el siguiente:

La liberación de  $H_2O_2$  por las mitocondrias se cuantifica mediante espectrofluorimetría empleando una sonda fluorescente: Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxasina). Esta molécula en presencia de peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase) es oxidada por el peróxido de hidrógeno hasta un compuesto fluorescente: la resofurina ( $\lambda_{excitacion} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{emision} = 584 \text{ nm}$ ). Por lo tanto, durante la medida se monitoriza la velocidad de producción de  $H_2O_2$  monitorizando la fluorescencia emitida a 594 nm.

**Tampón utilizado:** idéntico medio al utilizado en la determinación de la respiración en mitocondrias aisladas (3.2.1 de Modelos Experimentales) suplementado con 2,5 mM Pi-Tris (Panreac), 0,1% de seroalbúmina bovina delipidada (Sigma)

**Reactivos:** Sigma (rotenona, peroxidasa), antimicina A (Fluka), amplex red (Biochemika), succinato, malato y glutamato,  $H_2O_2$  (Sigma)

**Medio instrumental:** espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2500, Tokio (Japón); tratamiento de los datos mediante el programa programa FL Solutions 2.0 (Hitachi)

### 5.3. Medida de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales (Lacraz y cols., 2008)

La determinación de la actividad de los complejos respiratorios (I, II y III) se realiza con mitocondrias aisladas a partir de hígados de ratas macho Wistar, de acuerdo al procedimiento expuesto en el punto de 2 de técnicas experimentales de esta sección. Antes de comenzar con la medida propiamente dicha, se somete a las mitocondrias a tres ciclos de congelación-descongelación para tener la certeza de que la membrana mitocondrial externa se ha roto facilitando, de esta manera, el acceso de los sustratos a los complejos respiratorios. Las medidas se realizan espectrofotométricamente en cubeta termostaticada a una temperatura determinada bajo agitación.

**Medio instrumental:** Espectrofotómetro Specord 205/Analytik Jena Group (Alemania), baño con termostato de Selecta (España)

### *5.3.1 Medida de la actividad del complejo I: NADH-ubiquinona oxido-reductasa*

24  $\mu\text{g}$  de mitocondrias hepáticas se depositan sobre 2 ml de tampón de análisis 37 °C y en agitación, sobre los que también se añaden 3,75 mg/ml de albúmina delipidada, 100  $\mu\text{M}$  de NADH (donador de  $e^-$ ) y 100  $\mu\text{M}$  de decilubiquinona (aceptor de  $e^-$ ). La oxidación del NADH se monitoriza mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. La posterior adición de 10  $\mu\text{M}$  de rotenona permite sustraer la derivada asociada a la oxidación del NADH no específica a la actividad del complejo I. La actividad del complejo I se calcula mediante el coeficiente extinción molar del NADH ( $6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) y la velocidad de disminución de la absorbancia a 340 nm.

**Tampón utilizado:** tampón KPi 50 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,5; Panreac) a 37 °C

**Reactivos:** Sigma (seroalbúmina bovina delipidada, rotenona, decilubiquinona), NADH (Roche)

### *5.3.2 Medida de la actividad del complejo II: succinato-ubiquinona oxidorreductasa*

Esta actividad se determina mediante la transferencia de  $e^-$  desde el succinato (donador de  $e^-$  al complejo II) hacia la decilubiquinona (receptor de  $e^-$ ) y de ésta hasta DCIP (dicloroindofenol). El DCIP es un aceptor de  $e^-$  artificial, cuya absorbancia máxima se obtiene a una  $\lambda$  de 600 nm. De la misma forma que en el complejo I, 24  $\mu\text{g}$  de mitocondrias hepáticas se añaden al tampón de análisis (el mismo que el utilizado en el complejo I y a la misma temperatura de 37 °C), el cual lleva añadido 3,75  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de albúmina delipidada, 30 mM de succinato, 50  $\mu\text{M}$  de decilubiquinona, 100  $\mu\text{M}$  de DCIP, 9,3  $\mu\text{M}$  de antimicina A et 5  $\mu\text{M}$  de rotenona. Gracias a la rotenona y a la antimicina A se bloquea la transferencia de  $e^-$  desde la decilubiquinona hasta el complejo I y III, respectivamente, obligando así a los  $e^-$  a ser capturados por el DCIP. La bajada de la absorbancia monitorizada durante 2 minutos a 600 nm y el coeficiente de extinción molar del DCIP ( $19,1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) permiten calcular la actividad de este complejo II mitocondrial.

**Tampón utilizado:** tampón KPi 50 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,5; Panreac) a 37 °C

**Reactivos:** Sigma (seroalbúmina bovina delipidada, rotenona, decilubiquinona, DCIP, succinato), antimicina A (Fluka)

### *5.3.3 Medida de la actividad del complejo III: complejo bc1 (ubiquinol-citocromo c reductasa)*

La actividad del complejo III se monitoriza antes y después de la adición de su inhibidor (antimicina A) sobre 2 ml del medio de análisis que contiene 10  $\mu\text{g}$  de mitocondrias hepáticas, 1 mg/ml de albúmina delipidada, 50  $\mu\text{M}$  EDTA, 1 mM

KCN, 10  $\mu\text{M}$  citocromo c oxidado y 105,6  $\mu\text{M}$  decilubiquinona reducida. Antes de iniciar la medida es necesario reducir toda la decilubiquinona, mediante el ditionito de sodio, transformándola así en un excelente donador de  $e^-$  hacia su aceptor natural en la cadena de transporte mitocondrial, el citocromo c. De esta manera gracias al KCN (inhibidor del complejo IV), se registra el aumento de la absorbancia a 550 nm ( $\lambda$  de máxima absorbancia del citocromo c) y la actividad del complejo III se calcula utilizando el coeficiente máximo de absorbancia de este compuesto ( $18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

**Tampón utilizado:** tampón KPi 100 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,5; Panreac) a 30 °C

**Reactivos:** Sigma (seroalbúmina bovina delipidada, decilubiquinona, EDTA, KCN, citocromo C, ditionito de sodio), antimicina A (Fluka)

## **6. Medida de la capacidad de retención de calcio (CRC) (Walter y cols., 2000)**

La capacidad retención de calcio se estima por la cantidad total de calcio acumulada por la mitocondria antes del pulso de calcio que supone la apertura del poro de transición mitocondrial y por lo tanto, la liberación total del calcio. Esta medida se realiza mediante adiciones sucesivas de cantidades fijas de calcio (inductor de la apertura del poro de transición mitocondrial) a una suspensión de mitocondrias. Los picos del calcio se monitorizan gracias a un espectrofluorímetro y a una sonda fluorescente de calcio extra-mitocondrial: Calcium green-5N ( $\lambda_{\text{excitación}} = 506 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$ ). La fluorescencia emitida corresponde únicamente al calcio que hay fuera de la mitocondria, porque la sonda no puede difundir a través de las membranas. Por lo tanto, a cada adición de un pulso de calcio se va a observar un aumento en la fluorescencia (pico), que luego disminuye a medida que el calcio es captado por las mitocondrias.

La cantidad de calcio utilizado para observar este fenómeno, expresado por *mg de proteínas*, corresponde al CRC.

**Tampón utilizado:** 250 mM sacarosa (Panreac), 10 mM MOPS (Sigma) y 1 mM  $\text{P}_i$  ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) (Panreac); pH 7,4

**Reactivos:** Calcium green-5N (Invitrogen),  $\text{CaCl}_2$  (Sigma)

**Medio instrumental:** espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2500, Tokio (Japón); tratamiento de los datos mediante el programa programa FL Solutions 2.0 (Hitachi);  $\lambda$  de excitación: 506 nm;  $\lambda$  de emisión: 526 nm

### 6.1 Medida de CRC en mitocondrias hepáticas

Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban a temperatura ambiente en 2 ml de un tampón estandarizado al que se añade en cada punto de medida succinato/malato (5/2,5 mM) como sustrato respiratorio, los productos a investigar y 2 $\mu\text{M}$  Calcium-

green-5N como sonda fluorescente. Se inicia la medida y tras estabilización de la señal, se añaden pulsos de calcio ( $\text{CaCl}_2$  5 mM) de 25  $\mu\text{M}$  con intervalos de 1 minuto hasta que se observa la liberación del calcio mitocondrial inducido por los pulsos aplicados.

#### 6.2 Medida de CRC en hepatocitos permeabilizados

Los hepatocitos (10 mg/ml) se incuban durante 30 minutos en 2 ml de solución I empleada en su aislamiento (ver **técnica experimental de aislamiento de hepatocitos**), sobre la que se añade DHA 20 mM como sustrato y los productos a ensayar. Después de la incubación, se recogen 15 mg de hepatocitos, se centrifugan 30 segundos a 1000 g y se resuspenden con 2 ml del tampón estandarizado para esta técnica. Los hepatocitos se permeabilizan por acción de la digitonina (20 mg/ml) adicionada en la cubeta del espectrofluorímetro, junto con 2 ml del tampón de análisis, succinato/malato (5/2,5 mM) como sustrato respiratorio, los productos a ensayar y Calcium-green-5N 2 $\mu\text{M}$  como sonda fluorescente. La determinación de CRC es idéntica al protocolo descrito con mitocondrias aisladas, a excepción de que los pulsos de calcio empleados con los hepatocitos permeabilizados son de 12,5  $\mu\text{M}$ .

**Reactivos:** digitonina (Sigma)

## **V. Tratamiento estadístico**

Para todos los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM), de forma que los valores se expresan como media  $\pm$  EEM.

Para determinar las diferencias significativas entre dos grupos de resultados, se ha aplicado el test de la "t" de Student. Consideramos significativo un valor de  $p < 0.05$ . La diferencia entre los niveles de significación estadística se representó de la manera siguiente, según cada caso: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Para el análisis estadístico se utilizó un Programa de cálculo Excel 2007 (Microsoft Windows XP Home Edition).

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
iNVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MiTÓCONDRIALES DiRECTAS  
DE DOS TIAZOLiDiONAS, PiOGLiTAZONA Y ROSiGLiTAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

*RESVLTADOS*  
*PRiMERA PARTE*

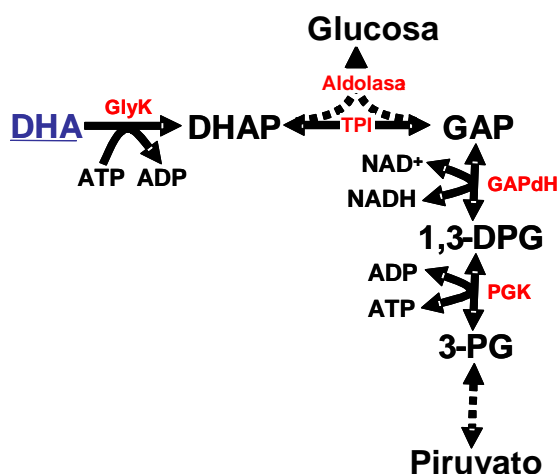
**EFFECTOS DiRECTOS DE LAS GLiTAZONAS,  
PiOGLiTAZONA Y ROSiGLiTAZONA,  
SOBRE EL METABOLiSMO HEPÁTICO**



# 1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS METABÓLICOS GLOBALES DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA A PARTIR DE DISTINTOS SUSTRATOS EN HEPATOCITOS DE RATA EN PERIFUSIÓN

## 1.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global de DHA

La dihidroxiacetona (DHA), aunque no es un sustrato fisiológico, constituye una herramienta de primera elección en el estudio del metabolismo hepático ya que sus carbonos utilizan simultáneamente las vías de la gluconeogénesis y de la glucólisis en función del estado energético celular. La DHA se transporta al interior celular por difusión simple en función del gradiente de concentración entre una y otra parte de la membrana plasmática. Una vez allí, es fosforilada por la glicerol quinasa (GlyK). Esta enzima tiene la particularidad de que aunque se produzca una acumulación de su producto (DHAP), esta situación no ejerce un retrocontrol negativo sobre la enzima. El control del metabolismo de la DHA se efectúa en varias etapas dependientes del estado energético celular (asimilado a la relación ATP/ADP citosólico) que son la fosforilación del sustrato por la GlyK, la etapa catalizada por la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK) y la catalizada por la PK (Leverve y cols., 1994b). Por todas estas razones, decidimos comenzar la investigación de los efectos rápidos y directos de pioglitazona (PIO) o rosiglitazona (ROSI) utilizando DHA como sustrato energético. Además, el uso de la DHA nos permite estudiar al mismo tiempo la gluconeogénesis y la glucólisis midiendo, respectivamente, la producción de glucosa ( $J_{\text{Glucosa}}$ ), de lactato+piruvato ( $J_{\text{Lactato+Piruvato}}$ ) y la cantidad total de DHA metabolizada ( $J_{\text{DHA}} = J_{2\text{GLP}} = 2 \times J_{\text{Glucosa}} + J_{\text{Lactato+Piruvato}}$ ; ya que el lactato y el piruvato son triosas mientras que la glucosa es una hexosa).



**Figura 1. Esquema resumen del metabolismo de la DHA**

ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; DHA: dihidroxiacetona; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; 1,3-DPG: 1,3 difosfoglicerato; 3-PG: 3-fosfoglicerato; GlyK: glicerol quinasa; GAP: gliceraldehído 3-fosfato; GAPdH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido; PGK: fosfoglicerato quinasa; TPI: triosa fosfato isomerasa

La base técnica y la forma de realizar el experimento fue la misma tanto para este “experimento tipo” a partir de DHA, así como para todos aquellos en los que empleamos otros sustratos energéticos (fructosa, lactato+piruvato y glicerol). Utilizando el modelo experimental de hepatocitos en perfusión (explicado en la *Sección de Material y Métodos*), realizamos titración de hepatocitos de rata perfundidos con el sustrato energético correspondiente a concentraciones sub-saturantes crecientes, en ausencia (p.e. cámara de perfusión 1) o en presencia (p.e. cámara de perfusión 2) de PIO o ROSI a la dosis de 25  $\mu$ M. Las dos glitazonas se disolvieron en un vehículo constituido por dimetilsulfóxido (DMSO) y agua (ambos al 50 %) y se infundieron a una velocidad de 5 ml/h. En la cámara control se infundió el vehículo en el que disolvimos los fármacos a la misma velocidad que la utilizada con las glitazonas.

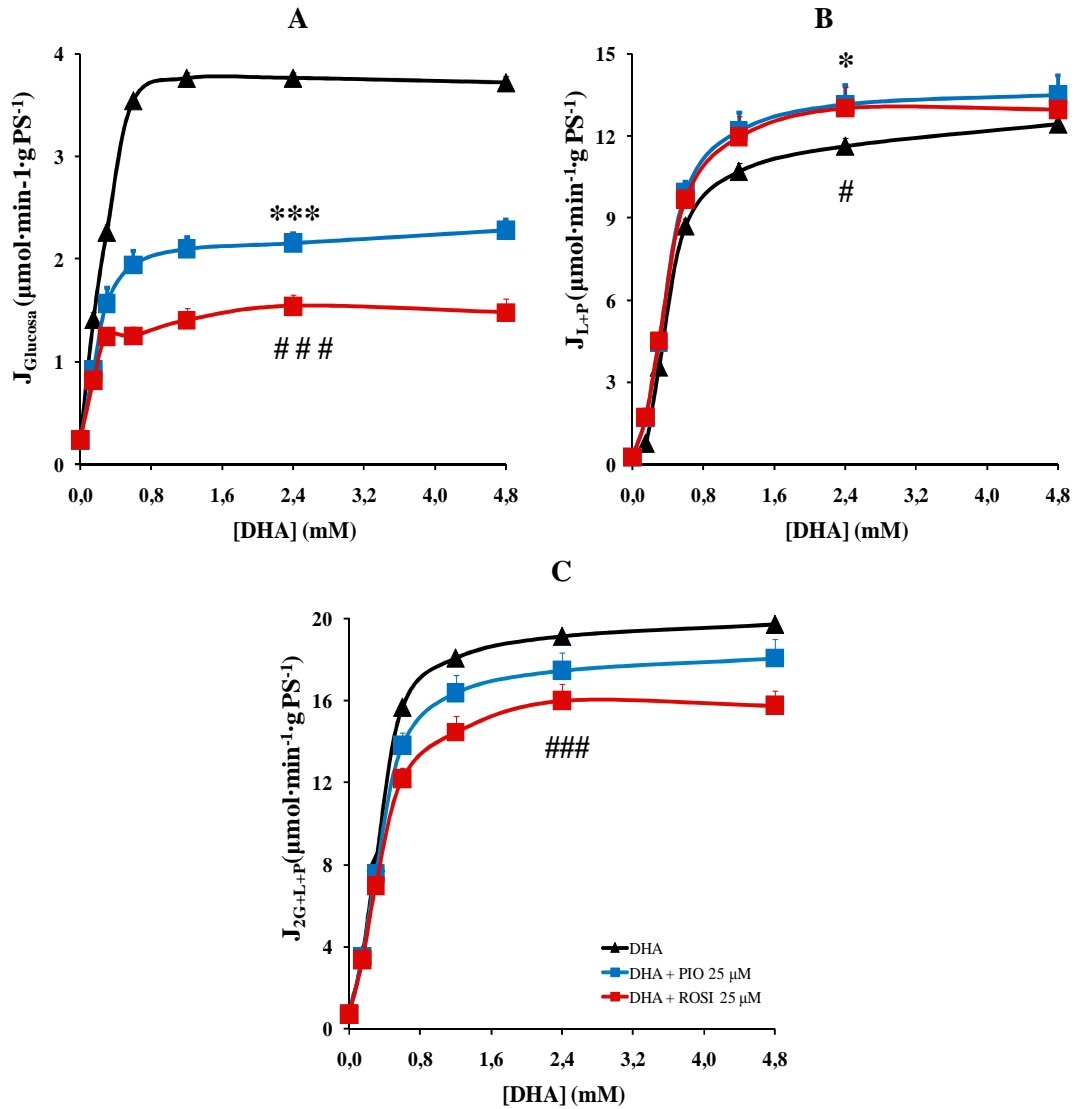
Las dos glitazonas inhiben significativamente la gluconeogénesis y activan, también significativamente, el flujo glucolítico. Tanto la inhibición de la gluconeogénesis, como la activación de la glucólisis, se mantuvieron en valores constantes a partir de una concentración de DHA de 0,6 M. Por encima de esta concentración de sustrato, la producción de glucosa mediante gluconeogénesis disminuyó en un 38% por acción de PIO y en un 47 % cuando se infundió ROSI, frente a los valores obtenidos en la cámara de perfusión control donde se infundió el vehículo (**figura 2A**). Como se puede observar claramente, la ROSI inhibió de manera más potente el flujo gluconeogénico que la PIO. Por el contrario, ambos fármacos activaron el flujo glucolítico  $J_{\text{Lactato+Piruvato}}$  de manera muy similar, concretamente, en un 12% la PIO y un 13% la ROSI (**figura 2B**). Como resultado de esta inhibición de la gluconeogénesis y activación de la glucólisis por parte de los dos antidiabéticos, el metabolismo total de la glucosa disminuyó ligeramente: un 9% cuando se utilizó PIO y un 16% cuando ROSI fue la glitazona estudiada (**figura 2C**). La inhibición de  $J_{\text{DHA}}$  por parte de la ROSI fue significativa respecto a la cámara control, mientras que la inhibición obtenida con PIO no llegó a alcanzar una significación respecto a los valores control.

Como se puede observar claramente en la **figura 2A**, ROSI es un inhibidor de la gluconeogénesis hepática más potente que PIO (47% frente a 38%). La posología de los dos agentes para el tratamiento de los diabéticos tipo 2 es diferente:

- el tratamiento con ROSI se suele iniciar con 4 mg al día y esta posología se puede aumentar hasta 8 mg diarios para conseguir un mejor control glucémico

- sin embargo, el tratamiento con PIO se inicia con 15 mg ó 30 mg diarios y se puede incrementar hasta los 45 mg al día

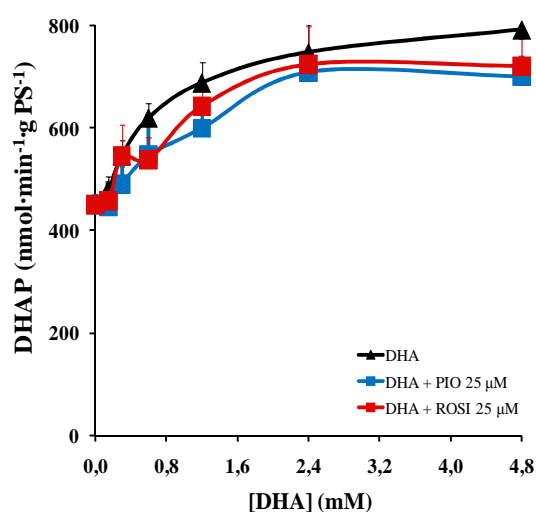
Para alcanzar un control glucémico adecuado y similar con ambos fármacos, la posología de ROSI es notablemente menor que la empleada con PIO. Gracias a nuestra investigación podemos concluir que, esta diferencia entre ambas glitazonas a largo plazo también la encontramos a corto plazo cuando trabajamos con los dos agentes a la misma concentración (25µM), utilizando hepatocitos de rata en perfusión.



**Figura 2. Inhibición del metabolismo de la DHA en hepatocitos de rata perfundidos con 25  $\mu$ M de pioglitazona o rosiglitazona**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) se aislaron de ratas Wistar en ayunas durante 24h y fueron perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la sección de "Material y Métodos". Después de un primer estado estacionario sin sustrato exógeno, la DHA se perfundió en ambas cámaras a concentraciones crecientes (0,15; 0,30; 0,60; 1,20; 2,40 y 4,80 mM). PIO 25  $\mu$ M (■) o ROSI 25  $\mu$ M (■) se perfundieron continuamente en una de las dos cámaras y se comparó con la otra cámara control donde se perfundió sólo el vehículo (▲). El flujo de la gluconeogénesis ( $J_{\text{Glucosa}}$ ), que mostramos en la **figura A**, se calculó a partir de la concentración de glucosa. En la **figura B** mostramos el flujo de la glucólisis ( $J_{\text{L+P}}$ ), calculado a partir de las concentraciones de lactato más piruvato. El metabolismo total de la DHA ( $J_{\text{2G+L+P}}$ ) mostrado en la **figura C** se expresa en forma de equivalentes de 3 carbonos mediante la suma de 2 moléculas de glucosa+lactato+piruvato. Los resultados se expresan como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de: n=18 preparaciones distintas de hepatocitos para la situación control, n=18 para PIO y n=18 para ROSI. \*\*\*p<0,001; \*p<0,05 valores de PIO respecto a los control a la concentración de DHA correspondiente. ###p<0,001; #p<0,05 valores de ROSI respecto a los control

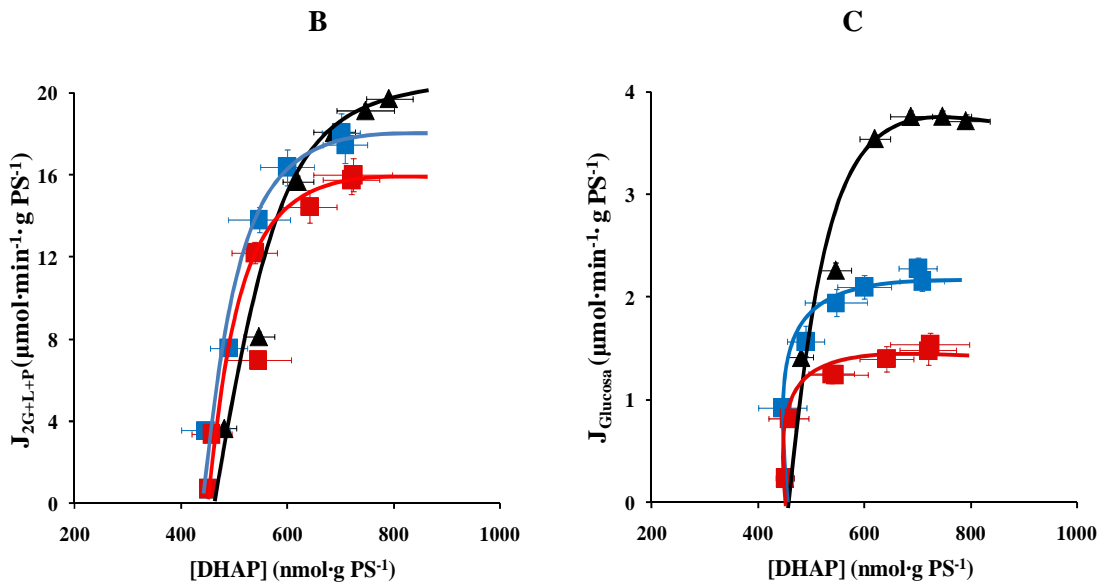
La gluconeogénesis y la glucólisis constituyen vías metabólicas comunes de la DHA después de su fosforilación, por lo tanto, el mayor porcentaje de inhibición de la gluconeogénesis respecto al de activación de la glucólisis encontrado en la acción de estas dos glitazonas podría deberse a un efecto localizado en el primer paso de la fosforilación de la DHA, lo cual se corresponde con la inhibición obtenida por la acción de estos fármacos sobre el metabolismo global de la DHA. Como se puede observar en la siguiente figura (**figura 3A**), las dos glitazonas a la dosis investigada, disminuyen ligeramente y de forma no significativa la concentración de DHAP: un 12% la pioglitazona y un 13% la rosiglitazona. En este caso, la concentración de DHAP debe disminuirse por efecto de estas dos glitazonas a partir del segundo estado estacionario, sugiriendo una menor fosforilación de la DHA.

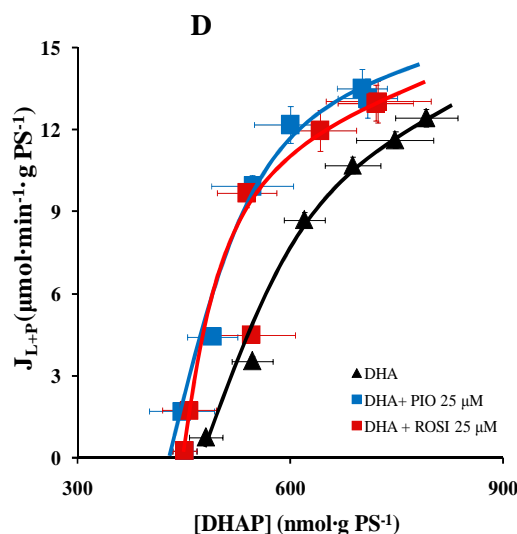


**Figura 3A. Efecto de PIO y ROSI sobre la producción de DHAP a partir de DHA.**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno, en presencia de DHA, con PIO 25  $\mu$ M (■), ROSI 25  $\mu$ M (■) o su vehículo (▲), tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 2**. En cada estado estacionario, se recogieron muestras de células de las cámaras y se centrifugaron a través de una capa de aceite de acuerdo a como se ha descrito en la sección de "Material y Métodos". Las concentraciones intracelulares de DHAP se midieron en la fracción celular neutralizada.

Según la anterior hipótesis expuesta, la relación entre DHAP y el flujo metabólico global de DHA no debería verse afectada. Sin embargo, esto no es lo que obtuvimos en los experimentos siguientes. Tal como observamos en las siguientes figuras, tanto PIO como ROSI inducen una modificación de la relación entre la concentración de DHAP y  $J_{DHA}$ , de manera que, para una concentración determinada de DHAP,  $J_{DHA}$  disminuye por efecto de los dos fármacos de forma dosis dependiente (**figura 3B**). Este resultado nos indica que los dos antidiabéticos ejercen también un efecto más allá de la etapa de la fosforilación de la DHA, tanto en las rutas gluconeogénicas como en las glucolíticas. De acuerdo al efecto observado en el caso del flujo gluconeogénico (**figura 2A**) en los experimentos iniciales realizados utilizando hepatocitos en perfusión, encontramos que el efecto inhibitorio de ROSI sobre la gluconeogénesis era mayor que el encontrado en el caso de PIO (47% frente a un 38%). Esta diferencia hallada entre ambas glitazonas concuerda con el efecto de ambas localizado más allá de la fosforilación inicial de la DHA, ya que el porcentaje de inhibición de ambas en este punto fue similar. Nuestra hipótesis se explica más claramente gracias a las **figuras 3C** y **3D**, con las que se demuestra que PIO y ROSI fueron responsables de una inhibición entre DHAP y la producción de glucosa (**Figura 3C**) y de una activación entre DHAP y la formación de lactato+piruvato (**Figura 3D**).





**Figura 3. Efecto de PIO y ROSI sobre la producción de DHAP: relación con el metabolismo global de la DHA, la producción de glucosa y de lactato+piruvato**

Continuando con lo descrito en la leyenda de la **figura 3A**. La **figura 3B** muestra el efecto de PIO 25  $\mu\text{M}$  (■) ó ROSI 25  $\mu\text{M}$  (■) sobre el metabolismo de la DHA más allá de la DHAP; la **figura 3C** muestra el efecto de las dos glitazonas sobre la gluconeogénesis más allá de la DHAP y por último, la **figura 3D** muestra el efecto de ambos antidiabéticos sobre la glucólisis más allá de la DHAP. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=6 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de antidiabético.

La gluconeogénesis hepática se controla, entre otros factores, por los distintos precursores gluconeogénicos procedentes de los tejidos extrahepáticos como el lactato, el piruvato, el glicerol y algunos aminoácidos, como la alanina. A esta lista de sustratos gluconeogénicos se le puede añadir la fructosa que es un azúcar que se ingiere en la dieta de forma frecuente y que es capaz de formar glucosa muy rápidamente. Por tanto, el flujo de la gluconeogénesis que se obtiene a partir de estos sustratos es diferente debido a que entran en las vías metabólicas de la GNG a distintos niveles. La fructosa entra al nivel medio de la ruta gluconeogénica y glucolítica mientras que el lactato, el piruvato y la alanina entran al nivel inicial de la GNG, a nivel de la piruvato carboxilasa.

Dado que la dihidroxiacetona no es un sustrato fisiológico, decidimos investigar si el efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo de DHA, observado anteriormente, se obtiene también en presencia de otros tres sustratos gluconeogénicos que son: la fructosa, el glicerol y el lactato/piruvato.

## 1.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global de la fructosa

Debido a su complejo metabolismo (figura 4), está bastante mal caracterizado el control de la gluconeogénesis a partir de la fructosa, aunque probablemente se divide en varias etapas. El transporte de la fructosa en el hepatocito constituye una primera etapa susceptible de control y se efectúa por medio de un transportador específico y también por GLUT2 (Okuno y Gliemann, 1986). Sin embargo, las características cinéticas de estos transportadores ( $K_m$  alta) hacen que la entrada de la fructosa en la célula dependa estrechamente de su concentración extracelular y no sea limitante (Sestoft y Fleron, 1974). Después de la fosforilación de la fructosa en F1P por la fructoquinasa, la escisión de esta última por la aldolasa forma la DHAP que es parte integrante de la vía de la glucólisis/gluconeogénesis y forma también el gliceraldehído (GA), que puede utilizar varias vías diferentes en función del estado redox o energético de la célula (Grivell y cols., 1991).

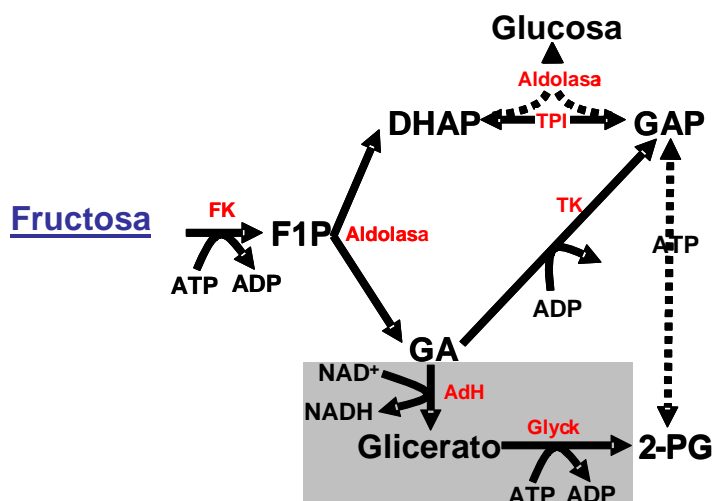


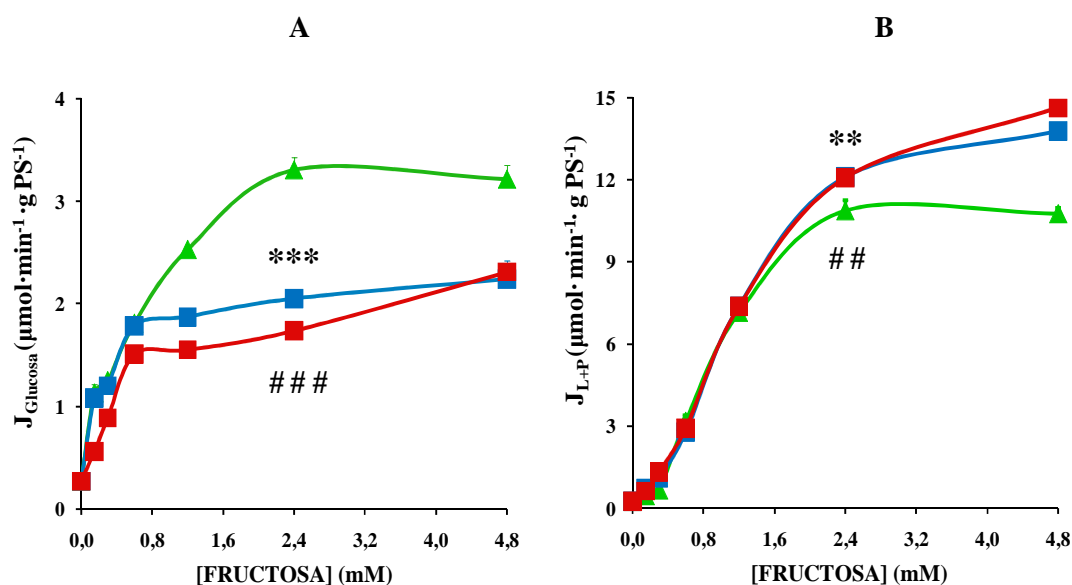
Figura 4. Esquema resumen del metabolismo de la fructosa

AdH: alcohol deshidrogenasa; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; FK: fructoquinasa; F1P: fructosa 1-fosfato; GAP: gliceraldehído 3-fosfato; GA: gliceraldehído; GlycK: glicerato quinasa; 2PG: 2-fosfoglicerato; NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido; TK: trioquinasa; TPI: triosa fosfato isomerasa

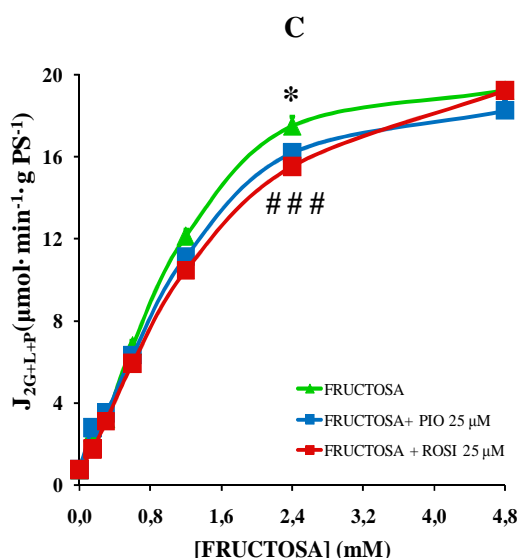
Dado que el uso de fructosa implica una disminución importante de la concentración de ATP y de la relación ATP/ADP citosólica, así como una acumulación intracelular de F1P (Woods y cols., 1970), es muy probable que las etapas moduladas por los efectores del *ciclo de las "fructosas" y de las "glucosas"* desempeñen un papel muy importante en el control del metabolismo a partir de este sustrato.

Como me mencionamos al comienzo del apartado anterior (1.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global de DHA), realizamos perfusión de hepatocitos con

distintos sustratos, en este caso fructosa, de acuerdo al modelo experimental de hepatocitos en perfusión explicado detalladamente en la *Sección de Material y Métodos*. La titración de hepatocitos de rata perfundidos se llevó a cabo a concentraciones sub-saturantes crecientes de fructosa, en ausencia o en presencia de PIO ó ROSI 25  $\mu$ M. Obtuvimos unos resultados muy parecidos a los obtenidos cuando el sustrato elegido fue DHA. La inhibición de la gluconeogénesis obtenida fue de un 38% en el caso de PIO y de un 47% cuando trabajamos con ROSI, en ambos casos la inhibición fue significativa. Al igual que cuando se empleó DHA como sustrato, los dos fármacos a la misma concentración no inhibieron con igual fuerza la producción de glucosa hepática: la inhibición de la gluconeogénesis que produce ROSI es mayor que la obtenida con PIO (**figura 5A**). Con fructosa, PIO y ROSI activaron significativamente el flujo glucolítico en un 11% (porcentaje de activación similar al obtenido con DHA) (**figura 5B**). Como consecuencia, el metabolismo global de la DHA se inhibió con PIO en un 7% y en un 11% con ROSI (**figura 5C**).



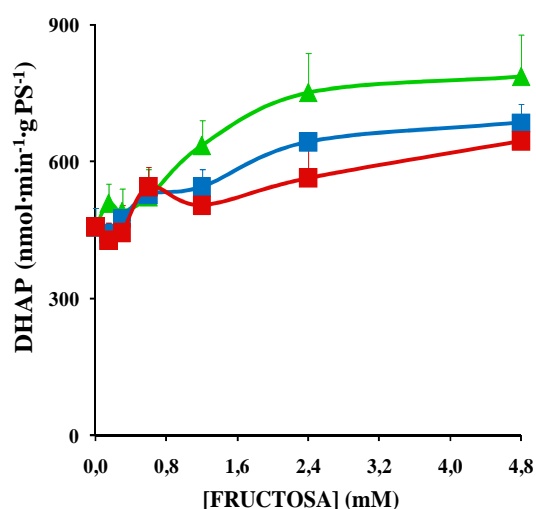




**Figura 5. Inhibición del metabolismo de la fructosa en hepatocitos de rata perfundidos con 25  $\mu\text{M}$  de pioglitazona o rosiglitazona**

Leyenda idéntica a la de la **figura 2**, pero usando fructosa en lugar de DHA como sustrato energético. La PIO 25  $\mu\text{M}$  (■) ó la ROSI 25  $\mu\text{M}$  (■) se infundieron de manera continua en una cámara y se compararon con la cámara control donde se infundió sólo el vehículo (▲). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM de: n=15 preparaciones distintas de hepatocitos para la situación control, n=15 para PIO y n=15 para ROSI. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05 valores de PIO respecto a los control a la concentración de fructosa correspondiente. ### p<0,001; ## p<0,01; # p<0,05 valores de ROSI respecto a los control a la concentración de fructosa correspondiente

Para investigar la (s) etapa (s) implicada (s) en la inhibición de la gluconeogénesis y en la activación de la glucólisis por PIO y ROSI a partir de fructosa, al igual que hicimos en el caso del sustrato DHA, analizamos la concentración intracelular de DHAP y la representamos frente a los flujos gluconeogénicos ( $J_{Glucosa}$ ) o glucolíticos ( $J_{L+P}$ ) correspondientes en cada estado estacionario. La gluconeogénesis y la glucólisis constituyen también vías metabólicas comunes de la fructosa, por lo tanto, la inhibición del metabolismo global de la fructosa podría deberse, por lo menos en parte, a un efecto localizado en el primer paso de la fosforilación de la fructosa. En este caso, la concentración de DHAP en un estado estacionario determinado debe ser disminuida por el efecto de las dos tiazolidindionas. Según podemos observar en la figura siguiente (**figura 6**), a partir de una concentración de fructosa de 1,2 mM, PIO inhibió la formación de DHAP en un 14% y ROSI en 21%. No obstante, la inhibición obtenida no fue significativa con ninguno de los dos medicamentos. Esta mayor inhibición en la formación de DHAP producida por ROSI se puede relacionar con la mayor inhibición sobre la gluconeogénesis que con este sustrato, al igual que con DHA, ejerce ROSI respecto a PIO.



**Figura 6. Efecto de PIO y ROSI sobre la producción de DHAP a partir de fructosa.**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno, en presencia de fructosa, con PIO 25 μM (■), ROSI 25 μM (■) o su vehículo (▲), tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 2**. En cada estado estacionario, se recogieron muestras de células de las cámaras y se centrifugaron a través de una capa de aceite de acuerdo a como se ha descrito en la sección de “*Material y Métodos*”. Las concentraciones intracelulares de DHAP se midieron en la fracción celular neutralizada. Los resultados se expresan como media ± EEM; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos.

Según esta hipótesis, la relación entre DHAP y el flujo metabólico global de fructosa ( $J_{2GLP}$ ) no debería verse afectada por acción de ambos antidiabéticos. Sin embargo, al igual que ocurrió en los experimentos en los que empleamos DHA como sustrato, observamos claramente que PIO y ROSI provocaron una modificación de la relación entre la DHAP y el  $J_{2GLP}$ , de manera que para una concentración determinada de DHAP,  $J_{2GLP}$  disminuyó por efecto de estos dos antidiabéticos. Este resultado indica que estos fármacos ejercen también un efecto más allá de la etapa de la fosforilación de la fructosa tanto en las rutas gluconeogénicas como en las glucolíticas. Lo cual se pone de manifiesto cuando representamos el flujo gluconeogénico y el glucolítico frente a la concentración de DHAP, donde se aprecia que PIO y ROSI son responsables de una inhibición en estas dos relaciones. *La relación entre la concentración de DHAP y los flujos glucolíticos, gluconeogénicos y el metabolismo global de la fructosa las exponemos más adelante en el apartado ANEXO-AMPLIACIÓN DE RESULTADOS (figuras 1A, B y C)*

### 1.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global del glicerol

El transporte intracelular del glicerol aún está mal caracterizado (Lin, 1977), sin embargo, no parece ejercer ningún control sobre su metabolismo. El glicerol entra en la vía de la glucólisis/gluconeogénesis al mismo nivel que la DHA y su metabolismo difiere de esta última solamente por la presencia de una etapa adicional entre su fosforilación por la GlyK y la DHAP (figura 7). Esta etapa consiste en la oxidación del G3P en DHAP catalizada por la isoforma citosólica de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PdH) y requiere la presencia de  $\text{NAD}^+$  como cofactor. Como el flujo a través de la GlyK sólo se limita por bajadas importantes de la relación ATP/ADP citosólica, el control de la gluconeogénesis a partir del glicerol se efectúa mayoritariamente por la etapa de la G3PdH dependiente del potencial redox citosólico (relación  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ) (Berry y cols., 1973). En presencia de glicerol, la reoxidación de los equivalentes reducidos se efectúa mayoritariamente por medio de la lanzadera G3P/DHAP, estrechamente vinculada a la cadena respiratoria por la isoforma mitocondrial de la G3PdH.

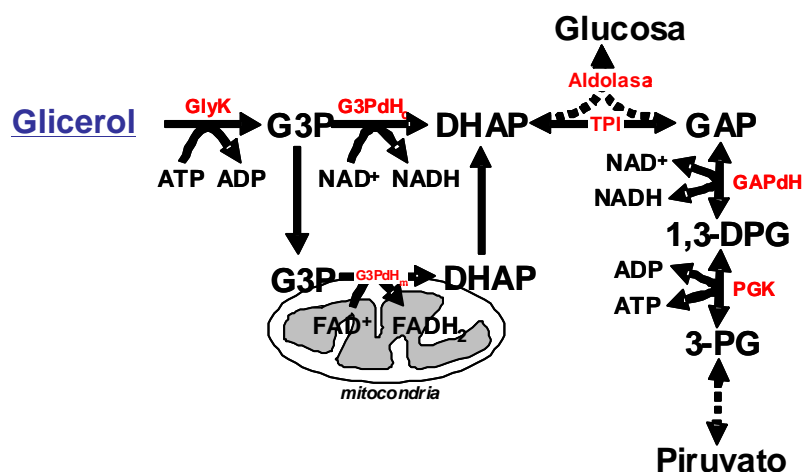


Figura 7. Esquema resumen del metabolismo del glicerol

ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; DHA: dihidroxiacetona; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; 1,3-DPG: 1,3 difosfoglicerato; 3-PG: 3-fosfoglicerato; GlyK: glicerol quinasa; GAP: gliceraldehído 3-fosfato; GAPdH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; G3PdHc: glicerol 3-fosfato deshidrogenasa citosólica; G3PdHm: glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial; G3P: glicerol 3-fosfato;  $\text{NAD}^+$ : nicotinamida adenina dinucleótido oxidado;  $\text{NADH}$ : nicotinamida adenina dinucleótido reducido; PGK: fosfoglicerato quinasa; TPI: triosa fosfato isomerasa.

Utilizando glicerol como sustrato energético realizamos titración de hepatocitos de rata perifundidos a concentraciones sub-saturantes crecientes del sustrato, en ausencia o en presencia de PIO y ROSI a la dosis de  $25 \mu\text{M}$ , tal y como hicimos anteriormente con DHA y fructosa. Los resultados obtenidos con este sustrato

concuerdan con los anteriores: las dos glitazonas actúan significativamente sobre el metabolismo hepático, inhibiendo la gluconeogénesis (figura 8A), activando la glucólisis (figura 8B) e inhibiendo el metabolismo global del glicerol (figura 8C).

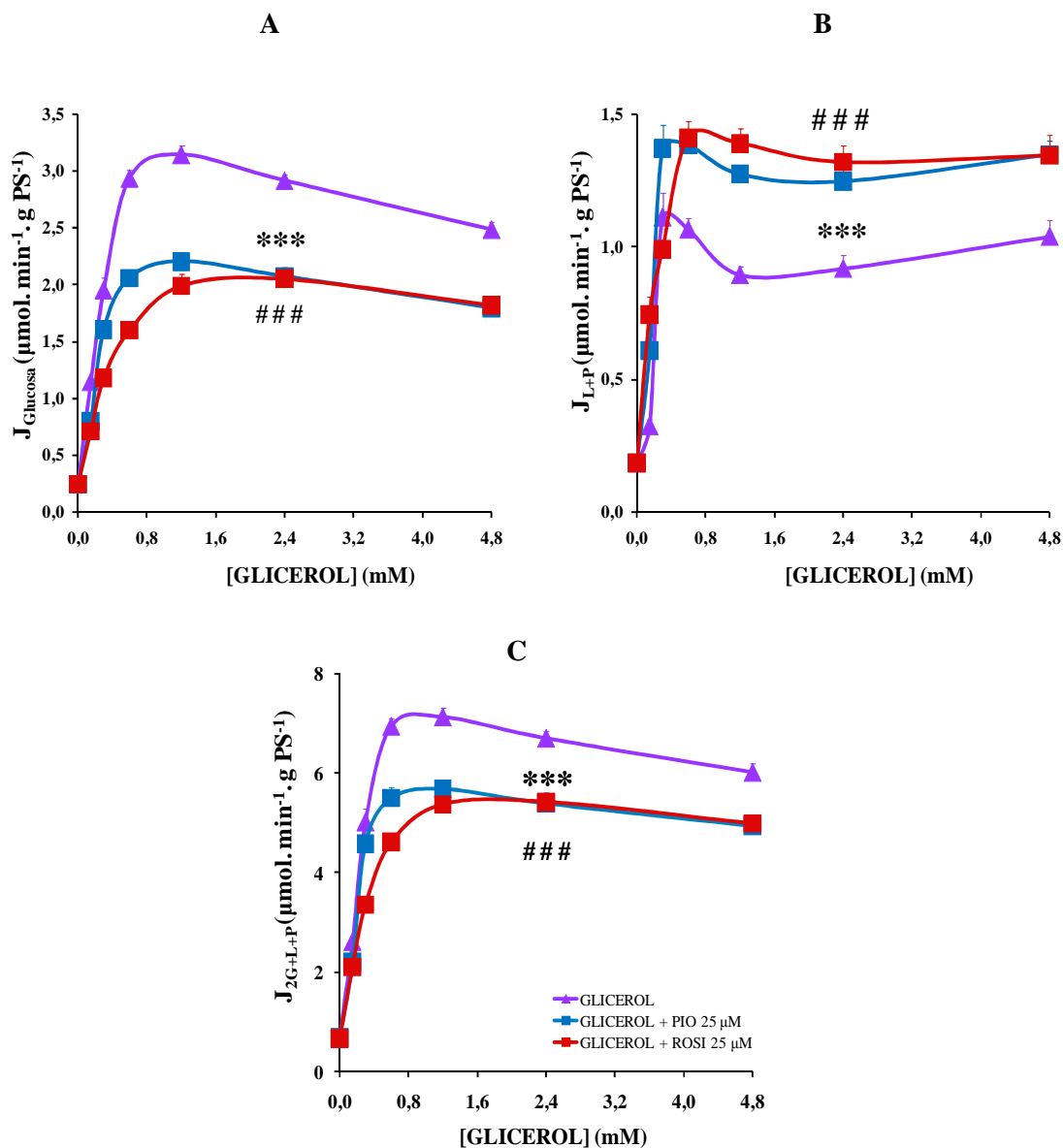


Figura 8. Inhibición del metabolismo del glicerol en hepatocitos de rata perfundidos con 25 µM de pioglitazona o rosiglitazona

Leyenda idéntica a la de la figura 2, pero usando glicerol en lugar de DHA como sustrato energético. La PIO 25 µM (■) ó la ROSI 25 µM (■) se infundieron de manera continua en una cámara y se compararon con la cámara control donde se infundió sólo el vehículo (▲). Los resultados se expresan como media ± EEM de: n=15 preparaciones distintas de hepatocitos para la situación control, n=15 para PIO y n=15 para ROSI. \*\*\*p<0,001 valores de PIO respecto a los control a la concentración de glicerol correspondiente. ### p<0,001 valores de ROSI respecto a los control a la concentración de glicerol correspondiente

A diferencia de lo obtenido con los otros dos sustratos anteriores (DHA y fructosa), con el glicerol:

- la inhibición de  $J_{Glucosa}$  fue de un 29% por parte de PIO y un 30% por acción de ROSI. Por lo tanto a partir del glicerol, la inhibición de la gluconeogénesis hepática por acción de estos dos antidiabéticos fue algo menor que la obtenida con DHA y fructosa.
- Sin embargo, obtuvimos una activación de la glucólisis bastante superior a la obtenida anteriormente: 36 % con PIO y 43% con ROSI. Hay que tener en cuenta que el flujo glucolítico a partir del glicerol es más bien mínimo, de 1  $\mu\text{M}$  por minuto, respecto a los 12  $\mu\text{M}$  por minuto que se generan a partir de la DHA.
- Por todo ello, las dos glitazonas inhiben significativamente el metabolismo global del glicerol en un 20 % cada una.

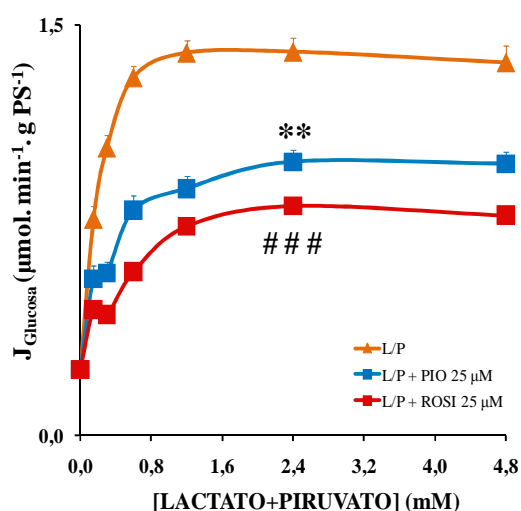
PIO y ROSI también inhibieron la producción de DHAP, aunque de forma ligeramente inferior a lo obtenido con los otros dos sustratos. Esta inhibición se hizo más patente en el último estado estacionario correspondiendo con la concentración 4,8 mM de glicerol. Según esto, el efecto de las dos glitazonas sobre el metabolismo del glicerol podría localizarse, en parte, en la entrada del glicerol a la ruta gluconeogénica/glucolítica. Al representar el flujo gluconeogénico, el glucolítico y el metabolismo global del glicerol frente a la concentración de DHAP se demuestra que el efecto de los dos antidiabéticos también está localizado más allá de la fosforilación de la DHAP. Por lo tanto, el efecto directo de ambas glitazonas sobre el metabolismo global de DHA, fructosa o glicerol se mantiene aunque se cambie de sustrato y se encuentra preferentemente localizado más allá de la entrada de los sustratos a la vía metabólica y la fosforilación de la DHAP. *Las gráficas correspondientes a este último apartado las exponemos más adelante en el Anexo-ampliación de resultados (figura 2).*

#### **1.4. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el metabolismo global del lactato más piruvato (lactato/piruvato)**

El lactato y el piruvato son los productos de la glucólisis de la glucosa. Habitualmente se forman en numerosos tejidos extrahepáticos (como el músculo, la retina, los glóbulos rojos, etc...) para que después, sobre todo en situación de ayuno,

vayan al hígado donde serán reutilizados para la gluconeogénesis hepática. Por tanto son sustratos naturales para la GNG y su vía de entrada a la ruta de GNG se hace a nivel de la piruvato carboxilasa mitocondrial (GNG). Normalmente, el lactato pasa a piruvato antes del primer paso de la GNG. La ventaja de utilizar el lactato/piruvato (L/P) como sustrato es que estos productos constituyen unos de los principales precursores fisiológicos gluconeogénicos del hígado y poseen la particularidad de entrar abajo de la vía metabólica. Además, la perfusión de lactato+piruvato permite modificar el nivel redox celular.

