

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y FARMACOLOGIA



VNiVERSiDAD
DE SALAMANCA

TESiS DOCTORAL

**CAPACIDAD DE LA SILIBININA DE
REVERTIR LAS ALTERACIONES
METABÓLICAS Y EL ESTRÉS OXIDATIVO
EN RATAS CON RESISTENCIA A LA
INSULINA INDUCIDA POR UNA
DIETA RICA EN FRUCTOSA**

DOCTORADO EUROPEO

Carlos Sánchez Martín

2011

VNiVERSiDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y FARMACOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**CAPACIDAD DE LA SILIBININA DE
REVERTIR LAS ALTERACIONES
METABÓLICAS Y EL ESTRÉS OXIDATIVO
EN RATAS CON RESISTENCIA A LA
INSULINA INDUCIDA POR UNA
DIETA RICA EN FRUCTOSA**

DOCTORADO EUROPEO

Memoria que presenta
D. Carlos Sánchez Martín
para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Salamanca

Salamanca, 18 de Mayo de 2011

Dña. María Jesús Monte Río, Directora del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, certifica que la presente Memoria, elaborada por **D. Carlos Sánchez Martín** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca y a la Mención de Doctorado Europeo, con el título: **“Capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo en ratas con resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa”**, ha sido realizada bajo la dirección de la **Dra. Dña. Gloria Rodríguez-Villanueva García** 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 dieciocho de Mayo de 2011.

Fdo.: Dña. María Jesús Monte Río

Dña. Gloria Rodríguez-Villanueva García, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca AUTORIZA la presentación de la Memoria realizada por **D. Carlos Sánchez Martín** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca y a la Mención de Doctorado Europeo, con el título: **“Capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo en ratas con resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa”**, 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 dieciocho de Mayo de 2011.

Fdo.: Dña. Gloria Rodríguez-Villanueva García

Este trabajo ha sido financiado con cargo a los siguiente proyectos

“Silibinina y Metabolismo Energético Hepático: Investigación de la capacidad de la silibinina de prevenir las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo en ratas con resistencia a la insulina inducida por dieta rica en fructosa”

Investigador Principal: M. Yehia El-Mir El Halak

Entidad Financiadora y Referencia: Universidad de Salamanca (Ref. USAL2005-B1-10)

Periodo: año 2006-2007

“La silibinina en el tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2: Capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo en ratas con resistencia a la insulina inducida por dieta rica en fructosa”. Papel de la proteína Kinasa activada por el AMP (AMPK)

Investigador Principal: M. Yehia El-Mir El Halak

Entidad Financiadora y Referencia: Conserjería de Sanidad, Junta de Castilla y León, Ref. SAN/673/SA12/08

Período: 2008-2009

Beca pre-doctoral

El doctorando ha disfrutado de una Beca de Formación de Personal Investigador para la realización de la Tesis Doctoral concedida por la Junta de Castilla y León en Junio de 2007 (Orden EDU/1878/2006).

Artículos científicos publicados como coautor

Detaille D, **Sánchez C**, Sanz N, López-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.

Algunos de los resultados incluidos en esta Memoria han sido presentados a los siguientes Congresos Nacionales e Internacionales:

44th Annual Meeting of “The European Association for the Study of Diabetes”, Roma, Italia (7-11 de Septiembre de 2008)

45th Annual Meeting of “The European Association for the Study of Diabetes”, Viena, Austria (29 de Septiembre-2 de Octubre de 2009)

XXXV Congreso de la “Asociación Española para el Estudio del Hígado”, Madrid, España (17-19 de Febrero de 2010)

46th Annual Meeting of “The European Association for the Study of Diabetes”, Estocolmo, Suecia (20-24 de Septiembre de 2010)

4th International Congress on “Prediabetes and the Metabolic Syndrome”, Madrid, España (6-9 de Abril de 2011).

Algunos de los resultados incluidos en esta Memoria han sido presentados en Revistas Científicas

Diabetologia (2008) volume 51, supplement 1, S374

Diabetologia (2009) volume 52, supplement 1, S318

Gastroenterología y Hepatología (2010) Volumen 33, Especial Congreso 1: 171

Diabetologia (2010) volume 53, supplement 1, S356-S357.

Journal of Diabetes (2011) Vol. 3, Supp 1: 280

ABREVIATURAS

AAT	alanina aminotransferasa
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazol sulfonato]
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosina-5'-difosfato
AGE	productos finales de glicosilación avanzada
ALX	aloxano
AMP	adenosina-5'-monofosfato
AMPc	adenosina-5'-monofosfato cíclico
AMPK	proteína quinasa dependiente de AMP
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosina-5'-trifosfato
ATPasa	ATP sintasa
BSA	seroalbúmina bovina
°C	grados centígrados
C	carbono
Ca ²⁺	cación de calcio
CaCl ₂	cloruro cálcico
CAT	catalasa
CCCP	carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
CDK	quinasas dependientes de ciclinas
α-CG	α-cetoglutarato
ChREBP	proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono
Cl ⁻	anión cloruro
cm	centímetro
C _{max}	concentración máxima plasmática
CO ₂	dióxido de carbono
CoA	coenzima A
CoQ	coenzima Q
CoQH ₂	coenzima Q reducida
Cols.	colaboradores
CRC	capacidad de retención de calcio
CS	citrato sintasa
CT	colesterol total
CYP	citocromo P450
DCIP	dicloroindofenol
DHA	dihidroxiacetona
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
dl	decilitro
DM	diabetes mellitus
DM 1	diabetes mellitus tipo 1
DM 2	diabetes mellitus tipo 2
DMG	diabetes mellitus gestacional
DMID	diabetes mellitus insulino dependiente
DMNID	diabetes mellitus no insulino dependiente
DNP	dinitrofenol
DNTB	ácido dinitrotiobenzoico
1,3-DPG	1,3-bisfosfoglicerato

dpm	desintegraciones por minuto
DPP-IV	enzima dipeptidil peptidasa
e ⁻	electrón
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
EEM	error estándar de la media
EGTA	ácido etilenglicoltetracético
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAD ⁺	flavina adenina dinucleótido oxidado
FADH ₂	flavina adenina dinucleótido reducido
FMN	flavinmononucleótido
F1,6bPasa	fructosa 1,6-bisfosfatasa
F2,6bPasa	fructosa 2,6-bisfosfatasa
F1,6bP	fructosa 1,6-bisfosfato
F2,6bP	fructosa 2,6-bisfosfato
F1P	fructosa 1-fosfato
F6P	fructosa 6-fosfato
G (g)	gramos
g	fuerza g
GAP	gliceraldehído 3-fosfato
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GDP	guanidina-5'-difosfato
GIP	polipéptido inhibidor gástrico
GK	glucoquinasa
GKRP	proteína reguladora de la glucoquinasa
GLP-1	péptido-1 similar al glucagón
GLUT	proteína transportadora de glucosa
GlyK	glicerol quinasa
GM	glutamato/malato
GP	glucógeno fosforilasa
G3P	glicerol 3-fosfato
G3PDH	glicerol 3-fosfato deshidrogenasa
G1P	glucosa 1-fosfato
G6P	glucosa 6-fosfato
G6Pasa	glucosa 6-fosfatasa
G6PDH	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GS	glucógeno sintasa
GSH	glutación
GSM	glutamato/succinato/malato
GSSG	glutación oxidado
GTP	guanidina-5'-trifosfato
h	horas
H ⁺	protón
H ₂ O	agua
H ₂ O ₂	peróxido de hidrógeno
HbA1C	hemoglobina glicosilada
HCl	ácido clorhídrico
HDL	lipoproteína de alta densidad
HOMA	Homeostasis Model Assessment

HK	hexoquinasa
HRP	peroxidasa de rábano picante
IKK β	proteína quinasa I κ B
i.p.	intraperitoneal
IR	receptor de insulina
IRS-1	proteína sustrato 1 del receptor de la insulina
IRS-2	proteína sustrato 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	consumo de oxígeno
K ⁺	cación potasio
KCl	cloruro de potasio
KCN	cianuro potásico
KDa	kiloDalton
Kg	kilogramo
K ₂ HPO ₄	fosfato dipotásico
KH ₂ PO ₄	fosfato monopotásico
K _i	constante de inhibición
K _m	constante de afinidad
KOH	hidróxido potásico
L (l)	litro
LA	ácido lipoico
LDH	lactato deshidrogenasa
LDL	lipoproteína de baja densidad
L+P	lactato+piruvato
LTB ₄	leucotrieno B ₄
M	molar
MDA	malonaldehído
MDR	resistencia a los fármacos
Mg ²⁺	magnesio
mg	miligramos
MgCl ₂	cloruro de magnesio
MgSO ₄	sulfato de magnesio
MHC I	complejo mayor de histocompatibilidad
min	minuto
mM	milimolar
mm	milímetro
MOPS	ácido 3 (N-morfolino)-propano sulfónico
MRP1	proteína 1 asociada a la resistencia a los fármacos
m/v	relación masa/volumen
n	tamaño de la muestra
Na ⁺	cación sodio
NaCl	cloruro sódico
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NaF	fluoruro sódico
NaHCO ₃	bicarbonato sódico

NaOH	hidróxido sódico
NEM	N-etilmaleimida
NF-κB	factor nuclear κB
ng	nanogramos
NH ₄ ⁺	ión amonio
(NH ₄) ₂ SO ₄	sulfato de amonio
nm	nanómetros
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
O ₂	oxígeno
O ₂ ⁻	anión superóxido
¹ O ₂	oxígeno singlete
OAA	oxalacetato
OH ⁻	radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	anión peroxinitrito
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OPA	o-ftaldialdehído
PC	piruvato carboxilasa
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPCK	fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PFK-1	fosfofructoquinasa-1
PFK-2	fosfofructoquinasa-2
3-PG	3-fosfoglicerato
PG	prostaglandinas
PGI	fosfoglucoisomerasa
PGK	3-fosfoglicerato quinasa
PGM	fosfoglicerato mutasa
PgP	glucoproteína P
Pi	fosfato inorgánico
PI3,4,5TP	fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PI3K	protein 3-quinasa de fosfatidilinositol
PIR	piruvato
PK	piruvato quinasa
PKA	proteína quinasa A
P/O	rendimiento de la fosforilación oxidativa (ATP/O)
PPARs	receptores nucleares activados por proliferadores de peroxisomas
PS	peso seco
PTP	poro de transición de la permeabilidad mitocondrial
p/v	relación peso/volumen
RCN	especies reactivas de cloro
RCR	ratio de control respiratorio
RET	flujo reverso de electrones
RNS	especies reactivas de nitrógeno
ROS	especies reactivas de oxígeno
s	segundos
SB	silibinina
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SM	succinato/malato

SOD	superóxido dismutasa
SREBP-1c	isoforma 1c de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides
STZ	streptozotocina
t	tiempo
TG	triglicéridos
TGF- β 1	factor de crecimiento transformante β 1
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TMPD-a	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina-ascorbato
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
TPI	triosa fosfato isomerasa
TRA-HCl	trietanolamonio clorhidrato
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trx	tiorredoxina
TZDs	tiazolidindionas o glitazonas
UI	unidad internacional
VDAC	Voltage-Dependant Anion Channel
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad
V_{max}	velocidad máxima
XO	xantina oxidasa
ZDF	ratas Zucker diabéticas obesas o <i>Zucker diabetic fatty rats</i>
ZFR	ratas Zucker obesas o <i>Zucker fatty rats</i>
$\Delta\Psi$	diferencia de potencial entre una y otra parte de la membrana mitocondrial interna
ΔpH	diferencia de pH entre una y otra parte de la membrana mitocondrial interna
Δp	fuerza protón motriz (gradiente electroquímico de protones)
λ	longitud de onda
μCi	microcurios
μg	microgramos
μl	microlitros
μm	micras
μM	micromolar
μU	microunidades
®	marca registrada

OBJETIVO

Nuestro grupo, en el marco de su línea de investigación, estudia el metabolismo energético y oxidativo hepático así como su influencia por distintas sustancias con propiedades antidiabéticas y antioxidantes como la silibinina, la metformina, las glitazonas, el resveratrol o la carbenoxolona (Detaille et al, 2008) . Realizamos este estudio mediante diversas técnicas, entre las cuales destaca la técnica de perfusión de células, que fue inventada inicialmente por los doctores Van der Meer y Tager de la Universidad de Ámsterdam en 1976 (Van Der Meer y Tager, 1976) y modificada posteriormente por Groen y Tager en 1983 (Groen et al, 1983). Precisamente, para llevar a cabo el estudio de la capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones metabólicas causadas por la resistencia a la insulina, 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 (Guigas et al, 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 (Argaud et al, 1991; Leverve et al, 1985; Leverve et al, 1986; Leverve et al, 1987).

De origen vegetal, la silimarina es un extracto de *Silybum marianum* (Cardo mariano) formada por una mezcla de flavonoides, con importantes propiedades hepatoprotectoras y antioxidantes, conocidas desde hace más de 30 años (Abenavoli et al, 2010). La silimarina fue introducida como fármaco hepatoprotector en España en 1975 bajo el nombre comercial de Legalon[®] y actualmente sigue siendo comercializada en todo el mundo para el tratamiento de diferentes enfermedades hepáticas (El-Kamary et al, 2009; Federico et al, 2006; Luper, 1998; Medina y Moreno-Otero, 2005; Pares et al, 1998). Está formada por varios isómeros que son: silibinina, isosilibinina, silicristina y silidianina; de los cuales el isómero más activo es la silibinina o silibina (SB).

En algunos estudios recientes la SB ha mostrado importantes propiedades antihiper glucemiantes y sensibilizadoras a la acción de la insulina (Federico et al, 2006; Guigas et al, 2007; Lirussi et al, 2002; McCarty, 2005; Velussi et al, 1997) por lo que, podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, dado que la eficacia de la SB frente a la resistencia a la insulina no ha sido prácticamente estudiada en ningún modelo animal de diabetes mellitus tipo 2, se consideró importante investigar la capacidad *in vivo* de la SB de revertir, total o parcialmente, las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo, asociados a la resistencia a la insulina, en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa. Asimismo, también se consideró importante confirmar que algunos efectos de la SB, especialmente los metabólicos, se repiten en otros modelos experimentales de diabetes mellitus tipo 2, como es el caso del modelo genético de las ratas Zucker diabéticas obesas (ZDF).

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

1. Determinar diferentes parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, perfil lipídico, urea, creatinina, iones) en la sangre de los distintos grupos experimentales tanto en el modelo de la dieta rica en fructosa como en las ratas ZDF, tratadas o no con silibinina.

2. Investigar la capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones metabólicas en hepatocitos de rata en perfusión en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa. Para ello habrá que cumplir los siguientes objetivos parciales:

2.1. Investigar el efecto de la silibinina sobre las alteraciones del metabolismo hepático: la glucólisis y la gluconeogénesis.

2.2. En caso de encontrar un efecto de la silibinina a este nivel, investigar su lugar de acción.

3. Confirmar la capacidad de reversión de la silibinina sobre las alteraciones del metabolismo hepático en el modelo genético de las ratas ZDF.

4. Investigar la capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones del metabolismo hepático del glucógeno en hepatocitos de rata en perfusión en un modelo de dieta rica en fructosa.

5. Investigar la capacidad de la silibinina de revertir, total o parcialmente, el estrés oxidativo en la resistencia inducida por una dieta rica en fructosa.

6. Investigar la capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones sobre la función mitocondrial en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa:

6.1. Investigar los efectos de la silibinina sobre la respiración celular en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa.

6.2. Investigar los efectos de la silibinina sobre el rendimiento de la fosforilación oxidativa en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa.

6.3. Investigar los efectos de la silibinina sobre la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa.

6.4. Investigar los efectos de la silibinina sobre la actividad de los complejos respiratorios I, II y III en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa.

7. Investigar la modulación que ejerce la silibinina sobre la apertura del poro de transición mitocondrial (PTP) en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa.

iNTRoDVCCiÓN

EL HÍGADO

1. Anatomía fisiológica del hígado (Gartner y Hiatt, 2003; Guyton y Hall, 2006)

El hígado es el órgano más voluminoso del organismo y representa el 2% del peso corporal total, es decir, alrededor de 1,5 kg para un adulto tipo. Se caracteriza por un doble aporte sanguíneo: la arteria hepática le 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 éste 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 centrolobulillares que convergen para formar la vena suprahepática (Figura 1).

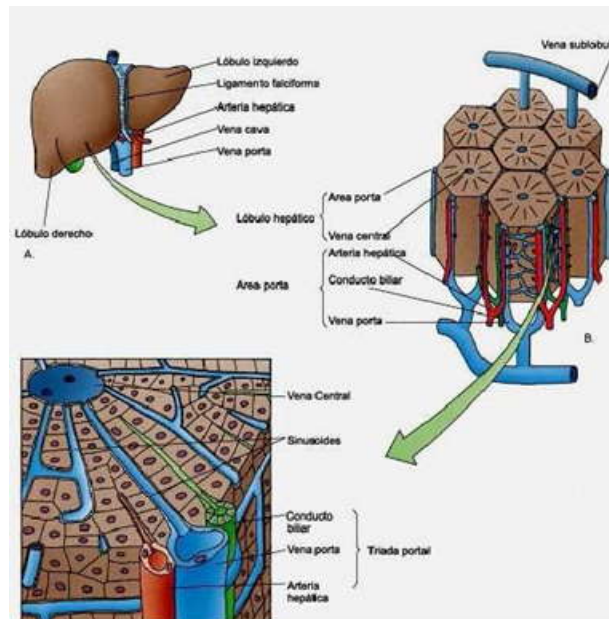


Figura 1. Esquema del hígado. A, Anatomía microscópica del hígado; B, lobulillos hepáticos en los que se observan las áreas portales y la vena central y, porción del lobulillo hepático en la que se observa el área portal, las placas hepáticas, los sinusoides y los canaliculos biliares.

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 invaginación de sus propias membranas plasmáticas, lo que constituye el canaliculo biliar, en el cual se forma la bilis primaria y se vierte al conducto biliar.

2. Las células hepáticas

2.1. Hepatocitos

Los hepatocitos o células parenquimales hepáticas son las unidades funcionales principales del hígado. Son células poliédricas de 20 a 30 μm de diámetro. Están muy unidas entre sí para formar placas de células hepáticas, de una a dos células de espesor. Representan alrededor del 65% de las células hepáticas y ocupan casi el 80% del volumen parenquimal. Manifiestan variaciones en sus propiedades, según su localización dentro de los lobulillos hepáticos. Se caracterizan por presentar una membrana celular con una polaridad muy marcada, de tal forma que en ellas se distinguen regiones con 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, fundamentalmente, por una baja actividad metabólica. Aparte de los fibroblastos y las células ducturales, las células sinusoidales ocupan el mayor volumen de las células hepáticas no parenquimales. Las células sinusoidales se pueden clasificar en: células endoteliales, células de Kupffer, células de Ito y células "Pit".

3. Funciones del hígado (Guyton A. y Hall J., 2006)

Las funciones básicas del hígado son:

- 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 y la protrombina.

A continuación, vamos a resumir brevemente el papel del hígado en el metabolismo lipídico y proteico para desarrollar, posteriormente, de forma detallada la función del hígado en la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, dada su relación con los objetivos planteados en este trabajo.

3.1. Metabolismo de los lípidos

Aunque casi todas las células del organismo metabolizan los lípidos algunos aspectos de este metabolismo solamente tienen lugar en el hígado. Las funciones concretas del hígado en el metabolismo de los lípidos son:

- β -oxidación de los ácidos grasos para aportar energía a otros tejidos corporales como el músculo esquelético y el corazón.
- Síntesis de la mayor parte de las lipoproteínas.
- Síntesis de colesterol y fosfolípidos.
- Síntesis de grasas a partir de proteínas y de hidratos de carbono.

De todas estas funciones, quizá la más importante sea la β -oxidación de los ácidos grasos, ya que el ATP formado durante este proceso servirá, en gran parte, para la síntesis de glucosa.

3.2. Metabolismo de las proteínas

El organismo no puede prescindir de los servicios del hígado en el metabolismo proteico más allá de unos días, sin consecuencias mortales, al contrario de lo que ocurre en el caso del metabolismo lipídico y glucídico. Las funciones principales del hígado en el metabolismo de las proteínas 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 de síntesis de otros compuestos a partir de los aminoácidos.

3.3. Metabolismo de los hidratos de carbono

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

- Almacenamiento de grandes cantidades de glucógeno.
- Conversión de la galactosa y de la 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. A través de la digestión, se convierten en monosacáridos, los cuales, en su mayor parte, llegan al hígado para ser metabolizados. A pesar de que todas las células son capaces de metabolizar los glúcidos, el hígado es el órgano regulador de la homeostasis de la glucosa. Las principales vías implicadas en el metabolismo hepático de la glucosa son la glucólisis y la gluconeogénesis.

4.1. Concepto de estado estacionario

Los seres vivos son capaces de mantener su composición interna relativamente constante, a pesar del intercambio continuo de nutrientes y energía con el medio ambiente. Para ilustrar el concepto de estado estacionario, se considera una vía metabólica simple que convierte un substrato A en un producto E (**figura 2**). En el estado estacionario (o estado metabólicamente estable), 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 tanto, las concentraciones de todos los intermediarios de dicha vía son también constantes, ya que se forman y destruyen a la misma velocidad.



Figura 2. Esquema de una vía metabólica simple

En el estado estacionario, la velocidad de formación de B por la primera reacción (ϵ_1) es igual a la velocidad de su consumo por la segunda reacción (ϵ_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 substrato, del producto y de los intermediarios de la vía son constantes.

4.2. Metabolismo hepático

El hígado es el principal órgano regulador de la homeostasis glucídica, de tal forma que puede liberar la glucosa a la circulación sanguínea o bien captarla y almacenarla. Este equilibrio entre uso y síntesis de glucosa está controlado sutilmente por una serie de factores, entre los que destacan: las concentraciones de substratos y productos de las distintas vías metabólicas, así como el medio hormonal y nutricional del organismo (**Hue, 2001**).

En el período postprandial, el hígado almacena la glucosa en forma de glucógeno, lo que requiere su conversión previa en compuestos de 3 carbonos (lactato,

piruvato,...) (Katz y McGarry, 1984; Newgard et al, 1984; Radziuk y Pye, 2001). Puede también, eventualmente, convertir la glucosa en ácidos grasos por la vía de la lipogénesis *de novo* (Hellerstein et al, 1996). En el período de ayuno, el hígado produce glucosa para mantener la glucemia y su almacenamiento en los tejidos extrahepáticos, especialmente, en aquéllos que usan la glucosa como único sustrato oxidativo (glóbulos rojos, retina,...). La glucosa liberada por el hígado durante este período puede proceder del glucógeno, tras su degradación por la glucogenólisis, y de algunos precursores no glucídicos, que participan en la síntesis *de novo* de la glucosa.

La glucólisis tiene lugar en el citosol de todas las células vivas, mientras que la gluconeogénesis ocurre, 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 la presencia de la enzima glucosa 6-fosfatasa en el intestino delgado, lo cual podría convertir a éste en un tercer sitio gluconeogénico (Croset et al, 2001). Como las reservas de glucógeno hepático son limitadas (alrededor de 75 g en el hombre sano) (Cahill, Jr., 1970), la contribución relativa de la gluconeogénesis a la producción hepática de glucosa aumenta durante el ayuno (Hellerstein et al, 1997). En condiciones fisiológicas normales, el hígado contribuye al flujo gluconeogénico total en mayor proporción que la corteza renal (Gerich, 2001). También se han encontrado pequeñas actividades de glucosa 6-fosfatasa en las células β -pancreáticas (Khan et al, 1995), músculo esquelético (Gamberucci et al, 1996) y astrocitos (Forsyth et al, 1993), aunque probablemente carezcan de significado fisiológico.

Al contrario de la glucólisis, que genera entre dos y tres 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 procede de la oxidación hepática de los ácidos grasos por medio de la β -oxidación.

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

Las vías de la glucólisis y de la gluconeogénesis constituyen redes enzimáticas complejas (figura 3) que no pueden ser dissociadas ya que comparten reacciones 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 la resultante de los flujos a través de las etapas claves de la vía glucolítica o gluconeogénica no es nula. La existencia de ciclos metabólicos constituye un sistema, gracias al cual, la velocidad y la dirección de

los flujos pueden modularse por variaciones sutiles de la concentración de los distintos efectores de una o varias enzimas del ciclo y por modificaciones covalentes de éstas. Este sistema de regulación particular tiene, sin embargo, un coste energético, consecuencia del mantenimiento de una elevada velocidad de reciclaje a través de estos bucles metabólicos.

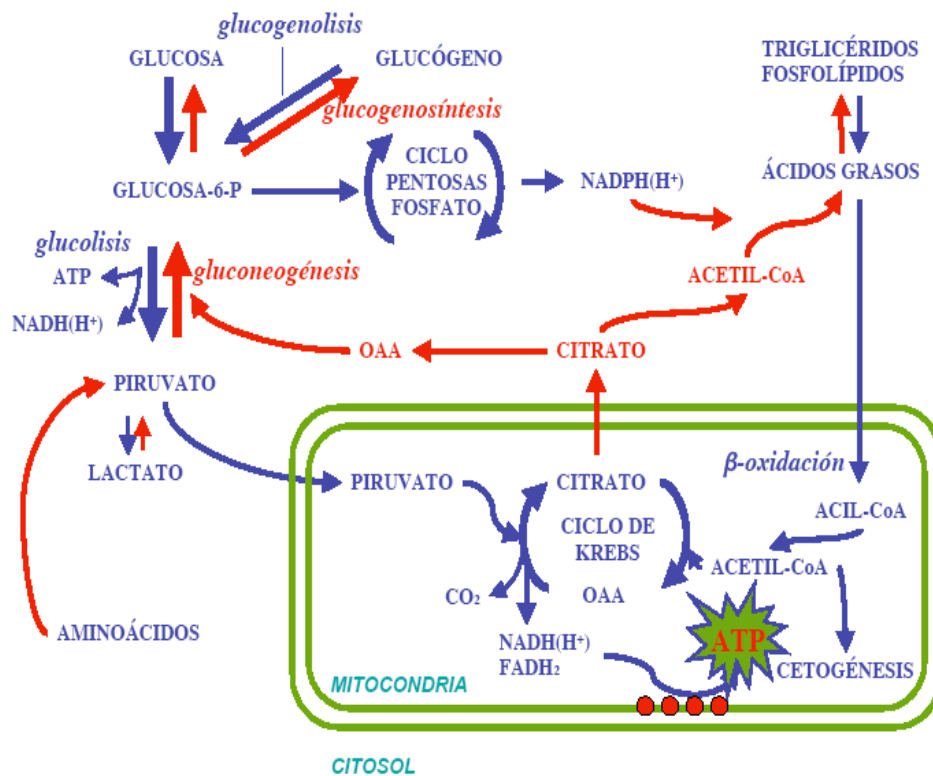


Figura 3. Integración del metabolismo global en la célula

ATP: adenosina-5'-trifosfato; CoA: coenzima A; CO₂: dióxido de carbono; FADH₂: flavina adenina dinucleótido reducido; Glucosa-6P: glucosa-6-fosfato; NADH(H⁺): nicotinamida adenina dinucleótido reducido; NADPH(H⁺): nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; OAA: oxalacetato.

Se localizan tres bucles metabólicos en la vía de la glucólisis/gluconeogénesis: el ciclo glucosa 6-fosfato (G6P) – glucosa o “Ciclo de las glucosas”; el ciclo fructosa 6-fosfato (F6P) – fructosa 1,6-bisfosfato (F1,6bP) o “Ciclo de las fructosas” y el Ciclo fosfoenolpiruvato (PEP) – piruvato (Figura 4).

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

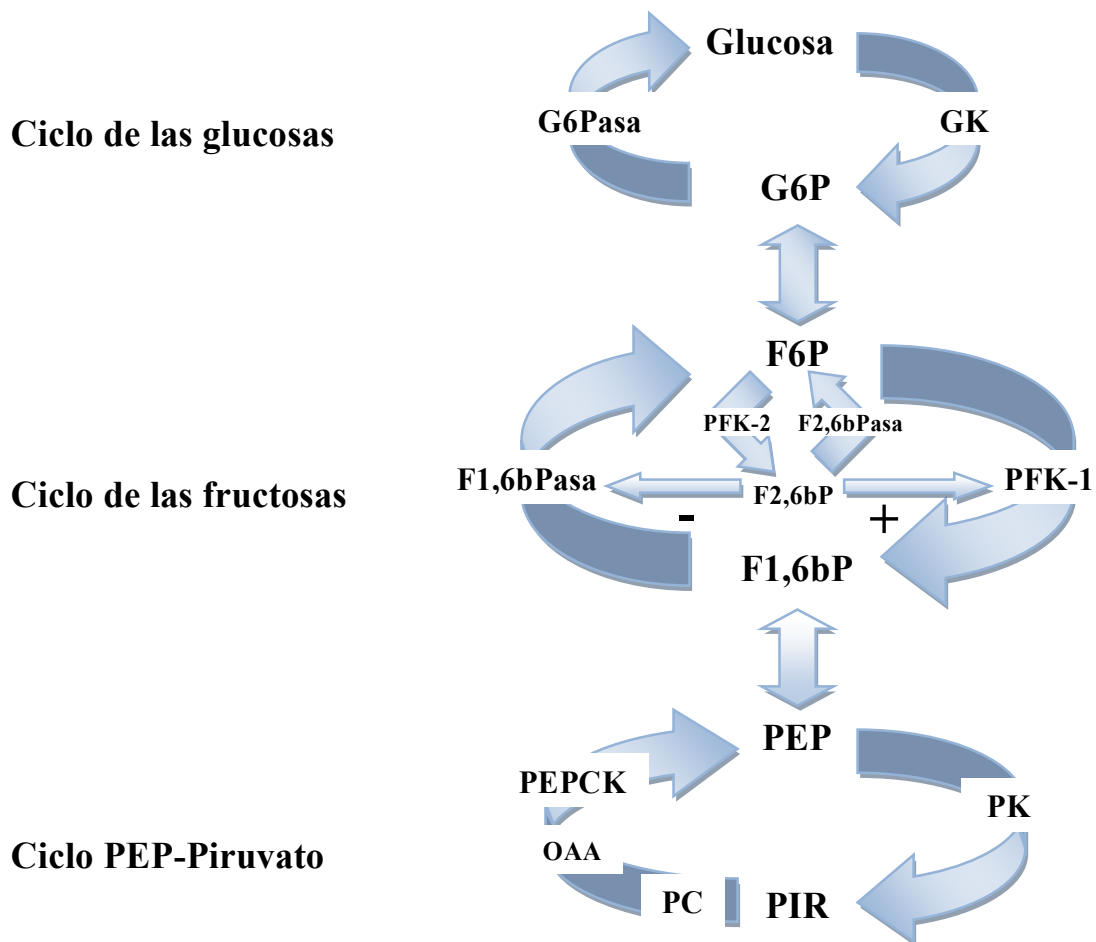


Figura 4. Ciclos metabólicos de la vía glucolítica y gluconeogénica

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

Para aumentar aún más la complejidad de la vía glucólisis/gluconeogénesis, cabe destacar que algunos intermediarios son comunes con otras vías metabólicas y algunas de las enzimas claves se localizan en compartimentos intracelulares distintos del citosol (retículo endoplásmico, núcleo, mitocondria), lo que les confiere propiedades y regulaciones muy particulares.

Por último, en el hígado, la distribución cuantitativa de las enzimas de las dos vías varía según la localización de los hepatocitos a lo largo del eje vascular hepático. De hecho, las enzimas gluconeogénicas prevalecen en la región periportal mientras que las enzimas glucolíticas predominan en las zonas perivenosas (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 constituye un bucle metabólico exclusivo de la vía glucólisis/gluconeogénesis, ya que la G6P se sitúa en el cruce de otras vías metabólicas importantes, principalmente la vía de la glucogenólisis/glucoogénesis y la vía de las pentosas fosfato (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 otras reacciones que lo usan o lo producen.

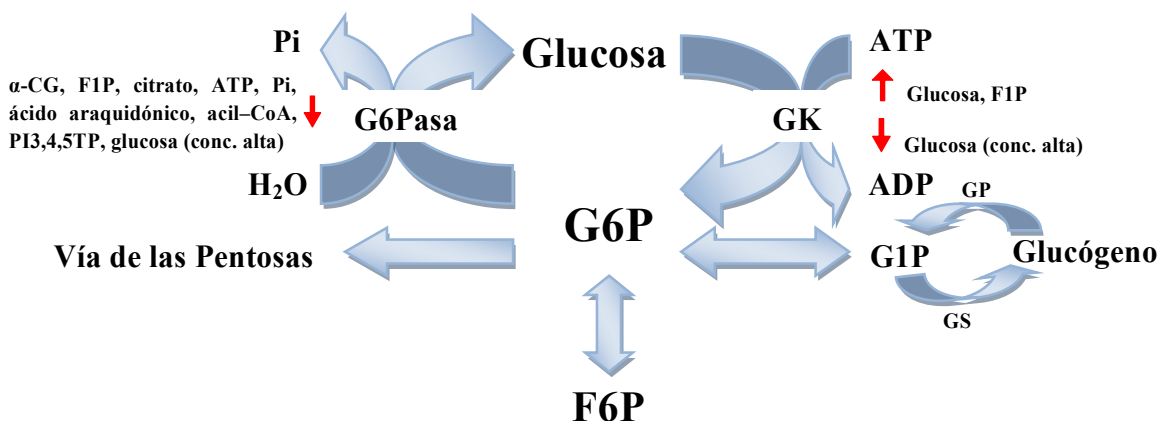


Figura 5. El cruce de la glucosa 6-fosfato y los principales efectores del ciclo de las “glucosas”.

ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; 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; H₂O: agua; Pi: fosfato inorgánico; PI3,4,5TP: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. ↑ indica activación de la enzima mientras que ↓ indica inhibición de la misma.

Limitaremos nuestra atención a la vía de la glucólisis/gluconeogénesis 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 es una proteína monomérica de 55 kDa que constituye la primera enzima de la glucólisis. De la familia de las hexoquinasas (hexoquinasa VI), esta enzima cataliza la fosforilación de la glucosa en 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) (Bouche et al, 2004; Iynedjian, 2009).

La expresión de la GK hepática está regulada de manera diferencial, de modo que la insulina estimula su expresión mientras que el AMPc la inhibe (Bedoya et al, 1986). El control de la actividad de la GK es llevado a cabo por una proteína reguladora de 64

kDa denominada GKR (glucokinase regulatory protein) y localizada principalmente en el núcleo de los hepatocitos, donde se une de manera reversible a la enzima (Foufelle y Ferre, 2002). En presencia de bajas concentraciones de glucosa, la afinidad de la GKR por la GK es alta y su unión provoca la inactivación de ésta. Pero un aumento de la concentración de la glucosa provoca una activación de la GK al disminuir la afinidad de la GKR por la enzima lo cual permite la translocación de la GK hacia el citosol, donde su fracción libre puede fosforilar a la glucosa (Agius, 2008).

Glucosa 6-fosfatasa

La glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) es una enzima clave para el control del metabolismo glucídico por su posición estratégica en la etapa terminal de la vía glucogenolítica y gluconeogénica. La G6Pasa parece poseer múltiples actividades pero cataliza principalmente la reacción de hidrólisis de G6P en glucosa y Pi (Foster y Nordlie, 2002). La G6Pasa es una enzima polipeptídica altamente hidrófoba de 80 kDa y que posee una subunidad catalítica de 35 kDa. Se localiza exclusivamente en la cara luminal del retículo endoplásmico (Hutton y O'Brien, 2009; Van Schaftingen y Gerin, 2002), lo cual exige la presencia de la glucosa-6-fosfatasa translocasa, cuya función principal es transportar la G6P desde el citoplasma hacia el lumen del retículo endoplásmico (Bouche et al, 2004).

Actualmente, debido a su K_m (2-3 mM) es superior a la concentración intracelular de G6P (0,05-1 mM), se admite que la actividad fisiológica de la G6Pasa es controlada por la disponibilidad de sustrato. Pero cada vez hay más evidencias que muestran una regulación *in vivo* probablemente más compleja. De hecho, Newgard y colaboradores propusieron una regulación postranscripcional de la enzima (Newgard et al, 1984). Esta hipótesis fue confirmada posteriormente cuando se observó una inhibición aguda de la G6Pasa en ratas en ayunas realimentadas (Minassian et al, 1995). Sin embargo, muchos de los mecanismos de acción son, aún hoy, una incógnita.

Los trabajos realizados *in vitro* en microsomas aislados mostraron que la enzima puede ser inhibida por distintos metabolitos como el α -cetoglutarato (Mithieux et al, 1990), la F1P (Robbins et al, 1991), el citrato (Nordlie, 1976), el ácido araquidónico (Mithieux et al, 1993) o algunos ésteres de acil CoA con cadenas superiores a 10 átomos de carbono (Mithieux y Zitoun, 1996). La insulina podría ejercer un efecto inhibitorio (Gardner et al, 1993) por medio del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PI3,4,5TP) (Mithieux et al, 1998), mientras que el glucagón podría activarla (Striffler et al, 1984). También se ha visto que la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), enzima clave en el metabolismo hepático, podría tener una acción inhibitoria sobre la expresión y la actividad de la G6Pasa (Vincent et al, 1991). Por último, el ATP y el Pi inhiben la G6Pasa (Nordlie, 1976) así como la glucosa, a pesar de tener una K_i (50-200 mM) para su producto muy superior a las concentraciones fisiológicas (Arion et al, 1972).

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

La fructosa 1,6-bisfosfatasa (F1,6bPasa) y la fosfofructoquinasa-1 (PFK-1) componen el ciclo de las “fructosas”. Hoy se admite que la regulación de este ciclo está garantizada por una enzima bifuncional (fructosa 2,6-bisfosfatasa y fosfofructoquinasa-2), cuya particularidad reside en su capacidad para catalizar dos reacciones opuestas que permiten controlar la concentración de la fructosa 2,6-bisfosfato (F2,6bP), un efector alostérico de las dos enzimas: F1,6bPasa y PFK-1 (Figura 6).

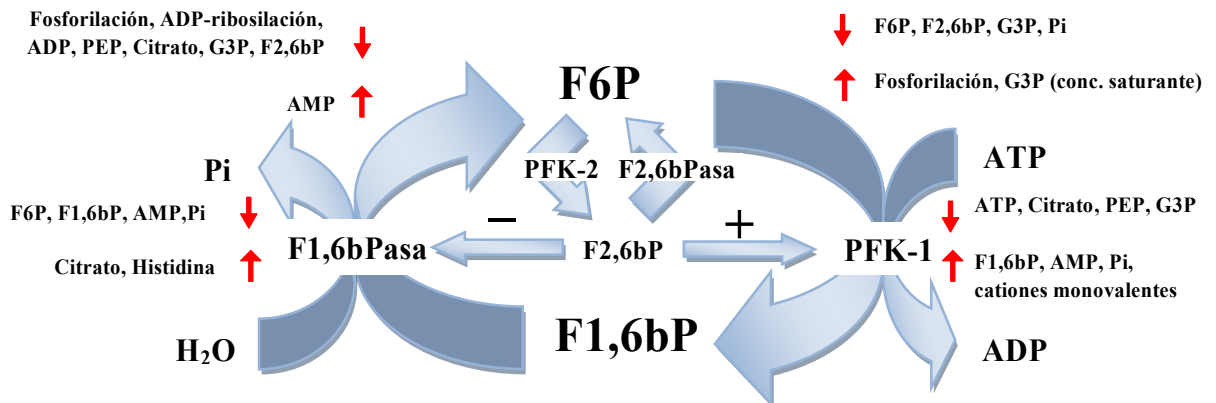


Figura 6. El ciclo de las “fructosas” y los principales efectores

ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; F1,6bPasa: fructosa 1,6-bisfosfatasa; F2,6bPasa: fructosa 2,6-bisfosfatasa; F6P: fructosa 6-fosfato; F1,6bP: fructosa 1,6-bisfosfato; F2,6bP: fructosa 2,6-bisfosfato; G3P: glicerol 3-fosfato; H₂O: agua; PFK-1: fosfofructoquinasa-1; PFK-2: fosfofructoquinasa-2; PEP: fosfoenolpiruvato; Pi: fosfato inorgánico. ↑ indica activación de la enzima mientras que ↓ indica inhibición de la misma.

Fosfofructoquinasa-1

La fosfofructoquinasa de tipo 1 (PFK-1) es una proteína tetramérica de 340 kDa que constituye una de las enzimas clave de la glucólisis ya que cataliza la fosforilación de 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 μM para la F6P.

Puede ser regulada de manera alostérica por varios efectores. La enzima es inhibida principalmente por el ATP, pero también por el citrato, el PEP y el G3P, mientras que sus efectores positivos son la F2,6bP, el AMP y el Pi, actuando estos últimos de manera sinérgica con el sustrato de la reacción, la F6P (Hue, 1981). Los cationes monovalentes como el potasio (K⁺) o el amonio (NH⁴⁺) activan la enzima y disminuyen la inhibición alostérica inducida por el ATP (Otto et al, 1976).

Fructosa 1,6-bisfosfatasa

La fructosa 1,6-bisfosfatasa hepática (F1,6bPasa) es una enzima tetramérica de 140 kDa y que presenta una localización intracelular perinuclear (Yanez et al, 2003). Esta enzima clave de la gluconeogénesis cataliza la conversión irreversible de F1,6bP en F6P y Pi. Presenta una cinética michaeliana con una K_m próxima a 5 μ M para su sustrato.

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 manera sinérgica para reforzar su acción sobre la enzima. Sus productos, así como su sustrato, inhiben también la enzima pero este último solamente a concentraciones suprafiológicas (Hue, 1981). Los raros activadores identificados de la F1,6bPasa son el citrato y la histidina.

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

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

Esta enzima dimerica de 110 kDa puede ser fosforilada en el residuo serina por la proteína quinasa A o dependiente de AMPc (PKA), lo cual afecta a la actividad de sus dos dominios catalíticos: quinasa y bisfosfatasa. Esta fosforilación induce una inhibición de la PFK-2 acompañada de una activación de la F2,6bPasa. Esta doble acción provoca una disminución de la concentración de la F2,6bP. Este efector alostérico actúa luego como un potente activador de la PFK-1 y un inhibidor de la F1,6bPasa (Rider et al, 2004). La enzima bifuncional puede ser también regulada por ADP-ribosilación en el residuo arginina, lo que impide su fosforilación por acción de la proteína quinasa A y disminuye 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, el ADP y la F2,6bP, así como por el citrato, el PEP y el G3P y activada por el AMP (Van Schaftingen E. et al, 1981). Por otra parte, la F2,6bPasa es inhibida por el producto (F6P) y el sustrato (F2,6bP) de la reacción que cataliza (Van Schaftingen E. et al, 1982), además de por el fosfato inorgánico y el G3P, aunque estos dos últimos efectores inhiben a concentración fisiológica y activan a concentración saturante (Stewart et al, 1985).

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

El ciclo PEP-Piruvato no se limita a la vía de la glucólisis/gluconeogénesis. En concreto, el piruvato además de su carboxilación en oxalacetato por la piruvato carboxilasa (PC), también puede sufrir una descarboxilación oxidativa en acetil CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH), puede ser transaminado a alanina por acción de

la alanina aminotransferasa (AAT) o puede ser reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en función del potencial redox celular.

El ciclo PEP-Piruvato se puede reducir a tres reacciones distintas (**Figura 7**): la formación de piruvato es catalizada por la piruvato quinasa (PK), mientras que la producción de PEP comprende dos reacciones, catalizadas por la piruvato carboxilasa (PC) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). Sin embargo, este ciclo metabólico cuya una de sus particularidades reside en su compartimentación (en la rata, la PK y la PEPCK son citosólicas mientras que la PC es exclusivamente mitocondrial), va a depender de los transportadores de piruvato y de malato.

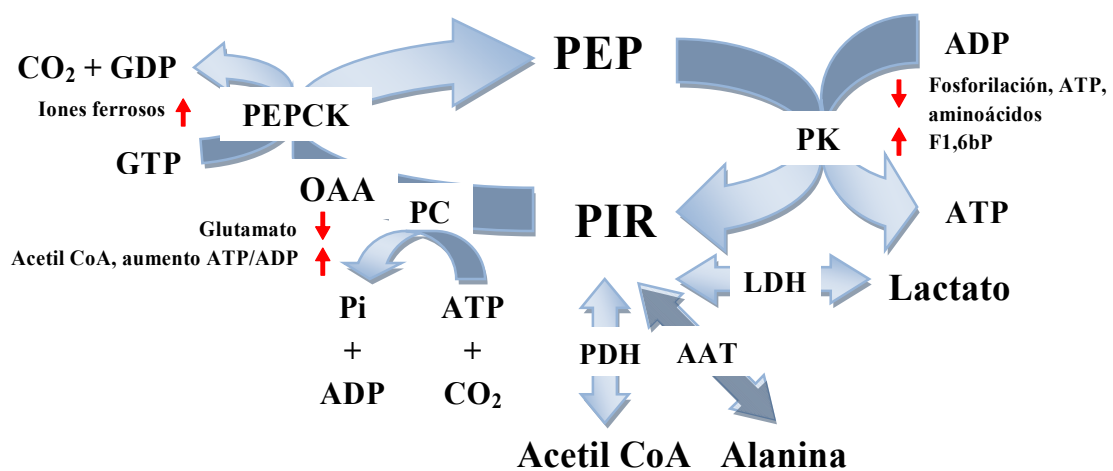


Figura 7. El ciclo PEP-Piruvato y los principales efectores enzimáticos.

AAT: alanina aminotransferasa; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; CO₂: monóxido de carbono; F1,6bP: fructosa 1,6-bisfosfato; GTP: guanosina trifosfato; GDP: guanosina difosfato; LDH: lactato deshidrogenasa; OAA: oxalacetato; PC: piruvato carboxilasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; PEP: fosfoenolpiruvato; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; Pi: fosfato inorgánico; PIR: piruvato; PK: piruvato quinasa. ↑ indica activación de la enzima mientras que ↓ indica inhibición de la misma.

Piruvato quinasa

La L-Piruvato quinasa es la isoforma hepática de la última enzima de la glucólisis y desempeña, por tanto, un papel muy importante en la regulación de esta ruta metabólica. Esta proteína tetramérica de 250 kDa cataliza la reacción irreversible que lleva a la formación de piruvato y de ATP a partir de PEP y ADP. La PK constituye un clásico ejemplo de enzima alostérica. Esta enzima presenta una cinética de tipo sigmoide y su actividad, por su elevado S_{0.5} para PEP (superior a 1 mM), depende de la concentración de éste. La PK está sutilmente regulada por efectores que modifican su afinidad por el sustrato. La enzima, cuya actividad requiere la presencia de cationes monovalentes, se activa por la F1,6bP y se inhibe por uno de sus productos, el ATP, así como por algunos aminoácidos como la alanina, la serina o la fenilalanina (**Hue, 1981**).

Es la única enzima del ciclo PEP-Piruvato que puede ser fosforilada y resulta así un objetivo principal de la acción de las hormonas. Así, su fosforilación en un residuo serina por la PKA la inhibe, lo que causa una disminución de la afinidad de la enzima por sus principales efectores positivos, el PEP y la F1,6bP (Fenton y Tang, 2009).

Piruvato carboxilasa

La PC es una proteína tetramérica de 500 kDa. La PC y la PEPCK constituyen las dos enzimas de la primera etapa de la gluconeogénesis oponiéndose a la PK. En el hombre, como en la rata, la localización de la PC es exclusivamente mitocondrial y la enzima, después del transporte intramitocondrial de piruvato, cataliza la conversión exergónica de éste en oxalacetato (OAA) (Jitrapakdee et al, 2008).

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, 1981). Está regulada también por efectores que, en su mayoría, poseen efectos opuestos sobre la PDH. En efecto, la PC se activa por el acetyl CoA y por una alta relación ATP/ADP. Al contrario, el glutamato es su efector negativo más potente.

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) es una proteína tetramérica de 74 kDa que cataliza la reacción exergónica que lleva a la síntesis de PEP a partir de OAA y GTP. Se considera generalmente como la segunda enzima de la gluconeogénesis. Esta enzima está distribuida de manera equiparable entre el compartimento citosólico y mitocondrial en el hombre. Parece que la localización de la PEPCK en la rata sea mayoritariamente citosólica (Lardy y Hughes, 1984).

Como su K_m es próxima a las concentraciones intracelulares de OAA (del orden de micromolar), la actividad de la enzima está principalmente controlada por la disponibilidad de sustrato (Hue, 1981). Su actividad también puede verse influida por el estado redox de los grupos tioles de la proteína y por la presencia de algunos iones ferrosos activadores (Maggini et al, 1993).

4.3.4. La ruta de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato es una vía alternativa de oxidación de la glucosa que no requiere oxígeno y en la que no se genera ATP. En muchos tejidos, el 80-90% de la glucosa se oxida a través de la glicólisis mientras que el tanto por ciento restante lo hace mediante la vía de las pentosas fosfato. Sus productos principales son el NADPH,

un agente reductor que se requiere en varios procesos anabólicos y la ribosa 5-fosfato, un componente estructural de los nucleótidos y los ácidos nucleicos. La etapa limitante es catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) (Bolaños et al, 2008). La ruta de las pentosas fosfato se lleva a cabo en el citosol de todas las células en dos fases:

- Fase oxidativa: Convierte la glucosa 6-fosfato en ribulosa 5-fosfato mediante varias reacciones irreversibles llevando a la formación de NADPH.
- Fase no oxidativa: Produce la isomerización y la condensación de varias moléculas de azúcar diferentes dando lugar a la formación de la ribosa 5-fosfato y los intermediarios glucolíticos fructosa 6-fosfato y gliceraldehído 3-fosfato.

La existencia de estas dos fases permite un control independiente de la producción de sus metabolitos mayoritarios según las necesidades celulares de NADPH, ribosa 5-fosfato y ATP. La fase oxidativa proporciona una cantidad sustancial de NADPH que se requiere para los procesos reductores y para el mantenimiento del glutatión en su forma reducida (GSH) (Wamelink et al, 2008). Así, esta fase es más activa en células en las que se sintetizan cantidades relativamente grandes de lípidos como el tejido adiposo, la corteza suprarrenal y el hígado y en aquéllas con un riesgo elevado de daño oxidativo como los eritrocitos. Cuando no se requieren las pentosas para las reacciones de biosíntesis de ácidos nucleicos, los metabolitos de la fase no oxidativa de la ruta se convierten en intermediarios glucolíticos que pueden degradarse posteriormente para generar energía o convertirse en moléculas precursoras para los procesos de biosíntesis. Por tanto, la estimulación de la vía de las pentosas fosfato constituye una forma de lucha frente al estrés oxidativo mediante el aumento de los niveles de GSH a través de la formación de NADPH (Grant, 2008) (Figura 8).

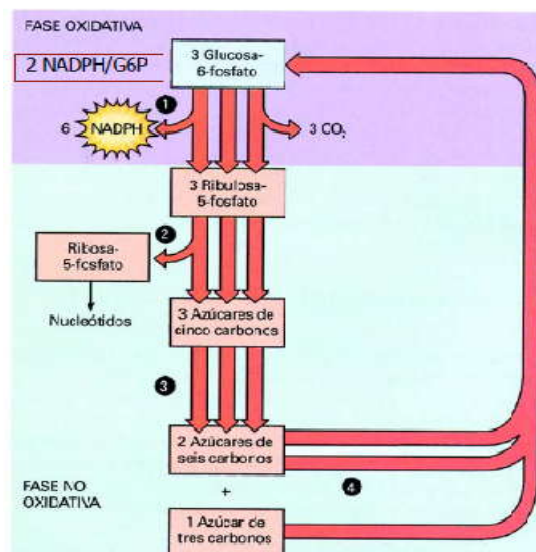


Figura 8. Esquema de la ruta de las pentosas fosfato

5. Control integrado de la gluconeogénesis

La gluconeogénesis hepática se controla por el suministro y la disponibilidad de sustratos formadores de glucosa, por la propia glucosa como producto final, por el estado hormonal del organismo así como por el estado energético celular.

5.1. Control de la gluconeogénesis por la glucosa

Los trabajos realizados sobre hepatocitos aislados mostraron que la glucosa, a bajas concentraciones (2-5 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 de lactato+piruvato, aumentando el flujo a través de la PC y de la PEPCK (Rigoulet et al, 1987). Por el contrario, a partir de concentraciones superiores o iguales a 10 mM, la gluconeogénesis se inhibe por su producto final. Este fenómeno bifásico podría explicarse por la acumulación progresiva de F2,6bP (Hue et al, 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 de AMPc. En situación de ayuno, el glucagón y otros agonistas β -adrenérgicos estimulan la gluconeogénesis por una cascada de fosforilación dependiente de 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 (Jiang y Zhang, 2003; Pilkis et al, 1988). 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 usa como precursor el lactato+piruvato la mayor parte del control se efectúa a través de la PC (Groen et al, 1983). Así, se ha demostrado que en presencia de DHA como sustrato energético, 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 et al, 2001).

En cuanto a 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 PFK-2 y la activación de la F2,6bPasa (Barthel y Schmoll, 2003; Pilkis et al, 1988). 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⁺ citosólicas. En

condiciones fisiológicas, varias de las enzimas clave de la gluconeogénesis pueden ser reguladas por una modificación sutil de la relación ATP/ADP o de la concentración de los distintos nucleótidos, lo cual se refleja sobre el control del flujo a través de la vía. 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 AMP la inhibe, al ser un efector positivo de PFK-1 y PFK-2 (Newsholme y Leech, 1983).

La variaciones del potencial redox celular, que se traducen en una modificación de la relación NADH/NAD⁺ citosólica puede también regular la gluconeogénesis a nivel de dos enzimas: la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPdH) y la piruvato carboxilasa (PC). Como la GAPdH es una enzima que funciona en condiciones cercanas al equilibrio con el NADH y el NAD⁺ como cofactores, la relación de sus concentraciones determina la orientación del flujo a través de la enzima. 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 son capaces de activar la gluconeogénesis. Sus acciones son complementarias, ya que sus concentraciones varían generalmente en paralelo: el citrato actúa sobre el ciclo de las “fructosas” e inhibe las dos fosfofructoquinasas (PFK-1 y PFK-2), disminuyendo así la concentración de F2,6bP, mientras que el acetil CoA actúa sobre el ciclo PEP/Piruvato estimulando la PC e inhibiendo la PDH (Hue, 1981).

6. Control transcripcional de la gluconeogénesis

En términos de fisiología integrada, la regulación transcripcional constituye una parte crucial del control hormonal y nutricional de la glucólisis y gluconeogénesis. El estado nutricional del organismo, así como algunas hormonas (insulina, glucagón, glucocorticoides), implican una modificación significativa del contenido hepático en enzimas glucolíticas y gluconeogénicas a largo plazo mediante modificaciones transcripcionales. Actualmente se asume que un período de ayuno prolongado induce la expresión de las principales enzimas de la gluconeogénesis (PC, PEPCK y G6Pasa) y disminuye la de las enzimas glucolíticas (GK, PFK-2, PK) (Pilkis y Granner, 1992). Por último, las hormonas desempeñan también un papel importante en la regulación transcripcional de las vías metabólicas de modo que 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 manera opuesta a la insulina, disminuyendo la expresión de la PK y de la GK y sobreexpresando la G6Pasa (Nordlie et al, 1999).

LA MITOCONDRIA

1. La Mitocondria

Las mitocondrias son organelas intracelulares situadas en el citoplasma de las células eucariotas. El número de mitocondrias 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 mientras que 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 β -oxidación de los ácidos grasos y el genoma mitocondrial. Se distingue por presentar numerosos repliegues, denominados crestas mitocondriales, que aumentan de manera considerable su superficie. Además, posee una proporción importante de cardiolípidos que le confieren una cierta impermeabilidad frente a los iones de manera que todos los cambios 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 y la ATP sintasa.

Al contrario que la membrana interna, la membrana externa no presenta repliegues y contiene en gran abundancia una proteína denominada porina o Voltage-Dependant Anion Channel (VDAC). Las porinas forman grandes canales anclados en la bicapa lipídica que permiten el paso de moléculas con un peso molecular inferior a 5 kDa (Figura 9).

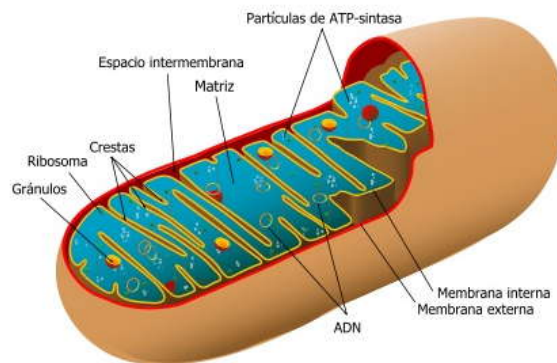


Figura 9. Estructura de la mitocondria

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_2) obtenidos por descarboxilación del piruvato, β -oxidación de los 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^+) hacia el exterior de la matriz mitocondrial constituyendo así un gradiente de H^+ que se usa para la síntesis de ATP a partir de ADP mediante el complejo enzimático ATP sintasa (complejo V).

2.1. Organización de la cadena respiratoria y de la ATP sintasa

La cadena respiratoria es una estructura multiproteica que consta de la ATP sintasa y de cuatro complejos transportadores de electrones formados por alrededor de cincuenta polipéptidos (Chance y Williams, 1956). 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 (como las flavinas y 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 y IV). La energía que lleva asociada este gradiente se emplea por el complejo V para la síntesis de ATP (Figura 10).

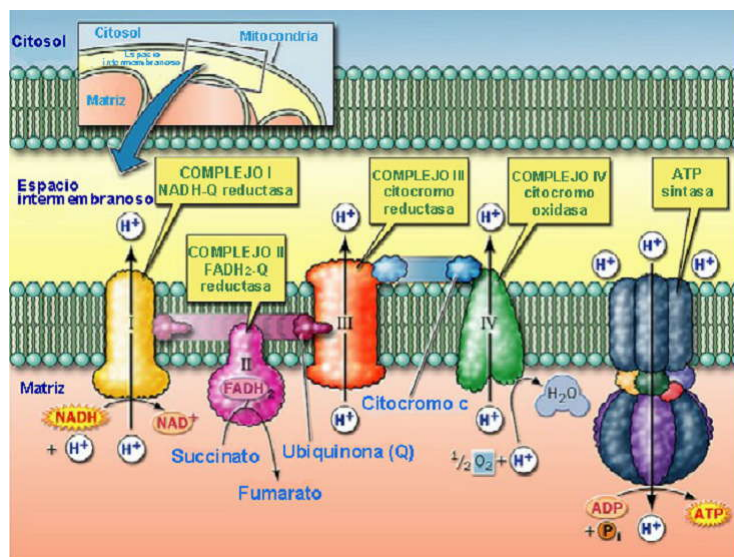


Figura 10. Esquema de la cadena respiratoria y de la ATP sintasa

2.1.1. El complejo I: NADH-ubiquinona oxidorreductasa

Es el complejo de la cadena respiratoria que cataliza la primera etapa de la transferencia de electrones, cediendo dos electrones desde el NADH a la ubiquinona estando ésta acoplada a una transferencia vectorial de protones a través de la membrana mitocondrial interna (Schultz y Chan, 2001; Weiss et al, 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 (Ino et al, 2003).

2.1.2. El complejo II: succinato-ubiquinona oxidorreductasa

Este complejo está compuesto de cuatro subunidades 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 (Hedderstedt, 2003; Ohnishi et al, 2000).

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 α -glicerofosfato deshidrogenasa y una flavoproteína implicada en la β -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 electrones y bombeo de protones. 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 aa₃)

Este complejo cataliza la última reacción de óxido-reducción de la fosforilación oxidativa. El complejo IV oxida al citocromo c y los electrones se transfieren, de manera irreversible, al oxígeno que es el último aceptor de electrones de la cadena respiratoria. El oxígeno recibe los electrones y se transforma en agua. En esto consiste el consumo de oxígeno (JO_2) o la respiración. Esta reacción es 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: F₀F₁-ATP sintasa

Este complejo está constituido por 3 dominios distintos: un dominio hidrosoluble F₁ que contiene los sitios catalíticos, un dominio F₀ membranoso que forma el canal de protones y un dominio que permite el anclaje de F₁ a la membrana. El dominio membranoso F₀ es un oligómero de subunidades c que giran cuando se produce el paso de protones del espacio intermembranoso a la matriz. El dominio F₁ fue purificado en 1961 por Racker (Racker, 1961) y está constituido por cinco subunidades diferentes: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. Las subunidades α y β contienen los sitios de fijación de los nucleótidos adenílicos y los sitios catalíticos están situados en cada una de las subunidades β .

La F₀F₁-ATP sintasa asocia el bombeo de protones desde el espacio intermembranoso hasta la matriz mitocondrial a la síntesis de ATP a partir de 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 subunidad F₀ (Hong y Pedersen, 2008).

2.2. La teoría quimio-osmótica de Mitchell

La teoría quimio-osmótica, propuesta por Mitchell en 1961, es la más adecuada para explicar el proceso de transducción de la energía en la mitocondria (Mitchell, 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. Constituyen entidades individuales que asocian la transferencia de electrones a una expulsión orientada de protones hacia el espacio intermembranoso, permitiendo 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 FADH₂) 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 traduce en una diferencia de potencial eléctrico transmembranoso ($\Delta\Psi$) y un gradiente de pH (ΔpH) entre un lado y otro de la membrana mitocondrial interna. El gradiente electroquímico de protones, expresado en términos de fuerza protón motriz (Δp), 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 F₀ de la ATPasa, la energía que liberan se usa para la síntesis de ATP por parte de la subunidad hidrosoluble F₁ 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.

2.2.1. ¿Qué sistemas aprovechan la fuerza protón motriz?

La fuerza protón motriz se usa en primer lugar para la síntesis de ATP. Sin embargo, además de esta función principal, numerosos transportadores activos usan esta energía como la lanzadera del glutamato-malato que permite la entrada del NADH citosólico hacia la matriz, y la translocasa que es 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 la 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 FADH₂) 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 (produce FADH₂) 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⁺).

El ratio de control respiratorio (RCR) representa la relación entre el estado 3 y el estado 4 de la respiración. 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⁻ 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, existe una inhibición de la síntesis de ATP asociada a un aumento importante de la respiración con el fin de restablecer 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, 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. Control de la Fosforilación Oxidativa

Los primeros estudios sobre los mecanismos de regulación de la fosforilación oxidativa consideraban dos etapas como potencialmente 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 y 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 et al, 1998). La citocromo oxidasa posee, en su subunidad IV, un sitio de regulación alostérica por el ATP y/o el ADP. El enlace de estos efectores es independiente de la fuerza protón motriz (Kadenbach y Arnold, 1999).

- **El transportador de los nucleótidos adenílicos:** la entrada de ADP^{3-} y la salida de ATP^{4-} dirigidas por la translocasa de nucleótidos de adenina está lejos del equilibrio termodinámico (Wanders et al, 1981). Sin embargo, un acercamiento más general ha permitido que, en una red metabólica, el control metabólico no esté limitado a una sola etapa enzimática sino distribuido en el conjunto de la vía metabólica estudiada. 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 metabólica. Por ejemplo, con succinato, cuando la producción de ATP es máxima (estado 3 de la respiración), el control de la respiración está 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 la fosforilación (estado 4 de la respiración), la respiración está controlada por la entrada pasiva de protones en la matriz mitocondrial (Groen et al, 1982) y por la cadena respiratoria (Brand et al, 1988). Cuando la velocidad de la respiración es intermedia 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 dependería de la hidrólisis de ATP, de la actividad del transportador de los nucleótidos adenílicos, del suministro en sustratos de la cadena respiratoria y de la fuga (*leak*) de protones 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.

Gracias a una serie de estudios (Hinkle et al, 1991; Lee et al, 1996) se demostró que una parte de la fuerza protón motriz generada por la cadena respiratoria se empleaba para la síntesis de ATP, debido a un cierto grado de desacoplamiento entre la óxido-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 del 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 conocido como "*leak*" y también un fenómeno de

patinaje a nivel del complejo IV denominado “*slipping*” que intervienen en la disminución del rendimiento de la fosforilación oxidativa.

Permeabilidad de la 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 (Δp), 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, usando desacopladores protonóforos como 2,4-dinitrofenol (DNP) o el carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). Estos agentes desacoplaantes 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^+ expulsados sobre los electrones donados al oxígeno en el complejo IV (Azzone et al, 1985). A este mecanismo de desacoplamiento intrínseco lo denominaron “*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 et al, 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 las levaduras. Esta pérdida del rendimiento se corresponde con un cambio en la estequiometría de la ATP sintasa (Rigoulet et al, 1989).

3. Síntesis de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Hace 40 años varios estudios demostraron 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_2^-), pero el radical liberado por la mitocondria era el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se sabe que existen dos sitios fundamentales de formación: el complejo I y el complejo III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen en condiciones de alto potencial de membrana, en aquellas condiciones donde el consumo de la fuerza protón motriz es débil. La producción de ROS juega un papel fisiológico muy importante dentro de la señalización celular, de tal manera que una producción excesiva está ligada a daños sobre el ADN, proteínas o lípidos y están implicados en el envejecimiento celular pero también en numerosas patologías degenerativas neurológicas e incluso la diabetes (Tahara et al, 2009).

El complejo I mitocondrial es el principal sitio de producción de ROS, de acuerdo a dos modelos (Figura 11):

- 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 el flujo reverso (Batandier et al, 2002).

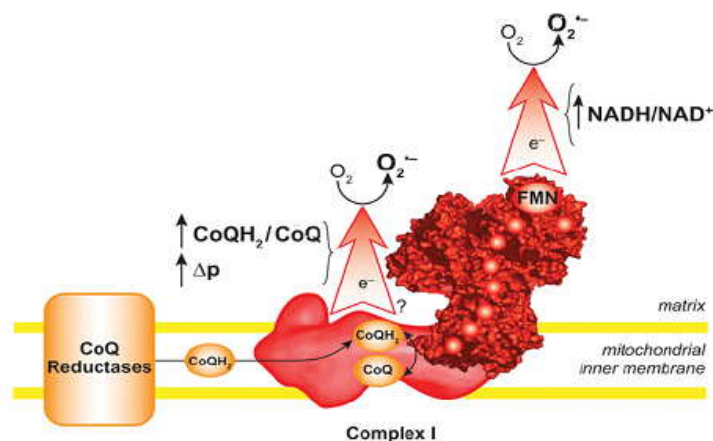


Figura 11. Producción de O_2^- por el complejo I

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 pérdida en compuestos matriciales (sustratos, nucleótidos adenílicos y piridínicos). 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.

Las primeras investigaciones realizadas por Hunter y Haworth (**Haworth y Hunter, 1979**) mostraron que solamente el Ca^{2+} era capaz de inducir la transición de la permeabilidad. Este fenómeno, que puede llegar a provocar una ruptura total de la membrana mitocondrial externa, se revierte por la adición de quelantes del Ca^{2+} . Las mitocondrias responden de manera heterogénea a la transición de la permeabilidad confiriendo a este proceso un carácter autocatalítico en la que el cambio de una mitocondria induce lo mismo en la adyacente.

4.2. Estructura y regulación del PTP

Parece que el PTP se trata de un complejo multiproteico, que podría estar constituido por diversas proteínas como las porinas, el transportador mitocondrial de los nucleótidos adenílicos o el complejo I de la cadena respiratoria. El Ca^{2+} es necesario para la apertura del PTP, aunque no es el único catión bivalente que puede modular dicha apertura. La cantidad de 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 bivalentes a nivel del PTP (**Bernardi et al, 1993**):

- Existe un sitio en la matriz mitocondrial sobre el que se va a fijar el Ca^{2+} y va a ejercer su efecto activador de apertura del poro. Sobre este sitio también se pueden fijar el estroncio y el manganeso.
- 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 et al, 1993**) e inhibida por aquellos valores de pH ácidos (**Bernardi et al, 1992**).

DIABETES MELLITUS TIPO 2

1. Introducción

La clasificación de la diabetes mellitus ha variado a lo largo de las tres últimas décadas en función del conocimiento adquirido sobre la homeostasis de la glucosa y la patogénesis de la enfermedad. Así, 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 Zimmet, 1998). La clasificación actual, según lo propuesto por la OMS y el ADA, 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 es la destrucción de las células β pancreáticas, lo que conduce a la carencia absoluta de insulina. La mayoría de los casos diagnosticados de DM 1 se deben a procesos autoinmunes que destruyen las células β pancreáticas y en menor medida, a procesos idiopáticos.

b) *Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2)*: se corresponde con la anteriormente conocida 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 la secreción de insulina. Aunque no contribuyen ambos factores por igual en la aparición de la DM 2, en cada caso individual predomina un factor sobre otro. Clínicamente, la diabetes tipo 2 se caracteriza por una hiperglucemia crónica definida por una tasa de glucosa en sangre superior a $1,26 \text{ g.l}^{-1}$ (7 mmol.l^{-1}) en ayuno y en más de una ocasión ó a 2 g.l^{-1} ($11,1 \text{ mmol.l}^{-1}$) dos horas después de una carga oral de glucosa (ADA, 2003).

Es la forma más común de diabetes mellitus, representando el 90-95% de todos los casos. Generalmente comienza después de los 40 años, aunque en los últimos estudios se observa un incremento de este tipo de diabetes en niños y adolescentes (Cali y Caprio, 2008). Existen evidencias considerables a favor de una fuerte predisposición genética, aunque este factor genético es complejo. También se sabe que están implicados factores ambientales (sedentarismo, sobrealimentación, excesivo consumo de alcohol) los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad en sujetos susceptibles de padecerla. Así, la obesidad es un factor frecuente 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.

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

d) *Diabetes gestacional*: se corresponde con cualquier grado de intolerancia a la glucosa que aparece al inicio o durante el embarazo. La diabetes mellitus gestacional (DMG) es una complicación común del embarazo apareciendo en el 7% de los casos. Las mujeres con DMG presentan un mayor riesgo para desarrollar DM 2 después del embarazo. La obesidad y otros factores que favorecen la resistencia a la insulina llevan al desarrollo de DM 2 después de la DMG. Los niños de mujeres con DMG presentan un mayor riesgo de obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes en la adolescencia (ADA, 2004).

2. La diabetes mellitus tipo 2: una epidemia mundial del siglo XXI

Utilizar el término epidemia para una enfermedad como la DM 2 puede resultar exagerado pero, dicho término, refleja claramente la progresión real de esta enfermedad a nivel mundial. En el año 2000, más de 171 (2,8%) millones de personas en todo el mundo padecían diabetes y este número podría llegar a 366 (4,4%) millones en el año 2030 según la OMS. 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 et al, 2004) (Figura 12). Por tanto, parece probable que, durante los próximos 25 años, la diabetes llegue a ser una de las primeras causas mundiales de incapacidad y muerte, en el mismo grado que el cáncer. Así, en 2006, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) decidió considerar a la diabetes como un problema de salud pública internacional, situada solamente por detrás del SIDA.

Se han desarrollado varias estrategias para prevenir la DM 1 pero ninguna ha resultado efectiva, por ello, la prevención de este tipo de diabetes continúa siendo un objetivo primordial para las autoridades. 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 un aumento de la actividad física, una dieta sana y equilibrada, la pérdida de peso y el abandono del hábito de fumar.

La diabetes representa actualmente un problema real de salud pública. Su prevalencia aumenta en paralelo al envejecimiento, a la urbanización, al sedentarismo y a la obesidad en los países desarrollados. La enfermedad no escapa tampoco a los países subdesarrollados donde la DM 2 llega a afectar al 20-40% de las poblaciones de algunas etnias debida a una predisposición genética asociada a un rápido cambio del modo de vida (Zimmet, 2003). En España, se estima que la diabetes afecta al 12% de la población adulta según un estudio presentado por la Sociedad Española de Diabetes.

La diabetes y las complicaciones tardías que conlleva también tienen consecuencias importantes sobre la economía, ya que la enfermedad genera un coste financiero considerable (Diamond, 2003). 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 se emplearon en sufragar los gastos directos de la diabetes y el resto se correspondió con la pérdida de productividad del país (ADA, 2008). Según los datos obtenidos por el estudio CODE-2, la DM 2 supone un gasto sanitario de 29.000 millones de euros (4,4% del gasto sanitario total) en la Unión Europea, mientras que en España supone un gasto de 2 millones de euros (4,4% del gasto sanitario total).

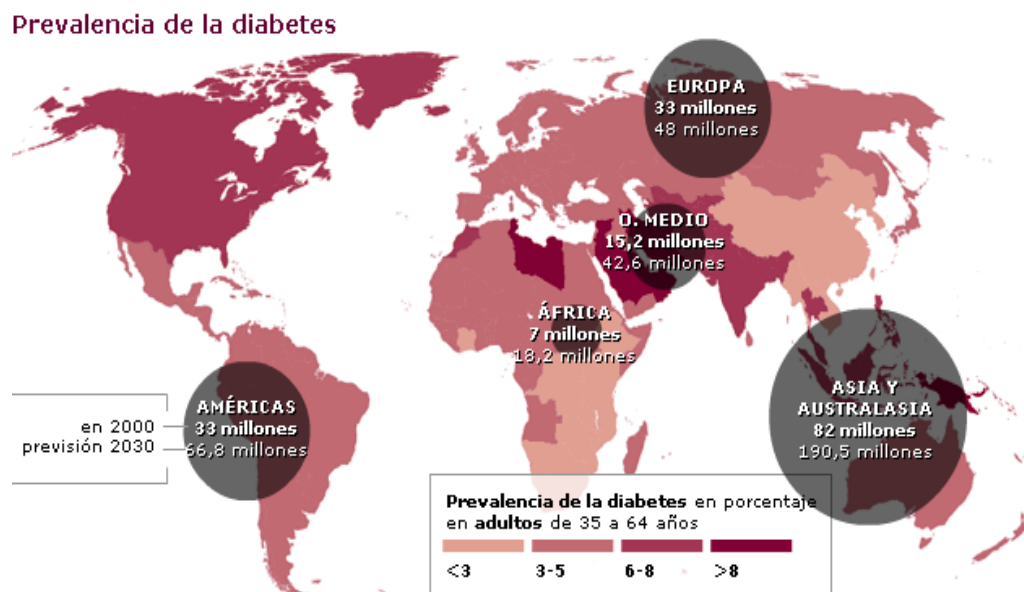


Figura 12. Prevalencia mundial de la diabetes (las cifras en cursiva indican el porcentaje de aumentos de personas con la enfermedad)

3. Fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2

La etiología de la enfermedad es compleja y es el resultado de un déficit de la secreción de insulina y de resistencia a la misma (Gerich, 2001). La diabetes tipo 2 es poligénica y es el resultado de la asociación de una predisposición genética (Van Tilburg

et al, 2001) y de factores ambientales como el sobrepeso, el sedentarismo y el desequilibrio nutricional (Lebovitz, 1999).

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

A pesar de períodos sucesivos de alimentación y de ayuno, la glucemia de un individuo está constantemente regulada y se mantiene en una escala estrecha de valores entre 80-100 mg/dl. Este control de la glucemia está regido por el equilibrio entre la absorción intestinal de la glucosa, su producción por el hígado, su captación celular y su metabolismo en los tejidos periféricos.

En este sistema sutilmente regulado, la insulina ejerce un papel esencial aumentando el transporte de glucosa hacia los tejidos extrahepáticos e inhibiendo la producción hepática de glucosa. Favorece también el almacenamiento de sustratos estimulando la lipogénesis, la síntesis de glucógeno y de proteínas asociada a una inhibición de la lipólisis, de la glucogenólisis y proteólisis. Por tanto, una deficiencia en la producción de insulina o la aparición de insulinoresistencia se traduce en una alteración profunda de estos procesos, llevando a la aparición de una hiperglucemia basal y posprandial. Muchos estudios han mostrado que la evolución de la DM 2 se acompaña de un deterioro progresivo de la acción de la insulina, avanzando desde una resistencia periférica inicial a la insulina hasta una insulinopenia que puede ser total (Lin y Sun, 2010; Saltiel, 2000) (Figura 13).

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 (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 un estado inicial de prediabetes) es la 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 β se desgasta y la intolerancia a la glucosa progresa a diabetes, inicialmente caracterizada por una glucemia posprandial, derivando posteriormente a una hiperglucemia en ayunas (Lebovitz, 2001).

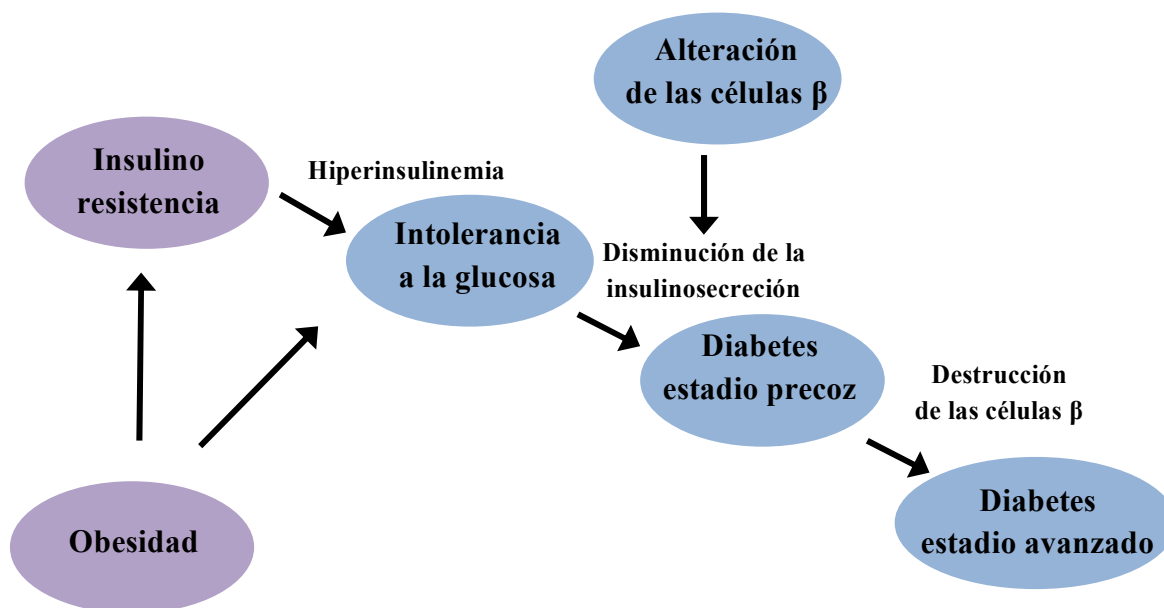


Figura 13. Esquema de la compleja etiopatogenia de la DM 2

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

3.1.1. Funcionamiento normal de las células β pancreáticas

En un estado basal, la glucemia se mantiene mediante una regulación dinámica entre el hígado y las células β pancreáticas. La insulina controla la salida de glucosa desde el hígado, siendo la glucosa el estímulo más importante para las células β . 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 citoplásmica ATP/ADP y un canal de calcio (Ca^{2+}) dependiente de voltaje. Al aumentar la glucosa en plasma, se incrementa la relación ATP/ADP, lo cual causa el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP. Esto lleva a la despolarización de la membrana plasmática adyacente, lo que causa la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, permitiendo así la entrada de calcio desde el compartimento extracelular hasta el interior de las células β . Como consecuencia del aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} se incrementa linealmente la liberación de insulina desde los gránulos de las células β hacia el compartimento plasmático (Fuhlendorff et al, 1998; Lebovitz y Melander, 2004).

3.1.2. Funcionamiento alterado de las células β en diabéticos tipo 2

La resistencia a la insulina es un rasgo patogénico común de la DM 2. Como consecuencia de dicha resistencia aparece la hiperglucemia la cual incrementa el estímulo de secreción de insulina en las células β , lo que resulta en una hipersecreción

de insulina en los primeros estadios de la diabetes. De manera concomitante a dicha hiperglucemia se desarrolla un defecto en la secreción de insulina. El fallo en la secreción de insulina se debe, principalmente, a anomalías en la función y en la supervivencia de las células β pancreáticas (Rhodes, 2005). Estos defectos funcionales 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 β , sino también a una alteración de las células α pancreáticas. Las células α alteradas no son inhibidas por el estímulo de glucosa y siguen produciendo glucagón. En la diabetes tipo 2, por tanto, puede alcanzarse una pérdida de funcionalidad de las células α y β de más del 50% (Porte y Kahn, 1995).

Se han implicado a diversos factores genéticos y 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 inhibe la transcripción del gen de la insulina mediante cambios en la actividad de los factores específicos de células β . Asimismo, la hiperglucemia afecta nocivamente a la masa de células β , al inducir apoptosis sin que se produzca un aumento compensatorio en su proliferación (Donath y Halban, 2004; Kaiser et al, 2003). Esta “glucotoxicidad” se demostró en modelos animales en los que un aumento discreto de la glucemia llevaba a una destrucción progresiva de las células β pancreáticas y al desarrollo de la diabetes (Leahy et al, 1992).

- El aumento plasmático de ácidos grasos libres, conocido como “lipotoxicidad”, también está implicado en la alteración de la función de las células β . La exposición crónica de las células β a valores altos de Acil-CoA inhibe la secreción de insulina y estimula la síntesis de ceramida. La ceramida estimula la óxido nítrico sintasa (NOS) y el aumento del óxido nítrico activa la expresión de citocinas inflamatorias (interleucina-1 y factor de necrosis tumoral α), compuestos que alteran la función y promueven la apoptosis de las células β (Bays et al, 2004; McGarry, 2002; Shimabukuro et al, 1998).

- La amilina (polipéptido amiloide de los islotes) también interviene en el deterioro progresivo de las células β en la diabetes tipo 2, al ser 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 interactúen de manera sinérgica para alterar la secreción de insulina y causar la lesión de las células β (Kahn et al, 1999).

3.2. Resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2

El mal funcionamiento de algunos de los mecanismos fundamentales en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa 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 la unión de la hormona a los 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 α y dos subunidades β unidas por puentes disulfuro (Smith et al, 2010). Las subunidades α extracelulares contienen el dominio de unión con la insulina mientras que las subunidades β presentan actividad tirosina quinasa, estimulada por la insulina.

La unión de la insulina a su receptor provoca la autofosforilación de residuos de tirosina seguida de una fosforilación de una serie de proteínas intracelulares específicas entre las que destacan las proteínas sustrato del receptor de insulina, denominadas IRS. 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 los que mayoritariamente regulan la señal de la insulina:

- en el músculo y en el tejido adiposo, la proteína IRS-1, fosforilada y activada por el receptor de la insulina, facilita la entrada de glucosa y activa distintas vías anabólicas como la síntesis de glucógeno, de lípidos y de proteínas.
- por otra parte, en el hígado, IRS-2 es la proteína encargada de mediar en el efecto de la insulina sobre la producción hepática de la glucosa, la gluconeogénesis y la formación de glucógeno.

La fosforilación de IRS-1 e IRS-2 lleva a la unión y activación de la proteína 3-quinasa de fosfatidilinositol (PI3K). Como resultado de dicha activación, y tras una cascada de reacciones, se produce la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) hacia la superficie celular. GLUT-4 facilita el transporte de glucosa, en función del gradiente de concentración, desde el espacio extracelular hacia el citoplasma. (Thirone et al, 2006; Van Cromphaut, 2009).

3.2.2. Resistencia a la insulina en la DM 2

La resistencia a la insulina es el aspecto fisiopatológico más importante en muchos estados prediabéticos y es la primera alteración detectable en la DM 2. Además,

la resistencia a la insulina junto con la obesidad, la hipertensión, la hiperlipidemia y la hiperglucemia constituyen “el síndrome metabólico” o “síndrome de resistencia a la insulina”. La resistencia a la insulina se define como la incapacidad de las células para responder a la acción de la insulina. La patogénesis de la DM 2 implica alteraciones tanto en la secreción de insulina como en su acción. Esta resistencia a la insulina se compensa, normalmente, con hiperinsulinemia que, a largo plazo, conduce al fallo funcional de las células β pancreáticas y al desarrollo de la diabetes (Bugianesi et al, 2005; Gastaldelli et al, 2010; Lee y White, 2004).

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. Varios factores como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia, los ácidos grasos libres, el factor α de necrosis tumoral (TNF- α) o la ceramida están implicados en la alteración de la vía de señalización de la insulina en pacientes con obesidad y diabetes (Combettes-Souverain y Issad, 1998; Virkamaki et al, 1999). En la DM 2 disminuye la asociación estimulada por insulina de IRS-1 con la subunidad reguladora de PI3K debido al incremento intracelular de ácidos grasos. Como consecuencia, en el músculo se reduce la actividad de la sintasa del glucógeno y la utilización de la glucosa (Schmitz-Peiffer, 2000). En los adipocitos y en el tejido muscular de diabéticos tipo 2 el transporte de glucosa hacia su interior se altera gravemente por el deterioro en el transportador de glucosa, denominado GLUT-4 (Boden et al, 2002; Shulman, 2000).

A nivel hepático, la resistencia a la insulina causa un aumento incontrolado de la producción de glucosa, lo cual contribuye a la hiperglucemia, típica de la DM 2. Esto se debe a una disminución de la sensibilidad del hígado a la acción de la insulina y a una alteración de la regulación de la vía metabólica por la glucosa. Esta alteración empeora progresivamente conforme el estado diabético se descompensa en el transcurso del tiempo. La excesiva producción de glucosa hepática es el resultado de un aumento en la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y de la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa) (Clore et al, 2000; Gastaldelli et al, 2010).

En el tejido adiposo, la insulina desempeña dos funciones importantes: favorecer la formación de triglicéridos e inhibir la degradación de dichos triglicéridos y su liberación en forma de ácidos grasos libres. Así, una alteración en la acción de la insulina causa una excesiva liberación de ácidos grasos libres desde el tejido adiposo. El aumento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres puede causar o agravar la resistencia a la insulina en el músculo e hígado y alterar la secreción de insulina por el páncreas (Boden et al, 2001). El resultado de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo consiste en una movilización de los triglicéridos y sus metabolitos hacia el hígado y el músculo, contribuyendo al incremento incontrolado de la gluconeogénesis hepática (Boden et al, 2002). Este aumento en el contenido graso en el hígado y en el

músculo se correlaciona de manera muy estrecha con la resistencia a la insulina en estos tejidos, lo cual, a largo plazo, contribuye al desarrollo de la esteatohepatitis no-alcohólica (Haque y Sanyal, 2002).

El tejido muscular constituye el principal lugar de utilización de la glucosa, estimulada por la insulina. Casi el 80% de la captación total de glucosa ocurre en el músculo estriado por lo que alteraciones en este punto agravan profundamente la homeostasis de la glucosa (Bjornholm y Zierath, 2005). Además, 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 et al, 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 la 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 usados en el tratamiento de la diabetes tipo 2 son: sulfonilureas, metaglinidas, miméticos de las incretinas, biguanidas, tiazolidindionas e inhibidores de α -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

Estos fármacos estimulan la secreción de insulina endógena por las células β pancreáticas. Existen varias clases diferentes y se diferencian entre sí por las características del enlace con las células β pancreáticas.

4.1.1 Sulfonilureas

Se comercializan desde los años cincuenta. Glipizida (*Glucotrol*®) y glimepirida (*Amaril*®) son las sulfonilureas que se prescriben con mayor frecuencia en

España. Son secretagogos de acción tardía y prolongada. Su principal efecto es la disminución de la hiperglucemia. Están indicadas en aquellos pacientes con DM 2 en los que la causa principal sea la hipoinsulinemia basal (Harrower, 1994; Turner et al, 1999).

4.1.2. Glinidas

Las dos metaglinidas disponibles actualmente en España son la repaglinida (*Prandin*®), y la nateglinida (*Starlix*®). Son secretagogos de acción rápida y corta, a diferencia de las sulfonilureas (Lebovitz, 2009).

4.2. Inhibidores de la α -glucosidasa

Los inhibidores de la α -glucosidasa: acarbosa (Glucobay®) y miglitol (Diastabol®, Plumarol®) actúan inhibiendo de forma competitiva y reversible a las enzimas α -glucosidasas intestinales localizadas en la superficie del duodeno y parte alta del yeyuno. Retrasan la absorción de los carbohidratos complejos (oligosacáridos, trisacáridos y disacáridos) en el intestino delgado proporcionándole al páncreas un tiempo adicional para que secrete la cantidad de insulina suficiente para normalizar la glucemia posprandial (Hanefeld y Schaper, 2008; Hsieh et al, 2010).

4.3. Miméticos de las incretinas

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 apetito. También son capaces de potenciar la mitosis de las células β pancreáticas y evitar su apoptosis. El GLP-1, una vez liberado, es inactivado rápidamente por la enzima dipeptidil peptidasa (DPP-IV) (Drucker y Nauck, 2006).

Se han hecho grandes avances en el desarrollo de los miméticos de incretinas, como por ejemplo, la exenatida y la liraglutida. En nuestro país solamente se comercializa exenatida (Byetta®) mientras que la liraglutida (Victoza®) se encuentra todavía en fase de investigación. También se ha progresado mucho en el desarrollo de los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, de modo que en España podemos elegir entre una amplia batería de fármacos miméticos de las incretinas, tanto en monoterapia como en combinación con metformina: sitagliptina (Januvia®) y vildagliptina (Icandra®), respectivamente (Amori et al, 2007; Srinivasan et al, 2008).

4.4. Insulina

La terapia con inyecciones de insulina está, sobre todo, indicada en pacientes con DM tipo 1. Los diabéticos tipo 2 no dependen del aporte exógeno de insulina para su supervivencia pero 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 (Lindstrom et al, 1992; Wright et al, 2002).

4.5. Sensibilizadores de la acción de la insulina

4.5.1. Biguanidas (Metformina)

La Metformina (Dianben®) se describió hace 50 años como medicamento antidiabético y es ampliamente utilizada para el tratamiento de la DM 2 en pacientes obesos y con resistencia a la insulina. El efecto hipoglucemiante se debe a una reducción de la producción de glucosa y a una disminución de la resistencia periférica a la insulina mediante mecanismos aún no identificados (Argaud et al, 1993; Holman, 2007).

El Dr. El-Mir demostró que la metformina produce una inhibición de la respiración celular en hepatocitos intactos mediante un efecto indirecto dirigido al Complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (El-Mir et al, 2000). Estudios posteriores relacionaron esta inhibición con sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Owen et al, 2000).

4.5.2. Tiazolidindionas o glitazonas (TZDs)

Las glitazonas son agonistas selectivos sintéticos de la isoforma γ de los receptores nucleares activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs). A través de estos receptores controlan la expresión de genes implicados en la diabetes, de tal manera que mejoran el control glucémico al reducir la producción hepática de glucosa y aumentar la utilización de glucosa en músculo esquelético y tejido adiposo (Chiarelli y Di Marzio, 2008; Israili, 2009). Actualmente, se comercializan dos glitazonas: la pioglitazona (Actos®) y la rosiglitazona (Avandia®) aunque el uso de ésta ha sido suspendido recientemente por la Agencia Europea del Medicamento ya que causa graves alteraciones cardíacas.

4.6. Terapia combinada

La naturaleza progresiva de la enfermedad, las acciones complementarias de varios fármacos y el efecto antihiper glucemiante sumatorio justifican la farmacoterapia combinada. Así, 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 de diferentes combinaciones de metformina con glitazonas (Avandamet®), metformina con miméticos de incretina (Eucreas®) y glitazonas con sulfonilureas (Tandemact®). Estas formulaciones permiten tratar al mismo tiempo varios aspectos fisiopatológicos de la diabetes tipo 2 (Bailey y Day, 2004; Scheen, 2010; Seufert y Urquhart, 2008).

5. Modelos experimentales para el estudio de la DM 2

Debida a la compleja relación entre los factores genéticos y ambientales implicados en el desarrollo de la DM 2, el estudio de la enfermedad en humanos es realmente complicado. Por ello, se recurre a modelos animales, en los que la enfermedad no es un reflejo exacto de la que se presenta en el hombre pero permiten investigar los mecanismos patogénicos que conducen a la hiperglucemia y sus consecuencias, además de explorar nuevos métodos para la prevención y el tratamiento de la diabetes. La mayoría de estos modelos experimentales están basados en roedores debido a la gran cantidad de ventajas que ofrecen con respecto al resto de animales de experimentación (Hugués-Hernandorena et al, 2002; Srinivasan y Ramarao, 2007).

Pueden establecerse varios modelos animales para el estudio de la DM 2:

- **Modelos genéticamente espontáneos:** Desarrollan DM 2 espontáneamente bien por una o varias mutaciones genéticas que son transmitidas de generación en generación o bien por selección a través de varias generaciones de animales no diabéticos (Ktorza et al, 1997). Ejemplos de este grupo son los ratones obesos (ob/ob), los ratones diabéticos (db/db) y las ratas obesas Zucker (ZDF).
- **Modelos nutricionales:** El consumo prolongado de dietas enriquecidas en grasas o en azúcares simples lleva al desarrollo de obesidad y DM 2 en animales no diabéticos (Mithieux et al, 2002). Un caso excepcional dentro de este grupo es el de *Psammomys obesus* o rata del desierto, que es normoglucémica en su hábitat natural pero desarrolla diabetes y obesidad al ser alimentada con una dieta estándar (Koceir et al, 2003).
- **Modelos químicos:** Se basan en la administración intravenosa de aloxano (ALX) (Drews et al, 2000) y estreptozotocina (STZ) (Islam y Loots, 2009) en animales no diabéticos. Esto permite el estudio del papel de los diferentes factores ambientales implicados en la destrucción de las células β pancreáticas y en el posterior desarrollo de la diabetes. En algunos estudios es frecuente la combinación de STZ con un modelo nutricional (Zhang et al, 2003).

- **Modelos quirúrgicos:** Consisten en una pancreatectomía total o parcial para lograr la inducción de una diabetes tipo 1 o tipo 2, respectivamente (Sasaki et al, 2000). También pertenece a este grupo la administración de electrolitos en la zona ventro-medial hipotalámica, lo cual causa lesiones que provocan hiperinsulinemia y obesidad sin alterar las células β pancreáticas (Balkan et al, 1991).

- **Modelos transgénicos:** Los animales transgénicos se desarrollan para estudiar los genes implicados en la acción periférica de la insulina (IRS-1, IRS-2, GLUT-4), en la secreción de insulina (GLUT-2, GK, GLP-1) y en la producción hepática de glucosa (PEPCK). Estos animales muestran varias características fenotípicas de la diabetes tipo 2 como la hiperglucemia, la resistencia a la insulina o la hiperinsulinemia (Plum et al, 2005).

5.1. Modelo nutricional de dieta rica en fructosa

La fructosa es un azúcar simple y bastante similar a la glucosa. La diferencia entre ambas radica en la presencia de un grupo ceto en el carbono 2 en el caso de la fructosa mientras que la glucosa presenta un grupo aldehído en el carbono 1. En la dieta, la fructosa está presente en la fruta, la miel y las bebidas refrescantes y es el constituyente principal de la sacarosa. En las últimas décadas, el consumo de fructosa ha aumentado progresivamente de manera paralela al aumento, a nivel mundial, de la prevalencia de la obesidad y la diabetes (Bray, 2010; Elliott et al, 2002).

La fructosa se absorbe en los enterocitos mediante el transportador GLUT-5 y se metaboliza rápidamente en el intestino y en el hígado por mecanismos independientes de la insulina (Skoog y Bharucha, 2004). A nivel hepático, la fructosa se transforma en fructosa 1-fosfato, de modo que la mayor parte de la fructosa ingerida se convierte en glucosa, glucógeno, lactato o ácidos grasos (Mayes, 1993).

Debido a su metabolismo independiente de la insulina, la fructosa se investigó como posible edulcorante para pacientes diabéticos. Además, la fructosa 1-fosfato, formada a partir de fructosa, incrementa la actividad de la glucoquinasa hepática, la cual contribuye a la mejora de la homeostasis de la glucosa (McGuinness y Cherrington, 2003). Así, pequeñas dosis de fructosa incrementan la liberación de glucosa hacia los tejidos extrahepáticos y disminuyen la gluconeogénesis hepática (Donmoyer et al, 2001). Incluso, se ha visto que puede llegar a mejorar la tolerancia a la glucosa en pacientes diabéticos (Moore et al, 2001). Sin embargo, el tratamiento de varias especies animales con una dieta rica en fructosa parece estar asociado con alteraciones metabólicas y cardiovasculares (Le y Tappy, 2006), llevando al desarrollo del síndrome metabólico caracterizado por dislipidemia (Reaven et al, 1990), resistencia a la insulina (Yadav et al, 2009), alteración de la homeostasis glucídica e hipertensión arterial (Reed et al, 1994).

La fructosa no aumenta la secreción de insulina, por lo que estimula el apetito a nivel del sistema nervioso central (Schwartz et al, 1999). Como consecuencia, la fructosa causa un incremento de la adiposidad sin variar el consumo total de energía (Jurgens et al, 2005). En humanos, se ha observado que la ingesta de fructosa causa un descenso en la secreción de leptina e insulina, por lo que es posible que la fructosa favorezca una mayor ingesta de calorías y un aumento de peso (Teff et al, 2004).

La fructosa lleva, fundamentalmente, al desarrollo de la resistencia a la insulina. Los mecanismos moleculares responsables de dicha resistencia a la insulina no están claros pero parece ser que interfiere con la señalización de la insulina. Así, se ha visto que, en hepatocitos en cultivo, la dieta rica en fructosa disminuye la fosforilación de IRS-1 en respuesta a la insulina. (Cai et al, 2005; Wei y Pagliassotti, 2004). Algunos de los experimentos llevados a cabo con una dieta rica en fructosa muestran que los efectos desensibilizadores de la fructosa pueden deberse a un metabolismo lipídico alterado. Dichos experimentos demuestran que, a corto plazo, la dieta rica en fructosa incrementa la gluconeogénesis hepática y altera la supresión, llevada a cabo por la insulina, sobre la síntesis de glucosa hepática y la lipólisis (Faeh et al, 2005). Tras 6 semanas de tratamiento, la fructosa causa una acumulación de lípidos en el músculo esquelético (Pagliassotti et al, 1996), por lo que es posible que también cause resistencia a la insulina en el músculo (McGarry, 2002).

La hiperlipidemia es otro de los efectos importantes provocados por una dieta rica en fructosa (Basciano et al, 2005). Así, incrementa los niveles plasmáticos de triglicéridos y estimula la lipogénesis *de novo*, lo cual puede deberse, en parte, a una estimulación de la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP-1c) (Bizeau y Pagliassotti, 2005; Minehira et al, 2003). Los niveles elevados de ácidos grasos libres inhiben la oxidación de glucosa (Rebrin et al, 1995) y tienen efectos proapoptóticos sobre las células β pancreáticas (Bergman y Ader, 2000). Además, como consecuencia de la estimulación de la lipogénesis, la dieta rica en fructosa aumenta la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y disminuye su aclaramiento (Arner, 2001; Carmona y Freedland, 1989).

En el hígado, la fructosa estimula las vías proinflamatorias y las respuestas celulares frente al estrés. Así, las ratas alimentadas con fructosa muestran una menor protección frente a la peroxidación lipídica. En 2004, Kelley y colaboradores postularon que este efecto pro-oxidante de la fructosa podría estar mediado por el incremento de la producción hepática de VLDL (Kelley et al, 2004). El estrés oxidativo está implicado en el desarrollo de la resistencia a la insulina, de modo que la dieta rica en fructosa causa un aumento tanto de las ROS como de los lipoperóxidos, así como una alteración del sistema antioxidante. De esta manera, la administración de sustancias antioxidantes como el ácido lipoico ha demostrado ser beneficiosa frente a las alteraciones causadas por la fructosa (Thirunavukkarasu et al, 2004).

Por último, algunas investigaciones han mostrado que la dieta rica en fructosa también provoca hipertensión arterial en animales (Dai y McNeill, 1995; Suzuki et al, 1997). El mecanismo por el que la fructosa causa hipertensión es totalmente desconocido pero puede deberse a la producción de ácido úrico (Nakagawa et al, 2006), a la hiperinsulinemia (Daly et al, 1997), a la formación de aldehídos (Vasdev et al, 1998) o a la alteración de la reactividad vascular (Verma et al, 1996).

5.2. Modelo genético de obesidad y diabetes tipo 2: Ratas ZDF

Las ratas Zucker obesas (ZFR; *Zucker fatty rats*) son uno de los modelos animales de obesidad genética más conocidos y más usados en experimentación animal. Dicho modelo fue descubierto por Lois Zucker en 1961 al realizar un cruce entre ratas Merck y ratas Sherman (Zucker y Zucker, 1961). Las ratas ZFR son homocigotas para el alelo autosómico recesivo *fa*, por lo que las ratas, al cabo de 4 semanas, desarrollan hiperfagia y una obesidad temprana. Además presentan hiperglucemia, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hipertensión (Aleixandre y Miguel, 2009; Durham y Truett, 2006). La hiperfagia observada en estas ratas se debe a un defecto en los receptores hipotalámicos de leptina, de tal manera que la leptina es incapaz de unirse a sus receptores y no puede ejercer sus acciones sobre el balance energético (Zhang et al, 1994). También presentan niveles elevados de somatostatina, así como menores cantidades de la hormona del crecimiento y prolactina que las ratas Zucker delgadas (Srinivasan y Ramarao, 2007).

Dentro de esta cepa de ratas Zucker, se distingue un subgrupo conocido como ratas ZDF (*Zucker diabetic fatty rats*), caracterizado por presentar diabetes tipo 2 además de obesidad. Las ratas ZDF macho desarrollan diabetes a partir de la novena semana debido a su incapacidad para compensar la resistencia a la insulina. Son menos obesas pero más resistentes a la insulina que las ratas ZFR (Lin y Sun, 2010). Sin embargo, las hembras son obesas, resistentes a la insulina y no desarrollan diabetes.

Por otra parte, las ratas ZDF presentan unas células β bastante frágiles y una capacidad limitada para aumentar la secreción de insulina. De hecho, algunos estudios demuestran que la resistencia a la insulina, presente en estos animales, se debe al alto grado de apoptosis de dichas células (Pick et al, 1998). Por tanto, la hiperglucemia, observada en estas ratas, radica en una menor expresión de los receptores GLUT-2 en la superficie de las células β pancreáticas y en una alteración de la secreción de insulina. También presentan un menor transporte de glucosa hacia los tejidos extrahepáticos como consecuencia de un descenso en los niveles de GLUT-4. Todas estas alteraciones parecen deberse al fenómeno de la “lipotoxicidad” (Shafrir y Ziv, 1998)

En cuanto al perfil lipídico, estos animales presentan niveles de ácidos grasos y colesterol en plasma 4 y 10 veces superiores a lo normal, respectivamente. Esto se debe

a una sobreproducción hepática de lipoproteínas que afecta, sobre todo, a los niveles de HDL y VLDL. Además, presentan niveles elevados de triglicéridos en plasma lo cual se correlaciona con el aumento de la producción de VLDL (Sparks et al, 2000). También desarrollan hipertensión arterial, ya que a partir de la semana 24 presentan un incremento significativo de la presión arterial sistólica (He y MacLeod, 2002), que podría deberse a una disfunción endotelial causada por una producción incontrolada de O_2^- .

Este modelo de ratas ZDF ha sido ampliamente usado para la investigación de los mecanismos moleculares asociados con la resistencia a la insulina y la disfunción de las células β pancreáticas en la diabetes tipo 2 así como en el estudio de los efectos beneficiosos de diferentes agentes antidiabéticos (Nielsen, 2005; Zhang y Moller, 2000).

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 las especies reactivas de oxígeno como una disminución en los sistemas de defensa”*.

2. Fuente de las Especies Reactivas

Hay varios tipos de especies reactivas que incluyen 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 (Perez-Matute et al, 2009). El estrés oxidativo surge cuando existe una sobreproducción de ROS, RCN o RNS no compensado por los sistemas antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos. El exceso de radicales libres daña la estructura y función de componentes celulares como los lípidos, las 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. Estos electrones desapareados le confieren al radical libre un elevado grado de reactividad con otras moléculas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

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 et al, 2007). Se genera en la mitocondria por una fuga prematura de los electrones hacia el oxígeno durante la transducción de energía. Entre 1-3% de los electrones de la cadena respiratoria mitocondrial “se fugan” en los complejos respiratorios I y III para generar superóxido en lugar de reducir completamente el oxígeno a agua. El radical hidroxilo (OH^\cdot) posee una gran reactividad y una vida media muy corta, de 10^{-9} segundos. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es otra especie reactiva de oxígeno importante al igual que el oxígeno singlete (1O_2).

Los peroxisomas producen únicamente H_2O_2 , pero no superóxido, en condiciones fisiológicas normales (Valko et al, 2004). Los peroxisomas constituyen un

lugar muy importante de consumo de oxígeno en las células, de modo que este elevado consumo les lleva a producir H_2O_2 con el que oxidan diferentes moléculas. Esta organela también contiene catalasa, que descompone el peróxido de hidrógeno y evita su acumulación. Por lo tanto, en el peroxisoma se mantiene un delicado equilibrio entre la producción de H_2O_2 y su degradación. Cuando estas organelas sufren algún daño, el H_2O_2 sale al citosol contribuyendo a los fenómenos de estrés oxidativo.

Las células fagocíticas, como los neutrófilos, y las células endoteliales poseen en su membrana plasmática la enzima NAD(P)H oxidasa que produce el radical superóxido necesario para la destrucción bacteriana (Decoursey y Ligeti, 2005). Entre otros sistemas enzimáticos capaces de transferir al oxígeno molecular para formar el radical superóxido se incluyen: ciclooxigenasas, lipooxigenasas, citocromo P450 reductasa y la xantina oxidasa (XO) (Selemidis et al, 2008).

2.2. Especies reactivas de nitrógeno (RNS)

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña que contiene un electrón desapareado y se produce por acción de enzimas óxido nítrico sintasas específicas (NOS) encargadas de metabolizar la arginina a citrulina (Ghafourifar y Cadenas, 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 del sistema inmune (Bergendi et al, 1999). El NO tiene una vida media en medio acuoso de tan solo unos segundos pero, al ser soluble tanto en medio acuoso como en medio 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 (Chiueh, 1999).

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

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

3. Sistemas antioxidantes

Un antioxidante se define como *“cualquier sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la*

oxidación de dicho sustrato” (Halliwell y Gutteridge, 1999). 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 de manera coordinada: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Existen otras enzimas como las quinonas reductasas y la hemo-oxigenasa que pueden prevenir la formación de ROS mediante el reciclado de electrones (Addabbo et al, 2009).

La SOD dismuta O_2^- en O_2 y H_2O_2 . Dicha enzima existe, principalmente, en dos formas en la célula. En la mitocondria, está presente como enzima que contiene manganeso, mientras que en el citoplasma está unida a cobre y zinc. La presencia de SOD en ambos compartimentos celulares asegura que la mayor parte del superóxido sea convertido en peróxido de hidrógeno.

A diferencia del superóxido que permanece cercano al sitio de su producción, H_2O_2 puede difundir a través de las membranas y llegar al citosol. En el momento, en el que H_2O_2 se convierte en un potente agente oxidante, las células expresan CAT y GPx que transforman el H_2O_2 en O_2 y agua. La GPx es una enzima tetramérica que reduce H_2O_2 , los lipoperóxidos y otros hidroperóxidos a sus correspondientes compuestos hidroxilados usando el glutatión como donador de hidrógeno (Roberts y Sindhu, 2009).