De esta manera, el lactato+piruvato fue el último sustrato con el que realizamos titración de hepatocitos perfundidos de rata a concentraciones subsaturantes crecientes en presencia o ausencia de pioglitazona y rosiglitazona. Con este sustrato obtuvimos el mismo efecto ejercido por las glitazonas al encontrado con los otros tres sustratos anteriores. Ambos fármacos inhibieron la gluconeogénesis hepática significativamente, de tal forma que al igual que lo encontrado con los demás sustratos, la inhibición producida por ROSI fue superior a la de PIO: 40 % frente a 29% (figura 9). Según se puede observar, este porcentaje de inhibición se mantuvo constante durante todo el transcurso del experimento.

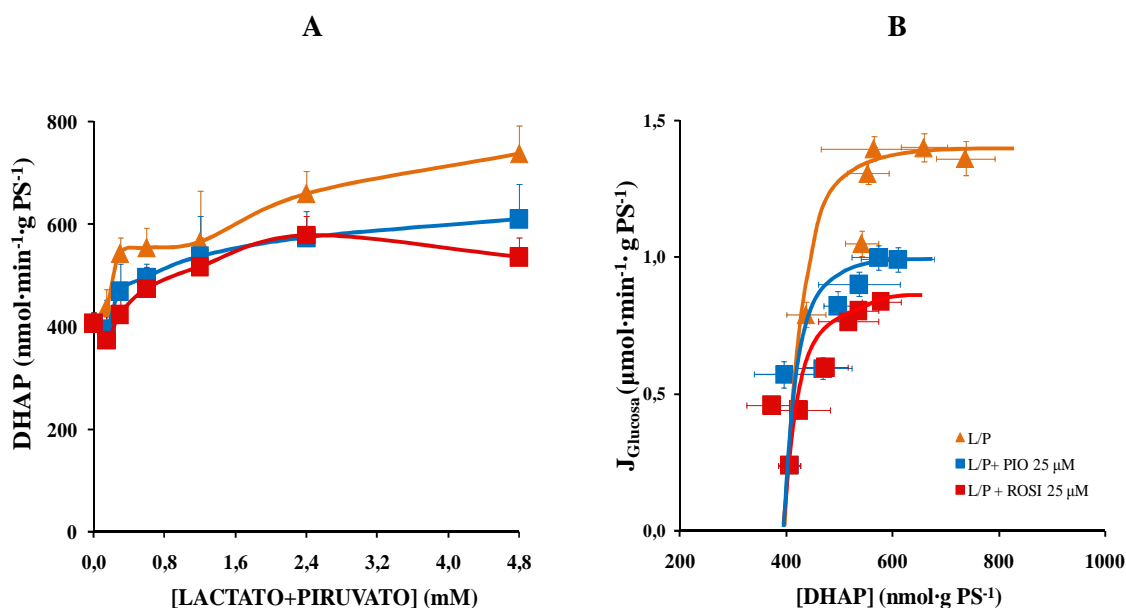


**Figura 9. Inhibición del metabolismo del L/P en los hepatocitos de rata perfundidos con 25 µM de pioglitazona o rosiglitazona**

Leyenda idéntica a la de la figura 2, pero usando lactato+piruvato en lugar de DHA como sustrato energético. La PIO 25 µM (■) ó la ROSI 25 µM (■) se infundieron de manera continua en una cámara y se compararon con la cámara control donde se infundió sólo el vehículo (▲). Los resultados se expresan como media ± EEM de: n=12 preparaciones distintas de hepatocitos para la situación control, n=12 para PIO y n=12 para ROSI. \*\*p<0,01 valores de PIO respecto a los control a la concentración de glicerol correspondiente. ### p<0,001 valores de ROSI respecto a los control a la concentración de glicerol correspondiente

Al igual que ocurrió con los tres sustratos anteriores, para determinar la(s) etapa(s) de la vía GNG/glucólisis implicadas en el efecto global de PIO y ROSI,

determinamos la concentración de DHAP formada a partir del lactato+piruvato. Gracias a su determinación (**figura 10A**) y su representación frente al flujo gluconeogénico **figura 10B**) podemos determinar que, también con este sustrato el efecto de PIO y ROSI sobre la gluconeogénesis se localiza más allá de la DHAP, probablemente sobre la actividad de la enzima G6Pasa. Esto se explica ya que las dos glitazonas inducen una modificación de la relación entre la DHAP y  $J_{Glucosa}$ , de manera que para una concentración determinada de DHAP, la  $J_{Glucosa}$  disminuye por acción de ambos fármacos.



**Figura 10. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona en presencia de L/P sobre la concentración de DHAP: relación con la producción de glucosa**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno, en presencia de L+P, con 25 μM de pioglitazona (■), rosiglitazona (■) o su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 2**. Las concentraciones intracelulares de DHAP se midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la DHAP; la **figura B** muestra el efecto de ambos antidiabéticos sobre la gluconeogénesis más allá de la DHAP. Los resultados se expresan como media ± EEM; n=4 preparaciones distintas de hepatocitos

## 2. EFECTO DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE LA GLUCÓLISIS HEPÁTICA A PARTIR DE DHA, FRUCTOSA Y GLICEROL

### 2.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de DHA

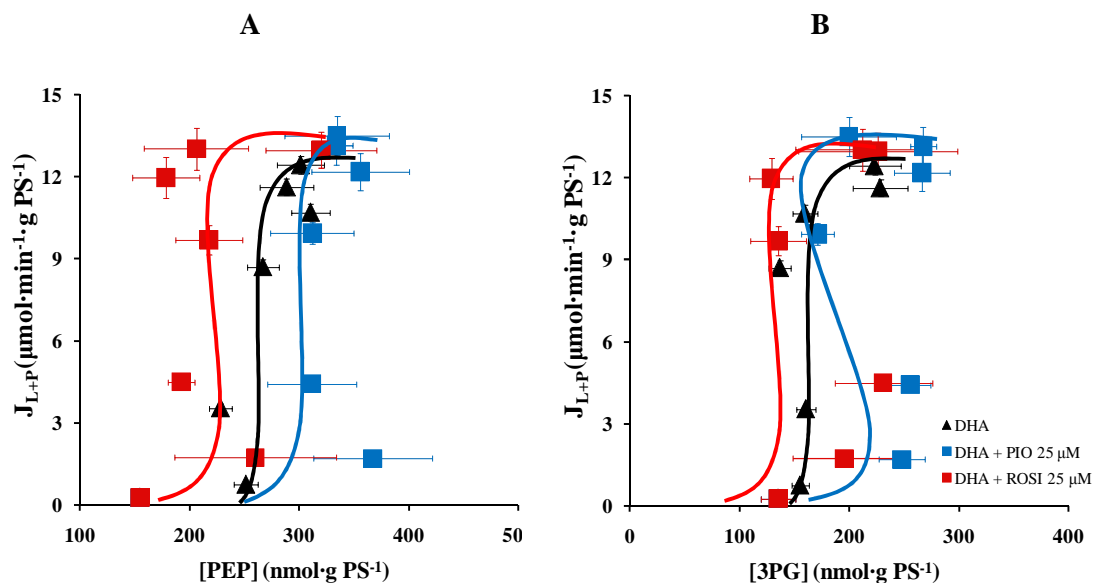
Como observamos en el apartado anterior, pioglitazona y rosiglitazona activan significativamente, aunque muy débilmente, la glucólisis hepática a partir de DHA, fructosa y glicerol en hepatocitos perifundidos (**figura 2B**, **figura 5B** y **figura 7B**). Por ello, decidimos investigar el lugar concreto de acción de las dos glitazonas sobre la glucólisis hepática, que como mencionamos previamente, debe localizarse entre la DHAP y el lactato/piruvato. Con ese fin, analizamos los intermediarios metabólicos fosfoenolpiruvato (PEP) y 3-fosfoglicerato (3PG) y los representamos frente a  $J_{L+P}$ . Utilizando la técnica de perfusión de células, la cinética de la enzima piruvato quinasa (PK) se puede evaluar midiendo la relación entre las concentraciones de *fosfoenolpiruvato* y el *flujo de lactato más piruvato* en diferentes condiciones y bajo estados estacionarios reales. En estas condiciones, como el lactato y el piruvato son continuamente aclarados del medio, el flujo a través de la PK puede ser evaluado por la producción neta de lactato más piruvato ( $J_{L+P}$ ).

En la siguiente figura (**figura 11A**) podemos observar claramente la clásica cinética sigmoide de la enzima piruvato quinasa (PK) que se obtiene en hepatocitos control perifundidos con concentraciones crecientes de DHA. En teoría, la curva que muestra la relación entre PEP y  $J_{L+P}$  tendría que desplazarse hacia la izquierda por acción de las glitazonas, indicando una activación de la piruvato quinasa. Sin embargo, al tratarse de una activación muy débil, no observamos claramente el efecto de ambas glitazonas sobre esta relación. No obstante, se en la misma figura se observa que bajo el efecto de estos antidiabéticos la cinética de la piruvato quinasa permanece de tipo enzima alostérica y su  $V_{\text{maxima}}$  aumenta. Con ROSI la curva se desplaza claramente hacia la izquierda (indicando activación de la PK), mientras que con PIO el efecto activador no es tan claro. En hepatocitos de rata, el PEP está presente en el citosol y en la matriz mitocondrial, mientras que el sustrato para la PK es el intermediario citosólico. La determinación del 3-fosfoglicerato (3-PG), un intermediario metabólico puramente citosólico que está en equilibrio con el PEP citosólico (Crabtree y Newsholme, 1978), confirma los resultados encontrados con el PEP (**figura 11B**).

Para certificar y poder asegurar que el efecto activador de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis hepática se localiza sobre la enzima piruvato kinasa, enzima clave en la glucólisis. A continuación pasamos a investigar directamente la cinética de esta enzima. Los resultados correspondientes a la cinética de la PK los



mostraremos más adelante, después de exponer la relación entre el flujo glucolítico y los intermediarios PEP y 3-PG obtenidos a partir de fructosa y glicerol.



**Figura 11. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de DHA**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml) fueron perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno, en presencia de DHA, con PIO 25  $\mu\text{M}$  (■), ROSI 25  $\mu\text{M}$  (■) ó su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 2**. Las concentraciones intracelulares de PEP y de 3PG se midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre PEP y  $J_{L+P}$ ; la **figura B** muestra el efecto de los fármacos sobre la relación entre 3PG y  $J_{L+P}$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=6 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de PIO ó ROSI

## 2.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de fructosa

También encontramos la clásica curva sigmoide de la piruvato quinasa cuando empleamos fructosa como sustrato en las perfusiones de hepatocitos, al igual que ocurrió con la DHA (**figura 11A**). Con este sustrato, al representar el flujo glucolítico ( $J_{L+P}$ ) frente a las concentraciones de los intermediarios PEP (**figura 12A**) y 3-PG (**figura 12B**), encontramos un efecto más claro de PIO y ROSI sobre la actividad de la piruvato quinasa. Los dos antidiabéticos aumentan la  $V_{\text{max}}$  de la piruvato quinasa y desplazan la curva ligeramente hacia la izquierda, indicando un posible efecto directo localizado sobre esta enzima. Debido a la tan débil activación de la glucólisis (7% con PIO y 11% con ROSI) obtenida a partir de fructosa, la desviación de la curva hacia la izquierda no es lo suficiente clara y patente como para que podamos enunciar concisamente que, de acuerdo a estos resultados el efecto de ambas glitazonas sobre la glucólisis está localizado sobre la actividad de la PK. Estos resultados, al igual que los obtenidos con DHA, también nos incitaron a investigar más profundamente la actividad de la piruvato quinasa hepática.

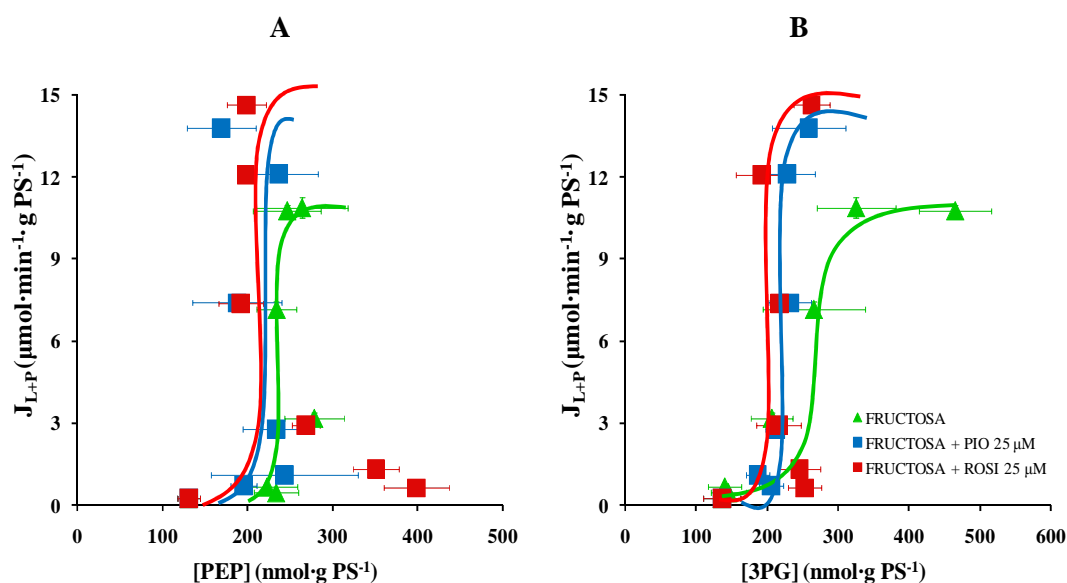
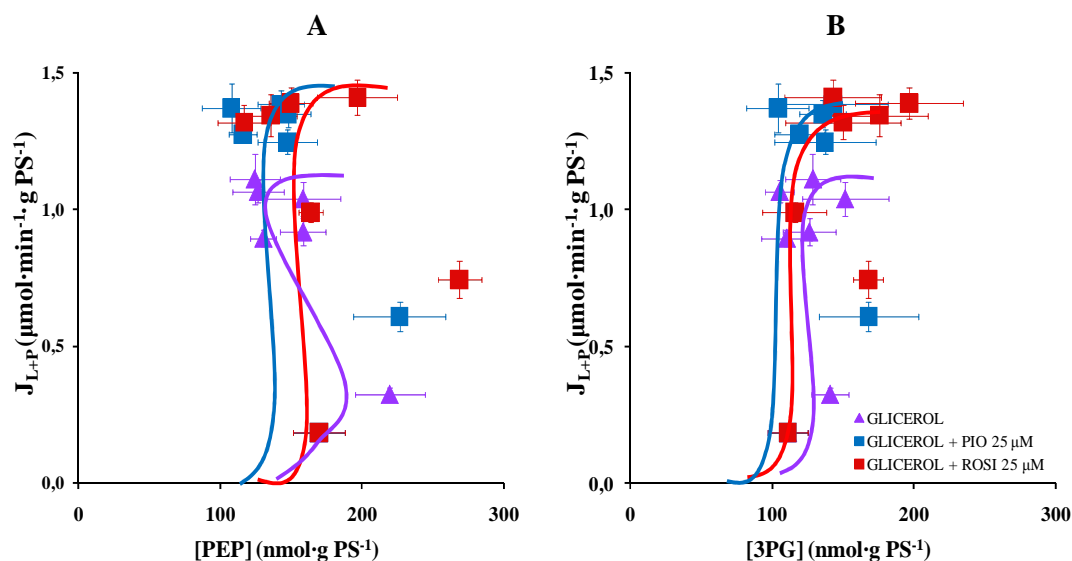


Figura 12. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de fructosa

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno, en presencia de fructosa, con PIO 25  $\mu\text{M}$  (■), ROSI 25  $\mu\text{M}$  (■) ó su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 2**. Las concentraciones intracelulares de PEP y de 3PG se midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre PEP y  $J_{L+P}$ ; la **figura B** muestra el efecto de ambos fármacos sobre la relación entre 3PG y  $J_{L+P}$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de PIO ó ROSI

### 2.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de glicerol

De igual forma que ocurrió con los otros dos sustratos anteriores, DHA y fructosa, con glicerol obtuvimos la clásica curva sigmoide de la piruvato kinasa (**figura 13A**). Pioglitazona y rosiglitazona, a la concentración empleada de 25  $\mu\text{M}$ , desplazaron ligeramente la curva que muestra la relación entre PEP y  $J_{L+P}$  hacia la izquierda, evidencia de la leve activación que producen ambas sobre la glucólisis (**figura 13A**). Por acción de las glitazonas también la cinética de la enzima PK permanece del tipo de enzima alostérica y la  $V_{\text{max}}$  aparente parece aumentar. La determinación del 3-fosfoglicerato (3PG) (**figura 13B**) confirma que ambos antidiabéticos actúan directamente sobre la PK.



**Figura 13. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de glicerol**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno, en presencia de glicerol, con PIO 25  $\mu\text{M}$  (■), ROSI 25  $\mu\text{M}$  (■) ó su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 2**. Las concentraciones intracelulares de PEP y de 3PG se midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre PEP y  $J_{L+P}$ ; la **figura B** muestra el efecto de ambos fármacos sobre la relación entre 3PG y  $J_{L+P}$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de PIO ó ROSI

A la luz de los resultados no muy claros sobre el efecto de PIO y ROSI en la glucólisis hepática que obtuvimos mediante el análisis de las concentraciones de los metabolitos intracelulares PEP y 3-PG, decidimos estudiar más profundamente la acción de estos dos antidiabéticos sobre dos parámetros que influyen en la glucólisis: el potencial redox y la relación ATP/ADP. Y por último, investigamos el efecto directo de PIO y ROSI sobre la actividad de la enzima PK.

#### **2.4. Papel de la relación ATP/ADP celular en el efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de DHA, fructosa y glicerol**

Desde el punto de vista del control de la glucólisis, teóricamente todas las etapas implicadas en la conversión de la DHAP en PEP pueden ejercer un control sobre el flujo glucolítico, aunque el grado de influencia de las enzimas implicadas en dichas etapas sobre la concentración del PEP es diferente. Las reacciones catalizadas por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPdH, encargada de la transformación de gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-difosfoglicerato o viceversa) y la fosfoglicerato quinasa

(PGK, responsable de la interconversión de 1,3-difosfoglicerato y 3-fosfoglicerato), aunque funcionan cerca del equilibrio pueden afectar a la concentración del PEP por un efecto mediado, bien por la relación ATP/ADP citosólica o por el estado redox del mismo (ver figura 1 de “Resultados”).

Por lo tanto, mediante la técnica de HPLC medimos los niveles citosólicos y mitocondriales de ATP, ADP y AMP. Obtuvimos los medios citosólico y mitocondrial de las muestras de hepatocitos recogidos en los distintos estados estacionarios de los experimentos de perfusión con DHA, fructosa y glicerol como sustratos (la técnica de fraccionamiento celular está explicada en la sección de “Material y Métodos”). Como se puede observar en la siguiente tabla (tabla 1), en las perfusiones realizadas utilizando DHA como sustrato pioglitazona inhibió en casi un 45% la relación ATP/ADP citosólica. Esta disminución estimula la reacción entre 1,3-difosfoglicerato (1,3-DPG) y 3-fosfoglicerato (3PG). Esto puede traducirse en un aumento en la concentración del PEP y por consiguiente, un aumento del flujo del PEP a través de la PK, ya que la disminución del ATP estimula también la actividad de la PK (Leverve, 1994b). Esta acumulación citosólica de PEP por acción de PIO es lo que observábamos en la figura 11A. Rosiglitazona, por el contrario, no ejerce ningún efecto significativo sobre la relación ATP/ADP citosólica, lo cual concuerda con la disminución de la concentración de PEP obtenida y representada en la misma figura. PIO también disminuye la relación ATP/ADP mitocondrial en un gran porcentaje superior al 66%. Esto nos indica que pioglitazona, además de sus efectos metabólicos ya mencionados, podría afectar la respiración celular a nivel de la cadena respiratoria o de la ATP sintasa. Abordaremos el estudio de estos últimos efectos mitocondriales directos de las glitazonas más adelante. A partir de fructosa y glicerol como sustratos, mediante el análisis del flujo glucolítico a través de la determinación de la concentración de PEP y 3PG, pudimos demostrar más claramente que la leve activación sobre la glucólisis que producen PIO y ROSI se debe a una acción directa sobre la piruvato quinasa. Aunque con fructosa (tabla 2), pio no disminuyó la relación ATP/ADP citosólica, ROSI sí la inhibió en un 21%. Mientras que a partir del glicerol (tabla 3), tanto PIO como ROSI disminuyeron esta relación en un 12% y 5%, respectivamente. Con los dos sustratos, los dos antidiabéticos disminuyeron claramente la relación ATP/ADP mitocondrial, lo cual sumado a lo obtenido con DHA nos animó a intensificar el posterior estudio de los efectos directos mitocondriales de ambos agentes.

Tabla 1

DHA	CITOSOL				
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP
Control	5,81±0,36	2,88±0,27	0,52±0,09	9,21±0,30	2,92±0,53
PIO 25 $\mu$ M	5,27±0,25	3,71±0,19	0,61±0,07	9,59±0,30	1,63±0,16
ROSI 25 $\mu$ M	5,58±0,30	2,42±0,17	0,38±0,05	8,38±0,29	2,81±0,25

	MITOCONDRIA				
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP
Control	1,33±0,20	2,29±0,14	0,57±0,05	4,17±0,29	0,62±0,09
PIO 25 $\mu$ M	0,62±0,07	3,37±0,2	0,42±0,03	4,40±0,28	0,21±0,02
ROSI 25 $\mu$ M	1,79±0,13	3,30±0,17	0,50±0,03	5,49±0,19	0,64±0,07

Tabla 2

FRUCTOSA	CITOSOL				
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP
Control	6,06±0,47	3,59±0,31	2,02±0,16	11,66±0,7	1,81±0,13
PIO 25 $\mu$ M	4,51±0,19	2,86±0,22	2,58±0,21	10,14±0,5	1,81±0,12
ROSI 25 $\mu$ M	4,10±0,17	3,18±0,14	2,02±0,13	9,30±0,28	1,42±0,07

	MITOCONDRIA				
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP
Control	4,08±0,32	3,77±0,24	1,36±0,10	9,21±0,47	1,13±0,08
PIO 25 $\mu$ M	4,49±0,30	4,71±0,31	1,18±0,10	10,41±0,6	1,00±0,06
ROSI 25 $\mu$ M	3,15±0,13	4,54±0,14	1,80±0,17	10,41±0,6	0,72±0,03

Tabla 3

	GLICEROL			CITOSOL		
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP	
Control	4,40±0,42	4,15±0,29	3,85±0,72	12,41±0,8	1,13±0,15	
PIO 25 $\mu$ M	3,55±0,18	3,59±0,27	2,72±0,15	9,86±0,48	0,99±0,08	
ROSI 25 $\mu$ M	3,25±0,17	3,05±0,13	2,58±0,20	8,88±0,33	1,07±0,06	
	MITOCONDRIA					
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP	
Control	1,19±0,20	2,59±0,32	2,13±0,21	5,92±0,65	0,45±0,03	
PIO 25 $\mu$ M	1,90±0,10	5,76±0,24	3,77±0,19	11,07±0,6	0,33±0,02	
ROSI 25 $\mu$ M	2,15±0,14	6,47±0,16	3,96±0,13	12,33±0,5	0,34±0,02	

**Tabla 1,2 y 3. Efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre las concentraciones de los nucleótidos adenílicos y la relación ATP/ADP citosólica y mitocondrial de los hepatocitos perfundidos con DHA, fructosa y glicerol**

Los hepatocitos aislados de ratas Wistar machos en ayunas se perfundieron con DHA, fructosa y glicerol tal y como está descrito en la **figura 2**. En cada estado estacionario, se recogieron muestras de las cámaras. La fracción mitocondrial se separó de la fracción citosólica a través de una capa de aceite de silicona mediante el fraccionamiento celular con digitonina. Las concentraciones de los nucleótidos adenílicos (ATP, ADP y AMP) se midieron en los compartimientos citosólicos y mitocondriales por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).  $\Sigma$ AN representa la suma de las concentraciones de ATP, ADP y AMP. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=6 preparaciones distintas de hepatocitos a partir de DHA; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos a partir de fructosa; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos a partir de glicerol.

**Los resultados preliminares obtenidos a partir del análisis de los intermediarios metabólicos (PEP,3-PG) y la relación ATP/ADP celular, nos indicaron que la activación de la glucólisis por pioglitazona y rosiglitazona, se debe en parte, a un efecto directo localizado a nivel de la enzima piruvato quinasa**

## 2.5. Activación directa de la actividad de la piruvato quinasa por pioglitazona y rosiglitazona

Determinamos la actividad de la enzima piruvato quinasa siguiendo el protocolo detalladamente explicado en la sección “Material y Métodos”. La determinación de la actividad de la piruvato quinasa se realizó mediante la adición de concentraciones crecientes de fosfoenolpiruvato, después de la extracción de dicha enzima, con o sin purificación parcial, a partir de los hepatocitos previamente incubados con pioglitazona, rosiglitazona ó su vehículo, junto con el glucagón (inhibidor clásico de la glucólisis). La actividad de la piruvato quinasa hepática no purificada (M-piruvato quinasa) se midió en el sobrenadante mientras que la actividad de la enzima parcialmente purificada (L-piruvato quinasa) se midió en el precipitado después de lavar el homogenado con sulfato de amonio saturado.

Los resultados que obtuvimos, expuestos en la siguiente tabla (tabla 4), demuestran claramente que el efecto activador de PIO y ROSI sobre la glucólisis hepática reside en la modificación de la actividad de la piruvato quinasa. Según lo obtenido, estos dos antidiabéticos no actúan de igual forma según se trate de la enzima total o parcialmente purificada. Cuando analizamos exclusivamente la enzima parcialmente purificada, lo que obtuvimos fue una gran activación de su velocidad máxima ( $V_{max}$ ) en un 26% y un 15,5% por efecto de PIO y ROSI, respectivamente. Mientras que cuando centramos nuestro estudio en la enzima hepática totalmente purificada, los dos fármacos no modificaron su  $V_{max}$ , pero sí alteraron la relación  $V/V_{max}$ . En este último caso, PIO aumentó la relación  $V/V_{max}$  en un 35% y ROSI, más débilmente, en un 23%.

<b>PIRUVATO QUINASA</b>				
	$v/V_{max}$ (0.4 mM PEP)		$V_{max}$ (4 mM PEP)	
	Purificada	Parcialmente purificada	Purificada	Parcialmente purificada
	nmol/min/mg protein		nmol/min/mg protein	
<b>Control (DHA)</b>	<b>0.34 ± 0.02</b>	<b>0.26 ± 0.03</b>	<b>230.6 ± 22.1</b>	<b>372 ± 9</b>
<b>Glucagón <math>10^{-7}</math> M</b>	<b>0.30 ± 0.02</b>	<b>0.21 ± 0.02</b>	<b>209.5 ± 18.8</b>	<b>348 ± 27</b>
<b>Pioglitazona 25 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.46 ± 0.02***</b>	<b>0.27 ± 0.02</b>	<b>210.5 ± 12.8</b>	<b>482.72 ± 9.22***</b>
<b>Rosiglitazona 25 <math>\mu</math>M</b>	<b>0.42 ± 0.02*</b>	<b>0.27 ± 0.03</b>	<b>221.2 ± 22.2</b>	<b>429.92 ± 7.68***</b>

**Tabla 4. Efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de la piruvato quinasa determinada in vitro sobre la enzima no purificada y parcialmente purificada**

Los hepatocitos ( $10 \text{ mg peso seco}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) aislados de ratas Wistar machos en ayunas se incubaron en Krebs-Bicarbonato-Calcio saturado en carbógeno a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en viales cerrados con 20 mM de DHA en presencia de vehículo, glucagón ( $10^{-7} \text{ M}$ ), de PIO 25  $\mu\text{M}$  o ROSI 25  $\mu\text{M}$ . Después de la incubación, las muestras celulares se recogieron de los viales, se centrifugaron, se resuspendieron y se homogenizaron durante un minuto tal y como está descrito en la sección de *Material y Métodos*. Después de la centrifugación, la actividad de la piruvato quinasa se midió en el sobrenadante, con o sin purificación parcial, en presencia de concentraciones crecientes de PEP. La relación  $v/V_{\text{max}}$  representa la actividad de la piruvato quinasa con 0,4 mM de PEP ( $v$ ) dividida por la actividad máxima obtenida con 4 mM de PEP ( $V_{\text{max}}$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM;  $n=5$  preparaciones distintas de hepatocitos. \* $p<0.05$ ; \*\*\*,  $p<0.001$  comparado con el control.

**Estos resultados nos indican que el efecto activador de pioglitazona o de rosiglitazona sobre la glucólisis hepática se explica a la vez mediante la activación de la PK y la disminución de la relación ATP/ADP citosólica**



### 3. INHIBICIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS POR PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA A PARTIR DE TODOS LOS SUSTRATOS UTILIZADOS (DHA, FRUCTOSA, GLICEROL Y LACTATO+PIRUVATO) EN HEPATOCITOS DE RATA EN PERIFUSIÓN

#### 3.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de DHA

Para investigar la(s) etapa(s) que están implicada(s) en la inhibición de la gluconeogénesis por la SB en los mismos experimentos de perfusión de hepatocitos con DHA expuestos anteriormente (figura 2A, 5A, 8A y 9), analizamos por métodos espectrofluorimétricos las concentraciones intracelulares de los principales intermediarios gluconeogénicos (G6P y F6P) y las representamos frente a los flujos gluconeogénicos correspondientes en cada estado estacionario.

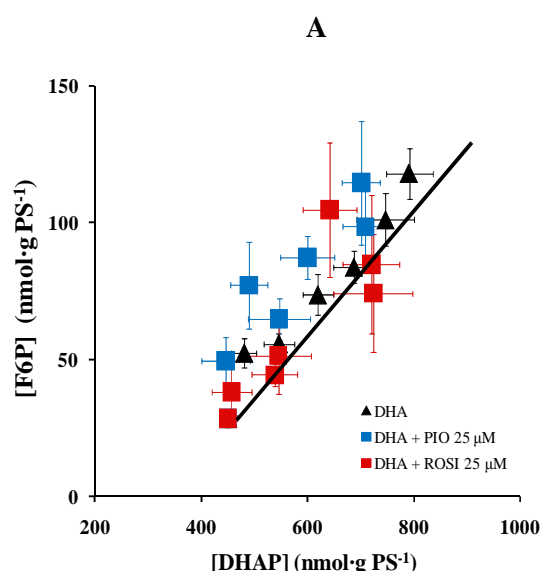
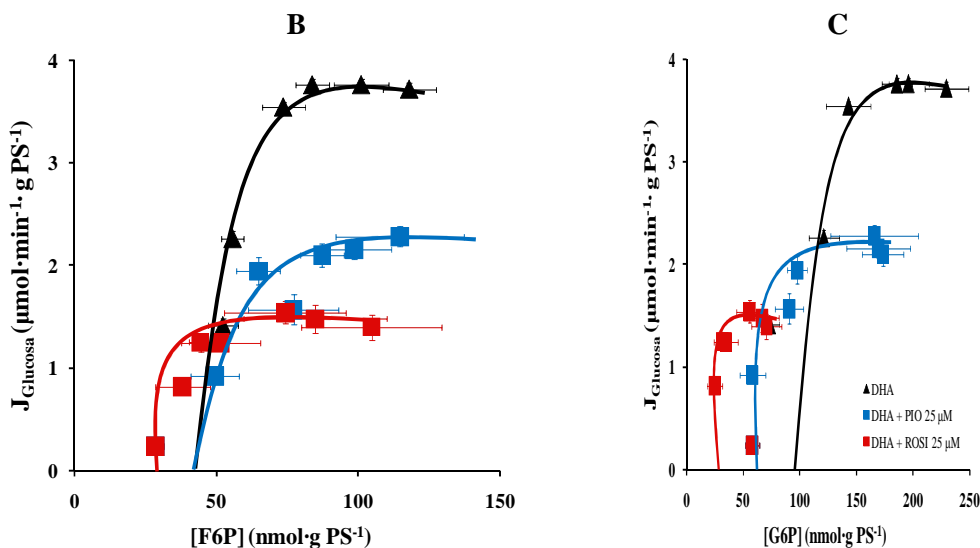


Figura 14A. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de DHA: relación entre F6P y DHAP

En la figura anterior (figura 14A) representamos la relación entre la concentración intracelular de DHAP y fructosa-6-fosfato (F6P), permitiendonos así estudiar el “*ciclo de las fructosas*”: fructosa-1,6-bisfosfatasa/fosfofructoquinasa (F1,6bPasa/PFK). En nuestras condiciones experimentales, utilizando animales en ayunas durante 24 h, consideramos que la actividad de la enzima fosfofructoquinasa es muy baja (Pilkis y Granner, 1992). Además, se asume que la fructosa-bisfosfato aldolasa y la triosa-fosfato isomerasa (TPI) se encuentran funcionando cerca del equilibrio (Groen y cols., 1983; 1986). Por lo tanto, la concentración de DHAP probablemente refleja la concentración de

fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6bP). Ambas glitazonas inhiben ligeramente la formación de DHAP a través de una disminución en la fosforilación de DHAP (**figura 3A**). Gracias a la **figura 14A** podemos deducir que pioglitazona no afecta este ciclo, sus valores se correlacionan con los controles en cada estado estacionario (entre 30 y 120 nmol·g peso seco<sup>-1</sup> para F6P). No podemos decir lo mismo en el caso de ROSI. La F6P se encuentra disminuida por acción de ROSI (valores entre 30 y 85 nmol·g peso seco<sup>-1</sup> frente 30-120 nmol·g peso seco<sup>-1</sup> de F6P que se producen en la situación control). Por tanto, podemos sugerir que ROSI afecta débilmente el “ciclo de las fructosas”, probablemente inhibiendo la F-2,6-bisfosfatasa. Sobre este punto puede radicar el mayor efecto inhibitorio sobre la gluconeogénesis que produce ROSI respecto a PIO (47% frente a 38%, respectivamente).

Por lo tanto, con los dos antidiabéticos la disminución de la gluconeogénesis que producen a partir de DHA se debe, principalmente, a un efecto inhibitorio localizado más allá de la F6P, como se observa en la **figura 14B** donde se demuestra que existe una doble relación entre los niveles de F6P y el flujo de producción de glucosa ( $J_{Glucosa}$ ). El hecho de que ROSI pueda afectar el “ciclo de las fructosas” (**figura 14A**) no limita únicamente a esta etapa el control que ejerce este antidiabético sobre la gluconeogénesis. Como la enzima fosfoglucoisomerasa (PGI) (encargada de la interconversión de F6P en G6P y viceversa) funciona cerca del equilibrio, teóricamente encontraremos la misma doble relación entre G6P y  $J_{Glucosa}$  que entre F6P y  $J_{Glucosa}$  (**figura 14C**).



**Figura 14. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de DHA**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno en presencia de DHA, con pioglitazona 25  $\mu$ M (■), rosiglitazona 25  $\mu$ M (■) o su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 2**. Las concentraciones intracelulares de G6P y de F6P se midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre DHAP y F6P; la **figura B** muestra el efecto de los dos antidiabéticos sobre la relación entre

F6P y  $J_{Glucosa}$ ; la **figura C** muestra el efecto de ambos fármacos sobre la relación entre G6P y  $J_{Glucosa}$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=6 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de glitazona

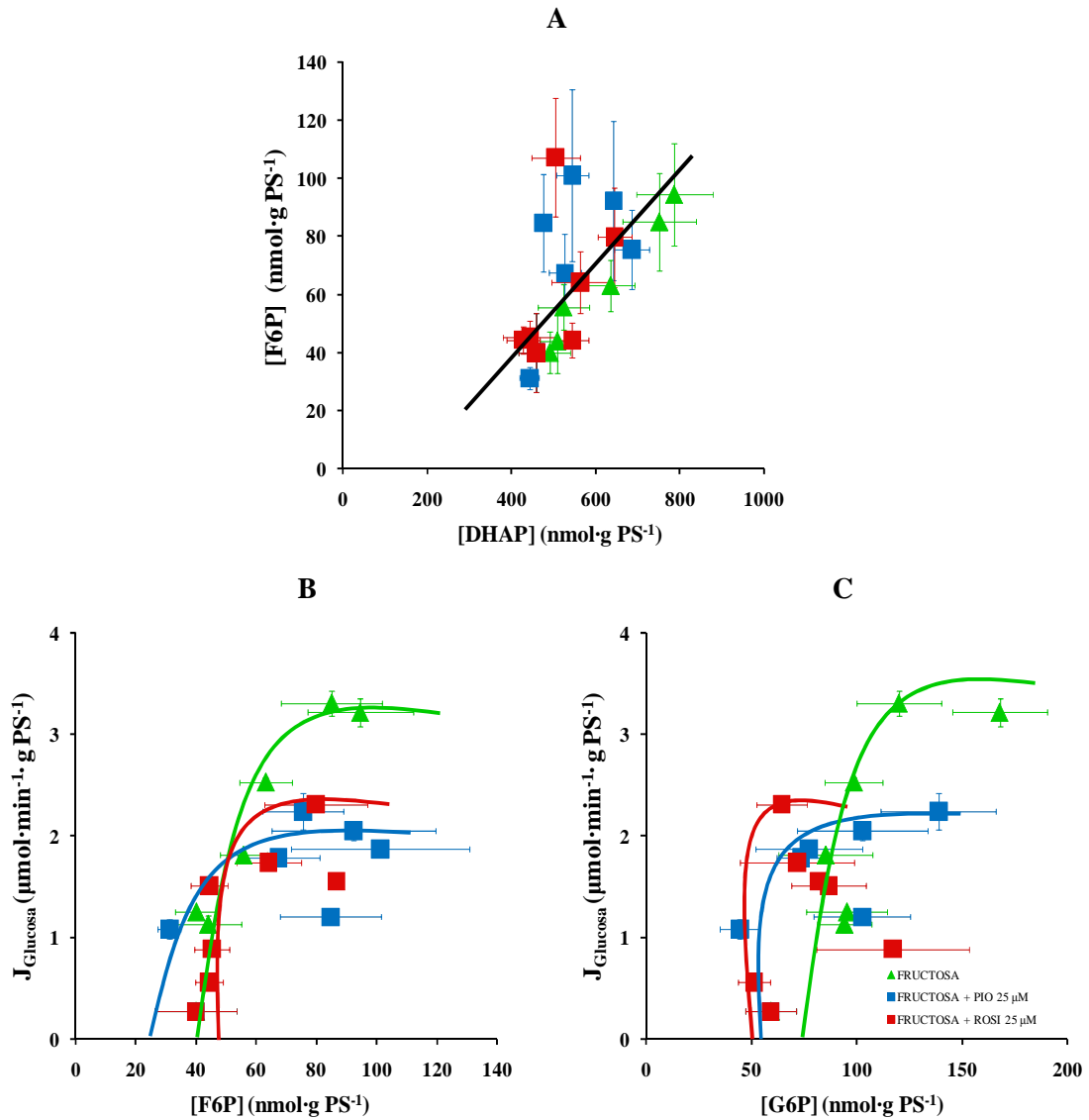
En nuestras condiciones de trabajo, el flujo metabólico a través de la enzima glucoquinasa (GK) es despreciable por la baja expresión de la GK debida al ayuno de 24 h (Groen y cols., 1983; 1986). Además, el sistema de perfusión permite una renovación permanente del medio extracelular, impidiendo la acumulación de la glucosa en las cámaras de perfusión. Así, la doble relación encontrada entre la G6P y  $J_{Glucosa}$  en presencia de PIO y ROSI nos indica que, la inhibición de la gluconeogénesis hepática inducida por las dos se debe, por lo menos en parte, a una potente inhibición de la hidrólisis de G6P a nivel de la enzima gluconeogénica glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa).

### **3.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de fructosa**

Al igual que el apartado anterior con el sustrato DHA, en los mismos experimentos de perfusión de hepatocitos con fructosa como sustrato (**figura 5, figura 6 y anexo 1**) representamos la relación entre la concentración intracelular de DHAP y F6P (**figura 15A**) y entre el flujo gluconeogénico frente a la F6P (**figura 15B**) y la G6P (**figura 15C**).

Trabajando con fructosa como sustrato, las dos glitazonas inhiben muy débilmente y sin significación la fosforilación de la DHA (como muy bien expusimos anteriormente (**figura 6**)). De tal forma que, la inhibición sobre este punto de entrada de la DHA a la vía GNG/glucólisis no constituye el único punto de control gracias al cual podamos explicar el efecto que producen PIO y ROSI sobre dicha vía. Por lo tanto, en la inhibición de la GNG hepática a partir de fructosa también están implicadas otras etapas entre la DHAP y la glucosa.

A diferencia de lo que ocurre con la DHA, con fructosa ninguna de las dos glitazonas actúa sobre “el ciclo de las fructosas” (**figura 15A**). Al examinar esta figura comprobamos que los valores de F6P se correlacionan en las 3 situaciones (control, PIO y ROSI) entre valores de 40-100 nmol·g peso seco<sup>-1</sup>. Gracias a las dos figuras siguientes deducimos que el efecto inhibitorio de PIO y ROSI está localizado más allá de la F6P, como se indica en la doble relación entre F6P y  $J_{Glucosa}$  (**figura 15B**), probablemente a nivel de la enzima G6Pasa como se demuestra en la doble relación de la **figura 15C**. La enzima fosfoglucoisomerasa (PGI) funciona cerca del equilibrio y por tanto, encontramos la misma relación entre G6P y  $J_{Glucosa}$  que entre F6P y  $J_{Glucosa}$ . En nuestras condiciones, la doble relación encontrada entre la G6P y la  $J_{Glucosa}$  con PIO y ROSI nos indica que, con la fructosa como sustrato, la inhibición de la gluconeogénesis hepática inducida por ambos agentes se debe también a una potente inhibición de la hidrólisis de la G6P a nivel de la G6Pasa, tal y como demostramos con el sustrato DHA

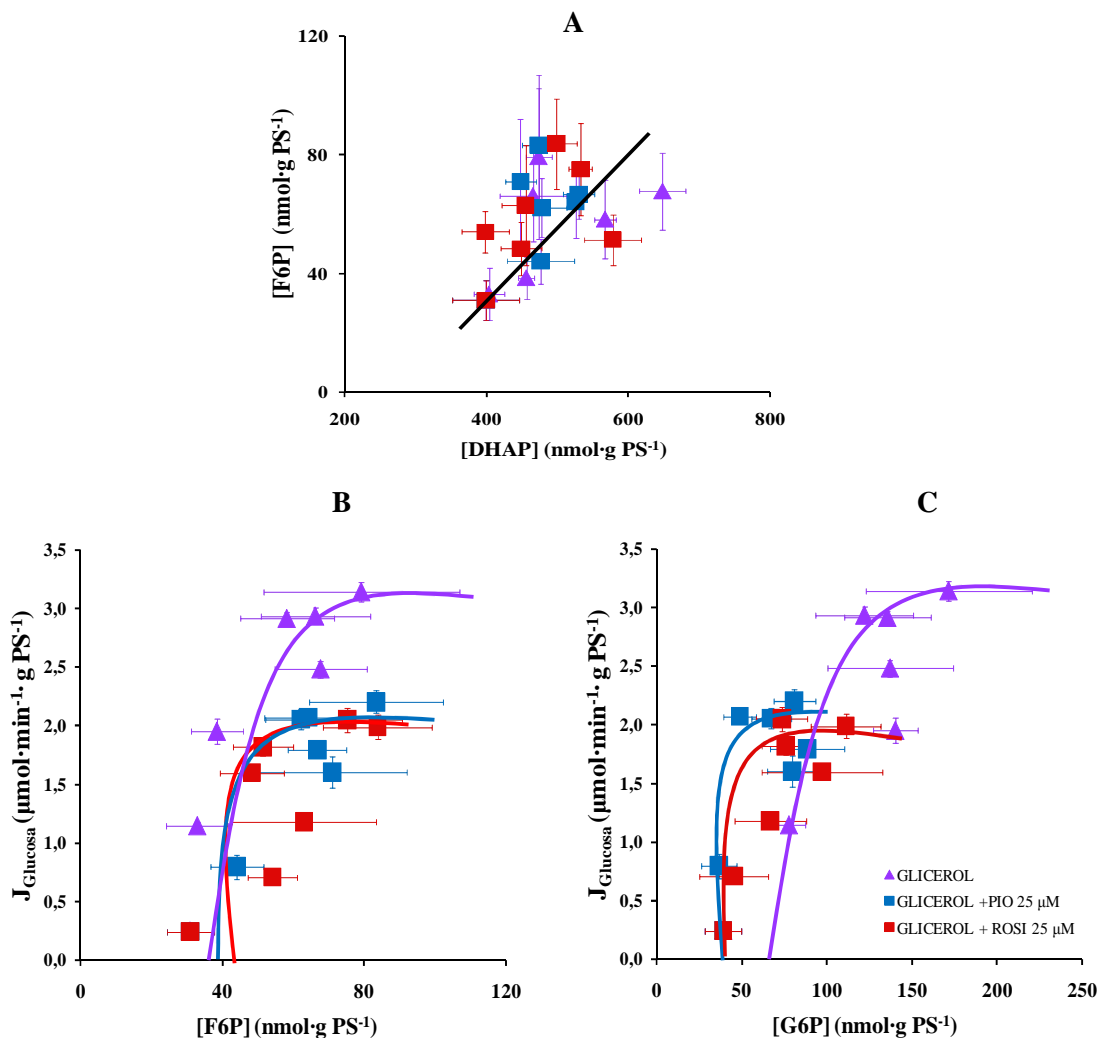


**Figura 15. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de fructosa**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno en presencia de fructosa, con pioglitazona 25 μM (■), rosiglitazona 25 μM (■) o su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 5**. Las concentraciones intracelulares de G6P y de F6P se midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre DHAP y F6P; la **figura B** muestra el efecto de los dos antidiabéticos sobre la relación entre F6P y *J*<sub>Glucosa</sub>; la **figura C** muestra el efecto de ambos fármacos sobre la relación entre G6P y *J*<sub>Glucosa</sub>. Los resultados se expresan como media ± EEM; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de glitazona

### 3.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de glicerol

Centrándonos en los experimentos de perfusión de hepatocitos en presencia de glicerol expuestos en el apartado 1.3. (figura 8A y anexo 2) y analizando los intermediarios F6P y G6P, vemos que tanto PIO como ROSI inhiben la gluconeogénesis hepática mediante el mismo mecanismo que en los experimentos a partir de fructosa. Aunque las dos glitazonas alteran ligeramente la fosforilación de la DHA, las etapas de control clave en la inhibición de la gluconeogénesis son alguna entre la DHAP y la glucosa. Los valores de F6P y DHAP en las 3 situaciones estudiadas se correlacionan (figura 16A), lo cual nos indica que estos dos agentes no actúan sobre “el ciclo de las fructosas”. Por lo tanto, el principal lugar de acción de ambas glitazonas sobre la GNG debe estar localizado más arriba de la F6P. Al funcionar la PGI en condiciones próximas al equilibrio, al igual que sucedió con los dos sustratos anteriores, con el glicerol también obtuvimos una doble relación idéntica al representar el flujo gluconeogénico frente a la F6P (figura 16B) y la G6P (figura 16C). Esta doble relación nos indica que, en este caso también, la inhibición de la gluconeogénesis hepática inducida por PIO y ROSI se debe a una potente inhibición de la hidrólisis de G6P a nivel de la G6Pasa

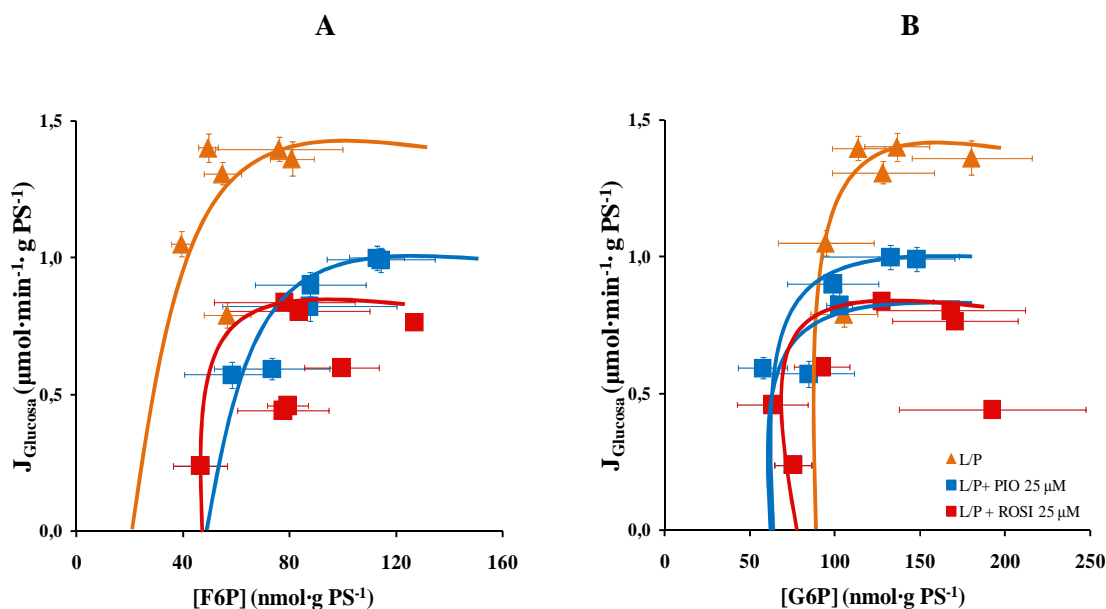


**Figura 16. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir del glicerol**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno en presencia de glicerol, con pioglitazona 25  $\mu\text{M}$  (■), rosiglitazona 25  $\mu\text{M}$  (■) o su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 8**. Las concentraciones intracelulares de G6P y de F6P se midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre DHAP y F6P; la **figura B** muestra el efecto de los dos antidiabéticos sobre la relación entre F6P y *J*Glucosa; la **figura C** muestra el efecto de ambos fármacos sobre la relación entre G6P y *J*Glucosa. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de glitazona

### 3.4. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de lactato+piruvato

Al igual que ocurrió con los otros 3 sustratos anteriores (DHA, fructosa y glicerol), cuando realizamos la perfusión de hepatocitos con lactato+piruvato (**figura 9 y 10B**) gracias al análisis de los intermediarios G6P y F6P demostramos que el punto de control clave en la inhibición de la GNG por parte de PIO y ROSI se encuentra a nivel de la enzima G6Pasa. En presencia de lactato+piruvato como sustrato y representando *J*Glucosa frente a F6P (**figura 17A**) y G6P (**figura 17B**), podemos deducir que la disminución de la gluconeogénesis a partir de L/P por las dos glitazonas se debe a un efecto inhibitorio localizado más allá de la F6P, como se indica en la doble relación obtenida en ambas representaciones. En nuestras condiciones, la doble relación que obtenemos entre la G6P y la *J*Glucosa refleja la potente inhibición de la hidrólisis de G6P a nivel de la G6Pasa que producen PIO y ROSI.