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, el núcleo y la mitocondria. Puesto que el glutatión se sintetiza en el citosol por acción de la glutatión sintetasa, su presencia en la mitocondria requiere un transporte a través de la membrana mitocondrial interna. Su forma oxidada es GSSG. Dicha forma se acumula en las células y la relación GSSG/GSH es un buen indicador del estrés oxidativo de un organismo, ya que concentraciones elevadas de GSSG dañan las enzimas y son tóxicas para las células (Nogueira et al, 2004). Las principales funciones del glutatión contra el estrés oxidativo son (Masella et al, 2005):

- 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,
- enmascara los radicales hidroxilo,
- regenera otros sistemas antioxidantes como la vitamina 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 ROS disminuyendo de esta manera su reactividad. Se dice que este tipo de compuestos 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 (Figura 14).

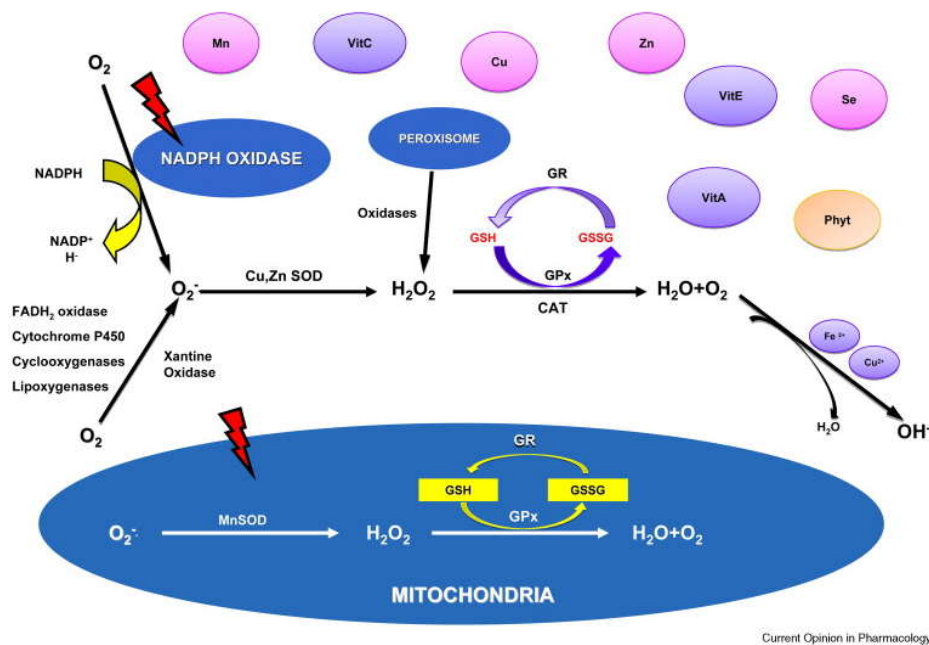


Figura 14. Representación esquemática de las defensas antioxidantes frente a la producción de ROS en el citosol y en la mitocondria.

VitE: Vitamina E; VitA: Vitamina A; VitC: Vitamina C; Zn: Zinc; Mn: Manganeso; Cu: cobre; Se: selenio; Phyt: fitoquímicos. (Imagen extraída de (Perez-Matute et al, 2009).

4. Acciones de ROS

En 1954, una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que las ROS eran agentes tóxicos e inductores de enfermedades (Gerschmann et al, 1954). Las 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.

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.

En el caso de las proteínas, las cadenas laterales de los aminoácidos, en particular los residuos de cisteína y metionina, son susceptibles de sufrir oxidación por parte de ROS y RNS. Así, se producen entrecruzamientos de cadenas polipeptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos que impiden el desarrollo de sus funciones (**Ponczek y Wachowicz, 2005**).

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

Los productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs) derivan de una reacción entre carbohidratos y proteínas, llamada “reacción de Maillard”. Los intermediarios de esta reacción son muy inestables y cumplen un papel importante en la fisiopatología de diferentes enfermedades. Su acumulación se incrementa con la edad y se encuentran en concentraciones elevadas en diabéticos tipo 2, lo cual lleva a la aparición de la disfunción endotelial. Los AGEs que han sido mejor caracterizados son la pentosidina y la carboximetil-lisina (**Dalle-Donne et al, 2005**).

5. El estrés oxidativo en la diabetes

La diabetes tipo 2 es una patología en la que 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 de la diabetes tipo 2 (**Evans et al, 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 (**Robertson y Harmon, 2006**) así como sus células diana pueden verse afectadas, como también los elementos de la sangre y los distintos tipos celulares presentes en los vasos sanguíneos e implicados en las complicaciones de la diabetes. Por ejemplo, el estrés oxidativo puede disminuir la internalización de la insulina en las células endoteliales (**Bertelsen et al, 2001**) e interferir en la transferencia de la hormona desde el plasma hacia el tejido. En las células diana, el

estrés oxidativo puede reducir la translocación de GLUT-4, limitando la capacidad de transporte de la glucosa a las células diana (Rudich et al, 1998).

5.1. El papel de la glucosa en el estrés oxidativo

La hiperglucemia induce estrés oxidativo mediante varios mecanismos:

a. Los excesivos niveles de glucosa activan la glucólisis y, por tanto, aumentan la síntesis de ATP y el potencial de membrana mitocondrial $\Delta\Psi_m$. Este aumento de dicho potencial lleva a un incremento en la producción de radicales libres (Leverve, 2003), en especial, el radical superóxido. Cuando no es neutralizado correctamente, se activan la mayoría de vías mediadas por radicales libres e implicadas en las complicaciones de la DM tipo 2 (Da Ros et al, 2004).

b. La hiperglucemia desacopla la óxido nítrico sintasa (NOS), desviando la generación de NO a la producción de radical superóxido. Esto provoca la formación de peroxinitritos que inhiben, de forma irreversible, la respiración mitocondrial (Brodsky et al, 2002). Esto daría lugar a la deficiente regulación del consumo de oxígeno, propia de la diabetes (Wiernsperger, 2003).

c. La hiperglucemia podría estimular la producción de radicales libres a través de una autooxidación de la glucosa en presencia de metales de transición (Valko et al, 2007).

d. La hiperglucemia también causa una activación prolongada de la NADPH oxidasa, de tal manera que una activación prolongada de dicha enzima provoca disfunción mitocondrial y una caída en los niveles de NADPH, que es el principal cofactor en la regeneración del glutatión y una defensa antioxidante fundamental a nivel celular (Gao y Mann, 2009).

5.2. Disfunción mitocondrial en la diabetes tipo 2

La producción exacerbada de ROS por parte de las mitocondrias en la DM 2 hace que dichas mitocondrias pierdan su capacidad de síntesis del ATP y se alteren las bombas de Na^+ - K^+ de la membrana plasmática. El resultado es una hinchazón 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 et al, 2009). Esta disfunción de las mitocondrias, típica de la DM 2, está relacionada con las complicaciones de la enfermedad como la enfermedad renal (Forbes et al, 2008) y de la disminución de la fosforilación oxidativa que se observa en el músculo esquelético (Civitarese y Ravussin, 2008).

5.3. Otros factores

Aunque no se puede negar el papel directo o indirecto de la glucosa, hay otros factores que aumentan las ROS en la diabetes. Entre esos factores destacan:

- La insulina es capaz de producir H₂O₂ mediante la unión con su receptor y la estimulación del sistema nervioso simpático, para inactivar también la catalasa (Mahadev et al, 2001).
- La angiotensina II, la insulina y los lípidos estimulan también la NADPH oxidasa (Griendling y Ushio-Fukai, 2000).
- Niveles altos de colesterol estimulan la producción endotelial de superóxido mediante la activación de la xantina oxidasa (Ohara et al, 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 et al, 2000).
- Hormonas producidas por los adipocitos, como la leptina, pueden también aumentar la producción de ROS (Yamagishi et al, 2001).

6. La terapia antioxidante

Dado que la hiperglucemia induce estrés oxidativo, es muy importante que los nuevos compuestos antidiabéticos, además de disminuir la hiperglucemia, posean la propiedad de reducir el estrés oxidativo. Hay que mencionar aquí que las dietas bajas en carbohidratos así como el ejercicio físico bajaron los niveles de estrés oxidativo asociado a la diabetes (Kamuren et al, 2006; Rector et al, 2007).

6.1. Vitaminas y suplementos

Numerosos estudios han demostrado que las vitaminas y los suplementos antioxidantes pueden ayudar a bajar los marcadores de estrés oxidativo y de peroxidación lipídica (Gezginci-Oktayoglu et al, 2009). Sin embargo, varios estudios clínicos han mostrado resultados contradictorios en pacientes diabéticos (Ble-Castillo et al, 2005; Darko et al, 2002) a pesar de que las vitaminas protegen frente a la oxidación de las LDL y mejoran la sensibilidad a la insulina (Anderson et al, 1999; Penckofer et al, 2002).

6.2. Plantas y sus ingredientes activos

Los fitoquímicos con efectos antioxidantes incluyen los ácidos cinámicos, cumarinas, flavonoides, lignanos, terpenos, fenilpropanoides y taninos. Hay muchos estudios sobre los efectos antioxidantes de los fitoquímicos en la diabetes y sus complicaciones, de los cuales destacamos un estudio reciente sobre los efectos

antioxidantes de extractos de hojas de *Leucas cephalotes* en ratas con diabetes inducida mediante aloxano (ALX) y estreptozotocina (STZ) (Bavarva y Narasimhacharya, 2010).

6.3. Fármacos y compuestos con potencial antioxidante

Diversos antidiabéticos usados para el tratamiento de la diabetes han mostrado propiedades antioxidantes. Así, la glibenclamida, perteneciente al grupo de las sulfonilureas, es capaz de normalizar la SOD y la CAT hepáticas en ratas con diabetes inducida por STZ (Elmali et al, 2004). La metformina también posee propiedades antioxidantes directas secuestrando las ROS generadas *in vitro*, tal como lo demuestran algunos estudios recientes (El-Mir et al, 2000; Guigas et al, 2004). Las glitazonas también muestran efectos beneficiosos contra el estrés oxidativo, inhibiendo la sobreproducción de radicales libres (Da Ros et al, 2004).

Entre todos los compuestos con potencial antioxidante, destacamos la melatonina y el ácido α -lipoico (LA). El tratamiento de ratas diabéticas con melatonina provocó un aumento de la actividad de la CAT, lo que desencadenó en una disminución de la actividad de la GPx hepática (Maritim et al, 2003). Además, la melatonina también disminuye la peroxidación lipídica en el tejido renal de ratas diabéticas y muestra propiedades beneficiosas en el tratamiento de la neuropatía diabética (Rahman, 2007). Sin embargo, se requieren más estudios que aseguren su eficacia en humanos.

El LA es un potente antioxidante que es capaz de neutralizar las ROS e incrementar los niveles de glutatión y vitamina C (Rahman, 2007; Smith et al, 2004). Así, dada la capacidad antioxidante de LA, se ha aprobado su uso en Alemania para el tratamiento de neuropatías asociadas a la diabetes. Incluso, LA también ha mostrado una mejoría en la retinopatía en ratas con diabetes inducida por STZ (Dene et al, 2005).

LA SILIBININA

I. Hepatoprotectores

Los hepatoprotectores son compuestos que, más que provocar la curación o regeneración del hepatocito lesionado, impide que la situación de éste continúe deteriorándose bajo la influencia del agente agresivo. Los fármacos hepatoprotectores más citados en la literatura son:

- Los aminoácidos y derivados: L-cisteína, N-acetil-L-cisteína, Glutatión.
- Los flavonoides y productos de origen natural: Silimarina.
- Los transmetilantes: S-adenosil-L-metionina.
- Los coleréticos con acción hepatoprotectora: Ácido ursodesoxicólico.

II. Flavonoides

Los alimentos procedentes de las plantas contienen miles de compuestos denominados “**fitoquímicos**”. Entre ellos destacan los carotenoides, inositol fosfato, fitoestrógenos, fitoesteroles, saponinas y polifenoles.

Los polifenoles naturales incluyen desde simples moléculas, como el ácido fenólico, hasta compuestos muy polimerizados, como los taninos. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que constituyen el grupo más común y extensamente distribuido de los polifenoles de origen vegetal. Los flavonoides constan de dos anillos bencénicos unidos por un anillo piránico que contiene oxígeno (**Figura 15**). La familia de los flavonoides está constituida por 13 clases de compuestos (6.000 estructuras diferentes) (**Harborne y Williams, 2000**). Éstas incluyen flavonas, flavonoles, flavanonas, catequinas o flavanoles, antocianidinas, isoflavonoides, además de los derivados de estas estructuras primarias.

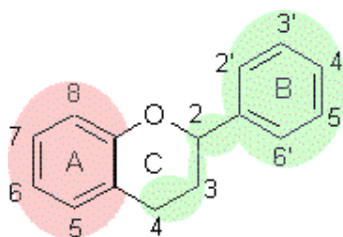


Figura 15. Estructura química de los flavonoides

Los flavonoides son los polifenoles más abundantes en la dieta, con una ingesta diaria media de 1 g. Se encuentran presentes, sobre todo, en frutas y hortalizas y se asocian con un amplio rango de propiedades beneficiosas para la salud (Aherne y O'Brien, 2002; Havsteen, 2002).

III. El cardo mariano

1. Leyenda del Cardo Santo

“Cuenta la leyenda que, en la huida de Egipto, la Virgen María estaba amamantando al niño Jesús y unas gotas de leche se derramaron sobre un cardo y desde entonces sus hojas crecen manchadas de blanco. El cardo quedó bendecido y lleno de virtudes”.

Los extractos del cardo mariano han sido usados como remedios naturales desde los tiempos de la Grecia antigua y del Imperio Romano, así como en la medicina tradicional china (Abenavoli et al, 2008; Ross, 2008).

Las semillas maduras del cardo mariano se usan para tratar alteraciones hepato biliares como la hepatitis, la cirrosis y la ictericia, y para proteger al hígado frente a la intoxicación causada por agentes químicos y ambientales como las mordeduras de serpientes, las picaduras de insectos, el hongo *Amanita phalloides* o el alcohol. (Rambaldi et al, 2005). Aparte de sus propiedades hepatoprotectoras, el cardo mariano también se usa para proteger los riñones frente a diferentes tóxicos, estimular la producción de leche materna y la secreción de bilis, tratar la depresión, bajar los niveles de colesterol y hasta mejorar la psoriasis (Flora et al, 1998).

A pesar de que el cardo mariano tiene utilidad en otros tratamientos, la atención se ha centrado, fundamentalmente, en sus efectos protectores y regeneradores del hígado. El cardo mariano es el agente farmacéutico mejor documentado para el tratamiento de las enfermedades del hígado. Hoy en día, es uno de los remedios herbales más populares utilizados por pacientes con enfermedades hepáticas. En el año 2000, entre todos los suplementos del mercado, el cardo mariano se clasificó como el décimo en las ventas de EE.UU (Richman y James, 2000).

2. Botánica

- **Familia botánica:** Asteraceae
- **Especie medicinal:** *Silybum marianum* (L.) Gaertn.
- **Nombres comunes:** cardo santo, cardo mariano, cardo lechero, cardo borriquero, alcachofa silvestre.

- **Clasificación terapéutica:** PA05. Plantas medicinales colagogas y protectoras hepáticas.
- **Descripción de la planta:** Es una especie herbácea de casi 2 metros de altura con un tallo erecto. Tiene hojas ovaladas distribuidas en roseta con nervios blancos que terminan en espinas. Las flores son rosadas o púrpuras con frutos (aquenios) negros y brillantes con moteado blanco (Figura 16).



Figura 16. El cardo mariano: hojas, flores y semillas

- **Longevidad:** Es una planta bianual que el primer año brota formando, a ras de suelo, un gran rosetón de hojas combadas con bordes espinosos y al siguiente, crece formando un largo tallo rematado con flores de color púrpura.
- **Hábitat:** Crece en terrenos secos y florece entre Julio y Agosto. Se encuentra en el Sur de Europa, norte de África y Oriente Medio y se cultiva en América y en el Sur de Australia.
- **Preparación:** En los preparados químicos curativos se usan las semillas molidas que se extraen fácilmente y en gran cantidad de las flores secas. Las semillas se exprimen para recoger sustancias aceitosas.
- **Fármacos:** Legalon[®], Silarine[®], Cardomarin[®] (cápsulas), Legalon Sil[®] (solución inyectable). Legalon[®] fue introducido en España como fármaco hepatoprotector en 1975 (Figura 17).



Figura 17. Legalon (cápsulas)

3. Bioquímica

Entre 1968 y 1974, científicos alemanes aislaron la silimarina a partir de las semillas secas del cardo mariano, donde es más abundante que en otras partes de la planta (Luper, 1998; Wagner et al, 1974). La silimarina es una mezcla compleja de cuatro isómeros flavonolignanicos: la silibina o silibinina (50-60%), la silicristina (20%), la silidianina (10%) y la isosilibinina (5%), además de otros compuestos (5%) como la taxifolina o la quercetina (Saller et al, 2001).

La silibinina es el componente biológico principal y más activo del cardo mariano por sus propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras y es, en gran parte, responsable de las ventajas atribuidas a la silimarina. Por consiguiente, los parámetros farmacocinéticos de la silimarina y el principio activo de cualquier producto que contenga silimarina son siempre considerados y estandarizados como silibinina. La silibinina natural es una mezcla equimolar aproximada de dos diastereoisómeros A y B.

Otros flavolignanicos identificados en el cardo mariano incluyen dehidrosilibinina, deoxisilicristina, deoxisilidianina, silandrina, silibinoma, silihermina y neosilihermina. Además, el cardo mariano contiene apigenina, silibonol, betaína clorhidrato y los ácidos mirístico, oleico, palmítico y esteárico que pueden tener un efecto hepatoprotector (Abenavoli et al, 2010). La hierba del cardo mariano contiene también cromo, que es importante en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, y otros elementos de interés para la regulación de otras funciones del organismo como hierro, magnesio, manganeso, fósforo, selenio, zinc y estaño (Cuadro 1).

Flavonolignanicos: Silimarina (Silibina o Silibinina, Isosilibinina, Silidianina, Silicristina), Dehidrosilibinina, Deoxisilicristina, Deoxisilidina, Siliandrina, Silibinona, Silihermina, Neosilihermina.

Otros Flavonoides: Taxifolina, Quercetina, Apigenina, Silibonol.

Otros: Ácido mirístico, oleico, palmítico y esteárico; Betaína clorhidrato.

Cuadro 1. Los constituyentes químicos activos del cardo mariano

4. Fitoquímica de la silibinina

La estructura de la silibinina es muy rica en grupos fenólicos (Figura 18). Cuando se forman los radicales libres, es necesario neutralizarlos para impedir daños en los tejidos circundantes, ya que el carácter aromático del grupo fenólico le permite capturar electrones después de la pérdida de un átomo de hidrógeno.

Los experimentos *in vitro* muestran que la silibinina tiene una gran afinidad por los radicales hidroxílicos y poca afinidad por los iones superóxido y por el peróxido de hidrógeno. Cuando nuestro sistema de neutralización de radicales libres no funciona normalmente o cuando la formación de los radicales es excesiva y nuestro sistema de neutralización está desbordado, la silimarina puede realizar esta función fisiológica (Saller et al, 2001).

RH

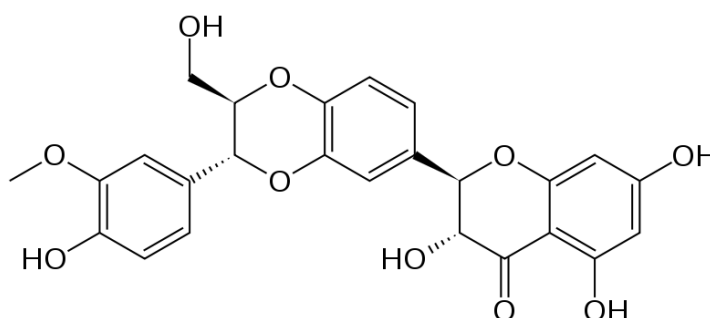


Figura 18. Estructura química de la silibinina

5. Farmacocinética de la silibinina

Después de una administración oral de silimarina en humanos, solamente se absorbe entre un 20-50% de la cantidad ingerida y casi el 80% se excreta por la bilis, mientras que aproximadamente el 10% pasa a la circulación enterohepática. Sin embargo, la mayor parte de los estudios farmacocinéticos se han llevado a cabo con silibinina.

La biodisponibilidad de la silibinina es baja, lo cual se debe, principalmente, a su baja solubilidad en agua (430 mg/l) aunque también parece depender de otros factores como son las sustancias acompañantes de la silibinina y la concentración de la silibinina en la preparación (Voinovich et al, 2009). La solubilidad se mejoró mediante la preparación de la silibinina 3,23-*O*-bis-hemisuccinato que permitió la aplicación intravenosa de la silibinina para el tratamiento de la intoxicación aguda de hígado (Braatz et al, 1985). Los ácidos carboxílicos derivados de la silibinina y de la 2,3-dehidrosilibinina tienen una mejor solubilidad en agua y se preparan mediante procesos de oxidación selectiva (Gazak et al, 2004). Se demostró que la glucosilación mejora también la solubilidad de la silibinina (Kosina et al, 2002), así como la formación de complejos con fosfatidilcolina (IdB 1016, Indena) (Barzaghi et al, 1990; Skottova et al, 2001) o con ciclodextrina (Arcari et al, 1992) e incluso la elección del material de la cápsula (Morazzoni et al, 1992).

Tras la administración oral de una única dosis estandarizada de silibinina de 100 a 360 mg, la C_{\max} de la silibinina en plasma se alcanzó después de aproximadamente 2 horas y osciló entre 200 y 1.400 $\mu\text{g/L}$, de los cuales aproximadamente el 75% se encontraba en forma conjugada (Gatti y Perucca, 1994; Weyhenmeyer et al, 1992). Para la silibinina total, se estima una vida media de eliminación de aproximadamente 6 horas (Pepping, 1999; Saller et al, 2008). Entre el 3 y el 8% de una dosis oral se excreta en la orina, mientras que del 20 al 40% se recupera de la bilis como conjugados de glucurónido y sulfato (Saller et al, 2001; Schandalik et al, 1992). La parte restante, no absorbida, se excreta en las heces.

Las concentraciones de silibinina en la bilis son aproximadamente 100 veces superiores a las encontradas en el suero (10^{-5} a 10^{-4} M de silibinina en la bilis), con un máximo entre 2 a 9 horas. La excreción biliar continúa durante 24 horas después de la administración de una dosis única (Saller et al, 2008).

6. Posología

Un derivado hidrosoluble de silibinina (silibinina dihidrógenosuccinato disódico) está disponible en Europa para el tratamiento de la intoxicación hepática por el hongo *Amanita phalloides*. Legalon[®] se comercializa en forma de cápsulas estandarizadas que contienen 70 o 140 mg de silimarina. Se puede comenzar con una o dos cápsulas al día y aumentar la dosis hasta tres al día, con una dosis máxima de 420 mg.

7. Seguridad y tolerancia

En principio, se considera que la silimarina es un fármaco bastante seguro (Saller et al, 2001). Estudios realizados tanto en animales como en humanos muestran que la silimarina no es tóxica incluso cuando se administra a altas dosis (>1500 mg/día) aunque sí que provoca una mayor secreción de bilis y un aumento del flujo biliar. Los efectos secundarios más frecuentes se suelen asociar con problemas gastrointestinales como hinchamiento, dispepsia, náuseas y diarreas. También causa prurito, dolor de cabeza, exantema, malestar, astenia y vértigo. En ensayos controlados, la frecuencia de estos efectos secundarios se sitúa entre 2% y 10%, que es bastante similar a la observada en el placebo (Pradhan y Girish, 2006).

Sin embargo, se han detectado tres pacientes, tratados con silibinina y que muestran efectos secundarios graves. Así, una mujer de 57 años desarrolló síntomas graves de gastroenteritis (sudores, dolor de estómago, náuseas, vómitos, diarrea)

asociados con colapso. Los otros dos casos mostraron reacciones anafilácticas tras la ingesta de una infusión de *Silybum marianum* (Geier et al, 1990; Jacobs et al, 2002).

Debido a la baja solubilidad de la silibinina, es prácticamente imposible determinar *in vivo* sus concentraciones tóxicas. La silibinina muestra, *in vitro*, una inhibición de la actividad catalítica del citocromo P450 (CYP) a concentraciones mucho mayores que a las alcanzadas en condiciones fisiológicas (Zuber et al, 2002). Así, silibinina no interfiere con la expresión de CYP1A2 y CYP3A4 (Kosina et al, 2005). Estos hallazgos demuestran que la silibinina no causa efectos secundarios en lo que se refiere a interacción con otros fármacos.

8. Acciones fisiológicas de la silibinina/silimarina

8.1. Acciones sobre el hígado

8.1.1. Efectos hepatoprotectores

La silibinina es una molécula con acción hepatoprotectora en muchas situaciones fisiopatológicas que se asocian con estrés oxidativo (Morazzoni y Bombardelli, 1995).

En estudios *in vivo*, se ha demostrado que la silimarina y, particularmente la silibinina, tiene acción protectora contra diversos hepatotóxicos como el acetaminofeno, el etanol, el tetraclorometano, el tolueno, el xileno, la D-galactosamina, la anatoxina y la dimetilnitrosamina (Campos et al, 1989; Chrungoo et al, 1997; Di Sario A. et al, 2005; Faulstich et al, 1980; Favari y Perez-Alvarez, 1997; Muriel y Mourelle, 1990; Wang et al, 1996; Wellington y Jarvis, 2001). También se ha demostrado que protege a los hepatocitos del daño isquémico (Wu et al, 1993), la radiación (Kropacova et al, 1998) y la toxicidad por hierro (Pietrangelo et al, 2002) y por plomo (Shalan et al, 2005). Además, la silimarina revierte la hepatotoxicidad inducida por los fármacos utilizados en la terapia psicotrópica (Allain et al, 1999) y en el tratamiento de la tuberculosis (Tasduq et al, 2005).

La silimarina también ha mostrado efectos regeneradores en ratas sometidas a una hepatectomía. Así, ratas a las que se había extirpado el 70% del hígado y habían sido pretratadas con silimarina muestran una mayor síntesis de ADN, ARN, proteínas y colesterol sugiriendo una regeneración del hígado (Pradhan y Girish, 2006; Srivastava et al, 1994).

Los extractos del cardo mariano, como la silibinina, son ampliamente usados en Europa y Norteamérica para tratar el envenenamiento por el hongo *Amanita phalloides* y han reducido las tasas de mortalidad entre un 60-80% (Saller et al, 2008). En ratones, la silibinina es totalmente efectiva en la prevención del daño hepático si se administra como pretratamiento o hasta 10 minutos después de la intoxicación con *Amanita*. La administración de la silibinina por vía intravenosa (20-50 mg/kg/día durante 3-4 días),

hasta 48 horas después de la ingestión del hongo *Amanita*, parece ser una medida efectiva para prevenir el daño hepático severo (Enjalbert et al, 2002).

8.1.2. Tratamiento de enfermedades hepáticas

En la hepatitis vírica, aunque la silimarina no afecta a la replicación viral, se cree que inhibe la cascada inflamatoria y citotóxica de los fenómenos provocados por la infección vírica (El-Kamary et al, 2009). También mejora el proceso de regeneración y normaliza las enzimas hepáticas (Buzzelli et al, 1993).

Así mismo, la silimarina provocó la normalización de las enzimas hepáticas y de los cambios histológicos en pacientes con enfermedades hepáticas alcohólicas (Feher et al, 1989) y con cirrosis hepáticas (Pares et al, 1998). La silibinina, administrada junto con fosfatidilcolina y vitamina E, también mejoró el daño en enfermos con esteatohepatitis no alcohólica (Federico et al, 2006). Así, en un estudio reciente realizado en un modelo animal de esteatohepatitis no alcohólica, se observó que la administración del complejo fosfatidilcolina-silibinina mejoró la esteatosis, la inflamación, la peroxidación lipídica, el estrés oxidativo y la insulinemia (Haddad et al, 2009).

8.1.3. Acciones de la silimarina sobre el metabolismo lipídico

Como la silimarina puede inhibir la síntesis hepática del colesterol, se ha sugerido que los productos del cardo mariano sean investigados como tratamiento para enfermos con hipercolesterolemia (Skottova y Krecman, 1998). En un estudio clínico con pacientes hiperlipidémicos, el tratamiento con silimarina se ha asociado con una disminución del colesterol total y un aumento de la proporción de colesterol en las HDL (Somogyi et al, 1989).

8.2. Efecto antidiabético

En el páncreas, la silibinina puede actuar principalmente como un quimioprotector y puede estimular la recuperación tras una intoxicación (Kren y Walterova, 2005). En ratas, la silimarina no solamente tiene un efecto protector frente a la diabetes mellitus inducida por el aloxano, sino que también induce la recuperación del páncreas (Soto et al, 2004) y aumenta las enzimas antioxidantes (Soto et al, 2003). Así pues, la silimarina representa una nueva posibilidad en el tratamiento de la diabetes mellitus, no sólo por los niveles aumentados de insulina, sino también por la recuperación de la función pancreática. La silibinina se probó también para la protección contra la toxicidad inducida por la ciclosporina A en el páncreas endocrino y exocrino de ratas (von Schonfeld et al, 1997), de allí su utilidad en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

La silimarina también inhibe la producción de citoquinas inflamatorias por parte de los macrófagos y de los linfocitos T (Cho et al, 2000; Kang et al, 2004), que probablemente, inician la destrucción de las células β en el desarrollo de la diabetes tipo

1. Maghrani y colaboradores confirmaron la acción antihiper glucemiante de extractos acuosos de las partes aéreas de *Silybum marianum* en ratas sanas y en un modelo de diabetes experimental inducida por la administración de estreptozotocina (Maghrani et al, 2004).

La administración oral de silimarina durante 1 año a enfermos alcohólicos con cirrosis hepática y diabetes tipo 2 causó disminuciones significativas tanto de la glucemia en ayunas, como del nivel diario medio de glucosa sanguínea, la glucosuria, la hemoglobina glicosilada (HbA1c), las necesidades de insulina y los niveles de malonaldehído (MDA) (Velussi et al, 1997). La silibinina también mejoró la resistencia a la insulina en enfermos con esteatohepatitis no alcohólica (Federico et al, 2006).

El tratamiento con silimarina durante 4 meses de pacientes diabéticos tipo 2 también causó un descenso en los niveles de glucosa sanguínea, HbA1c, LDL, colesterol total y triglicéridos (Huseini et al, 2006). Otro estudio clínico con diabéticos tipo 2 mostró que, después de un tratamiento a largo plazo, la silibinina-beta-ciclodextrina provocaba una disminución de los niveles de la glucosa sanguínea (Lirussi et al, 2002). En otro estudio posterior se combinó la silimarina con el antidiabético oral glibenclamida, de tal manera que dicha combinación mejoró el control glucémico con respecto a la monoterapia con la glibenclamida (Hussain, 2007). Por otra parte, se ha observado que la silibinina, a corto plazo, ejerce una inhibición de la gluconeogénesis y de la glucólisis en hepatocitos en perfusión, lo cual se debe a una inhibición de la actividad de la G6Pasa y de la PK (Detaille et al, 2008; Guigas et al, 2007).

8.3. Acciones sobre el riñón

La silibinina tiene un efecto estimulador sobre las células renales muy similar al descrito en las células del hígado. En las células renales dañadas *in vitro* por el paracetamol, el cisplatino y la vincristina, la administración de silibinina, antes o después del daño inducido, puede reducir o evitar los efectos nefrotóxicos (Sonnenbichler et al, 1999). Estos resultados se repitieron en otros estudios *in vivo*, realizados recientemente (Karimi et al, 2005). La silibinina se usó así mismo en el tratamiento de enfermos en el último estadio de la nefropatía diabética, dando resultados positivos (Dietzmann et al, 2002).

8.4. Acciones antineoplásicas

8.4.1. Efecto quimioprotector y anticancerígeno

Debido a sus efectos quimiopreventivos, la silibinina inhibe la acción carcinógena de muchos productos químicos (Dorai y Aggarwal, 2004). La silimarina inhibió la carcinogénesis de la piel inducida por el benzoil peróxido (Zhao et al, 2000). La silimarina también inhibió el crecimiento y favoreció la muerte de las células del carcinoma de próstata humano (Bhatia y Aggarwal, 2001). La silimarina y la silibinina

inhibieron de manera significativa el crecimiento celular *in vitro* del cáncer de colon (Yang et al, 2003). La combinación de la doxorubicina con la silibinina se probó también en el tratamiento del cáncer de pulmón (Singh et al, 2004).

Tanto la silimarina como la silibinina tienen efectos preventivos contra la fotocarcinogénesis como se ha demostrado en varios modelos animales de cáncer. La silibinina inhibió la fotocarcinogénesis cuando se aplicó superficialmente o bien cuando se administró con la dieta (Mallikarjuna et al, 2004).

8.4.2. Efecto en la terapia adyuvante del cáncer

La silibinina se puede usar también como adyuvante potencial en la terapia del cáncer de otros quimioterapéuticos, ya que debido a su capacidad antioxidante protege a los tejidos frente al estrés oxidativo generado por los quimioterapéuticos y elimina su hepatotoxicidad (Ladas y Kelly, 2003). La silibinina mejoró la citotoxicidad del cisplatino en las células cancerosas ováricas (Giacomelli et al, 2002), mejoró el potencial terapéutico de la doxorubicina en las células del carcinoma de mama en mujeres (Tyagi et al, 2004) y mostró una alta eficiencia como tratamiento adyuvante en el cáncer de próstata (Dhanalakshmi et al, 2002).

8.5. Acciones sobre el sistema nervioso

La silibinina o la silimarina pueden ser útiles en el tratamiento y la prevención de algunos procesos neurodegenerativos y neurotóxicos. La silimarina protege las neuronas dopaminérgicas frente a la neurotoxicidad inducida por liposacáridos (Wang et al, 2002). Un extracto de las semillas de *Silybum marianum* aumentó la diferenciación de neuronas en cultivo y previno la apoptosis inducida (Kittur et al, 2002). Además, la silimarina protegió el cerebro de ratas frente al estrés oxidativo inducido por acetaminofeno (Nencini et al, 2007).

8.6. Acciones gastrointestinales

La actividad intestinal anti-inflamatoria de varias dosis de silimarina se probó en la etapa aguda de la colitis causada por el ácido trinitrobenzenosulfónico (Cruz et al, 2001). El pretratamiento oral con silimarina atenuó el daño macroscópico del colon y redujo la actividad de la mieloperoxidasa, llevando a una mejora del estrés oxidativo. El extracto del cardo mariano posee una actividad anti-ulcerogénica dosis-dependiente en un modelo de úlcera gástrica de rata inducida por indometacina (Khayyal et al, 2001).

8.7. Acciones cardiovasculares

La silibinina puede ser muy eficaz como cardioprotector durante el tratamiento del cáncer con fármacos cardiotóxicos como la doxorubicina (Psotova et al, 2002). Se ha comprobado que la administración de silibinina con el fármaco antiarrítmico

amiodarona disminuye los efectos secundarios tóxicos de este fármaco (Agoston et al, 2003).

En un modelo experimental de aterosclerosis en conejos, la silimarina normalizó el metabolismo lipídico e inhibió los cambios ateroscleróticos (Bialecka, 1997).

8.8. Acciones pulmonares

La silimarina también tiene un efecto protector en la fase temprana del asma alérgica. Este efecto puede estar relacionado con la capacidad del flavonoide para reducir la respuesta bronquial a la histamina y, en consecuencia, la respuesta anafiláctica (Breschi et al, 2002).

8.9. Acciones sobre la lactancia

Los extractos del cardo mariano estimulan la lactancia en vacas (Tedesco et al, 2004) y en mujeres (Di Pierro et al, 2008). El mecanismo de acción por el cual la silimarina estimula la lactancia se desconoce aunque se ha podido observar que incrementa los niveles circulantes de prolactina en ratas (Capasso et al, 2009). Ante estos resultados, la silimarina puede considerarse un buen fármaco para el tratamiento de la insuficiencia láctica.

9. Mecanismos de acción de la silibinina/silimarina

Los mecanismos que explican las acciones de la silibinina y la silimarina son diversos y variados. Se deben, sobre todo, a sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y a sus efectos sobre la permeabilidad de la membrana y la expresión del ADN (Saller et al, 2001) (Figura 19).

9.1. Regulación de la permeabilidad de la membrana celular

Se ha descrito una acción reguladora de la silimarina sobre la permeabilidad de la membrana celular y mitocondrial asociada con un incremento de la estabilidad de la membrana contra el daño xenobiótico (Munter et al, 1986; Wu et al, 2003). Así, previene la absorción de toxinas por los hepatocitos ocupando sus sitios de unión a la membrana e inhibiendo algunas proteínas de transporte (Faulstich et al, 1980). Un claro ejemplo de este mecanismo de acción es el bloqueo del mecanismo de transporte de las toxinas faloidina y amanitina, responsables de la intoxicación hepática causada por el hongo *Amanita phalloides* (Saller et al, 2007; Wellington y Jarvis, 2001).

9.2. Efecto anti-inflamatorio

La silimarina tiene un efecto anti-inflamatorio significativo. Varios estudios han demostrado este efecto que incluye: estabilización del mastocito (Jeong et al, 2005), inhibición de la migración de los neutrófilos (Schumann et al, 2003), inhibición de las células de Kupffer (Al-Anati et al, 2009) y una fuerte inhibición de la síntesis de leucotrienos y de la formación de prostaglandinas (Dehmlow et al, 1996).

9.2.1. Inhibición de la lipoxigenasa

A las concentraciones de silibinina alcanzadas *in vivo*, la inhibición de la vía de la 5-lipoxigenasa, y en concreto de la síntesis de leucotrieno B₄ (LTB₄) puede representar una propiedad farmacológica esencial de la silimarina (Dehmlow et al, 1996).

9.2.2. Inhibición del factor de transcripción NF-κB

Las bases moleculares de los efectos anti-inflamatorios y anticarcinogénicos de la silibinina pueden estar relacionadas con la inhibición del factor de transcripción NF-κB que regula y coordina la expresión de varios genes involucrados en el proceso inflamatorio, en la citoprotección y en la carcinogénesis.

La silimarina bloqueó la activación del NF-κB inducida por varios agentes inflamatorios así como su unión al ADN (Manna et al, 1999; Saliou et al, 1998). La inhibición del NF-κB se hace, probablemente, mediante la inhibición del IKKβ que es un mediador común en la resistencia a la insulina inducida por el exceso de ácidos grasos. Esto puede explicar, en parte, los efectos antidiabéticos de la silimarina (McCarty, 2005).

La silimarina inhibió también la activación de las quinasas y de las caspasas inducidas por TNF-α (Saller et al, 2008). Al igual que la silimarina, fármacos anti-inflamatorios como el salicilato sódico o la aspirina bloquean la activación de NF-κB evitando la degradación de IκBα. Sin embargo, es más efectiva a una concentración 100 veces menor que tales fármacos por lo que se considera un inhibidor potente sin toxicidad aparente. Kang y colaboradores observaron que la silimarina ejerce también un efecto inhibitorio sobre la producción de óxido nítrico (NO) y sobre la expresión génica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos de ratón a través de una supresión de la activación del sistema NF-κB/Rel (Kang et al, 2002).

9.3. Secuestro de las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Los efectos citoprotectores de la silibinina se deben, fundamentalmente, a sus propiedades antioxidantes y de secuestro de ROS. De hecho, la estructura fenólica de la silibinina le permite formar complejos estables con O₂⁻ y HO⁻ (Das y Vasudevan, 2006). Así, en estudios *in vitro* realizados tanto en hepatocitos como en mitocondrias hepáticas

aisladas de rata, se ha podido observar que la silibinina, a bajas concentraciones, inhibe la formación de ROS a nivel mitocondrial (Detaile et al, 2008). En estudios *in vivo* la silimarina también reduce la formación de ROS, de modo que en ratas expuestas a concentraciones tóxicas de acetaminofeno, incrementó los niveles de GSH y SOD (Abenavoli et al, 2010).

La toxicidad alilo alcohol asociada con la peroxidación lipídica y el agotamiento del glutatión fue eficientemente contrarrestada por la silimarina, así como por la silibinina a altas concentraciones (Miguez et al, 1994). Se demostró que la incubación *in vitro* con silimarina a una concentración equivalente a la dosis terapéutica usual, y que el tratamiento *in vivo* aumenta notablemente la expresión de la superóxido dismutasa (SOD) en linfocitos de pacientes con cirrosis alcohólica (Feher et al, 1988; Pradhan y Girish, 2006).

9.4. Acción sobre la expresión del ADN y sobre la apoptosis

Uno de los mecanismos que explica la capacidad de la silimarina de estimular la regeneración hepática es el aumento de la síntesis proteica. Experimentos en hígados de rata *in vitro* e *in vivo* demostraron aumentos significativos en la formación de ribosomas y en la síntesis de ADN y proteínas. Este efecto de la silibinina se logra en tejido hepático dañado por tóxicos y por hepatectomía, pero en tejido hepático tumoral no existe aumento en la síntesis proteica, ni incremento en la síntesis de ADN (Sonnenbichler et al, 1986). El mecanismo por el cual la silibinina incrementa la síntesis proteica es desconocido, pero probablemente es capaz de penetrar en el núcleo, estimulando específicamente a la ARN polimerasa I e incrementando la síntesis de ribosomas (Pradhan y Girish, 2006).

La silibinina regula el desequilibrio entre la supervivencia de la célula y la apoptosis alterando la expresión de proteínas, implicadas en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis (Ramasamy y Agarwal, 2008). Así, la silibinina puede ejercer, al menos parcialmente, su efecto anticancerígeno inhibiendo la angiogénesis mediante la inducción de la apoptosis endotelial vía la modulación del NF- κ B, la familia Bcl-2 y las caspasas (Li et al, 2010; Yoo et al, 2004). En células de cáncer de colon humano, se ha observado que la silibinina tiene efectos antiproliferativos y apoptóticos, de modo que a corto plazo detiene el ciclo celular en la etapa G0/G1 mientras que, a altas dosis y a largo plazo, para el ciclo en la etapa G2/M. Estos resultados indican que la silibinina modula la actividad de las ciclinas, de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) y de los reguladores de dichas quinasas (Agarwal et al, 2003).

9.5. Efectos antifibróticos

Se ha demostrado que la silimarina es capaz de retardar o de revertir la fibrosis hepática (Wang y Jia, 2005). La silibinina redujo la conversión de las células estrelladas en fibroblastos y reguló la expresión génica de componentes de la matriz extracelular,

necesaria para la fibrosis (Gebhardt, 2002). Después de la oclusión biliar total en ratas, la silimarina fue capaz de reducir la fibrosis en un 30%, en comparación con los animales controles (Boigk et al, 1997) ya que reduce los niveles de ARNm del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) (Jia et al, 2001). Utilizando el modelo de fibrosis hepática inducida por tetracloruro de carbono, la silimarina mostró ser similar a la colchicina en la prevención de la fibrosis hepática, pero sin causar sus efectos secundarios (Favari y Perez-Alvarez, 1997). Así, la silimarina es capaz de inhibir la formación de colágeno reactivo en hígados de animales con fibrosis.

9.6. Inmunomodulación

La silibinina incrementa la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I) en células neurales y de neuroblastoma, lo cual es esencial para la identificación de patógenos intracelulares por las células T citotóxicas y para eliminar los virus del sistema nervioso central. Así, la silimarina podría ser útil para el tratamiento de la encefalitis (Sakai et al, 2001). Por otra parte, diferentes investigadores han estudiado los efectos inmunomoduladores de la silimarina en hepatopatías. Dos estudios demostraron un efecto positivo de la silimarina sobre la función inmune en enfermos con hepatopatía alcohólica crónica (Deak et al, 1990) y con cirrosis alcohólica (Lang et al, 1990).

9.7. Inhibición de la β -glucuronidasa

La silibinina puede actuar en el colon como inhibidor específico de la β -glucuronidasa bacteriana intestinal. Así, mejora la hepatoprotección durante el metabolismo de los xenobióticos, lo que permite su excreción biliar en forma de glucurónidos (Kim et al, 1994).

9.8. Inhibición del citocromo P450

Paradójicamente, la silimarina puede tener un efecto inhibidor sobre el sistema de detoxificación del citocromo P450. En un estudio en animales, la silibinina demostró inhibir varias enzimas específicas del citocromo P450 (Baer-Dubowska et al, 1998). Otros investigadores han demostrado la falta de efecto estimulador sobre el sistema de detoxificación P450 (Miguez et al, 1994). Este hecho puede explicar algunos de los efectos hepatoprotectores de la silimarina, especialmente contra el envenenamiento por el hongo *Amanita*. La inhibición de la bioactivación de esa toxina por el citocromo P450 puede reducir sus efectos tóxicos. Además, la silimarina y otros antioxidantes ofrecen cierta protección contra los radicales libres generados por las enzimas del citocromo P450 (Amdur et al, 1991).

9.9. Modulación de los transportadores de los fármacos

La resistencia a los fármacos (MDR) representa un problema creciente en el tratamiento del cáncer y de las infecciones bacterianas. Uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los fármacos implica su agotamiento en las células por proteínas de la membrana como, por ejemplo, la glucoproteína P (PgP). La silibinina es un inhibidor de la PgP (Dzubak et al, 2006; Maitrejean et al, 2000) e interactúa también con otros transportadores de fármacos como la proteína 1 asociada a la resistencia a fármacos (MRP1) (Nguyen et al, 2003).

9.10. Interacción con receptores de hormonas esteroideas

Los efectos antiestrogénicos y antiandrogénicos de algunos compuestos polifenólicos conducen a la inhibición de la proliferación de las células cancerosas dependientes del receptor de hormonas esteroideas. Ambas, silimarina y silibinina, muestran una actividad antiandrogénica en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP (Thelen et al, 2004; Zhu et al, 2001).

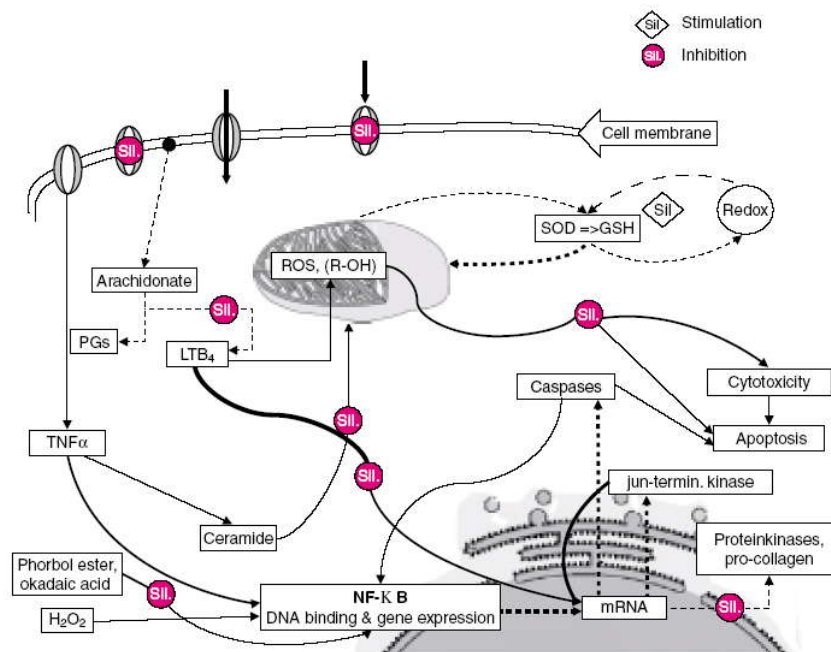


Figura 19. Esquema de los principales efectos farmacológicos de la silimarina relacionados con sus propiedades hepatoprotectoras

Se ilustran los efectos sobre las membranas celulares y las cascadas intracelulares. Las vías metabólicas están indicadas mediante líneas discontinuas y los efectos sobre la señalización mediante líneas continuas. LTB4: leucotrieno B4; GSH: glutatión; NF-κB: factor nuclear κB; PG: prostaglandinas; Sil: silimarina; SOD: superóxido dismutasa; ROS: especies reactivas de oxígeno; TNF-α: factor de necrosis tumoral.

MATERIA Y MÉTODOS

I. Animales: Tipo y alimentación

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 realizados en este trabajo, las ratas se sometían a ayuno durante las 24 horas previas al experimento para agotar las reservas de glucógeno hepático y así estudiar únicamente el efecto de los substratos exógenos sobre el metabolismo.

En todo momento, se cumplieron las condiciones de la ética en el tratamiento y la experimentación animal dictadas por el Consejo de Europa (*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*).

Para el presente trabajo se usan dos modelos experimentales: un modelo nutricional de dieta rica en fructosa, que causa resistencia a la insulina y un modelo genético de obesidad y diabetes tipo 2, caracterizado por la ausencia del gen de la leptina (fa/fa). A continuación, pasamos a exponer cada uno de los grupos experimentales y dietas empleadas en el estudio de la capacidad de reversión de la silibinina sobre las alteraciones metabólicas, presentes en cada uno de estos modelos.

Cabe destacar que la mayor parte de los experimentos presentados en esta Tesis Doctoral se realizan con el modelo nutricional de la dieta rica en fructosa, mientras que el modelo genético de las ratas Zucker obesas diabéticas (ZDF) solamente se usa para confirmar los efectos generales de la silibinina sobre el metabolismo hepático (glicólisis y gluconeogénesis).

1. Modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Para este primer modelo experimental, se usan ratas macho (para evitar las variaciones metabólicas de origen hormonal) de la raza Wistar procedentes de los laboratorios Charles River (Francia) y posteriormente procreadas en el animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca.

Ratas de seis semanas (180-200 gramos) se dividen en cuatro grupos experimentales:

Grupo 1: Control. Ratas que reciben una dieta estándar (Harlan Global Diet 2014, Italia) durante 6 semanas, además de una inyección intraperitoneal diaria del vehículo en el que se disuelve la silibinina durante las dos semanas previas al sacrificio.

Grupo 2: Fructosa. Ratas que reciben una dieta rica en fructosa (60%) (Harlan, Madison, WI) durante 6 semanas, además de una inyección intraperitoneal diaria de vehículo durante las dos últimas semanas de tratamiento.

Grupo 3: Fructosa + Silibinina. Ratas que reciben una dieta rica en fructosa (60%) durante 6 semanas, además de una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante las dos últimas semanas de tratamiento.

Grupo 4: Control + Silibinina. Ratas que reciben una dieta estándar durante 6 semanas, además de una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante las dos últimas semanas antes del sacrificio.

La composición de las dietas usadas se presenta en la Tabla 1.

Ingredientes	Dieta estándar	Dieta rica en fructosa
Carbohidratos (disponibles)	50	-
Fructosa	-	60
Caseína	20.7	20.7
Grasas	5	5
Celulosa	18	8
DL-Metionina	0.3	0.3
Complejo mineral	5	5
Complejo vitamínico	1	1

Tabla 1. Composición de la dieta (g/100 g)

Las ratas pertenecientes a cada uno de los grupos experimentales, se pesan 2 veces por semana y se controla la cantidad de agua y de dieta consumidas diariamente.

2. Modelo genético de obesidad y diabetes tipo 2

En este modelo, se usaron ratas ZDF macho (*Zucker diabetic fatty rats*) procedentes de los laboratorios Charles River (Francia) y posteriormente cuidadas en el animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca.

Este modelo experimental exige usar ratas delgadas como control. Dichas ratas son silvestres (+/+) o heterocigóticas (+/fa) para la mutación del gen de la leptina y no desarrollan resistencia a la insulina. Teniendo en cuenta estas características, se establecen los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1: Ratas Delgadas. Ratas silvestres o heterocigóticas para el gen de la leptina y que recibieron una inyección intraperitoneal diaria del vehículo en el que se disuelve la silibinina durante las dos semanas anteriores al sacrificio.

Grupo 2: Ratas ZDF. Ratas que presentan la mutación en el gen de la leptina y que recibieron una inyección intraperitoneal diaria de vehículo durante las dos semanas previas al sacrificio.

Grupo 3: Ratas ZDF + Silibinina. Ratas que presentan la mutación en el gen de la leptina y que además recibieron una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante dos semanas.

Grupo 4: Ratas Delgadas + Silibinina. Ratas silvestres o heterocigóticas para el gen de la leptina y que recibieron una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante dos semanas.

Los animales fueron alimentados a base de una dieta estandarizada (Harlan Global Diet 2014, Italia). Las ratas se pesan 2 veces por semana a partir de la novena semana de vida y se controla la cantidad de agua y de dieta consumidas diariamente.

En ambos modelos experimentales, la silibinina se disuelve en una solución acuosa que contiene 0,9% NaCl y 0,04% Tween 80. Además, dada la baja solubilidad de la silibinina en agua, era necesario calentar ligeramente dicho vehículo.

II. Productos y Medios Instrumentales

1. Productos

Abbott (Francia): Heparina.

Air liquide (Valladolid): Carbógeno

American Radiolabeled Chemicals (Saint Louis, USA): [1-¹⁴C]-glucosa y [6-¹⁴C]-glucosa.

Fisher Scientific (Madrid): Líquido de centelleo

Hospira (Madrid): Tiopental sódico.

Invitrogen (Barcelona): Calcium-green

Merck-Schuchardt (Alemania): Dihidroxiacetona (DHA), o-Ftaldialdehído, Tween 80.

Panreac (Barcelona): Ácido fosfórico (H₃PO₄), Cloruro potásico (KCl), Fosfato dipotásico (K₂HPO₄), Fosfato monopotásico (KH₂PO₄), Fosfato sódico monobásico (NaH₂PO₄), Fosfato sódico dibásico (Na₂HPO₄), Glucosa (Panreac), Hidróxido sódico (NaOH), Sacarosa, Sulfato de cobre (Cu₂SO₄).