**Figura 17. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis a partir de lactato+piruvato**

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno en presencia de lactato+piruvato, con pioglitazona 25  $\mu\text{M}$  (■), rosiglitazona 25  $\mu\text{M}$  (■) o su vehículo (▲) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 9**. Las concentraciones intracelulares de G6P y de F6P se

midieron en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **figura A** muestra el efecto de los dos antidiabéticos sobre la relación entre F6P y *JGlucosa*; la **figura B** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre G6P y *JGlucosa*. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=4 preparaciones distintas de hepatocitos para cada concentración de glitazona

**Los resultados obtenidos indican que, independientemente del sustrato utilizado (DHA, fructosa, glicerol o lactato/piruvato), pioglitazona y rosiglitazona inhiben la gluconeogénesis hepática inhibiendo la liberación de la glucosa a partir de la G6P mediante un efecto localizado posiblemente sobre la enzima G6Pasa**

Por todo lo anteriormente expuesto, decidimos determinar la actividad de la enzima glucosa 6-fosfatasa en presencia y ausencia estas dos glitazonas. Además y dado que el glucagón es una hormona hipergluceante que actúa principalmente liberando la glucosa a partir de la G6P, decidimos investigar los posibles efectos antiglucaón de pioglitazona y rosiglitaonza a nivel de la G6Pasa.

## **4. EFECTO ANTI-GLUCAGÓN DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE EL METABOLISMO DE LA DHA**

El glucagón es una hormona hiperglucemiante cuyas acciones principales consisten antagonizar los efectos hipoglucemiantes de la insulina. Por otra parte, en personas diabéticas los niveles del glucagón son altos, aunque no se sabe aún la causa de este aumento o si es causa o consecuencia de la diabetes. Por ello, decidimos investigar si pioglitazona y rosiglitazona, con claras acciones hipoglucemiantes inhibiendo la gluconeogénesis hepática, son también capaces o no de antagonizar los efectos metabólicos del glucagón, especialmente sus efectos sobre la GNG. Con ese objetivo realizamos experimentos de perfusión con hepatocitos aislados a partir de ratas sometidas a un ayuno de 24h y perfundidos con el sustrato metabólico DHA, en presencia y ausencia de PIO o ROSI a la dosis de 25  $\mu$ M y glucagón ( $10^{-7}$  M). Perfundimos los hepatocitos con las glitazonas a la misma concentración (25  $\mu$ M) que la que empleamos en los experimentos de perfusión presentados en todos los puntos anteriores de esta sección de “*Resultados*”.

### **4.1. Efecto antiglucagón de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis**

Es necesario recordar que el glucagón estimula la gluconeogénesis hepática mediante un mecanismo estimulador de la síntesis de la enzima clave de la GNG, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Además, también estimula otra enzima gluconeogénica, la fructosa-1,6-bifosfatasa, mediante un mecanismo indirecto (**ver punto 5.2 de la sección “El hígado” de Introducción**). En nuestras condiciones de estudio demostramos que el glucagón, en efecto, aumenta la gluconeogénesis respecto a la situación control en un 98% (**figura 18A**) a partir del segundo estado estacionario de la perfusión (concentración 0,2 mM de DHA). Esta enorme activación de la GNG, de casi el doble, se mantuvo constante hasta el final del experimento. En esta misma figura podemos observar que PIO y ROSI contrarrestaron parcialmente el efecto pro-activador del glucagón, revirtiendo la GNG hepática en un 25%. Curiosamente, las dos glitazonas actuaron de una manera muy similar entre sí y en este punto no observamos un efecto más potente de ROSI frente a PIO, como ocurrió en las perfusiones a partir de DHA en las que no infundimos glucagón (**figura 2**).

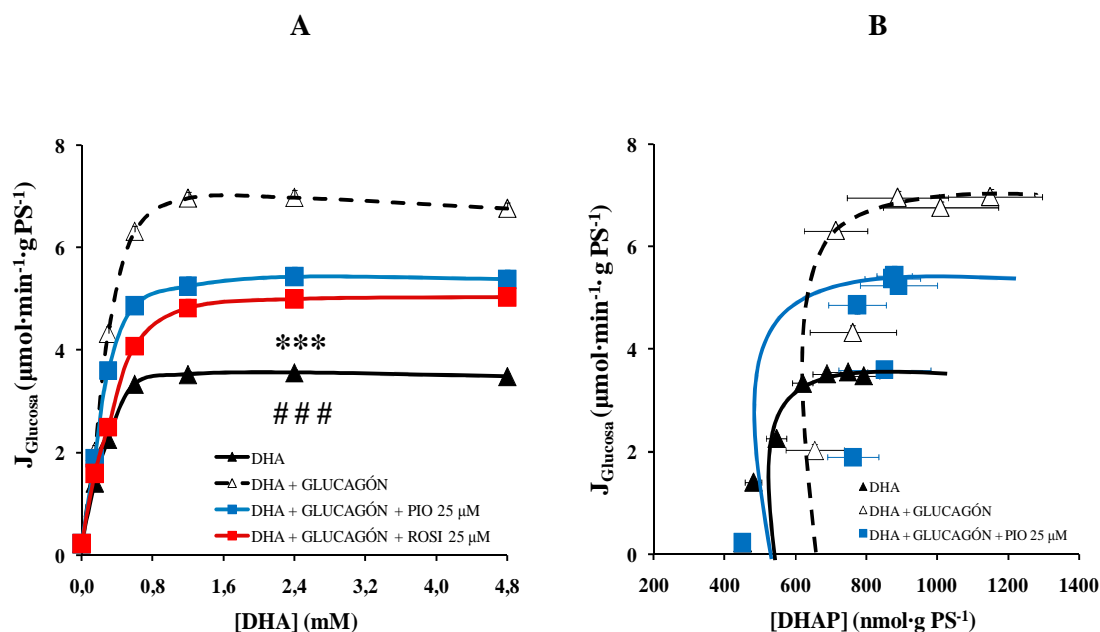
En estos mismos experimentos, también analizamos los intermediarios metabólicos DHAP, G6P y F6P en cada estado estacionario con el fin de dilucidar el lugar de acción anti-glucagón de PIO y ROSI. La **figura 18B** muestra que, en presencia de glucagón, existe una doble relación entre DHAP y  $J_{Glucosa}$ . El glucagón, además de aumentar el flujo gluconeogénico, lógicamente también aumenta la concentración de DHAP. Dada la activación espectacular de la relación entre DHAP y  $J_{Glucosa}$  por efecto del glucagón en ausencia de los antidiabéticos (**Figura 18B**), parece claro que la

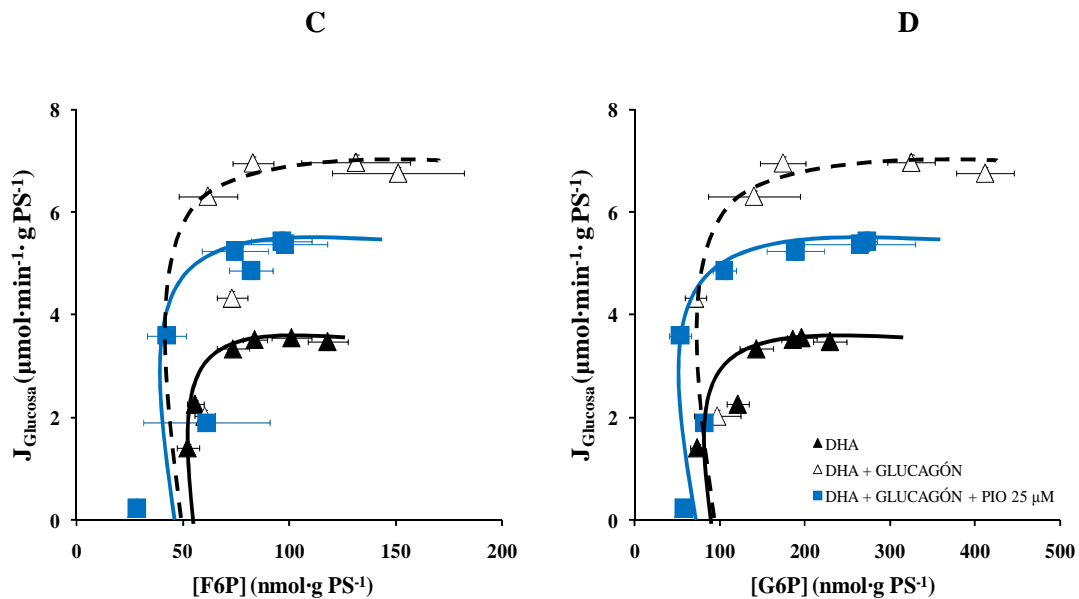


estimulación de la gluconeogénesis por el glucagón se debe, sobre todo, a un efecto localizado en una o varias etapas situadas entre este intermediario metabólico y la glucosa. La existencia de una doble relación entre F6P y el flujo gluconeogénico (figura 18C) indica claramente un efecto de la hormona situado más allá de la F6P. Como la G6P está en equilibrio con la F6P a través de la PGI, encontramos una relación idéntica entre G6P y  $J_{Glucosa}$  (figura 18D), lo que confirma que el glucagón activaca fuertemente la hidrólisis de la G6P a glucosa en la última etapa de la vía metabólica.

Como obtuvimos un efecto muy parecido entre los dos fármacos de estudio, únicamente exponemos los valores de los intermediarios metabólicos (DHAP, G6P y F6P) obtenidos en la situación en la que infundimos en una misma cámara PIO con glucagón. La administración de PIO 25  $\mu\text{M}$  modificó las tres relaciones presentadas que entre el flujo gluconeogénico y DHAP, F6P y G6P. En presencia de PIO+glucagón se revirtió el efecto del glucagón, inhibiéndose la formación de DHAP (figura 18B) y por tanto, la concentración de F6P (figura 18C). Sin embargo, de la interpretación de la figura 18D deducimos que toda esta F6P que se transforma en G6P no se defosforiló hasta glucosa, ya que obtuvimos un ligero aumento de los valores de G6P por acción de PIO+glucagón respecto a los valores control. La acumulación de G6P por acción de PIO nos indica que PIO, en estas condiciones en presencia de glucagón, inhibe a la enzima G6Pasa.

**Pioglitazona y rosiglitazona inhiben la gluconeogénesis a partir de DHA por un efecto situado en la última etapa de la vía metabólica que cataliza la reacción de hidrólisis de G6P a glucosa. Los dos fármacos ejercen su efecto anti-glucagón en esta misma etapa. Este efecto puede deberse a una inhibición de la enzima glucosa-6-fosfatasa**





**Figura 18. Efecto antiglucagón de pioglitazona y rosiglitazona en hepatocitos de rata perfundidos con DHA**

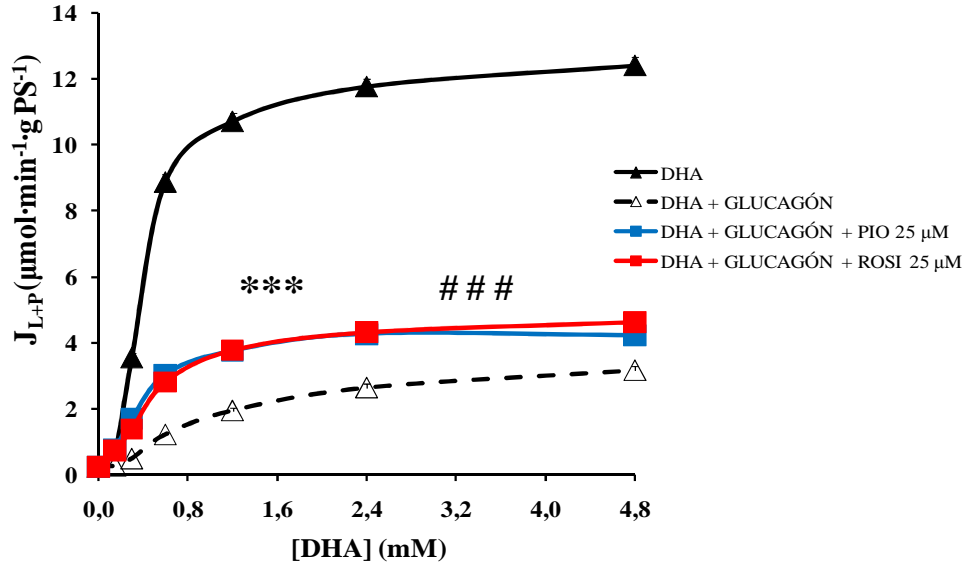
Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml) se aislaron de ratas Wistar machos en ayuno durante 24 horas y fueron perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la sección de “Material y Métodos”. Después de un primer estado estacionario sin sustrato, la DHA se perfundió en las dos cámaras a concentraciones crecientes (0,15; 0,30; 0,60; 1,20; 2,40 y 4,80 mM) con el vehículo ( $\blacktriangle$ ), con el glucagón ( $10^{-7}$  M) y el vehículo ( $\triangle$ ) o con el glucagón ( $10^{-7}$  M) y pioglitazona 25  $\mu$ M ( $\blacksquare$ ) o rosiglitazona 25  $\mu$ M ( $\bullet$ ). El flujo de la gluconeogénesis ( $J_{Glucosa}$ ) representado en la **figura A** se calculó a partir de las concentraciones de glucosa del perfusato. En cada estado estacionario, se recogieron muestras de células de las dos cámaras y se centrifugaron a través de una capa de aceite como se ha descrito en la sección de “Material y Métodos”. Las concentraciones intracelulares de DHAP, G6P y F6P se midieron en la fracción celular neutralizada. La **figura B** muestra la relación entre la DHAP y  $J_{Glucosa}$ , la **figura C** muestra la relación entre F6P y  $J_{Glucosa}$ , la **figura D** muestra la relación entre G6P y  $J_{Glucosa}$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos para cada condición. \*\*\*p<0,001 valores de PIO respecto a los control a la concentración de DHA correspondiente. ### p<0,001 valores de ROSI respecto a los control

#### 4.2. Investigación del posible efecto antiglucagón de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis

En los mismos experimentos mencionados en el apartado anterior, también se investigó el flujo glucolítico ( $J_{L+P}$ ) y su influencia por el glucagón y las glitazonas en hepatocitos perfundidos con DHA.

En la **figura 19** demostramos que, como cabría esperar, el glucagón inhibió el flujo glucolítico en un 82% a partir del mismo momento en que comenzamos a infundirlo en las cámaras de perfusión junto con la DHA y las glitazonas o su vehículo. Pioglitazona y rosiglitazona antagonizaron el efecto del glucagón, aumentando la glucólisis hasta en un 120% en todos los estados estacionarios. En este punto, como ocurrió en la

gluconeogénesis, no existieron diferencias entre las dos glitazonas: ambas fueron igual de potentes en su capacidad de revertir el efecto del glucagón.



**Figura 19. Efecto del glucagón sobre la glucólisis de los hepatocitos de rata perfundidos con DHA en presencia o no de pioglitazona y rosiglitazona**

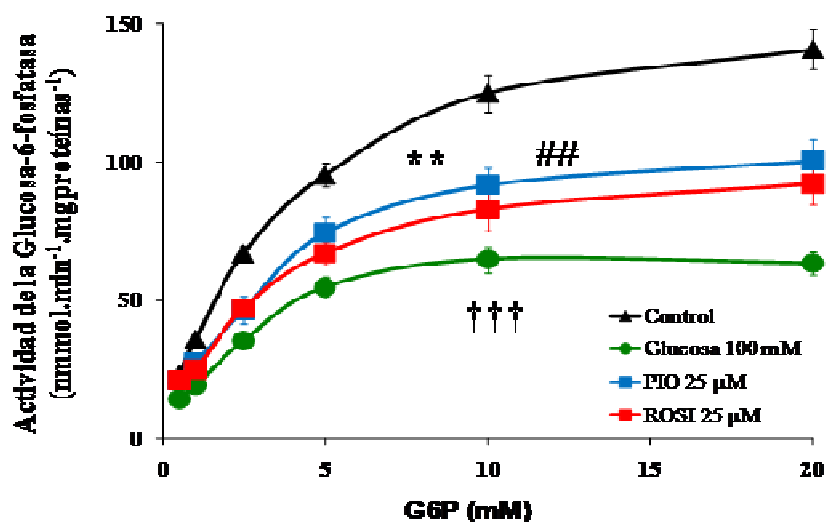
Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml) fueron perfundidos a 37°C con Krebs-Bicarbonato-Calcio saturado en carbógeno, con DHA y vehículo (▲); con DHA, glucagón ( $10^{-7}$  M) y vehículo (△) o con DHA, glucagón ( $10^{-7}$  M) y pioglitazona 25 μM (■) o rosiglitazona (■) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 18**. El flujo de la glucólisis ( $J_{L+P}$ ) se calculó a partir de las concentraciones de lactato más piruvato del perfusato. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=5 preparaciones distintas de hepatocitos para cada condición. \*\*\*p<0,001 valores de PIO respecto a los control a la concentración de DHA correspondiente. ### p<0,001 valores de ROSI respecto a los control

## 5. EFECTO DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-FOSFATASA

Los resultados y conclusiones que expusimos en los apartados anteriores 3 y en el 4.1. indican que la doble relación resultado del efecto de PIO y ROSI entre la concentración de G6P y el flujo gluconeogénico, es reflejo de una potente inhibición de la hidrólisis de la G6P por acción de estos dos antidiabéticos a nivel de la enzima clave en la última etapa de la GNG: glucosa-6-fosfatasa. Esto sucede con todos los sustratos utilizados: DHA, fructosa, glicerol y lactato/piruvato (figura 14C, figura 15C, figura 16C y figura 17B).

Para investigar los efectos directos de pioglitazona y rosiglitazona sobre esta enzima, determinamos la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa según la técnica de Baginski y cols. (Baginski y cols., 1975). Para lo cual, los hepatocitos se incubaron en dos tiempos: en primer lugar con Krebs-Bicarbonato-Calcio con DHA y en segundo lugar con tampón sacarosa-Tris, añadiendo a éste último concentraciones conocidas y crecientes de G6P. Así, pudimos investigar el efecto “directo” de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de esta enzima (los fármacos se añadieron en la segunda incubación) (ver Material y Métodos). Esta determinación se realizó también utilizando como control positivo glucosa 100 mM, que es un inhibidor tipo de referencia de la enzima G6Pasa.

En la siguiente figura (figura 20) podemos ver como PIO, ROSI y la glucosa 100 mM inhibieron la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa a partir de la primera concentración de G6P empleada (0,5 mM). El efecto inhibitorio de ROSI fue ligeramente superior al producido por PIO, un 30% frente a un 26%, respectivamente, a partir de una concentración de G6P de 1 mM. Como es lógico, la glucosa 100 mM produjo la mayor inhibición en torno a un 50 %, que se mantuvo en valores constantes también a partir de 1 mM de glucosa.



**Figura 20. Efecto “directo” de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de la glucosa-6-fosfatasa in vitro**

La actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa se determinó en hepatocitos de rata incubados en dos tiempos: la primera incubación fue de 30 minutos a 37°C en Krebs-Bicarbonato-Calcio con DHA 20 mM y la segunda fue de 10 minutos a 37°C en tampón sacarosa-Tris con distintas concentraciones de G6P. Se estudió el “efecto directo” de las dos glitazonas a la dosis 25 µM cuando se añadieron en la segunda incubación. Tras el choque hipo-osmótico con Tris y la sonicación, se evaluó la actividad de la enzima glucosa-6-fosfatasa, midiendo el fosfato inorgánico (Pi) liberado mediante la hidrólisis de la G6P, como está descrito en la sección de Material y Métodos. La contribución de la actividad de las fosfatasas no-específicas se estimó mediante la hidrólisis del β-glicerofosfato en lugar de la G6P en las mismas condiciones experimentales y se restó a todas las medidas. Los resultados se expresan como media ± EEM; n=15 incubaciones para nueve preparaciones celulares distintas. \*\*p<0,01 valores de PIO respecto a los control a la concentración de G6P correspondiente; ## p<0,01 valores de ROSI respecto a los control a la concentración de G6P correspondiente; ††† p<0,001; valores de glucosa 100 mM respecto a los control a la concentración de G6P correspondiente

La siguiente tabla (tabla 5) muestra los parámetros cinéticos,  $K_m$  (constante de afinidad) y la  $V_{max}$  (velocidad máxima) de la enzima G6Pasa (enzima Michaeliana) en la situación control, en presencia de glucosa 100 mM, de PIO y de ROSI a la misma concentración de 25 µM. En ella podemos observar el clásico efecto inhibitorio de la elevada concentración de glucosa sobre la actividad de la glucosa 6-fosfatasa (Arion y Wallin, 1973). Esta tabla también nos muestra que las dos glitazonas sometidas a estudio actúan de forma directa sobre la enzima. Concretamente, PIO y ROSI inhiben la velocidad máxima de la G6Pasa en un 31% y 27%, respectivamente, sin afectar de forma significativa a su constante de afinidad. Resulta paradójico que habiendo encontrado una mayor inhibición de la actividad de la enzima por parte de ROSI respecto a PIO, sea pioglitazona quien inhibe en mayor porcentaje la  $V_{max}$  de la enzima.

GLUCOSA-6-FOSFATASA	EFECTO DIRECTO	
	$K_m$ mM	$V_m$ nm·min <sup>-1</sup> ·mg proteínas <sup>-1</sup>
Control	3,43 ± 0,3	160 ± 13
Glucosa 100 mM	2,86 ± 0,3	65 ± 8***
Pioglitazona 25 µM	2,89 ± 0,6	111 ± 15*
Rosiglitazona 25 µM	3,78 ± 0,9	118 ± 17

**Tabla 5. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la cinética de la enzima glucosa-6-fosfatasa “in vitro”**

Los valores  $K_m$  y  $V_{max}$  de la enzima glucosa-6-fosfatasa se calcularon ajustando la curva con la ecuación de Michaelis-Menten mediante el Ultrafit software. La calidad del índice de ajuste era de  $0,98 \pm 0,01$ . Los resultados se expresan como media ± EEM; n=15 incubaciones para nueve preparaciones celulares distintas. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 vs. valores control

**Estos resultados muestran que, con dihidroxiacetona como sustrato, la inhibición de la gluconeogénesis por pioglitazona y rosiglitazona efectivamente se debe a la inhibición de la enzima G6Pasa**

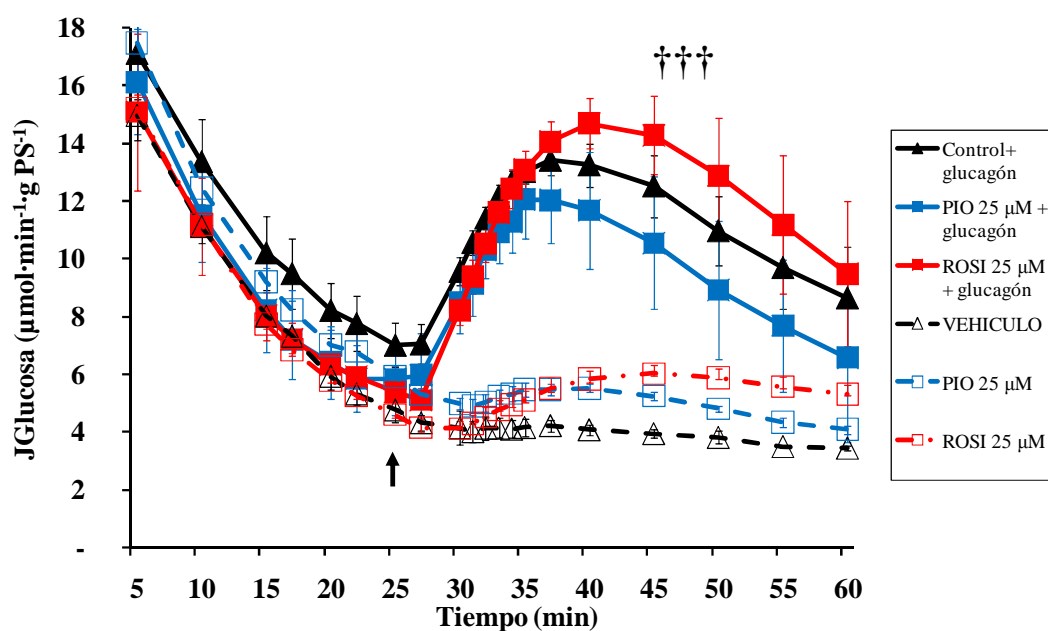
## **6. EFECTO DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE LA GLUCÓGENOLISIS**

Dado que las dos glitazonas investigadas (pioglitazona y rosiglitazona) afectan profundamente el metabolismo hepático, inhibiendo la GNG y activando la glucólisis, decidimos investigar el efecto de ambos agentes sobre la glucogenolisis hepática debido a la gran relación que guarda este proceso metabólico con el metabolismo hepático global. Para llevar a cabo este proceso, utilizamos ratas no en ayunas, con libre acceso a la comida y al agua durante toda la noche anterior al experimento, con el fin de asegurarnos de que las reservas del glucógeno hepático estuviesen elevadas. Se obtuvieron los hepatocitos y se realizaron experimentos de perifusión, donde se monitorizó en el perifusato a distintos tiempos la liberación de la glucosa, del lactato y del piruvato, en presencia o ausencia de pioglitazona o rosiglitazona 25  $\mu\text{M}$  junto con glucagón ( $10^{-7}$  M), hormona hiperglucemiante que estimula la glucogenolisis hepática.

### **6.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el flujo de glucosa**

La siguiente figura (**figura 21**) representa el flujo de la glucosa liberada a partir del glucógeno ( $J_{Glucosa}$ ) de hepatocitos en perifusión, en función del tiempo en presencia o ausencia de 25  $\mu\text{M}$  de pioglitazona o rosiglitazona con o sin glucagón ( $10^{-7}$  M). El glucagón y los antidiabéticos se administraron en el minuto 25 ( $t_{25}$ ) de la perifusión, tras un período de estabilización de los hepatocitos.

En la situación en que no infundimos glucagón en las cámaras de perifusión, la liberación de glucosa se fue ralentizando hasta valores mínimos. De manera muy interesante, tanto PIO como ROSI activaron, aunque no significativamente, la glucogenolisis hepática en ausencia de glucagón en un 30%. Sin embargo, tras infundir la hormona al  $t_{25}$  el flujo de la glucosa liberada aumentó significativamente en más de un 217% para luego disminuir a partir del  $t_{35}$ , tal y como se esperaba (Guigas, 2003). En este punto, ninguna de las dos glitazonas ejerció un efecto antiglucagón sobre la liberación de glucosa, ya que, paradójicamente PIO inhibió este flujo mientras que ROSI lo activó. El efecto de ambas (tanto inhibidor como activador), de un 10%, no fue significativo.



**Figura 21: Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el flujo de liberación de glucosa a partir del glucógeno en los hepatocitos de rata perifundidos**

Los hepatocitos (100 mg de peso seco en 15 ml) se aislaron a partir de ratas Wistar machos no en ayunas, con acceso ad libitum a la comida y al agua y fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la sección de Material y Métodos. Después de un periodo de estabilización de 25 minutos, se infundieron el vehículo ( $\Delta$ ), pioglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), rosiglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), el glucagón ( $10^{-7}$  M) junto con el vehículo ( $\blacktriangle$ ) o junto con pioglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) o rosiglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ). Esta figura muestra el flujo de producción de glucosa liberada a partir del glucógeno ( $J_{\text{Glucosa}}$ ). Este flujo se calculó a partir de las concentraciones de glucosa en el perfusato. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=4 preparaciones distintas de hepatocitos.  $\dagger\dagger\dagger$   $p < 0,001$  valores de glucagón  $10^{-7}$  M respecto a los del vehículo sin glucagón a los tiempos correspondientes

## 6.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis a partir de la glucosa liberada por la glucógenolisis

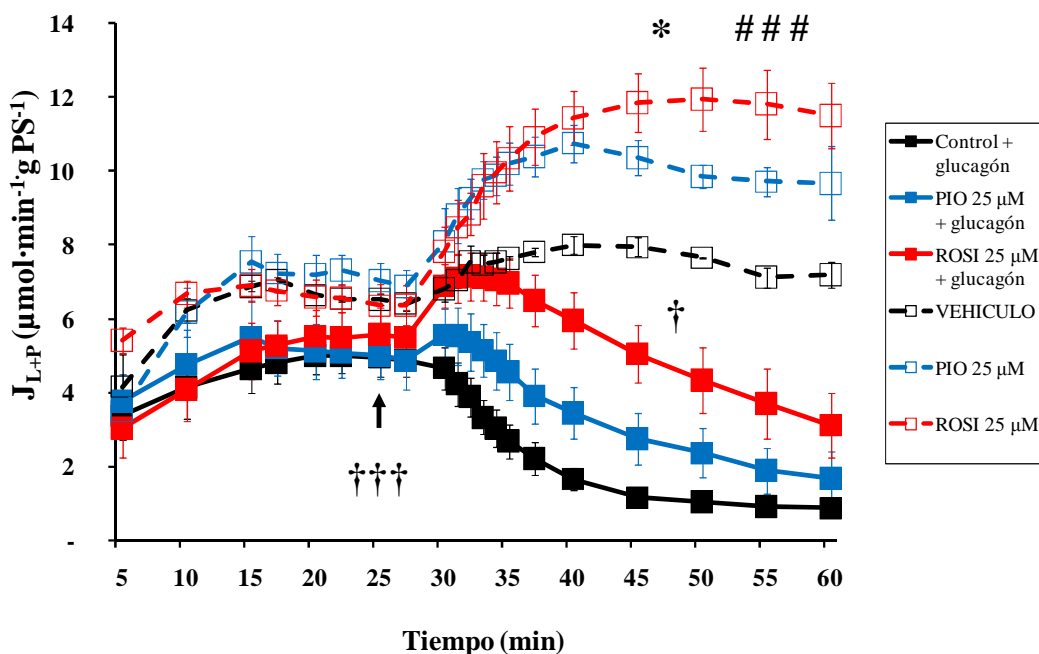
En los mismos experimentos de perfusión mostrados en el apartado anterior (figura 21), también medimos el flujo glucolítico ( $J_{L+P}$ ) en el perfusato recogido a diferentes tiempos. Realizamos estos experimentos en presencia o ausencia de glucagón  $10^{-7}$  M junto con o sin pioglitazona y rosiglitazona.

Cuando infundimos solamente el glucagón en las cámaras de perfusión, sin presencia de las glitazonas, los dos fármacos activaron la glucólisis al igual que lo hicieron en los experimentos de perfusión de hepatocitos realizados para investigar el metabolismo global de DHA, fructosa y glicerol (figuras 2B, 5B y 8B). La activación obtenida fue de un 33% en el caso de PIO y de un 40% en el de ROSI (figura 22). Esta activación se mantuvo constante hasta el final del experimento. La administración de glucagón

inhibió drásticamente el flujo glucolítico en un 71,5% (de  $7,80 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g PS}^{-1}$  a  $2,22 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g PS}^{-1}$  a t37). Las dos glitazonas, en esta situación junto con el glucagón, también activaron la glucólisis de la glucosa liberada a partir del glucógeno. El efecto encontrado fue muy potente y significativo:

a t=37, pioglitazona activó  $J_{L+P}$  en un 76% y ROSI en más de un 193%

Por lo tanto, estos resultados son coherentes con la acción de los dos fármacos sobre la glucólisis comentada anteriormente. Además, debido al efecto casi nulo de las dos glitazonas sobre la liberación de glucosa por glucogenólisis (apartado 6.1.), podemos concluir que tanto pioglitazona como rosiglitazona ejercen un efecto anti-glucagón, revirtiendo la acción hiperglucemiante de la hormona, a través de una activación la glucólisis y degradación de la glucosa liberada a partir del glucógeno hepático.



**Figura 22. Efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre el flujo glucolítico en hepatocitos de rata perifundidos**

Los hepatocitos (100 mg de peso seco en 15 ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a  $37^{\circ}\text{C}$  saturado en carbógeno con el vehículo ( $\Delta$ ), pioglitazona  $25 \mu\text{M}$  ( $\square$ ), rosiglitazona  $25 \mu\text{M}$  ( $\square$ ), el glucagón ( $10^{-7} \text{ M}$ ) junto con el vehículo ( $\blacktriangle$ ) o junto con pioglitazona  $25 \mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) o rosiglitazona  $25 \mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 21**. El flujo glucolítico ( $J_{L+P}$ ) se calculó a partir de las concentraciones de lactato más piruvato en el perfusado. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=4 preparaciones distintas de hepatocitos.  $\dagger\dagger\dagger$   $p < 0,001$  valores de glucagón  $10^{-7} \text{ M}$  respecto a los del vehículo sin glucagón a los tiempos correspondientes;  $\dagger$   $p < 0,05$  valores de PIO o ROSI sin glucagón respecto a los valores vehículo sin glucagón a los tiempos correspondientes; ###  $p < 0,001$  valores de ROSI+glucagón respecto a los valores glucagón a los tiempos correspondientes; \*  $p < 0,05$  valores de PIO+glucagón respecto a los de glucagón a los tiempos correspondientes

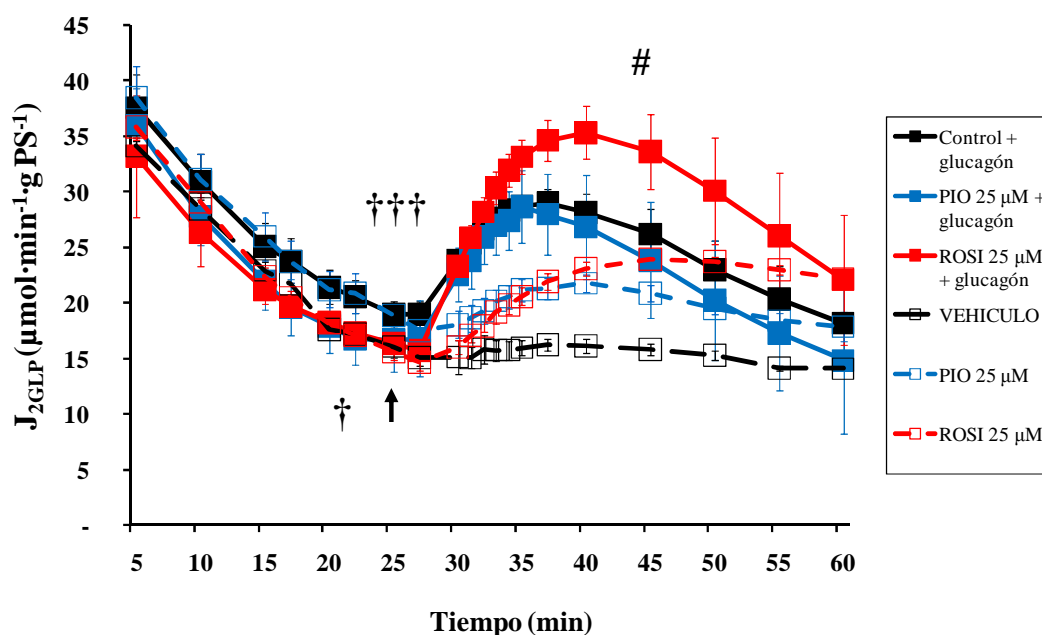


### 6.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre el flujo metabólico total producido por el metabolismo de la glucosa liberada del glucógeno hepático

La figura siguiente (**figura 23**) representa el flujo metabólico total en función del tiempo. Recordamos que el flujo metabólico total ( $J_{2GLP}$ ) se expresa en forma de equivalentes de 3 carbonos mediante la suma de 2xglucosa + lactato + piruvato.

Cuando se administra el glucagón en el t25, el flujo metabólico total aumenta en un 78,5% con respecto a los experimentos control en los que administramos únicamente el vehículo donde se disolvieron los fármacos (se pasa de valores de  $16,26 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g PS}^{-1}$  a valores de  $29,03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g PS}^{-1}$  por acción del glucagón). La administración simultánea de PIO junto con el glucagón no modificó significativamente el flujo metabólico total inducido por la hormona. Mientras que la administración conjunta del glucagón junto con ROSI sí que resultó en un aumento en más de un 24% del  $J_{2GLP}$ . Estos resultados se explican por la activación en la degradación de la glucosa liberada a partir del glucógeno que producen estas dos glitazonas. Así, en el caso de PIO la ligera disminución en  $J_{Glucosa}$  (**figura 21**) se ve contrarrestada por la activación producida en el flujo glucolítico (**figura 22**) y cuando se trata de ROSI, la enorme activación del flujo glucolítico que produce prevalece sobre el ligero efecto que provoca a nivel de la glucógenolisis hepática.

Estos resultados obtenidos de la administración conjunta de las glitazonas junto con el glucagón son coherentes con los obtenidos cuando se administraron por separado todos los agentes. En efecto, la administración de PIO y ROSI (en ausencia de glucagón) también aumenta significativamente el flujo metabólico global respecto a la administración única del glucagón. El efecto neto de PIO y de ROSI consistió en aumentar el  $J_{2GLP}$  en un 29% y un 30%, respectivamente. Este efecto se encontró a t37 y se mantuvo constante hasta el final del experimento.



**Figura 23. Efectos de pioglitazona y rosiglitazona sobre el flujo metabólico total en hepatocitos de rata perifundidos**

Los hepatocitos (100 mg de peso seco en 15 ml) fueron perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno con el vehículo ( $\Delta$ ), pioglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), rosiglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\square$ ), el glucagón ( $10^{-7}$  M) junto con el vehículo ( $\blacktriangle$ ) o junto con pioglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) o rosiglitazona 25  $\mu\text{M}$  ( $\blacksquare$ ) tal y como está descrito en la leyenda de la **figura 21**. El flujo metabólico total ( $J_{2GLP}$ ) se expresa en forma de equivalentes de 3 carbonos mediante la suma de 2xglucosa+lactato+piruvato. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; n=4 preparaciones distintas de hepatocitos. ††† p<0,001 valores de glucagón  $10^{-7}$  M respecto a los del vehículo sin glucagón a los tiempos correspondientes; † p<0,05 valores de PIO o ROSI sin glucagón respecto a los valores vehículo sin glucagón a los tiempos correspondientes; # p<0,05 valores de ROSI+glucagón respecto a los valores glucagón a los tiempos correspondientes

## 7. EFECTO DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA SOBRE LA RESPIRACIÓN EN HEPATOCITOS INTACTOS

Hemos visto en los apartados anteriores de esta primera parte de Resultados que presentamos en esta Tesis Doctoral, que pioglitazona y rosiglitazona afectan en gran medida el metabolismo hepático con todos los sustratos metabólicos ensayados (DHA, fructosa, glicerol y lactato+piruvato). En este sentido, y dada la relación que guarda el metabolismo energético con el metabolismo mitocondrial, decidimos investigar si la estos dos antidiabéticos afectan también a la respiración celular en hepatocitos intactos incubados en viales en presencia DHA (para revisión ver apartado 4.2.2. de la sección Modelos Experimentales pertenecientes a “Materiales y Métodos”). Medimos el consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) en hepatocitos intactos aislados en una cámara de oxigrafía equipada con un “electrodo de Clark” tras 15 minutos de pre-incubación con el sustrato y otros 30 minutos adicionales en presencia o ausencia de pioglitazona a concentración de 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Solamente vamos a presentar los resultados obtenidos en presencia o ausencia de pioglitazona, pero no de rosiglitazona, ya que en ambos casos fueron prácticamente idénticos (figura 24).

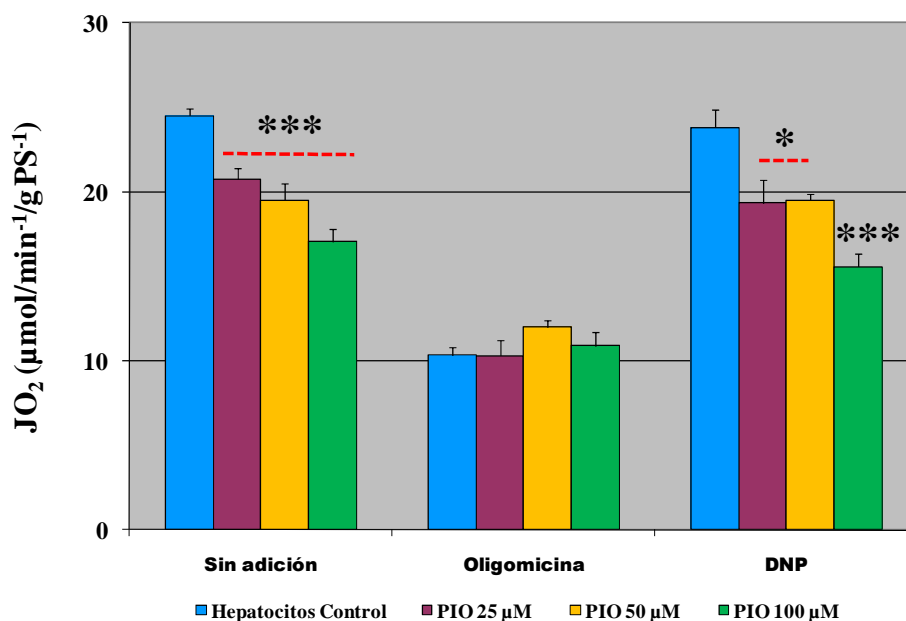


Figura 24. Efectos de pioglitazona sobre la respiración celular en hepatocitos aislados

Los hepatocitos ( $10 \text{ mg peso seco}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) aislados de ratas Wistar machos en ayunas se incubaron en Krebs-Bicarbonato-Calcio a  $37^\circ\text{C}$  saturado en carbógeno durante 15 minutos en viales cerrados con el sustrato DHA (20 mM) y 30 minutos adicionales con la adición de pioglitazona (25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo. La respiración celular se midió usando un oxígrafo equipado de un electrodo de Clark insertado en una cámara de oxigrafía termostatzada a  $37^\circ\text{C}$  donde depositamos las células. La medida del consumo de oxígeno se registró directamente después de transferir 2 ml del contenido del vial de incubación y se adicionó posteriormente oligomicina ( $6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y después DNP (100  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM; en 2 preparaciones distintas de hepatocitos. \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  comparado con el control

Al principio de cada punto de análisis en la cámara de oxigrafía, cuando registramos la respiración celular de los hepatocitos transferidos directamente desde el vial de incubación, obtuvimos una inhibición absolutamente clara por parte de la pioglitazona de forma dosis-dependiente (15% con PIO 25  $\mu$ M; 19,5% con PIO 50  $\mu$ M y 30% con PIO 100  $\mu$ M). Cuando inmediatamente después (en el mismo punto) añadimos la oligomicina (inhibidor clásico de la ATPasa que se fija en el canal  $F_0$  de la enzima provocando la inhibición de la respiración celular), la respiración celular disminuyó en más de un 50% y la presencia de pioglitazona, a todas las concentraciones ensayadas, no tuvo ningún efecto significativo a este respecto. En estas condiciones no fosforilantes, la respiración está únicamente controlada por la re-entrada pasiva de los protones a través de la membrana mitocondrial interna y refleja entonces exactamente los fenómenos de disipación de la energía a nivel de la cadena respiratoria asociados a las fugas de protones (leak) o a los patinajes de las bombas de protones (slipping). En presencia de oligomicina, según estos resultados, parece que pioglitazona no modifica en forma alguna este fenómeno de “leak” o fuga de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Este fenómeno será bien estudiado en la segunda parte los resultados presentados en esta tesis, gracia al estudio de la eficacia de la fosforilación oxidativa (P/O).

La inhibición de la respiración celular por acción de pioglitazona se volvió a hacer patente después de añadir el desacoplador de la cadena respiratoria dinitrofenol (DNP), justo después de haber registrado el  $JO_2$  durante 2 minutos en presencia de la oligomicina (19% con PIO 25  $\mu$ M; 18% con PIO 50  $\mu$ M y 35% con PIO 100  $\mu$ M). Este último dato apunta hacia que la inhibición de la respiración por pioglitazona no se debe a un efecto sobre la fosforilación del ADP en ATP a nivel de la ATPasa sino, posiblemente, a una acción del fármaco localizada antes del complejo V en la cadena respiratoria.

Estos resultados, obtenidos con hepatocitos intactos, los consolidaremos más adelante mediante el estudio de los efectos directos de pioglitazona y rosiglitazona en mitocondrias aisladas, hecho que trataremos a continuación en la segunda parte de resultados de esta tesis.

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
INVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

*PARTE*

*SEGUNDA PARTE*

*EFECTOS DIRECTOS MITOCONDRIALES  
DE PIOGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA*

Dado que las dos tiazolidindionas, pioglitazona y rosiglitazona, afectan el metabolismo energético hepático (inhibiendo la gluconeogénesis y activando la glucólisis), en esta parte de resultados nos centramos en el estudio de algunos efectos mitocondriales directos de los dos fármacos. Decidimos investigar la faceta mitocondrial de estos fármacos debido a la enorme relación que existe entre el metabolismo energético y el oxidativo. Esta investigación a nivel mitocondrial cobró una mayor importancia cuando demostramos que, pioglitazona y rosiglitazona no solamente inhiben la relación ATP/ADP citosólica, sino que también ejercen un claro efecto inhibitorio sobre la misma relación a nivel mitocondrial (**punto 2.4 de la parte 1 de los resultados de esta Tesis Doctoral**). Por ello, en primer lugar investigamos el efecto de PIO y ROSI sobre la respiración en mitocondrias aisladas y a continuación, abordamos el efecto directo de PIO y ROSI sobre el rendimiento de la fosforilación oxidativa (P/O) y sobre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la mitocondria. Finalmente, determinamos la actividad de los complejos respiratorios (I, II y III) por separado con el fin de esclarecer sobre qué punto concreto mitocondrial actúan ambos antidiabéticos orales.

## **1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la respiración mitocondrial**

Estudiamos la respiración mitocondrial ( $JO_2$ ), expresada como nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto y por mg de proteínas, en mitocondrias aisladas de hígados de ratas Wistar machos sin restricción de agua ni de comida.

Como ya describimos en el **punto 4.2.1. (Medida de la respiración en mitocondrias aisladas)** de la sección de **Material y Métodos**, las mitocondrias se suspendieron en el tampón de respiración KCl a 37°C con pioglitazona o rosiglitazona (10, 25, 50 y 100  $\mu$ M) o con su vehículo. La medida del consumo de oxígeno se realizó con un oxígrafo equipado de una cámara de oxigrafía y de un electrodo de Clark. Se emplearon dos tipos de sustratos respiratorios: el **glutamato/malato (GM)** para el complejo I o el **succinato/malato/rotenona (SM)** para el complejo II, lo que permite determinar la implicación de estos dos complejos de la cadena respiratoria mitocondrial en las posibles modificaciones de la respiración inducidas por estas dos glitazonas. El uso de la rotenona junto con el succinato/malato impide que se produzca el flujo reverso de los electrones a través del complejo I. En las dos situaciones, con los dos sustratos, se añade sucesivamente 1mM de ADP-Tris y 1,25  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de oligomicina, inhibidor de la ATPasa.

Recordamos brevemente los principales estados de la respiración mitocondrial (**para revisión ver punto 2.2.2 de la sección “La Mitocondria” perteneciente a la Introducción**):

- El **estado 4** representa la respiración en su estado basal, en presencia de equivalentes reducidos (sin añadir ADP).

- El **estado 3**, el estado fosforilante, representa un aumento de la respiración asociado a la síntesis de ATP (tras añadir ADP y Pi).

- El **estado desacoplado** representa la respiración en situación de desacoplamiento entre la transferencia de electrones y el bombeo de  $H^+$  con la fosforilación oxidativa (después de añadir un desacoplador protonóforo).

- El **estado de respiración**, estado 4 real, en presencia de oligomicina, un inhibidor de la ATPasa (estado 4 real).

En la tabla siguiente (**tabla 6**) hemos recogido los valores de la respiración mitocondrial ( $JO_2$ ) en sus diferentes estados en relación con las distintas dosis de pioglitazona y rosiglitazona utilizadas. Con los dos sustratos (GM y SM) encontramos que tanto PIO como ROSI activaron el **estado 4** (**figura 25**) de forma dosis dependiente, por lo tanto, la mayor activación se obtuvo a la concentración de glitazona de 100  $\mu M$ :

- con GM: el porcentaje de activación encontrado con PIO 100  $\mu M$  fue de un 88 % y el de ROSI, a la misma concentración, de un 104 % ;

- con SM: PIO y ROSI 100  $\mu M$  activaron el estado 4 un 155 % y un 141 %, respectivamente.

Por el contrario, la respiración asociada a la síntesis del ATP (el **estado 3** después de añadir ADP) (**figura 25**) con los dos sustratos se ve disminuida bajo el efecto de PIO y ROSI. No obstante, esta inhibición siguió un patrón dosis-dependiente cuando trabajamos con GM como sustrato, mientras que con SM, no encontramos este patrón de inhibición dosis-dependiente:

- Con GM: la mayor inhibición obtenida fue de un 52% con PIO y un 45% con ROSI, ambas a concentración 100  $\mu M$ .

- con SM: PIO inhibió con más fuerza el estado 3 a una concentración de 100  $\mu M$  en un 16%, mientras que ROSI inhibió más fuertemente, en un 11%, cuando se administró a una concentración de 10  $\mu M$ .

Para poder investigar la inhibición de PIO y ROSI sobre el estado 3, añadimos oligomicina (inhibidor clásico de la ATPasa que se fija en su canal  $F_0$ ). En la **tabla 6** se puede observar que la adición de oligomicina (estado 4 real) produce una inhibición de la respiración mitocondrial hasta un valor ligeramente inferior del valor obtenido con glutamato/malato o con succinato/malato sin ADP (estado 4). Esta ligera inhibición de  $JO_2$  en presencia de oligomicina se mantuvo con las diferentes concentraciones de PIO y ROSI por debajo del valor obtenido para las mismas dosis en el estado 4. Debido a que los dos antidiabéticos aumentan el estado 4, en algunos puntos encontramos valores

para el  $JO_2$  en el estado 4 y en el estado 4 real muy cercanos entre sí y algunas veces, incluso idénticos.

Tabla 6

	$JO_2$ (nátomo O/min/mgprot)		
	Estado 4	Estado 3	+ Oligo
<b>G/M</b>	16,36±0,42	163,65±6,44	15,47±0,89
<b>PIO 10 <math>\mu</math>M</b>	19,77±1,21	135,37±9,26	19,21±1,75
<b>PIO 25 <math>\mu</math>M</b>	21,58±1,60	116,30±7,50	20,88±2,10
<b>PIO 50 <math>\mu</math>M</b>	24,73±1,86	101,10±6,69	24,42±3,92
<b>PIO 100 <math>\mu</math>M</b>	30,76±2,13	79,12±5,74	29,59±4,48
<b>ROSI 10 <math>\mu</math>M</b>	19,06±0,78	137,69±9,45	17,42±1,34
<b>ROSI 25 <math>\mu</math>M</b>	22,00±1,03	129,69±11,03	20,39±1,39
<b>ROSI 50 <math>\mu</math>M</b>	26,90±1,14	117,77±9,13	25,08±1,65
<b>ROSI 100 <math>\mu</math>M</b>	33,46±1,62	89,63±7,23	33,50±3,14
<b>S/M</b>	44,19±1,72	241,54±9,60	40,10±2,38
<b>PIO 10 <math>\mu</math>M</b>	57,27±1,94	215,64±8,71	55,18±2,96
<b>PIO 25 <math>\mu</math>M</b>	63,97±1,97	224,34±7,83	57,73±1,19
<b>PIO 50 <math>\mu</math>M</b>	84,98±2,99	211,06±10,44	78,60±1,51
<b>PIO 100 <math>\mu</math>M</b>	113,08±3,30	203,37±10,36	112,99±6,14
<b>ROSI 10 <math>\mu</math>M</b>	50,68±2,82	215,44±20,44	44,97±4,39
<b>ROSI 25 <math>\mu</math>M</b>	62,11±3,71	232,56±16,24	54,71±4,95
<b>ROSI 50 <math>\mu</math>M</b>	81,96±6,07	246,11±16,64	76,71±9,66
<b>ROSI 100 <math>\mu</math>M</b>	106,58±6,67	227,42±16,38	100,28±9,95



En las siguientes figuras se puede observar con mayor claridad el efecto de PIO (figuras 25 A y C) y de ROSI (figuras 25 B y D) sobre los estados de la respiración: estado 4, estado 3 y estado 4 real; utilizando GM (figuras 25 A y B) y SM (figuras 25 C y D) como sustratos respiratorios.

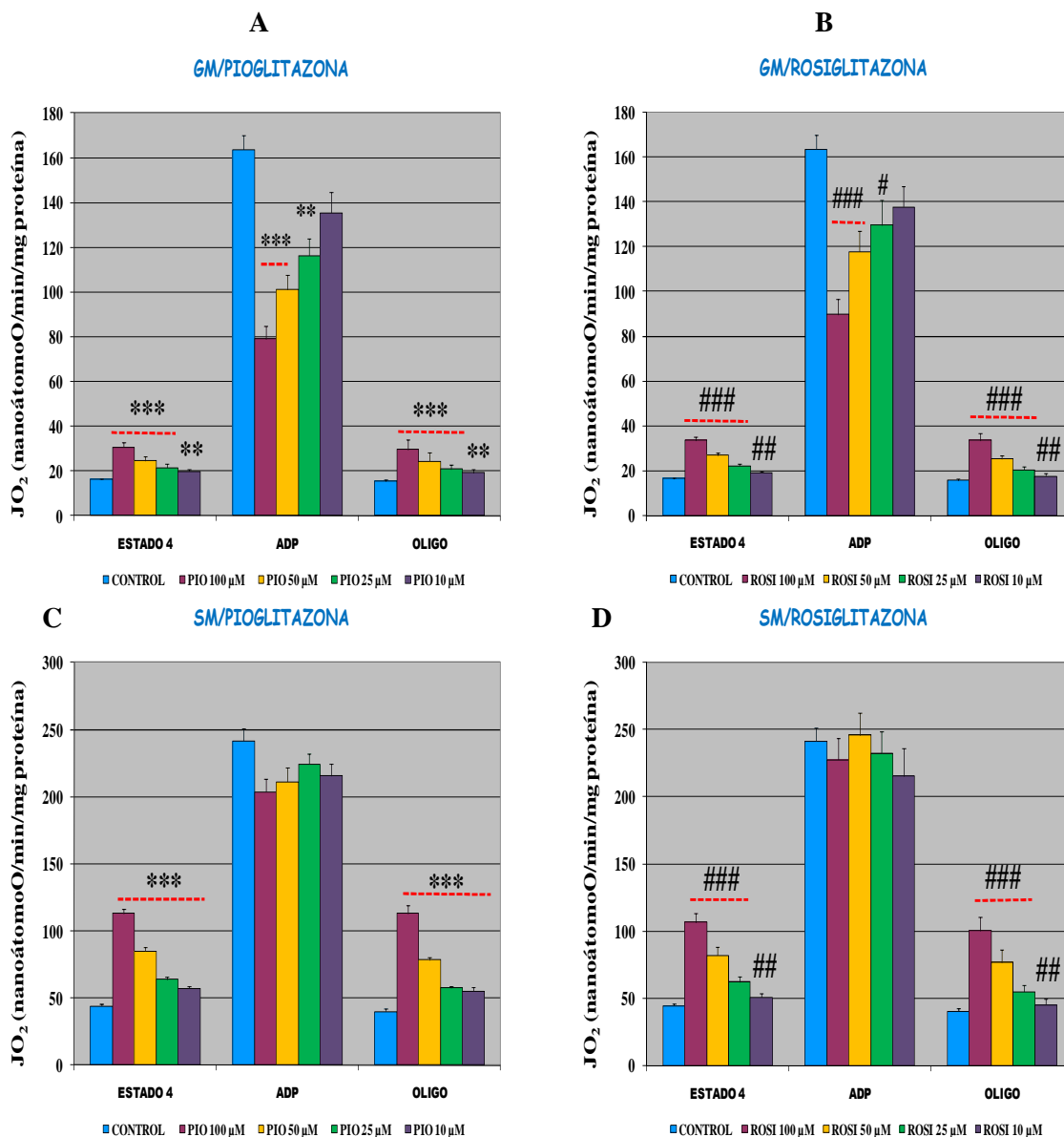


Figura 25 y tabla 6. Efecto de las distintas concentraciones de pioglitazona y rosiglitazona sobre los estados 4, 3 y “4 real” de la respiración mitocondrial

Las mitocondrias (1 mg/ml) se aislaron a partir de hígados de ratas Wistar machos no en ayunas según el método de Klingenberg y Slenczka y se suspendieron a 37°C en el tampón de respiración KCl (KCl 125 mM, EGTA 1mM, Tris-HCl 20mM) con pioglitazona o rosiglitazona (10, 25, 50 y 100 μM) o con su vehículo. La medida del consumo de oxígeno  $JO_2$  (nátomo O/min/mg proteína) se realizó, en una primera serie de experimentos, mediante un oxígrafo equipado de una cámara de oxigrafía y de un electrodo de Clark en presencia de dos tipos de sustratos respiratorios: glutamato/malato (5/2,5 mM) o succinato/malato (5/0,5 mM) + rotenona (1,25 μM) (estado 4) y después de la adición sucesiva de 1mM de ADP-Tris (estado 3) y de 1,25 μg.ml<sup>-1</sup> de oligomicina. Los resultados se expresan como media±EEM de n=10 preparaciones distintas de mitocondrias de hepatocitos. \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01 valores de PIO comparados con el control. ### p<0,001; ##<0,01; # p<0,05 valores de ROSI comparados con el control

Gracias a los experimentos que realizamos a continuación pudimos determinar si la inhibición de la respiración mitocondrial que PIO y ROSI producen sobre el estado 3 se localiza en algún punto de la cadena de transporte mitocondrial o únicamente sobre el complejo enzimático ATP sintasa (complejo V). Discernir el sitio de acción mitocondrial se consigue realizando una segunda serie de experimentos en los que el  $JO_2$  se determinó en las mismas condiciones y con los mismos sustratos que en los experimentos presentados en la **tabla 6** y la **figura 25**: glutamato/malato (5/2,5 mM) o succinato/malato (5/0,5 mM) + rotenona (1,25  $\mu$ M) (estado 4) y después de la adición sucesiva de 1,25  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de oligomicina; 75  $\mu$ M de DNP; 0,15  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de antimicina A y 1 mM/5mM de TMPD/Ascorbato (TMPD-a). Utilizamos el DNP porque se trata de un desacoplador clásico de la fosforilación oxidativa que permeabiliza la membrana mitocondrial interna a los protones. Gracias a la antimicina A bloqueamos el complejo III de la cadena respiratoria y así se puede estudiar la respiración a través del complejo IV tras añadir tetrametil-p-fenilendiamina/ascorbato (TMPD-a), que constituye un sustrato de la citocromo oxidasa (complejo IV).

La tabla y figuras siguientes (**tabla 7** y **figura 26**) muestran los resultados que obtuvimos en esta segunda tanda de determinaciones de la respiración mitocondrial.

Tabla 7

		$JO_2$ (nátomo O/min/mg prot)				
		+ DNP	+ TMPD-a	+ DNP	+ TMPD-a	
<b>G/M</b>		142,48±9,41	257,89±13,36	<b>S/M</b>	238,15±13,50	412,67±14,36
<b>PIO 10 <math>\mu</math>M</b>		140,99±12,34	229,74±9,42	<b>PIO 10 <math>\mu</math>M</b>	247,56±18,45	377,14±15,23
<b>PIO 25 <math>\mu</math>M</b>		137,54±12,19	241,63±15,20	<b>PIO 25 <math>\mu</math>M</b>	252,69±15,13	376,51±16,79
<b>PIO 50 <math>\mu</math>M</b>		123,43±10,85	249,23±11,52	<b>PIO 50 <math>\mu</math>M</b>	242,34±17,14	367,71±22,88
<b>PIO 100 <math>\mu</math>M</b>		109,04±9,40	236,66±13,35	<b>PIO 100 <math>\mu</math>M</b>	244,33±20,05	342,65±22,29
<b>ROSI 10 <math>\mu</math>M</b>		119,02±11,16	250,19±13,45	<b>ROSI 10 <math>\mu</math>M</b>	217,19±22,74	403,16±26,75
<b>ROSI 25 <math>\mu</math>M</b>		113,00±10,83	259,73±13,27	<b>ROSI 25 <math>\mu</math>M</b>	213,41±18,66	391,96±29,46
<b>ROSI 50 <math>\mu</math>M</b>		109,20±9,65	251,93±13,36	<b>ROSI 50 <math>\mu</math>M</b>	215,40±22,52	404,57±25,15
<b>ROSI 100 <math>\mu</math>M</b>		90,57±10,03	255,32±19,14	<b>ROSI 100 <math>\mu</math>M</b>	208,61±16,89	394,08±30,96

La adición del DNP, después de la oligomicina, revierte casi por completo la inhibición de la respiración producida por ésta hasta valores muy próximos a los obtenidos en el estado 3. El DNP funciona desacoplando la transferencia de electrones, generada por los complejos respiratorios hacia el espacio intermembranoso, de la síntesis de ATP por el complejo V. Por ello, los complejos respiratorios empiezan a bombear más electrones y protones con el fin de restaurar el gradiente de protones que ha sido disipado por el DNP. Este fenómeno de aumento del  $JO_2$  por la adición del DNP lo observamos con los dos sustratos respiratorios: GM y SM. Sin embargo, en presencia de PIO y de ROSI, el DNP no consiguió revertir completamente el efecto de la oligomicina. Este efecto se hizo más evidente con GM como sustrato que con SM. Además, con GM las dos glitazonas actuaron de forma dosis-dependiente, obteniéndose la mayor inhibición a la concentración de glitazona de 100  $\mu$ M: 23% con PIO y 36% con ROSI. Mientras que cuando trabajamos con SM la inhibición dosis-dependiente no fue tan clara:

- En presencia de PIO a todas sus concentraciones, el DNP consiguió revertir el efecto de la oligomicina. Es decir, pioglitazona no inhibe el estado desacoplado inducido por el DNP cuando se utiliza SM como sustrato.
- Con SM como sustrato, todas las concentraciones de ROSI no consiguieron aumentar la respiración hasta valores cercanos al estado 3. Además, en este caso no se trata de inhibición dosis-dependiente ya que todas las concentraciones de ROSI actuaron por igual.

A la luz de estos resultados obtenidos con el DNP, podemos deducir que el efecto inhibitorio de PIO y ROSI sobre el estado 3 de la respiración se localiza antes del complejo V mitocondrial (ATPasa), sobre los complejos I, II, III y IV. Además, parece que el efecto inhibitorio de PIO se localiza preferentemente sobre el complejo I y no sobre el II, ya que en presencia de DNP junto con el sustrato del complejo II (SM) se consigue revertir el  $JO_2$  hasta los valores normales del estado 3, independientemente de la adición o no de pioglitazona.

Nuestro siguiente objetivo consistió en investigar el efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de los complejos I, II, III y IV de la cadena respiratoria por separado, para poder localizar el sitio exacto de actuación de estas dos glitazonas sobre la cadena de transporte mitocondrial. Determinamos la actividad de los complejos respiratorios I, II y III mediante técnicas espectrofotométricas (*ver Material y Métodos*), las cuales presentaremos en los puntos siguientes de esta parte de Resultados. Para evaluar la actividad del **complejo IV (citocromo c oxidasa)** en presencia o ausencia de PIO y ROSI añadimos a la cámara de oxigrafía el par redox TMPD/ascorbato, después de añadir antimicina A tras el DNP. Este par redox actúa de la siguiente manera: el

ascorbato cede sus electrones al TMPD que reduce al citocromo c, sustrato de la citocromo oxidasa. La investigación del complejo IV nos mostró que la respiración mitocondrial no está afectada significativamente por la presencia de PIO y ROSI con ninguno de los dos sustratos respiratorios. En este punto no podemos referirnos a un efecto dosis dependiente, al haber obtenido resultados muy parecidos con todas las concentraciones empleadas de las dos glitazonas y con los dos sustratos.

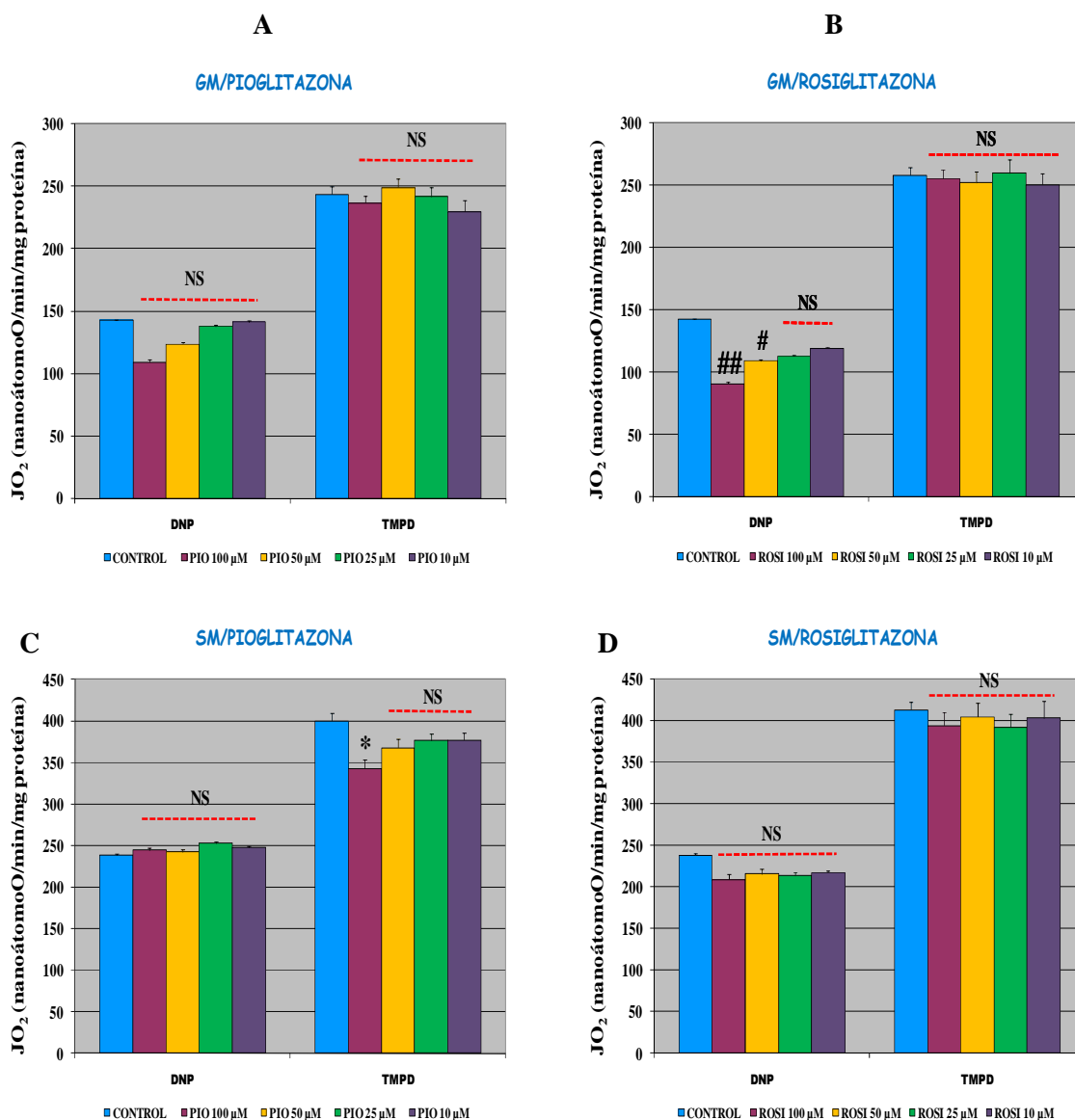


Figura 26 y tabla 7. Localización de la acción de las distintas concentraciones de pioglitazona y rosiglitazona sobre la respiración mitocondrial

Las mitocondrias (1 mg/ml) se aislaron a partir de hígados de ratas Wistar machos no en ayunas según el método de Klingenberg y Slenczka y se suspendieron a 37°C en el tampón de respiración KCl (KCl 125 mM, EGTA 1mM, Tris-HCl 20mM) con pioglitazona o rosiglitazona (10, 25, 50 y 100  $\mu$ M) o su vehículo. La medida del consumo de oxígeno  $JO_2$  (nátomo O/min/mg proteína) se realizó, en una segunda serie de experimentos, mediante un oxígrafo equipado de una cámara de oxigrafía y de un electrodo de Clark, en presencia de dos tipos de sustratos respiratorios: glutamato/malato (5/2,5 mM) o succinato/malato (5/0,5 mM) + rotenona (1,25  $\mu$ M) (estado 4) y después de la adición sucesiva de 1,25  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> de oligomicina; 50  $\mu$ M de DNP; 0,15  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> de antimicina A y por último 1mM/5mM de TMPD/Ascorbato (TMPD-a). Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM de n=10 preparaciones distintas de

mitocondrias de hepatocitos. \* $p < 0,05$  valores de PIO comparados con el control. ## $< 0,01$ ; #  $p < 0,05$  valores de ROSI comparados con el control. NS, no significativo respecto a los valores control

De las dos glitazonas, parece que pioglitazona es la que más afecta el complejo IV mitocondrial (**figuras 26 A y C**), mientras que ROSI (**figuras 26 B y D**) no ejerce ningún efecto significativo sobre este complejo. Con GM como sustrato, encontramos que PIO inhibió el  $JO_2$  en presencia de TMPD-a de forma casi imperceptible, produciendo la mayor inhibición del complejo IV a una concentración de  $10 \mu\text{M}$  y siendo ésta de tan solo un 6%. En presencia de SM el efecto inhibitorio de PIO fue algo más claro, ya que todas las concentraciones del fármaco inhibieron el complejo IV. En esta segunda condición, encontramos que PIO a  $100 \mu\text{M}$  fue la única concentración que inhibió significativamente el  $JO_2$  en un 14%.

Un hecho importante a destacar es que, estos dos antidiabéticos orales a la misma concentración ensayada de  $25 \mu\text{M}$  que empleamos en los experimentos del metabolismo hepático (*ver parte 1 de esta sección de Resultados*), también ejercen unos efectos directos muy claros sobre la respiración mitocondrial.

**PIOGLITAZONA y ROSIGLITAZONA a la concentración de  $25 \mu\text{M}$  activan el estado 4 e inhiben el estado 3 de la respiración mitocondrial. Esta gran inhibición del estado 3, probablemente se atribuye a un efecto localizado sobre los complejos I, II y III mitocondriales. No obstante, existen algunas ligeras diferencias entre ambas glitazonas:**

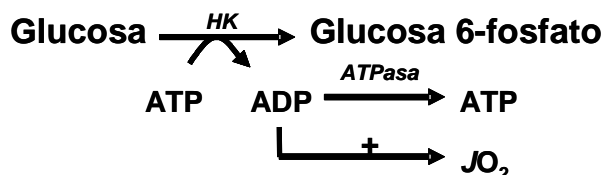
**pioglitazona, en relación a rosiglitazona, inhibe ligeramente el complejo IV y actúa preferentemente sobre el complejo I mitocondrial**

## 2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa

Dado que pioglitazona y rosiglitazona inhiben la respiración en hepatocitos intactos y en mitocondrias aisladas, además de bajar la relación ATP/ADP tanto en el compartimiento citosólico como en el mitocondrial en hepatocitos perfundidos, decidimos investigar si el rendimiento de la fosforilación oxidativa está modificado o no por la acción de estos dos fármacos. Con ese fin, investigamos la eficacia de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas, en presencia o ausencia de PIO o ROSI (25  $\mu$ M), mediante el estudio de la relación entre la síntesis de ATP ( $J_{ATP}$ ) y la respiración mitocondrial ( $JO_2$ ) con los siguientes sustratos:

1. Glutamato/malato
2. Succinato/malato/rotenona
3. Glutamato/succinato/malato

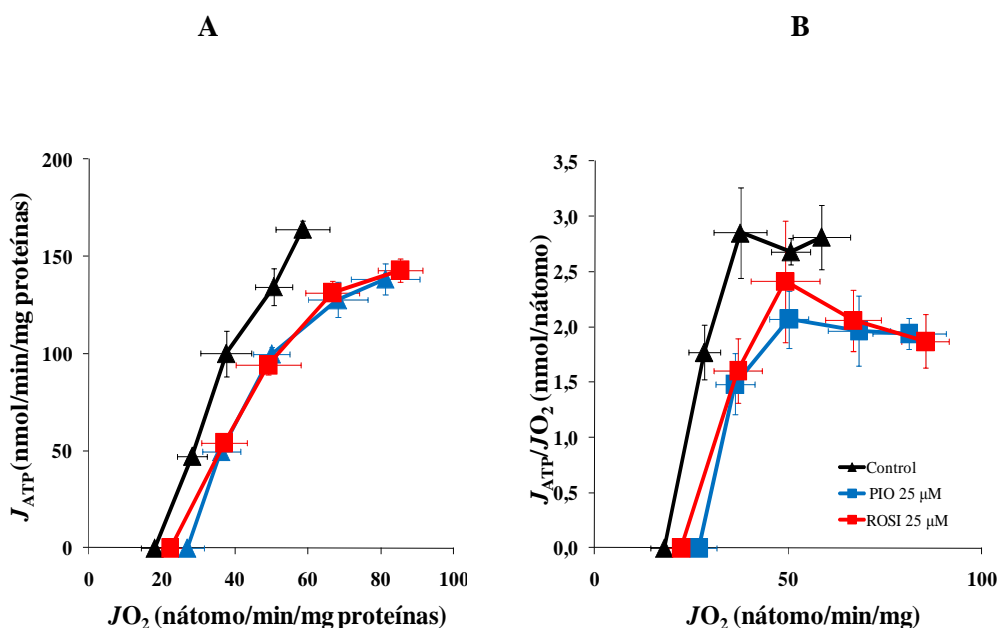
La medida del consumo de oxígeno se realizó mediante un oxígrafo equipado de una cámara de oxigrafía y de un electrodo de Clark. Medimos la eficacia de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas determinando la relación entre la síntesis de ATP y el flujo respiratorio en una situación donde el nivel de la fosforilación oxidativa está modulado por cambios de “turnover” del ADP inducidos por adición de cantidades crecientes de hexoquinasa (ver apartado 5.1. de la sección Técnicas Experimentales perteneciente a “Materiales y Métodos”). A partir de la medida espectrofotométrica de los niveles de G6P podemos evaluar la cantidad de ADP formado, que a su vez estimula la respiración y que es teóricamente idéntica a la cantidad del ATP formado por la ATP sintasa. De esta manera, se relaciona la respiración ( $JO_2$ ) con el flujo del nuevo ATP formado por la ATP sintasa ( $J_{ATP}$ ) que corresponde a dicha respiración. La relación entre el flujo de síntesis de ATP ( $J_{ATP}$ ) y la respiración ( $JO_2$ ) nos permite evaluar la eficacia de la fosforilación oxidativa (ATP/O).



## 2.1. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con glutamato/malato (GM)

Gracias a la utilización de GM (sustrato del complejo I), pudimos evaluar el efecto de PIO y ROSI sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa centrado únicamente a nivel del complejo I. Tal y como describimos ampliamente en el desarrollo de esta técnica en la sección de Material y Métodos y más brevemente en el párrafo anterior, determinamos la producción de ATP generado por la ATPasa gracias a la formación de glucosa-6-fosfato (G6P) mediante la adición de concentraciones crecientes de hexoquinasa (HK).

Las dos glitazonas, en presencia de GM, disminuyeron la producción de ATP a las concentraciones más altas de hexoquinasa. En la **figura 27A** podemos observar que la relación entre el consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) y la producción de ATP del grupo control, PIO y ROSI se mantienen lineales y casi paralelas hasta el último punto donde se aprecia claramente la bajada del flujo en la síntesis de ATP que producen pioglitazona y rosiglitazona en un 16% y un 13%, respectivamente (163,9 a 138,3 y 143 nmol/min/mg, respectivamente, con 25  $\mu$ l de HK 1/20). Sin embargo, la **figura 27B** que representa la eficacia de la fosforilación oxidativa (relación entre ATP/O y el consumo de oxígeno) muestra que estas dos glitazonas disminuyen este rendimiento. Esto se debe al aumento en el consumo de oxígeno que se registró en presencia de ambos fármacos, por otra parte coherente con la activación del estado 4 de la respiración mitocondrial que obtuvimos y presentamos en el apartado anterior.



**Figura 27. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la relación entre la síntesis de ATP ( $J_{ATP}$ ) y el consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) en mitocondrias aisladas con el glutamato/malato como sustrato**

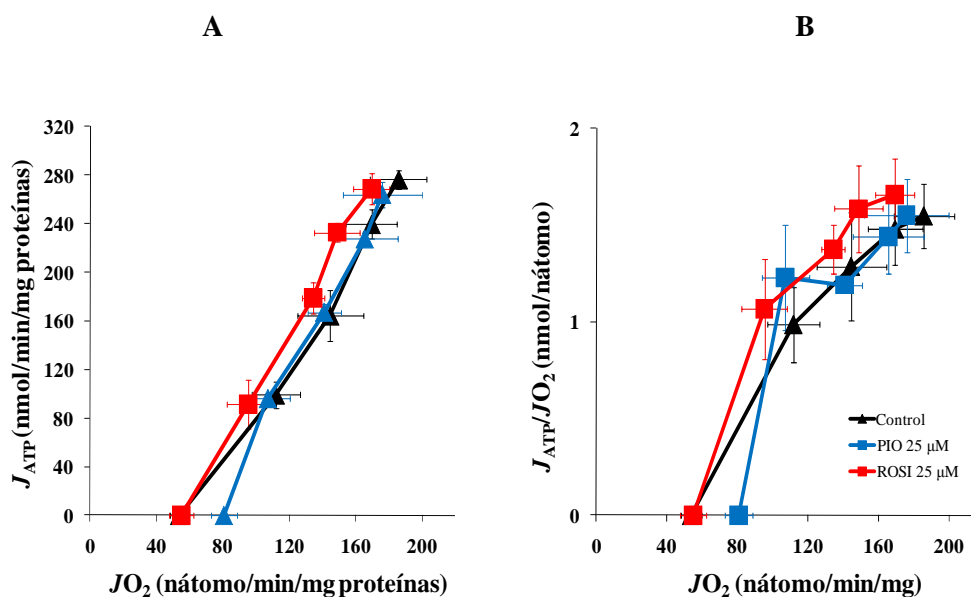
Las mitocondrias se aislaron a partir de hígados de ratas Wistar machos no en ayunas (2 mg/ml) y se suspendieron a 37°C en el tampón de respiración KCl (KCl 125 mM, EGTA 1mM, Tris-HCl 20mM) al que se añade glucosa 20 mM, ATP-Tris 125  $\mu$ M y  $MgCl_2$  1mM en presencia de pioglitazona 25  $\mu$ M (■), rosiglitazona 25  $\mu$ M (■) o su vehículo (▲). La síntesis de ATP y la respiración están modulados por concentraciones crecientes de hexoquinasa (0,17 a 0,7 U/ml). La medida del consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) se realizó a 37°C, mediante un oxígrafo equipado con electrodo de Clark, en presencia de glutamato/malato (5/2,5 mM). El flujo de ATP ( $J_{ATP}$ ) sintetizado por la ATP sintasa se calcula a partir del flujo de glucosa-6-fosfato formado. La relación entre el flujo de síntesis de ATP ( $J_{ATP}$ ) y el flujo de consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) nos permite evaluar el rendimiento de la fosforilación oxidativa (ATP/O). La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre  $JO_2$  y  $J_{ATP}$ . En la **figura B** podemos observar el efecto los dos antidiabéticos sobre la relación entre  $JO_2$  y ATP/O. Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM de 4 preparaciones distintas de mitocondrias

**2.2. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con succinato/malato (SM)**

Empleamos SM junto con la rotenona como sustrato respiratorio cuando nos interesa centrarnos únicamente en el estudio del rendimiento de la fosforilación oxidativa a nivel del complejo II mitocondrial. El uso de la rotenona junto con el succinato/malato impide el flujo reverso de electrones desde el complejo II hasta el complejo I de la cadena respiratoria. Como reflejan las dos figuras siguientes (**figura 28A y B**), ni PIO ni ROSI modificaron ni la síntesis de ATP ni el rendimiento de la fosforilación oxidativa. En la **figura 28A**, la relación entre  $J_{ATP}$  y  $JO_2$  en la situación control y en presencia de los fármacos produjo unas relaciones lineales y casi paralelas. Solamente encontramos una ligera desviación hacia la izquierda de la curva obtenida en presencia de ROSI (**figura 26B**), la cual representa la relación entre  $JO_2$  y ATP/  $JO_2$ :

esta última relación subió de un valor de 1,5 nmol/nátomo O en la situación control a 1,7 nmol/nátomo O en el grupo de ROSI, con 25  $\mu$ l de HK 1/20.



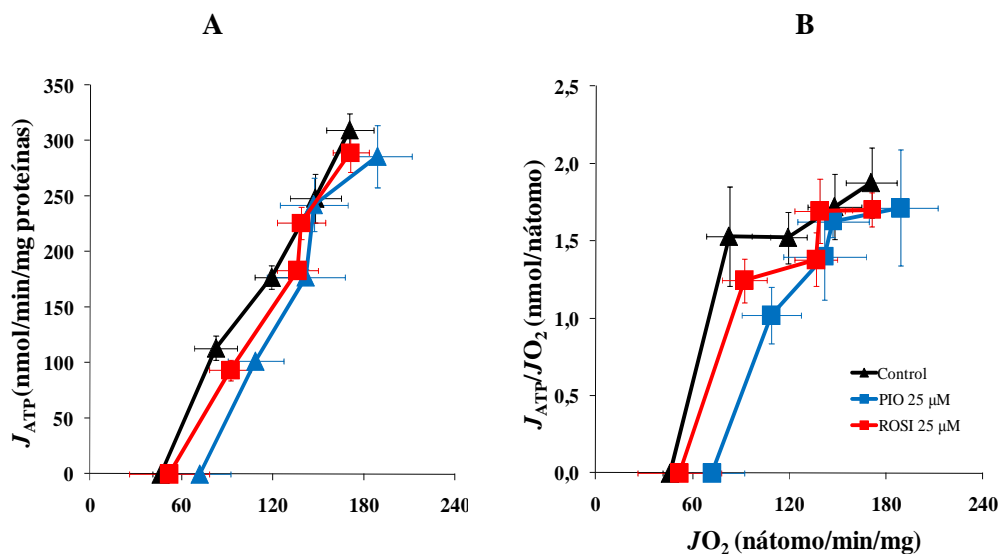


**Figura 28.** Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la relación entre la síntesis de ATP ( $J_{ATP}$ ) y el consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) en mitocondrias aisladas con el succinato/malato como sustrato

Las mitocondrias aisladas a partir de hígado de rata (1 mg/ml) se suspendieron en las mismas condiciones que aquellas descritas en la **figura 27** pero con succinato/malato (5/0,5 mM) más rotenona (1,25  $\mu$ M) como sustrato. La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre  $JO_2$  y  $J_{ATP}$ . En la **figura B** podemos observar el efecto los dos antidiabéticos sobre la relación entre  $JO_2$  y  $J_{ATP}/O$ . Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM de 4 preparaciones distintas de mitocondrias

### 2.3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con glutamato/succinato/malato (GSM)

Para evaluar simultáneamente el efecto de las dos glitazonas sobre la fosforilación oxidativa a nivel de los complejos I y II de la cadena respiratoria en condiciones parecidas a las condiciones fisiológicas, el consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) se midió en presencia de glutamato/succinato/malato (sustratos del complejo I y II). En estas condiciones, pioglitazona y rosiglitazona tampoco modificaron el rendimiento de la fosforilación oxidativa y actuaron de una manera muy parecida a como lo hicieron con los dos sustrato por separado. Cuando utilizamos la mayor concentración de hexokinasa (1,7 U/ml) las dos glitazonas disminuyeron ligeramente la síntesis de ATP (**figura 29A**) y la relación  $J_{ATP}/JO_2$  frente al  $JO_2$  (**figura 29B**).



**Figura 29. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la relación entre la síntesis de ATP ( $J_{ATP}$ ) y el consumo de oxígeno ( $JO_2$ ) en mitocondrias aisladas con glutamato/succinato/malato como sustrato**

Las mitocondrias aisladas a partir de hígado de rata (1 mg/ml) se suspendieron en las mismas condiciones que aquellas descritas en la **figura 27** pero con el sustrato glutamato/succinato/malato (5/5/0,5 mM). La **figura A** muestra el efecto de PIO y ROSI sobre la relación entre  $JO_2$  y  $J_{ATP}$ . En la **figura B** podemos observar el efecto los dos antidiabéticos sobre la relación entre  $JO_2$  y ATP/O. Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM de 4 preparaciones distintas de mitocondrias

**Poglitazona y rosiglitazona no modifican significativamente el rendimiento de la fosforilación oxidativa. Aunque con succinato/malato rosiglitazona ejerce un efecto positivo, la tendencia general observada con las dos glitazonas consistió en no modificar la eficacia de la fosforilación oxidativa**

### 3. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Como ya hemos mencionado en la introducción de este trabajo, la mitocondria es una fuente muy importante de producción de ROS en todas las células de mamíferos. Esta producción de ROS mitocondrial contribuye al daño de esta organela que ocurre en numerosas patologías, entre ellas la DM2 y también altera el estado redox celular. Nosotros hemos limitado el análisis de la producción mitocondrial de ROS a la cuantificación exclusiva del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), porque está absolutamente demostrado y documentado que éste es el principal ROS liberado por la mitocondria. El superóxido ( $O_2^-$ ) es el principal radical libre que producen las mitocondrias y debido a su alta reactividad, las mitocondrias poseen su propia superóxido dismutasa (SOD) que inmediatamente después de su formación lo transforma en oxígeno molecular ( $O_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), siendo éste último el que se sale de las mitocondrias al ser una especie reactiva menos perjudicial y peligrosa para las células que el radical superóxido (Weisiger y Fridovich, 1973).

Aunque en la sección Material y Métodos hemos descrito la forma en que medimos la producción de  $H_2O_2$  mitocondrial y su base científica, a continuación, ampliaremos dicha técnica. Los sitios reconocidos de producción de ROS por la mitocondria son el complejo I y el III de la cadena de transporte de electrones. Prácticamente la producción de ROS por el complejo III es despreciable frente a los niveles producidos por el complejo I. A este respecto, el **complejo I** respiratorio forma  $O_2^-$  mediante dos mecanismos distintos:

- El complejo I es el punto de entrada de los electrones en la cadena respiratoria desde el NADH. Los electrones procedentes del NADH son aceptados por un cofactor FMN (flavinmononucleótido) (parte constituyente de la estructura del complejo I), que los transporta hacia el sitio de reducción del coenzima Q (CoQ) en el complejo I. Los electrones en su transporte desde el FMN hacia el sitio CoQ están muy protegidos de ser atrapados por el  $O_2$  gracias a los centros Fe-S que también forman parte de la estructura del complejo I. Incluso, existe más probabilidad de que el  $O_2$  capte los electrones a partir del FMN que del sitio CoQ (Sazanov, 2007). Por lo tanto, el complejo I forma  $O_2^-$  mediante este primer mecanismo cuando el cofactor FMN está muy reducido, es decir, cuando la relación NADH/NAD es muy elevada (Hirst y cols., 2008). A este primer mecanismo se le denomina “*flujo de electrones hacia delante*” y ocurre cuando las mitocondrias respiran con glutamato/malato (GM) como sustrato. La rotenona, un inhibidor de la actividad del complejo I mediante unión a su sitio CoQ, exacerba la producción de  $O_2^-$  a partir de GM. Esto se explica porque mediante el bloqueo del sitio CoQ, los electrones no pueden

llegar a su destino desde el NADH y el O<sub>2</sub> los capta con más facilidad transformándose así en su especie reactiva (O<sub>2</sub><sup>-</sup>).

- El otro mecanismo mediante el cual el complejo I forma O<sub>2</sub><sup>-</sup> es el denominado *flujo reverso de electrones (RET)*. Este fenómeno sucede cuando la mitocondria trabaja en modo 2, es decir, cuando la fuerza protonmótriz ( $\Delta p$ ) es muy elevada y hace volver a los electrones desde el coenzima Q reducida (CoQH<sub>2</sub>) hacia el complejo I, reduciendo al NAD<sup>+</sup> a NADH de nuevo en el sitio del FMN (Liu y cols., 2002). La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> mediante este mecanismo se asocia con el succinato (sustrato del complejo II) y está demostrado que mitocondrias respirando con este sustrato producen grandes cantidades de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en el complejo I mediante este mecanismo. La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> prácticamente se detiene tras la adición de rotenona, debido a la barrera que supone la rotenona situada en el sitio CoQ del complejo I frente a los electrones que llegan desde el “pool” de CoQ reducido (CoQH<sub>2</sub>).

Aunque el lugar de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en el complejo I podría ser el mismo en los dos mecanismos (el RET fuerza a los electrones a volver hacia el FMN del complejo I), el sitio exacto de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en el complejo I por RET todavía no ha sido descubierto. Aún así, la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por el complejo I puede ocurrir simultáneamente mediante los dos mecanismos, como ocurre cuando se emplea glutamato/succinato/malato (GSM) como sustrato respiratorio. Lo que sí está establecido y bien documentado es que los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> más altos se producen en la mitocondria mediante el flujo inverso de electrones.

El *complejo III* es el otro sitio conocido de producción mitocondrial de ROS (Cadenas y cols., 1977). Este complejo se encarga de canalizar el paso de los electrones desde el “pool” de coenzima Q hasta el citocromo c. En presencia de grandes cantidades de CoQH<sub>2</sub> y de antimicina A (inhibidor de este complejo, mediante bloqueo del sitio Qi), el complejo III produce grandes cantidades de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en la reacción del O<sub>2</sub> con la ubisemiquinona que hay unida al sitio Q<sub>0</sub> del complejo (Ver Ciclo del Coenzima Q en anexo). El complejo III libera este O<sub>2</sub><sup>-</sup> a ambos lados de la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, aunque la antimicina A induce al complejo III a producir O<sub>2</sub><sup>-</sup>, estos niveles de producción son prácticamente insignificantes respecto a los producidos en el complejo I.

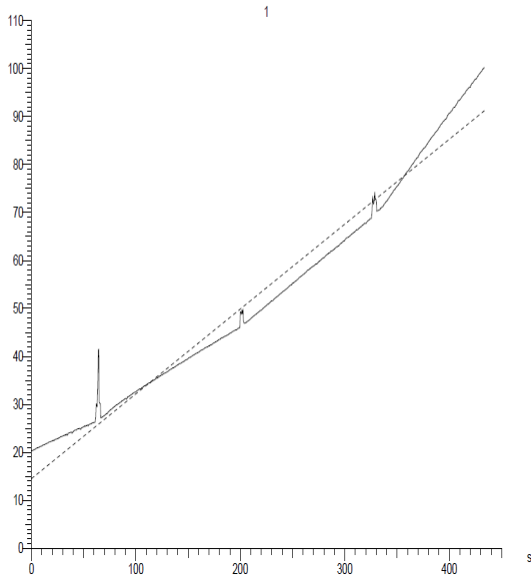
Nuestros resultados son el claro reflejo de lo anteriormente explicado. Representamos lo que ocurre con cada sustrato por separado: GM (figura 30A), SM (figura 30B) y GSM (figura 30C); cuando tras monitorizar la señal durante 2 minutos se añaden sucesivamente rotenona y antimicina (ver punto 5.2 de la sección Determinaciones Analíticas incluidas en “Material y Métodos”). Hay que comenzar destacando el hecho de

que, como se esperaba, la tasa basal de producción de  $H_2O_2$  (se corresponde con los primeros minutos de cuantificación sin haber añadido ninguno de los inhibidores mitocondriales) depende claramente del sustrato suministrado a las mitocondrias. La tasa más baja de producción de  $H_2O_2$  mitocondrial la encontramos con GM (figura 31A) y esta tasa supone una producción 4 veces menor que la que encontramos con SM (figura 32A) y 5 veces menor en relación a la obtenida con GSM. Por lo tanto, estos datos se corresponden con los esperados:

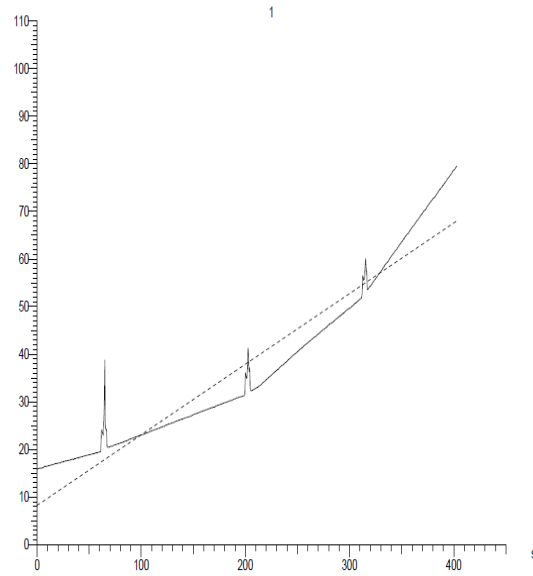
la producción de  $H_2O_2$  con GM refleja su formación en el complejo I mediante el primer mecanismo de “*flujo de electrones hacia delante*” y es notablemente menor que la producida por el mismo complejo respiratorio mediante el segundo mecanismo, **RET**, reflejo del empleo de SM (sustrato del complejo II). Estos datos concuerdan con la teoría que dice que la producción principal de  $O_2^-$  por la mitocondria se localiza en el complejo I y se produce gracias al RET. También hay que destacar que la mayor tasa de producción de  $H_2O_2$  que hemos obtenido ha sido con GSM, reflejo de que en estas condiciones el complejo I produce  $O_2^-$  por los dos mecanismos propuestos (figura 32A).

Antes de entrar en detalle en los resultados de cada sustrato por separado, hay que resaltar que la antimicina A (reflejo de la producción de  $O_2^-$  por el complejo III) aumenta la producción de  $H_2O_2$  con los tres sustratos. Ahora centrándonos en cada sustrato por separado, ponemos en evidencia que:

- con **GM** en condición control, la rotenona y la antimicina A activan la producción de  $H_2O_2$  según lo esperado (figura 30A). En la condición basal todas las concentraciones de PIO y ROSI inhibieron significativamente la formación de  $H_2O_2$  y en presencia de rotenona y antimicina A, la tendencia general fue también de inhibición, a excepción de PIO 25  $\mu M$  y ROSI 100  $\mu M$ . Abajo se pueden observar las gráficas, tal cual aparecen en la pantalla que tenemos acoplada al espectrofluorímetro, de la situación control (figura 30A) y en presencia de pioglitazona 100  $\mu M$ , la concentración más representativa PIO y ROSI sobre la producción de ROS (figura 30B). Como se puede observar, con cada uno de los sustratos, la escala del eje Y (mide la fluorescencia emitida por  $H_2O_2$  para la gráfica control y la de glitazona es la misma. El eje X representa el tiempo de medida en segundos (s)



**Figura 30A**



**Figura 30B**

- con **SM**, la rotenona inhibió la formación de  $H_2O_2$  por RET y la antimicina reactivó de nuevo esta producción a nivel del complejo III (**figura 31A**). Todas las concentraciones de las glitazonas inhibieron de forma dosis dependiente y significativamente la producción de  $H_2O_2$  en las 3 condiciones, a excepción de la condición de antimicina A, donde ROSI a la menor concentración de  $10 \mu M$  fue la que inhibió con más fuerza la formación de  $H_2O_2$ . Con este sustrato también mostramos el efecto de PIO  $100 \mu M$  en representación de todas las demás concentraciones de las dos glitazonas. En **figura 31B** se ve claramente la inhibición tan drástica que provoca PIO sobre la producción de ROS mitocondrial.

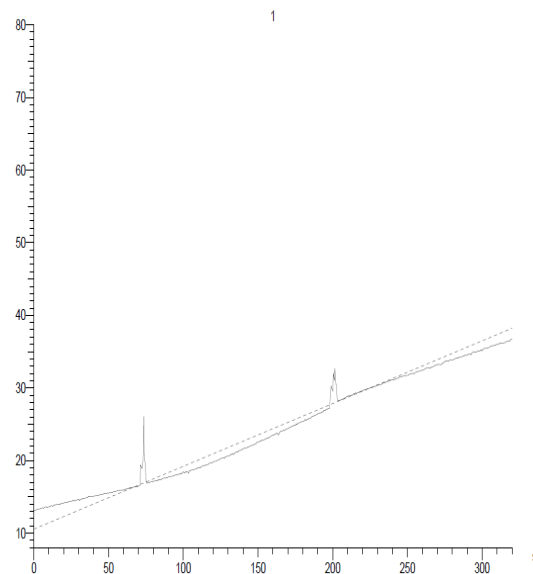
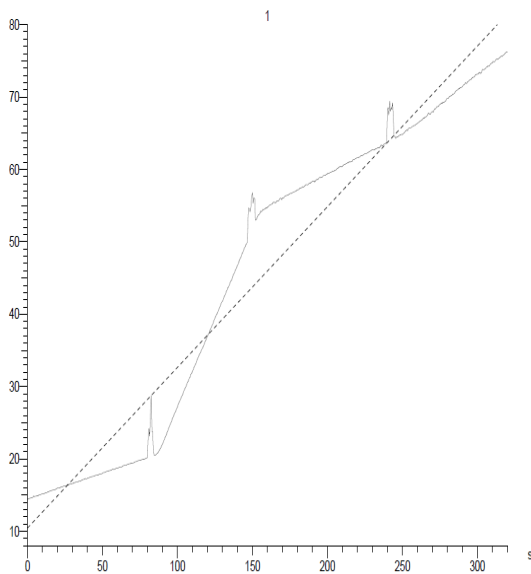
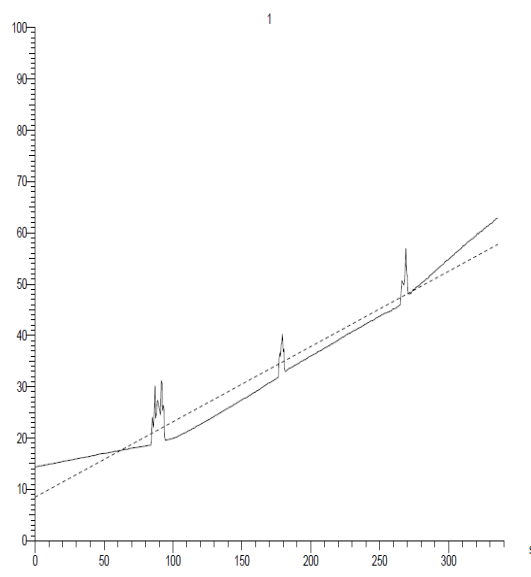
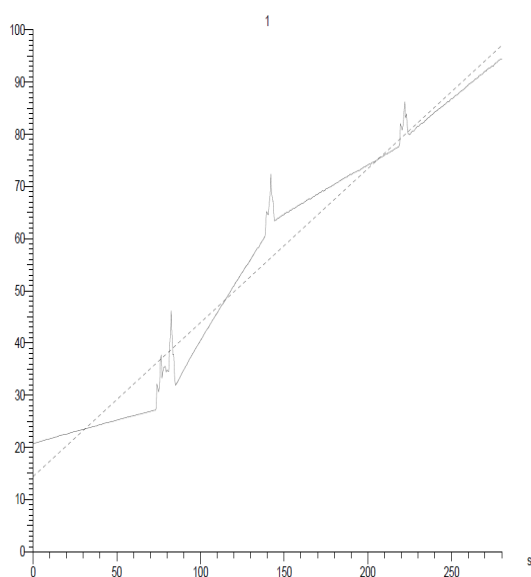


Figura 31A

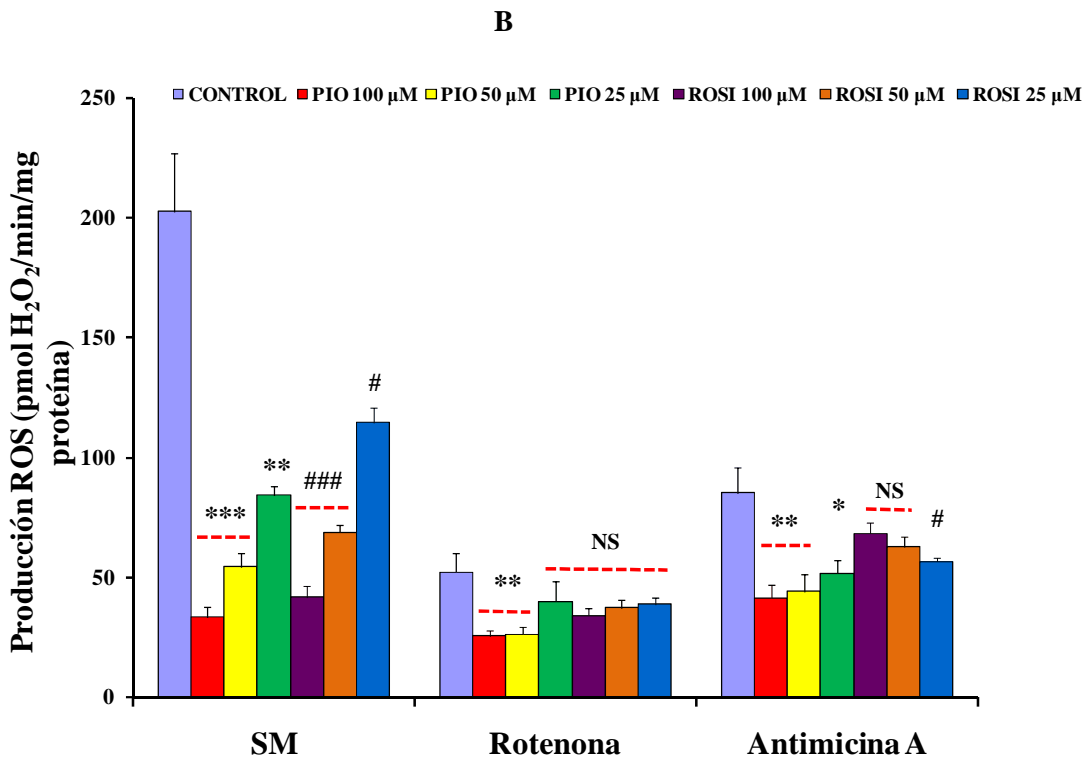
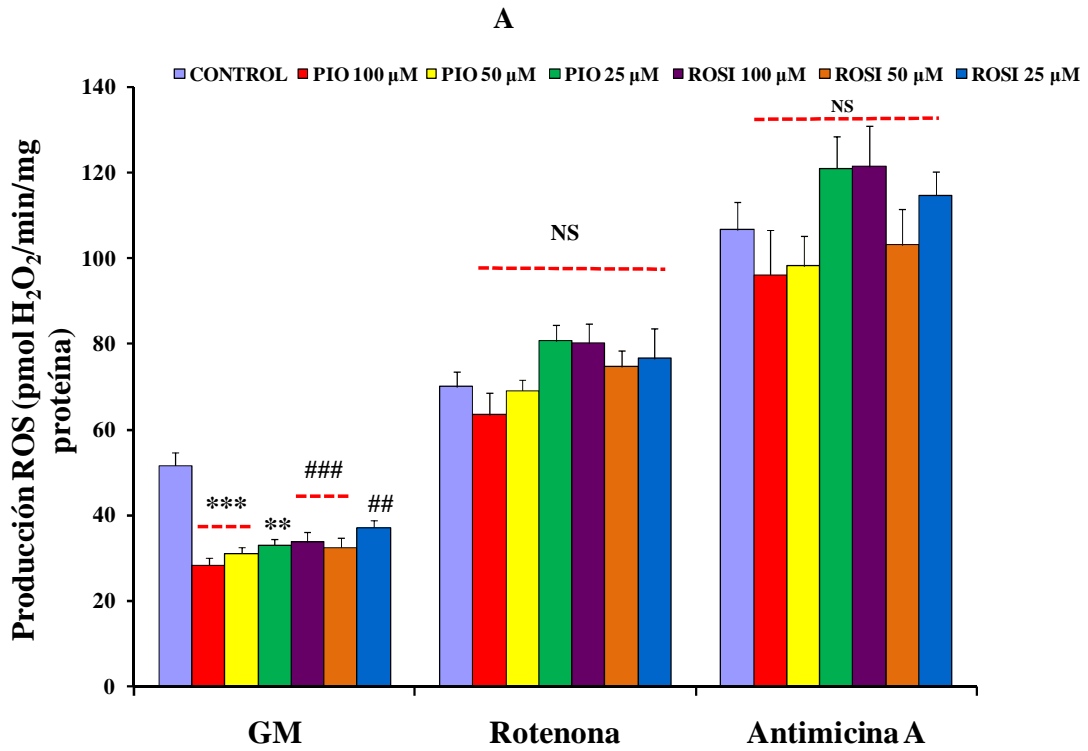
Figura 31B

- con **GSM**, PIO y ROSI inhibieron la producción basal de  $H_2O_2$  de manera dosis-dependiente y significativamente, mientras que en presencia de rotenona y antimicina A, la inhibición obtenida por las dos glitazonas no siguió esta pauta. Es curioso que con antimicina A, las concentraciones más grandes de PIO y ROSI (100  $\mu M$ ) activaron la formación de  $H_2O_2$  a nivel del complejo III. De igual forma que con los dos sustratos anteriores, mostramos la gráfica obtenida en la situación control (**figura 32A**) y en presencia de PIO 100  $\mu M$  (**figura 32B**).