Roche (Barcelona): Adenosina-5'-trifosfato (ATP), Fosfoenolpiruvato (PEP), Fosfoglucoisomerasa (PGI) (EC 5.3.1.9), Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (EC 1.1.1.8), Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ y NADP⁺ (G6PDH) (EC 1.1.1.49), Hexoquinasa (HK) (EC 2.7.1.1), Lactato deshidrogenasa (LDH) (EC 1.1.1.27), Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADP⁺), Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺), Piruvato quinasa (PK) (EC 2.7.1.40)

Sigma-Aldrich (Madrid): Acetil-CoA, Ácido 3-morfolino-propano sulfónico (MOPS), Ácido L-ascórbico, Ácido dinitrobenzoico (DNTB), Ácido clorhídrico de trietanolamonio (TRA-HCl), Ácido cólico, Ácido etilendiaminotetracético (EDTA), Ácido etilenglicoltetracético (EGTA), Ácido glutámico, Ácido málico, Ácido perclórico (HClO₄), Ácido succínico, Adenosina-5'-difosfato (ADP), Agua oxigenada (H₂O₂), Amplex Red, Antimicina A, β-glicerofosfato, Bicarbonato sódico (NaHCO₃), Cianuro de potasio (KCN), Citocromo c, Cloruro cálcico (CaCl₂·H₂O), Cloruro sódico (NaCl), Cloruro de magnesio (MgCl₂), Cloruro sódico (NaCl), Colagenasa (EC 3.4.24.3), Decilubiquinona, Dicloroindofenol (DCIP), Digitonina, Dinitrofenol (DNP), Ditionito de sodio, Ditiotreitól (DTT), Enolasa (EC 4.2.1.11), Ferricianuro potásico,

Fosfoglicerato mutasa (PGM) (EC 5.4.2.1), Glutación oxidado (GSSG), Glutación reducido (GSH), Fluoruro de sodio (NaF), Glicerol, Glicina, Glucosa 6-fosfato (G6P), Hidrato de hidracina, Hidróxido de bencetonio, Hidróxido potásico (KOH), Molibdato de amonio, N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilenediamina (TMPD), N-etilmaleimida (NEM), Nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH), Oligomicina, Oxalacetato (OAA), Peroxidasa de rábano picante (HRP), Rotenona, Seroalbúmina bovina (BSA), Seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos, Silibinina, Sodio citrato, Sodio meta-arsenito, Sulfato de amonio, Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Tris-HCl, Tritón X-100, Trizma base,

Wacker (Alemania): Aceite de silicona

2. Medios Instrumentales

Las **pesadas** se realizaron en una balanza analítica 770 de la empresa Kern (Alemania). Para pesar los animales se utilizó una balanza de precisión de Kern (Alemania).

La **determinación del pH** se realizó con un pH-metro cyberscan pH 1100 de Eutech Instruments (Países Bajos).

Las **agitaciones** se hicieron con un agitador tipo MS2 de IKA (Duero Lab, Salamanca).

Las **centrifugaciones** se realizaron en una centrífuga 5810R de Eppendorf (Alemania), una centrífuga Hermle Z 360 K (Madrid), centrífuga Eppendorf minispin (Duero Lab, Salamanca) y una ultracentrífuga Optima TL de Beckman (EEUU)

Las **incubaciones** se llevaron a cabo en un baño con termostato y agitación de Memmert (Madrid).

Los elementos del sistema de aislamiento de hepatocitos son:

- Bomba peristáltica 913 Mity Flex de WPI (Inglaterra)
- Baño con termostato de Selecta (Barcelona)

Para las **homogenizaciones** se usó un potter de Álamo (Madrid).

Para las **sonicaciones** se utilizó el sonicador (Sartorius, Cabsonic, Alemania) y el Ultraturrax (IKA Labortechnik, Alemania).

La **oxigrafía** se realizó en una cámara de oxigrafía (Heito, Francia) con un electrodo de Clarck (OXM 204, Heito, Francia) y un registrador (L6512, Linseis, EEUU).

Los **filtros** de jeringa 0,22 μm fueron de tipo Acrodisc (EEUU).

Las **medidas espectrofotométricas** se realizaron en un espectrofotómetro Specord 205 de Analytik Jena (Alemania).

Las **medidas espectrofluorimétricas** se realizaron con un fluorímetro de la casa Hitachi modelo F-2500 (Tokio, Japón).

La **medida de la radiactividad** se realizó en un contador de centelleo de Beckman (EEUU).

La **medida del glutatión** se realizó en un lector de placas Fluoroskan Ascent FL de Thermo Fisher Scientific (Madrid).

La **determinación de la concentración de proteínas** se realizó usando un lector de placas iMark™ Microplate Reader de Bio-Rad Laboratories (EE.UU.).

III. Técnicas experimentales

1. Extracción de sangre

La sangre se obtiene a partir de la vena yugular de las ratas. Para ello, los animales se anestesian por inyección intraperitoneal de tiopental sódico (12,5 mg/100 g peso corporal). Se coloca a la rata en posición decúbito supino, se aísla la vena yugular y se introducimos un catéter de 1 mm de diámetro. La sangre se recoge en tubos heparinizados de 4 ml (BD Vacutainer®, EE.UU.). La extracción de sangre se realiza hasta que se logra la exsanguinación del animal.

Los tubos se centrifugan durante 10 minutos a 3000 g, 4°C. Al final de la centrifugación, se recupera el sobrenadante ya que éste se corresponde con el plasma sanguíneo y sobre él se realizan las determinaciones bioquímicas y hormonales.

2. Aislamiento de hepatocitos

2.1. Principio

Los hepatocitos de los diferentes grupos experimentales se aíslan según la técnica de Berry y Friend (Berry y Friend, 1969) modificada por Groen y colaboradores (Groen et al, 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 de 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 del aislamiento, la presencia de 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 ₄ ·7H ₂ O, 1,2 mM KH ₂ PO ₄ , 24 mM NaHCO ₃ ; pH 7,4
Solución II	500 ml Solución I más 1,3 mM Ca ²⁺ ; pH 7,4
Solución III	60 ml de Solución II con 20 mg de colagenasa

2.2. Procedimiento de aislamiento

Las ratas se anestesian por inyección intraperitoneal de tiopental sódico (12,5 mg/100 g 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 impedir la formación de microtrombosis intrahepáticas que perjudicarían la oxigenación del órgano durante el proceso de aislamiento.

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 minutos, a una velocidad de 25 ml/min, con la solución I (termostatizada a 37°C y saturada con carbógeno (95% O₂ – 5% CO₂)) 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 introduce en la vena suprahepática a través de la aurícula derecha del corazón. Comienza así una *perfusión retrógrada* del hígado durante 20 minutos, 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 se coloca encima de un soporte (**Figura 1a**).

Pasados los 20 minutos, el hígado se perfunde en un sistema recirculante con la solución III (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 generalmente está 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.

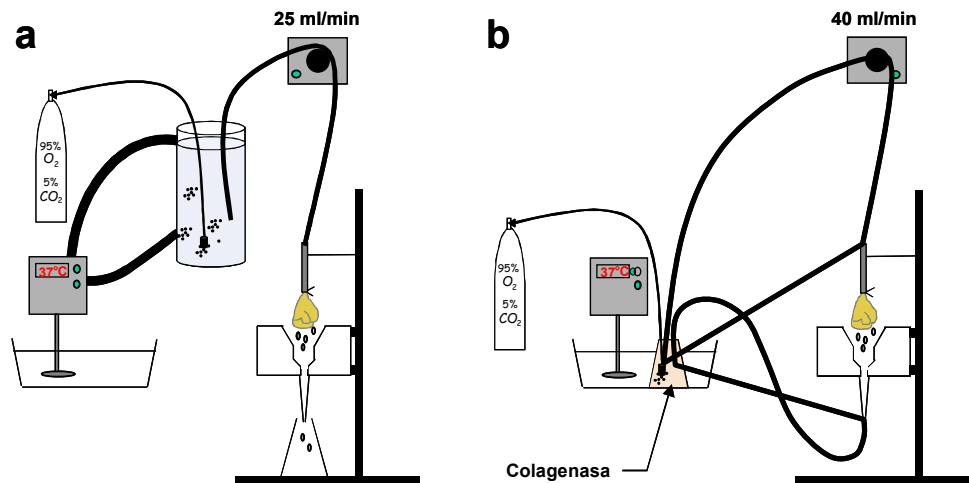


Figura 1. Sistema de perfusión retrógrada del hígado

(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 con carbógeno (95% O₂ – 5% CO₂) 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 colocada en un erlenmeyer donde el líquido está termostatizado y saturado con carbógeno.

Al final de la perfusión con la solución III, el hígado se separa del riñón y de los 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, en 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, 2 min, 4°C). Al final de esta primera centrifugación a baja velocidad, el sobrenadante de cada tubo se elimina y el sedimento se resuspende con la solución II (previamente saturada en carbógeno y conservada a 4°C en 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, 2 min, 4°C). 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 parenquimatosas. 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.

2.3. Apreciación de la suspensión celular

2.3.1. 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 del medio, 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 de 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.

2.3.2. 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 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 seco 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 última 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, aproximadamente, 465000 células (**Berry y Friend, 1969**).

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

3. Preparación de mitocondrias aisladas

Las mitocondrias se aislaron a partir de hígados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los distintos grupos experimentales y con un peso corporal medio de 350 gramos. Los animales tenían acceso *ad libitum* a la comida (dieta estándar o dieta rica en fructosa) y al agua.

3.1. Principio

El principio del aislamiento de las mitocondrias se basa en la técnica de fraccionamiento de los compuestos celulares por centrifugación diferencial (**Klingenberg M. y Slenczka, 1959; Romestaing et al, 2008**).

3.2. Procedimiento de aislamiento

La clave para un buen 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 lleve a cabo en cámara fría, toda la manipulación con las mitocondrias siempre se hace sobre el hielo. Dado que la anestesia modifica las propiedades de las membranas mitocondriales, las ratas se sacrifican de forma rápida mediante dislocación cervical. Después de una laparotomía media, el hígado se extrae y se enfría por inmersión en un tampón de homogenización (250 mM sacarosa, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA; pH 7,2) a 4°C. Luego se corta 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 obtenido se centrifuga (800 g, 10 min, 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 min, 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 y así, realizar una tercera y última centrifugación (8000 g, 10 min, 4°C). Después de la eliminación del sobrenadante, el sedimento mitocondrial final se pone de nuevo en suspensión con 500 µl del tampón de homogenización y se conserva a 4°C en hielo.

3.3. Determinación de la concentración de proteínas mitocondriales

La determinación de la concentración de proteínas 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 Bardawill, 1948) y se expresa en mg de proteínas por ml. La suspensión mitocondrial (25 μ l) se solubiliza con 200 μ l de colato de sodio 4% (m/v). Después de 10 minutos, se añaden 2.75 ml de NaOH 10% (m/v) y 300 μ l 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*.

IV. 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 Ámsterdam (Holanda) (Van Der Meer y Tager, 1976) y posteriormente fue modificada por Groen y Tager (Groen et al, 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 de 15 ml termostatizadas 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% O₂ – 5% CO₂). 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. Dicha salida se realiza a través de un filtro de acetato de celulosa, de 12 µm de diámetro de poro, que permite la salida del perfusato 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 es 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 administran a las células de manera continua y como el medio de perfusión o “*perifusato*” se renueva permanentemente, no hay limitación de sustratos, ni acumulación de productos. Otra ventaja importante es que al tener dos cámaras de perfusión, se permite el uso del mismo tipo de células en dos condiciones experimentales diferentes o de dos tipos de hepatocitos procedentes de animales con diferentes tratamientos, como es el caso de la presente Tesis Doctoral.

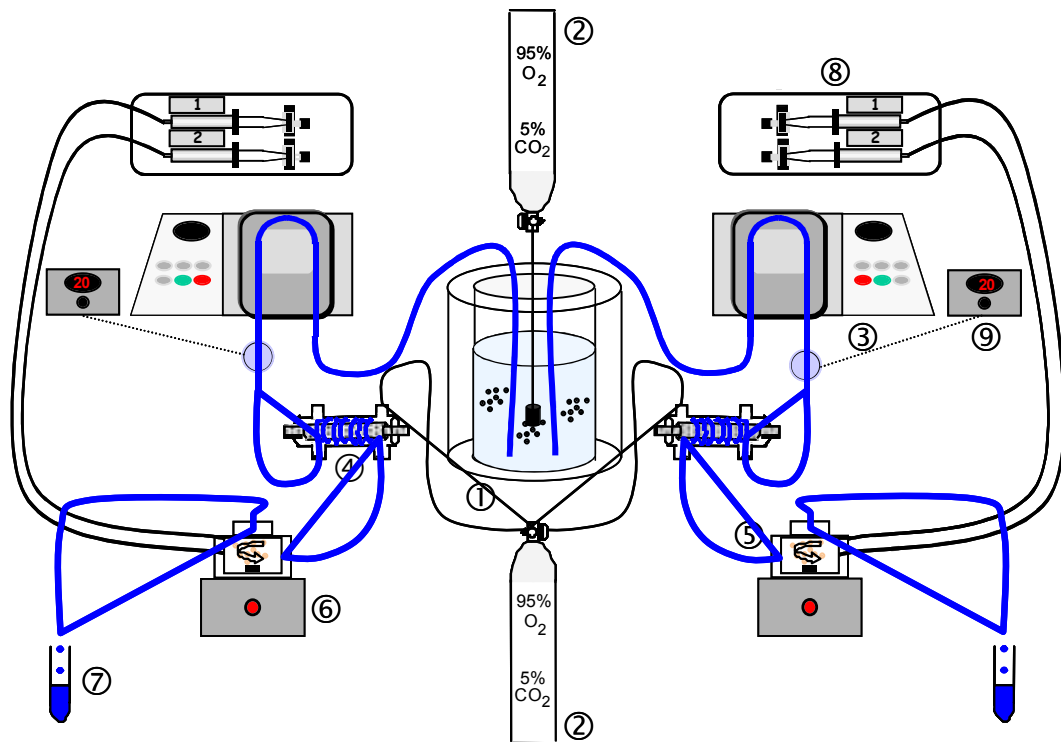


Figura 2. Esquema del sistema de perfusión de hepatocitos

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 de Peri Star de WPI (Reino Unido).

Dos bombas peristálticas con jeringas de presión de Vial Médical (Francia).

Dos captores de presión de Harvard Apparatus (Madrid).

Dos pulmones de reoxigenación de Áfora (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 celulosa de 12 μm 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 con “plexiglás” y constan de una cavidad, donde las células se depositan, y un compartimento que rodea enteramente esta última, permitiendo el paso del líquido de termostatización (**Figura 3**).

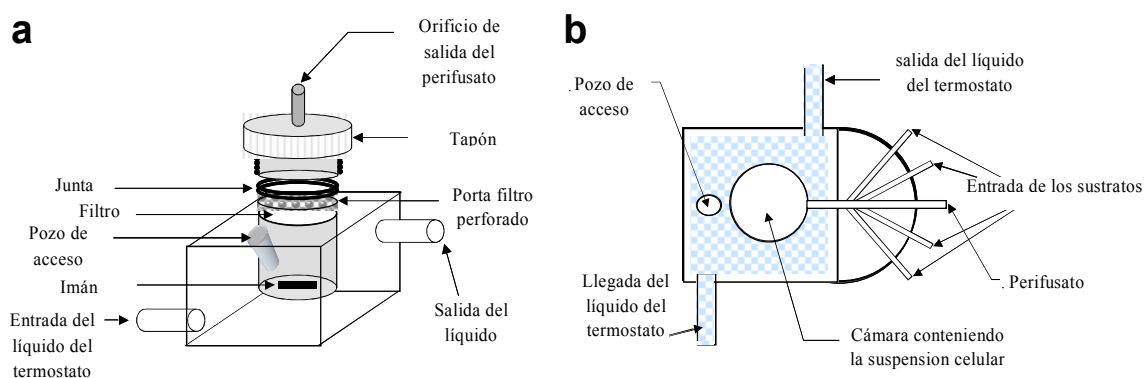


Figura 3. Cámara de perfusión, vista general (a) y vista superior (b)

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 celulosa cuyo diámetro de poro es de 12 μm , manteniéndose en su sitio sin moverse por el 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 el centro y 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 como “perfusato”.

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

Además de la entrada principal, por la cual penetra 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 termostatización a 37°C. La cámara de perfusión está colocada encima de un agitador magnético que permite el mantenimiento de las células o del 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 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 termostatizar 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 a 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% O₂ – 5% CO₂).

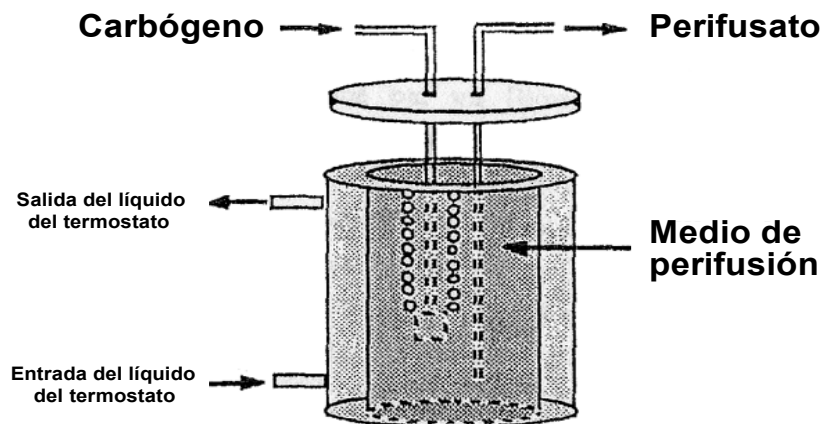


Figura 4. Depósito central del medio de perfusión

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 normalmente es baja, constituye un buen criterio de viabilidad celular. En efecto, cuando las células están en mal estado o, más frecuentemente, cuando una condición particular (drogas, inhibidores,...) tiene un efecto nocivo sobre éstas, 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 problemas son, evidentemente, utilizar una preparación de hepatocitos aislados de buena calidad, mantener una agitación constante y además cambiar el filtro de manera preventiva al final del período de estabilización, justo antes del inicio del experimento. Sin embargo, si surge un problema de presión, se puede realizar un cambio de 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 CO₂ por difusión a través del plástico. Como la proporción de CO₂ 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 por encima de las cámaras de perfusión (**Figura 5**).

El sistema de reoxigenación está constituido por un cilindro de vidrio, a través del cual 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 está enrollado alrededor de un tubo de vidrio por el cual circula el líquido del sistema de termostatación. Así, a la salida del sistema de reoxigenación, es decir justo antes de las entradas en las cámaras, el medio de perfusión tiene una temperatura de 37°C y está de nuevo saturado con carbógeno.

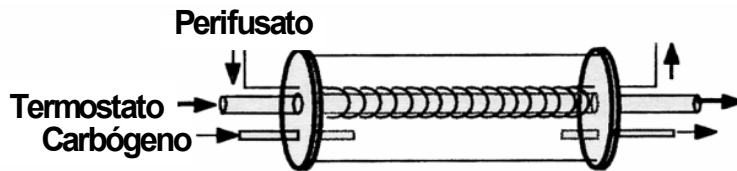


Figura 5. Sistema de reoxigenación

2.8. Procedimiento

Al comienzo del experimento, la suspensión de hepatocitos de los diferentes grupos experimentales (100 a 200 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, se ponen en marcha el sistema de agitación suave y las bombas peristálticas. La facilidad con la cual se puede hacer variar las concentraciones de sustratos y/o 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 sustrato y/o producto 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 32-35 minutos para permitir que se equilibren a la temperatura de 37°C. Al final de este período de estabilización, se recoge perifusato y suspensión de células del interior de las cámaras y se cambian los filtros de las dos cámaras de forma preventiva, lo que permite así eliminar las pocas células muertas presentes en la preparación inicial. Para cada concentración de sustrato estudiado durante los experimentos de titración, es necesario un tiempo de estabilización de 12 a 15 minutos, según las condiciones, para permitir alcanzar un nuevo estado estacionario. Este último se puede evaluar, 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 perifusato a la salida de las cámaras para analizar los diferentes metabolitos extracelulares (glucosa, lactato y piruvato) y calcular así el flujo de producción de estos últimos con arreglo a las diferentes condiciones estudiadas. Para los experimentos de titración, el perifusato 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 y se determina el mismo día del experimento.

También se pueden tomar muestras de la suspensión de hepatocitos 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.

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

2. Incubación de hepatocitos en viales cerrados

Los hepatocitos aislados (10 mg/ml en 2 a 2,5 ml de medio según el tipo de experimento) se incuban en viales cerrados de propileno que contienen la solución II (ver aislamiento de hepatocitos) (saturada de carbógeno [95% O₂ – 5% CO₂] durante el primer minuto de incubación) y con diferentes substratos, 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 toman muestras de células en suspensión. Este modelo experimental se emplea como fase inicial en las siguientes técnicas experimentales:

- medida de las actividades enzimáticas (glucosa-6-fosfatasa, piruvato quinasa).
- medida de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato.

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 luego la concentración de ciertos metabolitos.

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 a 4°C, se preparan con dos 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 un 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 y 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. Luego, 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 µl) a través de la capa de aceite y se neutraliza (pH = 7-7,5) con una mezcla de hidróxido potásico (2 M KOH) y de ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (0,3 M MOPS).

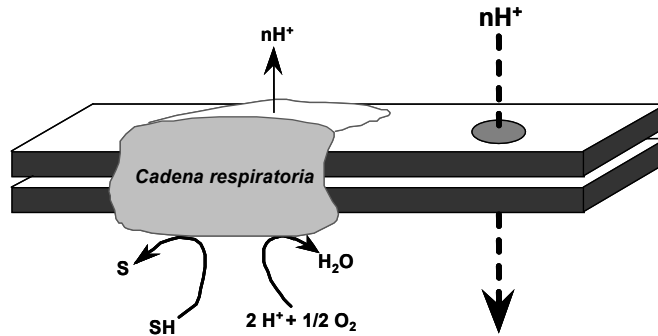
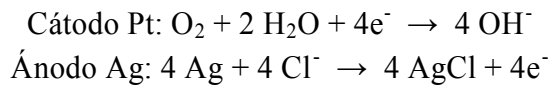
Las muestras finales neutralizadas se conservan a -80°C para las subsiguientes determinaciones de los diferentes metabolitos del contenido intracelular.

4. Técnica de estudio utilizada con las mitocondrias aisladas: la oxigrafía

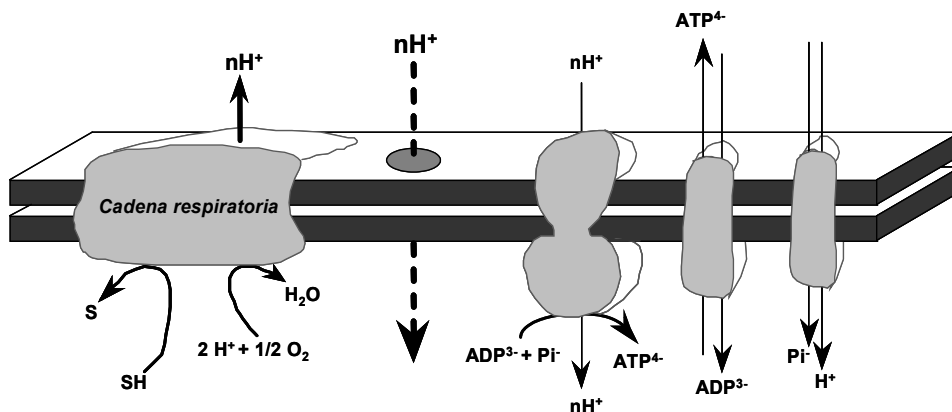
4.1. Fundamento de la oxigrafía

La medida del consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas se realiza en una cámara de oxigrafía cerrada, con agitación magnética y termostatizada a 30°C ó 37°C según los casos, mediante un electrodo que mide la concentración de oxígeno en el medio. Este electrodo, llamado de Clark, está constituido por un cátodo de platino (Pt) polarizado a -0,7 Voltios y por un ánodo de plata (Ag) bañado en una solución de KCl 3M, que actúa como electrolito. El cátodo de platino está recubierto por una membrana fija de teflón semipermeable que permite la difusión del oxígeno y lo protege del contacto con agentes químicos perturbadores y del 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 así se puede medir directamente la velocidad de la respiración celular que varía con los diferentes

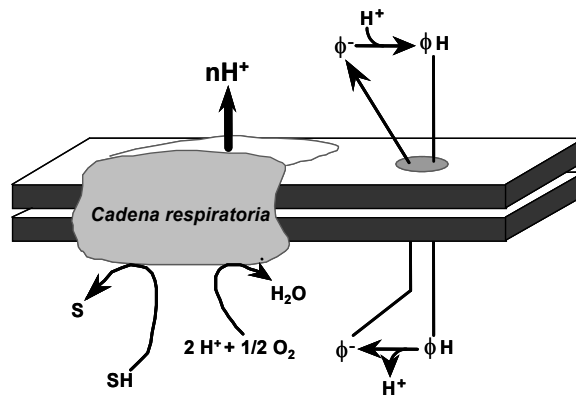
productos añadidos (Renger y Hanssum, 2009). Las reacciones que ocurren son las siguientes:



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 acopladas a la síntesis de ATP por la F0F1-ATP sintasa (ATPasa). El equilibrio entre el influjo y el eflujo de protones via la membrana mitocondrial interna contribuye al mantenimiento de la fuerza protón motriz y está asegurado por muchos mecanismos: la cadena respiratoria realiza el eflujo de protones en el espacio intermembranoso 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 principalmente 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 la respiración de manera máxima, el flujo está controlado sólo por el potencial redox y las propiedades cinéticas de la cadena respiratoria.

Figura 26. Esquema de los distintos estados de la respiración

4.2. Medida de la respiración en mitocondrias aisladas

La medida del consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas, procedentes de los distintos grupos experimentales, se realiza por simple adición de éstas ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) al tampón de respiración KCl (125 mM KCl, 20 mM Tris HCl, 1 mM EGTA, 5 mM Pi-Tris; pH 7,2) con 0,1% de albúmina delipidada.

La medida de la respiración mitocondrial se inicia con la adición de los sustratos respiratorios: glutamato/malato o succinato/malato, éste último junto con rotenona. En presencia de ambos sustratos las mitocondrias tienen una respiración basal, llamada **estado 4**, cuya velocidad está controlada por la reentrada 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 sustratos e inhibidores usados cuando se trabaja con las mitocondrias aisladas están indicadas en la siguiente tabla:

Inhibidor/Sustrato	Característica	Concentración
Glutamato/Malato	Sustratos del complejo I de la cadena respiratoria	5 mM / 2,5 mM
Succinato/Malato	Sustratos del complejo II de la cadena respiratoria	5 mM / 0,5 mM
ADP	Sustrato de la ATP sintasa	1 mM
Rotenona	Inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria	1,25 μ M
DNP	Desacoplador	75 μ M
Oligomicina	Inhibidor del canal F_0 de la ATP sintasa	1,25 μ g. ml^{-1}
Antimicina	Inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria	0,15 μ g. ml^{-1}
TMPD	Par redox sustratos de la citocromo oxidasa	1 mM
Ascorbato		5 mM

La concentración del oxígeno en los diferentes tampones de respiración varía en función del tipo de medio y la temperatura, aunque dicha concentración 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 que la concentración de oxígeno en el tampón mitocondrial KCl es de 440 nanoátomos O/ml a 37°C y de 460 nanoátomos O/ml a 30°C.

V. Determinaciones analíticas

1. Determinaciones de parámetros bioquímicos

1.1. Análisis bioquímico

En el plasma procedente de los animales, se determinan los siguientes parámetros: glucosa basal, perfil lipídico (colesterol total, HDL-c, LDL-c, y triglicéridos), urea, creatinina y los iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻. Estas determinaciones se realizan en el Servicio de Bioquímica del Hospital Clínico de Salamanca.

1.2. Medida de los niveles de insulina basal

Los niveles plasmáticos de insulina basal se determinan con ayuda de un ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) para insulina de rata proporcionado por Mercodia® (Uppsala, Suecia). Este tipo de ELISA empleado se basa en la técnica del sándwich directo en la que dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos situados en la molécula de insulina (Rydgren y Sandler, 2002).

Durante el proceso de incubación, la insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados con peroxidasa y los anticuerpos anti-insulina anclados a los pocillos. El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina con un simple lavado, mientras que el anticuerpo marcado que ha sido capaz de unirse al antígeno se detecta mediante una reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Al cabo de 15 minutos, la reacción se para con ácido sulfúrico. Se mide la absorbancia a 450 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).

2. Determinaciones de marcadores de estrés oxidativo

2.1. Determinación de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH)

Para la determinación del glutatión, se aíslan hígados de rata de los diferentes grupos experimentales, se lavan con la SOLUCIÓN II del aislamiento de hepatocitos, se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a -80°C para su posterior determinación. Una porción de tejido hepático (250 mg) se homogeniza por sonicación mediante Ultraturrax en una solución de homogenado (100 mM fosfato sódico; 5 mM EDTA-Na₂; pH = 8) en proporción 1:5 (p:v; mg/μL) con perclórico al 70% en proporción 1:0,05 (p:v; mg/μL). El homogenado se centrifuga a 4°C y 12000 g durante 15 minutos, de modo que se toma el sobrenadante para la determinación de GSSG y GSH.

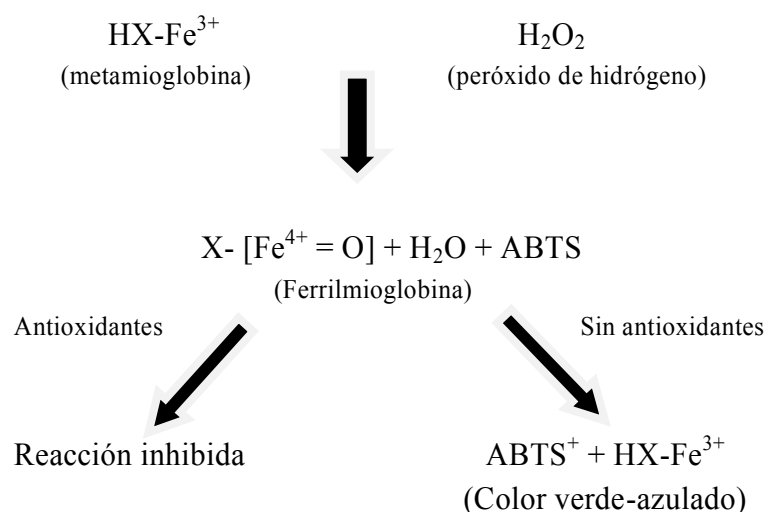
Tanto GSH como GSSG se determinan mediante un método fluorimétrico (Hissin y Hilf, 1976). En el caso de GSH, 10 μL de homogenado se incuban con 180 μL de tampón de homogenado y 10 μL de o-ftaldialdehído 0,1% (OPA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mide la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$ 350-355 nm; $\lambda_{\text{emisión}}$ 420-460 nm), tanto de las muestras como de la recta patrón, en un lector de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Fisher Scientific, Madrid).

En cuanto al GSSG, 25 μL de muestra se preincuban con 10 μL N-etilmaleimida 0,04 M (NEM) durante 40 minutos a temperatura ambiente. La adición de NEM previene la rápida oxidación de GSH a GSSH. Al cabo de este tiempo, la muestra se alcaliniza con NaOH 0.1N, de modo que 10 μL de esta mezcla se incuban con 180 μL de NaOH 0.1N y 10 μL de OPA durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se mide la fluorescencia y se calculan las concentraciones de GSSG en función de la recta patrón preparada previamente (Arana et al, 2006). Los valores de GSH y GSSG se expresan en *nanomoles $\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteínas*.

2.2. Medida del estado antioxidante total

Esta determinación se realiza sobre plasma con la ayuda de un kit proporcionado por Randox® (County Antrim, Reino Unido), y cuyo objetivo principal es la medida de la capacidad o de la actividad antioxidante de la muestra (Erel, 2004).

El análisis consiste en incubar ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazol sulfonato]) con la metamioglobina y H_2O_2 para obtener el catión ABTS^+ . Este radical presenta una coloración verde-azulada, relativamente estable, que se mide a 600 nm. La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo proporcional a su capacidad antioxidante.



3. Principios de las determinaciones analíticas de los metabolitos extracelulares

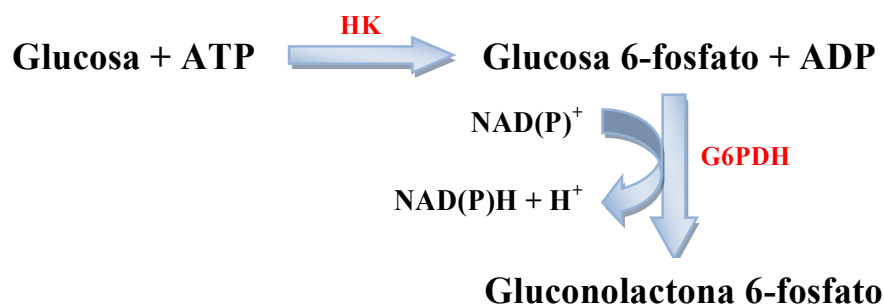
El análisis de los principales metabolitos extracelulares se realiza por los métodos enzimáticos descritos por Bergmeyer, basados en la transformación del NAD^+ en NADH o viceversa (Bergmeyer, 1974).

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

3.1. Determinación de la glucosa

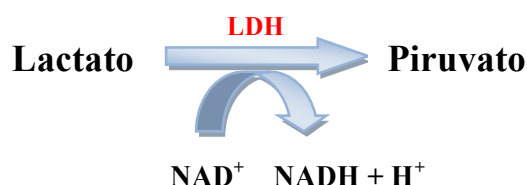
La determinación de la glucosa se basa en la transformación del NAD^+ en NADH durante una reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).



500 μl de la muestra a analizar se depositan en una cubeta de espectrofotómetro que contiene 500 μl de un medio de análisis estandarizado (0,603 mM NAD^+ , 0,625 mM ATP, 0,5 U.I. G6PDH NAD^+ -dependiente, 5 mM TRA-HCl, 0,75 mM MgCl_2 y 0,375 mM EDTA; pH 7,4 con NaOH). Se realiza una primera lectura y luego la reacción se inicia por adición de 10 μl de la enzima hexoquinasa (HK) diluida al 1/50. La cubeta se agita para homogenización y se realiza una segunda lectura 60 minutos más tarde.

3.2. Determinación del lactato

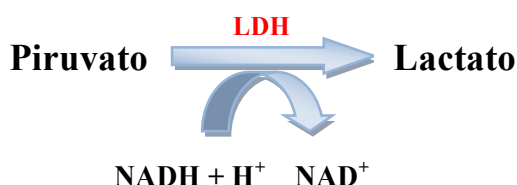
La determinación del lactato se basa en la transformación de NAD^+ en NADH durante una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).



La muestra a analizar (500 μl) se deposita en una cubeta que contiene 500 μl de un medio de análisis estandarizado (0,75 mM NAD^+ , 0,4 M hidrato de hidracina y 0,4 M glicina). La glicina y la hidracina, presentes en el medio, permiten orientar la reacción en el sentido de la formación de piruvato: la glicina vuelve el medio de análisis básico ($\text{pH} = 9$) y la hidracina degrada el piruvato formado. Se realiza una primera lectura y luego la reacción se inicia por adición de 6,5 μl de LDH diluida al 1/6. La cubeta se agita para homogenización y luego se realiza una segunda lectura 90 minutos más tarde.

3.3. Determinación del piruvato

La determinación del piruvato se basa en la transformación del NADH en 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 determinaciones anteriores, 500 μl de la muestra a analizar se añaden en una cubeta que contiene 500 μl de un medio de análisis estandarizado (0,2 mM NADH ; $\text{pH} 7,4$ con un tampón fosfato 50 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$). Se realiza una primera lectura y luego la reacción se inicia por adición de 6,5 μl de LDH diluida al 1/20. La cubeta se agita para homogenización y luego se realiza una lectura 15 minutos más tarde.

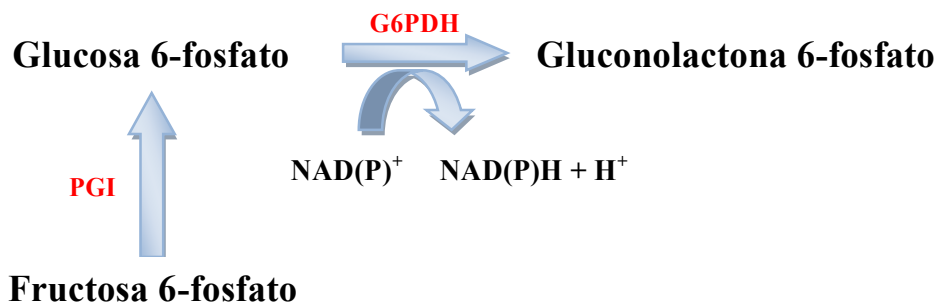
4. Principios de las determinaciones analíticas de los metabolitos intracelulares

El análisis de los principales intermediarios de la glucólisis y la gluconeogénesis se realiza como aquél de los metabolitos extracelulares presentado previamente; por medio de métodos enzimáticos descritos por Bergmeyer y basados en la transformación de NAD^+ 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 una $\lambda_{\text{excitación}}$ de 340 nm y una $\lambda_{\text{emisión}}$ 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.

4.1. Determinación de la glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato

La determinación de la glucosa 6-fosfato y de la fructosa 6-fosfato se basa en la transformación del NAD^+ en NADH durante dos reacciones sucesivas catalizadas por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la fosfoglucoisomerasa (PGI).



La muestra a analizar (60 μl) se añade en una cubeta de cuarzo que contiene 2 ml en un medio de análisis estandarizado (15 μM NADP, 5 mM TRA-HCl, 0,75 mM MgCl_2 y 0,375 mM EDTA; pH 7,4 con NaOH). La cubeta se coloca en el espectrofluorímetro con agitación suave y permanente gracias a un pequeño agitador magnético. Después de la estabilización de la señal, se añaden en primer lugar 10 μl de G6PDH NADP-dependiente diluida al 1/10 y cuando esta primera reacción termina, se añaden 10 μl de PGI diluida al 1/10.

4.2. Determinación de la dihidroxiacetona fosfato

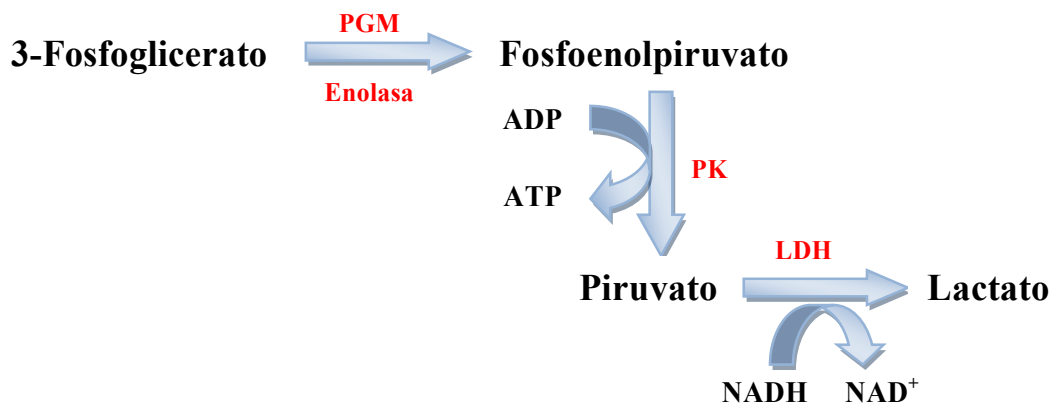
La determinación de la dihidroxiacetona fosfato se basa en la transformación del NADH en NAD^+ durante una reacción catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH).



La muestra a analizar (60 μl) se añade en una cubeta de cuarzo que contiene 2 ml de un medio de análisis estandarizado (15 μM NADP, 5 mM TRA-HCl, 0,75 mM MgCl_2 y 0,375 mM EDTA; pH 7,4 con NaOH) agitado permanentemente con un agitador magnético. La determinación empieza por la adición de una cantidad conocida de NADH en la cubeta y, después de la estabilización de la señal, se añaden 10 μl de G3PDH diluida al 1/10. Por último, una vez que la reacción está acabada, 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.

4.3. Determinación del fosfoenolpiruvato y del 3-fosfoglicerato

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



La muestra a analizar (60 μl) se añade en una cubeta de cuarzo que contiene 2 ml de un medio de reacción estandarizado (20 mM KCl, 5 mM TRA-HCl, 28,3 mM MgCl_2 y 0,375 mM EDTA; pH 7,4 con NaOH) agitado permanentemente con un

agitador magnético. El piruvato se elimina previamente de la muestra por adición de 40 μl de una cantidad conocida de NADH y de 20 μl de una preparación de LDH diluida al 1/10 en la que la contaminación por la PK es la más escasa posible. Después de 15 minutos, la reacción empieza por la adición de NADH y, tras la estabilización de la señal, se añaden 10 μl de PK diluida al 1/10 y 2 mM de ADP. Esto permite la determinación del fosfoenolpiruvato. Cuando esta primera reacción acaba, la adición de 10 μl de PGM diluida al 1/100 y de 10 μl de enolasa diluida al 1/5 permite la determinación del 3-fosfoglicerato.

5. Medida de las actividades enzimáticas

5.1. Glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa)

Principio

El principio de esta medida se basa en la determinación colorimétrica del fosfato inorgánico (Pi) liberado después de la hidrólisis de la glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima G6Pasa según el método de Baginski y colaboradores (Baginski et al, 1975).



Método

La actividad máxima de la G6Pasa se determina en hepatocitos aislados de los hígados de rata de los diferentes grupos experimentales. Dichos hepatocitos se incuban con Krebs- Ca^{++} (SOLUCIÓN II) en viales cerrados ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) en presencia de DHA 20 mM como sustrato energético. Después de 30 minutos de incubación, se extrae una muestra de células de cada uno de los viales y se centrifuga a baja velocidad (1000 g, 30 s). El sobrenadante se elimina y el precipitado se recoge con una solución Tris 20 mM con el fin de inducir un choque osmótico que permita liberar la G6Pasa. Posteriormente, se realiza una sonicación durante 15 segundos, sobre hielo, para asegurarse de que la muestra está perfectamente homogeneizada y que la enzima ha sido liberada de la membrana del retículo endoplásmico. El homogenado obtenido se incuba en viales cerrados durante 10 minutos a 37°C en un medio estandarizado (250 mM Sacarosa, 20 mM Tris-HCl; pH 7,3) que contiene concentraciones crecientes de G6P (0,5; 1; 2,5; 5; 10 y 20 mM). Tanto inmediatamente después de la adición del homogenado como al final de los 10 minutos de incubación, se extraen muestras del vial de incubación y la reacción de hidrólisis de G6P se para inmediatamente con la precipitación de las proteínas en una solución de ácido perclórico y ascórbico (10%/2%, p/v). La mezcla se

centrifuga (13500 g, 5 min, 4°C) y se conserva en hielo para determinar posteriormente la acumulación de fosfato inorgánico.

De esta forma, se puede investigar el efecto sobre la actividad de la G6Pasa de cada uno de los grupos experimentales planteados para la elaboración de esta Tesis Doctoral.

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

Determinación del fosfato inorgánico

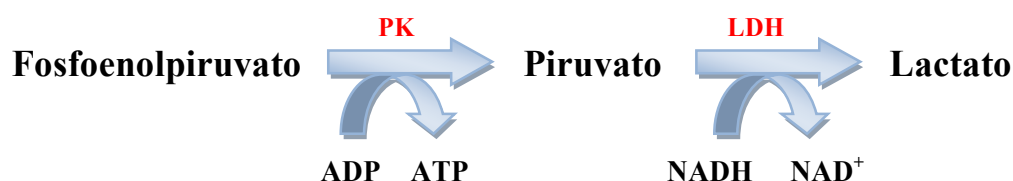
El fosfato inorgánico se determina mediante técnicas espectrofotométricas. En una cubeta, se añade molibdato de amonio (1%, p/v) a una muestra del sobrenadante previamente obtenido de las muestra. El complejo fosfomolibdico formado se reduce con el ácido ascórbico a un complejo fosfomolibdoso-molibdico 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 μmoles de fosfato liberado.

5.2. Piruvato quinasa (Detaile et al, 2008)

Principio

La determinación de la actividad de la piruvato quinasa se basa en la transformación de NADH en NAD^+ inducida por la adición al medio celular de concentraciones crecientes de fosfoenolpiruvato (PEP) (Llorente et al, 1970; Riou et al, 1978).



Método

La actividad máxima de la piruvato quinasa en sus dos isoformas: no purificada (M-PK, predominante en músculo y cerebro) y parcialmente purificada (L-PK, predominante en hígado) se determina en hepatocitos aislados de hígados de rata de los diferentes grupos experimentales. Estos hepatocitos son incubados en viales cerrados ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) con DHA 20 mM como sustrato energético. Durante todo el experimento, las muestras se mantienen una temperatura de 4°C para evitar la degradación de la enzima.

Después de 30 minutos de incubación, se extrae una muestra de células de cada uno de los viales y se centrifuga a baja velocidad (1000 g, 30 s). El sobrenadante se elimina y el precipitado se recoge en el tampón A (20 mM fosfato de potasio, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitól; pH 7,4). Luego las muestras se homogenizan rápidamente por sonicación mediante Ultraturrax durante un minuto con el fin de digerir las células y liberar así la piruvato quinasa sin alterarla ni desnaturalizarla. El homogenado se centrifuga (30000 g, 15 minutos, 4°C) de modo que 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 reposar durante 15 minutos a 4°C . Luego la mezcla se centrifuga (30000 g, 15 minutos, 4°C). El precipitado que contiene la forma L-piruvato quinasa se resuspende con el tampón B (20 mM fosfato de potasio, 250 mM sacarosa, 30% glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotreitól, 50 mM NaF; pH 7,4).

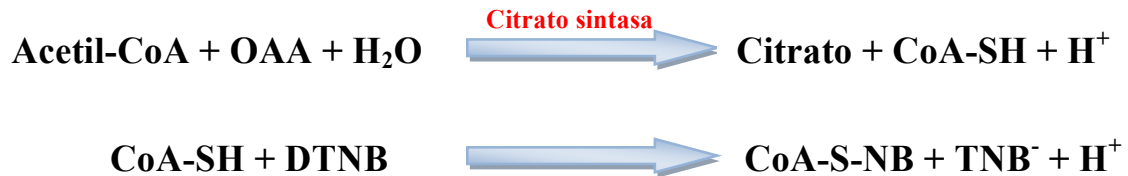
Medida

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 (50 mM Tris-HCl, 20 mM KCl, 5 mM MgCl_2 ; pH 7,4) se añade una muestra del sobrenadante que contiene la enzima, además de 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. La actividad o la velocidad de 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 (Claus et al, 1979).

La actividad de la piruvato quinasa se expresa en *nanomoles* $\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteínas.

5.3. Citrato sintasa (Shepherd y Garland, 1969)

La citrato sintasa es una enzima exclusivamente mitocondrial, por lo que puede usarse como marcador mitocondrial y como indicador de la integridad de la mitocondria. La determinación de la actividad de la citrato sintasa se basa en la reacción de grupos tioles libres con el ácido dinitrotiobenzoico (DTNB).



Método

Antes de la medida de la actividad de la enzima, 1 ml de la suspensión de hepatocitos aislados de hígados de rata, pertenecientes a los distintos grupos experimentales y disueltos en una solución Krebs-Ca⁺⁺ (SOLUCION II), se centrifugan durante 5 minutos a 500 g. El precipitado se resuspende en 300 µl de tampón fosfato (0.1 M K₂HPO₄; pH = 7). Posteriormente, cada una de las muestras de hepatocitos se somete a tres ciclos de congelación-descongelación para asegurarse de que las membranas celulares se rompen, facilitando el acceso a la citrato sintasa, situada en la mitocondria.

Medida

La medida de la actividad de la citrato sintasa se realiza mediante métodos espectrofotométricos a una longitud de onda de 412 nm y a una temperatura de 30°C. En una cubeta que contiene 980 µl de un medio de análisis estandarizado (100 mM Tris HCl; pH = 8, 0.1% Tritón X-100, 10 mM Acetil-CoA, 20 mM DTNB), se añaden 20 µl de muestra. Una vez que la señal registrada en el espectrofotómetro es estable, se inicia la reacción con la adición de 10 µl de oxalacetato (OAA), de manera que se registra la señal durante 10 minutos. Para cada una de las muestras medidas, se prepara un blanco al que no se añade OAA.

La actividad de la citrato sintasa se calcula utilizando el coeficiente máximo de absorbancia del DNTB (13.6 mM⁻¹·cm⁻¹) y se expresa en *nanomoles.min⁻¹.mg⁻¹ de proteínas*.

5.4. Determinación de la concentración de proteínas

Para la cuantificación de la cantidad de proteínas totales en los extractos celulares se sigue el protocolo del Kit Comercial Colorimétrico “DC Protein Assay” de Bio-Rad Laboratories, basado en el método de Lowry (Lowry et al, 1951). En primer lugar, se realiza una recta patrón formada por concentraciones conocidas de BSA, preparadas en el tampón de lisis en el que se extraen las proteínas. La reacción se lleva a cabo en placas de 96 pocillos utilizando 5 μ l, tanto de las muestras como de la recta patrón. A continuación se añaden 25 μ l del reactivo A (solución salina de tartrato de cobre) y 200 μ l del reactivo B (reactivo diluido de Folin) (Bio-Rad Laboratories, 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).

6. Determinación de la actividad de la ruta de las pentosas fosfato

Esta actividad se determinó en hepatocitos, procedentes de los distintos grupos experimentales, midiendo la diferencia entre la producción de $^{14}\text{CO}_2$ procedente de la oxidación de la [1- ^{14}C]-glucosa (que se descarboxila en la reacción catalizada por la G6PDH) y la producida por la oxidación de la [6- ^{14}C]-glucosa (que se descarboxila en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos) (Hothersall et al, 1979; Larrabee, 1990).

Los hepatocitos aislados de ratas no en ayunas según el método de Berry y Friend, modificado por Groen (Berry y Friend, 1969; Groen et al, 1982), fueron sometidos a una pre-incubación de 30 minutos con Krebs- Ca^{++} (SOLUCIÓN II) suplementado con glucosa 5 mM en viales cerrados (10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Tras esta pre-incubación, 150 μ l de la suspensión celular (equivalen a 750000 hepatocitos) se transfirieron directamente del vial a unos erlenmeyer especiales que contenían 1 ml de Krebs- Ca^{++} suplementado con glucosa 5 mM y con 0,5 μCi de [1- ^{14}C]-glucosa o con 0,5 μCi de [6- ^{14}C]-glucosa. Cada erlenmeyer consta de un pocillo central en el que se depositó un vial que contenía 0,3 ml de hidróxido de bencetonio. La atmósfera del erlenmeyer se gaseó con carbógeno (95% O_2 – 5% CO_2) durante 20 segundos, tras los cuales, los erlenmeyer se sellaron y se incubaron a 37°C durante 1 hora en agitación. Las incubaciones se detuvieron mediante la inyección de 0,2 ml de ácido perclórico 2M y los erlenmeyer se dejaron incubando otra hora bajo agitación para facilitar que el hidróxido de bencetonio atrapase al $^{14}\text{CO}_2$. Se usaron blancos sin células en paralelo, cuyos valores se restaron a los de todas las medias.

La actividad del ciclo de las pentosas fosfato se estimó mediante la diferencia entre los valores obtenidos de glucosa transformada en CO_2 a partir del [1- ^{14}C]-glucosa

y la producida a partir de [6-¹⁴C]-glucosa. Los cálculos se realizaron a partir de la radiactividad específica de la glucosa utilizada (dpm/mol) y los resultados se expresaron como *nanomoles de glucosa transformados en CO₂/min/células*.

7. Técnicas de medida utilizadas con las mitocondrias aisladas

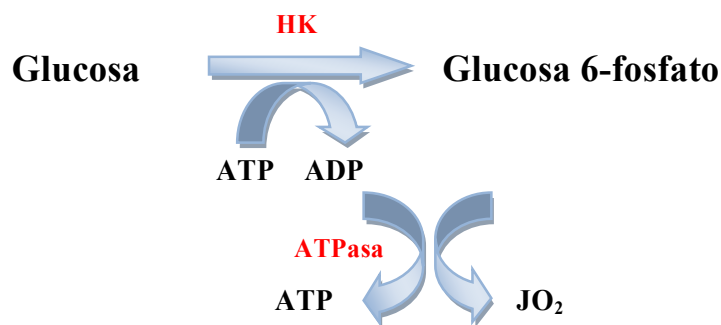
7.1. Determinación de la relación ATP/O

Principio (Fontaine et al, 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 permita la síntesis del ATP. En la práctica consiste en medir simultáneamente los dos flujos. Por ello, es fundamental asegurarse de que la respiración mitocondrial sea constante durante el período estudiado.

Para determinar el rendimiento de la fosforilación oxidativa, las mitocondrias aisladas a partir de ratas pertenecientes a cada uno de los grupos experimentales 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 tetraacético (EDTA) 25 mM y se mantienen a 4°C para detener así las reacciones enzimáticas. El sobrenadante se neutraliza con una mezcla de hidróxido potásico (KOH 2M) y de ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS 0.3M) y se centrifuga. Luego se conserva a 4°C para las determinaciones posteriores.

La producción de ATP se mide de manera indirecta mediante la medida de la producción de glucosa 6-fosfato (G6P). El medio de suspensión, idéntico al utilizado en la determinación de la respiración en mitocondrias aisladas, se suplementa con los sustratos respiratorios, 5 mM Pi-Tris, 1 mM MgCl₂, 20 mM glucosa y 125 μM ATP. La respiración se estimula entonces por la adición de hexoquinasa (0 a 40 μl de la enzima diluida a 1/20).



Así, midiendo los niveles de G6P se puede evaluar la cantidad de ADP formado, que a su vez estimula la respiración y que es teóricamente idéntica a la cantidad de 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 NAD^+ en NADH que se mide por espectrofotometría. La reacción está catalizada por la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).