**De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que, pioglitazona y rosiglitazona inhiben drásticamente la formación de  $H_2O_2$  mitocondrial a nivel del complejo I y III. Los datos obtenidos con SM nos indican que está inhibición se localiza principalmente sobre el flujo reverso de electrones del complejo II hacia el complejo I**

En las gráficas siguientes mostramos la cantidad exacta de  $H_2O_2$  producida por las mitocondrias con los sustratos empleados: GM (**figura 33A**), SM (**figura 33B**) y GSM (**figura 33C**) y en presencia de todas las concentraciones utilizadas de PIO y ROSI.





C

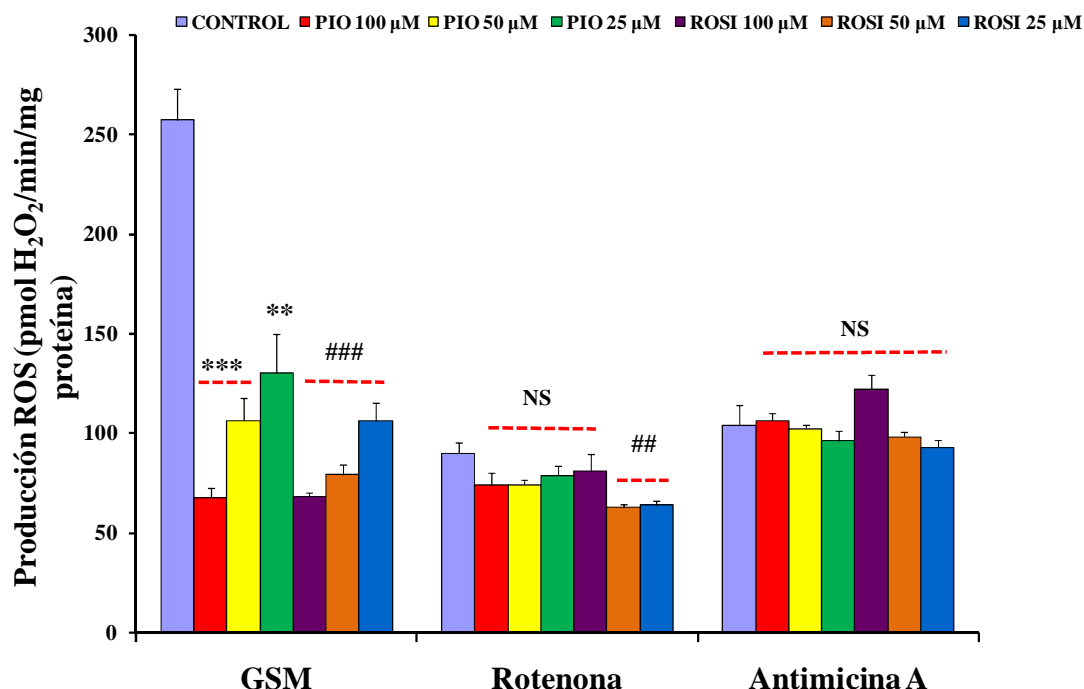


Figura 33. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por mitocondrias aisladas de hígado

Las mitocondrias aisladas a partir de hígado de ratas macho Wistar no en ayunas (0,25 mg/ml) se suspendieron a temperatura ambiente en el mismo tampón KCl utilizado en la determinación de la respiración mitocondrial y el rendimiento de la fosforilación oxidativa (125 mM, EGTA 1mM, Tris-HCl 20mM), al cual se adiciona albumina libre de ácidos grasos (FFA) al 0,1%, fosfato inorgánico (Pi) 2,5 mM, la sonda fluorescente Amplex Red (2mM) y peroxidasa del rabano negro (10 U/ml). La reacción se inició añadiendo el sustrato correspondiente: GM (2,5/1,25 mM), SM (2,5/1,25 mM) o GSM (2,5/2,5/1,25 mM), tras 2 minutos de estabilización se añadieron secuencialmente rotenona (1,25 μM) y antimicina A (3 μM) para cuantificar la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por los complejo I y III, respectivamente. Todos los análisis se realizaron en presencia de PIO (25, 50 y 100 μM), ROSI (25, 50 y 100 μM) o su vehículo (DMSO). La producción mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se expresa en relación a una concentración conocida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados se expresan como media±EEM de 8 preparaciones distintas de mitocondrias. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05; valores de PIO respecto al control. ###<0,001 ;##<0,01; # p<0,05 valores de ROSI respecto al control. NS, no significativo respecto a los valores control

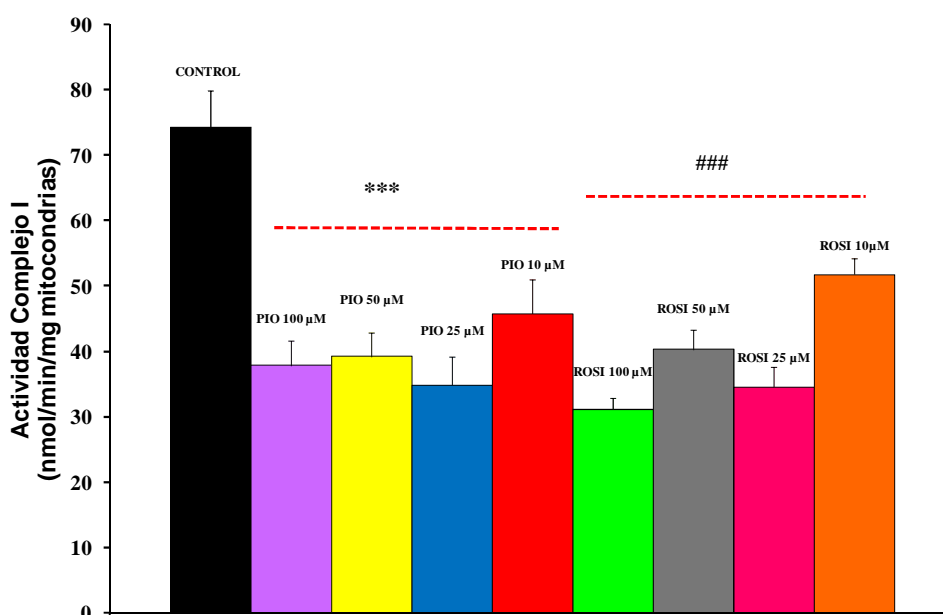
#### 4. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad de los complejos respiratorios I, II y III

Medimos la actividad de estos tres complejos respiratorios mediante técnicas espectrofotométricas de acuerdo a los protocolos presentados en la sección de Material y Métodos (punto 7, Determinaciones Analíticas).

##### 4.1. Actividad del complejo I de la cadena de transporte mitocondrial

El complejo I (NADH-ubiquinona oxido-reductasa) transfiere 2 electrones desde el NADH a una flavina (FMN), los cuales pasarán de 1 en 1 por centros de Fe-S hasta reducir la ubiquinona. Por cada par de electrones transferido se bombean desde la matriz hasta el espacio intermembranoso 4 protones. El glutamato/malato (GM) actúa como su sustrato, al suministrarle el NADH. El complejo I es el principal lugar de producción de ROS mitocondrial mediante el flujo reverso de  $e^-$  desde el complejo II. Aunque este complejo también es capaz de formar especies reactivas, aunque en menos cantidad, a través del flujo de  $e^-$  hacia adelante a partir del NADH.

Cuando monitorizamos la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas de hepatocitos de rata, en presencia o ausencia de PIO o ROSI (10, 25, 50 y 100  $\mu$ M), demostramos que las dos glitazonas a todas sus concentraciones disminuyen notablemente y de manera significativa la actividad de este complejo. No se trata de una inhibición dosis-dependiente, aunque sí que observamos que el menor porcentaje de inhibición lo obtuvimos cuando utilizamos cualquiera de las dos glitazonas a su dosis más baja, 10  $\mu$ M. En el caso de PIO la mayor inhibición en un 53% se obtuvo a una concentración de 25  $\mu$ M, mientras que ROSI a 100  $\mu$ M fue la concentración que inhibió con más fuerza la actividad de este complejo, en un 58 %.



**Figura 34. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad del complejo I en mitocondrias aisladas de hígado**

La determinación de la actividad del complejo I se realizó utilizando NADH (100  $\mu$ M) como donador de electrones y decilubiquinona (100  $\mu$ M) como aceptor de electrones, en un medio KPi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM; pH 7,5 ) a 37 °C, suplementado con 3,75 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos, en presencia o ausencia de PIO, ROSI (10, 25, 50 y 100  $\mu$ M) o su vehículo. La medida se inició tras la adición de 24  $\mu$ g de mitocondrias y se monitorizó la oxidación del NADH a 340 nm antes y después de la adición de rotenona (10  $\mu$ M). Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM de 3 preparaciones distintas de mitocondrias. \*\*\* $p < 0,001$ ; valores de PIO respecto al control. ### $< 0,001$  valores de ROSI respecto al control

Los datos preliminares que habíamos obtenido con la oxigrafía de mitocondrias y la producción de ROS, nos hacían suponer que el complejo I estaba fuertemente implicado en la inhibición de la respiración (estado 3 y estado desacoplado) y en la bajada drástica en la liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que producen las dos glitazonas sometidas a estudio. Gracias a la medida de la actividad del complejo I, confirmamos nuestra hipótesis y demostramos la importancia del complejo I en el control de la función mitocondrial.

#### **4.2. Actividad del complejo II de la cadena de transporte mitocondrial**

El complejo II-succinato deshidrogenasa toma electrones del succinato y los transfiere a través de flavoproteínas (FAD) y varios centros de Fe-S hasta la ubiquinona. La transferencia de  $e^-$  en este complejo no está asociada al bombeo de protones.

Aunque según nuestros estudios preliminares intuíamos que el complejo II no estaba implicado en ninguno de los efectos directos sobre la función de la mitocondria que ejercen PIO y ROSI, decidimos también determinar la actividad de este complejo para corroborar nuestra hipótesis. Como habíamos supuesto, ninguna de las dos glitazonas modificó significativamente la actividad de este complejo, incluso en el caso de PIO encontramos valores casi idénticos a los control con todas las concentraciones de fármaco empleadas.

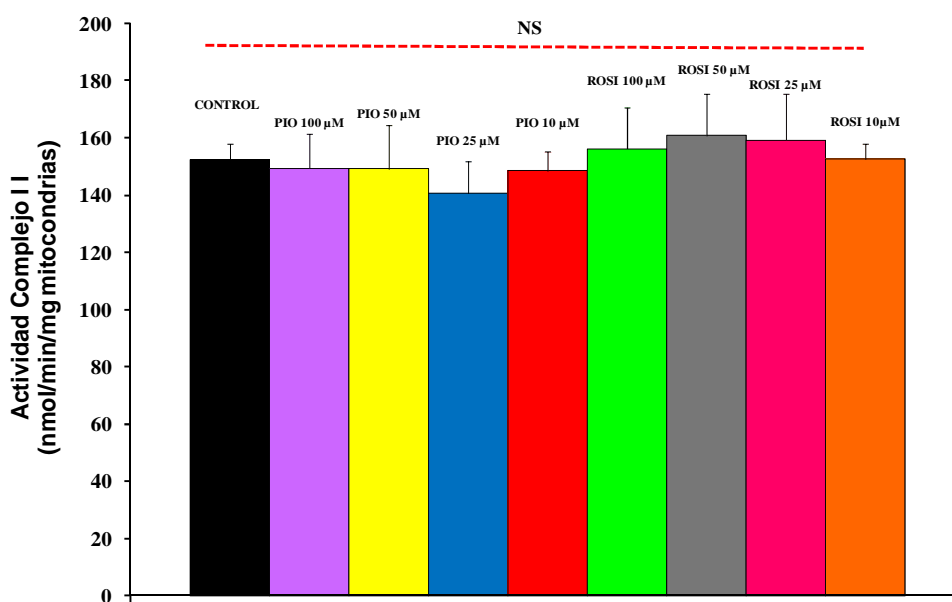


Figura 35. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad del complejo II en mitocondrias aisladas de hígado

La determinación de la actividad del complejo II se realizó monitorizando la bajada en la absorbancia de dicloroindofenol (DICP) (100 μM) a 600 nm. 24 μg de mitocondrias se añadieron sobre un medio KPi (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM; pH 7,5 ) a 37 °C, suplementado con 2,5 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos, antimicina A 9,3 μM, rotenona 5 μM, decilubiquinona 50 μM, succinato 30 mM, en presencia o ausencia de PIO, ROSI (10, 25, 50 y 100 μM) o su vehículo. Los resultados se expresan como media±EEM de 3 preparaciones distintas de mitocondrias. NS, no significativo respecto a los valores control

#### 4.3. Actividad del complejo III de la cadena de transporte mitocondrial

El complejo III-ubiquinona-citocromo c reductasa, transfiere dos electrones de uno en uno desde la ubiquinona reducida al citocromo c. Para ello los electrones pasan por distintas subunidades que contienen grupos prostéticos hemo del tipo b y c y centros Fe-S, realizando el denominado ciclo Q. El resultado es el bombeo de 4 protones al espacio intermembroso y la formación de 2 citocromos c reducidos. Este complejo constituye el segundo sitio de formación y liberación de especies reactivas de oxígeno por las mitocondrias.

De acuerdo con los datos obtenidos en los estudios previos, nuestra hipótesis consistía en que PIO y ROSI probablemente inhibían la respiración en presencia de DNP (estado desacoplado) y la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de antimicina, mediante un efecto localizado en el complejo III. Efectivamente al investigar la actividad del complejo III en presencia o ausencia de PIO o ROSI en un amplio rango de concentraciones, idéntico al utilizado en los complejos I y II, comprobamos que todas las concentraciones de las glitazonas inhibían significativamente a este complejo. Como en el caso del complejo I, en este caso tampoco se trata de una inhibición de tipo dosis-

dependiente, es más, PIO 25  $\mu\text{M}$  y ROSI 10  $\mu\text{M}$  fueron las dos concentraciones que inhibieron con más fuerza a este complejo en un 33% y un 43%, respectivamente.

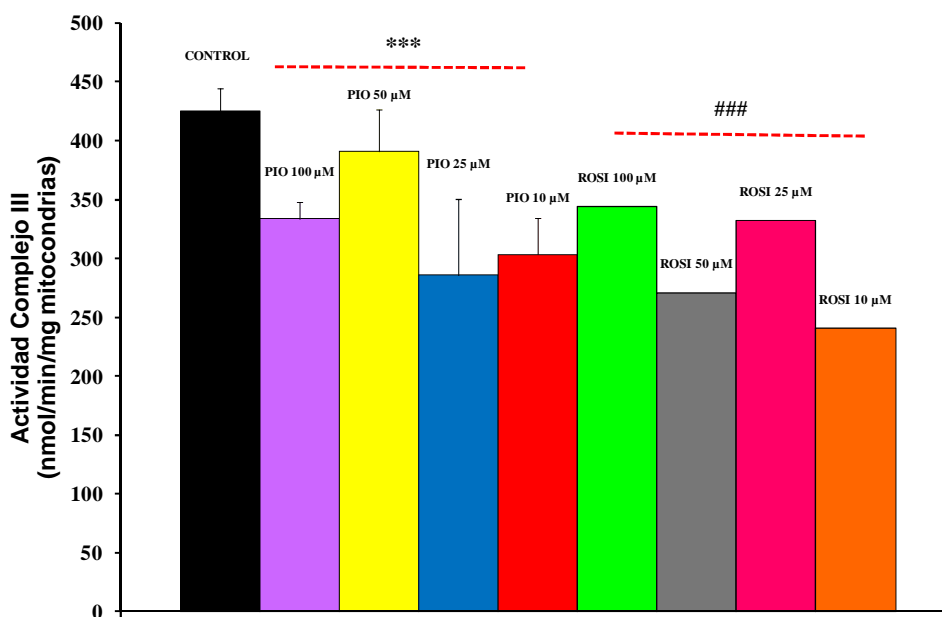


Figura 36. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la actividad del complejo III en mitocondrias aisladas de hígado

La actividad del complejo III se determinó monitorizando la reducción de citocromo c 10  $\mu\text{M}$  antes y después de añadir antimicina A 9,1  $\mu\text{M}$  a un tampón KPi ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  100 mM; pH 7,5 ) termostatzado a 30  $^\circ\text{C}$ , suplementado con 10  $\mu\text{g}$  de mitocondrias, 1 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos, EDTA 5mM, KCN 1 mM, decilubiquinona reducida 105,6  $\mu\text{M}$ , en presencia o ausencia de PIO, ROSI (10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo. Los resultados se expresan como media $\pm$ EEM de 3 preparaciones distintas de mitocondrias. \*\*\* $p$ <0,001; valores de PIO respecto al control. ###<0,001 valores de ROSI respecto al control

El hecho de que ROSI a su concentración más alta (100  $\mu\text{M}$ ) ejerza la inhibición más pequeña de todas aunque resulta raro, concuerda perfectamente con los datos obtenidos cuando medimos la producción de ROS en presencia de antimicina A:

en presencia de este inhibidor, como ya hemos indicado, estudiamos la producción de ROS centrada únicamente a nivel del complejo III. Nosotros obtuvimos que ROSI 100  $\mu\text{M}$  fue la concentración empleada del fármaco que menos inhibió e incluso activó, en el caso del GSM, la formación de ROS con todos los sustratos empleados.

## 5. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la apertura del poro de transición mitocondrial (PTP)

La apertura del poro de transición mitocondrial, que determinamos gracias a la capacidad de retención cálcica que poseen las mitocondrias (CRC), es clave para la puesta en marcha de fenómenos apoptóticos y además, también modifica el funcionamiento mitocondrial porque participa en la distribución de nucleótidos y en la despolarización de las mitocondrias (Dumas y cols., 2009). Por estas razones decidimos investigar si PIO y ROSI ejercen algún tipo de acción directa sobre este parámetro, principalmente porque la modificación en la apertura del PTP tiene un gran papel en el metabolismo energético. Nos propusimos profundizar en este proceso y por este motivo determinamos la apertura del PTP en dos condiciones diferentes, en mitocondrias (figura 37A y B) y en hepatocitos permeabilizados (figura 37C y D), cuya metodología hemos descrito en Material y Métodos (punto 6, Determinaciones Analíticas). Empleamos SM como sustrato con todas las manipulaciones y la adición de ciclosporina A (bloquea la apertura del PTP) sirve como control positivo del buen estado de las mitocondrias y los hepatocitos, así como de la correcta realización del experimento.

La tendencia general observada en ambas condiciones fue que ni PIO ni ROSI, a las concentraciones de 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ , ejercieron un efecto significativo sobre la apertura del PTP. Con **mitocondrias**, PIO es la produce un efecto más claro sobre el PTP mediante una inhibición de su apertura de manera dosis dependiente (figura 37A), mientras que el efecto de ROSI es prácticamente nulo (figura 37B). El mayor porcentaje de inhibición de un 30 % lo encontramos con PIO a una concentración 50  $\mu\text{M}$ , cuando trabajamos con mitocondrias aisladas. Esta fue la única inhibición significativa que producen las dos glitazonas tanto en mitocondrias como en hepatocitos permeabilizados. Sobre hepatocitos permeabilizados, el efecto de las dos glitazonas siguió el mismo patrón que en mitocondrias: la tendencia general fue una ligera inhibición de la apertura del poro, aunque en ningún caso alcanzó la significancia.

Figura 37A

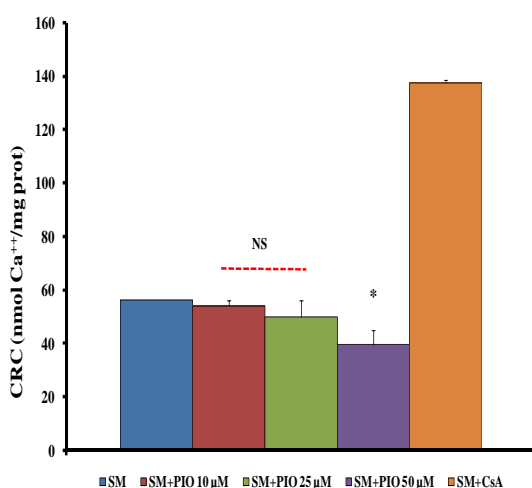
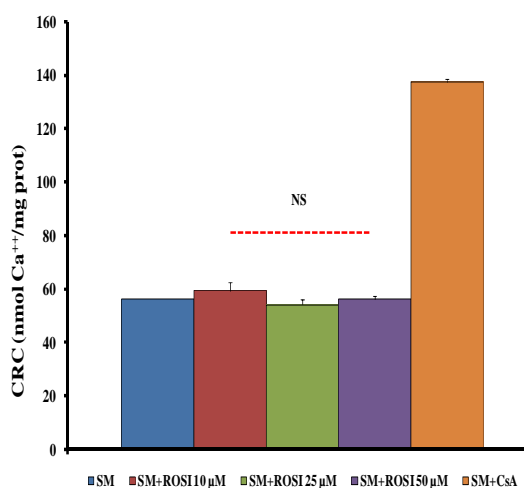
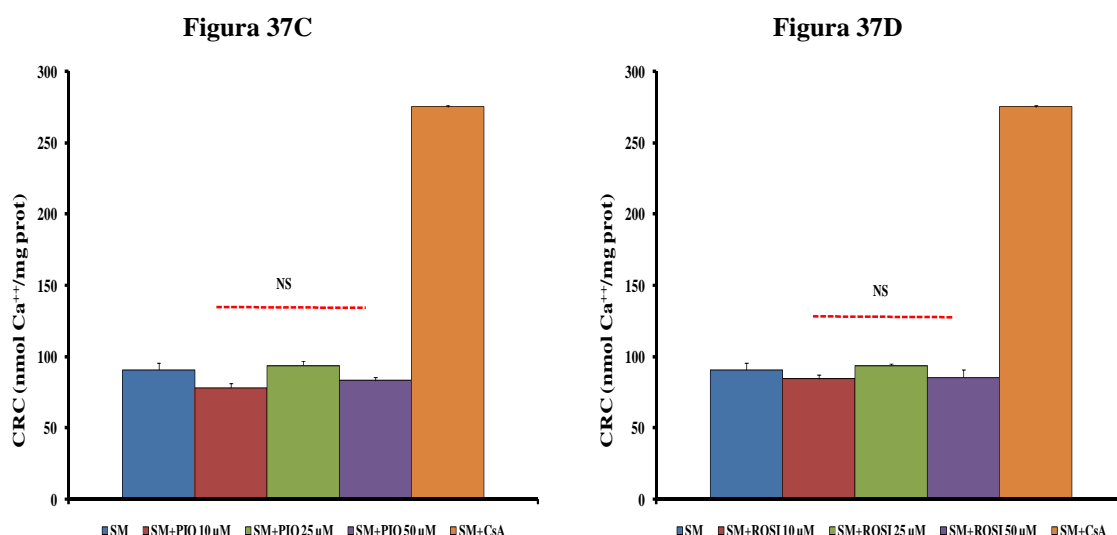


Figura 37B





**Figura 37. Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la apertura del poro de transición mitocondrial**

Las mitocondrias (1 mg/ml) o los hepatocitos permeabilizados, se incuban con 2 ml de tampón de análisis (250 mM sacarosa, 10 mM MOPS y 1 mM Pi; pH 7,4) en presencia de SM (5/2,5 mM) y de una sonda fluorescente al calcio-extramitocondrial (Calcium Green-5N). La capacidad de retención cálcica de las mitocondrias se determina mediante la adición de pulsos de Ca<sup>++</sup> 12,5 μM cada minuto. Todas las manipulaciones se realizaron en presencia o ausencia de PIO, ROSI (10, 25 y 50 μM) o su vehículo. Los resultados se expresan como media±EEM de 3 preparaciones distintas de mitocondrias y 3 preparaciones distintas de hepatocitos. \*p<0,05; valores de PIO respecto al control. NS, no significativo respecto a los valores control

La tendencia general del efecto de PIO o ROSI sobre la capacidad de retención cálcica mitocondrial y la apertura del PTP consistió en una inhibición bastante ligera. No obstante, este efecto inhibitorio es la señal clara de que estas dos glitazonas, en un corto período de tiempo y de manera directa, protegen a las mitocondrias del daño que provoca la apertura del PTP con la liberación del citocromo c que lleva asociado y el inicio de las cascadas apoptóticas. Por lo tanto, este efecto protector de las mitocondrias que hemos demostrado se suma a todas las razones por las cuales se prescriben estos antidiabéticos.

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
INVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PIUGLITAZONA Y ROSIGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

*DISCUSIÓN*



En este trabajo investigamos los efectos metabólicos y mitocondriales agudos y directos, no mediados por los receptores nucleares PPAR $\gamma$ , de las tiazolidinonas: Pioglitazona y Rosiglitazona; con el fin de contribuir al conocimiento del mecanismo de acción hepático de estas moléculas antidiabéticas, dada la gran importancia del hígado en la regulación del metabolismo energético global en el cuerpo humano. Para realizar este trabajo, nuestro grupo cuenta con la única técnica de perfusión de células que hay en España, que fue instalada y puesta a punto por el Dr. El-Mir en el año 2003.

La técnica de perfusión de células fue instalada con éxito en nuestro laboratorio, por primera vez en España gracias a la colaboración científica mantenida entre el Dr. Yehia El-Mir y el Dr. Xavier Leverve de la Universidad de Grenoble I (Francia). En este trabajo demostramos que en condiciones experimentales similares, usando hepatocitos en perfusión en presencia del mismo sustrato metabólico, hemos obtenido resultados parecidos a los obtenidos por otros grupos de investigación que utilizan esta técnica (Leverve y cols., 1985, 1986, 1987; Argaud y cols., 1993) y de esta manera ha quedado validada su instalación en nuestro laboratorio desde 2003 (El-Mir y cols., 2004; Naboulsi y cols., 2005; 2006, Guigas, 2007; Detaille, 2008).

El grupo de fármacos antidiabéticos orales, glitazonas o tiazolidinedionas (TZDs), tienen un papel firmemente establecido en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) como sensibilizadores a la acción de la insulina y protectores de la función de las células- $\beta$ . Son agonistas selectivos de alta afinidad de los receptores nucleares PPAR- $\gamma$  (receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas) y a través de su activación mejoran, **A LARGO PLAZO**, la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad corporal a la insulina mediante múltiples y variadas acciones (Edgerton y cols., 2009). Estos receptores regulan la expresión de genes específicos implicados en el metabolismo glucídico y lipídico y en el balance energético, cuyos efectos finales consisten en disminuir la hiperglucemia y la resistencia a la insulina. Los receptores PPAR- $\gamma$  se expresan fundamentalmente en adipocitos, pero también, en menor proporción, en otros tipos celulares como hepatocitos, células musculares, células endoteliales, macrófagos, monocitos y células vasculares (Boden y cols., 2006). Además de sus beneficiosos efectos metabólicos, las glitazonas ejercen otras acciones favorables sobre las complicaciones secundarias de la DM2, como la enfermedad cardiovascular, debido a sus propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes (Hauner, 2002; Hernández-Jiménez y cols., 2002).

Aunque los receptores PPAR- $\gamma$  se expresan principalmente en el tejido adiposo, donde las glitazonas son excelentes agentes sensibilizadores a la insulina, mejorando la acción insulina y ejerciendo un efecto anti-lipolítico (DeFronzo, 2010), también son potentes sensibilizadores a la acción de la insulina, incluso en mayor grado que la

metformina, (Cusi y DeFronzo, 1998), tanto en el hígado como en el músculo, donde estos receptores son muy escasos.

Los efectos de las glitazonas a largo plazo sobre el hígado y el músculo podrían ser, por lo menos en parte, una consecuencia de sus **efectos indirectos** sobre tejido adiposo mediados por PPAR- $\gamma$ , hecho que se demostró al trabajar con ratones knock-out específicos para PPAR- $\gamma$  en tejido adiposo, los cuales tuvieron **una respuesta disminuida** al efecto antidiabético de las TZDs, indicando así la importancia del tejido adiposo en la acción global de las glitazonas (Chao y cols., 2000; He y cols., 2003). En este sentido, está bien documentado que a nivel del tejido adiposo, en pacientes con diabetes tipo 2, las glitazonas mejoran la resistencia a la insulina a través de una remodelación de adipocitos, de tal forma que los lípidos son redistribuidos desde los depósitos lipolíticos y resistentes a la insulina de la grasa visceral a depósitos de la grasa subcutánea. Así, indirectamente se va a disminuir en un 50% la grasa hepática y se mejorará la resistencia hepática a la insulina (Mayerson y cols., 2002; Miyazaki y cols., 2003).

No obstante, existen suficientes indicios que indican que las glitazonas también ejercen numerosos efectos metabólicos independientes de la activación de los receptores nucleares de transcripción (PPAR- $\gamma$ ), a los cuales denominamos **EFFECTOS DIRECTOS Y/O AGUDOS**. En algunos estudios se ha demostrado que tras la infusión de 10-20 minutos de troglitazona a ratas “*in vivo*”, los niveles de glucosa se redujeron significativamente (Lee y Olefsky, 2005). Sin embargo, no estaba lo suficientemente claro si estos efectos agudos “*in vivo*”, al igual que ocurre con los efectos a medio y largo plazo, se debían principalmente a acciones de la troglitazona sobre el tejido adiposo o sobre otros tejidos que contribuyen en la homeostasis de la glucosa, como por ejemplo, el hígado. Se intentó resolver esta duda cuando se investigaron los efectos de las TZDs en ratones lipoatróficos (sin grasa-fatless), donde se observó que el tratamiento con TZDs había mejorado la sensibilidad a la insulina en estos ratones sugiriéndose de esta manera otros lugares de acción de las glitazonas diferentes al tejido adiposo (Burant y cols., 1997). También se ha demostrado que la exposición de tejido muscular durante 30 minutos a troglitazona y rosiglitazona aumenta la captación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos en este tejido (LeBrasseur y cols., 2006). Debido al corto período de tiempo de exposición a las glitazonas y a que el músculo prácticamente no expresa PPAR- $\gamma$  (Auboeuf y cols., 1997), se deduce que estos efectos agudos y directos de las TZDs son independientes de la activación de estos factores de transcripción PPAR- $\gamma$ . Los efectos directos e independientes de la activación de PPAR- $\gamma$  han sido muy poco estudiados y su investigación ha cobrado una mayor importancia en la actualidad. Hay que indicar que estos estudios se han realizado mayoritariamente “*in vitro*” sobre cultivos celulares muy variados.

Mediante mecanismos desconocidos e independientes de PPAR- $\gamma$ , en los estudios que se realizaron hasta el momento, se vio que las glitazonas poseen efectos directos

antitumorales al activar la apoptosis en cáncer de próstata y cáncer de colon (Shiau y cols., 2005; Baek y cols., 2003); inhiben la síntesis de andrógenos (Kempna y cols., 2007); inhiben la síntesis de proteínas en células endoteliales (Cho y cols., 2006); aumentan la liberación de ácido araquidónico de la membrana celular con el subsiguiente aumento de eicosanoides (Tsukamoto y cols., 2004); pueden ejercer sus efectos ateroprotectivos mediante inhibición de TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ) y de la proliferación y migración de células vasculares (Liu y cols., 2005; Hattori y cols., 2000; Arthwol y cols., 2005); inhiben la oxidación mitocondrial y aumentan la liberación de lactato en músculo esquelético (Brunmair y cols., 2001); a través de estos mecanismos activan la actividad de la enzima AMPK en tejido muscular (Fryer y cols., 2002; LeBrasseur y cols., 2006; Fediuc y cols., 2008), células renales (Turturro y cols., 2007) y en células- $\beta$  del páncreas (Wang y cols., 2007).

De todo lo recogido en la literatura concerniente a los efectos directos de las glitazonas se concluye que, además de que dichos efectos han sido muy poco estudiados a nivel del hígado, en la mayoría de estas investigaciones se empleó troglitazona (que se retiró del mercado farmacéutico en 2000 debido a sus efectos hepatotóxicos) y no las dos glitazonas, PIO y ROSI (actualmente en el mercado farmacéutico desde 2003), objeto de estudio de mi Tesis Doctoral.

En este trabajo demostramos, por primera vez, que PIOGLITAZONA (*Actos*®) y ROSIGLITAZONA (*Avandia*®) ejercen acciones antidiabéticas **AGUDAS Y DIRECTAS** sobre el metabolismo hepático, principalmente, inhibiendo la gluconeogénesis y activando la glucólisis. Para demostrar la existencia de dichos efectos directos utilizamos, como ya hemos señalado anteriormente, la técnica de perfusión de células. La técnica de perfusión de células es una técnica “in vitro” muy potente para el estudio del metabolismo hepático y su influencia por diferentes drogas (Leverve 1985, 1986, 1987; Argaud 1993). La técnica de perfusión de células es un sistema ideal para medir metabolitos extracelulares e intracelulares (ATP/ADP, intermediarios de la vía gluconeogénica/glucolítica) y actividades enzimáticas. La singularidad de esta técnica consiste en que se trata de un sistema abierto, simétrico, que permite mantener las células termostatazadas y en agitación en una cámara de perfusión donde las células están continuamente perfundidas con Krebs-Bicarbonato oxigenado evitando así el acúmulo de los metabolitos extracelulares, que podría afectar la regulación del metabolismo, permitiendo así la obtención de estados estacionarios reales (steady-state) (*Ver sección de material y métodos*). Este hecho de evitar la acumulación de metabolitos en el medio de incubación de células, a diferencia de los cultivos celulares, es sumamente importante, porque refleja lo que ocurre realmente en los órganos corporales en una situación fisiológica donde no se acumulan metabolitos y de esta manera no hay “*feed-back*” sobre los mecanismos de regulación del metabolismo, como ocurre en los cultivos celulares habituales.

Antes de comenzar a analizar con detenimiento los **efectos metabólicos directos que ejercen pioglitazona y rosiglitazona a nivel hepático**, hemos de indicar que en este trabajo, donde investigamos otros mecanismos de acción de estas moléculas no mediados por los receptores nucleares PPAR $\alpha$ , utilizamos la concentración de 25  $\mu$ M con ambas glitazonas para realizar el análisis de este tipo de efectos directos. Hay que recordar que los dos fármacos PIO (*Actos*®) y ROSI (*Avandia*®), una vez administrados “*in vivo*” se metabolizan principalmente por el hígado. En el caso de PIO, esta molécula alcanza “*in vivo*” una concentración máxima en el hígado (*Ver sección “PIOGLITAZONA y ROSIGLITAZONA” de Introducción*) mayor de 25  $\mu$ M (Cox y cols., 2000; Eckland, Danhof, 2000; Hanefeld, 2001). Además, la concentración empleada en nuestro estudio fue similar e incluso inferior a la empleada en otros estudios “*in vitro*”, donde se investigaron sus propiedades antihiper glucemiantes, antioxidantes y antiinflamatorias (Nishimura y cols., 1997; Toriumi y cols., 2003; Brunmair y cols., 2004b; Turturro y cols., 2007).

Como hemos mencionado anteriormente, la perfusión de células hepáticas se convierte en una herramienta adecuada y potente para determinar el lugar de acción de pioglitazona y rosiglitazona en las diferentes rutas metabólicas. En nuestras condiciones experimentales de trabajo, la producción de glucosa refleja exactamente la velocidad de la gluconeogénesis ya que la síntesis de glucógeno, en nuestras condiciones de ayuno de 24 horas, es insignificante comparada con el flujo de producción de glucosa (Exton y Park, 1967). En cuanto a la glucólisis, el flujo de lactato más piruvato refleja realmente el flujo de la enzima glucolítica piruvato quinasa solamente en ausencia de una oxidación mitocondrial significativa del piruvato o de una transaminación del mismo. La oxidación del piruvato o su transaminación puede conducir a un flujo glucolítico subestimado, pero éste está probablemente limitado porque la concentración de piruvato es baja, debido al aclaramiento continuo del perfusado en nuestro sistema.

Empezaremos abordando profundamente el papel que ejercen en un corto período de tiempo estas dos glitazonas sobre la **GLUCONEOGÉNESIS (GNG)**, de manera aguda y directa. Nuestros resultados obtenidos en hepatocitos perfundidos con cuatro sustratos energéticos diferentes: DHA, fructosa, lactato + piruvato (L/P; 10/1) y glicerol, indican por primera vez, que PIO y ROSI producen una marcada inhibición de la gluconeogénesis (GNG) con todos los sustratos empleados. Se trata de una acción **AGUDA** de las dos glitazonas sobre una o varias etapas de la vía GNG/glucólisis, porque empezó a observarse en el segundo estado estacionario justamente después de la adición de los dos fármacos, en tan solo 15 minutos. Además, esta inhibición se mantuvo en valores constantes hasta el final del experimento: 1 hora y media después de la infusión de las glitazonas. La inhibición directa de la gluconeogénesis hepática es uno de los mecanismos mediante el cual, algunos medicamentos antidiabéticos orales, como la metformina, ejercen su efecto antidiabético (Argaud y cols., 1993). La metformina, un

antidiabético oral cuyo uso está muy extendido (desde hace más de 40 años) en todo el mundo para el tratamiento de la DM tipo 2, ejerce su acción hipoglucemiante de forma DIRECTA, inhibiendo la GNG en hepatocitos en perfusión, además de estimular la glucólisis. Nuestros resultados obtenidos en este trabajo con pioglitazona, empleando la misma metodología que la utilizada por el Dr. Argaud, concuerdan con los obtenidos con metformina. No obstante, hay que señalar que ambas moléculas poseen estructuras químicas muy diferentes: la metformina es lipofílica, mientras que la pioglitazona es hidrófoba y por tanto sus mecanismos de acción no son idénticos. Aunque se ha demostrado que las glitazonas inhiben, al igual que la metformina, la respiración por inhibición del complejo I de la cadena respiratoria (El-Mir y cols., 2000; Brunmair y cols., 2004b).

De acuerdo a lo expuesto en el apartado de *Introducción* de esta memoria, estos cuatro sustratos metabólicos ensayados (DHA, fructosa, lactato+piruvato y glicerol) se incorporan a distinto nivel en la vía GNG/glucólisis, de ahí se deduce que su metabolismo global será diferente. Aunque como comprobamos en nuestros experimentos, parece ser que la inhibición directa de la GNG hepática que ejercen las dos glitazonas es un fenómeno general y se produce independientemente del sustrato gluconeogénico empleado. Esto sugiere que el efecto inhibitorio por parte de PIO y ROSI sobre la GNG podría estar localizado en el último paso metabólico de la vía, donde convergen todos los sustratos. La inhibición directa “*in vitro*” de la GNG encontrada con PIO y ROSI concuerda con ensayos clínicos en los que pacientes diabéticos tipo 2 fueron tratados con los dos antidiabéticos orales a su dosis normal: PIO a 45 mg/día y ROSI a 4 mg/día. En estos estudios “*in vivo*” se comprobó que los dos agentes corrigen los niveles de glucosa en plasma, principalmente, mejorando la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos mediante inhibición de la gluconeogénesis hepática (Herz y cols., 2003; Phillips y cols., 2001; Scherbaum y cols., 2002) y en segundo lugar, ralentizando el deterioro de la función de las células- $\beta$  del páncreas (Bajaj y cols., 2003; Gastaldelli y cols., 2006; Gastaldelli y cols., 2007; Lebovitz y cols., 2001; Phillips y cols., 2001). Además, en estudios a largo plazo en los que se comparó la eficacia antidiabética entre los dos agentes se demostró que ambos ejercen un poder **anti-hiperglucemiante** muy similar (Chiquette y cols., 2004). Hemos de recordar que el aumento de la gluconeogénesis hepática, aún cuando los niveles de glucemia no son precisamente bajos, es considerado como la causa principal de la hiperglucemia encontrada en ayunas en pacientes diabéticos tipo 2. Por lo tanto, una de las funciones principales de los antidiabéticos orales es poder bajar la glucemia en ayunas. En este sentido, está bien documentado que a nivel hepático, las glitazonas inhiben la GNG a largo plazo (efectos mediados por receptores nucleares PPAR- $\gamma$ ) (Bajaj y cols., 2007).

Independientemente del control glucémico, sí se han encontrado entre ambas moléculas diferencias en cuanto al control que ejercen a nivel lipídico. A este respecto, el tratamiento de pacientes con PIO en relación a ROSI se asocia con mejoras

significativas sobre los niveles plasmáticos de triglicéridos, de colesterol unido a partículas HDL y sobre la concentración y el tamaño de las partículas LDL (Goldberg y cols., 2005). Estas diferencias en cuanto a su perfil lipídico hacen que el empleo de la pioglitazona en el tratamiento de la DM2 esté más extendido. Además, los últimos informes negativos recogidos asociados al riesgo de aparición de problemas cardiovasculares (Nissen y cols., 2007) que conlleva el uso de rosiglitazona ha disminuido temporalmente su prescripción habitual a los diabéticos tipo 2. Aunque como ya hemos hecho referencia en esta Tesis Doctoral, estos informes negativos no son concluyentes, ni mucho menos, e incluso no existe unanimidad en cuanto a la restricción del uso de rosiglitazona entre diferentes grupos de investigación.

Por otra parte, otros grupos de investigación también han demostrado que pioglitazona, rosiglitazona y otras glitazonas (troglitazona y englitazona) inhiben, en un corto período de tiempo, la gluconeogénesis hepática, de manera directa y sin que medie la activación de los receptores PPAR $\alpha$  (Nishimura y cols., 1997; Adams y cols., 1998; Raman y cols., 1998; Raman y Judd, 2000). Sin embargo, estos estudios se realizaron utilizando otras técnicas experimentales, como modelos de incubación de hepatocitos en viales cerrados (donde se acumulan metabolitos) y modelos de hígado aislado y perfundido. Hay que indicar que nuestros resultados se han obtenido utilizando la técnica de perfusión de hepatocitos, (como mencionamos anteriormente), un sistema mucho más sensible, más fiable y más fisiológico, al evitar la acumulación de metabolitos en el medio de incubación y reproducir lo más fielmente posible lo que sucede fisiológicamente. Pasaremos a discutir brevemente las diferencias y semejanzas entre nuestros experimentos y los escasos estudios similares recogidos en la literatura:

- Nishimura y su equipo cuando trabajaron con hígado perfundido de rata utilizando lactato como sustrato gluconeogénico demostraron que PIO (1-10  $\mu$ M), en los tan sólo 20 minutos en los que se añadió al buffer de perfusión, disminuía la GNG de forma dosis-dependiente y su efecto inhibitorio permanecía en el tiempo aún después de haber sido retirada del buffer de perfusión. Nuestra dosis de 25  $\mu$ M está en el rango de concentraciones empleada por este equipo de investigación (Nishimura y cols., 1997).

- Los resultados obtenidos con englitazona por el grupo de investigación de Melissa Adams coinciden absolutamente con los nuestros (Adams y cols., 1998). Este grupo realizó perfusión de hígado de rata con 3 sustratos gluconeogénicos (DHA, fructosa y lactato) y demostraron que esta glitazona también inhibe la GNG y activa la glucólisis con los tres sustratos. El rango de concentraciones utilizado fue de 6,25-50  $\mu$ M, aunque al tratarse de glitazonas distintas no podemos establecer una comparación. Englitazona inhibió la GNG a partir de DHA y lactato en un porcentaje similar al de PIO y ROSI, pero esta inhibición a partir de fructosa fue mucho menor que la que producen PIO y ROSI.

- En otros estudios con troglitazona realizados por el grupo de Raman (**Raman y cols., 1998; Raman y Judd, 2000**), empleando el modelo de hepatocitos en incubación se demostró que esta glitazona también inhibe de manera directa y aguda la GNG hepática a partir de lactato en tan solo 1 hora. En este caso, para observar una inhibición significativa de la GNG se debió utilizar la troglitazona a dosis más elevadas, de alrededor de 250  $\mu\text{M}$ .

Dentro los parámetros que hemos estudiado, investigamos el efecto de PIO y ROSI sobre el metabolismo de los compuestos adenílicos, nuestros resultados indican que ambas glitazonas inhiben la relación ATP/ADP tanto citosólica como mitocondrial con todos los sustratos ensayados. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por otros grupos pero en otros tejidos y en cultivo celular (**Fryer y cols., 2002**). En este sentido, se podría pensar que PIO y ROSI inhiben la GNG de forma directa únicamente a través de una disminución de la relación ATP/ADP que afecta sobre todo a la fosforilación de la DHA. No obstante, si esto fuera así, disminuiría la GNG y la glucólisis a la vez. Según nuestros resultados, la glucólisis aumenta con todos los sustratos empleados por acción directa de las dos glitazonas (*el efecto directo sobre la glucólisis será tratado con detalle más adelante*), lo cual indica que la acción de los dos fármacos no está mediada exclusivamente por una disminución de la relación ATP/ADP y que su principal efecto se localiza más allá de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), posiblemente entre la DHAP y la glucosa. Existen varios puntos de control en la GNG más allá de la DHAP, donde pueden actuar las dos glitazonas:

- 1) El ciclo del fosfoenolpiruvato-piruvato: sobre las enzimas gluconeogénicas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa (PEPCK);
- 2) El ciclo de las fructosas: sobre la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa y sobre el regulador alostérico de este bucle, fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-bisP), un potente inhibidor de la GNG, clave en la regulación del bucle de las fructosas al tratarse de un activador alostérico de la enzima fosfofructoquinasa y un inhibidor alostérico de la fructosa-1,6-bisfosfatasa. Por lo tanto, una concentración elevada de este efector alostérico estimula la glucólisis, mientras que una concentración disminuida inhibe la gluconeogénesis;
- 3) El ciclo de las glucosas: a nivel de la enzima gluconeogénica glucosa-6-fosfatasa.

A continuación abordaremos con más detalle cada punto por separado:

- 1) La enzima PEPCK es una de las enzimas limitantes más importantes para la gluconeogénesis. Sin embargo en nuestras condiciones experimentales, esta enzima únicamente intervendría en la regulación de la formación “de novo” de glucosa cuando utilizamos lactato+piruvato como sustrato, porque la vía de entrada a la GNG de los

otros tres sustratos se realiza a través de la DHAP. Al haber centrado nuestros estudios en el sustrato DHA, no hemos profundizado en el análisis de las enzimas gluconeogénicas de este bucle de la vía GNG/glucólisis. Pero sin embargo, otros investigadores sí han demostrado tratando modelos animales de DM2 con pioglitazona y troglitazona, que estas dos glitazonas inhiben a largo plazo la expresión hepática de esta enzima (Hofmann y cols., 1992; Davies y cols., 2001). El equipo de Dana demostró que rosiglitazona altera la expresión de esta enzima cuando se administra a ratas Zucker durante 15 días, pero en este caso determinaron su expresión en tejido adiposo y lo que observaron curiosamente fue una aumento en su expresión (Dana y cols., 2001). Este hecho se explica gracias al proceso denominado **glycerolneogenesis**, del cual la PEPCK es la enzima limitante (**para profundizar en el proceso de glycerolneogenesis, ver Anexo**). Con esto se pone de manifiesto que las glitazonas no ejercen su capacidad hipoglucemiante de la misma manera en todos los tejidos, sino que pueden ejercer acciones totalmente opuestas dependiendo del tejido del que se trate.

2) Según nuestros resultados (ver punto 3.1. de la primera parte de Resultados), la representación de la relación entre la concentración intracelular de DHAP y fructosa-6-fosfato (F6P) (figura 14A) que permite el estudio de este ciclo, nos indica que PIO no afecta este bucle, aunque parece que ROSI sí podría actuar a esta nivel porque disminuye ligeramente la concentración intracelular de F6P. Aunque en nuestro modelo experimental pioglitazona parece no afectar a ninguna enzima, ni al contenido de F-2,6-bisP, otros investigadores sí han demostrado que las glitazonas son capaces de aumentar la cantidad de este importante efecto de manera directa y en muy poco tiempo:

Nishimura y sus colaboradores utilizando un modelo de hígado perfundido, distinto al nuestro, demostraron que PIO **aumenta la cantidad de F-2,6-bisP en tan solo 20 minutos** (Nishimura y cols., 1997). Este resultado se suma al obtenido por Raman y su equipo, los cuales demostraron que el efecto antihiperoglucemiante de la troglitazona se debía, por lo menos en parte, a una elevación de los niveles intracelulares de la F-2,6-bisP (Raman y cols., 1998, 2000).

Además, el grupo de Raman ha demostrado que también a largo plazo troglitazona aumenta los niveles de este efector. Contrariamente a lo observado por Raman a largo plazo, otro equipo de investigación vio que el tratamiento con troglitazona de ratones diabéticos disminuye los niveles intracelulares de los metabolitos glucosa-6-fosfato (G6P) y F6P a la vez, pero esta bajada no se debió a un aumento en los niveles de F-2,6-bisP, sino a una inhibición localizada sobre la enzima fructosa-2,6-bisfosfatasa (Fujiwara y cols., 1995).

Por lo tanto, la ligera inhibición que nosotros encontramos en la concentración intracelular de F6P por acción directa de ROSI puede deberse, bien a un aumento en los niveles de F-2,6-bisP, o bien a una inhibición de la actividad de la fructosa-2,6-



bisfosfatasa. El hecho de que ROSI sí parece que afecte este bucle mientras que PIO no, puede explicarnos parcialmente el hecho de que ROSI tenga un mayor poder hipoglucemiante que PIO. Todo esto indica que serán muy necesarios estudios posteriores y profundos para investigar el efecto de ROSI sobre este bucle metabólico.

3) El principal efecto de pioglitazona y rosiglitazona que hemos demostrado empleando hepatocitos perifundidos con 4 sustratos energéticos distintos (DHA, fructosa, glicerol y lactato+piruvato) radica en una potente inhibición de la liberación de la glucosa a partir de la glucosa-6-fosfato, debido a una potente inhibición de la actividad de la enzima clave y más importante de la **Gluconeogénesis hepática: la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)**. La hidrólisis de la G6P, que es la última etapa común de la producción de la glucosa a partir de la degradación del glucógeno o a partir de la gluconeogénesis hepática, está catalizada por la G6Pasa, una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico (RE) con una subunidad catalítica intraluminal. Asombrosamente, a pesar de tratarse la G6Pasa de una de las enzimas clave en el control de la GNG, únicamente se ha investigado el efecto de pioglitazona sobre esta enzima en tratamiento a largo plazo de modelos animales resistentes a la insulina (Sugiyama y cols., 1990) y esto concuerda con nuestros hallazgos a corto plazo. En cuanto a los parámetros cinéticos de la G6Pasa obtenidos en ausencia de los antidiabéticos, hay que indicar que los valores de  $K_m$  de la G6Pasa en este trabajo son similares a los obtenidos por otros grupos (Arion y Wallin, 1973; Van Schaftingen, 2002) y que los valores de  $V_{max}$  de la G6Pasa concuerdan con aquellos obtenidos por otros grupos ( $160 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ ) (Arion y Wallin, 1973). En nuestro estudio hemos demostrado que pioglitazona y rosiglitazona inhiben directamente la  $V_{max}$  de la enzima, sin apenas modificar su  $K_m$ . Además, las dos glitazonas inhiben a esta enzima directamente en un porcentaje muy parecido, incluso la inhibición de pioglitazona fue algo superior a la de rosiglitazona, lo que sigue induciéndonos a pensar que rosiglitazona, efectivamente, ejerce algún punto de control sobre el bucle de las fructosas, gracias al cual podamos explicar el por qué inhibe con más fuerza la GNG que la pioglitazona.