Se recogen 250 μl de sobrenadante de las muestras neutralizadas y se depositan en 1 ml del medio de determinación (50 mM trietanolamina clorhidrato, 7.5 mM cloruro de magnesio, 3.75 mM EDTA; $\text{pH} = 7.4$, 0.5 mM NAD^+). La lectura de la absorbancia ($\lambda = 340 \text{ nm}$) se hace antes y 20 min después de la adición de la enzima G6PDH (10 μl de la enzima diluida 1/40).

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

La producción de ROS, concretamente de peróxido de hidrógeno (H_2O_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 añade P_i 2,5 mM y BSA 0,1%, 10 UI/ml de peroxidasa de rábano picante (HRP) y la sonda fluorescente Amplex Red 2 μM . La producción de ROS se registra durante 5 minutos

tras la adición sucesiva de los sustratos respiratorios, rotenona 1,25 μM como inhibidor del complejo I, y por último, antimicina A 3 μM como inhibidor del complejo III. El uso de rotenona y antimicina A permite cuantificar tanto la producción de ROS por el complejo I como por los complejos I y III al mismo tiempo. Esta producción se refiere 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 mide en presencia de mitocondrias, ya que 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-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina). Esta molécula en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP) es oxidada por el peróxido de hidrógeno hasta un compuesto fluorescente: la resofurina ($\lambda_{\text{excitación}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 584 \text{ nm}$). Por lo tanto, durante la medida se monitoriza la velocidad de producción de H_2O_2 registrando la fluorescencia emitida a 584 nm.

7.3. Medida de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales (Lacraz et al, 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, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, de acuerdo al procedimiento expuesto en el punto 2 de técnicas experimentales de esta sección de Material y Métodos. 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 una cubeta termostatzada a una temperatura determinada bajo agitación.

7.3.1. Medida de la actividad del complejo I: NADH-ubiquinona oxido-reductasa

24 μg de mitocondrias hepáticas se depositan sobre 2 ml de tampón KPi 50 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,5) a 37°C y en agitación, sobre los que se añaden 3,75 mg/ml de albúmina delipidada, 100 μM NADH (donador de electrones) y 100 μM decilubiquinona (aceptor de electrones). La oxidación del NADH se monitoriza mediante la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos. La posterior

adición de rotenona 10 μM permite sustraer la derivada asociada a la oxidación del NADH, no específica de la actividad del complejo I. La actividad del complejo I se calcula mediante el coeficiente de extinción molar del NADH ($6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) y la velocidad de disminución de la absorbancia a 340 nm.

7.3.2. Medida de la actividad del complejo II: succinato-ubiquinona oxidoreductasa

Esta actividad se determina mediante la transferencia de electrones desde el succinato (donador de electrones al complejo II) hacia la decilubiquinona (aceptor de electrones) y de ésta hacia el DCIP (dicloroindofenol). El DCIP es un aceptor de electrones artificial, cuya absorbancia máxima se obtiene a una longitud de onda de 600 nm. De la misma forma que ocurría en el complejo I, 24 μg 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, 30 mM succinato, 50 μM decilubiquinona; 100 μM DCIP, 9,3 μM antimicina A y 5 μM rotenona. Gracias a la rotenona y a la antimicina A se bloquea la transferencia de electrones desde la decilubiquinona hacia el complejo I y III, obligando así a los electrones a ser capturados por el DCIP. La bajada de la absorbancia se registra 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 del complejo II mitocondrial.

7.3.3. Medida de la actividad del complejo III: complejo bcl (ubiquinol-citocromo c reductasa)

La actividad del complejo III se monitoriza antes y después de la adición de su inhibidor, la antimicina A, sobre 2 ml de tampón KPi 100 mM ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,5) que contiene 10 μg de mitocondrias hepáticas, 1 mg/ml de albúmina delipidada, 50 μM EDTA, 1 mM KCN, 10 μM citocromo c oxidado y 105,6 μM 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 electrones 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. La actividad del complejo III se calcula utilizando el coeficiente máximo de absorbancia del citocromo c ($18,5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

8. Medida de la capacidad de retención de calcio (CRC) (Walter et al, 2000)

La capacidad de 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 células o mitocondrias. Los picos de calcio se monitorizan gracias a un espectrofluorímetro y a una sonda fluorescente de calcio extra-mitocondrial: calcium green-5N ($\lambda_{\text{excitación}} = 506$ nm; $\lambda_{\text{emisión}} = 526$ nm). La fluorescencia emitida corresponde únicamente al calcio que hay fuera de la mitocondria, ya que 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 pico en la fluorescencia, que luego disminuye a medida que el calcio es captado por las mitocondrias.

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

8.1. Medida de CRC en mitocondrias hepáticas

Las mitocondrias (1 mg/ml) se incuban a temperatura ambiente en 2 ml de un tampón estandarizado (250 mM sacarosa, 10 mM MOPS, 1 mM Pi; pH 7,4) al que se añade en cada punto de medida succinato/malato (5/2,5 mM) como sustrato respiratorio y 2 μM calcium-green-5N como sonda fluorescente. Se inicia la medida y tras la estabilización de la señal, se añaden pulsos de calcio (CaCl_2 5 mM) de 25 μM con intervalos de 1 minuto hasta que se observa la liberación de calcio mitocondrial inducida por los pulsos aplicados.

V. Tratamiento estadístico

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

Se ha aplicado una ANOVA de una sola vía, junto con el test de Tukey para determinar las diferencias significativas entre grupos. Consideramos significativo un valor de $p < 0.05$. La diferencia entre los distintos niveles de significación estadística se representó de la siguiente manera, cambiando el símbolo en función de los grupos experimentales entre los que se realiza la comparación: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

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

RESVLTADOS Y DiSCVSiÓN

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS
DE LA SILIBININA SOBRE
LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS
EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA**

1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SILIBININA SOBRE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

Para el estudio de la capacidad de reversión de la silibinina sobre las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo causados por la resistencia a la insulina, usamos un modelo experimental de ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en fructosa (60%) durante 6 seis semanas. Así, a tal efecto, se plantearon cuatro grupos experimentales:

Grupo 1: Control. Ratas que reciben una dieta estándar, además de una inyección intraperitoneal diaria del vehículo en el que se disuelve la silibinina durante las dos semanas previas al sacrificio.

Grupo 2: Fructosa. Ratas que reciben una dieta rica en fructosa (60%) durante 6 semanas, además de una inyección intraperitoneal diaria del vehículo durante las dos últimas semanas de tratamiento.

Grupo 3: Fructosa + Silibinina. Ratas que reciben una dieta rica en fructosa (60%) durante 6 semanas, además de una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante las dos últimas semanas de tratamiento.

Grupo 4: Control + Silibinina. Ratas que reciben una dieta estándar, además de una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante las dos últimas semanas antes del sacrificio.

La silibinina se disuelve en una solución acuosa que contiene 0,9% NaCl y 0,04% Tween 80. Teniendo en cuenta que la dieta rica en fructosa causa resistencia a la insulina (Yadav et al, 2009) y que la silibinina (SB) ha mostrado importantes propiedades antidiabéticas (Guigas et al, 2007) decidimos investigar, en primer lugar, si la SB revierte total o parcialmente los efectos de dicha dieta sobre el peso corporal y sobre ciertos parámetros bioquímicos.

1.1. Efecto de la dieta rica en fructosa sobre la variación del peso corporal

Durante el tiempo de tratamiento, bien con la dieta rica en fructosa o bien con la SB (50 mg/kg/día; i.p.), se controla diariamente la cantidad de comida y bebida ingerida por las ratas pertenecientes a cada uno de los grupos experimentales. Además, las ratas se pesan 2 veces por semana con el fin de obtener datos sobre la variación del peso al final del experimento. En la siguiente tabla (Tabla 2), se presentan los valores de peso corporal al final del experimento y de aumento de peso desde el inicio del tratamiento

para cada uno de los grupos experimentales. Según muestran los datos, no existe una diferencia significativa entre los distintos grupos, ya que la dieta rica en fructosa no provoca obesidad.

	Peso corporal	Aumento de peso corporal
	<i>gramos</i>	<i>Gramos</i>
Control	361 ± 11	161 ± 4
Fructosa	353 ± 11	161 ± 11
Fructosa+SB	345 ± 7	151 ± 6
Control+SB	354 ± 13	161 ± 7

Tabla 2. Efecto de la silibinina sobre el peso corporal en un modelo de dieta rica en fructosa.

Las pesadas se realizan el día antes del sacrificio de los animales, tras 6 semanas de tratamiento con una dieta estándar o una dieta rica en fructosa (60%), junto con la administración diaria de silibinina a la dosis de 50 mg kg⁻¹ durante las dos últimas semanas. El valor “aumento de peso corporal” es el resultado de la diferencia entre el peso final y el peso de los animales antes del inicio del tratamiento. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (EEM); n = 9 ratas para cada uno de los grupos experimentales.

1.2. Efecto de la silibinina sobre la homeostasis glucídica en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa

Tal y como se indica en la sección de “Material y Métodos”, a partir de las muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se determinan varios parámetros bioquímicos en colaboración con el Servicio de Bioquímica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

Uno de los parámetros analizados y, quizás el más importante en lo que se refiere a la resistencia a la insulina, es la glucemia o glucosa plasmática (**Figura 26A**). En ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa se observa un aumento del 30% en la glucemia (7.63 ± 0.36 mmol/L para el control frente a 9.89 ± 0.24 mmol/L para las ratas fructosa). El tratamiento con SB (50 mg/kg/día; i.p.) durante dos semanas revierte casi totalmente la hiperglucemia observada en ratas tratadas con la dieta en fructosa.

Otro parámetro importante en la homeostasis glucídica es la insulinemia o insulina en plasma (**Figura 26B**). En este caso, con ayuda de un ELISA para insulina de rata, se constata que la dieta rica en fructosa causa un incremento de más del 300% en los niveles de insulina plasmática con respecto a los valores control (0.88 ± 0.12 ng/mL para el control frente a 4.07 ± 0.19 ng/mL para fructosa). La SB revierte parcialmente esa hiperinsulinemia, de tal manera que reduce los niveles de insulina en un 40%.

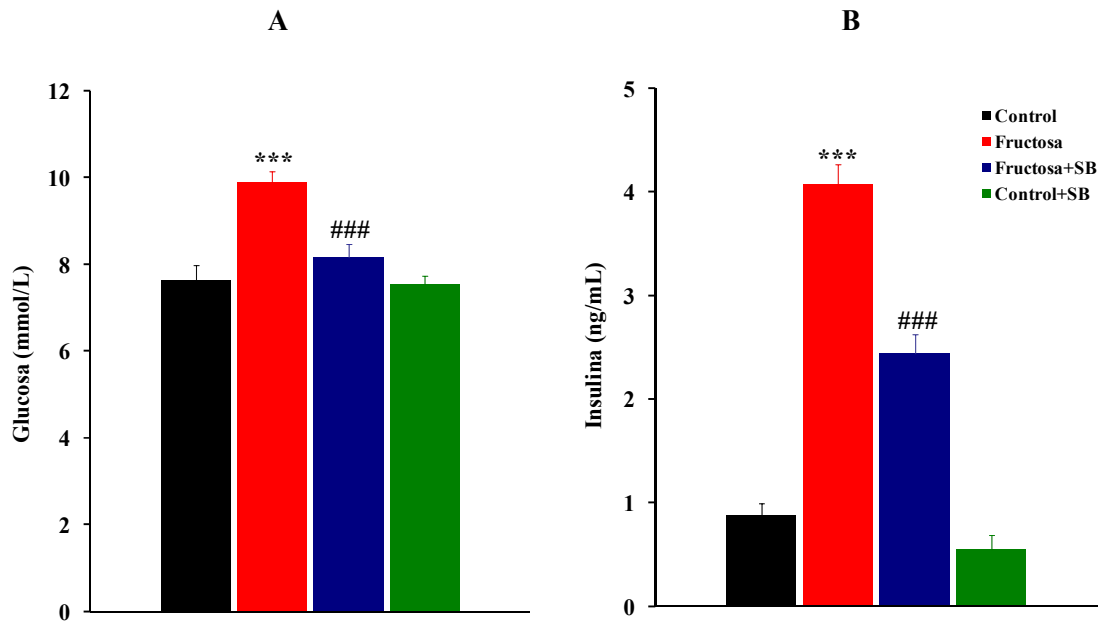


Figura 26. Efecto de la silibinina sobre la homeostasis glucídica en una dieta rica en fructosa

La glucosa (A) y la insulina (B) se miden a partir de las muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas, sometidas a 6 semanas de tratamiento con una dieta estándar o una dieta rica en fructosa, junto con la administración diaria de silibinina a la dosis de 50 mg kg⁻¹, i.p. durante las dos últimas semanas. Los resultados se expresan como media ± EEM; n = 8 ratas para cada uno de los grupos experimentales. *** p<0.001 valores del grupo fructosa respecto al grupo control; ### p<0.001 valores del grupo fructosa+SB respecto al grupo fructosa.

Matthews y colaboradores presentaron un modelo matemático conocido como HOMA (Homeostasis Model Assessment), que permite realizar estimaciones de la resistencia a la insulina y de la función de las células beta en función de las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina (Bugianesi et al, 2005; Matthews et al, 1985). Así, a partir de los valores de glucemia e insulinemia, se estima la resistencia a la insulina mediante HOMA-IR. Este índice es fácil de cuantificar ya que se simplifica mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{Insulinemia } (\mu\text{U mL}^{-1}) \times \text{Glucemia } (\text{mmol L}^{-1}))/22.5$$

Las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa muestran un HOMA-IR significativamente más alto que el observado en ratas control (7.46 ± 0.35 frente a 44.78 ± 1.10), lo cual demuestra que estas ratas presentan resistencia a la insulina (Figura 27). El tratamiento con SB durante dos semanas disminuye parcialmente esos valores, por lo que mejora la resistencia a la insulina. Además, cabe destacar que en el caso del grupo de las ratas control inyectadas con SB (50 mg/kg/día; i.p.) durante dos semanas, se observa una reducción no significativa del índice HOMA-IR cuando se compara con ratas control (7.46 ± 0.35 frente a 4.60 ± 0.12).

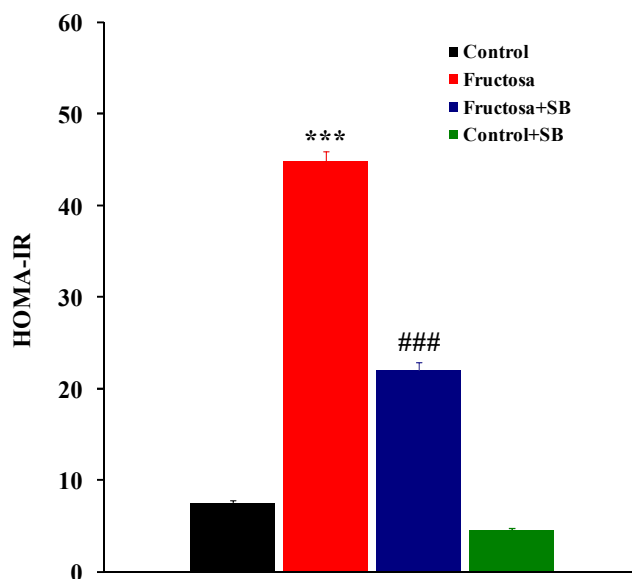


Figura 27. Efecto de la silibinina sobre el índice HOMA-IR en una dieta rica en fructosa

A partir de los valores de glucemia e insulinemia (ver **Figura 26**) medidos en muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas, calculamos HOMA-IR, que es un buen indicador del estado de resistencia a la insulina. HOMA-IR viene dado por la siguiente fórmula: $\text{Insulinemia } (\mu\text{U mL}^{-1}) \times \text{Glucemia } (\text{mmol L}^{-1}) / 22.5$. Los resultados se expresan como media \pm EEM; n = 8 ratas para cada uno de los grupos experimentales. *** p<0.001 valores del grupo fructosa respecto al grupo control; ### p<0.001 valores del grupo fructosa+SB respecto al grupo fructosa.

Por lo tanto, a la vista de estos resultados, se puede afirmar que la silibinina es capaz de revertir, al menos parcialmente, tanto la hiperglucemia como la hiperinsulinemia, causadas por el tratamiento con una dieta rica en fructosa, lo cual lleva a una mejora de la sensibilidad a la insulina.

1.3. Efecto de la silibinina sobre el perfil lipídico en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa

En este apartado se determinan las alteraciones sobre el perfil lipídico causadas por la dieta rica en fructosa así como su posible reversión por la silibinina. Así, se realiza la determinación de los siguientes parámetros bioquímicos: triglicéridos (TG), colesterol LDL (LDL-C), colesterol HDL (HDL-C) y colesterol total (CT).

Como se muestra en la **tabla 3**, no se observan diferencias significativas en los niveles de colesterol total y LDL-C entre los distintos grupos experimentales. En cambio, la dieta rica en fructosa causa un incremento de la concentración plasmática de triglicéridos y un descenso de los niveles de HDL-C. Pero la SB, a la dosis empleada (50 mg/kg/día; i.p.), no fue capaz de revertir ninguno de estos dos efectos en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa.

	TG	CT	HDL-C	LDL-C
	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>
Control	0.42 ± 0.04	1.63 ± 0.08	1.43 ± 0.09	0.29 ± 0.04
Fructosa	0.85 ± 0.12***	1.56 ± 0.06	1.09 ± 0.07*	0.30 ± 0.03
Fructosa+SB	0.80 ± 0.06	1.53 ± 0.10	1.13 ± 0.09	0.31 ± 0.08
Control+SB	0.46 ± 0.05	1.46 ± 0.08	1.24 ± 0.12	0.31 ± 0.06

Tabla 3. Efecto de la silibinina sobre el perfil lipídico en una dieta rica en fructosa

Los triglicéridos (TG), el colesterol total (CT), el colesterol HDL (HDL-C) y el colesterol LDL (LDL-C) se miden en muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas pertenecientes a los cuatro grupos experimentales. Los resultados se expresan como media ± EEM; n = 8 ratas para cada uno de los grupos experimentales. * p<0.05; *** p<0.001 valores del grupo fructosa respecto al grupo control.

1.4. Efecto de la silibinina sobre parámetros de función renal en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa

En la **tabla 4** se muestran los resultados obtenidos con respecto a algunos parámetros de función renal entre los cuales se encuentran la urea, la creatinina y los iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻. En dicha tabla, no se observan diferencias significativas en los niveles plasmáticos de dichos parámetros.

	UREA	CREAT.	Na⁺	K⁺	Cl⁻
	<i>mmol L⁻¹</i>	<i>μmol L⁻¹</i>	<i>mmol L⁻¹</i>	<i>mmol L⁻¹</i>	<i>mmol L⁻¹</i>
Control	14.17 ± 0.40	32.26 ± 1.53	147.27 ± 1.58	5.14 ± 0.49	102.87 ± 0.58
Fructosa	14.86 ± 0.74	28.98 ± 1.53	146.27 ± 1.41	4.51 ± 0.28	103.87 ± 0.84
Fructosa+SB	15.60 ± 0.70	29.92 ± 2.19	146.08 ± 1.54	4.23 ± 0.30	104.92 ± 0.80
Control+SB	14.44 ± 0.30	38.98 ± 0.85	148.01 ± 2.58	4.74 ± 0.38	104.44 ± 0.50

Tabla 4. Efecto de la silibinina sobre parámetros de función renal en una dieta rica en fructosa

La urea, la creatinina y los iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻ se determinan en muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas. Los resultados se expresan como media ± EEM; n = 8 ratas para cada uno de los grupos experimentales.

2. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SILIBININA SOBRE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN EL MODELO DE LAS RATAS ZUCKER DIABÉTICAS OBESAS

Una vez que se constata que la silibinina muestra efectos beneficiosos frente a las alteraciones causadas por la resistencia a la insulina sobre algunos parámetros bioquímicos en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa, se decidió investigar si tales efectos se repiten en otro modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2.

Para ello, se utilizan las ratas ZDF (*Zucker diabetic fatty rats*), que son un subgrupo dentro de las ratas Zucker y que se caracterizan por desarrollar resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2, además de obesidad. Dichas ratas son homocigotas para el alelo autosómico recesivo *fa*, de modo que la leptina es incapaz de unirse a sus receptores lo cual les lleva al desarrollo de una obesidad temprana (Durham y Truett, 2006). Como consecuencia, este modelo requiere el uso de ratas delgadas (*Zucker lean rats*) que servirán como controles ya que son silvestres (Fa/Fa) o heterocigotas dominantes (Fa/fa) para dicho alelo. Por tanto, teniendo en cuenta todo esto, se plantearon cuatro grupos experimentales:

Grupo 1: Ratas Delgadas. Ratas silvestres o heterocigotas para el gen de la leptina y que recibieron una inyección intraperitoneal diaria del vehículo en el que se disuelve la silibinina durante las dos semanas anteriores al sacrificio.

Grupo 2: Ratas ZDF. Ratas que presentan la mutación en el gen de la leptina y que recibieron una inyección intraperitoneal diaria de vehículo durante las dos semanas previas al sacrificio.

Grupo 3: Ratas ZDF + Silibinina. Ratas que presentan la mutación en el gen de la leptina y que además recibieron una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante las dos semanas previas al sacrificio.

Grupo 4: Ratas Delgadas + Silibinina. Ratas silvestres o heterocigóticas para el gen de la leptina y que recibieron una inyección intraperitoneal diaria de silibinina (50 mg/Kg/día; i.p.) durante las dos semanas anteriores al sacrificio.

2.1. Estudio de la variación del peso en ratas ZDF

Al igual que en el caso del modelo nutricional de la dieta rica en fructosa, las ratas se pesan 2 veces por semana con el fin de observar si existen variaciones en el peso de los animales al final del experimento. En este caso, se realizan las pesadas entre

la séptima y la décima semana de vida, momento en el que se sacrifican los animales. La **tabla 5** muestra los valores de peso corporal al final del experimento y de aumento de peso desde el inicio del tratamiento para cada uno de los grupos experimentales. Estos resultados muestran que las ratas ZDF presentan un incremento del 56% en el peso con respecto a las ratas delgadas. Esta diferencia entre ambos grupos probablemente se deba a la hiperfagia y a la obesidad, características de las ratas ZDF. Por otra parte, el tratamiento con SB (50 mg/kg/día, i.p.) durante dos semanas no provoca ninguna diferencia apreciable en ninguno de los grupos experimentales.

	Peso corporal	Aumento de peso corporal
	<i>gramos</i>	<i>gramos</i>
Delgadas	281 ± 3	63 ± 8
ZDF	439 ± 9***	136 ± 8***
ZDF+SB	439 ± 7	142 ± 6
Delgadas+SB	303 ± 15	71 ± 3

Tabla 5. Efecto de la silibinina sobre el peso en ratas Zucker diabéticas obesas (ZDF).

Las pesadas se realizan el día antes del sacrificio de los animales tanto en ratas delgadas como en ratas ZDF, tratadas o no diariamente con silibinina a la dosis de 50 mg kg⁻¹ durante las dos semanas previas al sacrificio. El valor “aumento de peso corporal” es el resultado de la diferencia entre el peso final y el peso de los animales antes del inicio del tratamiento. Los resultados se expresan como media ± error estándar de la media (EEM); n = 5 ratas para cada uno de los grupos experimentales. *** p<0.001 valores de las ratas ZDF frente a las ratas delgadas.

2.2. Efecto de la silibinina sobre la homeostasis glucídica en ratas ZDF

A partir de muestras de sangre pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, se determina la glucemia (**Figura 28A**). Las ratas ZDF presentan un incremento del 72% en los valores de glucosa plasmática con respecto a las ratas delgadas (6.19 ± 0.75 mmol/L para las ratas delgadas frente a 10.69 ± 0.41 mmol/L para las ratas ZDF). La administración de SB a las ratas ZDF durante dos semanas revierte parcialmente la hiperglucemia.

En cuanto a la insulina en plasma (**Figura 28B**), se observa que las ratas ZDF presentan una insulinemia 16 veces mayor que la que muestran las ratas delgadas (2 ± 0.10 ng/mL para el control frente a 33.31 ± 0.83 ng/mL para las ratas ZDF). En cambio, el tratamiento con SB revierte dicha hiperinsulinemia en un 30%.

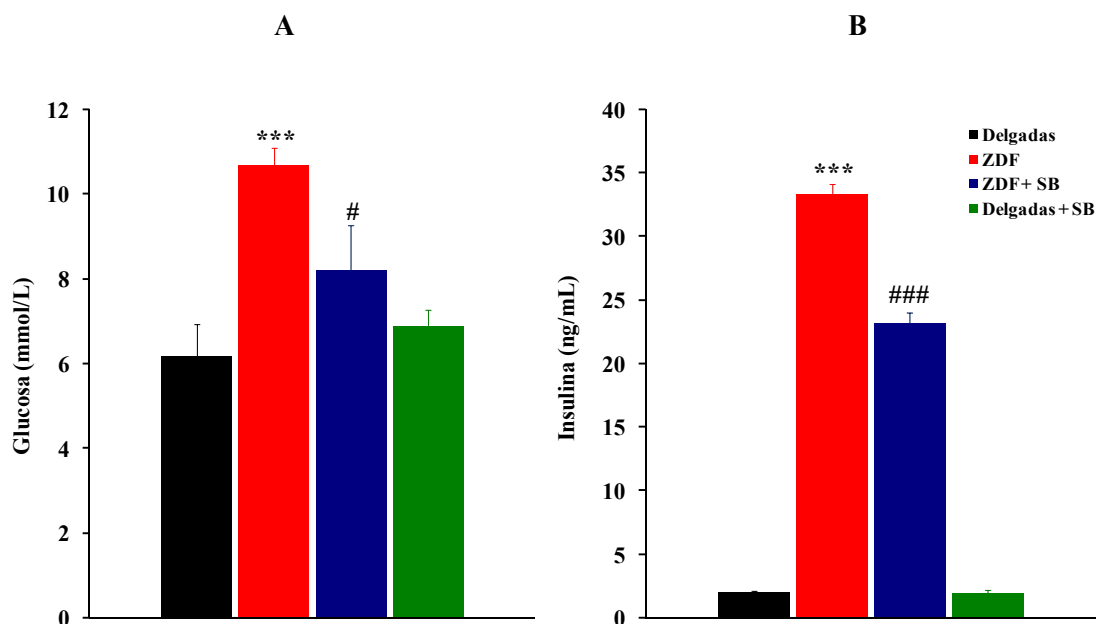


Figura 28. Efecto de la silibinina sobre la homeostasis glucídica en ratas ZDF

La glucemia (A) y la insulinemia (B) se determinan en muestras de sangre pertenecientes a ratas delgadas y ratas ZDF, tratadas con silibinina a la dosis de 50 mg kg^{-1} durante las dos últimas semanas antes del sacrificio. Los resultados se expresan como media \pm EEM; $n = 5$ ratas para cada uno de los grupos experimentales. *** $p < 0.001$ valores de ratas Zucker frente a ratas delgadas; # $p < 0.05$, valores de ratas ZDF+SB frente a ratas ZDF; ### $p < 0.001$ valores de ratas ZDF+SB respecto a ratas ZDF.

Por último, a partir de los valores anteriores de glucemia e insulinemia se estima la resistencia a la insulina mediante el índice HOMA-IR (Figura 29), como ya se ha descrito anteriormente. Así, las ratas ZDF muestran un índice HOMA-IR 26 veces mayor que el observado en ratas control (14.83 ± 0.64 frente a 395.93 ± 9.84), lo cual demuestra que las ratas ZDF presentan una resistencia a la insulina bastante fuerte. La SB, a la dosis de 50 mg/kg/día , reduce en un 47% los valores de HOMA-IR en ratas ZDF.

Por lo tanto, ante estos resultados, se puede afirmar que la silibinina también es capaz de revertir, al menos parcialmente, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, características de la resistencia a la insulina, en el modelo genético de las ratas Zucker diabéticas obesas.

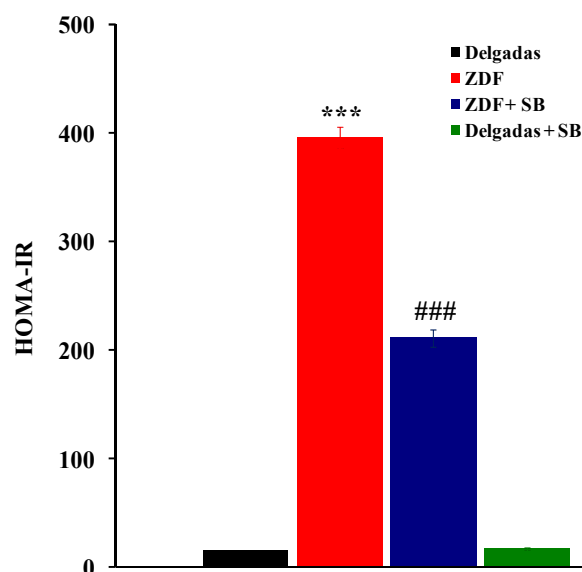


Figura 29. Efecto de la silibinina sobre el índice HOMA-IR en ratas ZDF

A partir de los valores de glucemia e insulinemia (ver **Figura 28**), se calcula HOMA-IR, que es un buen indicador del estado de resistencia a la insulina. HOMA-IR viene dado por la siguiente fórmula: $\text{Insulinemia } (\mu\text{U mL}^{-1}) \times \text{Glucemia } (\text{mmol L}^{-1}) / 22.5$. Los resultados se expresan como media \pm EEM; n = 5 ratas para cada uno de los grupos experimentales. *** p<0.001 valores de ratas delgadas respecto a ratas ZDF; ### p<0.001 valores de ratas ZDF+SB frente a ratas ZDF.

2.3. Efecto de la silibinina sobre el perfil lipídico en ratas ZDF

Nuestro estudio de los efectos de la silibinina a nivel del perfil lipídico en plasma de ratas ZDF se limita, al igual que en el caso de la dieta rica en fructosa, a la determinación de los siguientes parámetros: triglicéridos, LDL-C, HDL-C y colesterol total.

Al analizar los resultados (**Tabla 6**), se observa que las ratas ZDF presentan un incremento significativo en todos los parámetros del perfil lipídico. La administración de SB durante dos semanas, a la dosis de 50 mg/kg/día, solamente revierte significativamente los valores de colesterol total, aunque tiende a normalizar los niveles plasmáticos de HDL-C y LDL-C.

Por tanto, aunque la silibinina tiende a normalizar algunos parámetros lipídicos en ratas ZDF, en general no muestra una gran capacidad de reversión frente a las alteraciones del perfil lipídico, al igual que ocurre en el modelo nutricional de la dieta rica en fructosa.

	TG	CT	HDL-C	LDL-C
	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>
Delgadas	0.40 ± 0.01	1.81 ± 0.03	1.33 ± 0.05	0.42 ± 0.02
ZDF	2.74 ± 0.22***	4.42 ± 0.21***	2.18 ± 0.14***	0.90 ± 0.13**
ZDF+SB	2.47 ± 0.49	3.34 ± 0.23##	1.77 ± 0.15	0.64 ± 0.06
Delgadas+SB	0.49 ± 0.07	2.29 ± 0.23	1.24 ± 0.12	0.56 ± 0.05

Tabla 6. Efecto de la silibinina sobre el perfil lipídico en ratas ZDF

Los triglicéridos (TG), el colesterol total (CT), el colesterol HDL (HDL-C) y el colesterol LDL (LDL-C) se miden en muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas. Los resultados se expresan como media ± EEM; n = 5 ratas para cada uno de los grupos experimentales. ** p<0.01, valores de ratas ZDF frente a ratas delgadas; *** p<0.001 valores de ratas ZDF respecto a ratas delgadas; ## p<0.01, valores de ratas ZDF+SB frente a ratas ZDF.

2.4. Efecto de la silibinina sobre parámetros de función renal en ratas ZDF

En la **tabla 7** se muestran los resultados obtenidos tras la medida de algunos parámetros bioquímicos de función renal como la urea, la creatinina y los iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻. En este caso, tampoco se observan diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

	UREA	CREAT.	Na⁺	K⁺	Cl⁻
	<i>mmol/L</i>	<i>μmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>	<i>mmol/L</i>
Delgadas	12.26 ± 0.12	23.26 ± 3.43	141 ± 1	3.78 ± 0.26	98.50 ± 0.50
ZDF	12.85 ± 0.96	22.12 ± 1.25	143 ± 1	3.41 ± 0.23	95.60 ± 0.51
ZDF+SB	12.50 ± 0.62	23.13 ± 2.26	143 ± 1	3.29 ± 0.04	96.67 ± 0.88
Delgadas+SB	12.57 ± 0.07	25.17 ± 0.76	141 ± 1	4.04 ± 0.21	100.50 ± 0.50

Tabla 7. Efecto de la silibinina sobre algunos parámetros de función renal en ratas ZDF

La urea, la creatinina y los iones Na⁺, K⁺ y Cl⁻ se miden muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas. Los resultados se expresan como media ± EEM; n = 5 ratas para cada uno de los grupos experimentales.

El tratamiento con silibinina, a la dosis de 50 mg/kg/día; i.p., durante dos semanas mejora el estado de resistencia a la insulina tanto en ratas alimentadas con una dieta en fructosa como en ratas Zucker diabéticas obesas

3. DISCUSIÓN

En este trabajo, se estudió la capacidad *in vivo* de la silibinina para revertir, total o parcialmente, las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo asociados con la resistencia a la insulina mediante la utilización de dos modelos experimentales de diabetes mellitus tipo 2 (DM 2): el modelo nutricional de una dieta rica en fructosa y el modelo genético de las ratas Zucker diabéticas obesas (ZDF). De esta manera se pretende contribuir al conocimiento del mecanismo de acción hepático de la silibinina frente a la resistencia a la insulina, dada la gran importancia del hígado en la regulación del metabolismo energético global en el cuerpo humano.

La silibinina (SB) es el componente mayoritario y más activo de un conjunto de flavonolignanos y polifenoles extraídos de las semillas del cardo mariano (*Silybum marianum*) (Saller et al, 2001). La silibinina ha sido usada desde hace más de 40 años en el tratamiento de varias enfermedades hepáticas ya que protege al hígado del estrés oxidativo y de los procesos inflamatorios, desencadenados por la excesiva producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y citoquinas (Wellington y Jarvis, 2001). La SB también ha recibido una gran atención debido a sus efectos beneficiosos en otros órganos, aparte del hígado. Así, esta molécula muestra propiedades anticancerígenas y quimioprotectoras (Ramasamy y Agarwal, 2008), además de poseer efectos neuroprotectores (Sakai et al, 2001), cardioprotectores (Abenavoli et al, 2010) y nefroprotectores (Dietzmann et al, 2002). Todo esto ha hecho que, a pesar de la antigüedad en el uso de la SB, hace tan sólo 12-15 años se haya intensificado la investigación a nivel mundial del mecanismo de acción de la SB.

Recientemente, la SB ha sido propuesta para ser usada en el tratamiento de la DM 2, ya que la administración de SB en su forma farmacológica, conocida bajo el nombre comercial de Legalon[®], mejoró la glucemia en diabéticos tipo 2 (Huseini et al, 2006; Hussain, 2007; Lirussi et al, 2002; Velussi et al, 1997) sola o en combinación con el antidiabético oral glibenclamida. Extractos acuosos del cardo mariano también mostraron efectos antihiper glucemiantes en ratas en las que se había inducido una diabetes mellitus tipo 1 (DM 1) mediante la administración de estreptozotocina (Maghrani et al, 2004) y aloxano (Soto et al, 2004).

De todo lo recogido en la literatura concerniente a los efectos antidiabéticos de la SB se concluye que dichos efectos no han sido estudiados en ningún modelo animal de resistencia a la insulina y que se desconoce casi por completo el mecanismo de acción por el cual la SB ejerce esas acciones antihiper glucemiantes. Por ello, el primer objetivo de esta Memoria ha sido estudiar los efectos de la SB sobre los niveles de ciertos parámetros bioquímicos como primera aproximación a las posibles acciones beneficiosas del flavonoide frente a la resistencia a la insulina.

Antes de discutir los resultados obtenidos en la primera parte de esta Memoria, se ha de indicar que la SB era administrada a una dosis de 50 mg/kg/día por vía intraperitoneal durante 2 semanas. En un estudio reciente de la farmacocinética de la SB, se muestra que, tras su administración intravenosa en ratas a una dosis de 100 mg/kg, alcanza al cabo de dos horas unos valores en plasma entre 1-3 μ M, luego pasa a la sangre portal y se concentra en el hígado en torno a 30 veces más que en el plasma antes de excretarse por la bilis (Wu et al, 2007). Entonces, según esto, al administrar una dosis de 50 mg/kg en ratas, las concentraciones alcanzadas en el hígado estarán en torno a 15-45 μ M, bastante similares a las concentraciones empleadas en algunos estudios *in vitro* sobre los efectos metabólicos de la SB (Detaille et al, 2008; Guigas et al, 2007). Además, esta dosis de 50 mg/kg ha sido ya usada en varios estudios *in vivo* realizados con SB (Muriel et al, 2005; von Schonfeld et al, 1997; Zhao y Agarwal, 1999). Por último, cabe destacar que la SB presenta una toxicidad muy baja, incluso con una dosis letal superior a 10 g/kg en ratas y a 300 mg/kg en perros (Vogel et al, 1975), está bien tolerada y prácticamente carece de efectos secundarios (Morazzoni y Bombardelli, 1995).

El primero de los modelos usados para el estudio de los efectos beneficiosos de la SB frente a la resistencia a la insulina fue el modelo nutricional de la dieta rica en fructosa. Este modelo nutricional puede administrarse en forma de “*pellet*” o en forma líquida y presenta una gran variabilidad en cuanto al porcentaje de fructosa que contiene la dieta. Para realizar los experimentos que forman parte de este Trabajo, se decidió usar una dieta que contenía un 60% de fructosa, ya que es uno de los tipos de dieta rica en fructosa más nombrados en la literatura y de esa manera se lograba sustituir prácticamente todos los hidratos de carbono de la dieta control por fructosa.

En esta primera parte de la Memoria se observa que la administración de una dieta rica en fructosa durante 6 semanas causó hiperinsulinemia, hiperglucemia e hipertrigliceridemia, y en definitiva, un estado de resistencia a la insulina tal y como demuestra el índice HOMA-IR. Estos resultados se confirman con lo obtenido en otros estudios semejantes realizados con este mismo modelo animal de DM 2 (Chen et al, 2001; Francini et al, 2010; Rajasekar y Anuradha, 2007).

Sin embargo, la administración de SB durante dos semanas, a una dosis de 50 mg/kg/día, en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa revirtió parcialmente la hiperglucemia y la hiperinsulinemia, llegando a mejorar la sensibilidad a la insulina. Estudios similares realizados por otros grupos en este mismo modelo experimental mostraron que antidiabéticos orales como la metformina (Anurag y Anuradha, 2002) o la rosiglitazona (Yadav et al, 2009) también mejoraban la resistencia a la insulina. Por tanto, estos resultados son coherentes con lo que hemos obtenido en el presente trabajo y con otro trabajo reciente que destacaba el efecto protector de los polifenoles extraídos de *Emblica officinalis* para mejorar la resistencia a la insulina en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa durante 3 semanas (Kim et al, 2010). Además, la SB ya había

mostrado efectos beneficiosos frente a la resistencia a la insulina en otros modelos experimentales. Así, un estudio reciente muestra que la administración oral del complejo silibinina-fosfatidilcolina durante 5 semanas a la dosis de 200 mg/kg/día mejoraba la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas durante 12 semanas (Haddad et al, 2009).

Esta capacidad de la SB para mejorar la resistencia a la insulina ya había sido sugerida en otras investigaciones previas llevadas a cabo en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas. Así, en uno de estos estudios, la administración durante 6 meses de 135 mg/día de silibinina- β -ciclodextrina en pacientes diabéticos tipo 2 con esteatohepatitis alcohólica disminuía la hiperglucemia (Lirussi et al, 2002). También se había observado que su administración en forma de un complejo formado por silibinina, vitamina E y fosfolípidos mejoraba la sensibilidad a la insulina en pacientes con esteatohepatitis no-alcohólica (Federico et al, 2006).

En cuanto a los parámetros de perfil lipídico, se puede observar que la SB no fue capaz de normalizar la hipertrigliceridemia causada por la ingesta de una dieta rica en fructosa. Estudios similares realizados por otros grupos con silimarina en ratas hipertrigliceridémicas y alimentadas con una dieta rica en sacarosa (70%) mostraban resultados muy semejantes a los presentados en este Trabajo (Skottova et al, 2004), por lo que parece que los efectos beneficiosos de la SB frente a la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa radican fundamentalmente en un efecto a nivel del metabolismo glucídico.

El segundo modelo experimental utilizado en esta Memoria para estudiar los efectos de la SB frente a la resistencia a la insulina fue el modelo genético de las ratas Zucker diabéticas obesas (*Zucker diabetic fatty rats* o ZDF), muy utilizadas para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de la DM 2. Estas ratas se caracterizan por desarrollar DM 2 a partir de la 8ª semana ya que son incapaces de compensar la resistencia a la insulina. Además, también desarrollan una obesidad temprana debido a que presentan una mutación autosómica recesiva en el gen de la leptina (Aleixandre y Miguel, 2009; Srinivasan y Ramarao, 2007). Al usar este segundo modelo experimental de DM 2, se pretende demostrar que los efectos beneficiosos de la SB frente a la resistencia a la insulina, observados en el modelo de la dieta rica en fructosa, se repiten en otros modelos de DM 2 y así confirmar los efectos antidiabéticos de la SB.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral mostraron que las ratas ZDF presentaban hiperglucemia e hiperinsulinemia, lo cual es reflejo de un fuerte estado de resistencia a la insulina, como queda demostrado con el cálculo del índice HOMA-IR. Además estas ratas también presentaban un incremento en los niveles de algunos parámetros del perfil lipídico como los triglicéridos, el colesterol total, LDL-c y HDL-c.

Estos resultados concuerdan totalmente con lo obtenido en otros estudios realizados con ratas ZDF de una edad similar a las usadas en la elaboración de este Trabajo **(de Lemos et al, 2007; Leonard et al, 2005; Samuel et al, 2009)**.

En cambio, la administración de SB durante 14 días a una dosis de 50 mg/kg/día en ratas ZDF a partir de la 9ª semana de vida mejoró la resistencia a la insulina disminuyendo la hiperglucemia y la hiperinsulinemia. Estos resultados son coherentes con lo obtenido en otros estudios semejantes de manera que antidiabéticos orales como la pioglitazona **(Pickavance et al, 2005)** o flavonoides con propiedades antihiperglucemiantes, como la quercetina **(Rivera et al, 2008)**, también mejoraban la resistencia a la insulina al igual que lo hace que la SB.

Al contrario de lo que ocurría con el modelo de la dieta rica en fructosa, la administración de SB revertía las alteraciones del perfil lipídico en ratas ZDF, de manera que normalizó los valores de colesterol total en ratas ZDF, además de mostrar una tendencia a reducir los valores de HDL-c y LDL-c. Este resultado es semejante al obtenido en otros estudios llevados a cabo con antidiabéticos orales, como la rosiglitazona **(Walker et al, 1999)**, o flavonoides como el resveratrol **(Rivera et al, 2009)**. Aunque en general, los efectos de la SB sobre el metabolismo lipídico están poco documentados, se sabe que la administración de 420 mg de Legalon® durante 3 meses reducía los niveles de colesterol total en pacientes hiperlipidémicos **(Somogyi et al, 1989)**, tal y como se observa en las ratas ZDF tratadas con SB.

En definitiva, los resultados expuestos en esta primera parte del Trabajo demuestran que la administración de silibinina durante 2 semanas, a una dosis de 50 mg/kg/día, i.p.; mejoraba la resistencia a la insulina mediante una disminución de la hiperglucemia y de la hiperinsulinemia tanto en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa como en ratas Zucker diabéticas obesas. Este aumento de la sensibilidad a la insulina probablemente se deba a un efecto de la SB localizado a nivel de la gluconeogénesis hepática, lo cual haría que la SB fuera una buena alternativa para el tratamiento de la DM 2.

**ESTVDiO DE LOS EFECTOS
DE LA SiLiBiNiNA SOBRE
EL METABOLiSMO HEPÁTICO
EN LA RESiSTENCiA A LA iNSVLiNA**

1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA SILIBININA SOBRE EL METABOLISMO GLOBAL HEPÁTICO EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA

1.1. Efecto de la silibinina sobre el metabolismo global de la DHA en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa

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 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 et al, 1994). Además, el uso de la DHA nos permite estudiar al mismo tiempo la gluconeogénesis y la glucólisis midiendo, respectivamente, la producción de glucosa ($J_{Glucosa}$), de lactato+piruvato ($J_{Lactato+Piruvato}$) y la cantidad total de DHA metabolizada ($J_{DHA} = J_{2GLP} = 2 \times J_{Glucosa} + J_{Lactato+Piruvato}$) ya que el lactato y el piruvato son triosas mientras que la glucosa es una hexosa).

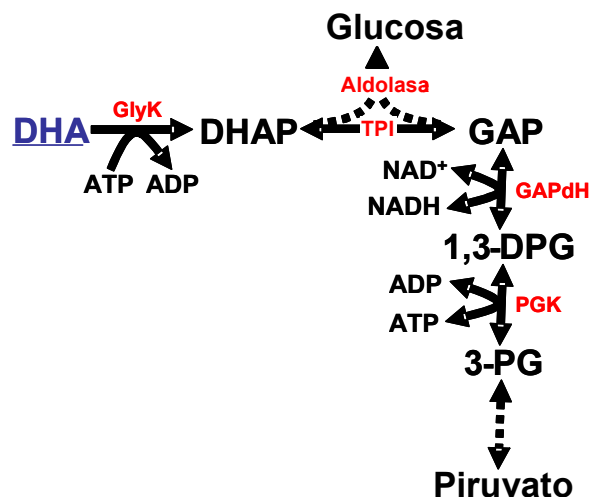


Figura 30. Esquema resumen del metabolismo de DHA

ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; DHA: dihidroxiacetona; DHAP: dihidroxiacetona fosfato; 1,3-DPG: 1,3-bisfosfoglicerato; F1,6bP: fructosa 1,6-bisfosfato; GAP: gliceraldehído 3-fosfato; GAPdH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; GlyK: glicerol quinasa; NAD⁺: nicotinamida adenina

dinucleótido oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reducido; 3-PG: 3-fosfoglicerato; PGK: fosfoglicerato quinasa; TPI: triosa fosfato isomerasa.

Para investigar la capacidad de reversión de la SB sobre las alteraciones del metabolismo hepático asociadas con la resistencia a la insulina en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa, se usa el modelo experimental de hepatocitos en perfusión (explicado en la **Sección de Material y Métodos**). Así, se aíslan hepatocitos de ratas Wistar, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, y se realiza titración de hepatocitos perfundidos con el sustrato energético DHA a concentraciones subsaturantes crecientes.

La ingesta de una dieta rica en fructosa durante 6 semanas activa significativamente tanto la gluconeogénesis como la glucólisis, lo que provoca una activación generalizada del metabolismo hepático a partir del sustrato energético DHA. En cambio, el tratamiento con SB, a la dosis de 50 mg/kg/día, durante 2 semanas revierte dichos efectos.

A partir de una concentración de DHA de 0,6 mM, la producción de glucosa mediante gluconeogénesis se incrementa en un 23% por acción del tratamiento con una dieta rica en fructosa frente a los valores obtenidos con hepatocitos procedentes de ratas control. El tratamiento crónico con silibinina reduce la producción de glucosa en un 31% en comparación con las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa, por lo que normaliza la gluconeogénesis. Además, cabe destacar que la silibinina administrada a ratas control también causa una inhibición significativa del flujo gluconeogénico ($J_{Glucosa}$) con respecto a los valores control (**Figura 31A**).

En cuanto a la glucólisis hepática, la dieta rica en fructosa incrementa el flujo glucolítico (J_{L+P}) en un 25% mientras que el tratamiento con silibinina previene dicho efecto. Además, nótese que el tratamiento de ratas control con silibinina también inhibe significativamente la producción de lactato+piruvato frente a los valores obtenidos en ratas control (**Figura 31B**).

Como resultado del aumento en la producción de glucosa y de lactato+piruvato por parte de la dieta rica en fructosa, el metabolismo global de la DHA (J_{DHA}) se incrementa en un 24%. En cambio, la administración de silibinina durante dos semanas reduce J_{DHA} hasta valores próximos a los normales. La silibinina administrada a ratas control también causa una disminución significativa de J_{DHA} (**Figura 31C**).

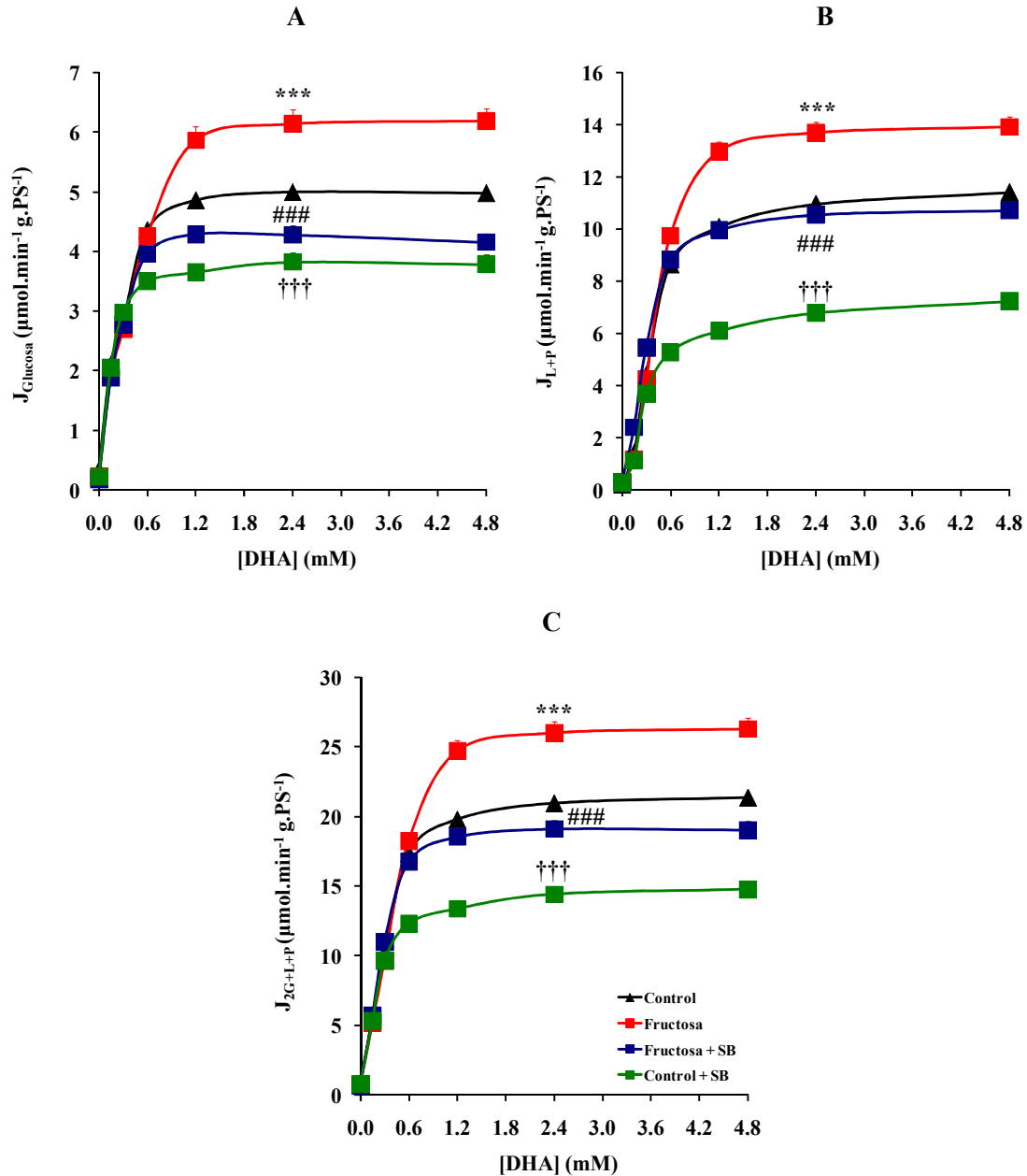


Figura 31. Inhibición de la silibinina sobre el metabolismo hepático de la DHA en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml) se aíslan de ratas Wistar, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales: control (▲), fructosa (■), fructosa + SB (■) y control + SB (■). Las ratas se ponen en ayunas 24 horas antes del experimento y los hepatocitos se perfunden 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). El flujo de la gluconeogénesis ($J_{Glucosa}$), que se muestra en la **Figura A**, se calcula a partir de la concentración de glucosa. En la **Figura B** se muestra el flujo de la glucólisis (J_{L+P}), calculado a partir de las concentraciones de lactato más piruvato. El metabolismo global de la DHA (J_{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 más lactato y piruvato. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. *** $p < 0.001$ valores del tratamiento con una dieta rica en fructosa respecto a los obtenidos en hepatocitos control a la concentración de DHA correspondiente. ### $p < 0.001$ valores del tratamiento con silibinina

respecto a los obtenidos con la dieta rica en fructosa. ††† $p < 0.001$ valores del tratamiento con silibinina en ratas control con respecto a los obtenidos en hepatocitos control.

La gluconeogénesis y la glucólisis constituyen vías metabólicas comunes de la DHA después de su fosforilación, por lo que la activación del metabolismo hepático de la DHA inducida por una dieta rica en fructosa y su reversión por el tratamiento con SB podría dilucidarse investigando la concentración de intermediarios metabólicos intracelulares en hepatocitos perfundidos, muestreados en cada estado estacionario. La **Figura 32** muestra la relación entre el intermediario metabólico dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y la concentración del sustrato energético DHA, donde se puede observar que ni la dieta rica en fructosa ni el tratamiento con SB tienen efecto alguno sobre las concentraciones de DHAP.

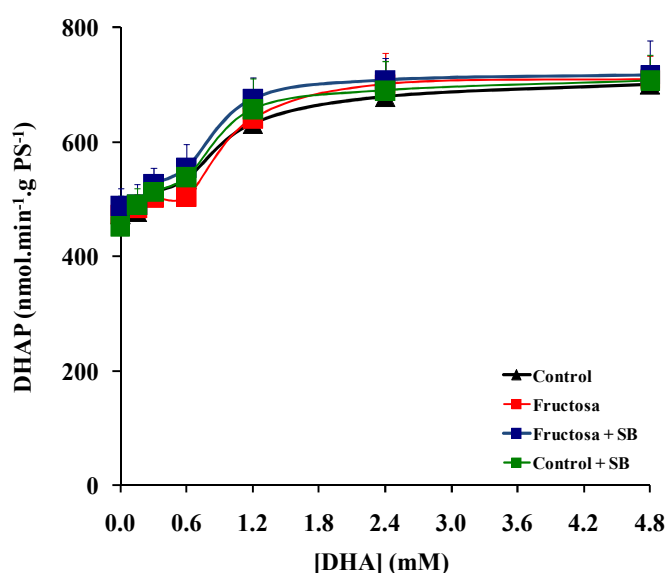


Figura 32. Efecto de una dieta rica en fructosa sobre la producción de DHAP a partir de DHA

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml), perteneciente a los distintos grupos experimentales, se perfunden con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado con carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 31**. En cada estado estacionario, se recogen muestras de células de las cámaras y se centrifugan a través de una capa de aceite de acuerdo a lo descrito en la sección de "Material y Métodos". Las concentraciones intracelulares de DHAP se miden en la fracción celular neutralizada. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, la relación entre DHAP y el flujo metabólico global de la DHA no debería verse afectada. Sin embargo, esto no es lo que se obtuvo en los siguientes experimentos. Tal y como se observa en la **Figura 33A**, la dieta rica en fructosa induce una modificación de la relación entre la concentración de DHAP y J_{DHA} , de manera que para una concentración determinada de DHAP, J_{DHA} aumenta. El tratamiento con SB durante dos semanas de ratas alimentadas con una dieta

rica en fructosa normaliza los valores de J_{DHA} para una concentración determinada de DHAP. También conviene destacar que en ratas control tratadas con SB, se observa una modificación de la relación entre la concentración de DHAP y J_{DHA} con respecto a los valores control. Por tanto, estos resultados nos indican que tanto la dieta rica en fructosa como la SB ejercen un efecto más allá de la etapa de fosforilación de la DHA, tanto en las rutas gluconeogénicas como en las glucolíticas.

Para poder identificar el lugar de acción tanto de la dieta rica en fructosa como de la SB sobre la glucólisis y la gluconeogénesis hepáticas en el marco del metabolismo global de DHA se representa el flujo gluconeogénico (**Figura 33B**) y el flujo glucolítico (**Figura 33C**) frente a la concentración de DHAP. De acuerdo al efecto observado en el caso del flujo gluconeogénico (**Figura 31**) en los experimentos iniciales, se observa que la dieta rica en fructosa incrementa la producción de glucosa para una concentración determinada de DHAP mientras que el tratamiento con SB durante 2 semanas revierte dicha relación.

Con respecto a la relación entre el flujo glucolítico y DHAP, las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa presentan una mayor producción de lactato+piruvato para una misma concentración de DHAP con respecto a los valores control. La SB devuelve esos valores hasta niveles cercanos a los observados en hepatocitos control. Tanto en el caso del flujo gluconeogénico como en el del flujo glucolítico, se observa también que el tratamiento de ratas control con SB inhibe la producción de glucosa y de lactato+piruvato para una determinada concentración de DHAP.

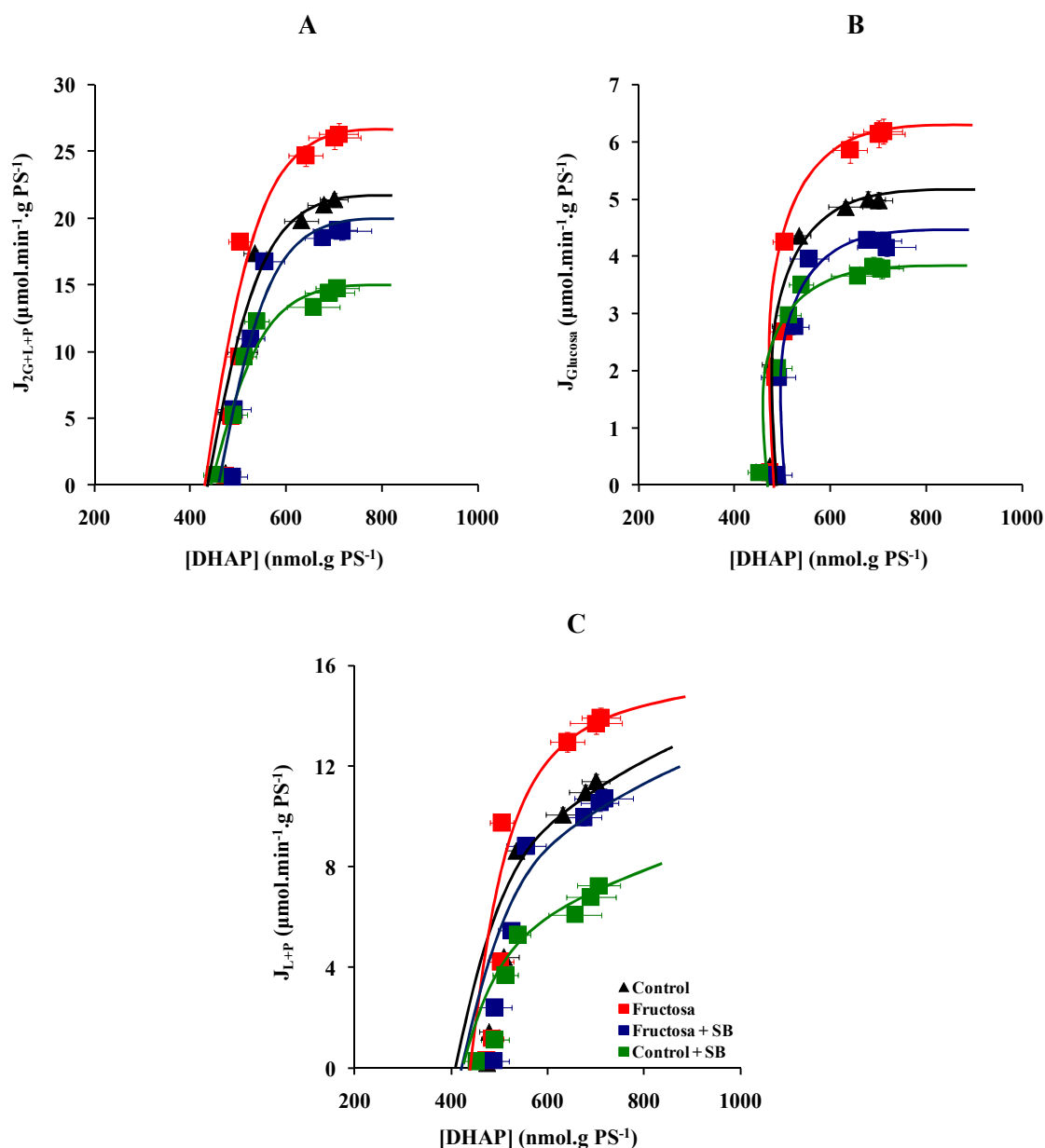


Figura 33. Efecto de la silibinina sobre la producción de DHAP en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa: relación con el metabolismo global de la DHA, la producción de glucosa y de lactato+piruvato

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml), perteneciente a los distintos grupos experimentales, son perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 31**. En cada estado estacionario, se recogen muestras de células de las cámaras y se centrifugan a través de una capa de aceite de acuerdo a lo descrito en la sección de “*Material y Métodos*”. Las concentraciones intracelulares de DHAP se midieron en la fracción celular neutralizada. La **Figura 33A** muestra el efecto de la SB sobre el metabolismo de la DHA más allá de DHAP; la **Figura 33B** muestra el efecto del flavonoide sobre la gluconeogénesis más allá de la DHAP y por último, la **Figura 33C** muestra el efecto de la SB sobre la glucólisis más allá de la DHAP; todo ello en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa durante 6 semanas. Los resultados se expresan como media ± EEM de n = 6 preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales.

1.2. Efecto de la silibinina sobre el metabolismo global de la DHA en el modelo genético de las ratas Zucker diabéticas obesas

Dado que el tratamiento con silibinina durante dos semanas a la dosis de 50 mg/kg/día revierte las alteraciones del metabolismo hepático de la DHA causadas por un modelo nutricional de dieta rica en fructosa, decidimos investigar si dichos efectos se observan también en el modelo genético de las ratas Zucker diabéticas obesas (ZDF), muy usado para el estudio de la DM 2. Como se menciona al comienzo del apartado anterior, se aíslan los hepatocitos de los distintos grupos experimentales y se realiza titración de hepatocitos en presencia de concentraciones subsaturantes crecientes de DHA de acuerdo al modelo experimental de hepatocitos en perfusión explicado detalladamente en la **Sección de Material y Métodos**.

Las ratas ZDF presentan un aumento del metabolismo hepático de la DHA, debido a una activación significativa tanto de la gluconeogénesis como de la glucólisis hepáticas, mientras que el tratamiento con SB durante 2 semanas a la dosis de 50 mg/kg/día revierte esos efectos. Así, los resultados son semejantes a los obtenidos en el caso de la dieta rica en fructosa, con la diferencia de que la activación del flujo glucolítico es mucho mayor que la del flujo gluconeogénico.

Por encima de una concentración de DHA de 0,6 mM, la producción de glucosa aumenta en un 33% en las ratas ZDF respecto a los valores obtenidos en hepatocitos procedentes de ratas delgadas, usadas en este modelo como grupo control. El tratamiento de las ratas ZDF con SB durante dos semanas reduce el aumento de la gluconeogénesis hasta valores normales (**Figura 34A**). En lo que se refiere a la producción de lactato+piruvato, las ratas ZDF presentan una activación del 90% mientras que la administración de SB durante 2 semanas reduce el flujo glucolítico en un 29% (**Figura 34B**).

Como resultado del aumento en la producción de glucosa y de lactato+piruvato en ratas ZDF, el metabolismo global de la DHA aumenta en un 40%. En cambio, el tratamiento con SB durante 2 semanas reduce J_{DHA} hasta valores próximos a los obtenidos con ratas delgadas (**Figura 34C**). También cabe destacar que la SB administrada a ratas delgadas no tuvo ningún efecto significativo sobre el metabolismo hepático de la DHA.

La silibinina revierte el aumento del metabolismo hepático de DHA causado por la resistencia a la insulina tanto en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa como en ratas Zucker diabéticas obesas.

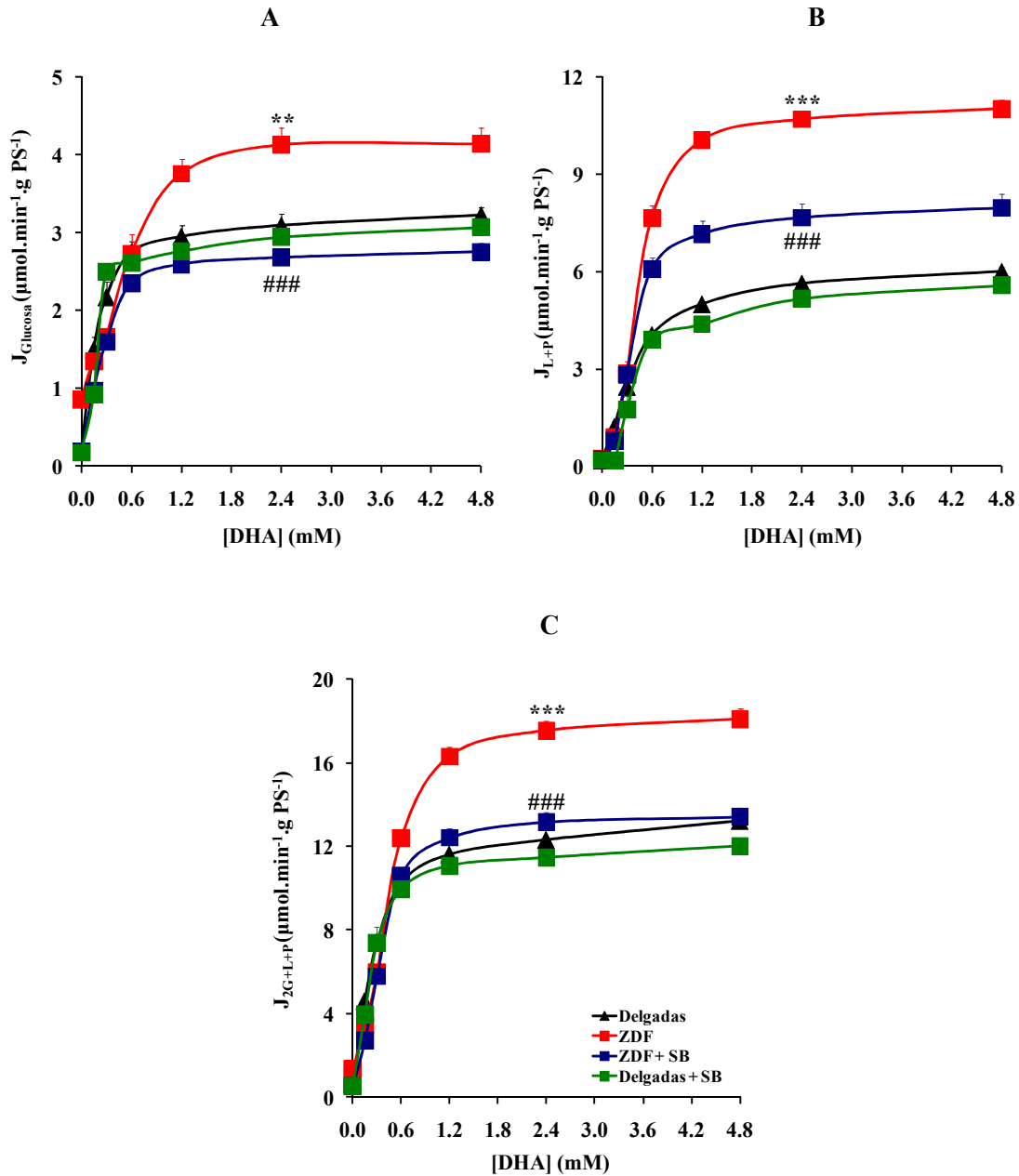


Figura 34. Inhibición de la silibinina sobre el metabolismo hepático de la DHA en ratas ZDF

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml) se aíslan de ratas pertenecientes a los cuatro grupos experimentales: delgadas (▲), ZDF (■), ZDF + SB (■) y delgadas + SB (■). Las ratas se ponen en ayunas 24 horas antes del experimento y los hepatocitos se perfunden con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 31**. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ valores de las ratas ZDF frente a los obtenidos en ratas delgadas control para la concentración de DHA correspondiente. ### $p < 0,001$ valores del tratamiento de ratas ZDF con silibinina frente a los obtenidos en ratas ZDF.

2. INHIBICIÓN DE LA GLUCÓLISIS HEPÁTICA POR LA SILIBININA EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR LA DIETA RICA EN FRUCTOSA

2.1. Efecto de la silibinina sobre la glucólisis hepática en un modelo de dieta rica en fructosa

Tras constatar que tanto en el modelo nutricional de la dieta rica en fructosa como en el modelo genético de las ratas ZDF, la SB revierte el aumento del metabolismo hepático causado por la resistencia a la insulina, se decidió investigar el lugar concreto de acción de la SB sobre la glucólisis hepática en un modelo de resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Cabe destacar que, a partir de ahora, solamente se usará la dieta rica en fructosa como modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2.

Así, como se mencionó previamente, los efectos observados sobre la glucólisis hepática deben localizarse entre DHAP y lactato/piruvato. Con ese fin, se analizan los intermediarios metabólicos fosfoenolpiruvato (PEP) y 3-fosfoglicerato (3-PG) y se representan frente a J_{L+P} . Usando 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 35A**) se puede observar claramente la clásica cinética sigmoide de la enzima piruvato quinasa (PK) que se obtiene en hepatocitos control perfundidos con concentraciones crecientes de DHA. En las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa se observa que dicha curva se desplaza hacia la izquierda, sugiriendo una activación de la PK, mientras que el tratamiento con SB revierte el efecto de la dieta sobre la PK y hace que la curva prácticamente se superponga con la curva control. No obstante, en la misma figura se observa que bajo el efecto de la SB la cinética de la PK permanece del tipo enzima alostérica y su V_{max} aparente disminuye.

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. El análisis del 3-fosfoglicerato (3-PG), un intermediario metabólico puramente citosólico que está en equilibrio con el PEP citosólico (**Crabtree y Newsholme, 1978**), confirma que el tratamiento crónico con SB revierte el aumento de la glucólisis en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa, posiblemente mediante inhibición de la PK (**Figura 35B**).

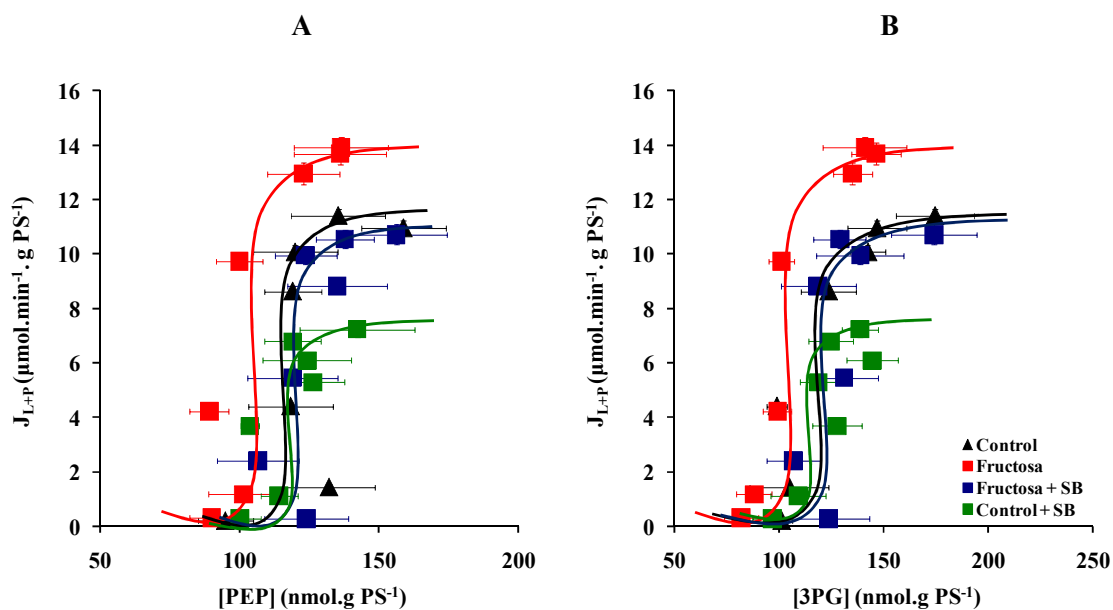


Figura 35. Efecto de la silibinina sobre la glucólisis a partir de DHA en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml), perteneciente a los distintos grupos experimentales, son perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 31**. Las concentraciones intracelulares de PEP y 3PG se miden en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **Figura A** muestra el efecto de la SB sobre la relación entre PEP y J_{L+P} en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa; la **Figura B** muestra el efecto de SB sobre la relación entre 3PG y J_{L+P} en el modelo nutricional de dieta rica en fructosa. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales.

Para poder certificar y asegurar que el efecto inhibitorio de la silibinina sobre la activación de la glucólisis hepática en el modelo nutricional de la dieta rica en fructosa se localiza sobre la enzima piruvato quinasa, clave en la glucólisis, a continuación se procedió a investigar la cinética de esta enzima.

Los resultados preliminares obtenidos a partir del análisis de los intermediarios metabólicos (PEP, 3-PG) indican que la silibinina inhibe la glucólisis hepática en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa mediante un efecto localizado, posiblemente, a nivel de la enzima piruvato quinasa.

2.2. Inhibición de la actividad de la piruvato quinasa por la silibinina en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa

La determinación de la actividad de la enzima piruvato quinasa se realiza siguiendo el protocolo explicado en la sección “**Material y Métodos**”. Así, dicha determinación se lleva a cabo mediante la adición de concentraciones crecientes de fosfoenolpiruvato, después de la extracción de dicha enzima con o sin purificación parcial, a partir de hepatocitos pertenecientes a los cuatro grupos experimentales. La actividad de la enzima piruvato quinasa hepática no purificada (M-piruvato quinasa) se mide en el sobrenadante mientras que la actividad de la enzima parcialmente purificada (L-piruvato quinasa) se determina en el precipitado después de lavar el homogenado con sulfato de amonio saturado.

Los resultados, expuestos en la **tabla 8**, demuestran que el efecto de la dieta rica en fructosa sobre la glucólisis hepática reside en un aumento de la actividad de la enzima piruvato quinasa mientras que el tratamiento con SB durante 2 semanas revierte esa modificación de la actividad de la enzima.

Cuando se analiza exclusivamente la enzima no purificada, la dieta rica en fructosa causa un aumento del 120% sobre la velocidad máxima (V_{max}) de la enzima, pero sin llegar a modificar la relación v/V_{max} , que representa la actividad de la piruvato quinasa. El tratamiento con SB revierte casi totalmente el efecto de la dieta sobre la velocidad máxima. Cuando se centra el estudio en la actividad de la enzima hepática parcialmente purificada, la dieta rica en fructosa provoca un incremento del 135% en los valores de la velocidad máxima de la enzima, mientras que la SB revierte parcialmente dicho aumento. En este caso, la dieta rica en fructosa también causa un aumento significativo de la relación v/V_{max} , lo cual supone un aumento de la actividad de la enzima. El tratamiento con SB normaliza los valores de dicha relación. También se observa que la SB administrada a ratas control disminuye la relación v/V_{max} sin afectar de manera significativa a los valores de la velocidad máxima.

Piruvato quinasa	v/V_{\max}		V_{\max}	
	No purificada	Parcialmente purificada	No purificada	Parcialmente purificada
	<i>nmol.min⁻¹.mg proteínas⁻¹</i>		<i>nmol.min⁻¹.mg proteínas⁻¹</i>	
Control	0.53 ± 0.02	0.53 ± 0.01	200 ± 6	278 ± 18
Fructosa	0.54 ± 0.01	0.57 ± 0.01*	441 ± 34***	653 ± 42***
Fructosa + SB	0.54 ± 0.02	0.50 ± 0.01###	277 ± 21###	413 ± 27###
Control + SB	0.56 ± 0.02	0.49 ± 0.03†	235 ± 17	311 ± 30

Tabla 8. Efectos de la silibinina sobre la actividad de la piruvato quinasa en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los hepatocitos (10 mg de peso seco·ml⁻¹) se aíslan de ratas Wistar, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales: control, fructosa, fructosa + SB y control + SB. Las ratas se ponen en ayunas 24 horas antes del experimento y los hepatocitos se incuban en Krebs-Bicarbonato-Calcio saturado en carbógeno a 37°C durante 30 minutos en viales cerrados con DHA 20 mM. Después de la incubación, las muestras celulares se recogen de los viales, se centrifugan, se resuspenden y se homogenizan 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 mide en el sobrenadante, con o sin purificación parcial, en presencia de concentraciones crecientes de PEP. La relación v/V_{\max} representa la actividad de la enzima piruvato quinasa con 0.4 mM de PEP (v) dividida por la actividad máxima obtenida con 4 mM de PEP (V_{\max}). Los resultados se expresan como media ± EEM de $n = 5$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ valores del grupo fructosa comparado con los hepatocitos control. ### $p < 0.001$ valores del grupo fructosa + SB respecto a los del grupo fructosa. † $p < 0.05$ valores del grupo control + SB con respecto a los obtenidos en hepatocitos control.

Estos resultados nos indican que el efecto inhibitorio de la silibinina sobre la glucólisis hepática en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa se explica mediante una inhibición de la actividad de la enzima piruvato quinasa.

3. INHIBICIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS POR LA SILIBININA EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

3.1. Efecto de la silibinina sobre la gluconeogénesis hepática a partir de DHA en la resistencia a la insulina inducida por un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Para investigar la(s) etapa(s) implicada(s) en la activación de la gluconeogénesis hepática inducida por una dieta rica en fructosa y su reversión por el tratamiento con SB durante 2 semanas, se analizan por métodos espectrofluorimétricos las concentraciones intracelulares de los principales intermediarios gluconeogénicos (G6P y F6P) y se representan frente a los flujos gluconeogénicos correspondientes en cada estado estacionario.

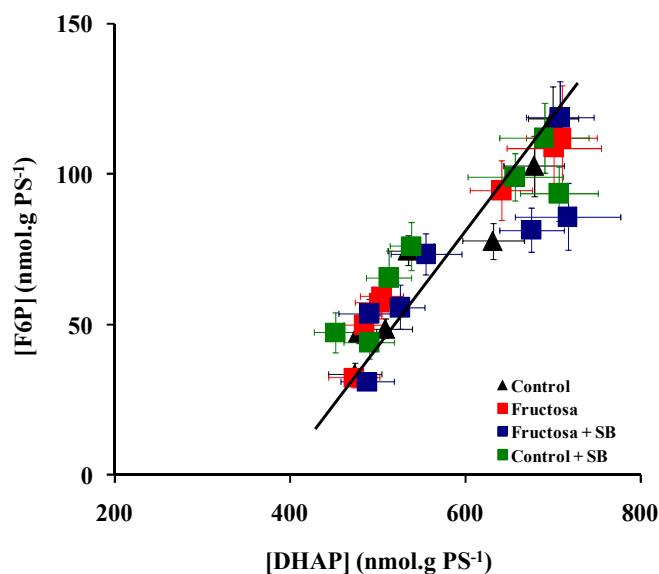


Figura 36. Efecto de la silibinina sobre la gluconeogénesis a partir de DHA en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa: relación entre F6P y DHAP

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml), pertenecientes a los distintos grupos experimentales, son perifundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 31**. Las concentraciones intracelulares de F6P y DHAP se miden en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La Figura muestra el efecto de la SB sobre la relación entre DHAP y F6P en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa (60%) durante 6 semanas. Los resultados se expresan como media \pm EEM de n = 6 preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales.

En la figura anterior (**Figura 36**) se representa la relación entre las concentraciones intracelulares de DHAP y fructosa-6-fosfato (F6P), permitiendo así estudiar el “ciclo de las fructosas”: fructosa-1,6-bisfosfatasa/fosfofructoquinasa (F1,6bPasa/PFK). En nuestras condiciones experimentales, al usar animales en ayunas durante 24 horas, se considera 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 cercanas al equilibrio (**Groen et al, 1983; Groen et al, 1986**). Por lo tanto, la concentración de DHAP probablemente refleja la concentración de fructosa-1,6-bisfosfato (F1,6bP). Gracias a la **Figura 36** podemos deducir que la dieta rica en fructosa no afecta a este ciclo, ya que sus valores se correlacionan con los de los controles en cada estado estacionario (entre 30 y 120 nmol g peso seco⁻¹ para F6P). El tratamiento con SB tampoco muestra ningún efecto a nivel de la relación entre DHAP y F6P. Por tanto, se puede sugerir que tanto la dieta rica en fructosa como la SB no afectan al ciclo de las fructosas.

Por lo tanto, la inhibición de la gluconeogénesis por acción del tratamiento con SB en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa se debe, principalmente, a un efecto localizado más allá de la F6P. Así, en la **Figura 37A** se demuestra que existe una doble relación entre los niveles de F6P y el flujo de producción de glucosa ($J_{Glucosa}$) en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa, y que dicha relación se normaliza por el tratamiento con SB.

Como la enzima fosfoglucoisomerasa (PGI) (encargada de la interconversión de F6P en G6P y viceversa) funciona cercana al equilibrio, se encontrará teóricamente la misma doble relación entre F6P y $J_{Glucosa}$ que entre G6P y $J_{Glucosa}$ en el caso del modelo nutricional de la dieta rica en fructosa. Del mismo modo, la SB revierte dicha relación (**Figura 37B**).

En nuestras condiciones experimentales, el flujo metabólico a través de la enzima glucoquinasa (GK) es despreciable por la baja expresión de la GK debida al ayuno de 24 horas (**Groen et al, 1983; Groen et al, 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 ratas tratadas con una dieta rica en fructosa y su reversión por la SB, nos indica que la inhibición de la gluconeogénesis hepática inducida por el tratamiento con SB en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa 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).

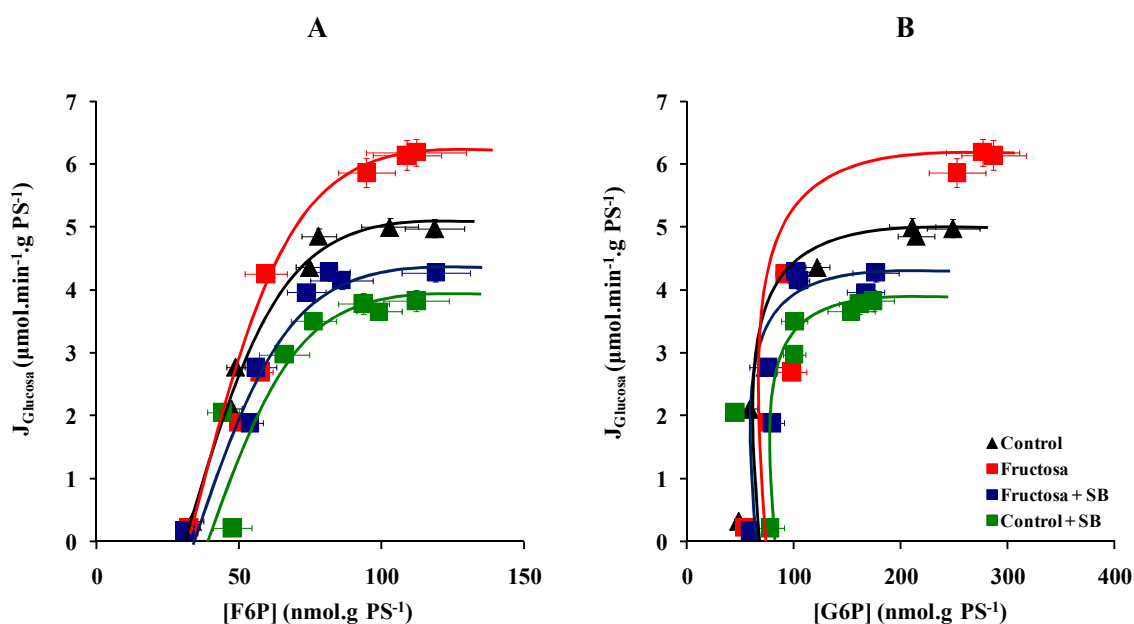


Figura 37. Efecto de la silibinina sobre la gluconeogénesis a partir de DHA en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los hepatocitos (200 mg de peso seco en 15 ml), pertenecientes a los distintos grupos experimentales, son perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 31**. Las concentraciones intracelulares de F6P y G6P se miden en la fracción celular neutralizada recogida en cada estado estacionario. La **Figura A** muestra el efecto de la SB sobre la relación entre F6P y $J_{Glucosa}$ en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa durante 6 semanas; la **Figura B** muestra el efecto de la SB sobre la relación entre G6P y $J_{Glucosa}$ en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales.

La silibinina inhibe la gluconeogénesis hepática en un modelo de resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa inhibiendo la liberación de glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato mediante un efecto localizado posiblemente sobre la enzima gluconeogénica glucosa 6-fosfatasa

Por todo lo anteriormente expuesto, el siguiente paso es determinar el efecto del tratamiento con SB sobre la actividad de la glucosa 6-fosfatasa en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa.

3.2. Inhibición de la actividad de la glucosa 6-fosfatasa por la silibinina en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa

Los resultados y las conclusiones expuestos en el apartado anterior indican que la reversión, por efecto de la SB, de la doble relación entre la concentración de G6P y el flujo gluconeogénico, encontrada en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa, es el resultado de una potente inhibición de la hidrólisis de la G6P por acción de la SB a nivel de la enzima clave en la última etapa de la gluconeogénesis: la glucosa 6-fosfatasa.

Para investigar los efectos del tratamiento con SB sobre la actividad de esta enzima en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa, se determina la actividad de la enzima glucosa 6-fosfatasa según la técnica de Baginski y cols (**Baginski et al, 1975**). Así, los hepatocitos, aislados de los distintos grupos experimentales, se incuban en dos tiempos: en primer lugar con Krebs-bicarbonato-calcio con el sustrato energético DHA y en segundo lugar con tampón Sacarosa-Tris, añadiendo a éste último concentraciones conocidas y crecientes de G6P (**ver sección de Material y Métodos**).

En la siguiente figura (**Figura 38**) se observa que la dieta rica en fructosa incrementa la actividad de la glucosa 6-fosfatasa en un 21% a partir de una concentración de G6P de 10 mM. El tratamiento con SB durante dos semanas normaliza la actividad de la glucosa 6-fosfatasa, de tal manera que a partir de una concentración de G6P de 1 mM se observa que la actividad de la glucosa-6-fosfatasa es menor respecto a la observada en hepatocitos aislados de ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Además, merece especial mención el hecho de que el tratamiento de ratas control con SB causa una inhibición significativa de la actividad de la glucosa 6-fosfatasa con respecto al control.

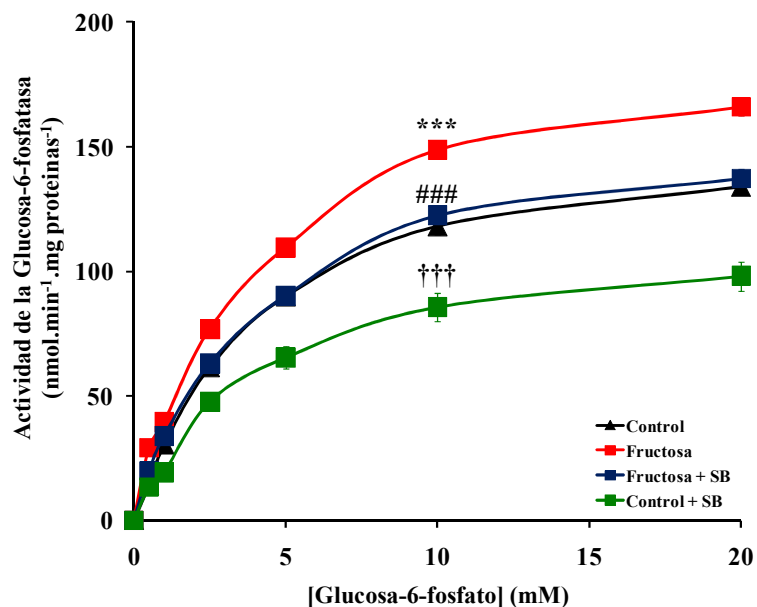


Figura 38. Efecto de la silibinina sobre la actividad de la glucosa 6-fosfatasa en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

La actividad de la enzima glucosa 6-fosfatasa se determina 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. Tras el choque hipo-osmótico con Tris y la sonicación, se evalúa 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 estima mediante la hidrólisis del β -glicerofosfato en lugar de la G6P en las mismas condiciones experimentales y se resta a todas las medidas realizadas. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. *** $p < 0.001$ valores del grupo fructosa comparado con los hepatocitos control. ### $p < 0.001$ valores del grupo fructosa + SB respecto a los del grupo fructosa. ††† $p < 0.001$ valores del grupo control + SB con respecto a los obtenidos en hepatocitos control.

La siguiente tabla (Tabla 9) muestra los parámetros cinéticos, K_m (constante de afinidad) y la V_{max} (velocidad máxima) de la enzima G6Pasa (enzima Michaeliana) en los cuatro grupos experimentales planteados. Esta tabla muestra que la resistencia a la insulina inducida por una dieta en fructosa causa un incremento de la velocidad máxima así como una disminución de la constante de afinidad, lo cual supone una mayor afinidad de la enzima por la G6P. El tratamiento con SB revierte los valores de la velocidad máxima sin llegar a modificar la constante de afinidad con respecto a los valores obtenidos en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. Por otra parte, la SB administrada a ratas control causa una disminución de la velocidad máxima sin modificar significativamente la constante de afinidad.

Glucosa 6- fosfatasa	K_m	V_{max}
	<i>mM</i>	<i>nmol.min⁻¹.mg proteínas⁻¹</i>
Control	5.05 ± 0.36	160 ± 5
Fructosa	3.63 ± 0.24**	212 ± 14*
Fructosa + SB	3.65 ± 0.28	160 ± 9[#]
Control + SB	4.75 ± 0.11	101 ± 9[†]

Tabla 9. Efecto de la silibinina sobre la cinética de la enzima glucosa 6-fosfatasa en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los valores K_m y V_{max} de la enzima glucosa 6-fosfatasa para cada uno de los grupos experimentales se calculan ajustando la curva con la ecuación de Michaelis-Menten mediante el Ultrafit Software. Los resultados se expresan como media ± EEM de n = 6 preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. * p<0.05; ** p<0.01 valores del grupo fructosa comparado con los hepatocitos control. # p<0.05 valores del grupo fructosa + SB respecto a los del grupo fructosa. † p<0.001 valores del grupo control + SB con respecto a los obtenidos en hepatocitos control.

La inhibición de la gluconeogénesis por el tratamiento con silibinina en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa se explica por la inhibición de la actividad de la enzima gluconeogénica glucosa-6-fosfatasa

4. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA GLUCOGENÓLISIS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

Dado que la SB revierte las alteraciones sobre el metabolismo hepático causadas por la dieta rica en fructosa, inhibiendo tanto la gluconeogénesis como la glucólisis, decidimos investigar el efecto de la SB sobre la glucogenólisis hepática en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa debido a la gran relación que guarda este proceso metabólico con el metabolismo hepático global. Para llevar a cabo este proceso, se utilizan ratas con libre acceso a la comida y al agua durante toda la noche anterior al experimento, con el fin de que las reservas de glucógeno hepático estuviesen suficientemente elevadas. Por lo tanto, a partir de hepatocitos aislados de los distintos grupos experimentales, se llevan a cabo experimentos de perfusión, de tal manera que se monitoriza a distintos tiempos la liberación de la glucosa, del lactato y del piruvato en presencia o ausencia de glucagón (10^{-7} M), hormona hiperglucemiante que estimula la glucogenólisis hepática.

4.1. Efecto de la silibinina sobre el flujo de glucosa en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

La siguiente figura (**Figura 39**) representa el flujo de la glucosa liberada a partir del glucógeno ($J_{Glucosa}$) de hepatocitos en perfusión, en función del tiempo en presencia o ausencia de glucagón (10^{-7} M). El glucagón se administra en el minuto 25 de la perfusión tras un período de estabilización de los hepatocitos.

En la situación en la que se infunde el glucagón al t25 (**Figura 39A**), se observa que el flujo de la glucosa liberada aumenta significativamente en más de un 250% para luego disminuir a partir del t35. En este punto, la dieta rica en fructosa incrementa la liberación de glucosa a partir del glucógeno en un 36% en comparación con los hepatocitos control. La SB, administrada a ratas tratadas con una dieta rica en fructosa, normaliza los valores de producción de glucosa. Por último, el tratamiento de ratas control con SB produjo una reducción del 34% del flujo de glucosa inducido por glucagón en comparación con los hepatocitos control.

Por otra parte, cuando no se infunde glucagón en las cámaras de perfusión (**Figura 39B**), la producción de glucosa se va ralentizando hasta valores mínimos. Así, la dieta rica en fructosa aumenta la producción de glucosa en ausencia de glucagón en un 85%. La administración de SB durante 2 semanas a ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa revierte completamente el aumento exacerbado del flujo gluconeogénico.

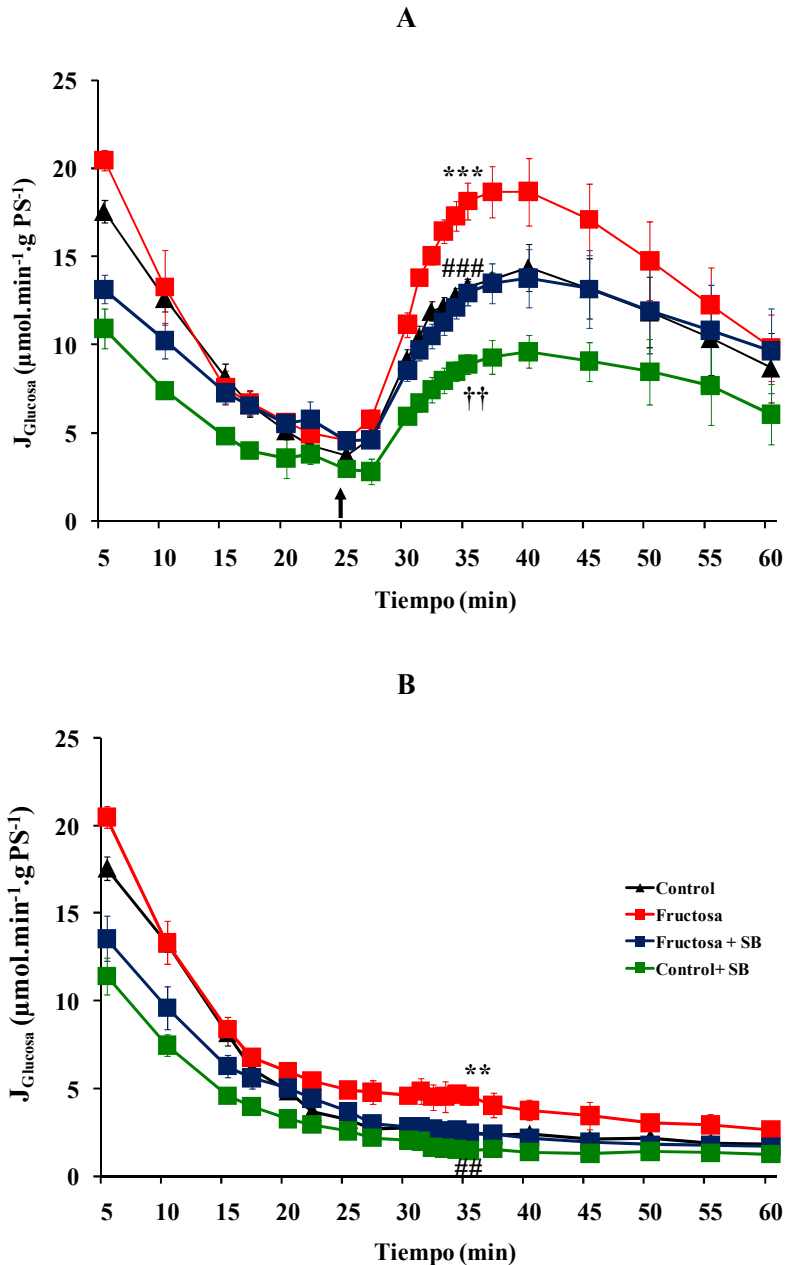


Figura 39. Efecto de la silibinina sobre el flujo de liberación de glucosa a partir del glucógeno hepático en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los hepatocitos (100 mg de peso seco en 15 mL) se aíslan a partir de ratas Wistar machos no en ayunas con acceso *ad libitum* a la comida y al agua y pertenecientes a los cuatro grupos experimentales. Dichos hepatocitos se perfunden 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 período de estabilización de 25 minutos, se infunde el glucagón (10^{-7} M). La **Figura A** muestra el flujo de producción de glucosa liberada a partir del glucógeno ($J_{Glucosa}$) en presencia de glucagón. La **Figura B** muestra ese mismo flujo pero en ausencia del glucagón. Este flujo se calcula a partir de las concentraciones de glucosa en el perfusado. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 4$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ valores del grupo fructosa comparado con los hepatocitos control a los tiempos correspondientes. ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ valores del grupo fructosa + SB respecto a los del grupo fructosa a los tiempos correspondientes. †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB con respecto a los obtenidos en hepatocitos control a los tiempos correspondientes.

Con el fin de dilucidar donde radica el efecto inhibitor de la silibinina sobre el aumento de la glucogenólisis inducido por la ingesta de una dieta rica en fructosa durante 6 semanas, se presentan a continuación los resultados de las medidas de algunos intermediarios metabólicos, como la F6P y G6P, realizados en los mismos experimentos de la **Figura 39**.

Se deduce que la dieta rica en fructosa favorece la hidrólisis de la G6P proveniente del glucógeno, ya que para una concentración determinada de G6P, $J_{Glucosa}$ aumenta con respecto al control. La administración de SB, a la dosis de 50 mg/kg/día, durante 2 semanas normaliza la relación entre G6P y $J_{Glucosa}$, por lo que la SB ejerce una potente inhibición sobre la hidrólisis de G6P (**Figura 40A**). Por tanto, podemos asumir que, la disminución de la glucogenólisis por la silibinina en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa, no se debe a una disminución de la cantidad de G6P por su utilización posterior en la glucólisis, como se indica en la relación entre F6P y $J_{Glucosa}$ (**Figura 40B**). Por último, también se observa que la SB administrada a ratas control causa una inhibición de la hidrólisis de G6P.

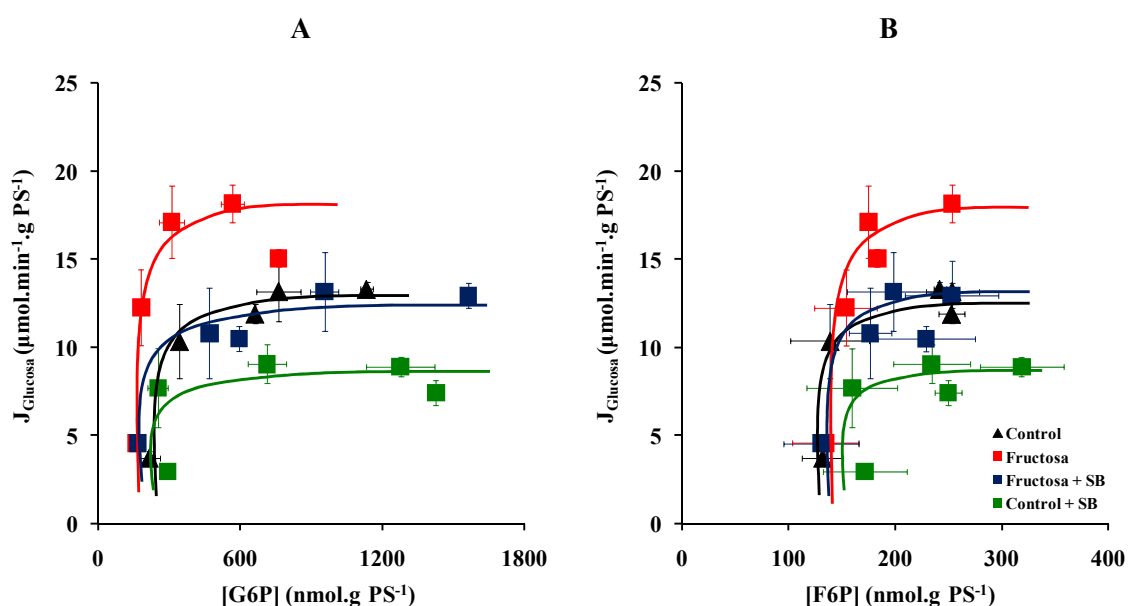


Figura 40. Efectos de la silibinina sobre la concentración intracelular de G6P y F6P a partir de la glucosa liberada del glucógeno hepático en un modelo nutricional de dieta en fructosa

Los hepatocitos (100 mg de peso seco en 15 ml), pertenecientes a los distintos grupos experimentales, son perfundidos con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 39**. Después de un período de estabilización de 25 minutos, se infunde el glucagón (10^{-7} M). A los minutos 25, 32, 35, 45 y 55 se recogen muestras de células de las cámaras para medir las concentraciones intracelulares de G6P y F6P. La **Figura A** muestra el efecto de la SB sobre la relación entre G6P y $J_{Glucosa}$ en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa durante 6 semanas. La **Figura B** representa el efecto de la SB sobre la relación entre F6P y $J_{Glucosa}$ en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales.

La silibinina inhibe la glucogenólisis en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa mediante la inhibición de la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato, confirmando los resultados obtenidos a nivel de la glucosa 6-fosfatasa

4.2. Efecto de la silibinina sobre la glucólisis a partir de la glucosa liberada por la glucogenólisis en un modelo de dieta rica en fructosa

En los mismos experimentos de perfusión mostrados en el apartado anterior (Figura 39), también se mide el flujo glucolítico (J_{L+p}) en el perifusato recogido a distintos tiempos, en presencia o en ausencia de glucagón 10^{-7} M.

La administración de glucagón inhibe drásticamente el flujo glucolítico en un 60% (de $5,67 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g PS}^{-1}$ a $3,57 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g PS}^{-1}$) a t35. En esta situación, las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa muestran un incremento del 68% en la producción de lactato+piruvato con respecto a las ratas control. En cambio, el tratamiento con SB normaliza los valores de flujo glucolítico (Figura 41A).

En los experimentos realizados en ausencia de glucagón, se observa que la dieta rica en fructosa activa la glucólisis en un 53%. El tratamiento con SB revierte totalmente ese aumento de la glucólisis. Además, la SB inhibe significativamente la glucólisis hepática a partir de la glucosa liberada del glucógeno hepático cuando es administrada a ratas control (Figura 41B).

Por lo tanto, estos resultados son coherentes con las acciones de la SB sobre la glucólisis hepática en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa, ya comentadas anteriormente. Así, en presencia de glucagón, la dieta rica en fructosa incrementa el flujo de producción de lactato+piruvato a partir de la glucosa liberada del glucógeno hepático, mientras que el tratamiento con SB revierte totalmente el aumento de la glucólisis hepática y de la degradación de glucosa liberada a partir del glucógeno.

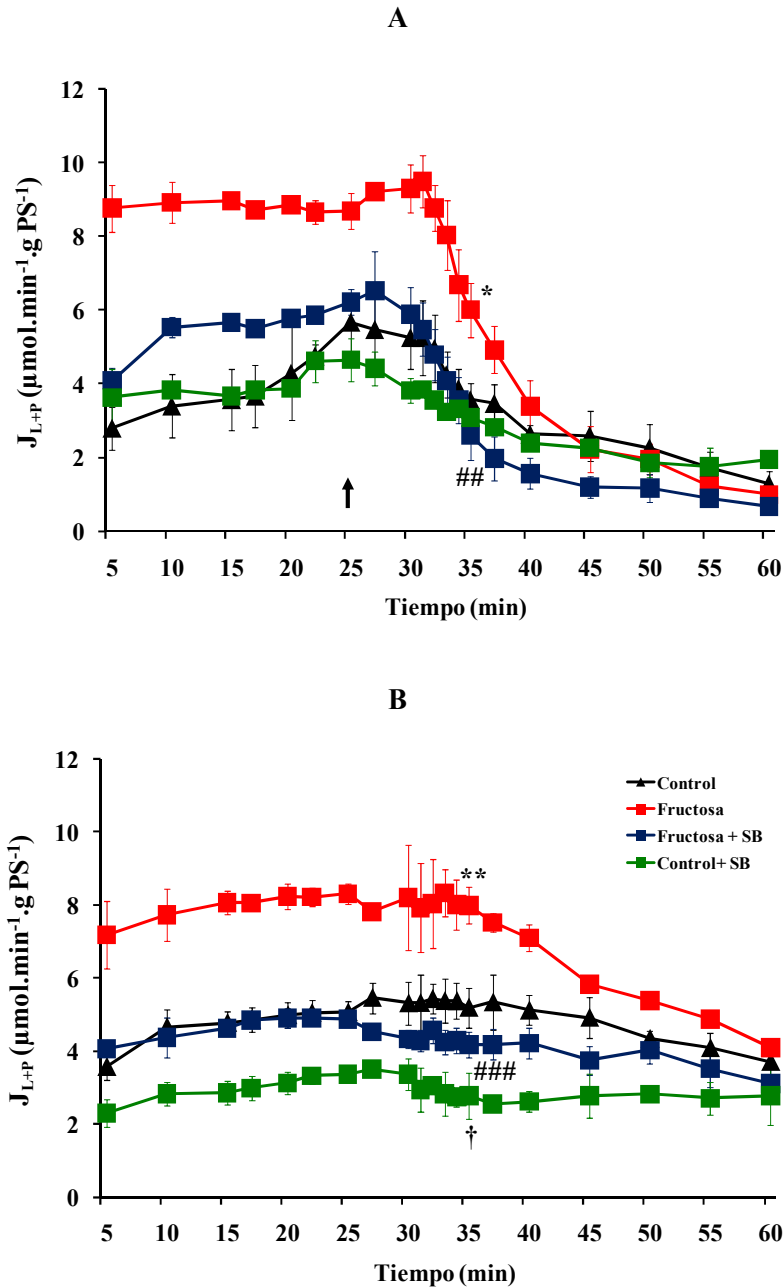


Figura 41. Efecto de la silibinina sobre el flujo glucolítico a partir de la glucosa liberada por glucogenólisis en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los hepatocitos (100 mg de peso seco en 15 mL) se perfunden con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 39**. Después de un período de estabilización de 25 minutos, se infunde el glucagón (10^{-7} M). La **Figura A** muestra el flujo glucolítico (J_{L+P}) a partir de la glucosa liberada por glucogenólisis en presencia de glucagón. La **Figura B** representa ese mismo flujo pero en ausencia del glucagón. El flujo glucolítico (J_{L+P}) se calcula a partir de las concentraciones de lactato más piruvato en el perfusado. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 4$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ valores del grupo fructosa comparado con los hepatocitos control a los tiempos correspondientes. ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ valores del grupo fructosa + SB respecto a los del grupo fructosa a los tiempos correspondientes. † $p < 0.05$ valores del grupo control + SB con respecto a los obtenidos en hepatocitos control a los tiempos correspondientes.