La inhibición directa de la GNG a nivel de la enzima G6Pasa que producen pioglitazona y rosiglitazona es muy importante, ya que además de inhibir la producción de glucosa, la glucosa-6-fosfato acumulada podría desviarse a los siguientes caminos:

a) síntesis de glucógeno, b) Glucólisis y c) al ciclo de las pentosas fosfato, con el consiguiente aumento de la producción de NADPH en este último caso. El NADPH está muy implicado en la estabilización y aumento del glutatión reducido con la consiguiente reducción del estrés oxidativo que acompaña a la hiperglucemia (Leverve y cols., 2003). Por lo tanto, nuestro siguiente paso en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, consistió en intentar determinar el lugar hacia dónde se dirige esta glucosa-6-fosfato acumulada. Nuestros resultados indican que las dos glitazonas activan la glucólisis, en concreto con DHA como sustrato, PIO y ROSI activaron el flujo glucolítico en un 12%. Por lo tanto,

parte de la glucosa-6-fosfato acumulada se deriva hacia la producción de piruvato por glucólisis, estos resultados concuerdan con los realizados por otros grupos que también demostraron que PIO y ROSI activan la glucólisis hepática en músculo esquelético (Brunmair y cols., 2001). Hay que recordar también que la metformina, el antidiabético más antiguo y extendido en el mundo estimula también la glucólisis hepática (Leverve y cols., 1994).

La pregunta que nos surge es la siguiente: *¿qué ocurre con el resto de la G6P acumulada no empleada en la glucólisis?* Aunque el poder antioxidante a largo plazo de las glitazonas está más que comprobado y ratificado, nunca antes se había investigado el efecto de estos fármacos sobre la ruta de las pentosas fosfato ni en cultivo celular, ni en modelos animales de experimentación, ni en tratamiento de pacientes a largo plazo, ni mucho menos su acción directa sobre esta vía metabólica. Nosotros hemos sido los primeros en afrontar este tema y hemos comprobado que, sobre hepatocitos de rata Wistar en incubación, ni pioglitazona ni rosiglitazona ejercen ninguna acción directa sobre esta ruta: ni aumentan ni disminuyen la desviación de la glucosa-6-fosfato hacia la producción de NADPH por esta vía. Eliminada esta opción, nos decantamos por determinar si el camino que toma la glucosa-6-fosfato es el de la síntesis de glucógeno. Varias investigaciones en las que se demostró que el tratamiento crónico con troglitazona y pioglitazona aumentaban la síntesis de glucógeno en músculo esquelético apoyaron nuestra idea (Sugiyama y cols., 1996; Park y cols., 1998; Cha y cols., 2001; Kausch y cols., 2001). Aunque, cuando se determinó el efecto a corto plazo de troglitazona sobre la síntesis de glucógeno en músculo esquelético, dicho efecto fue el contrario que a largo plazo.: troglitazona disminuyó en un 36% la síntesis de glucógeno (Fürsinn y cols., 1997; Gras y cols., 2003). En la actualidad estamos realizando experimentos encaminados para dilucidar si a corto plazo, PIO y ROSI estimulan o no la síntesis de glucógeno.

El **GLUCAGÓN** es la hormona hiperglucemiante por excelencia. Esta hormona se secreta por las células- $\alpha$  del páncreas y sus efectos se oponen completamente a los de la insulina. Concretamente en el hígado, la relación insulina:glucagón determina el intrincado control de la glucólisis/gluconeogénesis. El efecto del glucagón sobre el hígado es muy complejo e implica una regulación coordinada de los factores de transcripción y de la cascada de señalización que provoca la unión del glucagón con su receptor hepático. En situación de ayuno, cuando la glucemia es muy baja, el glucagón estimula la degradación del glucógeno almacenado en el hígado liberándose así glucosa al torrente sanguíneo. La secreción del glucagón por las células- $\alpha$  pancreáticas se inhibe, en individuos sanos, después de las comidas. Sin embargo, se ha comprobado que el nivel de glucagón aumenta de manera significativa en enfermos diabéticos tipo II (Ohneda y cols., 1984; Unger, 1985) y se ha propuesto recientemente que estos altos niveles de glucagón contribuyen parcialmente a

la desregulación de la homeostasis de la glucosa y a la resistencia a la insulina de la diabetes (Salehi y cols., 2006). En esta enfermedad, la anomalía en la secreción del glucagón sumada a la insulino-resistencia típica, tiene como resultado una hiperglucemia en ayunas y post-prandial. Esta hiperglucemia aumenta, aún más, debido a la glucosa liberada a partir de los depósitos del glucógeno hepático, como resultado de la hipersecreción del glucagón. La secreción anómala del glucagón en la DM 2 se debe al mal funcionamiento de las células- $\alpha$  del páncreas, durante la evolución de esta enfermedad, además de sufrir un desgaste en su funcionalidad las células- $\beta$ , también las células- $\alpha$  pierden hasta un 50% de su función (Porte y Khan., 1995).

Por lo tanto, la existencia de antidiabéticos orales que sean capaces de antagonizar los efectos del glucagón es sumamente beneficiosa para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Nosotros hemos sido los primeros en demostrar que las glitazonas (PIO y ROSI) antagonizan los efectos hiperglucemiantes y pro-diabéticos del glucagón en el hígado, principal órgano diana de la hormona. Además, se trata de un efecto rápido, directo e independiente de la activación de PPAR- $\gamma$ , ya que lo hemos obtenido en un corto período de tiempo (1-2 horas) mediante el uso de la técnica de perfusión de células. Nuestros resultados indican, por primera vez, que las TZDs antagonizan la hiperglucemia provocada por la adición de glucagón en hepatocitos aislados de ratas en ayunas mediante dos maneras: disminuyen la producción de glucosa (inhibiendo la GNG hepática) en presencia de glucagón hasta valores próximos al control (figura 18A) y además, estimulan significativamente la glucólisis inhibida por la hormona (figura 19). También hemos encontrado este mismo efecto directo anti-glucagón cuando analizamos la glucogenólisis en hepatocitos aislados de ratas no en ayunas. A este respecto, ninguna de las dos glitazonas inhibieron significativamente la liberación neta de glucosa a partir del glucógeno hepático por glucógenolisis (figura 21), pero sí que aumentaron significativamente el flujo glucolítico de esta glucosa inmediatamente después de ser liberada por la glucógenolisis (figura 22).

Esta nueva cualidad descubierta de las glitazonas las hace todavía más atractivas como tratamiento de elección en la terapia de la DM2. Aunque este efecto anti-glucagón, de momento solo se ha demostrado en una situación “*in vitro*” y a corto plazo, podría contribuir a aumentar los efectos beneficiosos que las glitazonas ejercen sobre la homeostasis de la glucosa “*in vivo*” y a largo plazo.

Una vez finalizada la discusión del efecto directo de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis hepática, pasaremos a la exposición profunda y razonada de la acción aguda y directa de las dos tiazolidindionas sobre la **GLUCÓLISIS HEPÁTICA**.

Los resultados que hemos obtenido indican que tanto PIO como ROSI estimulan la glucólisis hepática en un 12%, con DHA y fructosa como sustratos y aproximadamente en un 40%, cuando el sustrato empleado fue el glicerol. Dichos resultados están en consonancia con los obtenidos por Adams y su equipo (Adams y cols., 1998), así como con otros estudios realizados con metformina en condiciones similares con perfusión de hepatocitos (Argaud, 1993), sin olvidar que la propia insulina activa la glucólisis hepática en situación post-prandial. En el mismo estudio del equipo de Adams, utilizando hígado en perfusión, englitazona activó la glucólisis a partir de DHA y fructosa en un 42 % y un 50%, respectivamente, con más fuerza que lo obtenido por nosotros con PIO y ROSI. En tejido nervioso, el cual no está absolutamente implicado en la resistencia a la insulina de la DM2, se ha demostrado que el tratamiento durante 48 horas de astrocitos y neuronas en cultivo con pioglitazona aumenta la liberación de lactato desde la astroglia, sirviendo éste como combustible energético para las neuronas adyacentes (Izawa y cols., 2009).

La investigación del mecanismo de acción de las glitazonas se ha centrado prácticamente en la explicación de su poder anti-hiperglucemiante en el tratamiento a largo plazo de diabéticos tipo 2 y ha dejado aparcado el estudio de sus efectos directos e independientes de la activación de los receptores PPAR $\gamma$ . Sumado a la escasa investigación realizada hasta el momento de las acciones directas de las glitazonas, hay que añadir que se ha ahondado menos en el estudio de su acción directa sobre la glucólisis que sobre la gluconeogénesis. Las investigaciones que existen al respecto se han centrado únicamente en los efectos de las glitazonas sobre la enzima glucolítica hexoquinasa de músculo esquelético y tejido adiposo o su isoenzima glucoquinasa del hígado y células- $\beta$  pancreáticas. En todos estos tejidos sumamente implicados en la aparición y desarrollo de la DM2, el tratamiento a largo plazo con pioglitazona y troglitazona aumentó la expresión y actividad de esta enzima (Braithwaite y cols., 1995; Kim y cols., 2002; Kim y cols., 2004).

En nuestras condiciones experimentales de ayunas 24 horas, el flujo glucolítico a través de la glucokinasa es prácticamente nulo (GK) es despreciable por la baja expresión de la GK debida al ayuno de 24 h (Groen y cols., 1983; 1986) y por lo tanto, la activación directa de PIO y ROSI sobre la glucólisis debe localizarse en el bucle del fosfoenolpiruvato. Nosotros hemos sido los primeros en demostrar que existe una acción rápida y directa de las glitazonas sobre la enzima sigmoidea: piruvato quinasa. Recordamos los efectos de PIO y ROSI sobre la glucogenólisis, que como hemos expuesto en el punto 6 de la primera parte de resultados, ni pioglitazona, ni rosiglitazona ejercieron ninguna modificación neta en la liberación de glucosa a partir del glucógeno hepático por glucógenolisis (figura 21), pero sí que aumentaron significativamente el flujo glucolítico de esta glucosa inmediatamente después de ser liberada por la glucógenolisis (figura 22). Es decir, PIO y ROSI aumentan la glucólisis hepática independientemente de la fuente de la glucosa: bien la recién formada por

GNG a partir de DHA en ratas en ayunas, o la liberada desde el glucógeno en ratas NO en ayunas. Estos resultados están en consonancia con un efecto activador de PIO y ROSI sobre la enzima glucolítica más importante: la **piruvato quinasa (PK)**. Esta es una enzima alósterica con una cinética sigmoidea, que posee una regulación alostérica mediante activadores (fructosa-1,-bisfosfato) o inhibidores (alanina, ATP) (Hue y cols., 1981; Hers y Hue, 1983). Además, el glucagón también inhibe su actividad a través de su fosforilación, teniendo al AMPc como mediador (Pilkis y cols., 1988). Por esta razón nosotros además de determinar la  $V_{max}$  de la enzima, también determinamos la relación  $v/V_{max}$ , la cual se trata de un indicador altamente reconocido del estado de fosforilación de la enzima. Cuando esta relación disminuye significa que la enzima ha sido fosforilada en su mayoría y por lo tanto inhibida (Bartrons y cols., 1984).

De acuerdo a la metodología que empleamos (punto 4.2. Determinaciones Analíticas de la sección Material y Métodos), nosotros analizamos la acción directa de pioglitazona y rosiglitazona sobre hepatocitos “*in vitro*” y los valores control que obtuvimos, en ausencia de las glitazonas, fueron similares a los obtenidos en las mismas condiciones experimentales por otros grupos (Ichai y cols., 2001). Analizamos la actividad de la piruvato quinasa en su forma parcialmente purificada (predominante en músculo y cerebro) y en su forma purificada (forma hepática), tras tratamiento de las muestras con  $(NH_4)_2SO_4$ . Curiosamente, las dos glitazonas no actuaron de la misma manera cuando se trató de una u otra forma de la enzima.

- Sobre la forma purificada (hepática), pioglitazona y rosiglitazona aumentaron significativamente la relación  $v/V_{max}$ , señal de que la enzima no está mayoritariamente fosforilada y por lo tanto, se encuentra activada. Sin embargo, ambas glitazonas inhibieron ligeramente, aunque no significativamente, la  $V_{max}$  de esta forma purificada de la enzima. Analizando este parámetro enzimático ( $v/V_{max}$ ), el efecto de las glitazonas que obtuvimos sobre la actividad de la forma purificada es el contrario al producido por silibina (Detaile y cols., 2008), Mg-ATP (Ichai y cols., 2000;) y glucagón (Jiang y Zhang, 2003), sustancias conocidas, sobre todo el glucagón, por la inhibición de la glucólisis que producen.
- Cuando se trató de la forma parcialmente purificada, el efecto de las glitazonas sobre la relación  $v/V_{max}$  fue nulo, mientras que sí activaron significativamente y en un alto porcentaje la  $V_{max}$  de la enzima.

Debido a que el ATP y el ADP son el producto y el sustrato de la piruvato quinasa, respectivamente, pueden actuar como posibles efectores alostéricos de la enzima. El efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la relación ATP/ADP citosólica y mitocondrial fue de clara tendencia inhibitoria. Aunque existieron algunas excepciones, como el caso de la rosiglitazona en presencia de DHA, donde el antidiabético no modificó prácticamente la relación citosólica, ni mitocondrial. También

pioglitazona, en las muestras obtenidas a partir de fructosa como sustrato, no ejerció ningún efecto sobre la relación ATP/ADP en el citosol, aunque sí que inhibió claramente dicha relación a nivel mitocondrial. El hecho de que el efecto global de las dos glitazonas sobre hepatocitos en perfusión consista en una disminución de la relación ATP/ADP en los dos compartimentos celulares, excluye un posible efecto de los fármacos sobre la translocasa de los nucleótidos de la mitocondria (Leverve y cols., 1994). Estos datos se pueden interpretar mediante dos mecanismos diferentes: una disminución en la producción de energía o un aumento en procesos consumidores de ATP. La posible explicación para este claro efecto de las glitazonas sobre los niveles de los nucleótidos adenílicos, la encontramos en la inhibición de la respiración en su estado basal de los hepatocitos intactos que obtuvimos (ver figura 24). Así la activación directa de la glucólisis que producen pioglitazona y rosiglitazona, a través de la piruvato quinasa, muy probablemente consistirá en un mecanismo que sirva a la célula como una fuente de producción adicional de ATP.

Como las enzimas glucolíticas: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y 3-fosfoglicerato kinasa, trabajan en condiciones cercanas al equilibrio, la disminución de la relación ATP/ADP en el citosol favorecerá la formación de 3-fosfoglicerato y por lo tanto, de fosfoenolpiruvato. Sin embargo, cuando analizamos la concentración intracelular de estos metabolitos (figuras 11A y B, 12 A y B, 13 A y B) no encontramos ningún efecto claro como resultado de la acción de las glitazonas, incluso en el caso de la condición en la que utilizamos fructosa como sustrato (figuras 12A y B), ambas glitazonas inhibieron claramente la concentración de estos dos metabolitos. Estos datos concuerdan con los obtenidos con la almitrina (sustancia empleada en enfermedades crónicas de pulmón), con la que se ha demostrado que, en hepatocitos de rata en perfusión es capaz de activar el flujo glucolítico ( $J_{L+P}$ ) disminuyendo la concentración de los dos metabolitos antes mencionados (Leverve y cols., 1994). Esto es así, porque la activación de la enzima piruvato quinasa conduce a un aclaramiento del fosfoenolpiruvato y mantiene su concentración en niveles bajos.

Por lo tanto, explicamos la activación directa de la piruvato quinasa, por parte de pioglitazona y rosiglitazona, por una disminución de la relación ATP/ADP citosólica, que provoca una modificación alostérica de la enzima, con el consiguiente aumento de su actividad. Otra posible explicación para la activación directa de la piruvato quinasa demostrada en nuestros experimentos, consistiría en un aumento de la concentración citosólica de  $\text{NAD}^+$ . Empleando DHA como sustrato en hepatocitos de rata en perfusión, se ha demostrado que un aumento citosólico de este nucleótido nicotínico disminuye la gluconeogénesis y activa la glucólisis mediante una activación alostérica de la enzima piruvato quinasa (Devin y cols., 2001). Sin embargo, nosotros no hemos podido cuantificar los nucleótidos nicotínicos y los datos de los que disponemos no nos ofrecen ninguna información concluyente a este respecto. Esta posible acción directa de

las glitazonas la investigaremos en el futuro como pieza fundamental en la integración del efecto directo metabólico y mitocondrial de pioglitazona y rosiglitazona.

En definitiva, nuestros resultados demuestran por primera vez la existencia de efectos metabólicos **AGUDOS Y DIRECTOS** de la pioglitazona en hepatocitos en perfusión, no mediados por activación de los receptores PPAR- $\gamma$  inhibiendo la gluconeogénesis y activando la glucólisis, principalmente. Estas acciones descritas en este trabajo contribuyen a esclarecer el mecanismo de acción completo del antidiabético oral pioglitazona y contribuyen en la sensibilización del hígado a la insulina. Al igual que sucede en el músculo esquelético (junto con el tejido adiposo y el hígado son los órganos sensibles a la acción de la insulina implicados en la DM2), la acción sensibilizadora de la insulina se asocia con un aumento moderado de la glucólisis y del contenido en glucógeno (Crettaz y cols., 1980).

Los resultados de la investigación inicial que llevamos a cabo centrada en la los efectos metabólicos directos de las dos glitazonas (pioglitazona y rosiglitazona) en hepatocitos de rata en perfusión, nos hicieron pensar que también la respiración celular podría estar afectada de manera directa por estos dos antidiabéticos. Además, nuestra idea principal en este sentido es investigar si PIO y ROSI ejercen acciones mitocondriales directas a nivel hepático que podrían contribuir a sus efectos antidiabéticos.

Por este motivo decidimos investigar, en primer lugar la respiración en hepatocitos y su influencia por las glitazonas, a la luz de lo obtenido, decidimos abrir una nueva línea de investigación que abarcara la mayor parte posible de los parámetros de la función mitocondrial y que nosotros pudiésemos determinar en base a nuestras posibilidades técnicas: respiración en mitocondrias aisladas, rendimiento de la fosforilación oxidativa, producción de radicales libres y actividad de los complejos respiratorios. Además, el hecho de que varios autores hubiesen descrito acciones mitocondriales directas del grupo de fármacos de la clase glitazonas (troglitazona, ciglitazona y nuestras dos glitazonas de estudio) nos reafirmaron aún más en la realización de este estudio mitocondrial. Nos animó aún más el hecho de que, aunque los resultados preliminares mitocondriales que obtuvimos y los publicados eran muy prometedores y abrían un nuevo campo de acción en la terapia de las glitazonas, existían escasas publicaciones a este respecto a nivel hepático.

Es necesario señalar que muchos de los efectos directos mitocondriales de las glitazonas que habían sido demostrados por otros autores apuntaban hacia un deterioro mitocondrial, por ejemplo:

- En hepatocitos humanos y de rata, las glitazonas causaban una disfunción mitocondrial por un aumento en su permeabilidad en un rango de potencia de troglitazona > pioglitazona > rosiglitazona (**Haskin y cols., 2001**).
- En líneas celulares de hepatocarcinoma, troglitazona (25-100  $\mu\text{M}$ ) en tan solo minutos disminuía el potencial eléctrico transmembranario ( $\Delta\psi$ ), con el consiguiente aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que lleva asociado este fenómeno (**Bova y cols., 2000**).
- Sobre astrocitos, ciglitazona aumentaba en muy poco tiempo la liberación de ROS mitocondrial (**Perez-Ortiz y cols., 2004**). Este mismo efecto pro-activador de la formación de ROS mitocondrial lo observaron otros autores al trabajar con troglitazona y pioglitazona sobre células de astrocitoma (**Feinstein y cols., 2005**).



Además, hay que subrayar que los efectos mitocondriales a largo plazo asociados al uso de las glitazonas se han demostrado y documentado en diversos tipos celulares, aunque los estudios en el hígado han sido muy escasos. A este respecto, en un estudio realizado con ratones diabéticos tratados con ROSI a largo plazo se demostró que existe una alteración en las mitocondrias de tejido adiposo, músculo e hígado. Sin embargo, el tratamiento con rosiglitazona solamente modificó algunos de los parámetros de actividad mitocondrial (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ATP-asa, complejos II y III) en adipocitos y no en hígado y músculo (Choo y cols., 2006). Estos datos nos hacen pensar que es probable que, a nivel hepático, las glitazonas actúen a nivel de la mitocondria únicamente mediante mecanismos directos e independientes de la activación de los receptores PPAR- $\gamma$ . También a largo plazo sobre líneas celulares de neuronas humanas, se ha comprobado que pioglitazona (a concentraciones micromolares) reduce el estrés oxidativo y aumenta el contenido del ADN y la biogénesis mitocondrial (Ghosh y cols., 2007). Estos datos hacen muy atractivo el uso de pioglitazona en el tratamiento de mitocondriopatías.

El hecho de que las glitazonas estimulen la producción de ROS en otros tipos celulares diferentes de nuestro modelo de mitocondrias aisladas a partir de hígados de ratas Wistar, puede resultar incluso beneficioso en el caso de células cancerígenas (hepatocarcinoma). A través del aumento en la producción de ROS se puede dirigir el efecto de las glitazonas hacia el daño y la progresiva muerte de estas células cancerosas y dañinas, sumándose este hecho a las numerosas evidencias que existen para proponer una investigación más profunda del papel de las glitazonas en la terapia contra el cáncer (Knapp y cols., 2006).

Curiosamente, la mayor parte de los efectos mitocondriales que se han obtenido con troglitazona son perjudiciales para la función mitocondrial. Por ejemplo, el equipo de Haskin demostró que troglitazona era la glitazona que aumentaba en mayor grado la producción de ROS en mitocondrias hepáticas. Este efecto dañino de troglitazona sobre las mitocondrias recientemente se está postulando como la causa principal del daño hepático de origen desconocido que produce su uso y que provocó su retirada del mercado en el año 2000. En este sentido, el poro de transición mitocondrial (PTP) ejerce un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad mitocondrial y celular y el desencadenamiento de la muerte celular por apoptosis. Se ha demostrado que troglitazona y ciglitazona, pero ni PIO ni ROSI, inducen la apertura de este poro contribuyendo así a la hepatotoxicidad inducida por la troglitazona (Masubuchi y cols., 2006; Yokoi, 2010). Estos datos obtenidos con hepatocitos de ratón, concuerdan absolutamente con el efecto prácticamente nulo o ligeramente inhibitorio que encontramos nosotros al medir la apertura de este poro en mitocondrias y en hepatocitos permeabilizados de rata. La ligera inhibición por la acción de PIO y ROSI que encontramos, por lo tanto, constituye otra prueba más del efecto tan beneficioso que poseen ambos fármacos sobre la función mitocondrial y sirven como una posible

explicación del por qué su uso no provoca hepatotoxicidad, como ocurre en el caso de troglitazona.

La búsqueda bibliográfica que realizamos y la demostración clara de que, tanto pioglitazona como rosiglitazona, disminuyen la relación ATP/ADP mitocondrial con DHA, fructosa y glicerol como sustratos, nos indujeron con aún más si cabe a explorar la acción directa a nivel mitocondrial de estos dos antidiabéticos. Cuando determinamos la respiración en hepatocitos intactos tras una breve incubación de 30 min en presencia de pioglitazona, comprobamos que el antidiabético inhibió la respiración en su estado basal y también en presencia del desacoplador mitocondrial dinitrofenol (DNP) (**figura 24, resultados metabólicos**). Como pioglitazona no ejerció ningún efecto significativo en presencia de oligomicina, pero sí que inhibió la respiración en presencia del DNP, descartamos la intervención de la ATP-sintasa y por lo tanto, reducimos el radio de acción de las glitazonas a algún complejo respiratorio anterior al complejo V. Esta misma inhibición de la respiración localizada en algún complejo anterior a la ATP-asa la obtuvimos al utilizar mitocondrias aisladas. A nivel mitocondrial, PIO y ROSI, activaron el estado 4 e inhibieron el estado 3 (fosforilante, en presencia de ADP) con glutamato/malato (GM) o succinato/malato mas rotenona (SM), como sustratos (**Efecto de pioglitazona y rosiglitazona sobre la respiración mitocondrial, punto 1 de resultados mitocondriales**). Aunque ningún autor antes de nosotros había determinado la respiración en hepatocitos intactos, sí que varios investigadores han determinado el efecto de las glitazonas sobre la respiración de mitocondrias aisladas de músculo e hígado, tanto a largo como a corto plazo. La medida de la respiración en hepatocitos intactos, que nosotros realizamos en un primer momento, es una medida mucho más fisiológica que la realizada sobre mitocondrias pero tiene el inconveniente de que a partir de ella es muy difícil deducir a qué nivel actúan las glitazonas. Volviendo a lo observado por otros autores, gran parte concuerda con lo que nosotros obtuvimos. La investigación que llevaron a cabo Brunmair y su equipo (**Brunmair y cols., 2004**) fue bastante parecida a la nuestra:

- este equipo de investigación utilizó mitocondrias aisladas de músculo esquelético e hígado y midió su respiración (consumo de oxígeno) en presencia de los dos mismos sustratos que los empleados por nosotros (GM y SM) y de varias glitazonas en un corto período de tiempo. En mitocondrias hepáticas, al igual que nosotros, encontraron una inhibición del estado 3 respiratorio. Pero en este caso la inhibición fue más patente en presencia de GM, mientras que fue prácticamente nula con SM. Además con GM, solamente observaron que PIO inhibía el estado 3 a la mayor concentración utilizada de 100  $\mu$ M, mientras que nosotros obtuvimos una inhibición muy clara del estado 3 a partir de la concentración más baja de las glitazonas: 10  $\mu$ M. Otra diferencia del estudio de Brunmair respecto al nuestro, consistió en que la activación del estado 4 que nosotros obtuvimos con los dos sustratos no la reprodujeron los experimentos del equipo de Brunmair, ellos

solamente encontraron esta activación del estado 4 en presencia de SM y a la concentración más alta de ROSI y PIO, de 100  $\mu$ M .

- La activación del estado 4 demostrada en nuestro estudio, además de no corresponderse del todo con el trabajo de Brunmair, tampoco coincide con otros trabajos en los que se demostró que varias glitazonas, entre ellas ciglitazona, troglitazona, darglitazona, rosiglitazona y pioglitazona, inhiben los estados respiratorios 3 y 4 en tan solo 20 minutos (Nadanaciva y cols., 2007).

Las diferencias que existen respecto al efecto directo de las glitazonas sobre el estado 4 de la respiración entre las diferentes investigaciones, se pueden explicar debido a la diferente metodología empleada por nosotros y los otros grupos de investigación. Brunmair y su equipo, al igual que nosotros, emplearon un electrodo de Clark, mientras que Nadaciva y su equipo monitorizaron el consumo de oxígeno mitocondrial mediante espectrofluorimetría, una técnica mucho menos fisiológica que la empleada por Brunmair y nosotros.

Además, nosotros investigamos la respiración mitocondrial, en presencia de estas dos glitazonas, en más condiciones experimentales que los anteriores grupos de investigación. Así demostramos que, tanto PIO como ROSI, inhiben la respiración exacerbada por el uso de un desacoplador mitocondrial (DNP) y que PIO ejerce una ligera inhibición sobre el complejo IV. Lo que nos indica que el efecto de las dos glitazonas se localiza, principalmente, a nivel de los complejos I y III.

Como ya expusimos en la introducción de este trabajo, la disfunción mitocondrial es un parámetro intrínseco a la diabetes tipo 2. Así, las mitocondrias de ratas Gotokazi, modelo animal de este tipo de diabetes, presentan unas tasas respiratorias muy elevadas (Rolo y cols., 2006). La estimulación de la respiración que aparece en la diabetes, junto con su hiperglucemia característica, provocan una mayor producción y liberación de especies reactivas de oxígeno desde las mitocondrias (Brwonlee, 2001; Leverage, 2003), los cuales imposibilitan la acción de la insulina en tejido periférico y participan en el desarrollo de la insulino-resistencia (Bashan y cols., 2009). El hecho de que PIO y ROSI inhiban la liberación de  $H_2O_2$  mitocondrial en cuanto las añadimos al medio de análisis, es decir de manera directa e independiente de PPAR- $\gamma$ , es la primera demostración de una inhibición a corto plazo que ejercen estas glitazonas sobre la producción de ROS en mitocondrias hepáticas. Esta inhibición directa de la producción de ROS en el hígado se suma a los muchos estudios que han demostrado que la mejoría en los parámetros inflamatorios y el estrés oxidativo, asociados ambos a las complicaciones vasculares de la diabetes, se debe a una disminución en la producción de ROS por parte de las células endoteliales (McGuire e Inzucchi, 2008; Nissen y cols., 2008). Es muy importante resaltar que

la mayor parte de los efectos de las glitazonas sobre las células endoteliales es independiente de la activación de PPAR- $\gamma$  (Ceolotto y cols., 2008).

El estudio del efecto directo de pioglitazona y rosiglitazona sobre la respiración y sobre la producción de ROS mitocondrial, nos indicaba claramente que su acción mitocondrial se localiza principalmente sobre el complejo I y III de la cadena respiratoria. Nosotros investigamos la actividad de estos dos complejos y le sumamos la del complejo II, del cual, aunque intuíamos por nuestros resultados que no estaba implicado en las acciones directas de estas glitazonas, gracias a su estudio podíamos confirmar nuestra hipótesis. La inhibición de la actividad del complejo I por las glitazonas (*al igual que hace la metformina*) concuerda con lo obtenido por otros autores, pero como ocurrió con la respiración, nosotros a diferencia de otras investigaciones observamos una disminución en la actividad de este complejo a concentraciones muy bajas de los fármacos (Brunmair y cols., 2004; Nadanaciva y cols., 2007). Por el contrario, nosotros hemos sido los primeros en proponer y llevar a cabo el análisis del efecto directo de las glitazonas sobre el complejo II y III. Gracias a los resultados que obtuvimos: inhibición clara y significativa de la actividad del complejo III y no modificación de la actividad del complejo II; confirmamos y reafirmamos los resultados obtenidos anteriormente en la oxigrafía y la medida de ROS.

Podemos proponer, por tanto, como adelantamos antes, que pioglitazona y rosiglitazona inhiben la respiración mitocondrial en el mismo sentido que lo hacen otros medicamentos antidiabéticos, como la metformina. Además dicha inhibición es coherente con su acción antioxidante, ya que la inhibición de la respiración a nivel de los distintos complejos de la cadena respiratoria acarrea una menor producción de radicales libres en la mitocondria (Leverve, 2003). La metformina (el antidiabético oral de primera elección, perteneciente a la clase biguanida) inhibe la respiración mitocondrial en presencia de GM, pero no de SM, como es el caso de PIO y ROSI. Se ha demostrado que la metformina inhibe la respiración en hepatocitos intactos por una inhibición localizada a nivel del complejo I (El-Mir y cols., 2000) y que la inhibición del “flujo reverso de electrones” a nivel de este complejo es la causa de la disminución de ROS que produce este antidiabético (Batandier y cols., 2006). El paralelismo que existe en la acción mitocondrial “in vitro” entre nuestras dos glitazonas sometidas a estudio y la metformina, nos inducen a pensar que la restauración en la actividad del complejo I que producen ambos tipos de antidiabéticos contribuyen fuertemente en sus acciones antidiabéticas terapéuticas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que se trata de antidiabéticos con estructura y naturaleza distinta:

las glitazonas son de naturaleza lipofílica y se acumulan preferentemente en la membrana mitocondrial, mientras que la metformina al ser una molécula cargada positivamente ejerce su acción de forma indirecta sobre la mitocondria y necesita que la célula esté “**intacta**” para poder ejercer su efecto indirecto, ya que la incubación de

mitocondrias aisladas con metformina no tuvo ningún efecto sobre la respiración (El-Mir, 2000).

Aunque no se disponen de datos de concentración de los fármacos en fracciones celulares, es muy probable que el progresivo acumulo de las glitazonas alrededor del complejo I las convierta en un gran inhibidor de la respiración (Brunmair y cols., 2001; Fürnsinn y cols., 2000). Es importante resaltar, (*asumiendo que no se puede siempre extrapolar los resultados “in vitro” a una situación “in vivo”*), que este efecto inhibitorio directo de la función mitocondrial obtenido “in vitro”, podría ser más beneficioso cuando se prolongue el tratamiento con estas dos glitazonas “in vivo”.

En consonancia con la ralentización de la función mitocondrial que producen PIO y ROSI a corto plazo, está el hecho de que no hayamos encontrado ningún efecto significativo sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa (ATP/O<sub>2</sub>). Estos datos nos llevan a pensar que ninguna de las dos glitazonas afecta los fenómenos de *leak* y *slipping*, fenómenos que disipan energía y provocan una pérdida del acoplamiento entre la oxidoreducción y la fosforilación del ADP para formar ATP (Murphy and Brand, 1987, 1988; Brand, 1990, 1994).

Se ha identificado una proteína mitocondrial de unión a la pioglitazona, denominada “mitoneet”, que se expresa en cerebro, hígado, músculo y adipocitos de roedores (Colca y cols., 2004). La existencia de este “receptor” mitocondrial puede servir como posible explicación de las acciones directas tan claras que hemos observado, realizando así las glitazonas sus efectos mitocondriales independientemente de los receptores PPAR- $\gamma$ , a través de su unión con estas proteínas mitocondriales.

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
iNVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCÓNDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSiGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

***CONCLVSiONES***

1. En hepatocitos de rata perifundidos con dihidroxiacetona, fructosa, glicerol y lactato más piruvato como sustratos, pioglitazona y rosiglitazona ejercen acciones antidiabéticas directas e independientes de la activación de los receptores PPAR $\gamma$ , inhibiendo la gluconeogénesis y activando la glucólisis.

*Sur les hépatocytes du rat périfuses avec du dihydroxyacétone, du fructose, du glycérol et du lactate plus pyruvate comme substrats, la pioglitazone et la rosiglitazone exercent directement des actions anti-diabétiques indépendant de l'activation des récepteur PPAR $\gamma$ , en inhibant la néoglucogénèse et en activant la glycolyse.*

2. En hepatocitos de rata perifundidos, pioglitazona y rosiglitazona ejercen esta acción directa antidiabética inhibiendo la liberación de la glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato.

*Sur les hépatocytes du rat périfuses, la pioglitazone et la rosiglitazone exercent directement cette action antidiabétique en inhibant la libération du glucose à partir du glucose-6-phosphate.*

3. En hepatocitos de rata perifundidos con dihidroxiacetona, pioglitazona y rosiglitazona antagonizan los efectos pro-diabéticos del glucagón disminuyendo la activación de la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato.

*Sur les hépatocytes du rat périfuses avec du dihydroxyacétone, la pioglitazone et la rosiglitazone compensent les effets pro-diabétiques du glucagon en diminuant l'activation de l'hydrolyse du glucose-6-phosphate*

4. Todos los efectos inhibidores de pioglitazona y rosiglitazona sobre la gluconeogénesis y su activación estimulada por el glucagón, son mediados por una acción inhibidora directa de las dos glitazonas sobre la enzima gluconeogénica más importante: la glucosa 6-fosfatasa.

*Tous les effets inhibiteurs de la pioglitazone et de la rosiglitazone sur la néoglucogénèse et son activation stimulée par le glucagon, sont médiés par une action inhibitrice directe des deux glitazonas sur l'enzyme la plus importante de la néoglucogénèse: la glucose-6-phosphatase.*

5. En hepatocitos de rata perifundidos con dihidroxiacetona, pioglitazona y rosiglitazona activan la degradación de la glucosa liberada desde el glucógeno por glucógenolisis hasta la formación de lactato más piruvato.

*Sur les hépatocytes du rat périfusés avec du dihydroxyacétone, la pioglitazone et la rosiglitazone activent la dégradation du glucose libéré à partir du glycogène par glycogénolyse à la formation de lactate plus pyruvate.*

6. Todos los efectos activadores de pioglitazona y rosiglitazona sobre la glucólisis y sobre la degradación de la glucosa liberada en la glucógenolisis, son mediados por una acción directa de las dos glitazonas sobre la enzima glucolítica más importante: piruvato quinasa.

*Tous les effets activateurs de la pioglitazone et de la rosiglitazone sur la glycolyse et la dégradation du glucose libéré par la glycogénolyse sont médiés par une action directe des deux glitazones sur l'enzyme la plus importante de la glycolyse: la pyruvate kinase.*

**7.** En los hepatocitos intactos, pioglitazona y rosiglitazona inhiben la respiración celular de manera dosis-dependiente. Esta inhibición se debe a un efecto localizado antes del complejo V de la cadena respiratoria.

*Sur les hépatocytes intacts, la pioglitazone et la rosiglitazone inhibent la respiration cellulaire de une manière dose-dépendante. Cette inhibition est due à un effet localisé avant le complexe V de la chaîne respiratoire.*

**8.** Pioglitazona y rosiglitazona inhiben la respiración en mitocondrias aisladas. Dicha inhibición se localiza sobre los complejos I y III de la cadena respiratoria.

*La pioglitazone et la rosiglitazone inhibent la respiration en mitochondries isolées. Cette inhibition est située sur le complexe I et III de la chaîne respiratoire.*

**9.** En mitocondrias aisladas, ni pioglitazona ni rosiglitazona modifican significativamente la eficacia de la fosforilación oxidativa con ninguno de los sustratos ensayados.

*En mitochondries isolées, ni la pioglitazone, ni la rosiglitazone modifient significativement le rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de aucun des substrats testés.*

**10.** En hepatocitos permeabilizados y mitocondrias aisladas, pioglitazona y rosiglitazona no modifican significativamente la apertura del poro de transición mitocondrial, con una ligera tendencia a su inhibición.

*Sur les hépatocytes perméabilisés et les mitochondries isolées, la pioglitazone et la rosiglitazone ne modifient pas significativement l'ouverture du pore de transition mitochondrial, avec une légère tendance à l'inhibition.*

**11.** Pioglitazona y rosiglitazona muestran efectos antioxidantes muy claros en mitocondrias aisladas de hígado, inhibiendo la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial.

*La pioglitazone et la rosiglitazone montrent très clairs effets antioxydants sur les mitochondries isolées du foie, en diminuant la production d'espèces réactives de l'oxygène au niveau mitochondrial.*



*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
iNVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSiGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

*RESVMEN DOCTORADO  
EVROPEO ~  
RÉSVMÉ DOCTORAT  
EVROPÉEN*

## **OBJECTIF**

La pioglitazone (PIO) et la rosiglitazone (ROSI), deux agents antidiabétiques oraux, qui appartiennent à la classe antidiabétique des glitazones ou thiazolidinediones (TZDs), sont largement utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (DM2). Les deux médicaments exercent ses effets antidiabétiques principalement en diminuant la résistance à l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux et, secondairement, par la inhibition de la néoglucogenèse hépatique. Ces effets à long terme hypoglycémiants des PIO et ROSI sont produits par l'activation sélective des récepteurs peroxisome proliferator-activated-gamma (PPARgamma), qui se expriment surtout dans le tissu adipeux. Toutefois, il est aussi connu que les TZD pourraient réaliser certains de leurs effets antidiabétiques dans le foie et le muscle où habituellement les récepteurs PPARgamma ne sont pas très abondantes. À ce sujet, il a été récemment démontré que les TZD ont la capacité d'exercer des effets directs, rapides et aigus dans ces types cellulaires indépendant de l'activation PPARgamma. Précisément dans le foie, la plupart de ces effets ont été obtenus en utilisant les hepatocytes en culture et le foie en perfusion.

L'étude de ces effets indépendants de l'activation des PPAR-gamma devient très important dans la compréhension du mécanisme d'action des glitazones et constituent l'objectif essentiel de ma thèse doctoral. Spéciquement nous avons centré sur l'étude de ces effect directs métaboliques et mitochondriales dans le foie, principal organe qui contrôle tout le métabolisme corporel.

## INTRODUCTION

### 1. Le rôle du foie dans le métabolisme

Le foie est un organe crucial dans l'homéostasie énergétique. Il est responsable de la majorité (85%) de la production endogène de glucose par néoglucogenèse et glycogénolyse. Le rein réalise les 15% restant par néoglucogenèse. Les voies métaboliques y sont très fortement régulées par le couple hormonal d'action antagoniste: insuline et glucagon. L'insuline active la glycolyse et inhibe la  $\beta$ -oxydation, le glucagon favorise la néoglucogenèse, la glycogénolyse et l'oxydation des lipides.

L'insulino-résistance du foie a été mise en évidence de longue date chez les sujets diabétiques de type 2 par des méthodes de clamps euglycémiques hyperinsuliniques. Ces travaux ont démontré que la production endogène de glucose est moins inhibée par l'insuline chez les sujets diabétiques et leurs descendants par rapports à des sujets témoins. L'insulinorésistance hépatique est très fortement associée à une répartition viscérale abdominale des graisses chez l'homme. Elle est, comme au niveau musculaire, corrélée à l'accumulation intra-hépatocytaire des triglycérides. Une stéatose hépatique est d'ailleurs retrouvée de façon quasi-constante chez les sujets diabétiques de type 2. Chez 50% d'entre eux, l'atteinte hépatique de l'insulino-résistance se complique d'une inflammation et d'une fibrose qui caractérisent l'évolution cirrhotique du foie. Cette atteinte devient fréquemment un indicateur de la nécessité d'une cause de plus en plus fréquente d'indication de transplantation hépatique. Le mécanisme initial qui génère l'insulino-résistance hépatique est l'accumulation intra-cellulaire d'acylCoA, soit une  $\beta$ -oxydation lipidique inadaptée par rapport à la quantité d'acylCoA disponible. Cette observation met en avant le rôle potentiel de la mitochondrie dans le développement de l'insulino-résistance hépatique.

### 2. Le rôle de la mitochondrie dans l'insulino-résistance

Le contenu en ATP et Pi des foies de sujets diabétiques de type 2 est environ 25% plus bas par rapport aux de groupes contrôles. Le contenu en ATP et Pi du foie est négativement corrélé à la production endogène de glucose en présence d'insuline: plus l'insulino-résistance hépatique est importante, plus le contenu en ATP et Pi du foie est bas, conduisant à une possible altération d'une synthèse mitochondriale d'ATP altérée au cours de l'insulinorésistance hépatique. L'hypothèse physiopathologique qui se dégage de l'ensemble est que l'insulino-résistance hépatique est secondaire à l'accumulation intracellulaire d'acyl-coA en raison d'un déséquilibre entre la disponibilité des acides gras libres comme substrats et la demande en ATP. Cette situation génère un fort apport d'équivalents réduits et donc d'électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale. Il en résulte une élévation de la force proton-motrice qui s'accompagne d'une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés ou

nitrés. Ces radicaux libres vont à leur tour aggraver l'insulino-résistance en altérant les mitochondries (péroxydation lipidique, lésions de l'ADN).

### 3. Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant (DNID)

Le diabète de type 2 représente la forme la plus répandue de diabète, tant dans les pays développés que dans ceux en voie de développement. Il touche les deux sexes, avec une discrète majorité masculine et concerne principalement des individus âgés de plus de 50 ans. Il est toutefois en progression chez des sujets plus jeunes (entre 30 et 50 ans) et est même en train d'apparaître comme une complication fréquente de l'obésité chez l'enfant. Il constitue donc un problème majeur de santé publique. Il représente aussi la première cause d'insuffisance rénale dans tous les pays occidentaux, un quart à un tiers des causes d'infarctus du myocarde (chez l'homme et chez la femme), la première cause d'artériopathie des membres inférieurs et est enfin l'une des causes majeures des accidents vasculaires cérébraux et des rétinopathies. Ainsi, ce diabète longtemps qualifié de "petit diabète" est en réalité un redoutable et "silencieux" pourvoyeur de complications. Par ailleurs, il est utile de noter que le terme "diabète non insulino-dépendant" a été abandonné pour diabète de type 2 car, au moment du diagnostic et pendant au moins une décennie, l'insulinothérapie n'est pas strictement nécessaire au traitement.

#### 3.1 Physiopathologie

Le diabète de type 2 est caractérisé par deux types d'anomalies: l'altération de l'insulinosécrétion et l'insulinorésistance.

- Les **altérations de la sécrétion d'insuline** sont progressive et évoluent parallèlement avec la progression du diabète. Il existe une diminution quantitative mais aussi qualitative, avec une baisse du taux de l'insuline active au profit de la proinsuline. Par ailleurs, la dynamique de sécrétion est modifiée avec la disparition de la première phase d'insulinosécrétion normalement observée lors de la perfusion de glucose et la perte du caractère pulsatile de la sécrétion. Ce défaut de sécrétion est lié à une mauvaise reconnaissance du glucose comme signal direct et comme agent potentialisateur de l'insulinosécrétion par les cellules- $\beta$  du pancréas. Ce défaut sécrétoire de la cellule bêta-pancréatique est génétiquement déterminé, mais aussi aggravé par les troubles métaboliques imputables au diabète (hyperglycémie et hyperlipémie). On évoque même l'hypothèse d'une apoptose induite par la glucotoxicité et la lipotoxicité.
- **L'insulinorésistance** ou défaut de l'action de l'insuline **en périphérie**, est la deuxième anomalie observée dans le diabète. Elle est constante chez le

diabétique, indépendamment du statut pondéral du patient. Elle se traduit au niveau hépatique par une augmentation de la production de glucose et au niveau musculaire, par une diminution de l'utilisation du glucose en période postprandiale. Les mécanismes cellulaires de l'insulinorésistance peuvent se situer à différents niveaux: anomalie de liaison de l'insuline à son récepteur, anomalies de la transduction du signal insulinique, anomalies des systèmes effecteurs (transporteurs du glucose, métabolisme intracellulaire du glucose).

L'hyperglycémie contribue à l'installation d'un cercle vicieux. C'est le concept de glucotoxicité. L'hyperglycémie accroît l'insulinorésistance qui elle-même majore le déficit insulinosécrétoire. Il y a donc une aggravation progressive de la maladie.

### ***3.2.Traitement***

Le but principal du traitement du diabète est de maintenir la glycémie dans la plage des valeurs normales: 70-105 mg/dl. Le maintien d'un poids santé, le régime alimentaire et l'exercice sont tous des éléments essentiels du traitement, mais le plus important d'entre eux reste l'aspect nutritionnel. Dans d'autres cas, le régime alimentaire et l'exercice ne suffisent pas à eux seuls; la prise de médicaments devient alors nécessaire pour maintenir valeurs normales de glycémie. Si les médicaments oraux ne permettent plus de maîtriser la glycémie, on peut alors prescrire des injections d'insuline. Parmi les médicaments oraux disponibles pour contrecarrer le diabète (également appelés hypoglycémifiants oraux), on retrouve:

**Les sulfonylurées:** Cette classe de médicaments comprend le tolbutamide, le chlorpropamide, le glyburide, le glimépiride et le gliclazide. Ils sont couramment prescrits pour traiter le diabète de type 2 et ils agissent en stimulant la libération d'une plus grande quantité de l'insuline stockée dans le pancréas.

**Les méglitinides:** Ces médicaments incluent le répaglinide et le natéglinide. Ces produits aussi stimulent la production d'insuline par le pancréas, mais d'une autre manière que les sulfonylurées. Les méglitinides agissent plus rapidement que les sulfonylurées et ils sont également éliminés plus rapidement par l'organisme.

**Les biguanides:** Le principal effet de ces produits, dont la metformine fait partie, est de réduire la quantité de glucose produite dans le foie. Ces médicaments aident aussi à rendre les cellules de l'organisme plus sensibles aux effets de l'insuline.

**L'acarbose:** Ce médicament ralentit la dégradation des glucides par les voies digestives et prolonge leur temps d'absorption après le repas, ce qui aide à prévenir les "pics" de glucose sanguin. Pour être efficace, le médicament doit être pris durant ou après le repas.

**Les thiazolidinédiones:** Ces médicaments, incluant la pioglitazone et la rosiglitazone, agissent en augmentant la sensibilité des cellules du tissu adipeux, du muscle et du foie.

Vu de l'expansion mondiale du diabète de type 2 et l'accroissement de la morbidité et mortalité liée à cette maladie, une prise en charge adéquate est devenue une priorité de santé. Plusieurs études ont pu démontrer qu'un traitement efficace (HbA1c <7%) peut réduire les complications microvasculaires, telles que la rétinopathie et néphropathie.

#### 4. MÉCANISME D'ACTION DES GLITAZONES

Les glitazones (ou thiazolidinediones) sont des ligands pharmacologiques de récepteurs nucléaires PPAR (peroxysome proliferator activated receptor), sous-famille de la super-famille des récepteurs hormonaux nucléaires. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription activés par des ligands naturels ou pharmacologiques. Les PPARs actifs se fixent sur des séquences spécifiques d'ADN (PP (peroxysome proliferator) "response elements" ou PPREs), en amont des gènes de réponse aux agents PP et sont responsables des effets pléiotropiques des glitazones. Les récepteurs PPAR activés forment d'abord un hétérodimère avec le récepteur rétinol X (RXR). Ensuite, le complexe PPAR:RXR s'apparie avec une séquence d'acides nucléiques PPRE sur l'ADN nucléaire des tissus-cibles, promoteur d'une série de gènes de réponse, en modifiant la transcription, la synthèse d'ARNm et de protéines et, *in fine*, le phénotype des cellules. Les récepteurs activés par les glitazones appartiennent à la classe PPAR- $\gamma$ . Ces récepteurs, présents en faible quantité dans de nombreux tissus (foie, muscles), sont fortement représentés au niveau du tissu adipeux.

##### 4.1. Effets sur l'insuline-résistance

La résistance à l'insuline a longtemps été considérée comme marqueur associé à l'existence de facteurs de risques cardiovasculaires "classiques" (hypertension, obésité, HDL bas) ou "émergents" (inflammation chronique), et prédictif du développement d'un diabète de type 2 chez des sujets à fonction  $\beta$  limitée présentant un phénotype de syndrome métabolique. Son rôle additionnel en tant que facteur prédictif indépendant du risque cardiovasculaire paraît actuellement démontré. Selon les critères de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la démonstration clinico-biologique de l'existence d'un syndrome métabolique permet non seulement de définir les sujets diabétiques de type 2 dans la perspective du risque cardiovasculaire global, mais devient en elle-même une cible thérapeutique, soit en intervenant directement sur la résistance à l'insuline, soit en modulant les composantes phénotypiques (hypertension artérielle, dyslipidémie, état procoagulant) du syndrome.

Les glitazones sont, avec la metformin, les agents pharmacologiques les plus puissants spécifiquement destinés à réduire la résistance à l'insuline. L'effet est tripolaire, d'abord adipocytaire (pro-adipogène et différenciation) puis secondairement musculaire (amélioration de la captation du glucose par les myocytes) et hépatique (réduction de la production et amélioration de la captation du glucose).

#### ***4.2. Effets sur la cellule beta pancréatique***

Le déclin progressif de la fonction sécrétoire  $\beta$  est la cause principale d'échappement thérapeutique du contrôle glycémique des sujets diabétiques de type 2. Il impose le recours progressif à des polythérapies orales et/ou à l'insulinothérapie. La résistance à l'insuline est l'un des trois facteurs potentiellement réversibles, les deux autres étant la glucotoxicité (hyperglycémie) et la lipotoxicité impliqués dans cette physiopathologie. Des études à moyen terme (mois-années) ont montré une stabilisation de la capacité sécrétoire suite à l'administration thérapeutique (diabète de type 2) ou préventive (intolérance glucidique chez des sujets risquant fortement de développer un diabète de type 2) de glitazones (par rapport aux autres classes médicamenteuses), améliorant considérablement ces trois facteurs et plus particulièrement, la résistance à l'insuline et la lipotoxicité. Ces effets sont potentiellement favorables sur le plan de la préservation de l'intégrité fonctionnelle de la cellule  $\beta$ . Des données prospectives à long terme (> 5 ans) sur l'histoire naturelle de la sécrétion insulinaire dans le diabète de type 2 ne sont pas encore disponibles, étant donné l'histoire naturelle du déclin de la cellule  $\beta$  selon l'UKPDS et le fait que toute amélioration de l'hyperglycémie chronique et de la lipotoxicité améliore transitoirement la fonction sécrétoire.

#### ***4.3. Ses effets métaboliques à long terme***

Une première molécule appartenant à cette classe, la troglitazone (Rezulin®), avait été introduite sur le marché aux États-Unis et en Europe, mais elle en fut rapidement retirée du fait d'une toxicité hépatique importante. Il existe aujourd'hui deux glitazones au niveau mondial: la pioglitazone (Actos®) et la rosiglitazone (Avandia®). De nombreuses études en monothérapie, en bithérapie: association à la metformine (M) ou aux sulfamides hypoglycémiantes (SU) et glinides; en trithérapie: glitazone + M + SU, enfin à l'insuline (association non encore autorisée en France), sont disponibles et permettent d'obtenir un effet hypoglycémiant habituellement inférieur aux chefs de file (M et SU) d'environ -0,8 à -1 % d'HbA1c (hémoglobine glyquée). La bithérapie avec la metformine ou les sulfamides hypoglycémiantes renforce les effets de la monothérapie (-1,5 à -2 %).

#### ***4.4. Ses autres effets***

En plus de leurs effets sur le contrôle glycémique, l'impact est net sur le profil lipidique: activation du transporteur de l'Apo E et abaissement des AGL (acides gras libres) et triglicérides (TG) (VLDL) circulants. L'amplitude de l'impact sur le métabolisme des lipides varie selon les molécules et les études. Elle pourrait être liée à leur affinité pour les récepteurs PPAR-alpha, ceux liés par les fibrates, à une activation de lipoprotéine lipase (LPL) et à une baisse de l'apo C-III et de l'apoA-V (baisse de VLDL TG), plus d'apo A-I et A-II (principales apoprotéines présentes dans les particules HDL d'épuration). Il est aujourd'hui établi que la pioglitazone exerce plus d'effets de cette nature: baisse des TG sanguins, élévation du HDL cholestérol, LDL moins petites et moins denses, donc moins athérogènes. On note néanmoins des effets lipidiques de la rosiglitazone: élévation du cholestérol des HDL et baisse des AGL.



## PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

### 1. Techniques pour les manipulations avec des hépatocytes

#### 1.1. Isolement des hépatocytes

Les animaux ont été mis à jeun 24 h avant le début de l'expérimentation, avec un accès *ad libitum* à la boisson. La préparation a été réalisée selon la technique d'isolement décrite par Berry et Friend et modifiée par Groen et al. Cette technique, éliminant les cellules parenchymateuses, les cellules de Kupffer et les cellules vasculaires, permet d'obtenir une population homogène d'hépatocytes viable à environ 85%. La quantité de cellules ainsi obtenue est évaluée par un poids sec final obtenu par la différence mesurée après dessiccation de 500 µl de suspension cellulaire et du même volume de solution ayant servi à la remise en suspension des hépatocytes. Les résultats obtenus à partir d'hépatocytes seront donc exprimés le plus souvent par g de poids sec d'hépatocytes (g PS ou g dry cells). Selon Berry et Friend, 1 mg de poids sec d'hépatocytes isolés à partir de foie de rat à jeun contient 465000 cellules.

#### 1.2. Périfusion des hépatocytes

Cette technique décrite par Van der Meer et Tager, puis modifiée par Groen et al, permet d'obtenir différents états stationnaires métaboliques. Dans ce système, les cellules reçoivent un flux permanent d'un milieu de périfusion avec des concentrations non saturantes de substrats. Ceci a l'avantage de travailler dans des conditions plus physiologiques, en évitant l'accumulation des produits formés. Le système de périfusion est composé de deux chambres de périfusion de 15 ml thermostatées à 37°C et agitées où sont placées les cellules. Elles sont alimentées continuellement en liquide de Krebs (solution II) (vérifier composition dans Material y Métodos: aislamiento de hepatocitos) à un débit de 5 ml/min grâce à deux pompes péristaltiques. Ce Krebs provenant du réservoir central est réoxygéné juste avant son entrée dans les chambres en passant au travers d'un système appelé "poumon de réoxygénation", un dispositif thermostaté à 37°C et alimenté en carbogène (95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>). Les cellules sont maintenues dans les chambres grâce à un filtre en cellulose de 12 µm de porosité placé sur le bouchon des chambres par lequel s'écoule le périfusé. Quatre autres entrées dans les chambres permettent de délivrer les différents substrats à l'aide de pousse-seringues. Un puits d'accès aux chambres permet de déposer les hépatocytes en début de l'expérience et de réaliser des prélèvements cellulaires à tout instant. Les cellules sont maintenues en suspension dans les chambres à l'aide d'un agitateur magnétique. Un capteur de pression placé en amont des chambres de périfusion permet de suivre l'évolution de la pression de la périfusion. Ce paramètre témoigne d'un éventuel colmatage du filtre par des cellules mortes.

La manipulation commence après 35 minutes de stabilisation du système, 200 mg d'hépatocytes sont déposés dans chaque des chambres de perfusion. La perfusion commence par 35 minutes de stabilisation sans substrat. Ensuite, les substrats (dihydroxyacétone-DHA, fructose, glycérol et lactate+pyruvate) sont apportés via les pousse-seringues à des concentrations variables (0; 0.15; 0.3; 0.6; 1.2; 2.4; 4.8 mM) et les molécules sujet d'étude: la pioglitazone et la rosiglitazone à concentration de 25 µM; et son véhicule. Nos drogues sont dissous avec 50% de l'eau + 50% DMSO. L'état stable métabolique (état estacionaire) des cellules est atteint en 15 minutes. A ce moment, les prélèvements de perfusats (3 fois 5 ml) sont réalisés. Ils sont placés dans la glace avant d'être chauffés pendant 10 minutes à 80°C pour dénaturer les protéines et centrifugés 10 minutes à 3000 g, puis la détermination des metabolites extracellulaires (lactate, glucose et pyruvate).

Aussi, on fait des prélèvements des cellules dedans les chambers vers le puit au fin de chaque état estacionaire pour l'obtention des compartiments cellulaires où on determine les metabolites intracellulaires (DHAP, F6P, G6P, PEP et 3-PG) et la quantité des nucléotides adényliques mitochondriales et cytosoliques (ATP, ADP et AMP).

#### 1.2.1. Fractionnement cellulaire

Las séparations des: 1) compartiments intracelular et extracellular; 2) compartiments cytosolique et mitochondrial; ont été réalisée par fractionnement cellulaire selon le protocole décrit par Zuurendonk. La première technique est effectuée par simple centrifugation à travers d'une couche d'huile de silicone dont la densité ne permet que le passage de cellules entières. En revanche, la séparation des compartiments cytosolique et mitochondrial consiste à dégrader spécifiquement la membrane plasmique des cellules par la digitonine, puis à centrifuger ces dernières au travers d'une couche d'huile de silicone.

#### 1.2.2. Dosage des métabolites extracellulaires contenues dans le perfusat

Les dosages des métabolites (glucose, lactate, pyruvate) ont été réalisés par les méthodes enzymatiques décrites par Bergmeyer. Elles reposent toutes sur la transformation du NADH en NAD<sup>+</sup> ou inversement. Les réactions sont donc suivies par des variations d'absorbance à 340 nm et les concentrations déduites de la loi de Lambert-Beer.

Chaque dosage a été réalisé en triplicata pour chacun des prélèvements. Le dosage est effectué en mélangeant 500 µl de perfusat à 500 µl de milieu réactionnel spécifique du métabolite à doser. Une première lecture d'absorbance à 340 nm est réalisée et correspond au blanc de l'échantillon. Une quantité d'enzyme est ajoutée dans la cuve et

agitée. Après un temps d'incubation spécifique à chaque dosage, une deuxième lecture est effectuée. La concentration du métabolite est alors calculée à partir de cette variation d'absorbance en tenant compte de tous les facteurs de dilution de l'échantillon.

### 1.2.3 Dosage des métabolites intracellulaires

Les dosages des principaux intermédiaires de la glycolyse/gluconéogenèse sont réalisés, comme ceux des métabolites extracellulaires présentés précédemment, par l'intermédiaire de méthodes enzymatiques décrites par Bergmeyer et reposant sur la transformation de  $\text{NAD}^+$  en NADH ou inversement. Cette technique est utilisée pour doser des concentrations de métabolites très faibles car elle est capable de détecter la fluorescence d'une nanomole de NADH, ce qui la rend environ 1000 fois plus sensible que la spectrophotométrie. La molécule de NADH ou NADPH est excitée à la longueur d'onde de 340 nm et réémet à 460 nm. La quantité de NADH produite ou consommée par la réaction spécifique étudiée correspond à la variation de la hauteur du tracé sur l'enregistreur avant et après de l'addition de l'enzyme. Pour chaque dosage un étalonnage est réalisé avec une quantité connue de NADH, dosée préalablement par spectrophotométrie.

Grâce à cette méthodologie, nous pouvons déterminer la concentration intracellulaire des métabolites:

Glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P), dihydroxyacétone phosphate (DHAP), phosphoenolpyruvate (PEP) and 3-phosphoglycérate (3-PG)

### 1.2.4. Quantification des nucléotides adényliques dans le milieu cytosolique et mitochondriale par HPLC

La technique de chromatographie liquide à haute performance est utilisée pour le dosage des nucléotides adényliques (ATP, ADP, AMP). Cette technique est à la fois quantitative et qualitative car les nucléotides de l'échantillon sont séparés en fonction de leur polarité (temps de rétention), puis détectés par un spectrophotomètre à 254 nm, relié à un enregistreur-intégrateur. L'échantillon contenant les nucléotides à doser est mobilisé au travers d'un milieu adéquat ralentissant plus ou moins les molécules en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques.

Phase solide non-polaire: Colonne (BSD HYPERSIL C18, Thermo Scientific)

Phase mobile liquide polaire: tampon pyrophosphate de sodium/acide pyrophosphorique (25 mM) ajusté à un pH de 5.75 par une solution saturée en pyrophosphate de sodium, qui est filtré sur une membrane de 0.22  $\mu\text{m}$ .

### 1.3. Détermination des activités enzymatiques

#### 1.3.1. Glucose-6-phosphatase

La détermination de l'activité de la glucose-6-phosphatase (G6Pase) s'effectue selon la méthode développée par Baginski et al., basée sur la détermination colorimétrique du phosphate inorganique libéré lors de l'hydrolyse du G6P par l'enzyme. L'activité maximale de la G6Pase est déterminée sur hépatocytes isolés incubés en pots fermés à 37°C en présence "*in vivo*" ou non "*in vitro*" des produits à tester. Après 30 minutes d'incubation, un échantillon de cellules est prélevé et homogénéisé. L'homogénat obtenu est incubé en pots fermés pendant 10 minutes à 37°C dans un milieu standardisé contenant 20 mM de G6P et en présence "*in vitro*" ou non "*in vivo*" des produits à tester. Dans notre cas, pour analyser les effets directs de la pioglitazone et la rosiglitazone, nous les ajoutons dans la dernière incubation. Le phosphate inorganique est dosé par spectrophotométrie à 700 nm.

L'activité de l'enzyme dans les homogénats d'hépatocytes est exprimée en nmoles  $P_i \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg Poids sec}^{-1}$  ou protéines<sup>-1</sup>

#### 1.3.2. Pyruvate kinase

La détermination de l'activité de la pyruvate kinase est basée sur la transformation du NADH en NAD<sup>+</sup> induite par l'adjonction aux extraits cellulaires de concentrations croissantes de phosphoénolpyruvate (PEP): 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.75; 1.25; 1.75; 2.25 y 4 mM.

L'activité maximale de l'enzyme est déterminée sous deux isoformes:  
non purifié: *M-PK*, qui s'exprime dans les muscles et le cerveau  
partiellement purifié: *L-PK*, principalement dans le foie

La mesure de l'activité de la pyruvate kinase est effectuée en utilisant les échantillons traités qui provient d'une incubation des hépatocytes isolés en présence des produits à tester pendant 30 minutes. La disparition du NADH est suivie par mesure de la décroissance de la DO à 340 nm pendant 2 minutes. L'expression des valeurs par le rapport de l'activité de la pyruvate kinase à une concentration donnée du PEP (V) et son activité maximale à une concentration 4 mM du PEP (V<sub>max</sub>), permet la normalisation des résultats.

L'activité de l'enzyme est exprimée comme nanomoles·min<sup>-1</sup>·mg protéines<sup>-1</sup>

#### ***1.4. Oxygraphie (cette technique sera expliquée plus en détail ci-dessous)***

Les mesures de consommation d'oxygène sur hépatocytes perméabilisés sont réalisées après pré-incubation des cellules intactes (10 mg/ml) en pot fermés en présence ou non des produits à tester. Après 45 minutes, le volume entier contenu dans le pot est versé dans la chambre de l'oxygraphie et la respiration basal des hépatocytes est quantifiée. Après, l'addition de l'olygomicine et d'un découplant (DNP) nous donne l'effet des glitazones sur la dissipation de l'énergie et sur les complexes respiratoires qui sont placés devant le complex V dans la chaîne respiratoire, respectivement.

la concentration saturante du oxygène dans le milieu Krebs-Ca<sup>++</sup> à 37 °C est de 1 mM de O<sub>2</sub>.

## **2. Techniques pour les manipulations mitochondriales**

### ***2.1. Préparation de mitochondries isolées***

Les mitochondries ont été isolées à partir de foies de rats avec acces *ad libitum* au repas et à la boisson selon les procédures décrits par Klingenberg y Slenczka, moyennat une centrifugation différentielle. Toute la manipulation a été réalisée a 4°C et les mitochondries isolées sont conservées dans la glace pour les expériences réalisées dans les heures suivantes (oxygraphie et mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène, détermination du rendement de l'oxydation phosphorylante, ouverture du Pore de Transition de Permeabilité) puis congelées à -80°C pour les dosages biochimiques.

#### **2.1.1 Détermination de la concentration protéique mitochondriale**

La mesure de la concentration protéique de la suspension mitochondriale est effectuée par la méthode du Biuret. 25 µl de suspension mitochondriale sont diluées dans 200 µl de cholate de sodium 4 %. Après 10 min, les échantillons additionnés de soude 10 % (qsp 3 ml) et de 300 µl de sulfate de cuivre 1 % sont incubés pendant 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La densité optique est ensuite lue à 540 nm. La quantité de protéines contenues dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de concentrations connues de BSA en solution dans du tampon d'homogénéisation. L'ensemble des résultats obtenus à partir de mitochondries isolées est exprimé en mg de protéines par ml de suspension mitochondriale.

## **2.2. Oxygraphie**

Les mesures de consommation d'oxygène sur mitochondries isolées sont réalisées dans une chambre d'oxygraphie thermostatée (37°C), fermée et agitée, munie d'une électrode de Clark. La suspension des mitochondries est immergée dans une solution de KCl à demi-saturée et isolées de la cuve de mesure par une membrane en Téflon laissant diffuser l'oxygène. Il est donc nécessaire de déterminer la concentration en oxygène du milieu utilisé. Pour cela, le milieu est oxygéné et placé à la température souhaitée, 37°C dans nos expérimentations:

la concentration saturante de l'oxygène dans le milieu KCl (125 mM KCl, 20 mM Trizma HCl, 1 mM EGTA; pH 7.2) à 37 °C est de 440 natom O/ml

A ce milieu de respiration sont ajoutés: les mitochondries (1 à 2 mg.ml<sup>-1</sup>, selon le substrat utilisé), 0,1 % de BSA délipidée, 5 mM de phosphate, les substrats respiratoires en concentrations saturantes, divers inhibiteurs (en fonction des expérimentations) permettant d'isoler les différents sites de couplage de la chaîne respiratoire. Pour énergiser les mitochondries au niveau du complexe I, nous ajoutons du glutamate-Tris 5 mM et du malate-Tris 2,5 mM comme substrats respiratoires (GM). Pour le complexe II, nous ajoutons du succinate-Tris 5mM, du malate-Tris 2,5 mM (SM) et de la roténone 1,25 µM, qui inhibe le complexe I en empêchant le flux rétrograde d'électrons. Les mitochondries sont énergisées directement au niveau du complexe IV grâce au TMPD.

Après addition des substrats, **l'état 4** de la respiration est mesuré. L'adjonction de 1 mM d'ADP permet d'obtenir la respiration à **l'état 3**, c'est-à-dire en condition phosphorylante. **L'état 4 véritable** est obtenue après addition de 1.25 µg/ml d'oligomycine, cette respiration est le reflet d'une rentrée passive des protons à travers la membrane interne mitochondriale. L'ajout d'un découplant protonophore (DNP, 75 µM) permet d'obtenir une respiration découplée de la synthèse d'ATP.

## **2.3. Mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante**

La mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante est obtenue en établissant le rapport entre le flux de synthèse d'ATP et le flux d'oxygène consommé. Nous mesurons ainsi l'efficacité avec laquelle l'énergie rédox provenant de l'oxydation des substrats est convertie en énergie permettant la synthèse d'ATP. Les mesures sont réalisées dans une chambre d'oxygraphie thermostatée à 37 °C, contenant le milieu KCl supplémenté par les substrats respiratoires et par du Pi-Tris 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glucose 20 mM et ATP 125 µM. La respiration est mesurée à l'état 4 puis elle est stimulée par l'ajout de concentrations croissantes en hexokinase (0.2 – 2 U.ml<sup>-1</sup>). La production d'ATP est mesurée en présence d'un système à flux d'ADP variable, de façon indirecte par la

détermination spectrophométrique de la production de glucose-6-phosphate, selon la méthode décrite par Bergmeyer.

#### ***2.4. Mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>***

La production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les mitochondries a été estimée par la libération d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les mitochondries (Batandier et al. 2006). Celle-ci est mesurée par fluorimétrie en utilisant une sonde fluorescente : l'Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxasine). Cette molécule, en présence de peroxydase de radis noirs est oxydée par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un composé fluorescent: la Résorufine ( $\lambda_{\text{excitation}} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{émission}} = 584 \text{ nm}$ ).

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre où les mitochondries (0.25 mg/ml) sont plongées dans la cuve et agitées pendant 30 secondes avant de lancer la mesure. La mesure commence par 2 minutes de stabilisation avant injection de substrat: GM (2,5/1,25 mM), SM (2,5/1,25 mM) o GSM (2,5/2,5/1,25 mM). La production est alors mesurée à l'état 4 pendant 2 minutes, puis en présence de la roténone (inhibiteur du complexe I) et enfin d'Antimycine A (inhibiteur du complexe III). L'estimation de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est exprimée en pmol d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg protéines après étalonnage du système.

#### ***2.5. Détermination de l'activité des complexes respiratoires I, II et III***

Ces mesures ont été effectuées sur des préparations de mitochondries qui avaient subi, avant les mesures, trois cycles de congélation/décongélation afin de faciliter l'accès des substrats aux enzymes membranaires. Les mesures ont été réalisées par spectrophotométrie dans des cuves de 2 ml agitées et thermostatées.

##### 2.5.1. Activité du complexe I de la chaîne respiratoire

Cette mesure est basée sur l'oxydation du NADH est suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 340 nm pendant 3 minutes, puis l'addition de 10  $\mu\text{M}$  de roténone permet de soustraire la dérive liée à l'oxydation du NADH non spécifique à l'activité du complexe I.

##### 2.5.2. Activité du complexe II de la chaîne respiratoire

Cette mesure détermine l'activité de la succinate déshydrogénase en suivant le transfert d'électrons du succinate vers la décylubiquinone, puis le dichloroindophénol. La réduction de ce composé est suivie par la mesure de la décroissance de la DO à 600 nm pendant 3 minutes.

### 2.5.2. Activité du complex III de la chaîne respiratoire

L'activité du complex III est mesurée pendant 5 minutes avant et après de l'ajout de son inhibiteur, l'Antimycin A, en suivant l'augmentation de l'absorbance à 550 nm comme résultat du transfert d'électrons de la décyubiquinone complètement réduite vers le cychrome c oxidé.

### **3. Mesure de la capacité de rétention calcique (CRC)**

La capacité de rétention calcique (CRC) est estimée par la quantité de calcium nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité (PTP). Cette mesure est effectuée en ajoutant successivement des doses fixes de calcium (inducteur puissant de l'ouverture du PTP) à une suspension de mitochondries ou des hepatocytes perméabilisés jusqu'au déclenchement de l'ouverture du PTP. Celle-ci se matérialise par une libération massive du calcium accumulé par les mitochondries. Les mouvements calciques sont suivis à l'aide d'un spectrofluorimètre et d'une sonde calcique extra-mitochondriale: le Calcium Green ( $\lambda_{excitation}=506$  nm,  $\lambda_{émission}=530$  nm). Cette sonde seulement détecte la quantité de calcium-extra-mitochondriale. Lorsque l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité survient, le calcium est libéré des mitochondries et la fluorescence augmente massivement. La quantité de calcium utilisée pour observer ce phénomène, exprimée par mg de protéine mitochondriale, correspond à la CRC.

Les cellules sont perméabilisées grâce à l'action de la digitonine qui casse les membranes plasmiques en dégradant le cholestérol



# 1. EFFETS DIRECTS “IN VITRO” DE LA PIOGLITAZONE ET DE LA ROSIGLITAZONE SUR LE MÉTABOLISME: ÉTUDE EN PÉRIFUSION DES HÉPATOCYTES ISOLÉS DE RATS TÉMOINS

## 1.1. Effets directs “in vitro” de la pioglitazone et de la rosiglitazone sur le métabolisme du DHA

Pour déterminer les effets des glitazones sur le métabolisme hépatique, nous avons utilisé un système de perfusion (réviser procédures expérimentales) et en présence d’une concentration constante de la PIO et de la ROSI (25  $\mu\text{M}$ ), on observe une inhibition significative de la gluconéogenèse ( $J_{\text{glucose}}$ ) (Figure 1A):  $2.16 \pm 0.09$  (PIO) et  $1.54 \pm 0.11$  (ROSI) vs  $3.76 \pm 0.06$ ; - 32% et - 59%, respectivement,  $p < 0.001$ . On trouve une faible augmentation, mais significative, du flux glycolytique ( $J_{L+P}$ ) (Figure 1B) en présence des glitazones: + 12 % pour chacune. Du fait de ces modifications, le métabolisme total de DHA ( $J_{2G+L+P}$ ) (Figure 1C) est légèrement diminué:  $18.07 \pm 0.92$  (PIO) et  $16.00 \pm 0.82$  (ROSI) vs  $19.15 \pm 0.32$ ; - 9% et - 16%, respectivement.

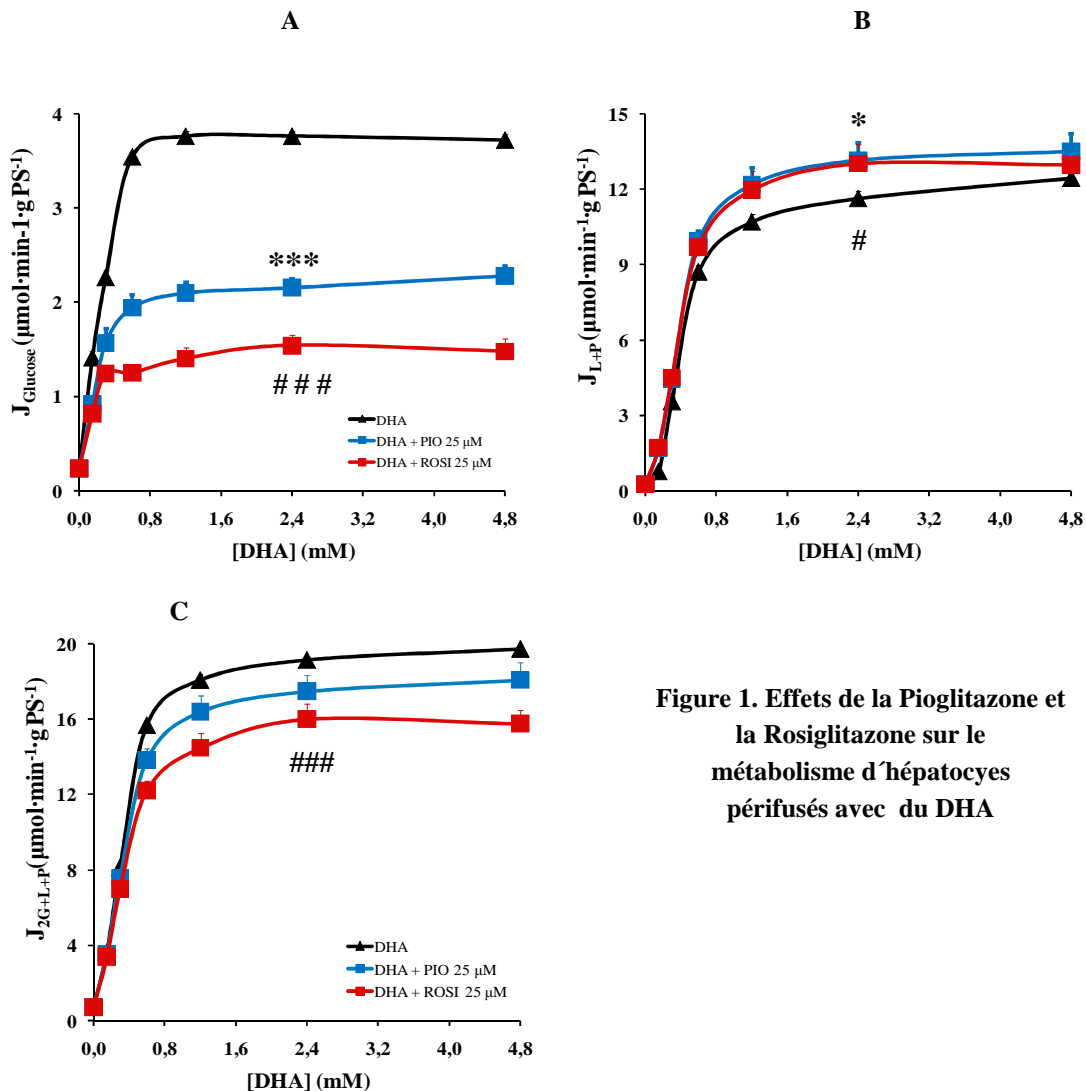


Figure 1. Effets de la Pioglitazone et la Rosiglitazone sur le métabolisme d’hépatocytes perfusés avec du DHA

Le métabolisme du DHA est contrôlé par la première étape de phosphorylation du substrat qui est catalysée par la glycérólquínase. Dans nos conditions, l'inhibition de la gluconéogenèse pourrait donc s'expliquer par un effet des glitazones à ce niveau, entraînant une diminution de la concentration intracellulaire de DHAP. Cependant, pour chaque concentration de DHA perfusé, on a observé une légère diminution, non significative, de l'accumulation intracellulaire de DHAP des glitazones (Figure 2A), ce qui nous permet d'exclure un effet absolu de ces drogues exclusivement à ce niveau. L'inhibition de la gluconéogenèse et l'activation de la glycolyse par la PIO et la ROSI peut s'expliquer par un effet majoritaire localisé au-delà de DHAP. La Figure 2B montre que pour une concentration de DHAP donnée, le flux gluconéogénique résultant est notamment moindre en présence des glitazones, ce qui signifie qu'une ou plusieurs étapes sont inhibées entre cet intermédiaire et le glucose. De la même façon, la Figure 2C démontre que l'activation du  $J_{L+P}$  est localisée sur la partie basse de la voie métabolique.

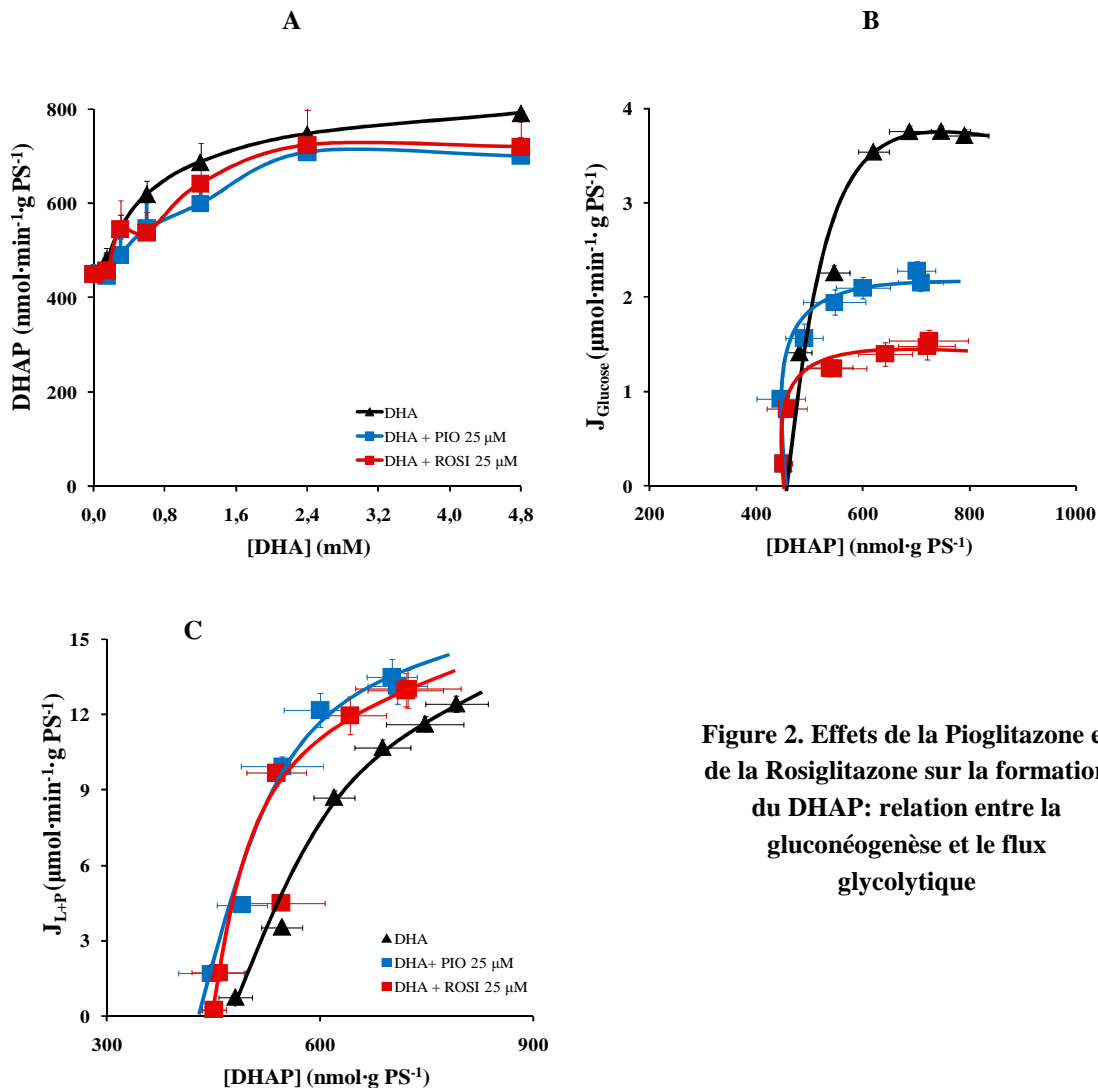


Figure 2. Effets de la Pioglitazone et de la Rosiglitazone sur la formation du DHAP: relation entre la gluconéogenèse et le flux glycolytique

## 2. Effets directs “in vitro” de la pioglitazone et de la rosiglitazone sur le métabolisme de la fructose, du glycérol et du lactate plus pyruvate

Les résultats obtenus avec du DHA comme substrat, une inhibition de la gluconéogenèse et une augmentation du flux glycolitique, ont été reproduits avec les autres substrates employés.

	CONTROL	PIO 25 µM	ROSI 25 µM
Fructose- $J_{glucose}$	3.31 ± 0.12	2.05 ± 0.09***	1.74 ± 0.03###
Fructose- $J_{L+P}$	10.88 ± 0.37	12.11 ± 0.09**	12.07 ± 0.15##
Fructose- $J_{DHA}$	17.50 ± 0.46	16.21 ± 0.20*	15.55 ± 0.15###
Glycérol- $J_{glucose}$	2.92 ± 0.05	2.07 ± 0.03***	2.05 ± 0.10###
Glycérol- $J_{L+P}$	0.92 ± 0.05	1.25 ± 0.04***	1.32 ± 0.06###
Glycérol- $J_{DHA}$	6.70 ± 0.15	5.39 ± 0.06***	5.43 ± 0.18###
L+P- $J_{glucose}$	1.40 ± 0.10	1.00 ± 0.0**	0.84 ± 0.00***

Pour cette reason, dans ce résumé nous seulement montrerons les représentations graphiques des métabolites intracellulaires obtenues avec à partir du DHA.

Le métabolisme du DHA est contrôlé par la première étape de phosphorylation du substrat qui est catalysée par la glycérolquinase. Dans nos conditions, l’inhibition de la gluconéogenèse pourrait donc s’expliquer par un effet des glitazones à ce niveau, entraînant une diminution de la concentration intracellulaire de DHAP.

## 2. EFFET DIRECT “IN VITRO” DE LA PIOGLITAZONE ET DE LA ROSIGLITAZONE SUR LA GLYCOLYSE HÉPATIQUE À PARTIR DU DHA

La représentation graphique entre les concentrations de différents métabolites en présence de la pioglitazone: 3-PG et PEP et le flux glycolytique ne est pas donné une explication claire dont la localisation exacte du effet direct des glitazones sur la voie glycolitique. Pour cette reason, nous déterminons la quantité des nucléotides adényliques (ATP, ADP et AMP) (table 2) dans le compartiment cytosolique et mitochondriale. Comme on peut vérifier sur la table ci-dessous, la glitazone diminue le rapport ATP/ADP dans les deux milieux. L’ATP est un efector allosteric de la enzyme pyruvate kinase et sa diminution est traduite comme une activation de celle-ci.

<b>DHA</b>		<b>CYTOSOLIC</b>			
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP
Control	5,81±0,36	2,88±0,27	0,52±0,09	9,21±0,30	2,92±0,53
PIO 25 µM	5,27±0,25	3,71±0,19	0,61±0,07	9,59±0,30	1,63±0,16
ROSI 25 µM	5,58±0,30	2,42±0,17	0,38±0,05	8,38±0,29	2,81±0,25
		<b>MITOCHONDRIAL</b>			
	ATP	ADP	AMP	$\Sigma$ AN	ATP/ADP
Control	1,33±0,20	2,29±0,14	0,57±0,05	4,17±0,29	0,62±0,09
PIO 25 µM	0,62±0,07	3,37±0,2	0,42± 0,03	4,40± 0,28	0,21± 0,02
ROSI 25 µM	1,79±0,13	3,30± 0,17	0,50± 0,03	5,49± 0,19	0,64± 0,07

**Table 2. Effet direct “in vitro” de la pioglitazone et la rosiglitazone sur la quantité des nucléotides adénilyques cytosoliques et mitochondriales**

Même si les résultats obtenus avec la rosiglitazone n’ont pas été les prévus, la rosiglitazone a inhibé ce rapport cytosoloque et mitochondrial avec de la fructose et du glycerol et elle a diminué les concentration de PEP et PEP plus activement que la pioglitazone, ceci est la preuve d’une activation de la pyruvate quinase.

Pourtant, l’étape suivante a consisté en l’étude la cinétique de piruvate quinase sous deux isoformes: purifié et partiellement purifié (Table 3). La pioglitazone et la rosiglitazone sur l’enzyme purifié, augmentent le rapport  $v/V_{max}$ , en revanche sur la forme partiellement purifié les deux antidiabétiques ne affectent pas ce rapport, mais elles montent son activité maximale d’une manière significative.

<b>PYRUVATE QUINASE (PK)</b>				
	$v/V_{max}$ (0.4 mM PEP)		$V_{max}$ (4 mM PEP)	
	Non-purified	Partially	Non-purified	Partially
<b>purified</b>			<b>purified</b>	
	<b>nmol/min/mg protein</b>			
Control (DHA)	0.34 ± 0.02	0.26 ± 0.03	230.6 ± 22.1	372 ± 9
Glucagon 10 <sup>-7</sup> M	0.30 ± 0.02	0.21 ± 0.02	209.5 ± 18.8	348 ± 27
Pioglitazone 25 µM	0.46 ± 0.02***	0.27 ± 0.02	210.5 ± 12.8	482,72 ± 9,22***
Rosiglitazone 25 µM	0.42 ± 0.02*	0.27± 0.03	221.2 ± 22.2	429.92 ± 7,68***

**Table 3. Effet direct “in vitro” de la pioglitazone et de la rosiglitazone sur la cinétique de la piruvate quinase**

### 3. EFFETS ANTI-GLUCAGON DE LA PIOGLITAZONE ET DE LA ROSIGLITAZONE SUR LE MÉTABOLISME DU DHA

Pour étudier la putatif effet antagoniste au glucagon des glitazones, nous avons comparé l'effet de l'hormone sur le métabolisme d'hépatocytes périfusés avec du DHA en présence ou non des drogues. Lorsqu'on évalue l'effet propre de l'hormone sur le métabolisme du DHA (**Figure 3**), on observe effectivement une puissante stimulation de la gluconéogenèse (+ 98%) et l'addition des glitazones conjointement à l'hormone entraîne une diminution significative de la gluconéogenèse augmenté par el glucagon (-25%).

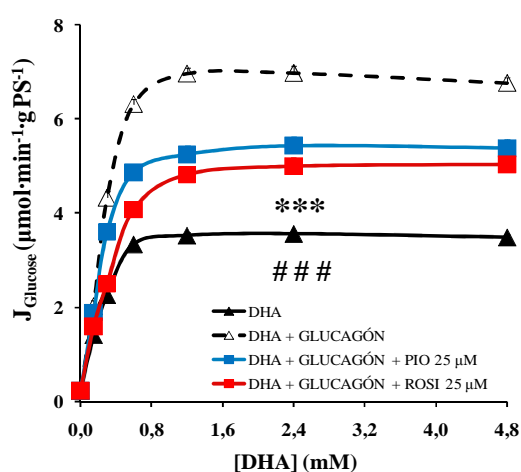


Figure 3. Effets anti-glucagon de la pioglitazone et de la rosiglitazone sur le flux gluconéogénique en hépatocytes périfusés avec du DHA

### 4. EFFET DIRECT "IN VITRO" DE LA PIOGLITAZONE ET DE LA ROSIGLITAZONE SUR LA GLUCONÉOGÈNESE HÉPATIQUE À PARTIR DU DHA

L'inhibition de la gluconéogenèse par les deux glitazones sous étude ne peut donc s'expliquer que par un effet situé sur la partie haute de la voie métabolique. L'existence d'une double relation entre F6P et  $J_{\text{Glucose}}$  (**Figure 4A**) identifie clairement les étapes situées en amont de F6P comme étant celles modifiées par les drogues. La double relation existant entre G6P et  $J_{\text{Glucose}}$  (**Figure 4B**) est logiquement identique à celle observée avec le F6P.

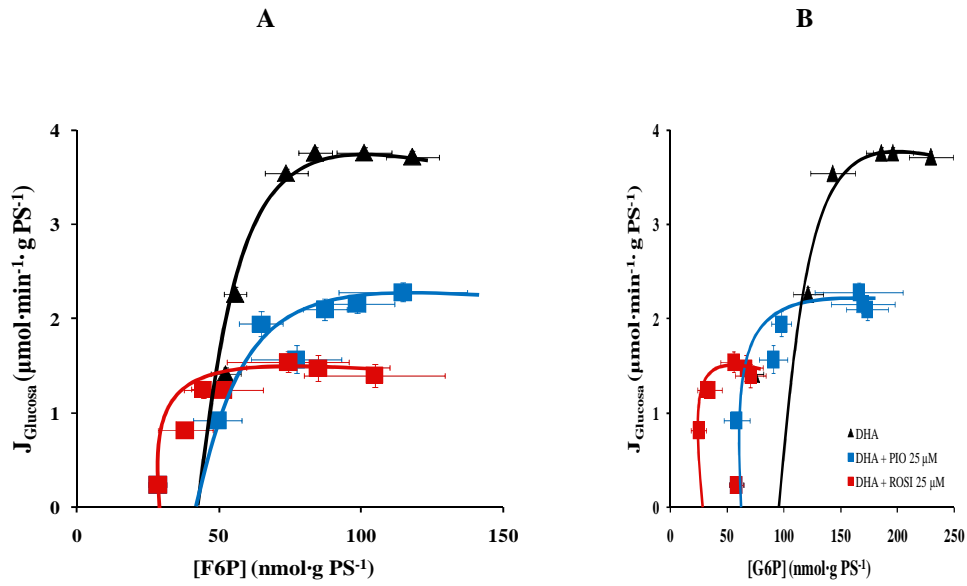


Figure 4. Effets de la Pioglitazone et la Rosiglitazone sur les relations entre les concentration de F6P et G6P et le flux gluconéogénique d'hépatocytes périfusés

Il apparaît donc clairement que, dans nos conditions, l'inhibition de la gluconéogénèse à partir de DHA par les drogues est exclusivement due à une réduction de l'hydrolyse du G6P en glucose, ce que pourrait plaider en faveur d'un effet de la drogue au niveau de la G6Pase.

Pourtant, on détermine l'activité de l'enzyme glucose-6-phosphatase (G6Pase) sur hépatocytes incubés en présence des glitazones pour vérifier si l'effet sur la gluconéogénèse en présence ou non du glucagon de la pioglitazone et la rosiglitazone est médié par l'inhibition directe de la G6Pase.

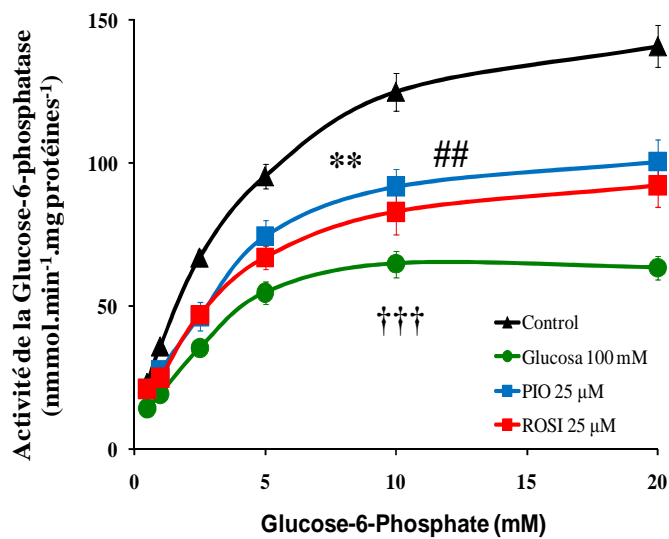


Figure 5. Effet direct "in vitro" de la pioglitazone et la rosiglitazone sur l'activité de l'enzyme G6Pase

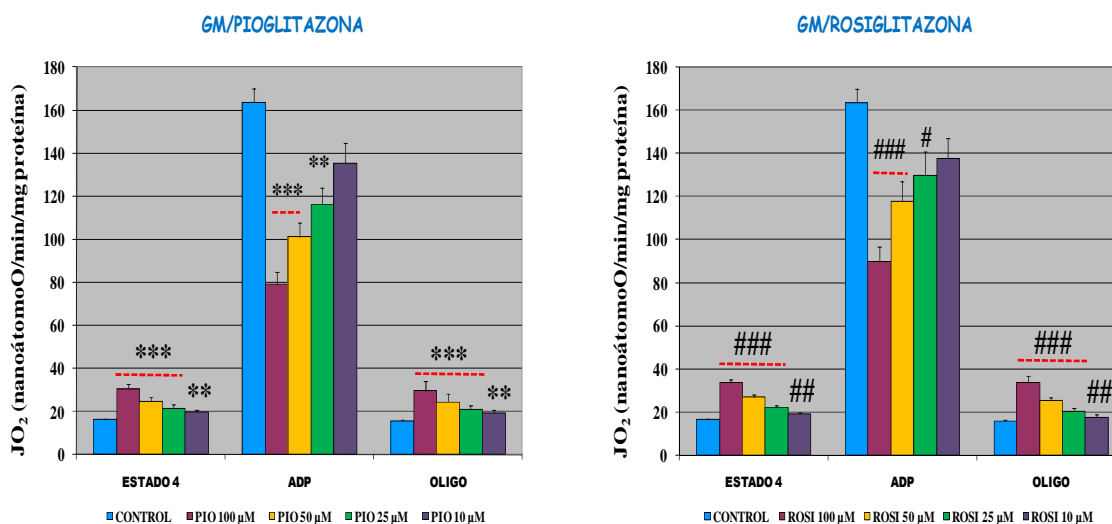
La G6Pase est une enzyme michaeliane et quand nous analysons ses paramètres cinétiques: constante michaelis ( $K_m$ ) et vitesse maximale ( $V_{max}$ ), les glitazones directement diminuent la  $V_{max}$ , la pioglitazone d'une façon significative, sans une modification la  $K_m$ , bien que la pioglitazone soit un inhibiteur faible de ce paramètre.

GLUCOSA-6-FOSFATASA	EFECTO DIRECTO	
	$K_m$ mM	$V_m$ nm·min <sup>-1</sup> ·mg proteínas <sup>-1</sup>
Control	3,43 ± 0,3	160 ± 13
Glucosa 100 mM	2,86 ± 0,3	65 ± 8***
Pioglitazona 25 µM	2,89 ± 0,6	111 ± 15*
Rosiglitazona 25 µM	3,78 ± 0,9	118 ± 17

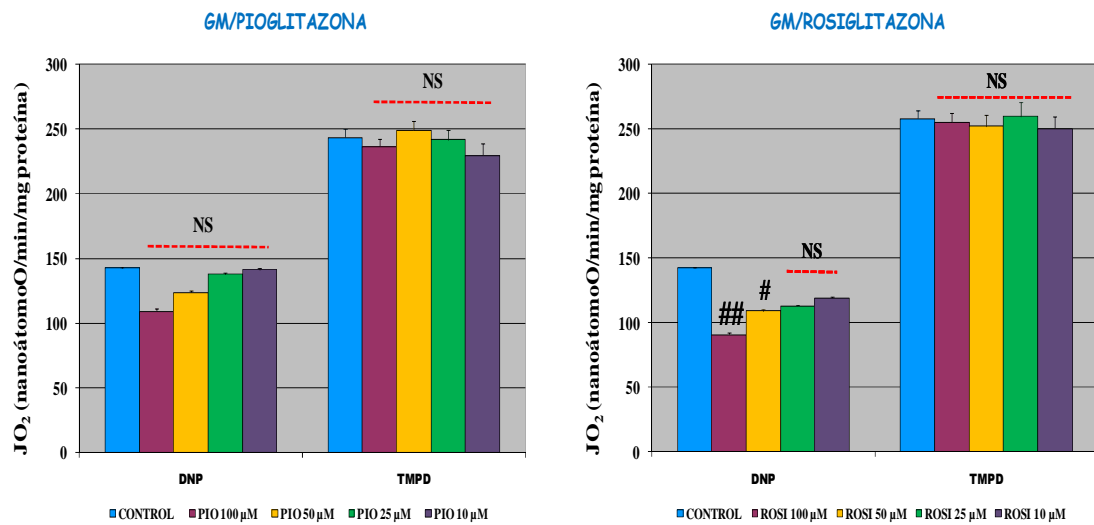
Table 4. Efecto direct "in vitro" de la pioglitazone et de la rosiglitazone sur les paramètres cinétiques de l'enzyme Glucose-6-phosphatase

## 5. EFFET DIRECT DE LA PIOGLITAZONE ET LA ROSIGLITAZONE SUR LA CONSOMMATION DE L'OXYGÈNE EN MITOCHONDRIES ISOLÉES

Sur mitochondries extraites à partir de foie de rats contrôles, la pioglitazone et la rosiglitazone à toutes les concentrations testées (10, 25, 50 et 100 µM) exercent un effet très clair et significatif sur le fonctionnement mitochondrial, en activant l'état 4 de la respiration et en diminuant l'état 3-phosphorylante respiratoire. On observe cet effet direct mitochondrial quand les mitochondries sont énergisées avec du glutamate/malate et du succinate/malate en présence de la rotenone. L'effet des glitazones en présence du substrat du complexe I (GM) a été dose-dépendant, en revanche nous ne avons pas trouvé ce comportement au cas du substrat du complexe II (SM).



L'activation de la respiration par les glitazones est constante après l'addition de l'oligomycine (inhibiteur de la ATP-ase), pourtant l'action directe des glitazones doit être situé avant du complex V. L'adjonction d'un agent découplant (DNP) montre que les glitazones inhibent la respiration exacerbé comme conséquence de l'état découplée. La consommation d'oxygène mesurée en présence de TMPD/Ascorbate permet de mesurer l'activité maximale de la cytochrome oxydase in situ. Celle-ci n'est pas modifiée significativement par le deux glitazones, bien que la pioglitazone puisse exercer une petite inhibition.



Ces observations permet d'affirmer que l'inhibition de la respiration mitochondriale est toute ou partie liée à l'inhibition du complexe I et III.



Finalement, je résume les conclusions de ma thèse doctorale:

- La pioglitazone et la rosiglitazone, en plus de leurs effets connus antidiabétique par l'activation des récepteurs PPAR gamma, exercent des effets directs et aigus indépendants de l'activation des récepteurs PPAR gamma sur le métabolisme du foie.
- Ces effets directs hépatiques consistent en une inhibition de la néoglucogenèse et une activation de la glycolyse, vers modifications des activités de les enzymes: glucose-6-phosphatase et pyruvate quinase.
- Les deux glitazones, la pioglitazone et la rosiglitazone, se conduisent de la même façon indépendamment du substrat employé (DHA, fructose, glycérol et lactate+pyruvate)
- Les effets directs hépatiques hypoglycémisants s'ajoutent à les effets connus antidiabétiques à long terme qui possèdent les glitazones et expliquent le mécanisme d'action de ce type de médicament.
- L'action directe sur les mitochondries du foie: une inhibition de la respiration et de la production des radicaux libres; peut sûrement contribuer à leurs propriétés antidiabétiques.
- Les deux antidiabétiques ne exercent pas aucune action sur le rendement de l'oxydation phosphorylante et sur la capacité de rétention calcique mitochondrial.
- L'action directe mitochondriale des glitazones est due principalement à une inhibition de l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire.