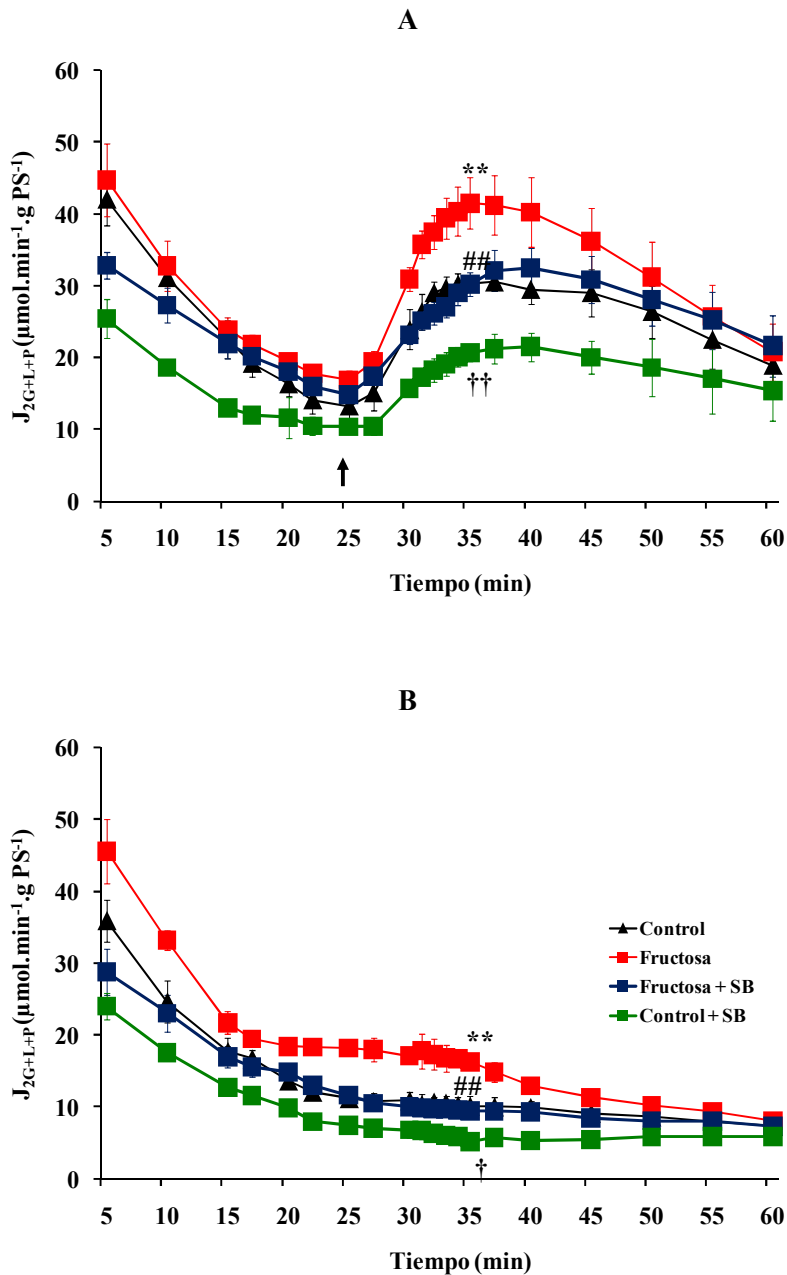
4.3. Efecto de la silibinina sobre el flujo metabólico global producido por el metabolismo de la glucosa liberada del glucógeno hepático en un modelo de dieta rica en fructosa

La **figura 42** representa el flujo metabólico total en función del tiempo. Recordamos que el flujo metabólico global (J_{2GLP}) se expresa en forma de equivalentes de 3 carbonos mediante la suma de 2 x glucosa + lactato + piruvato.

Cuando se administra el glucagón en el t25, el flujo metabólico global aumenta en un 128% con respecto a los experimentos control en los que no se administra la hormona: se pasa de valores de 13,24 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g PS}^{-1}$ a valores de 30,25 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g PS}^{-1}$ por acción del glucagón. En presencia de glucagón, la dieta rica en fructosa aumenta el flujo metabólico global en un 37% con respecto a los valores control. El tratamiento con SB de ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa normaliza el J_{2GLP} . La SB, administrada a ratas control, también reduce el flujo metabólico total en un 32% (**Figura 42A**).

Cuando se estudia el flujo metabólico global en ausencia de glucagón, se observa que en el caso de la dieta rica en fructosa se incrementa el flujo metabólico total en un 60% frente a los valores obtenidos en hepatocitos control. La SB revierte totalmente el incremento del flujo metabólico total causado por la dieta rica en fructosa (**Figura 42B**).

Por lo tanto, a la vista de estos resultados, se puede constatar que la dieta rica en fructosa causa una activación del metabolismo hepático global a partir de la glucosa liberada por la glucogenólisis, lo cual se debe a una activación tanto del flujo gluconeogénico como del flujo glucolítico aunque con un predominio de éste último. En cambio, la administración de SB, a la dosis de 50 mg/kg/día, a ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa durante 6 semanas, revierte los valores de los flujos gluconeogénico y glucolítico y los sitúa en valores próximos a los normales.



Los hepatocitos (100 mg de peso seco en 15 ml) se perfunden con Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno tal y como está descrito en la leyenda de la **Figura 39**. Después de un período de estabilización de 25 minutos, se infunde el glucagón (10^{-7} M). La **Figura A** muestra el flujo metabólico global (J_{2G+L+P}) a partir de la glucosa liberada por la glucogenólisis en presencia de glucagón. La **Figura B** representa ese mismo flujo pero en ausencia del glucagón. El flujo metabólico global (J_{2G+L+P}) se expresa en forma de equivalentes de 3 carbonos mediante la suma de 2xglucosa+lactato+piruvato. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 4$ preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$ valores del grupo fructosa comparado con los hepatocitos control a los tiempos correspondientes. ## $p < 0.01$ valores del grupo fructosa + SB respecto a los del grupo fructosa a los tiempos correspondientes. † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB con respecto a los obtenidos en hepatocitos control a los tiempos correspondientes.

5. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA RUTA DE LAS PENTOSAS FOSFATO EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

Como se sabe, la glucólisis y la ruta de las pentosas fosfato están interconectadas, de tal manera que ésta lleva a cabo una descarboxilación oxidativa de la G6P, procedente de la vía glucolítica, con el fin de obtener potencial redox en forma de NADPH. En nuestros estudios previos, se observa que el tratamiento con silibinina inhibe tanto la actividad de la enzima gluconeogénica G6Pasa como la de la enzima glucolítica PK en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Por lo tanto, para intentar esclarecer cuál es el camino que sigue esta glucosa 6-fosfato, determinamos si parte de este metabolito podría desviarse hacia la ruta de las pentosas fosfato.

Para ello, se determina la actividad del ciclo de las pentosas fosfato mediante la diferencia entre la oxidación de la [1-¹⁴C]-glucosa y la de [6-¹⁴C]-glucosa. Así, se observa que el tratamiento con una dieta rica en fructosa reduce significativamente la actividad de la ruta de las pentosas fosfato mientras que la SB revierte totalmente ese efecto, situándose incluso por encima de los valores obtenidos en hepatocitos control. Además, la SB también muestra un aumento significativo de la actividad del ciclo de las pentosas fosfato cuando se administra a ratas control durante dos semanas (**Figura 43**).

A este respecto, podemos concluir que, la glucosa 6-fosfato acumulada como consecuencia de la inhibición de la gluconeogénesis y de la glucólisis por efecto de la silibinina en un modelo de dieta rica en fructosa se desvía hacia la ruta de las pentosas fosfato, mientras que en el caso de ratas tratadas con una dieta rica en fructosa parece evidente que la glucosa 6-fosfato se emplea fundamentalmente para la formación de glucosa y de lactato+piruvato.

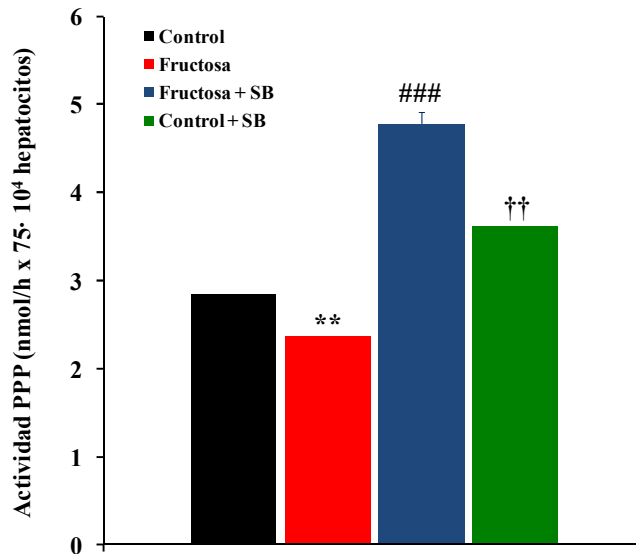


Figura 43. Efecto de la silibinina sobre la actividad de la ruta de las pentosas fosfato en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

El efecto de la silibinina sobre la actividad de la ruta de las pentosas fosfato se determina en hepatocitos previamente preincubados y obtenidos de ratas Wistar macho, pertenecientes a los distintos grupos experimentales. La actividad de dicho ciclo se estima mediante la diferencia entre la oxidación de la [1-¹⁴C]-glucosa y la de [6-¹⁴C]-glucosa, lo que permite obtener una medida fiable de la actividad de esta vía. Los resultados se expresan como media ± EEM de n = 2 preparaciones distintas de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. ** p<0.01 valores del grupo fructosa comparado con los hepatocitos control. ### p<0.001 valores del grupo fructosa + SB respecto a los del grupo fructosa †† p<0.01 valores del grupo control + SB con respecto a los obtenidos en hepatocitos control.

La silibinina incrementa la actividad de la ruta de las pentosas fosfato en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa mediante el desvío de la glucosa 6-fosfato acumulada como consecuencia de la inhibición de la gluconeogénesis y de la glucólisis

6. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

Como ya se ha mencionado anteriormente el estrés oxidativo se define como una situación en la que existe tanto un aumento de la velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como una disminución de los sistemas de defensa. Así, se sabe que la diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por un aumento crónico y creciente de los estímulos que favorecen el estrés oxidativo y por una disminución de la eficacia de los sistemas antioxidantes. Teniendo en cuenta que la dieta rica en fructosa tiene un efecto pro-oxidante y que la SB ha mostrado efectos antioxidantes muy importantes, decidimos investigar si la SB es capaz de revertir el estrés oxidativo en la resistencia a la insulina inducida por un modelo nutricional de dieta rica en fructosa. Así, en esta parte de la sección de Resultados nos vamos centrar más en los efectos de la SB sobre los sistemas antioxidantes y especialmente el glutatión. Para ello, se determina, en primer lugar, el estado antioxidante total en plasma, como primera aproximación al estado general de las defensas antioxidantes y en segundo lugar, se estudian los niveles de glutatión hepático.

6.1. Efecto de la silibinina sobre el estado antioxidante total en un modelo de dieta rica en fructosa

Como se describe en la Sección de Material y Métodos, el término “estado antioxidante total” se refiere a la capacidad o actividad antioxidante que presenta la muestra para contrarrestar el efecto de las sustancias oxidantes. Esta determinación sirve como primera aproximación al estado antioxidante general de cada uno de los grupos experimentales.

Entonces, a partir de muestras de sangre, pertenecientes a ratas de los cuatro grupos experimentales, se observa que la dieta en fructosa causa un descenso del 46% en el estado antioxidante total. En cambio, el tratamiento con SB durante 2 semanas restablece el estado antioxidante total, llegando incluso a valores situados por encima del control. También cabe destacar que la SB administrada a ratas control causa una mejora del estado antioxidante total con respecto al control. Así, a la vista de estos resultados, podemos decir que la SB mejora el estado antioxidante total en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa (**Figura 44**).

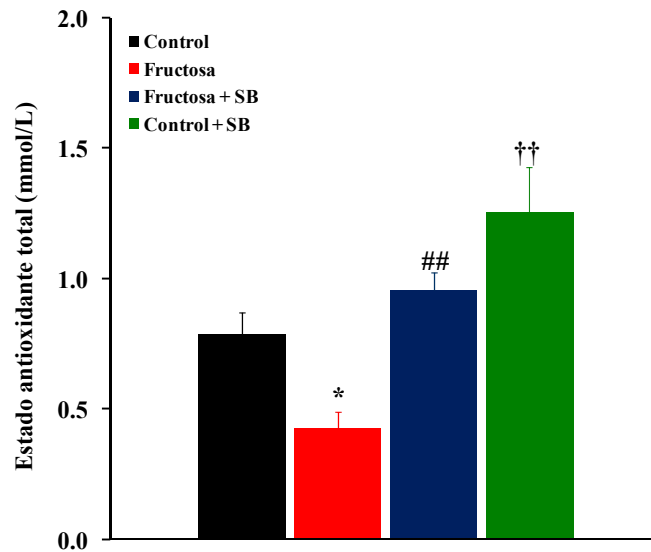


Figura 44. Efecto de la silibinina sobre el estado antioxidante total en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

El estado antioxidante total se mide a partir de las muestras de sangre procedentes de ratas en ayunas, pertenecientes a los distintos grupos experimentales. El análisis consiste en incubar la muestra con ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazol sulfonato), metamioglobina y peróxido de hidrógeno para formar $ABTS^+$ tal y como se indica en la sección de *Material y Métodos*. La formación de ese radical da lugar a una coloración verde-azulada, de tal manera que a menor coloración, más capacidad antioxidante. Los resultados se expresan como media \pm EEM; n = 5 ratas para cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$ valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ## $p < 0.01$ valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

6.2. Efecto de la silibinina sobre los niveles de glutatión hepático en un modelo de dieta rica en fructosa

Una vez estudiado el estado antioxidante total, decidimos estudiar los efectos de la SB sobre los niveles de glutatión hepático en la resistencia a la insulina inducida por la dieta rica en fructosa. Tal y como está descrito en la sección de *Material y Métodos*, a partir de hígados de rata, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se determinan mediante métodos espectrofluorimétricos los niveles hepáticos de glutatión reducido (GSH) y de glutatión oxidado (GSSG). A partir de estos valores, se pueden estimar los niveles de glutatión total ($G_T = GSSG + GSH$) y la relación GSSG/GSH, que es un buen indicador del estrés oxidativo.

Aunque todos los grupos presentan valores similares de glutatión total (**Figura 45C**), se observa un descenso del 22% en los niveles hepáticos de GSH en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa con respecto al control, mientras que el tratamiento con SB durante dos semanas normaliza dicho parámetro (**Figura 45A**). En cuanto al GSSG, la

dieta rica en fructosa causa un incremento del 48% con respecto a los valores control. En cambio, la administración de SB, a la dosis de 50 mg/kg/día, revierte totalmente el aumento de los niveles de GSSG. El tratamiento de ratas control con SB durante dos semanas también reduce los niveles hepáticos de GSSG (**Figura 45B**).

Como consecuencia del descenso de GSH y del aumento de GSSG, la dieta rica en fructosa causa un incremento del 80% sobre la relación GSSG/GSH. El tratamiento con SB revierte totalmente el efecto de la dieta rica en fructosa sobre dicha relación y mejora el estrés oxidativo. En ratas control tratadas con SB durante dos semanas se obtiene una disminución significativa de la relación GSSG/GSH, como consecuencia del descenso en los niveles de GSSG (**Figura 45D**).

Por tanto, a la vista de estos resultados se puede concluir que la SB revierte totalmente las alteraciones causadas por la dieta rica en fructosa sobre los niveles de glutatión hepático tal y como demuestra la relación GSSG/GSH. Además, teniendo en cuenta que una de las principales funciones de la ruta de las pentosas fosfato es la regeneración del glutatión reducido, a expensas del NADPH, se puede decir que el aumento de la actividad de dicha ruta causado por el tratamiento con SB ayuda a la normalización de los niveles de glutatión y, en consecuencia, a la mejora del estrés oxidativo en la resistencia a la insulina inducida por un modelo nutricional de dieta rica en fructosa.

Como consecuencia de la activación del ciclo de las pentosas fosfato, la silibinina mejora el estrés oxidativo en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa mediante la normalización de los niveles hepáticos de glutatión

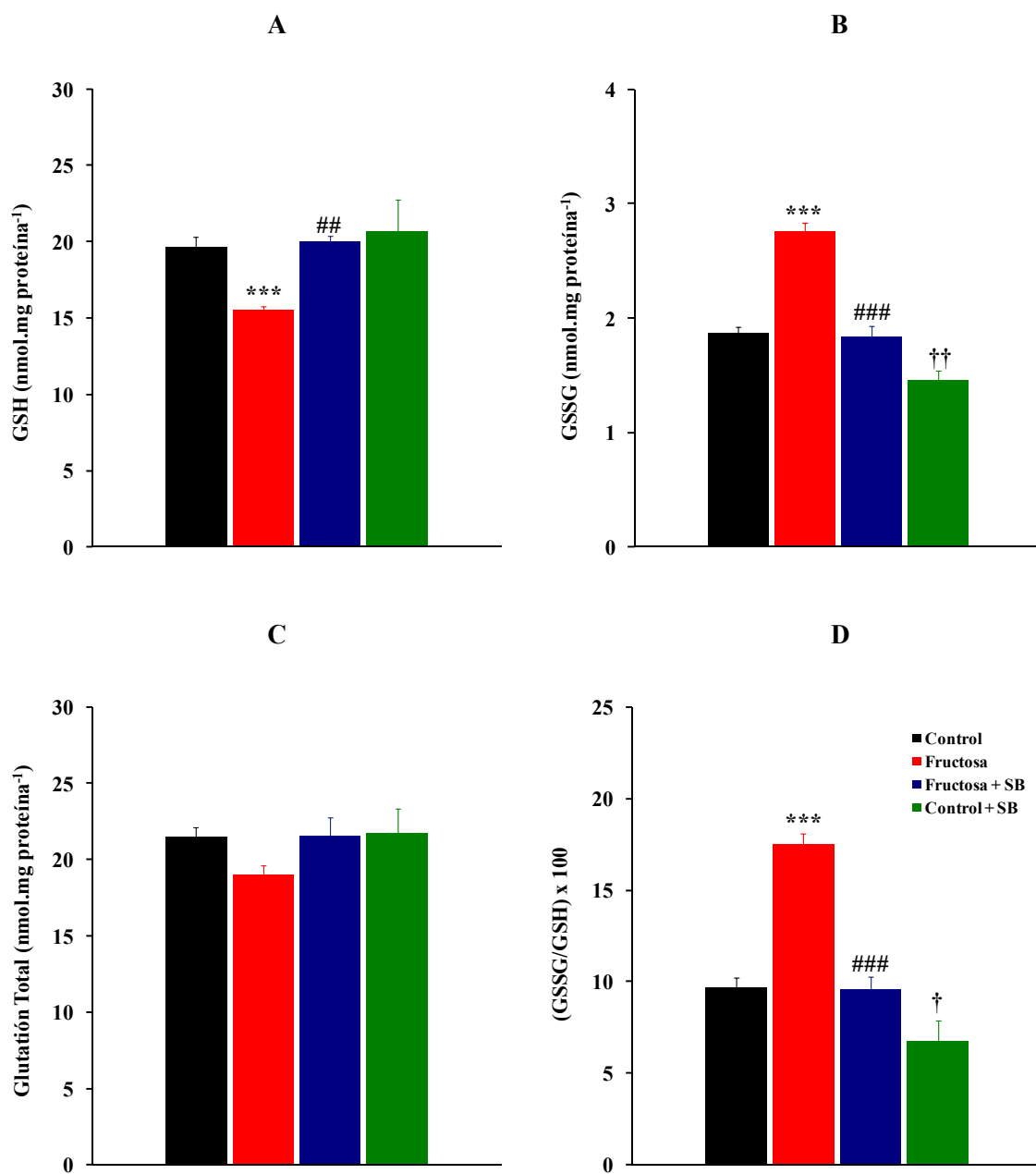


Figura 45. Efecto de la silibinina sobre los niveles de glutatión hepático en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

El glutatión se mide a partir de hígados aislados de ratas Wistar, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales. Los hígados se homogenizan en un tampón estandarizado y el análisis se realiza por métodos espectrofluorimétricos en presencia de o-ftaldialdehído (OPA) tal y como se indica en la sección de *Material y Métodos*. La **Figura A** representa los niveles de glutatión reducido (GSH), la **Figura B** muestra los valores de glutatión oxidado (GSSG), la **Figura C** presenta el glutatión total, calculado como la suma de GSH y GSSG y la **Figura D** representa la relación GSSG/GSH, que es un buen indicador del estrés oxidativo. Los resultados se expresan como media \pm EEM; n = 3 ratas para cada uno de los grupos experimentales. *** p<0.001 valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ## p<0.01, ### p<0.001 valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † p<0.05, †† p<0.01 valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

7. DISCUSIÓN

En esta segunda parte del Trabajo se investiga el mecanismo de acción hepático de la SB, implicado en su capacidad de reversión frente a las alteraciones metabólicas, causadas por la resistencia a la insulina tanto en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa como en ratas Zucker diabéticas obesas (ZDF). Para realizar este estudio, nuestro grupo cuenta con la única técnica de perifusión 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 perifusión de células fue instalada con éxito en nuestro laboratorio por primera vez en España gracias a la colaboración científica mantenida con el grupo de Bioenergética Fundamental y Aplicada de la Universidad de Grenoble I (Francia). En este trabajo demostramos que en condiciones experimentales similares, usando hepatocitos en perifusión en presencia del mismo sustrato metabólico, los valores obtenidos en el grupo control fueron similares a los obtenidos por otros grupos de investigación que han usado esta técnica (Argaud et al, 1991; Leverve et al, 1987; Vial et al, 2011) y de esta manera ha quedado validada su instalación en nuestro laboratorio desde 2003 (Detaille et al, 2008; Guigas et al, 2007).

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la perifusión de células hepáticas se convierte en una herramienta adecuada y potente para determinar el lugar de acción de la SB en las diferentes rutas metabólicas alteradas por la resistencia a la insulina, ya que permite estudiar el metabolismo energético hepático en estados estacionarios sucesivos, midiendo los flujos metabólicos de glucosa y de lactato+piruvato así como las concentraciones intracelulares de algunos intermediarios metabólicos (DHAP, F6P, G6P, PEP y 3-PG).

En nuestras condiciones experimentales, la producción de glucosa ($J_{Glucosa}$) refleja exactamente la velocidad de la gluconeogénesis ya que la síntesis de glucógeno, como consecuencia del 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 (J_{L+p}) 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 perfusato en nuestro sistema.

En esta Memoria, se demuestra que, usando esta novedosa técnica de hepatocitos en perifusión, la administración de SB durante dos semanas, a una dosis de 50 mg/kg/día, revirtió totalmente el aumento del metabolismo hepático global causado por

la resistencia a la insulina tanto en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa como en ratas ZDF. Ese efecto inhibitor de la SB sobre el metabolismo hepático global en la resistencia a la insulina se debe a una inhibición simultánea de la gluconeogénesis y de la glucólisis hepáticas. La disminución de la gluconeogénesis hepática por la SB hay que tenerla muy en cuenta, dado que la producción hepática de glucosa está muy estimulada en la DM 2, como así se demuestra en los dos modelos experimentales usados para la elaboración de esta Tesis Doctoral.

Cabe destacar que, en el caso de la dieta rica en fructosa, se realizaron experimentos preliminares, en los cuales al cabo de 4 semanas de haber iniciado el tratamiento con esta dieta se confirmaba un aumento del metabolismo hepático global como reflejo de una posible resistencia a la insulina (ver anexo). A partir del momento en el que se observó que existían indicios de una resistencia a la insulina, se decidió iniciar el tratamiento con SB durante dos semanas a la dosis de 50 mg/kg/día, i.p.

Empezaremos abordando profundamente las acciones de la SB sobre la glucólisis hepática en la resistencia a la insulina. Los resultados obtenidos indicaban que, tanto en el modelo nutricional de una dieta rica en fructosa como en las ratas ZDF, se estimulaba la glucólisis hepática en un 25% y en un 90%, respectivamente en presencia de dihidroxiacetona (DHA) como sustrato energético. Esta activación de la glucólisis junto con el incremento de la gluconeogénesis hepática llevó a una activación general del metabolismo energético hepático. Aunque la investigación se ha centrado especialmente en el estudio de la alteración de la gluconeogénesis hepática asociada a la resistencia a la insulina, existen algunos estudios realizados en ambos modelos experimentales, que están en consonancia con lo obtenido en este Trabajo y confirman una alteración de la glucólisis hepática (Henly et al, 1999; Mayes, 1993; Rajasekar y Anuradha, 2007).

La administración de SB durante dos semanas, a una dosis de 50 mg/kg/día; i.p., redujo la producción de lactato+piruvato en un 25% y en un 29% en función del modelo experimental empleado. Estudios similares realizados por otro grupo en el modelo experimental de la dieta rica en fructosa en presencia de L-carnitina (amina sintetizada en el hígado, riñones y cerebro y cuya principal función es el transporte de ácidos grasos hacia al interior de las mitocondrias) mostraron que la L-carnitina inhibía simultáneamente tanto la gluconeogénesis hepática como la producción de lactato y piruvato (Rajasekar y Anuradha, 2007). Estos resultados son coherentes con lo que hemos obtenido en el presente trabajo. Esta capacidad de la SB para inhibir la glucólisis hepática al mismo tiempo que la gluconeogénesis ya había sido descrita en experimentos *in vitro* realizados en hepatocitos en perfusión y en presencia de distintos sustratos energéticos (Detaille et al, 2008).

Analizando la glucólisis y su inhibición por la SB en una situación de resistencia a la insulina, cabría pensar, a priori, que la SB podría aumentar la glucemia por disminuir el uso de la glucosa por las células hepáticas, enmascarando así su efecto antidiabético inhibitorio de la gluconeogénesis. Sin embargo, tal y como queda demostrado con los resultados expuestos en este Trabajo, la SB disminuye significativamente la glucemia, de manera que esa inhibición de la glucólisis hepática por la SB es coherente con sus acciones antidiabéticas y antioxidantes. Por una parte, se sabe de la literatura, que en experimentos *in vivo* llevados a cabo en animales, la inhibición de la glucólisis, en general, disminuye la expresión génica de las enzimas gluconeogénicas (Foufelle et al, 1996). Esto podría reforzar así el efecto antidiabético de la SB descrito en este trabajo. Por otra parte, la inhibición de la gluconeogénesis y de la glucólisis hepáticas por la SB en la resistencia a la insulina lleva, en primer lugar, a una activación de la vía de las pentosas fosfato, con la consiguiente regeneración del glutatión (Mithieux et al, 2002) y, en segundo lugar, a una menor oxidación mitocondrial del piruvato (Leverve, 2003).

En nuestras condiciones experimentales de ayunas de 24 horas, el flujo glucolítico a través de la glucoquinasa es prácticamente nulo (GK) y despreciable por la baja expresión de la GK debida al ayuno (Groen et al, 1983; Groen et al, 1986) y por lo tanto, el efecto observado de la SB sobre la glucólisis en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa debe localizarse en el ciclo del PEP-piruvato. Así, con los resultados presentados en este Trabajo se llegó a demostrar que, en un modelo experimental de resistencia a la insulina, la SB inhibía la glucólisis hepática mediante una inhibición de la enzima glucolítica piruvato quinasa (PK). Como se había presentado en los experimentos de glucogenolisis, la SB disminuye significativamente el flujo glucolítico de la glucosa liberada a partir de la degradación del glucógeno hepático, por lo que parece que el flavonoide inhibía la glucólisis hepática en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa, independientemente de la fuente de glucosa: bien la recién formada por la gluconeogénesis a partir del sustrato energético DHA, o bien la liberada desde el glucógeno hepático. Estos resultados concuerdan con el efecto inhibitorio de la SB sobre la enzima PK, observado en experimentos *in vitro* (Detaille et al, 2008).

La PK es una enzima alostérica con una cinética sigmoidea, regulada por activadores como la fructosa 1,6-bisfosfato o inhibidores como la alanina o el ATP (Hers y Hue, 1983; Hue, 1981). Además, el glucagón también inhibe su actividad a través de su fosforilación, teniendo al AMPc como mediador (Pilkis et al, 1988). Por esta razón, además de determinar la V_{max} de la enzima, también se calculó la relación \square/V_{max} , la cual es 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 et al, 1984). De acuerdo a la metodología empleada, se analizaron los efectos de la SB sobre la actividad de la piruvato quinasa en

un modelo nutricional de dieta rica en fructosa. Para ello, se estudió la actividad de la piruvato quinasa en su forma no purificada (predominante en músculo y cerebro) y en su forma parcialmente purificada (forma hepática), tras tratamiento de las muestras con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

En primer lugar, hay que destacar que los valores obtenidos en el grupo control fueron similares a los obtenidos en las mismas condiciones experimentales por otros grupos (Ichai et al, 2001). En el caso de la forma no purificada, la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa aumentó significativamente la V_{\max} sin afectar a la relación \square/V_{\max} . Sobre la forma hepática (parcialmente purificada), la dieta rica en fructosa aumentó significativamente la relación \square/V_{\max} , señal de que esta enzima se encuentra activada en este modelo de resistencia a la insulina. Además, también incrementó significativamente los valores de la V_{\max} . Por tanto, parece que el incremento de la glucólisis hepática causado por la dieta rica en fructosa se debía a una activación de la enzima glucolítica PK mediante un incremento de su V_{\max} . Estos resultados son coherentes con el incremento de la actividad de la PK, observado en algunos estados de resistencia a la insulina (Noguchi y Tanaka, 1995). Asimismo, varios estudios recientes han mostrado que ese aumento en la actividad de la PK se debe a un incremento en la síntesis del ARNm de la enzima mediante la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta a los hidratos de carbono (ChREBP) (Koo et al, 2008; Koo et al, 2009).

La administración de SB, a una dosis de 50 mg/kg/día; i.p., disminuyó la V_{\max} en el caso de la forma no purificada mientras que cuando se trataba de la forma parcialmente purificada la SB reducía tanto la V_{\max} como la relación \square/V_{\max} , por lo que el efecto inhibitorio de la SB sobre la glucólisis hepática en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa radica en una inhibición de la actividad de la enzima glucolítica más importante, la PK. Este efecto inhibitorio de la SB sobre la actividad de la PK ya había sido observado en otros experimentos *in vitro* (Detaille et al, 2008). En dichos experimentos, la SB inhibía la actividad de la enzima de una manera alostérica. Sin embargo, en este Trabajo, la SB modificó la V_{\max} de la PK, por lo que parece que el flavonoide ejerce su efecto inhibitorio sobre la PK en la resistencia a la insulina modificando la cantidad de enzima y no, mediante un mecanismo alostérico, tal y como fue sugerido en otros estudios semejantes realizados con Mg-ATP (Ichai et al, 2001; Mahmoud et al, 1997).

Una vez finalizada la discusión de los efectos de la SB sobre la glucólisis hepática, pasaremos a la exposición profunda y razonada de las acciones de la SB sobre la gluconeogénesis hepática en la resistencia a la insulina tanto en el modelo nutricional de una dieta rica en fructosa como en ratas ZDF. Los resultados obtenidos en hepatocitos aislados de los distintos grupos experimentales y posteriormente perfundidos en presencia del sustrato energético DHA indican que el tratamiento con

SB durante dos semanas revirtió totalmente el aumento de la gluconeogénesis hepática mostrado en ambos modelos experimentales.

Este incremento de la gluconeogénesis o producción endógena de glucosa ya había sido señalado en varios artículos anteriores (Bergeron et al, 2001; Muñoz et al, 2001; Nandhini y Anuradha, 2002; Rajasekar y Anuradha, 2007). La inhibición de ese aumento de la gluconeogénesis hepática por la administración de SB durante 2 semanas indica claramente un efecto de la SB tipo antidiabético. Parece ser que la normalización de la gluconeogénesis hepática por la SB en un estado de resistencia a la insulina es un fenómeno general y se produce independientemente del modelo experimental utilizado. La inhibición de la gluconeogénesis hepática es uno de los mecanismos mediante el cual algunos antidiabéticos orales, como la metformina o la rosiglitazona, ejercen sus efectos antidiabéticos según se ha podido observar en algunos modelos nutricionales de resistencia a la insulina (Mithieux et al, 2002; Yadav et al, 2009).

Este efecto de inhibición de la gluconeogénesis hepática por acción de la SB ya había sido observado en una serie de experimentos *in vitro* en los que la molécula, a concentraciones entre 25 y 100 μM , inhibía de manera directa la gluconeogénesis hepática en presencia de varios sustratos gluconeogénicos. En este sentido, hay que recordar que este mecanismo antidiabético fue dilucidado, en el seno de nuestro grupo de investigación, usando la técnica de perfusión de hepatocitos (Guigas et al, 2007). Además, esta inhibición de la gluconeogénesis hepática ya había sido sugerida en varios ensayos clínicos realizados con pacientes diabéticos tipo 2, en los que se comprobó que la SB corregía los niveles de glucosa en plasma mediante una posible inhibición de la gluconeogénesis (Huseini et al, 2006; Hussain, 2007; Lirussi et al, 2002; Velussi et al, 1997) tal y como confirman nuestros resultados.

Los resultados obtenidos en esta Memoria demuestran que la SB induce una fuerte inhibición tanto de la gluconeogénesis hepática como de la glucogenolisis en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Este efecto radica en una potente inhibición de la liberación de glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato (G6P), debido a una disminución de la actividad de la enzima más importante de la gluconeogénesis hepática: la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa). Este resultado constituye el descubrimiento más importante de nuestro estudio, identificando a la SB como un inhibidor de la G6Pasa como ya había sido observado en otros experimentos *in vitro* (Guigas et al, 2007) y sugiriendo de esta manera que el uso del flavonoide en el tratamiento de la DM 2 por sus propiedades antigluconeogénicas y antiglucoenolíticas.

Como se mencionó anteriormente, la hidrólisis de la G6P, que es la última etapa común de la producción de 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 con una subunidad catalítica intraluminal.

Según la literatura, la dieta rica en fructosa causó un incremento en la actividad de la enzima gluconeogénica G6Pasa (Francini et al, 2010; Rajasekar y Anuradha, 2007), lo cual concuerda con nuestros hallazgos. En cuanto a los parámetros cinéticos obtenidos, no existen investigaciones que estudien dichos parámetros pero algunos estudios realizados por otros grupos con este mismo modelo experimental mostraron que este aumento en la actividad se debía a una mayor expresión del ARNm de la subunidad catalítica de la G6Pasa y esto, en consecuencia, lleva a tener una mayor cantidad de enzima (Yadav et al, 2009). Además, el aumento de la velocidad máxima (V_{max}) de la G6Pasa ya había sido asociado con el incremento de la gluconeogénesis hepática, típica de la DM 2 (Barzilay y Rossetti, 1993; Clore et al, 2000; Ferrannini y Groop, 1989).

En nuestro estudio, demostramos que la SB inhibía la actividad de la G6Pasa en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa disminuyendo la V_{max} de la enzima, sin apenas modificar la constante de afinidad (K_m). Esa disminución de la actividad de la G6Pasa es coherente con otros estudios realizados con antidiabéticos orales, como la rosiglitazona, en un modelo experimental semejante al usado en este Trabajo (Yadav et al, 2009). Asombrosamente, a pesar de conocer las propiedades antidiabéticas de la SB y de ser la G6Pasa una de las enzimas clave en el control de la gluconeogénesis, únicamente se ha estudiado el efecto del flavonoide sobre esta enzima en experimentos *in vitro* realizados en microsomas intactos y permeabilizados (Guigas et al, 2007), de manera que la SB, al igual que en nuestros estudios, disminuía la V_{max} .

En cuanto a los valores cinéticos de la G6Pasa obtenidos en condiciones control, hay que indicar que tanto los valores de K_m (Arion y Wallin, 1973; Van Schaftingen y Gerin, 2002) como los de V_{max} (Arion y Wallin, 1973) concuerdan con aquellos obtenidos por otros grupos.

Aparte de la enzima gluconeogénica G6Pasa, hay otras enzimas clave implicadas en la regulación de la gluconeogénesis como la fructosa 1,6-bisfosfatasa (F1,6bPasa) y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), cuya actividad se ha visto incrementada en algunos modelos experimentales de DM 2 (Bizeau et al, 2001; Rajasekar y Anuradha, 2007). Dado que algunos flavonoides como la rutina (Stanley Mainzen y Kamalakkannan, 2006), la canela (Kannappan et al, 2006) o la naringina (Jung et al, 2004) reducían la actividad de tales enzimas en distintos modelos animales de diabetes, sería interesante comprobar en investigaciones futuras si el efecto antigluconeogénico de la SB también radica en una inhibición de la actividad de estas enzimas, además del efecto observado a nivel de la G6Pasa.

La inhibición de la gluconeogénesis a nivel de la enzima G6Pasa por el tratamiento con SB en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa es muy importante porque, además de inhibir la síntesis exacerbada de glucosa, la G6P acumulada podría desviarse hacia la síntesis de glucógeno, hacia la glucólisis o hacia la

vía de las pentosas fosfato, con el consiguiente aumento en la producción de NADPH. El NADPH está implicado en la estabilización y el aumento del glutatión con la consiguiente reducción del estrés oxidativo que acompaña a la hiperglucemia (Bolaños et al, 2008; Leverage, 2003). Por lo tanto, el siguiente paso en el desarrollo de esta Tesis Doctoral consistió en intentar determinar el lugar hacia dónde se dirige esta G6P.

Nuestros resultados indican que la SB inhibió la glucólisis hepática tanto en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa como en ratas ZDF, usando DHA como sustrato energético. Por lo tanto, en principio, la G6P acumulada no se desvía hacia la producción de lactato y piruvato por la glucólisis hepática.

Otra posibilidad es que la G6P sea desviada hacia la vía de las pentosas fosfato. Aunque el poder antioxidante de la SB está más que estudiado, nunca antes se había investigado el efecto de la SB sobre esta vía ni en cultivos celulares, ni en modelos animales de experimentación. Hemos sido los primeros en afrontar este tema y hemos comprobado que, en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa, la SB incrementó la actividad de la vía de las pentosas fosfato, como ya había sido sugerido en experimentos *in vitro*, llevados a cabo en hepatocitos de rata (Guigas et al, 2007).

La etapa limitante de esta vía está catalizada por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), de manera que estudios realizados por otros grupos indican que la dieta rica en fructosa causó un descenso en la actividad de dicha enzima (Kannappan et al, 2006; Nandhini y Anuradha, 2002), aunque otros estudios muestran resultados completamente contradictorios a los anteriores (Francini et al, 2010). En cualquier caso, esa disminución de la actividad de la enzima G6PDH es coherente con los resultados presentados en este Trabajo. Además, estudios llevados a cabo en ratas tratadas con una dieta rica en grasas han asociado la inhibición de la G6Pasa por el antidiabético oral metformina con un aumento del flujo a través de la G6PDH (Mithieux et al, 2002), sugiriendo así un mecanismo de desvío de la G6P hacia la vía de las pentosas fosfato.

Una de las principales funciones de esta vía de las pentosas fosfato es generar poder reductor en forma de NADPH, lo cual ayuda a la regeneración del glutatión, fundamental para combatir el estrés oxidativo en la DM 2. Así, como consecuencia de la activación de la vía de las pentosas fosfato, la SB incrementó los niveles hepáticos de glutatión reducido (GSH) y disminuyó el glutatión oxidado (GSSG) y la relación GSSG/GSH, por lo que mejoró el estrés oxidativo en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Estos resultados son coherentes con los obtenidos por otros grupos en el mismo modelo experimental y usando el antidiabético oral metformina (Srividhya y Anuradha, 2002). Además, ya se había observado que la silimarina administrada a ratas hipertriglicéridemicas y alimentadas con una dieta rica en sacarosa

(70%) aumentaba los niveles hepáticos de GSH (Skottova et al, 2004). Cabe destacar que la SB también causó un incremento de GSH en ratas control, lo cual confirma que el flavonoide posee propiedades antioxidantes independientes de sus características antidiabéticas.

En definitiva, puesto que la caída en los niveles de glutatión es característica de la DM 2 y que suele ir unida a las complicaciones asociadas a esta patología (Thornalley et al, 1996), la activación de la vía de las pentosas fosfato por la SB en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa, lleva a una normalización de los niveles de glutatión y, por tanto, a una mejora del estrés oxidativo en la resistencia a la insulina.

Aunque parece claro que la G6P acumulada como consecuencia de la inhibición de la enzima gluconeogénica G6Pasa se desvía, en su mayor parte, hacia la vía de las pentosas fosfato, existe un posible tercer destino para esa G6P: la síntesis de glucógeno. Estudios realizados por distintos grupos han mostrado que el modelo nutricional de la dieta rica en fructosa reduce el almacenamiento de glucógeno hepático (Liu et al, 2011; Rajasekar y Anuradha, 2007), tal y como ocurre en pacientes diabéticos tipo 2 (Magnusson et al, 1992). Sin embargo, a día de hoy, se desconocen por completo los efectos de la SB sobre la síntesis de glucógeno en la resistencia a la insulina, lo único que se sabe es que el flavonoide no muestra ningún efecto a corto plazo sobre la síntesis de glucógeno hepático (Guigas et al, 2007). Por tanto, en el futuro deberán realizarse experimentos encaminados al esclarecimiento de si la SB estimula la síntesis de glucógeno en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa al igual que lo hacen antidiabéticos orales como la metformina o flavonoides como la quercetina (Kannappan y Anuradha, 2009).

El glucagón es la hormona hiperglucemiante por excelencia. Esta hormona se secreta por las células- α del páncreas y sus efectos se oponen completamente a los de la insulina. Concretamente en el hígado, la relación insulina/glucagón determina el 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 α -pancreáticas se inhibe, en individuos sanos, después de las comidas. Sin embargo, se ha comprobado que el nivel de glucagón se incrementa en enfermos diabéticos tipo 2 (Henkel et al, 2005; Shah et al, 2000) y se ha propuesto recientemente que altos niveles de glucagón contribuyen parcialmente a la desregulación de la homeostasis de la glucosa y a la resistencia a la insulina típica de la DM 2 (Salehi et al, 2006). Esta anomalía en la secreción del glucagón, sumada a la resistencia a la insulina, da lugar a una hiperglucemia en ayunas y postprandial. 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 dieta rica en fructosa, como modelo de resistencia a la insulina, incrementó significativamente la producción de glucosa a partir de la degradación del glucógeno hepático, lo cual junto con la gluconeogénesis descontrolada contribuye a la hiperglucemia, observada en este Trabajo. Además, como consecuencia de la glucosa liberada por la glucogenolisis, la dieta rica en fructosa también incrementa el flujo glucolítico por lo que esa glucosa lleva a una activación general de todo el metabolismo energético hepático, al igual que habíamos observado en los experimentos de perfusión a partir del sustrato energético DHA.

Por lo tanto, en este contexto, la existencia de antidiabéticos orales que sean capaces de antagonizar los efectos del glucagón es sumamente beneficiosa para el tratamiento de la resistencia a la insulina y de la DM 2. Así, los resultados presentados muestran que la SB fue capaz de antagonizar los efectos hiperglucemiantes y pro-diabéticos del glucagón, de manera que el flavonoide inhibió la glucogenolisis en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. Esto lleva a una reducción de la hiperglucemia, característica de la DM 2. A este respecto, cabe destacar que la SB inhibió significativamente tanto la liberación neta de glucosa a partir del glucógeno hepático como el flujo glucolítico de esta glucosa inmediatamente después de ser liberada por la glucogenolisis, por lo que revierte el aumento del metabolismo energético hepático causado por la dieta rica en fructosa. Esta capacidad antiglucogenolítica de la SB ya había sido sugerida en experimentos *in vitro* llevados a cabo por nuestro grupo (Guigas et al, 2007).

A la luz de estos resultados, se puede deducir que el efecto antihiperglucemiante de la SB en la resistencia a la insulina radica en una inhibición tanto de la gluconeogénesis como de la glucogenolisis mediante una disminución de la actividad de la G6Pasa como ha sido demostrado en este Trabajo y como ya había sido sugerido en el caso de otros antidiabéticos orales como la metformina (Mithieux et al, 2002). Por tanto, la confirmación de estas propiedades antihiperglucemiantes de la SB en un modelo de resistencia a la insulina la convierten en una opción muy atractiva como terapia alternativa para el tratamiento de la DM 2.

En definitiva, nuestros resultados demuestran, en dos modelos animales de resistencia a la insulina, que el tratamiento con SB durante 2 semanas, a una dosis de 50 mg/kg/día, i.p.; normalizaba el metabolismo energético hepático mediante una inhibición simultánea de la glucólisis y de la gluconeogénesis hepáticas. Esa inhibición de la gluconeogénesis está mediada por una inhibición de la actividad de la G6Pasa, mientras que en el caso de la glucólisis, la SB actúa a nivel de la enzima PK. Asimismo, la SB activa la vía de las pentosas fosfato, lo cual lleva a una mejora del estrés oxidativo

mediante la regeneración del glutatión. Por tanto, basándose en esto y en el hecho de que la reducción de la producción hepática de la glucosa constituye una aproximación para corregir la alteración de la homeostasis de la glucosa en la DM 2, sugerimos el uso de la silibinina para la prevención y el tratamiento de la DM 2 debido a las propiedades anti-hipergluce miantes e insulinosensibilizadoras presentadas en este trabajo.

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS
MITOCONDRIALES DE LA
SILIBININA EN LA RESISTENCIA
A LA INSULINA**

1. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA RESPIRACIÓN EN HEPATOCITOS INTACTOS EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

En los apartados anteriores presentados en esta Tesis Doctoral, se ha visto que la silibinina posee una capacidad de reversión de las alteraciones del metabolismo hepático (glucólisis, gluconeogénesis, glucogenólisis y ciclo de las pentosas fosfato) causadas por la ingesta de una dieta rica en fructosa durante 6 semanas. En este sentido y dada la relación que guarda el metabolismo energético con el metabolismo mitocondrial, se decidió investigar si la SB revierte también las acciones de la dieta rica en fructosa sobre la respiración celular en hepatocitos intactos (para revisión ver apartado 4.3. de la sección Modelos Experimentales pertenecientes a “Materiales y Métodos”). A partir de hepatocitos, aislados de los distintos grupos experimentales, se mide el consumo de oxígeno (JO_2) en una cámara de oxigrafía equipada con un “electrodo de Clark” tras 30 minutos de incubación en viales cerrados en presencia del sustrato energético DHA.

En la tabla siguiente (Tabla 10) se recogen los valores de la respiración celular (JO_2) en las distintas condiciones ensayadas para cada uno de los grupos experimentales.

	JO_2 ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g peso seco}^{-1}$)		
	Respiración	+ Oligo	+ DNP
Control	35.24 ± 1.99	17.29 ± 0.88	37.15 ± 2.48
Fructosa	44.98 ± 1.64***	20.49 ± 0.61**	48.20 ± 2.59**
Fructosa + SB	32.30 ± 1.87###	15.34 ± 0.93###	30.99 ± 2.25###
Control + SB	27.00 ± 1.14††	14.44 ± 0.56†	27.94 ± 1.69†

Tabla 10. Efecto de la silibinina sobre la respiración celular en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa.

Los hepatocitos ($10 \text{ mg peso seco}\cdot\text{ml}^{-1}$) aislados de ratas Wistar macho en ayunas, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se incuban en Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno durante 30 minutos en viales cerrados con el sustrato energético DHA (20 mM). La respiración celular se mide usando un oxígrafo equipado con un electrodo de Clark insertado en una cámara de oxigrafía termostaticada a 37°C donde se depositan las células. La medida del consumo de oxígeno se registra directamente después de transferir 2 mL del contenido del vial de incubación y, a continuación, se añade oligomicina ($6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y después DNP ($100 \mu\text{M}$). Los resultados se expresan como media \pm EEM; $n = 3$ preparaciones de hepatocitos para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ### $p < 0.001$ valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Al principio de cada punto de análisis en la cámara de oxigrafía, cuando se registra la respiración celular de los hepatocitos transferidos directamente desde el vial de incubación, se observa que la dieta rica en fructosa ejerce una activación del 28% sobre la respiración celular respecto a hepatocitos control. En cambio, el tratamiento con SB revierte completamente ese aumento de la respiración celular. Las ratas control tratadas con SB durante dos semanas también muestran un descenso significativo de la respiración en comparación con la situación control (Figura 46).

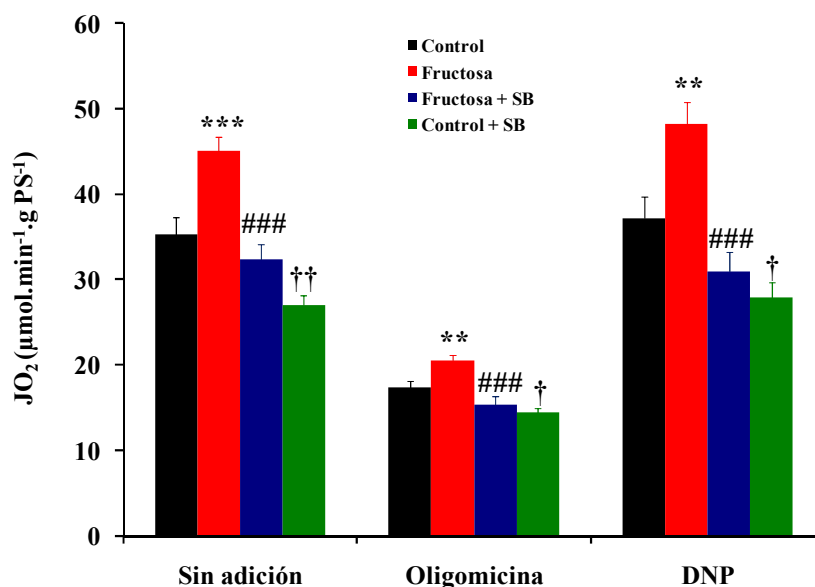


Figura 46. Efecto de la silibinina sobre la respiración celular en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Los hepatocitos ($10 \text{ mg peso seco.ml}^{-1}$) aislados de ratas Wistar macho en ayunas, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se incuban en Krebs-Bicarbonato-Calcio a 37°C saturado en carbógeno durante 30 minutos en viales cerrados con el sustrato energético DHA (20 mM). La respiración celular se mide tal y como está descrito en la leyenda de la **Tabla 10**. Los resultados se expresan como media \pm EEM; $n = 3$ ratas para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ### $p < 0.001$ valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Cuando inmediatamente después (en el mismo punto) se añade 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 disminuye en más de un 50%. En ratas tratadas con una dieta rica en fructosa, se observa una activación del 18% frente a los valores obtenidos en el grupo control. La SB, administrada durante dos semanas, revierte totalmente el incremento de la respiración en presencia de oligomicina. Por otra parte, esa misma SB inyectada en ratas control causa una inhibición significativa de la respiración celular.

La activación de la respiración celular por acción de la dieta rica en fructosa persiste tras la adición del desacoplador de la cadena respiratoria dinitrofenol (DNP), justo después de haber registrado el JO_2 durante 2 minutos en presencia de la oligomicina. Así, la dieta rica en fructosa activa la respiración celular en un 30% con respecto a las condiciones control. En este caso, la SB también normaliza la respiración celular, situándose incluso por debajo de los valores control. Por último, también persiste la inhibición de la respiración celular ejercida por el tratamiento con SB en ratas control.

Una vez que se observa que la silibinina revierte totalmente el aumento de la respiración celular en ratas alimentadas durante 6 semanas con una dieta rica en fructosa, el siguiente paso es determinar si ese aumento en el consumo de oxígeno se debe a que estas células presentan un mayor número de mitocondrias y, en caso de que esto ocurriera, si la silibinina es capaz de revertirlo. Para ello, se determina la actividad de la enzima citrato sintasa, que es una enzima del ciclo de Krebs, solamente presente en la mitocondria y puede usarse como un buen indicador de la masa mitocondrial.

En la **tabla 11** puede observarse que la dieta rica en fructosa provoca un aumento del 45% en la actividad de la citrato sintasa, por lo que con este resultado se constata que la ingesta de una dieta rica en fructosa durante 6 semanas favorece la biogénesis mitocondrial. Por otra parte, la administración de SB a ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa no modifica este aumento. Sin embargo, parece ser que la SB también tiende a incrementar la biogénesis mitocondrial ya que la SB administrada a ratas control también causa un incremento significativo de la actividad de la citrato sintasa.

Citrato sintasa	
<i>nmol.min⁻¹.mg proteína⁻¹</i>	
Control	196.33 ± 21.18
Fructosa	286.25 ± 26.17*
Fructosa + SB	278.27 ± 17.92
Control + SB	285.43 ± 14.83[†]

Tabla 11. Efecto de la silibinina sobre la actividad de la enzima citrato sintasa en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

La determinación de la actividad de la citrato sintasa se realiza a 30°C en un medio estandarizado que contiene Acetil-CoA 10 mM y DNTB 20 mM, de tal manera que la adición de oxalacetato 20 mM desencadena la reacción de grupos tioles con DNTB tal y como se indica en la sección de *Material y Métodos*. Los resultados se expresan como media ± EEM; n = 3 ratas para cada uno de los grupos experimentales. * p<0.05 valores del grupo fructosa respecto al grupo control. † p<0.05 valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Puesto que la dieta rica en fructosa incrementa la actividad de la citrato sintasa y por tanto, aumenta el número de mitocondrias de la célula, en la siguiente tabla (Tabla 12) se presentan los valores de respiración celular en función de la actividad de la citrato sintasa (expresada en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$), obtenida para cada uno de los grupos experimentales, con el fin de obtener cuál es el consumo de oxígeno por unidad mitocondrial.