*VSO DE LA TÉCNICA DE PERIFUSIÓN DE CÉLVLAS HEPÁTICAS DE RATA EN LA  
iNVESTIGACIÓN DE LAS ACCIONES METABÓLICAS Y MITOCONDRIALES DIRECTAS  
DE DOS TIAZOLINDIONAS, PiOGLITAZONA Y ROSiGLITAZONA*

*M<sup>a</sup> de las Nieves Sanz García*

***BiBLiOGRAFiA***

- ADA (2008). "Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2007". *Diabetes Care.*; vol. 31 no. 3 596-615
- ADA. **The expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus** (1997). "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus". *Diabetes Care*; 20: 1183-7
- Agius L (1998). "The physiological role of glucokinase binding and translocation in hepatocytes". *Adv Enzyme Regul* 38: 303-31
- Aithal GP, Thomas JA, Kaye PV, Lawson A, Ryder SD, Spendlove I, Austin AS, Freeman JG, Morgan L, Webber J (2008). "Randomized, placebo-controlled trial of pioglitazone in nondiabetic subjects with nonalcoholic steatohepatitis". *Gastroenterology.*;135(4):1176-84
- Alberti KG, Zimmet PZ (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation". *Diabete Med.* 15: 539-53
- Arakaki N, Kita T, et al. (2007). "Cell-surface H<sup>+</sup>-ATP synthase as a potential molecular target for anti-obesity drugs". *FEBS Lett* 581(18): 3405-9
- Argaud D, Halimi S, Castelloni F and Leverve XM (1991). "Inhibition of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital". *Biochem J* 280 (Pt 3): 663-9
- Arion WJ, Wallin BK, Carlson PW, and Lange AJ (1972). "The specificity of glucose 6-phosphatase of intact liver microsomes". *J Biol Chem* 247(8): 2558-65
- Arion WJ and Wallin BK (1973). "Kinetics of the glucose 6-phosphate-glucose exchange activity and glucose inhibition of glucose 6-phosphatase of intact and disrupted rat liver microsomes". *J Biol Chem* 248: 2372-9
- Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL (2000). "Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group". *Diabetes Care*; 23: 1605-1611
- Artwohl M, Furnsinn C, Waldhausl W, Holzenbein T, Rainer G, Freudenthaler A, Roden M, Baumgartner-Parzer SM (2005a). "Thiazolidinediones inhibit proliferation of microvascular and macrovascular cells by a PPAR $\gamma$ -independent mechanism". *Diabetologia* 48(3):586-94
- Artwohl M, Holzenbein T, Furnsinn C, Freudenthaler A, Huttary N, Waldhausl WK, Baumgartner-Parzer SM (2005b). "Thiazolidinediones inhibit apoptosis and heat shock protein 60 expression in human vascular endothelial cells". *Thromb Haemost.* 93(5):810-5
- Arulmozhi DK, Portha B (2006). "GLP-1 based therapy for type 2 diabetes". *Eur J Pharm Sci.*;28(1-2): 96-108
- Azzone GF, Zoratti M, Petronilli V, Pietrobon D (1985). "The stoichiometry of H<sup>+</sup> pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling". *J Inorg Biochem.*; 23(3-4):349-56
- Baginski ES, Epstein E and Zak B (1975). "Review of phosphate methodologies". *Ann Clin Lab Sci* 5: 399-416
- Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Pratipanawatr T, DeFronzo RA (2004). "Plasma resistin concentration, hepatic fat content, and hepatic and peripheral insulin resistance in pioglitazone-treated type II diabetic patients". *Int J Obes Relat Metab Disord.*;28(6):783-9
- Bajaj M, Suraamornkul S, Pratipanawatr T, Hardies LJ, Pratipanawatr W, Glass L, Cersosimo E, Miyazaki Y, DeFronzo RA (2002). "Pioglitazone reduces hepatic fat content and augments splanchnic glucose uptake in patients with type 2 diabetes". *Diabetes*; 52(6):1364-70
- Bakker SJL, Ijzerman RG, Teelink T, Westerhoff HV, Gans ROB and Heine RJ (2000). "Cytosolic triglycerides and oxidative stress in central obesity: the missing link between excessive atherosclerosis, endothelial dysfunction and beta-cell failure?" *Atherosclerosis* 148: 17-21
- Barnett AH (2009). "Redefining the role of thiazolidinediones in the management of type 2 diabetes". *Vascular Health and Risk Management*; 5 141-151
- Barthel A and Schmoll D (2003). "Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4): E685-92
- Bartrons R, Van Schaftingen E, Hers HG (1984). "The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect". *Biochemical Journal* 218 (1), 157-163
- Batandier C, Fontaine E, Kériel C, Leverve XM (2002). "Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects". *J Cell Mol Med* 6(2): 175-87
- Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve XM (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin". *J Bioenerg Biomembr* 38(1): 33-42

- Batandier C, Guigas B, Detaille D, El-Mir MY, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve XM** (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin". *J Bioenerg Biomembr* 38:33-42
- Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA** (2004). "Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach". *J Clin Endocrinol Metab*;89:463-78
- Beaser RS** (2007). "Pharmacotherapy of type 2 diabetes: medications to match the pathophysiology". In: Beaser RS, Joslin Diabetes Center, editors. *Joslin's diabetes deskbook: a guide for primary care providers*. 2nd ed. Boston; Philadelphia: Joslin Diabetes Center; [Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins]; 2007. p. 173-248
- Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, Balas B, Gastaldelli A, Tio F, Pulcini J, Berria R, Ma JZ, Dwivedi S, Havranek R, Fincke C, DeFronzo R, Bannayan GA, Schenker S, Cusi K** (2006). "A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis". *N Engl J Med*. 355(22):2297-307
- Belvisi MG, Hele DJ, Birreli MA** (2006). "Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation". *European Journal of Pharmacology* Vol.533, Issues 1-3,101-109
- Berberoglu Z, GURSOY A, Bayraktar N, Yazici AC, Bascil Tutuncu N, GUVENER DEMIRAG N** (2007). "Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women". *J Clin Endocrinol Metab*;92:3523-3530
- Bergmeyer HU** (1974). "Methods of Enzymatic Analysis". Academic Press, New York, San Francisco, London
- Berry MN and Friend DS** (1969). "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study". *J Cell Biol* 43(3): 506-20
- Berry MN, Kun E and Werner HV** (1973). "Regulatory role of reducing-equivalent transfer from substrate to oxygen in the hepatic metabolism of glycerol and sorbitol". *Eur J Biochem* 33: 407-17
- Berry MN, Phillips JW, Gregory RB, Grivell AR, Wallace PG** (1992). "Operation and energy dependence of the reducing equivalent shuttles during lactate metabolism by isolated hepatocytes". *Biochim Biophys Acta* 1136(3): 223-30
- Bertelsen M, Anggard EE and Carrier MJ** (2001). "Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro". *Diabetologia* 44: 605-13
- Bjornholm M & Zierath JR** (2005). "Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in type II diabetes". *Biochemical Society Transactions* 33 354-357
- Blanquicett C, Roman J, Hart CM** (2008). "Thiazolidinediones as anti-cancer agents". *Cancer Ther*.;6(A):25-34
- Bolton GC, Keogh JP, East PB, Hollis FJ and Shore AD** (1996). "The fate of a thiazolidinedione antidiabetic agent in rat and dog". *Xenobiotica* 26:627-636
- Bonofiglio D, Cione E, Qi H, Pingitore A, Perri M, Catalano S, Vizza D, Panno ML, Genchi G, Fuqua SA, Andò S** (2009). "Combined low doses of PPARgamma and RXR ligands trigger an intrinsic apoptotic pathway in human breast cancer cells". *Am J Pathol*.;175(3):1270-80
- Boveris A and Chance B** (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen". *Biochem J* 134(3): 707-16
- Brand MD, Hafner RP and Brown GC** (1988). "Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain". *Biochem J*. 255:535-9
- Brettenthaler N, De Geyter C, Huber PR, Keller U** (2004). "Effect of the insulin sensitizer pioglitazone on insulin resistance, hyperandrogenism, and ovulatory dysfunction in women with polycystic ovary syndrome". *J Clin Endocrinol Metab*. 89(8):3835-40
- Brodsky SV, Gao S, Li H and Goligorsky MS** (2002). "Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5): H2130-9
- Brown GC** (1992). "Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells". *Biochem J*.284 (Pt 1):1-13
- Brunmair B, Gras F, Neschen S, Roden M, Wagner L, Waldhausl W, Furnsinn C** (2001). "Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator activated receptor-g mediated changes in gene expression". *Diabetes* 50:2309-2315
- Brunmair B, Gras F, Wagner L, Artwohl M, Zierhut B, Waldhausl W, Furnsinn C** (2004a). "Expression of uncoupling protein-3 mRNA in rat skeletal muscle is acutely stimulated by thiazolidinediones: an exercise-like effect?". *Diabetologia*. 47(9):1611-4

- Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Furnsinn C** (2004b). "Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?". *Diabetes* 53(4):1052-9
- Buchanan TA** (2003). "Pancreatic beta-cell loss and preservation in type 2 diabetes". *Clin Ther* 25 suppl B: B32-46
- Buckingham RE** (2005). "Thiazolidinediones: Pleiotropic drugs with potent anti-inflammatory properties for tissue protection". *Hepatol Res.*;33(2):167-70
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel RA, Butler PC** (2003). "Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in human with type 2 diabetes". *Diabetes* 52: 102-10
- Calkin AC, Forbes JM, Smith CM, Lassila M, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ** (2005). "Rosiglitazone attenuates atherosclerosis in a model of insulin insufficiency independent of its metabolic effects". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;25(9):1903-9
- Campbell IW, Mariz S** (2007). "Beta-cell preservation with thiazolidinediones". *Diabetes Res Clin Pract.*; 76(2):163-76
- Carpentier A, Mittelman SD, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF** (2000). "Prolonged elevation of plasma free fatty acids impairs pancreatic beta-cell function in obese nondiabetic humans but not in individuals with type 2 diabetes". *Diabetes* 49: 399-408
- Carr AC, McCall MR, Frei B** (2004). "Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(7):1716-23
- Cataldo NA, Abbasi F, McLaughlin TL, Basina M, Fechner PY, Giudice LC, Reaven GM** (2006). "Metabolic and ovarian effects of rosiglitazone treatment for 12 weeks in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome". *Hum Reprod.*;21(1):109-20
- Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, Franco L, Murphy E, Iori E, Pagnin E, Fadini GP, Albiero M, Semplicini A, Avogaro A** (2007). "Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;27(12):2627-33
- Chance B, Williams GR** (1956). "The respiratory chain and oxidative phosphorylation". *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.*;17:65-134
- Charbonnel B, Dormandy J, Erdmann E, Massi-Benedetti M, and Skene A, PROactive Study Group** (2004). "The Prospective Pioglitazone Clinical Trial in Macrovascular Events (PROactive) Can pioglitazone reduce cardiovascular events in diabetes? Study design and baseline characteristics of 5,238 patients". *Diabetes Care* 27:1647-1653
- Chiquette E, Ramirez G, DeFronzo R** (2004). "A meta-analysis comparing the effect of thiazolidinediones on cardiovascular risk factors". *Arch Intern Med*; 164:2097-104
- Civitaresse AE, Ravussin E** (2008). "Mitochondrial energetics and insulin resistance". *Endocrinology*, 149(3), 950-954
- Claus TH, El Maghrabi MR and Pilkis SJ** (1979). "Modulation of the phosphorylation state of rat hepatocyte pyruvate kinase by allosteric effectors and insulin". *J Biol Chem* 254: 7855-6
- Clerc P, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E** (2007). "Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency". *J Bioenerg Biomembr.* 39(2):158-66
- Cline GW, Petersen KF, Krssak M, Shen J, Hundal RS, Trajanoski Z** (1999). "Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes". *N Eng J Med* 341: 240-6
- Clore JN, Stillman J, Sugerman H** (2000). "Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes". *Diabetes* 49: 969-74
- Coletta DK, Sriwijitkamol A, Wajcberg E, Tantiwong P, Li M, Prentki M, Madiraju M, Jenkinson CP, Cersosimo E, Musi N, DeFronzo RA** (2009). "Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: a randomised trial". *Diabetologia.*;52(4):723-32
- Consoli A, Devangelio E** (2005). "Thiazolidinediones and inflammation". *Lupus.*;14(9):794-7
- Cortés V, Quezada N, Rigotti A, Maiz A** (2005). "New heterodimeric nuclear receptors: key metabolic regulators with relevance in the pathophysiology and therapy of dyslipidemias and diabetes mellitus". *Rev Med Chil.*;133(12):1483-92.
- Cox PJ, Ryan DA, Hollis FJ, Harris AM, Miller AK, Vousden M, and Cowley H** (2000). "Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans". *Drug metabolism and disposition* 28:772-780
- Crabtree B and Newsholme EA** (1978). "Sensitivity of a near-equilibrium reaction in a metabolic pathway to changes in substrate concentration". *Eur J Biochem* 89: 19-22
- Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S and Mithieux G** (2001). "Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ". *Diabetes* 50(4): 740-6

- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawart T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ** (2001). "Insulin resistance differentially affects the PI-3-kinase and MAP kinase-mediated signaling in human muscle". *J Clin Invest* 105:311-20
- Cusimano EM, Knight AR, Slusser JG, Clancy RL, Pierce JD** (2009). "Mitochondria: the hemi of the cell". *Adv Emerg Nurs J*;31(1):54-62
- Da Ros R, Assaloni R and Ceriello A** (2004a). "Antioxidant therapy in diabetic complications: what is new?" *Curr Vasc Pharmacol* 2(4): 335-41
- Da Ros R, Assaloni R and Ceriello A** (2004b). "The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance". *Diabetes Med* 21(11): 1249-52
- Da Silva Morais A, Lebrun V, Abarca-Quinones J, Brichard S, Hue L, Guigas B, Viollet B, Leclercq IA** (2009). "Prevention of steatohepatitis by pioglitazone: implication of adiponectin-dependent inhibition of SREBP-1c and inflammation". *J Hepatol*;50(3):489-500
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A** (2003). "Protein carbonylation in human diseases". *Trends Mol. Med.*, 9, 169–176
- Dana SL, Hoener PA, Bilakovics JM, Crombie DL, Ogilvie KM, Kauffman RF, Mukherjee R, Paterniti JR Jr** (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor subtype-specific regulation of hepatic and peripheral gene expression in the Zucker diabetic fatty rat". *Metabolism* ; 50(8):963-71.
- Das SK & Elbein SC** (2006). "The genetic basis of type 2 diabetes". *Cellscience* 2 100–131
- Decoursey TE, Ligeti E** (2005). "Regulation and termination of NADPH oxidase activity". *Cell Mol Life Sci*.;62(19-20):2173-93
- Deeg MA, Buse JB, Goldberg RB, et al; for the GLAI Study Investigators** (2007). "Pioglitazone and rosiglitazone have different effects on serum lipoprotein particle concentrations and sizes in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia". *Diabetes Care*;30:2458–2464
- Degli Esposti M** (1998). "Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview". *Biochim Biophys Acta*.1364:222-35
- Dello Russo C, Gavrielyuk V, Weinberg G, Almeida A, Bolanos JP, Palmer J, Pelligrino D, Galea E, Feinstein DL** (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes". *J Biol Chem*. 278(8):5828-36
- Desvergne B, Wahli W** (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism". *Endocr Rev* 20:649–88
- Detaille D, Sanchez C, Sanz N, Lopez-Novoa JM, Leverve X, El-Mir MY** (2008). "Interrelation between the inhibition of glycolytic flux by silibinin and the lowering of mitochondrial ROS production in perfused rat hepatocytes". *Life Sciences* 82: 1070–1076
- Devin A, Nogueira V, Leverve X, Guérin B, Rigoulet M** (2001). "Allosteric activation of pyruvate kinase via NAD<sup>+</sup> in rat liver cells". *Eur J Biochem*.;268(14):3943-9
- Diani AR, Sawada G, Wyse B, Murray FT, Khan M** (2004). "Pioglitazone preserves pancreatic islet structure and insulin secretory function in three murine models of type 2 diabetes". *Am J Physiol Endocrinol Metab*.; 286(1): E116-22
- Donath MY, Stirling J, Maedler K & Mandrup-Poulsen T** (2003). "Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes". *Journal of Molecular Medicine* 81 455–470
- Dong X, Park S, Lin X, Copps K, Yi X, White MF** (2005). "Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth". *J Clin Invest*.;116(1):101-14
- DREAM (Diabetes Reduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomized controlled trial** (2006). *Lancet* 368: 1096–105 2006.
- Duckworth WC** (2008). American Diabetes Association 68th Scientific Sessions: VA Diabetes Trial Symposium
- Eckland DA, Danhof M** (2000). "Farmacocinética clínica de pioglitazona". *Exp. Clin. Endocrinology & Diabetes* Vol.108, Suppl 2, pp. S234-S242
- El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Haberte N, Rigoulet M and Leverve X** (2000). "Bimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I". *J Biol Chem* 275(1): 223-8
- Engstrom L** (1978). "The regulation of liver pyruvate kinase by phosphorylation--dephosphorylation". *Curr Top Cell Regul* 13: 28-51
- Erecinska M and Wilson DF** (1982). "Regulation of cellular energy metabolism". *J Membr Biol*.70:1-14
- Eriksson UJ** (1996). "Lifelong consequences of metabolic adaptations in utero?" *Diabetologia* 39: 1123-5

- Escribano L, Simón AM, Pérez-Mediavilla A, Salazar-Colocho P, Del Río J, Frechilla D** (2009). "Rosiglitazone reverses memory decline and hippocampal glucocorticoid receptor down-regulation in an Alzheimer's disease mouse model". *Biochem Biophys Res Commun.*;379(2):406-10
- Evans A, Krentz AJ** (1999). "Benefits and risks of transfer from oral agents to insulin in type 2 diabetes mellitus". *Drug Saf* 21(1): 7-22
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM** (2002). "Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes". *Endocrine Rev* 23: 599-622
- Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE** (2001). "Beta-cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death". *Diabetes* 50(5):1021-9
- Fontaine EM, Devin A, Rigoulet and Leverve XM** (1997). "The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux". *Biochemical and biophysical research communications* 232, 532–535
- Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME** (2008). "Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes". *Diabetes.*;57(6):1446-54
- Foster JD and Nordlie RC** (2002). "The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system". *Exp Biol Med (Maywood)* 227(8): 601-8
- Fritsche L, Weigert C, Haring HU & Lehmann R** (2008). "How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver – implications for health and disease". *Current Medicinal Chemistry* 15 1316–1329
- Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D** (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways". *J Biol Chem.* 12;277(28):25226-32
- Fuhlendorff J, Rorsman P, Kofod H, Brand CL, Rolin B, MacKay P, Shymko R, Carr RD** (2004). "Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes". *Diabetes.*;47(3):345-51
- García C, Díaz MT and Morales F** (2005). "Presencia de las especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus insulino-dependiente". *Av Diabetol* 2: 145-8
- Garvey WT** (1998). "Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system". *Am J Med* 105:331-45
- Gastaldelli A, Baldi S, Pettiti M, Toschi E, Camastra S, Natali A, Landau BR, Ferrannini E** (2000). "Influence of obesity and type 2 diabetes on gluconeogenesis and glucose output in humans: a quantitative study". *Diabetes* 49: 1367-73
- Gastaldelli A, Casolaro A, Pettiti M, Nannipieri M, Ciociaro D, Frascerra S, Buzzigoli E, Baldi S, Mari A, Ferrannini E** (2007). "Effect of pioglitazone on the metabolic and hormonal response to a mixed meal in type II diabetes". *Clin Pharmacol Ther.*;81(2):205-12
- Geerloff J, Lebrizzi R, Carey R** (2000). "Effect of food on the pharmacokinetics of pioglitazone. Pioglitazone 036 Study Group. *Diabetes* 49 (Supl 1): A357
- Gerich JE, Meyer C, Woerle HJ and Stumvoll M** (2001). "Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis". *Diabetes Care* 24(2): 382-91
- Gerschman R** (1954). "Oxygen poisoning and X-Irradiation. A mechanism in common". *Science* 119: 623-6
- Ghafourifar P, Cadenas E** (2005). "Mitochondrial nitric oxide synthase". *Trends Pharmacol Sci.*;26(4):190-5
- Girard J, Ferre P and Foufelle F** (1997). "Mechanisms by which carbohydrates regulate expression of genes for glycolytic and lipogenic enzymes". *Annu Rev Nutr* 17: 325-52
- Glintborg D, Andersen M, Hagen C, Heickendorff L, Hermann AP** (2008). "Association of pioglitazone treatment with decreased bone mineral density in obese premenopausal patients with polycystic ovary syndrome: a randomized, placebo-controlled trial". *J Clin Endocrinol Metab.*;93:1696–1701
- Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, Tan MH, Khan MA, Perez AT, Jacober SJ** (2005). "A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia". *Diabetes Care*; 28:1547–1554.
- Goldfine AB** (2008). "The rough road for rosiglitazone". *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*;15(2):113-7
- Goodpaster BH, Thaete FL, Kelley BE** (2000). "Thigh adipose tissue distribution is associated with insulin resistance in obesity and in type 2 diabetes mellitus". *Am J Clin Nutr* 71: 885-92
- Gornall AG, Vardawill CJ and David MM** (1948). "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction". *J Biol Chem* 177: 751-66
- Greenfield JR** (2004). "Thiazolidinediones-mechanism of action". *Aust. Prescr.*;27:67-70

- Griendling KK and Ushio-Fukai M** (2000). "Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling". *Regul Peptides* 91: 21-7
- Grivell AR, Halls HJ and Berry MN** (1991). "Role of mitochondria in hepatic fructose metabolism". *Biochim Biophys Acta* 1059: 45-54
- Groen AK, Sips HJ, Vervoorn RC and Tager JM** (1982a). "Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells". *Eur J Biochem* 122(1): 87-93
- Groen AK, Wanders RJ, Westerhoff HV, Van der Meer R and Tager JM** (1982b). "Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration". *J Biol Chem.*257:2754-7
- Groen AK, Vervoorn RC, Van der Meer R and Tager JM** (1983). "Control of gluconeogenesis in rat liver cells. I. Kinetics of the individual enzymes and the effect of glucagon". *J Biol Chem* 258: 14346-53
- Groen AK, van Roermund CW, Vervoorn RC and Tager JM** (1986). "Control of gluconeogenesis in rat liver cells. Flux control coefficients of the enzymes in the gluconeogenic pathway in the absence and presence of glucagon". *Biochem J* 237: 379-89
- Gruzman A, Babai G, Sasson S** (2009). "Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) as a New Target for Antidiabetic Drugs: A Review on Metabolic, Pharmacological and Chemical Considerations". *Rev Diabet Stud.* Spring;6(1):13-36
- Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, Magnuson MA, Redha R, Zhang Y, Breyer MD** (2005). "Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPARgamma stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption". *Nat Med.*;11:861– 866
- Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E and Leverve X** (2004). "Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study". *Biochem J* 382(Pt 3): 877-84
- Guigas B, Naboulsi R, R.-Villanueva G, Taleux N, Lopez-Novoa JM, Leverve XM and El-Mir MY** (2007). "The flavonoid silibinin decreases glucose-6-phosphate hydrolysis in perfused rat hepatocytes by an inhibitory effect on glucose-6-phosphatase". *Cell Physiol Biochem*;20:925-934
- Guyton A, Hall J** (2001). "Tratado de Fisiología Médica". Editor: *Mc-Graw-Hill interamericana*. 12a edición
- Halliwell B & Gutteridge JMC** (1999). "Free radicals in biology and medicine" (3rd ed.). Oxford University Press
- Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter Sopasakis V, Smith U** (2005). "The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance". *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*;73(1):65-75
- Hanefeld M** (2001). "Pharmacokinetics and clinical efficacy of pioglitazone". *Int J Clin Pract Suppl* (121):19-25
- Hanefeld M, Dickinson S, Bouter KP, Guitard C** (2000). "Rapid and short-acting mealtime insulin secretion with nateglinide controls both prandial and mean glycemia". *Diabetes Care* 23: 202-7
- Hanley AJ, Zinman B, Sheridan P, Yusuf S, Gerstein HC; for the DREAM Investigators** (2008). "Effect of rosiglitazone and ramipril on {beta}-cell function in people with impaired glucose tolerance (IGT) or impaired fasting glucose (IFG): the DREAM Trial". *Diabetes Care*
- Hardie G** (2007). "AMP-Activated Protein Kinase as a Drug Target". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47:185–210
- Hauner H** (2002). "The mode of action of thiazolidinediones". *Diabetes Metab Res Rev*; 18: S10–S15
- Hederstedt L** (2003a). "Complex II is complex too". *Science.*299:671-672
- Hederstedt L** (2003b). "Structural biology. Complex II is complex too". *Science.*299:671-2
- Hellerstein MK, Schwarz JM and Neese RA** (1996). "Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans". *Annu Rev Nutr* 16: 523-57
- Henry RR** (1997). "Thiazolidinediones". *Endocrinol Metab Clin North Am* 26:553–573
- Herz M, Johns D, Reviriego J, et al** (2003). "A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of the effects of pioglitazone on glycemic control and dyslipidemia in oral antihyperglycemic medication-naive patients with type 2 diabetes mellitus". *Clin Ther.*; 25:1074–1095
- Hers HC and Hue L** (1983). "Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis". *Ann. Rev. Biochem.* 52, 617-653
- Hinkle PC, Kumar MA, Resetar A, Harris DL** (1991). "Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation". *Biochemistry* 30(14): 3576-82
- Hofmann CA, Edwards CW, Hillman RM, Colca JR** (1992). "Treatment of insulin-resistant mice with the oral antidiabetic agent pioglitazone: evaluation of liver GLUT2 and phosphoenolpyruvate carboxykinase expression". *Endocrinology*; 130 (2): 735-40
- Hong S and Pedersen PL** (2008). "ATP synthase and the actions of inhibitors utilized to study its roles in human health, disease, and other scientific areas". *Microbiol Mol Biol Rev* 72(4): 590- 641, Table of Contents



- Hue L** (1981). "The role of futile cycles in the regulation of carbohydrate metabolism in the liver". *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 52: 247-331
- Hue L** (2001). "Regulation of gluconeogenesis in liver". Handbook of physiology. O. U. Press. Volume II: The endocrine pancreas and regulation of metabolism: 649-657
- Hue L, Sobrino F and Bosca L** (1984). "Difference in glucose sensitivity of liver glycolysis and glycogen synthesis. Relationship between lactate production and fructose 2,6-bisphosphate concentration". *Biochem J* 224(3): 779-86
- Ichai C, El-Mir MY, Nogueira V, Piquet MA, Chauvin C, Fontaine E, Leverve XM** (2001). "Exogenous Mg-ATP induces a large inhibition of pyruvate kinase in intact rat hepatocytes". *J Biol Chem* 276(9):6398-403
- IDF Clinical Guidelines Task Force** (2006). "Global guideline for type 2 diabetes: recommendations for standard, comprehensive, and minimal care". *Diabet Med.*; 23: 579-593
- Ino T, Nishioka T, Miyoshi H** (2003). "Characterization of inhibitor binding sites of mitochondrial complex I using fluorescent inhibitor". *Biochim Biophys Acta.*;1605(1-3):15-20
- Inzucchi SE** (2002). "Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review". *JAMA*;287(3):360-72
- Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V Shulman GI** (1998). "Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type 2 diabetes mellitus". *N Engl J Med* 338: 867-72
- Janson J, Butler AE, Bonner-Weir S, Ritzel RA, Sultana C, Butler PC** (2002). "Failure of compensatory increase in new islet formation in humans with type-2 diabetes mellitus". *Diabetes* 51 (Suppl 2): A377
- Jiang G and Zhang BB** (2003). "Glucagon and regulation of glucose metabolism". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(4): E671-8
- Jitrapakdee S and Wallace JC** (1999). "Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase". *Biochem J* 340 ( Pt 1): 1-16
- Jovanovic L, Dailey G III, Huang WC, Strange P, Goldstein BJ** (2000). "Repaglinide in type 2 diabetes : a 24-week fixed-dose efficacy and safety study". *J Clin Pharmacol* 40:49-57
- Jungermann K and Kietzmann T** (1996). "Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver". *Annu Rev Nutr* 16: 179-203
- Kadenbach B and Arnold S** (1999). "A second mechanism of respiratory control". *FEBS Lett.*447:131-4
- Kadenbach B, Napiwotzki J, Frank V, Arnold S, Exner S and Huttemann M** (1998). "Regulation of energy transduction and electron transfer in cytochrome c oxidase by adenine nucleotides". *J Bioenerg Biomembr.*30:25-33
- Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB** (1999). "Islet amyloid. A long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes". *Diabetes* 48: 241-53
- Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, et al; for the ADOPT Study Group** (2006). "Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy". *N Engl J Med.*;355:2427-2443
- Kahn SE, Haffner SM, Viberti G, Herman WH, Lachin JM, Kravitz BG, Yu D, Paul G, Holman RR, Zinman B; Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT) Study Group** (2010). "Rosiglitazone decreases C-reactive protein to a greater extent relative to glyburide and metformin over 4 years despite greater weight gain: observations from a Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT)". *Diabetes Care*;33(1):177-83
- Kaiser CC, Shukla DK, Stebbins GT, Skias DD, Jeffery DR, Stefoski D, Katsamakis G, Feinstein DL** (2009). "A pilot test of pioglitazone as an add-on in patients with relapsing remitting multiple sclerosis". *J Neuroimmunol.*;211(1-2):124-30
- Kaiser N, Leibowitz G, Neshier R** (2003). "Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus". *J Pediatr Endocrinol Metab.*;16(1): 5-22
- Kaplan F, Al-Majali K, Betteridge DJ** (2001). "PPARS, insulin resistance and type 2 diabetes". *J Cardiovasc Risk* 8(4):185-6
- Klatt P and Lamas S** (2000). "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress". *Eur. J. Biochem* 267: 4928-44
- Klingenberg M, Slenczka W** (1959). "Pyridine nucleotide in liver mitochondria. An analysis of their redox relationships". *Biochem Z* 331:486-517
- Knapp P, Jarzabek K, Blachnio A, Zbroch T** (2006). "The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in carcinogenesis". *Ginekol Pol.* 77(8):643-51
- Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S** (2008). "Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects". *Gastroenterology*; 134(5):1369-75

- Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, Kumagai H, Itoh S, Satoh H, Yano W, Ogata H, Tokuyama K, Takamoto I, Mineyama T, Ishikawa M, Moroi M, Sugi K, Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Noda T, Nagai R, Kadowaki T** (2006). "Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways". *J Biol Chem.*; 31; 281(13):8748-55
- Kurland IJ and Pilkis SJ** (1995). "Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of bifunctional enzyme". *Protein Sci* 4(6): 1023-37
- Lancaster CR** (2002). "Succinate:quinone oxidoreductases: an overview". *Biochim Biophys Acta.*1553:1-6
- Lacraz G, Couturier K, Taleux N, Servais S, Sibille B, Letexier D, Guigas B, Dubouchaud H, Leverve X, Favier R** (2008). "Liver mitochondrial properties from the obesity-resistant Lou/C rat". *Int J Obes (Lond).*;32(4):629-38
- Lardy H and Hughes PE** (1984). "Regulation of gluconeogenesis at phosphoenolpyruvate carboxykinase". *Curr Top Cell Regul* 24: 171-9
- Lebovitz HE** (1998). "Alpha-glucosidase inhibitors as agents in the treatment of diabetes". *Diabetes Reviews* 6: 132-45
- Lebovitz HE** (2001a). "Diagnosis, classification, and pathogenesis of diabetes mellitus". *J Clin Psychiatry.* 62 Suppl 27:5-9; discussion 40-1
- Lebovitz HE, Dole JF, Patwardhan R, Rappaport EB, Freed MI; for the Rosiglitazone Clinical Trials Study Group** (2001b). "Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes". *J Clin Endocrinol Metab.*; 86: 280-288
- Lebovitz HE, Meander A** (2004). "Sulfonylureas: basic aspects and clinical use". In: DeFronzo R, editor. *International textbook of diabetes*, 3<sup>rd</sup> edition. Chichester (UK): John Wiley and sons Ltd
- LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E** (2006). "Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues". *Am J Physiol Endocrinol Metab.*;291(1):E175-81
- Lee CP, Gu Q, Xiong Y, Mitchell RA, Ernster L** (1996). "P/O ratios reassessed: mitochondrial P/O ratios consistently exceed 1.5 with succinate and 2.5 with NAD-linked substrates". *FASEB J.* 10(2):345-50
- Leverve XM, Fontaine E, Putod-Paramelle F and Rigoulet M** (1994). "Decrease in cytosolic ATP/ADP ratio and activation of pyruvate kinase after in vitro addition of almitrine in hepatocytes isolated from fasted rats". *Eur J Biochem* 224: 967-74
- Leverve XM** (2003). "Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects". *Intensive Care Med* 29(4): 511-4
- Llorente P, Marco R and Sols A** (1970). "Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroad". *Eur J Biochem* 13: 45-54
- Longo R** (2010). "Diabetes under control: Understanding oral antidiabetic agents". *Am J Nurs.*;110(2):49-52
- Lowry OH** (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J Biol Chem* 193, 265-275
- Lin EC** (1977). "Glycerol utilization and its regulation in mammals". *Annu Rev Biochem* 46: 765-95
- Mahadev K, Zilbering A, Zhu L and Goldstein BJ** (2001). "Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade". *J Biol Chem* 276: 21938-42
- Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C** (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes". *J Nutr Biochem.*;16(10):577-86
- Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF** (2002). "The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes". *Diabetes*; 51(3):797-802.
- Mazzone T, Meyer PM, Feinstein SB, Davidson MH, Kondos GT, D'Agostino RB Sr, Perez A, Provost JC, Haffner SM** (2006). "Effect of pioglitazone compared with glimepiride on carotid intima-media thickness in type 2 diabetes: a randomized trial". *JAMA.*;296(21):2572-81
- McGarry JD** (2002). "Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes". *Diabetes* 51: 7-18
- McGuire DK, Inzucchi SE** (2008). "New drugs for the treatment of diabetes mellitus: part I: Thiazolidinediones and their evolving cardiovascular implications". *Circulation.*;117(3):440-9
- McKennon SA, Campbell RK** (2007). "The physiology of incretin hormones and the basis for DPP-4 inhibitors". *Diabetes Educ.*;33(1):55-6, 60-2, 65-6

- Mehta JL, Hu B, Chen J, and Li D** (2003). "Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 23: 2203–2208
- Mitchell P** (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism". *Nature*. 191:144-8,1961
- Murphy MP** (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species". *Biochem J* 417(1): 1-13
- Narsing Rao L, Jacob JJ, Paul TV, Rajarathinam S, Thomas N, Seshadri MS** (2009). "Effects of pioglitazone on menstrual frequency, hyperandrogenism and insulin resistance in adolescents and young adults with polycystic ovary syndrome". *J Pediatr Adolesc Gynecol.*;22(2):91-5
- Natali A, Ferrannini E** (2006). "Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review". *Diabetologia*; 49:434-41
- Newsholme EA and Leech A** (1983). "Biochemistry for the medical sciences". Chichester, New York, Brisbane, Toronto and Singapore, John Wiley & Sons
- Newsholme EA and Leech A** (1983). "Biochemistry for the medical sciences". Chichester, New York, Brisbane, Toronto and Singapore, John Wiley & Sons
- Nishimura Y, Inoue Y, Takeuchi H, Oka Y** (1997). "Acute effects of pioglitazone on glucose metabolism in perfused rat liver". *Acta Diabetol.*;34(3):206-10
- Nissen SE**, (2008). "Comparison of pioglitazone vs glimepiride on progression of coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: the PERISCOPE randomized controlled trial". *JAMA.*;299:1561–1573
- Nissen SE, Wolski K** (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes". *N Engl J Med*. 14;356(24):2457-71
- Noble J, Baerlocher MO, Silverberg J** (2005). "Management of type 2 diabetes mellitus. Role of thiazolidinediones". *Can Fam Physician* 51: 683-7
- Nordlie RC** (1976). "Glucose-6-Phosphatase-Phosphotransferase: roles and regulation in relation to gluconeogenesis. Gluconeogenesis: Its regulation in Mamalian species". R.W. Hanson and M. A. Mehlman. New York, Wiley: 93-152
- Nordlie RC, Foster JD and Lange AJ** (1999). "Regulation of glucose production by the liver". *Annu Rev Nutr* 19: 379-406
- O'Moore- Sullivan TM and Prins JB** (2002). "Thiazolidinediones and type 2 diabetes: new drugs for an old disease". *MJA Vol* 176: 381-386
- Ohara Y, Peterson TE and Harrison DG** (1993). "Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production". *J Clin Invest* 91: 2546-51
- Ohnishi T, Moser CC, Page CC, Dutton PL, Yano T** (2000). "Simple redox-linked proton-transfer design: new insights from structures of quinol-fumarate reductase". *Structure.*;8(2):R23-32
- Okuno Y and Gliemann J** (1986). "Transport of glucose and fructose in rat hepatocytes at 37 degrees C". *Biochim Biophys Acta* 862: 329-34
- Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL** (2001). "A selective peroxisome proliferator-activatedreceptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport". *Proc Natl Acad Sci U S A*;98:5306–11
- Otto M, Jacobasch G and Rapoport S** (1976). "A comparison of the influence of potassium and ammonium ions on the phosphofructokinases from rabbit muscle and rat erythrocytes". *Eur J Biochem* 65(1):201-6
- Ovalle F, Bell DS** (2002). "Lipoprotein effects of different thiazolidinediones in clinical practice". *Endocr Pract.*; 8:406–410
- Ovalle F, Bell DS** (2004). "Effect of rosiglitazone versus insulin on the pancreatic b-cell function of subjects with type 2 diabetes". *Diab. Care* 27: 2585–2589
- Owen MR, Doran E and Halestrap AP** (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain". *Biochem J* 348 Pt 3: 607-14
- Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA** (2009). "Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health". *Curr Opin Pharmacol.*;9(6):771-9
- Perry C and Petrie JR** (1998). "Insulin-sensitising agents". *Emerging Drugs* 3:247–260
- Pilkis SJ, El-Maghrabi MR and Claus TH** (1988). "Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis". *Annu Rev Biochem* 57: 755-83
- Pilkis SJ and Granner DK** (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis". *Annu Rev Physiol* 54: 885-909
- Pilkis SJ, Claus TH, Kurland IJ and Lange AJ** (1995). "6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme". *Annu Rev Biochem* 64: 799-835

- Ponczek MB and Wachowicz B** (2005). "Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins". *Postepy Biochem* 51: 140-5
- Porte D Jr and Khan SE** (1995). "The key role of islet dysfunction in type II diabetes mellitus". *Clin Invest Med.*;18(4):247-54
- Pratipanawart W, Pratipanawart T, Cusi K, Berria R, Adams JM, Jenkinson CP** (2001). "Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation". *Diabetes* 50: 2572-8
- Printz RL, Magnuson MA and Granner DK** (1993). "Mammalian glucokinase". *Annu Rev Nutr* 13: 463-96 proliferator activated receptor-g mediated changes in gene expression". *Diabetes* 50:2309-2315
- Promrat K, Lutchman G, Uwaifo GI, Freedman RJ, Soza A, Heller T, Doo E, Ghany M, Premkumar A, Park Y, Liang TJ, Yanovski JA, Kleiner DE, Hoofnagle JH** (2004). "A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis". *Hepatology*. 39(1):188-96
- Qin S, Liu T, Kamanna VS, Kashyap ML** (2007). "Pioglitazone stimulates apolipoprotein A-I production without affecting HDL removal in HepG2 cells: involvement of PPAR-alpha". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*; 27:2428-2434
- Racker E** (1961). "Mechanisms of synthesis of adenosine triphosphate". *Adv Enzyme Regul.*23:323-99
- Radziuk J and Pye S** (2001). "Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis". *Diabetes Metab Res Rev* 17(4): 250-72
- Raskin P, Rendell M, Riddle MC, Dole JF, Freed MI, Rosenstock J; for the Rosiglitazone Clinical Trials Study Group** (2001). "A randomized trial of rosiglitazone therapy in patients with inadequately controlled insulintreated type 2 diabetes". *Diabetes Care*;24:1226-1232
- Ratzu V, Charlotte F, Bernhardt C, Giral P, Halbron M, Lenaour G, Hartmann-Heurtier A, Bruckert E, Poynard T; LIDO Study Group** (2010). "Long-term efficacy of rosiglitazone in nonalcoholic steatohepatitis: results of the fatty liver improvement by rosiglitazone therapy (FLIRT 2) extension trial". *Hepatology.*;51(2):445-53
- Renger G and Hanssum B** (2009). "Oxygen detection in biological systems". *Photosynth Res DOI* 10.1007/s11120-009-9434-2
- Rhodes CJ** (2005). "Type 2 diabetes – a matter of beta-cell life and death?" *Science* 307 380-384
- Ridnour LA, Thomas DD, Mancardi D, Espey MG, Miranda KM, Paolucci N, Feelisch M, Fukuto J, Wink DA** (2004). "The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations". *Biol Chem.*;385(1):1-10
- Rigoulet M, Leverve XM, Plomp PJ and Meijer AJ** (1987). "Stimulation by glucose of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from starved rats". *Biochem J* 245(3): 661-8
- Rigoulet M, Ouhabi R, Leverve X, Putod-Paramelle F, Guérin B** (1989). "Almitrine, a new kind of energy-transduction inhibitor acting on mitochondrial ATP synthase". *Biochim Biophys Acta* 975(3): 325-9
- Riou JP, Claus TN and Pilkis SJ** (1978). "Stimulation of glucagon of in vivo phosphorylation of rat hepatic pyruvate kinase". *J Biol Chem* 253: 656-9
- Risner ME, Saunders AM, Altman JF, Ormandy GC, Craft S, Foley IM, Zvartau-Hind ME, Hosford DA, Roses AD; Rosiglitazone in Alzheimer's Disease Study Group** (2006). "Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease". *Pharmacogenomics J.*;6(4):246-54
- Robertshaw H, Friedmann PS** (2005). "Pioglitazone: a promising therapy for psoriasis". *Br J Dermatol.*;152(1):189-91
- Rosen ED, Spiegelman BM** (2001). "PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth". *J Biol Chem.*;276(41):37731-4
- Rosenblatt S, Miskin B, Glazer NB, Prince MJ, Robertson KE** (2001). "The impact of pioglitazone on glycemic control and atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus". *Coron Artery*
- Ruderman NB, Cacicedo JM, Itani S, Yagihashi N, Saha AK, Ye JM, Chen K, Zou M, Carling D, Boden G, Cohen RA, Keaney J, Kraegen EW, Ido Y** (2003). "Malonyl-CoA and AMP-activated protein kinase (AMPK): possible links between insulin resistance in muscle and early endothelial cell damage in diabetes". *Biochem Soc Trans.*;31(Pt 1):202-6
- Rudich A, Tirosch A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H and Bashan N** (1998). "Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes". *Diabetes* 47: 1562-9
- Ryysy L, Hakkinen AM, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J** (2000). "Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolis rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients". *Diabetes* 49: 749-58

- Saez DE, Figueroa CD, Concha II and Slebe JC** (1996). "Localization of the fructose 1,6-bisphosphatase at the nuclear periphery". *J Cell Biochem* 63(4): 453-62
- Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB** (2004). "Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo". *Biochem Biophys Res Commun.*; 314(2):580-5
- Saltiel AR, Kahn CR** (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism". *Nature*. 2001;414(6865):799-806
- Sato T, Hanyu H, Hirao K, Kanetaka H, Sakurai H, Iwamoto T** (2009). "Efficacy of PPAR-gamma agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease". *Neurobiol Aging*
- Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J** (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions". *Curr Opin Lipidol*; 8: 159-166
- Schultz BE, Chan SI** (2001). "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes". *Annu Rev Biophys Biomol Struct.*;30:23-65
- Selamidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR** (2008). "NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition". *Pharmacol Ther.*;120(3):254-91
- Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S** (2006). "PPAR gamma and human metabolic disease". *J Clin Invest*;116:581-9
- Sestoft L and Fleron P** (1974). "Determination of the kinetic constants of fructose transport and phosphorylation in the perfused rat liver". *Biochim Biophys Acta* 345: 27-38.
- Seufert J** (2006). "A fixed-dose combination of pioglitazone and metformin: A promising alternative in metabolic control". *Curr Med Res Opin.*;22 Suppl 2:S39-48
- Shadid S, Jensen MD** (2003). "Effect of pioglitazone on biochemical indices of non-alcoholic fatty liver disease in upper body obesity". *Clin Gastroenterol Hepatol*. 1(5):384-7
- Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P, Gupta M, Kumar B, Sandhu K** (2005). "Pilot trial: Pioglitazone versus placebo in patients with plaque psoriasis (the P6)". *Int J Dermatol.*;44(4):328-33
- Shah S, Iqbal M, Karam J, Salifu M, McFarlane SI** (2007). "Oxidative stress, glucose metabolism, and the prevention of type 2 diabetes: pathophysiological insights". *Antioxid Redox Signal.*;9(7):911-29
- Shimabukuro M, Zhou Y-T, Levi M, Unger RH** (1998). "Fatty acid induced  $\beta$ -cell apoptosis: a link between obesity and diabetes". *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2498-502
- Shorr RI, Ray WA, Daugherty WA, Griffin MR** (1996). "Individual sulfonylureas and serious hypoglycemia in older people". *J Am Geriatr Soc* 44:751-5
- Skinner AM and Turker MS** (2005). "Oxidative mutagenesis, mismatch repair, and aging". *Sci Aging Knowledge Environ*: re3
- Smith U** (2001). "Pioglitazone: mechanism of action". *Int J Clin Pract Supp*; (121): 13-8
- Sohda T, Mizuno K, Tawada H, Sugiyama Y, Fujita T, Kawamatsu Y** (1982a). "Studies on antidiabetic agents I. Synthesis of 5-[4-(2-methyl-2-phenylpropoxy)-benzyl] thiazolidine-2,4-dione (AL-321) and related compounds". *Chem Pharm Bull* 1982a; 30:3563-73
- Sohda T, Mizuno K, Tawada H, Sugiyama Y, Fujita T, Kawamatsu Y** (1982b). "Studies on antidiabetic agents II. Synthesis of 5-4-1 (methylcylohexylmethoxy) benzyl thiazolidine-2,4-dione ADD-3878 and its derivatives". *Chem Pharm Bull*; 30:3580-600
- Sohda T, Momose Y, Meguro K, Kawamatsu Y, Sugiyama Y, Ikeda H** (1990). "A new antidiabetic agent, AD 4833, and structure-activity relationship of 5-[4-pyridylalkoxy] benzyl]-2,4-thiazolidinedione". *Arzneim- Forsch/drug Res*;40:37-43
- Srinivasan BT, Jarvis J, Khunti K, Davies MJ** (2008). "Recent advances in the management of type 2 diabetes mellitus: a review". *Postgrad Med J.*;84(996):524-31
- Stark G** (2005). "Functional consequences of oxidative membrane damage". *J Membr Biol* 205: 1-16
- Stewart HB, El-Maghrabi MR and Pilkis SJ** (1985). "Evidence for a phosphoenzyme intermediate in the reaction pathway of rat hepatic fructose-2,6-bisphosphatase". *J Biol Chem* 260(24): 12935-41
- Sugiyama Y, Shimura Y, Ikeda H** (1990). "Effects of pioglitazone on hepatic and peripheral insulin resistance in Wistar fatty rats". *Arzneimittelforschung*; 40(4):436-40
- Tack CJ, Smits P** (2006). "Thiazolidinedione derivatives in type 2 diabetes mellitus". *Neth J Med.*; 64(6):166-74
- Tahara EB, Navarete FD, Kowaltowski AJ** (2009). "Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation". *Free Radic Biol Med* 46(9): 1283-97
- Toblli JE, Ferrini MG, Cao G, Vernet D, Angerosa M, Gonzalez-Cadavid NF** (2009). "Antifibrotic effects of pioglitazone on the kidney in a rat model of type 2 diabetes mellitus". *Nephrol Dial Transplant.*;24(8):2384-91

- Triplitt CL, et al** (2005). Diabetes Mellitus. In: DiPiro JT, et al., editors. "Pharmacotherapy: a pathophysiologic approach". 6<sup>th</sup> ed. New York City: McGraw-Hill Medical; p 1333-67
- Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR, for the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group** (1999). "Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: Progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49)". *JAMA.*; 281: 2005–2012
- Turturro F, Oliver R 3rd, Friday E, Nissim I, Welbourne T** (2007). "Troglitazone and pioglitazone interactions via PPAR-gamma-independent and -dependent pathways in regulating physiological responses in renal tubule-derived cell lines". *Am J Physiol Cell Physiol.*;292(3):C1137-46
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J** (2004). "Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence". *Mol Cell Biochem.*;266(1-2):37-56
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J** (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *Int J Biochem Cell Biol*, 39:44-84
- Valko M, Morris H, Cronin MT** (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress". *Curr Med Chem.*;12(10):1161-208
- Van Der Meer R and Tager JM** (1976). "A simple method for the perfusion of isolated liver cells". *FEBS Lett* 67: 36-40
- Van Schaftingen E and Gerin I** (2002). "The glucose-6-phosphatase system". *Biochem J* 362(Pt 3): 513-32
- Van Schaftingen E, Davies DR and Hers HG** (1981). "Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic AMP – dependent protein kinase". *Biochem Biophys Res Commun* 103(1):362-8
- Van Schaftingen E, Davies DR and Hers HG** (1982). "Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver". *Eur J Biochem* 124(1): 143-9
- Van Staa T, Abenhaim L, Monette J** (1997). "Rates of hypoglycemia in users of sulfonylureas". *J Clin Epidemiol* 50: 735-41
- Vandercammen A and Van Schaftingen E** (1990). "The mechanism by which rat liver glucokinase is inhibited by the regulatory protein". *Eur J Biochem* 191(2): 483-9
- Verma S, Bhanot S, Arikawa E, Yao L, McNeill JH** (1998). "Direct vasodepressor effects of pioglitazone in spontaneously hypertensive rats". *Pharmacology* 56(1):7-16
- Vestergaard P** (2009). "Bone metabolism in type 2 diabetes and role of thiazolidinediones". *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*;16(2):125-31
- Vogt C, Ardehali H, Iozzo P, Yki-Jarvinen H, Koval J, Maezono K, Pendergrass M, Printz R, Granner D, DeFronzo R, Mandarino L** (2000). "Regulation of hexokinase II expression in human skeletal muscle in vivo". *Metabolism* 49: 814-8
- Vogt T, Hafner C, Bross K, Bataille F, Jauch KW, Berand A, Landthaler M, Andreesen R, Reichle A** (2003). "Antiangiogenic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and metronomic trifluoromethylthymine in patients with advanced malignant vascular tumors". *Cancer*. 98(10):2251-6
- Votyakova TV, Reynolds IJ** (2001). "DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria". *J Neurochem* 79:266–277
- Wahli W** (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing". *Swiss Med Wkly.*;132(7-8):83-91
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR** (2004). "An increase in insulin sensitivity and basal beta-cell function in diabetic subjects treated with pioglitazone in a placebo-controlled randomized study". *Diabet Med.*; 21(6):568-76
- Walter L, Nogueira V, Leverve X, Heitz MP** (2000) *J Biol Chem*; 275 (38): 29521-7
- Wanders RJ, Groen AK, Meijer AJ and Tager JM** (1981). "Determination of the free-energy difference of the adenine nucleotide translocator reaction in rat-liver mitochondria using intraand extramitochondrial ATP-utilizing reactions". *FEBS Lett.*132:201-6
- Ward CW, Lawrence MC, Streltsov VA, Adams TE, McKern NM** (2007). "The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation". *Trends Biochem Sci.*;32(3):129-37
- Weiss H and Friedrich T** (1991). "Redox-linked proton translocation by NADH-ubiquinone reductase
- Weissgarten J, Berman S, Efrati S, Rapoport M, Averbukh Z, Feldman L** (2006). "Apoptosis and proliferation of cultured mesangial cells isolated from kidneys of rosiglitazone-treated pregnant diabetic rats". *Nephrol Dial Transplant.*;21(5):1198-204
- Whitehead JP, Clark SF, Urso B, James DE** (2000). "Signalling through the insulin receptor". *Curr Opin Cell Biol.*;12(2):222-8
- Wiernsperger NF** (2003). "Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy". *Diabetes Metab* 29(6): 579-85
- Wikstrom M** (2004). "Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump". *Biochim Biophys*

- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R and King H** (2004). "Global Prevalence of Diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030". *Diabetes Care* 27: 1047-1053
- Williams KV, Price JC, Kelley DE** (2001). "Interactions of impaired glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle insulin resistance. A dose-response assessment using positron emission tomography". *Diabetes* 50: 2069-79
- Wong AK, Howie J, Petrie JR, Lang CC** (2009). "AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease". *Clin Sci (Lond)*; 116(8):607-20
- Woods HF, Eggleston LV and Krebs HA** (1970). "The cause of hepatic accumulation of fructose 1-phosphate on fructose loading". *Biochem J* 119: 501-10
- Wright A, Burden AC, Paisey RB, Cull CA, Holman RR; U.K. Prospective Diabetes Study Group** (2002). "Sulfonylurea inadequacy: efficacy of addition of insulin over 6 years in patients with type 2 diabetes in the U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS 57)". *Diabetes Care*;25(2):330-6
- Yadav H, Jain S, Yadav M, Sinha PR, Prasad GB, Marotta F** (2009). "Epigenomic derangement of hepatic glucose metabolism by feeding of high fructose diet and its prevention by Rosiglitazone in rats". *Dig Liver Dis*; 41(7):500-8
- Yamagishi S, Eldestin D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M and Brownlee M** (2001). "Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase". *A J Biol Chem* 276: 25096-100
- Yang J, Zhang D, Li J, Zhang X, Fan F, Guan Y** (2009). "Role of PPARgamma in renoprotection in Type 2 diabetes: molecular mechanisms and therapeutic potential". *Clin Sci (Lond)*;116(1):17-26
- Young PW, Buckle DR, Cantello BCC, Chapman H, Clapham JC, Coyle PJ, Haigh D, Hindley RM, Holder JC, Kallender H, Latter AJ, Lawrie KWM, Mossakowska D, Murphy GJ, Roxbee Cox L and Smith SA** (1998). "Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisomal proliferator-activated receptor gamma". *J Pharmacol Exp Ther* 284: 751-759
- Yu K, Bayona W, Kallen C. B, Harding H. P, Ravera C. P, McMahon G, Brown M and Lazar M A** (1995). "Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids". *J. Biol. Chem* 270(41), 23975-23983
- Zeender E, Maedler K, Bosco D, Berney T, Donath MY, Halban PA** (2004). "Pioglitazone and sodium salicylate protect human beta-cells against apoptosis and impaired function induced by glucose and interleukin-1beta". *J Clin Endocrinol Metab*; 89(10):5059-66
- Zuurendonk PF, Tischler ME, Akerboom TP, Van Der Meer R, Williamson JR and Tager JM** (1979). "Rapid separation of particulate and soluble fractions from isolated cell preparations (digitonin and cell cavitation procedures)". *Methods Enzymol* 56: 207-23