	JO_2 en relación con la actividad de la citrato sintasa		
	Respiración	+ Oligo	+ DNP
Control	183.41 ± 10.01	88.19 ± 4.50	198.61 ± 12.35
Fructosa	157.27 ± 5.73*	71.64 ± 2.15***	164.54 ± 8.49*
Fructosa + SB	116.18 ± 6.72###	55.18 ± 3.35###	111.48 ± 8.08###
Control + SB	94.74 ± 4.04†††	50.66 ± 1.95†††	98.04 ± 5.91†††

Tabla 12. Efecto de la silibinina sobre la respiración en función de la actividad de la citrato sintasa en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

A partir de hepatocitos aislados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se mide la respiración celular y la actividad de la citrato sintasa tal y como se detalla en la sección de *Material y Métodos*. En esta figura se representa el consumo de oxígeno (JO_2) en función de la actividad de la citrato sintasa (expresada en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$). Los resultados se expresan como media \pm EEM; n = 3 ratas para cada uno de los grupos experimentales. * p<0.05, *** p<0.001 valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ### p<0.001 valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. ††† p<0.01 valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Cuando se presenta la respiración celular de los hepatocitos en función de la actividad de la citrato sintasa, se observa que la dieta rica en fructosa inhibe la respiración celular en un 15% respecto a los hepatocitos control. El tratamiento con SB disminuye aún más la respiración con respecto a ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. En ratas control tratadas con SB durante dos semanas también se observa un descenso significativo de la respiración en función de la actividad de la citrato sintasa cuando se compara con valores obtenidos en ratas control (Figura 47)

Al expresar la respiración celular en función de la actividad de la citrato sintasa en presencia de oligomicina, se observa que la dieta rica en fructosa causa un descenso del 18% con respecto a lo obtenido en hepatocitos control. El tratamiento con SB, como en el caso anterior, provoca una disminución de la respiración con respecto a la dieta rica en fructosa. Por otra parte, la SB administrada a ratas control provoca una inhibición del 43% sobre la respiración, como consecuencia del menor consumo celular de oxígeno y de la mayor actividad de la citrato sintasa.

Tras la adición de DNP como desacoplador de la cadena respiratoria, la dieta rica en fructosa inhibe la respiración en un 17% cuando se expresa en función de la actividad de la citrato sintasa. La administración de SB también disminuye la respiración con respecto a los valores obtenidos en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa y se aleja aún más de los valores control. Por último, la SB administrada a ratas control también inhibe la respiración en relación con los valores obtenidos en hepatocitos control.

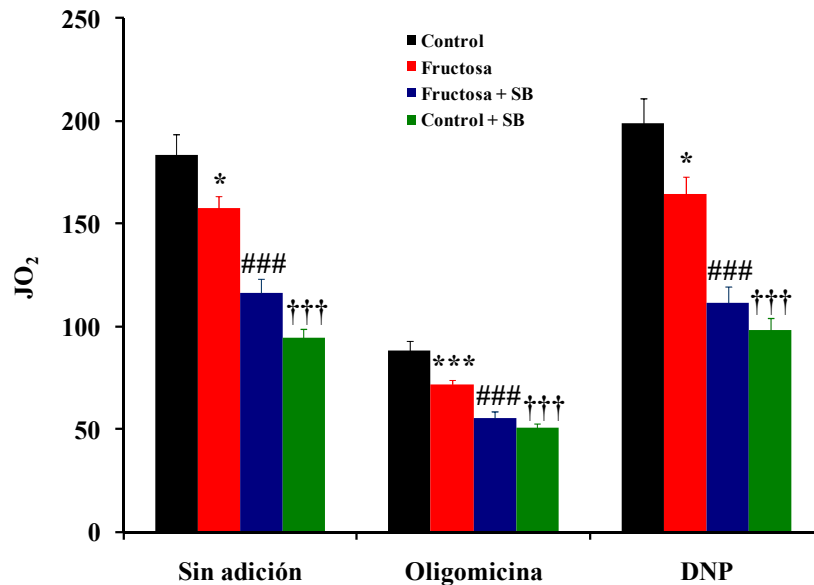


Figura 47. Efecto de la silibinina sobre la respiración en función de la actividad de la citrato sintasa en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

A partir de hepatocitos aislados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los distintos grupos experimentales, se mide la respiración celular y la actividad de la citrato sintasa tal y como se detalla en la sección de *Material y Métodos*. En esta figura se representa el consumo de oxígeno (JO_2) en función de la actividad de la citrato sintasa (expresada en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}\text{ proteína}^{-1}$). Los resultados se expresan como media \pm EEM; $n = 3$ ratas para cada uno de los grupos experimentales. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ### $p < 0.001$ valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. ††† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Por lo tanto, a la vista de estos resultados, se puede decir que el tratamiento con una dieta rica en fructosa durante 6 semanas causa un incremento en la respiración celular, lo cual se debe a un aumento compensatorio de la masa mitocondrial ya que dicho tratamiento disminuye el consumo de oxígeno por unidad mitocondrial. Este mecanismo podría indicar la existencia de una posible disfunción mitocondrial en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. En el caso del tratamiento con SB durante dos semanas, parece evidente que no modifica la masa mitocondrial en ratas fructosa e incluso puede que la propia SB aumente el número de mitocondrias tal y como se demuestra en el grupo de ratas control + SB. Sin embargo, la

SB, a diferencia de la fructosa, inhibe la respiración celular teniendo la misma masa mitocondrial, por lo que es probable que la silibinina ejerza algún tipo de efecto inhibitorio, relacionado con su capacidad antioxidante, sobre la cadena respiratoria y que lleve a una mejoría de la disfunción mitocondrial.

La silibinina inhibe la respiración celular sin modificar el incremento de la masa mitocondrial causado por la ingesta de una dieta rica en fructosa durante 6 semanas

A continuación, estos resultados obtenidos en hepatocitos, se intentaron consolidar mediante estudios realizados en mitocondrias aisladas, procedentes de cada uno de los grupos experimentales. Para ello, se estudió, en primer lugar, el efecto de la silibinina sobre la respiración en mitocondrias aisladas en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa y a continuación, el efecto del flavanoide sobre el rendimiento de la fosforilación oxidativa (P/O) y sobre la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Por último, se determinó la actividad de los complejos respiratorios (I, II y III) con el fin de clarificar sobre qué punto mitocondrial podría actuar la silibinina en un modelo de dieta rica en fructosa.

2. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

El consumo de oxígeno (JO_2) se determinó en mitocondrias aisladas, expresado como nanoátomos de oxígeno consumidos por minuto y por mg de proteínas en mitocondrias aisladas de ratas Wistar pertenecientes a los cuatro grupos experimentales y con libre acceso al agua y a la comida. Como se describe en la sección de **Material y Métodos**, las mitocondrias se suspenden en el tampón de respiración KCl a 30°C y la medida del consumo de oxígeno se realiza en un oxígrafo equipado con una cámara de oxigrafía y un electrodo de Clark. Se emplean dos tipos de sustratos respiratorios: **glutamato/malato (GM)** para el complejo I y 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 la silibinina en el modelo nutricional de dieta rica en fructosa. El uso de la rotenona junto con el succinato/malato impide que se produzca el flujo reverso de electrones a través del complejo I. Con ambos sustratos, se añade sucesivamente 1 mM de ADP-Tris y 1.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de oligomicina, inhibidor de la ATPasa.

A continuación, se recuerda brevemente los principales estados de la respiración mitocondrial:

- El **estado 4** representa la respiración en su estado basal, en presencia de equivalentes reducidos sin añadir ADP.

- El **estado 3** se corresponde con el estado fosforilante y 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 4 real** se obtiene en presencia de oligomicina, un inhibidor de la ATPasa.

En la tabla siguiente (**Tabla 13**) se recogen los valores de la respiración mitocondrial (JO_2) en los diferentes estados estudiados para cada uno de los grupos experimentales.

G/M	<i>JO₂</i> (nátomo O/min/mg proteína)		
	Estado 4	Estado 3	+ Oligo
Control	9.32 ± 0.38	105.65 ± 5.46	8.87 ± 0.43
Fructosa	9.12 ± 0.57	87.18 ± 6.39	6.56 ± 0.49**
Fructosa + SB	9.15 ± 0.39	79.88 ± 5.95	8.79 ± 0.49 ^{##}
Control + SB	8.91 ± 0.51	80.72 ± 7.77 [†]	7.22 ± 0.37 [†]

S/M	<i>JO₂</i> (nátomo O/min/mg proteína)		
	Estado 4	Estado 3	+ Oligo
Control	24.48 ± 0.59	145.83 ± 6.11	18.92 ± 0.74
Fructosa	23.96 ± 1.18	130.35 ± 4.98	18.25 ± 1.19
Fructosa + SB	21.97 ± 0.68	116.59 ± 5.08	18.42 ± 1.04
Control + SB	22.15 ± 1.39	119.16 ± 4.36 ^{††}	17.64 ± 0.94

Tabla 13. Efecto de la silibinina sobre la respiración mitocondrial en la dieta rica en fructosa

Las mitocondrias (1 ó 2 mg/ml) se aíslan a partir de hígados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, según el método de Klingenberg y Slenczka y se suspenden a 37°C en el tampón de respiración KCl (KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM). La medida del consumo de oxígeno se realiza mediante un oxígrafo equipado con una cámara de oxigrafía y 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 1 mM de ADP-Tris (estado 3) y de 1.25 µg.mL⁻¹ de oligomicina (estado 4 real). Los resultados se expresan como media ± EEM de n = 6 preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. ** p<0.01 valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ## p<0.01 valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † p<0.05, †† p<0.01 valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Con los dos sustratos, se observa que la dieta rica en fructosa (**Figura 48**) no provoca ninguna modificación significativa en el estado 4 con respecto a lo obtenido en mitocondrias control. En lo que se refiere a la respiración asociada a la síntesis de ATP (el estado 3 después de añadir ADP), se observa que la dieta rica en fructosa tiende a disminuir, de manera no significativa, la respiración mitocondrial en un 18% con GM y en un 11% con SM. La administración de SB a ratas tratadas con una dieta rica en fructosa reduce aún más la respiración mitocondrial, tal y como ocurría con la respiración celular en función de la actividad de la citrato sintasa. Por otra parte, la SB inyectada a la dosis de 50 mg/kg/día a ratas control causa una inhibición significativa del estado 3 en presencia de ambos sustratos respiratorios.

Tras la adición de oligomicina se observa que las ratas control presentan una inhibición de la respiración mitocondrial hasta un valor ligeramente inferior al valor

obtenido con glutamato/malato o con succinato/malato sin ADP. Así pues, en presencia de GM, las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa muestran una inhibición de la respiración del 27% en comparación con los valores obtenidos en hepatocitos control. El tratamiento con SB durante dos semanas revierte totalmente los valores de la respiración mitocondrial en presencia de oligomicina. Por último, la SB administrada a ratas control también inhibe en un 15% la respiración mitocondrial.

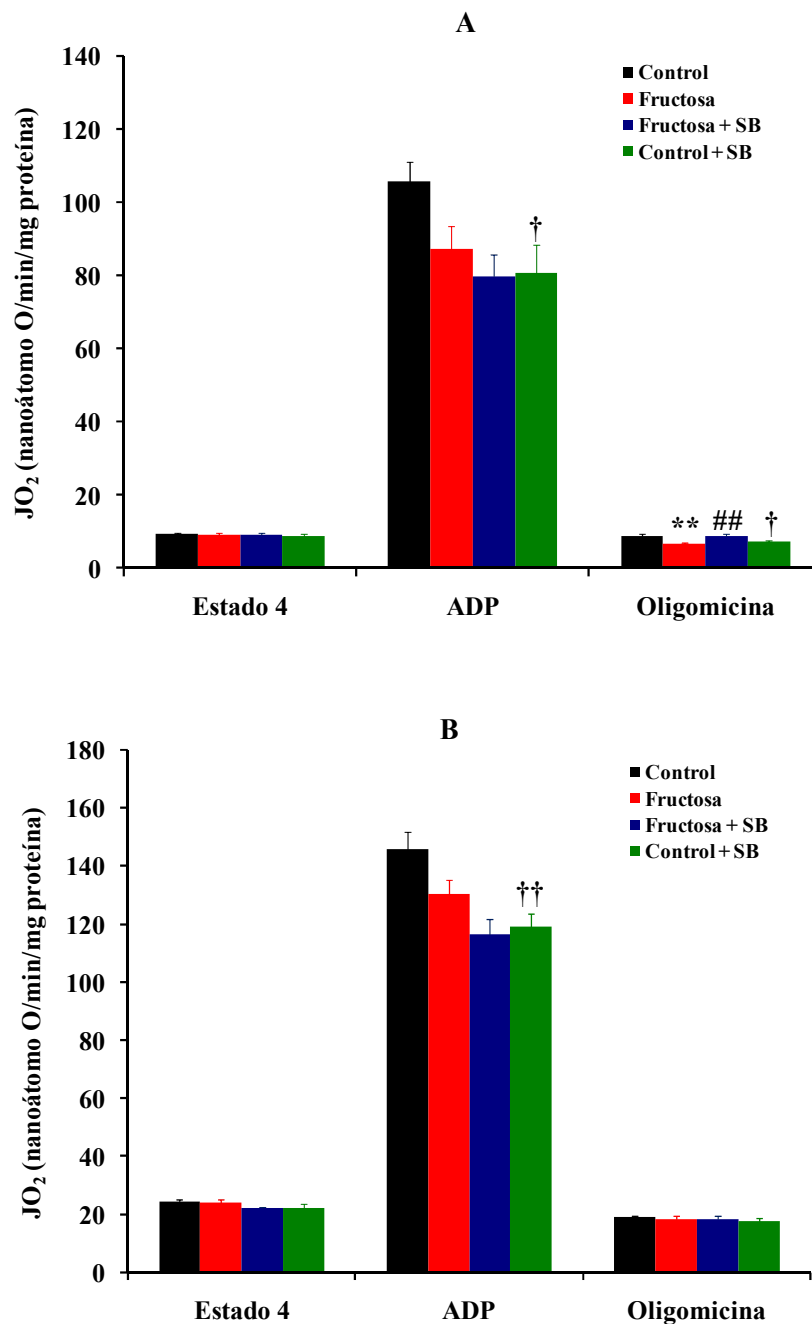


Figura 48. Efecto de la silibinina sobre la respiración mitocondrial en la dieta rica en fructosa

Las mitocondrias (1 ó 2 mg/ml) se aíslan a partir de hígados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, según el método de Klingenberg y Slenczka. La medida del consumo de oxígeno se realiza mediante

un oxígrafo equipado con una cámara de oxigrafía y un electrodo de Clark tal y como se detalla en la leyenda de la **Tabla 13**. La **Figura A** representa el efecto de la silibinina sobre la respiración mitocondrial en una dieta rica en fructosa en presencia de GM. La **Figura B** muestra el efecto del flavonoide sobre la cadena respiratoria en un modelo de dieta rica en fructosa en presencia de SM. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$ valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ## $p < 0.01$ valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Gracias a los experimentos que se exponen a continuación, se puede determinar si la silibinina, en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa, ejerce acciones sobre algún punto de la cadena de transporte mitocondrial o únicamente sobre el complejo enzimático ATP sintasa (complejo V). Para ello, se realiza una segunda serie de experimentos en los que el JO_2 se determina en las mismas condiciones y con los mismos sustratos que en los experimentos presentados en la **tabla 13** y en la **figura 48**: glutamato/malato (5/2.5 mM) o succinato/malato (5/0.5 mM) + rotenona (1.25 μ M) (estado 4) y después de la adición sucesiva de 1.25 μ g.ml⁻¹ de oligomicina; 75 μ M de DNP; 0.15 μ g.ml⁻¹ de antimicina A y 1 mM/5 mM de TMPD/Ascorbato (TMPD-a). Se utiliza el DNP como desacoplador clásico de la fosforilación oxidativa que permeabiliza la membrana mitocondrial interna a los protones. Gracias a la antimicina A, se logra bloquear el complejo III de la cadena respiratoria y así se puede estudiar la respiración a través del complejo IV tras añadir tetrametil-p-fenilenodiamina/ascorbato, que constituye un sustrato de la citocromo oxidasa. En la **tabla 14** se muestran los resultados obtenidos en esta segunda serie de determinaciones de la respiración mitocondrial:

	JO_2 (nátomo O/min/mg proteína)			
	Glutamato/Malato		Succinato/Malato	
	+ DNP	+ TMPD-a	+ DNP	+ TMPD-a
Control	92.10 \pm 3.03	220.90 \pm 6.48	155.96 \pm 8.56	295.80 \pm 10.00
Fructosa	75.56 \pm 3.68**	217.17 \pm 21.38	137.04 \pm 6.91	276.16 \pm 23.00
Fructosa + SB	90.97 \pm 3.88##	237.60 \pm 24.19	129.76 \pm 8.79	287.43 \pm 16.04
Control + SB	74.21 \pm 4.20††	205.19 \pm 11.72	123.10 \pm 6.15†	262.61 \pm 15.06

Tabla 14. Localización del efecto de la silibinina sobre la respiración mitocondrial en un modelo de dieta rica en fructosa

Las mitocondrias (1 ó 2 mg/ml) se aíslan a partir de hígados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, según el método de Klingenberg y Slenczka y se suspenden a 37°C en el tampón de respiración KCl (KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM). La medida del consumo de oxígeno se realiza, en una segunda serie de experimentos, mediante un oxígrafo equipado con una cámara de oxigrafía y 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 μ M) (estado 4) y después de la adición sucesiva de 1.25 μ g.ml⁻¹ de oligomicina; 50 μ M de DNP; 0.15 μ g.ml⁻¹ de antimicina A y por último 1mM/5mM de TMPD/Ascorbato (TMPD-a). Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$ valores

del grupo fructosa respecto al grupo control. ## $p < 0.01$ valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

La adición de 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.

Cuando el sustrato respiratorio es GM (**Figura 49A**), los resultados muestran que la dieta rica en fructosa disminuye significativamente la respiración en un 18% con respecto a los valores control. La administración de SB a estas ratas revierte completamente esa disminución de la respiración y la sitúa en valores próximos al control. La SB inyectada a ratas control también inhibe significativamente la respiración a partir de la adición de DNP. En cambio, en presencia de SM (**Figura 49B**), no existen diferencias significativas entre ellos, pero sí se observa que la dieta rica en fructosa tiende a disminuir en un 13% el consumo de oxígeno con respecto a los valores obtenidos en mitocondrias aisladas de ratas control, tal y como ocurría en el estado 3. El tratamiento con SB durante dos semanas disminuye aún más el consumo de oxígeno. Por último, el tratamiento de ratas control con SB ejerce una inhibición del 21% sobre la cadena respiratoria a partir de la adición de DNP.

A la luz de los resultados obtenidos, se puede deducir que, en cierta manera, se confirman los resultados obtenidos en el caso del consumo de oxígeno en función de la actividad de la citrato sintasa, ya que en presencia de ADP y de DNP se obtienen gráficas muy similares a las obtenidas en aquél caso. Además se confirma que ese posible efecto de la silibinina sobre la cadena respiratoria en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa, probablemente se localice antes del complejo V mitocondrial (ATPasa).

Nuestro siguiente objetivo consistió en investigar el efecto del flavonoide sobre la actividad de los complejos I, II, III y IV para poder localizar el sitio exacto de actuación de la silibinina sobre la cadena de transporte mitocondrial en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa. Para evaluar la actividad del **complejo IV (citocromo c oxidasa)** se añade a la cámara de oxigrafía el par redox TMPD/ascorbato, después de haber añadido DNP y antimicina A. Al añadir este par redox (**Figura 49**), el ascorbato cede sus electrones al TMPD que reduce el citocromo c, sustrato de la citocromo c oxidasa. La investigación de la actividad del complejo IV muestra que la respiración mitocondrial no está afectada ni por la dieta rica en fructosa ni por la silibinina, por lo que se descarta que exista un efecto a nivel de este complejo.

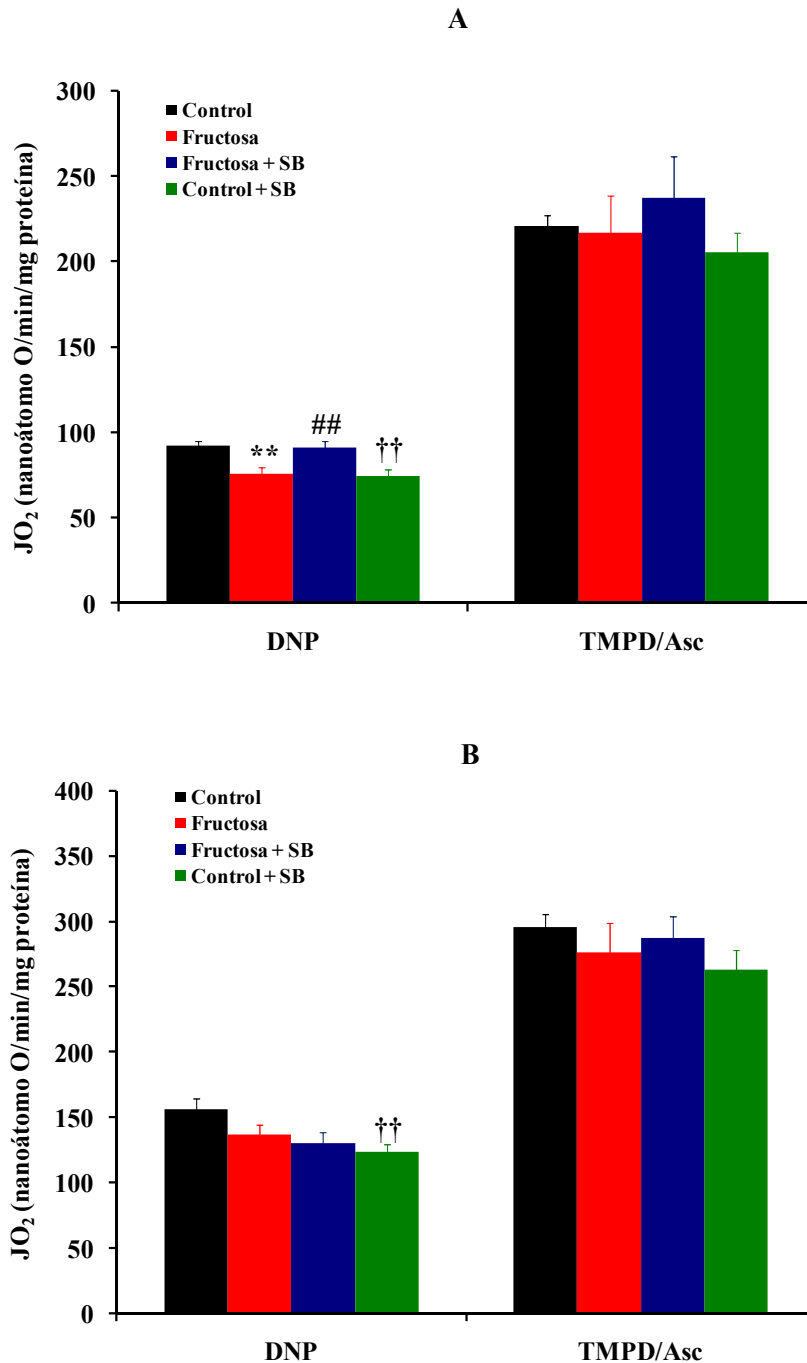


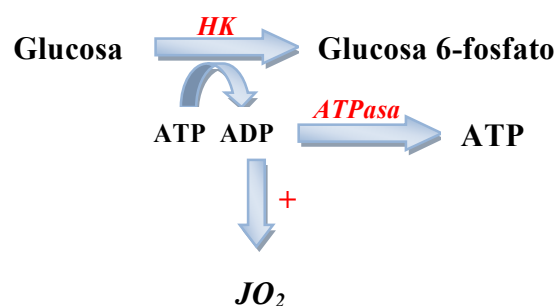
Figura 49. Localización del efecto de la silibinina sobre la respiración mitocondrial en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Las mitocondrias (1 ó 2 mg/ml) se aíslan a partir de hígados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, según el método de Klingenberg y Slenczka. La medida del consumo de oxígeno se realiza mediante un oxígrafo equipado con una cámara de oxigrafía y un electrodo de Clark tal y como se detalla en la leyenda de la **Tabla 14**. La **Figura A** representa la localización del efecto de la silibinina sobre la respiración mitocondrial en una dieta rica en fructosa en presencia de GM. La **Figura B** muestra la localización del efecto de la silibinina sobre la cadena respiratoria en un modelo de dieta rica en fructosa en presencia de SM. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 6$ preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0.01$ valores del grupo fructosa respecto al grupo control. ## $p < 0.01$ valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

3. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA EFICACIA DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

Dados los resultados obtenidos en hepatocitos intactos y en mitocondrias aisladas, se decidió investigar si el rendimiento de la fosforilación oxidativa está modificado por la acción del tratamiento con silibinina durante dos semanas en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Con ese fin, se determinó la eficacia de la fosforilación oxidativa en mitocondrias aisladas de los cuatro grupos experimentales mediante el estudio de la relación entre la síntesis de ATP (J_{ATP}) y la respiración mitocondrial (JO_2) con los sustratos respiratorios: glutamato/malato, succinato/malato/rotenona y glutamato/succinato/malato.

La medida del consumo de oxígeno se realiza mediante un oxígrafo equipado con una cámara de oxigrafía y un electrodo de Clark. Se mide 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 en la renovación del ADP inducidos por adición de cantidades crecientes de hexoquinasa (HK). A partir de la medida espectrofotométrica de los niveles de G6P se puede evaluar la cantidad de ADP formado, que a su vez estimula la respiración y que es teóricamente idéntica a la cantidad de ATP formado por la ATP sintasa. Así, se relaciona la respiración (JO_2) con el flujo del nuevo ATP formado por la ATP sintasa (J_{ATP}) que corresponde a dicha respiración.



3.1. Efecto de la silibinina sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con glutamato/malato (GM) en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Gracias al uso de GM como sustrato, se puede evaluar el efecto de la SB sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa a

nivel del complejo I. La **figura 50A** muestra que la relación entre el consumo de oxígeno y la producción de ATP para los cuatro grupos experimentales son lineales y casi paralelas. La dieta rica en fructosa desplaza la curva hacia la derecha en comparación con el grupo control, de tal manera que el flujo de síntesis de ATP disminuye en un 51% con altas concentraciones de HK (de 230.15 a 118.19 nmol/min/mg con 20 μ l de HK 1/20). El tratamiento con SB disminuye el flujo de síntesis de ATP con respecto al grupo fructosa (de 118.19 a 80.01 nmol/min/mg).

En cuanto a la relación ATP/O (producción de ATP dividida por JO_2) y el consumo de oxígeno (JO_2) (**Figura 50B**) que representa la eficacia de la fosforilación oxidativa, parece claro que el tratamiento con una dieta rica en fructosa disminuye el rendimiento. Así, desplaza la curva hacia la derecha con respecto al control, de modo que la relación ATP/O disminuye en un 21% en comparación con el grupo control (de 2.05 a 1.62 nmol/nátomo con 20 μ l de HK 1/20). La administración de SB durante dos semanas desplaza ligeramente a la curva hacia la izquierda, de tal manera que estas ratas requieren un menor consumo de oxígeno para alcanzar el mismo rendimiento que las ratas fructosa. Por último, la SB, administrada durante dos semanas a ratas control, disminuye la producción de ATP y mejora en un 16% la eficacia de la fosforilación oxidativa.

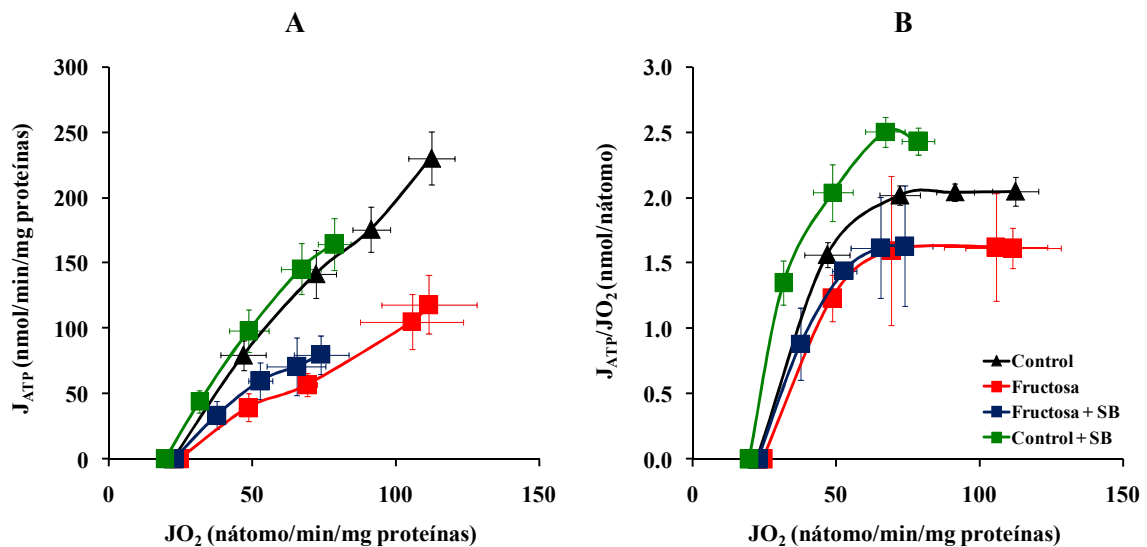


Figura 50. Efecto de la silibinina sobre la relación entre la síntesis de ATP (J_{ATP}) y el consumo de oxígeno (JO_2) en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa con glutamato/malato como sustrato

Las mitocondrias se aíslan a partir de hígados de ratas Wistar macho no en ayunas, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, y se suspenden a 37°C KCl (KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM) al que se añade glucosa 20 mM, ATP-Tris 125 μ M y $MgCl_2$ 1 mM. La síntesis de ATP y la respiración están modulados por concentraciones crecientes de hexoquinasa (0.17 a 0.7 UI/ml). La medida del consumo de oxígeno (JO_2) se realiza 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 **figura A** muestra el

efecto del tratamiento con silibinina sobre la relación entre JO_2 y J_{ATP} en una dieta rica en fructosa. En la **figura B** se puede observar el efecto del flavonoide sobre la relación entre JO_2 y ATP/O en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 4$ preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales.

3.2. Efecto de la silibinina sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con succinato/malato (SM) en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Se emplea SM junto con la rotenona como sustrato respiratorio cuando interesa centrarse 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. La **figura 51A** muestra que, en nuestras condiciones, la dieta rica en fructosa desplaza la curva hacia la derecha en comparación con el grupo control, de manera que el flujo de síntesis de ATP disminuye en un 23% a concentraciones altas de HK (de 225.70 a 175.25 nmol/min/mg con 20 μ l de HK 1/20). La administración de SB a ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa disminuye aún más el flujo de producción de ATP (de 175.25 a 119.21 nmol/min/mg).

En lo referente a la relación entre ATP/O y el consumo de oxígeno (**Figura 51B**), la ingesta de una dieta rica en fructosa empeora la eficacia de la fosforilación oxidativa en un 30% con respecto a los valores control (de 1.48 a 1.05 nmol/nátomo con 20 μ l de HK 1/20). El tratamiento con SB desplaza la curva hacia la izquierda mejorando la eficacia de la fosforilación oxidativa en un 14%. Por último, la administración de SB a ratas control inhibe el flujo de la síntesis del ATP y mejora la eficacia de la fosforilación oxidativa en un 35% (de 1.48 nmol/nátomo de O a 2 nmol/nátomo de O).

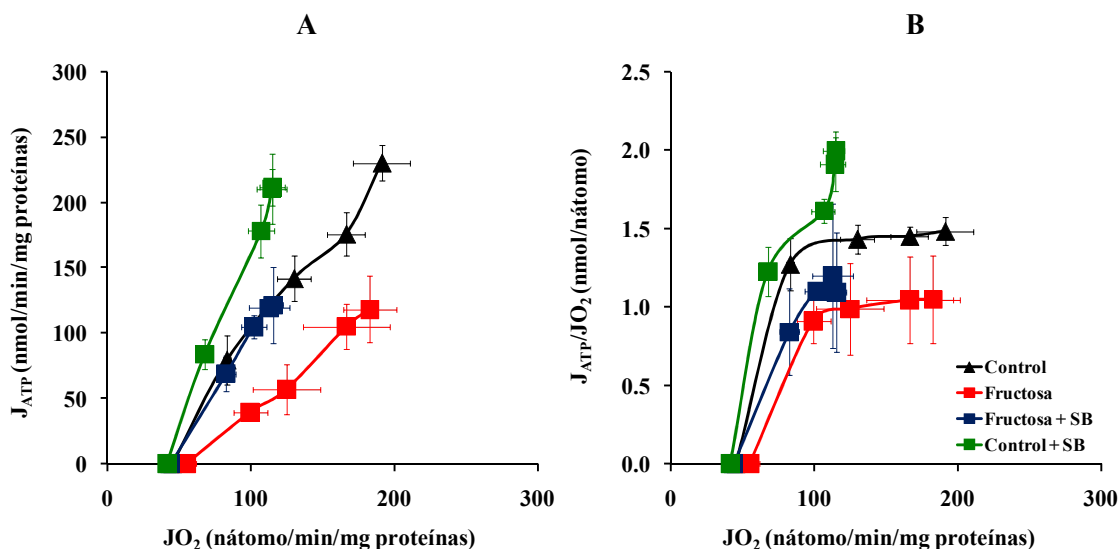


Figura 51. Efecto de la silibinina sobre la relación entre la síntesis de ATP (J_{ATP}) y el consumo de oxígeno (JO_2) en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa con succinato/malato/rotenona como sustrato

Las mitocondrias aisladas a partir de hígados de ratas Wistar macho no en ayunas, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales se suspenden en las mismas condiciones que aquellas descritas en la **figura 50** pero con succinato/malato (5/0.5 mM) más rotenona (1.25 μ M) como sustrato. La **figura A** muestra el efecto del tratamiento con silibinina sobre la relación entre JO_2 y J_{ATP} en una dieta rica en fructosa. En la **figura B** se puede observar el efecto del flavonoide sobre la relación entre JO_2 y ATP/O en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 4$ preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales

3.3. Efecto de la silibinina sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa con glutamato/succinato/malato (GSM) en un modelo de dieta rica en fructosa

Para evaluar simultáneamente el efecto de la silibinina sobre la eficacia de la fosforilación oxidativa a nivel de los complejos I y II de la cadena respiratoria en un modelo experimental de dieta rica en fructosa en condiciones parecidas a las fisiológicas, el consumo de oxígeno (JO_2) se mide en presencia de glutamato/succinato/malato. La **Figura 52A** muestra que la ingesta de una dieta rica en fructosa durante 6 semanas inhibe el flujo de producción de ATP en un 21% (de 230.58 nmol/min/mg a 191.04 nmol/min/mg con 20 μ l de HK 1/20). El tratamiento con SB durante dos semanas, como con los otros sustratos, disminuye aún más la síntesis de ATP a altas concentraciones de HK.

En cuanto a la relación entre ATP/O y el consumo de oxígeno (**Figura 52B**), la dieta rica en fructosa desplaza la curva hacia la derecha y disminuye la eficacia de la fosforilación oxidativa en un 21% con respecto a los valores obtenidos en mitocondrias

control (de 1.53 a 1.22 nmol/nátomo de O con 20 μ l de HK 1/20). El tratamiento con SB sitúa la curva próxima a los valores controles y mejora la eficacia de la fosforilación oxidativa en un 15% en relación con las ratas fructosa. Por otra parte, como ocurre con los otros sustratos, las ratas control, inyectadas con SB durante 2 semanas, presentan una disminución en la síntesis de ATP y una mejora de la fosforilación oxidativa.

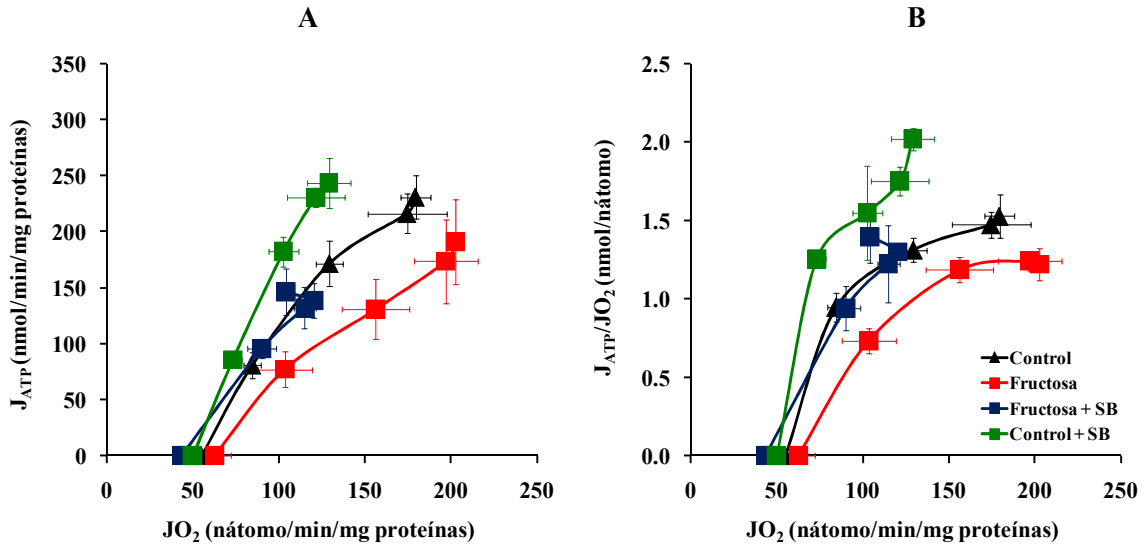


Figura 52. Efecto de la silibinina sobre la relación entre la síntesis de ATP (J_{ATP}) y el consumo de oxígeno (JO_2) en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa con succinato/malato/rotenona como sustrato

Las mitocondrias aisladas a partir de hígados de ratas Wistar macho no en ayunas, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales se suspenden en las mismas condiciones que aquellas descritas en la **figura 50** pero con el sustrato glutamato/malato/succinato (5/5/2.5 mM). La **figura A** muestra el efecto del tratamiento con silibinina sobre la relación entre JO_2 y J_{ATP} en una dieta rica en fructosa. En la **figura B** se puede observar el efecto del flavonoide sobre la relación entre JO_2 y ATP/O en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Los resultados se expresan como media \pm EEM de n = 4 preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales.

La administración de silibinina durante dos semanas mejora el rendimiento de la fosforilación oxidativa en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa

4. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS) EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

Puesto que como ya se ha visto anteriormente, la silibinina revierte totalmente el aumento de la relación GSSG/GSH y mejora el estado antioxidante en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa, se decidió investigar si existía algún efecto a nivel de la producción de ROS mitocondrial.

Como se ha mencionado en la Introducción de este trabajo, las mitocondrias son 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 y también altera el estado redox celular. El análisis de la producción mitocondrial de ROS se limita exclusivamente a la cuantificación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), porque está demostrado que éste es la principal ROS liberada por la mitocondria. El radical 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 tras su formación lo transforma en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno, siendo éste último el que sale de las mitocondrias al ser una especie reactiva menos perjudicial y peligrosa para las células (Weisiger y Fridovich, 1973).

Aunque en la sección de Material y Métodos se ha descrito la forma en que se mide la producción de H_2O_2 mitocondrial y su base científica, a continuación, se amplía la explicación de dicha técnica. Los sitios reconocidos de producción de ROS por la mitocondria son el complejo I y III de la cadena transportadora de electrones. A nivel práctico, la producción de ROS ocurre, principalmente, en 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, de manera que los electrones son aceptados por el cofactor FMN (flavinmononucleótido) 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 (Sazanov, 2007). Por lo tanto, el complejo I forma O_2^- cuando el cofactor FMN está muy reducido, es decir, cuando la relación NADH/NAD⁺ es muy elevada (Hirst et al, 2008). A este primer mecanismo se le conoce como “*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, exagera la producción de O_2^- a partir de GM, ya que los electrones no pueden llegar a su destino desde el NADH y el O_2 los capta con más facilidad, transformándose así en su especie reactiva.

- El otro mecanismo mediante el cual el complejo I forma O_2^- es el denominado **flujo reverso de electrones (RET)**. Este fenómeno sucede cuando la fuerza protón motriz (Δp) es muy elevada y hace volver a los electrones desde el coenzima Q reducido ($CoQH_2$) hacia el complejo I, reduciendo el NAD^+ a NADH de nuevo en el sitio del FMN (Liu et al, 2002). La producción de O_2^- 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_2^- en el complejo I mediante este mecanismo. La producción de O_2^- 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 ($CoQH_2$).

Aunque el lugar de producción de O_2^- en el complejo I podría ser el mismo en los dos mecanismos, el sitio exacto de la producción de O_2^- en el complejo I por RET todavía no ha sido descubierto. Aún así, la producción de O_2^- 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_2^- más altos se producen en la mitocondria mediante el flujo reverso de electrones.

El **complejo III** es el otro sitio conocido de producción mitocondrial de ROS (Cadenas et al, 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 $CoQH_2$ y de antimicina A, el complejo III produce grandes cantidades de O_2^- . El complejo III libera este O_2^- a ambos lados de la membrana mitocondrial interna.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se espera que la tasa basal de producción de H_2O_2 dependa claramente del sustrato administrado a las mitocondrias. La producción de H_2O_2 con GM refleja su formación en el complejo I mediante el primer mecanismo de **“flujo de electrones hacia adelante”** y es notablemente menor que la producida por el mismo complejo respiratorio mediante el flujo reverso de electrones, reflejo del empleo de SM (sustrato del complejo II). También hay que destacar que la tasa de producción de H_2O_2 con GSM es muy elevada, ya que en esas condiciones el complejo I produce O_2^- por los dos mecanismos propuestos. Además, la adición de antimicina A (reflejo de la producción de O_2^- por el complejo III), aumenta la producción de H_2O_2 con los tres sustratos.

Al centrarse en cada uno de los sustratos por separado, se observa que, en presencia de GM, la rotenona y antimicina A activan la producción de H_2O_2 según lo

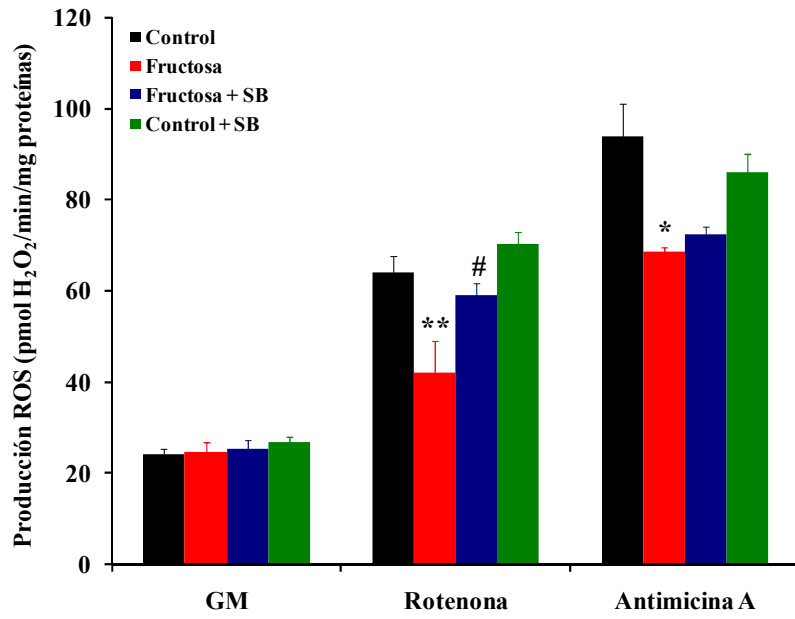
esperado (**Figura 53A**). En condiciones basales no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales. Al añadir la rotenona, inhibidor de la actividad del complejo I, se observa que en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa, la producción de ROS es significativamente menor a la obtenida en el grupo control, por lo que, a simple vista, parece que las mitocondrias de ratas fructosa no responden adecuadamente al efecto estimulador de la rotenona sobre la producción de ROS. La administración de SB durante dos semanas sitúa los valores de producción de ROS próximos a los normales.

Cuando se añade antimicina A, la diferencia observada anteriormente entre el grupo control y el grupo fructosa se mantiene, lo cual confirma que posiblemente exista un efecto de la dieta rica en fructosa a nivel del complejo I. En el caso de las ratas fructosa tratadas con SB se observa que la producción de ROS prácticamente se iguala con la presentada por las ratas fructosa, por lo que es posible que exista un efecto de la SB a nivel del complejo III.

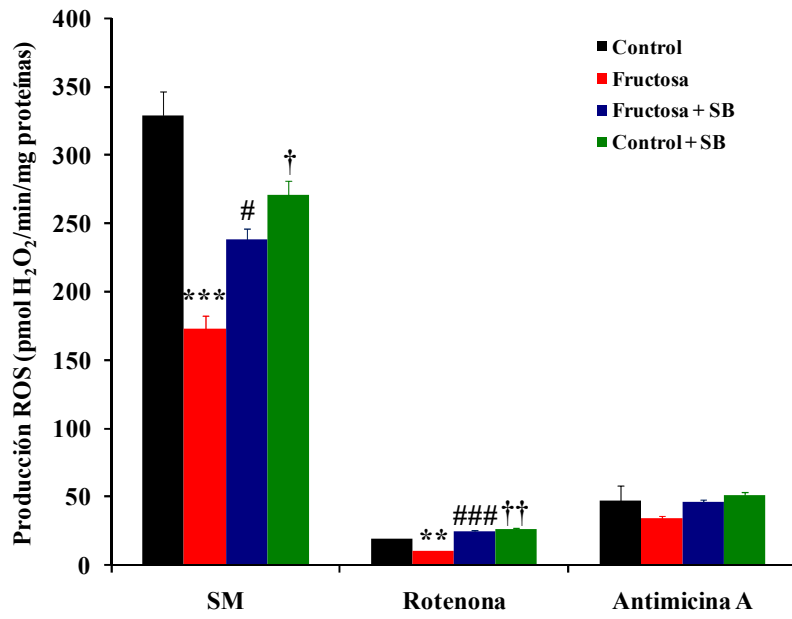
Con SM, en condiciones basales, las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa presentan una disminución del 48% en la producción de ROS con respecto a las ratas control (**Figura 53B**). La SB tiende a incrementar significativamente dicha producción. En presencia de rotenona, disminuye la producción de ROS en todos los grupos experimentales, de manera que se mantiene la diferencia observada entre el grupo control y el grupo fructosa. El tratamiento con SB durante dos semanas normaliza la producción de ROS. Tras la adición de antimicina A se reactiva de nuevo la producción de ROS en el complejo III, de manera que no se observan diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales, aunque sí una tendencia a que esa producción sea menor en el caso de las ratas fructosa. Cabe destacar que el tratamiento de ratas control con SB durante dos semanas disminuye la producción de ROS en condiciones basales.

En presencia de GSM como sustrato, la dieta rica en fructosa inhibe la producción de ROS en un 43% con respecto a los valores control (**Figura 53C**). La SB no es capaz de revertir esta disminución. Al añadir la rotenona, se observa que la producción de ROS es significativamente menor en ratas fructosa, de manera que se mantiene la diferencia observada a nivel basal con respecto al control. El tratamiento con SB durante dos semanas revierte la disminución de la producción de ROS, mostrada por las ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Con antimicina A, la dieta rica en fructosa también muestra una menor producción de ROS mientras que la SB revierte este efecto. Por último, cabe destacar que se observa una disminución del 30% en la producción de ROS en condiciones basales en ratas control tratadas con SB durante dos semanas.

A



B



C

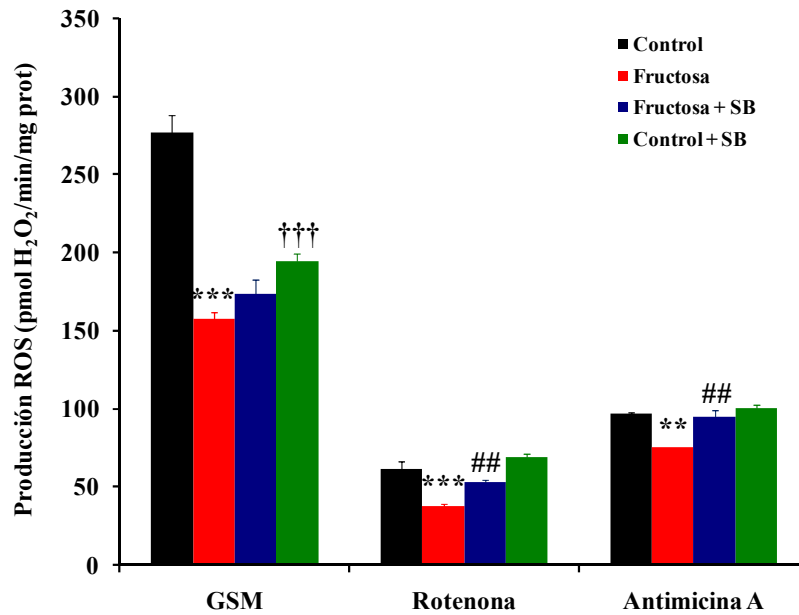


Figura 53. Efecto de la silibinina sobre la producción mitocondrial de H₂O₂ en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Las mitocondrias aisladas de hígados de ratas Wistar macho, pertenecientes a los cuatro grupos experimentales, se suspenden a temperatura ambiente en el mismo tampón KCl utilizado en la determinación de la respiración mitocondrial y el rendimiento de la fosforilación oxidativa (Sacarosa 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM), al cual se añade albúmina libre de ácidos grasos al 0.1%, fosfato inorgánico (Pi) 2.5 mM, la sonda fluorescente Amplex Red (2 mM) y peroxidasa de rábano (10 UI/ml). La reacción se inicia añadiendo el sustrato correspondiente: GM (2.5/1.25 mM), SM (2.5/0.25 mM) o GSM (2.5/2.5/1.25 mM), tras 2 minutos de estabilización se añaden secuencialmente rotenona (1.25 μM) y antimicina A (3 μM) para cuantificar la producción de H₂O₂ por los complejos I y III, respectivamente. La producción mitocondrial de H₂O₂ se expresa en relación a una concentración conocida de H₂O₂. Los resultados se expresan como media ± EEM de n = 4 preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 valores del grupo fructosa respecto al grupo control. # p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. † p<0.05, †† p<0.01, ††† p<0.001 valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

La silibinina tiende a normalizar el descenso en la producción de H₂O₂ mitocondrial a nivel del complejo I, causado por la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa

5. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS RESPIRATORIOS I, II Y III EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

5.1. Actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial

El complejo I (NADH ubiquinona oxido-reductasa) transfiere 2 electrones desde el NADH a una flavina (FMN), los cuales pasarán de uno en uno por centros de Fe-S hasta reducir a 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 mediante el flujo reverso de electrones desde el complejo II, aunque también es capaz de formar ROS a través del flujo de electrones hacia adelante a partir del NADH.

Cuando se monitoriza la actividad del complejo I en mitocondrias hepáticas aisladas de los diferentes grupos experimentales (Figura 54), se observa que la dieta rica en fructosa causa una disminución del 36% en la actividad de este complejo. La administración de SB durante dos semanas revierte parcialmente ese descenso en la actividad del complejo I. Cabe destacar que en ratas control tratadas con SB también se observa un descenso del 30% en la actividad de este complejo respiratorio.

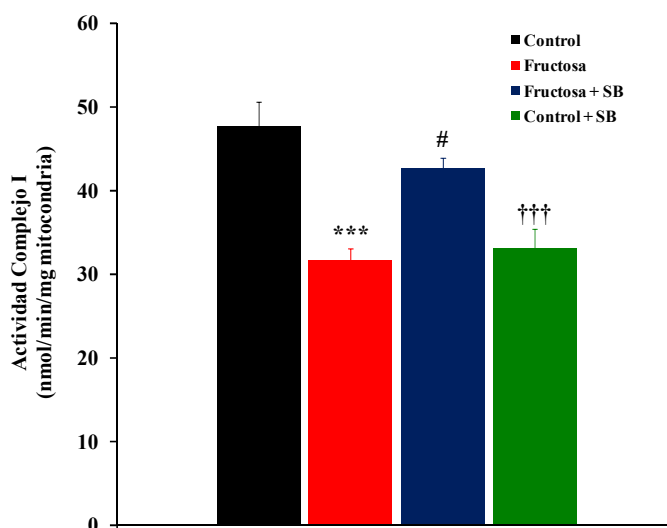


Figura 54. Efecto de la silibinina sobre la actividad del complejo I en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

La determinación de la actividad del complejo I se realizó utilizando NADH (100 μ M) como donador de electrones y decilubiquinona (100 μ 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 mitocondrias aisladas de los cuatro grupos experimentales. La medida se inició tras la adición de 24 µg de mitocondrias y se monitorizó la oxidación del NADH a 340 nm antes y después de la adición de rotenona (10 µM). Los resultados se expresan como media ± EEM de n = 4 preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. *** p<0.001 valores del grupo fructosa respecto al grupo control. # p<0.05 valores del grupo fructosa + SB respecto al grupo fructosa. ††† p<0.001 valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

Los datos preliminares obtenidos en la producción de ROS en presencia del sustrato GM y rotenona hacen pensar que existe una alteración a nivel del complejo I respiratorio en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. Gracias a esta medida de la actividad del complejo I, se confirma tal alteración y podría ser uno de los procesos implicados en la posible disfunción mitocondrial causada por la dieta rica en fructosa. El tratamiento con SB parece que tiende a mejorar la actividad del complejo I y, por tanto, también dicha disfunción.

La silibinina incrementa la actividad del complejo I de la cadena respiratoria en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa.

5.2. Actividad del complejo II de la cadena respiratoria 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 electrones en este complejo no está asociada al bombeo de protones.

Al estudiar la actividad del complejo II (**Figura 55**), se observa que no existen diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales. Aún así, parece que la dieta rica en fructosa induce un pequeño descenso en la actividad de este complejo respiratorio. El tratamiento con SB durante dos semanas también tiende a causar un descenso no significativo de la actividad del complejo II en comparación con las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. En este caso, la SB administrada a ratas control también causa inhibición del 17% sobre la actividad de este complejo.

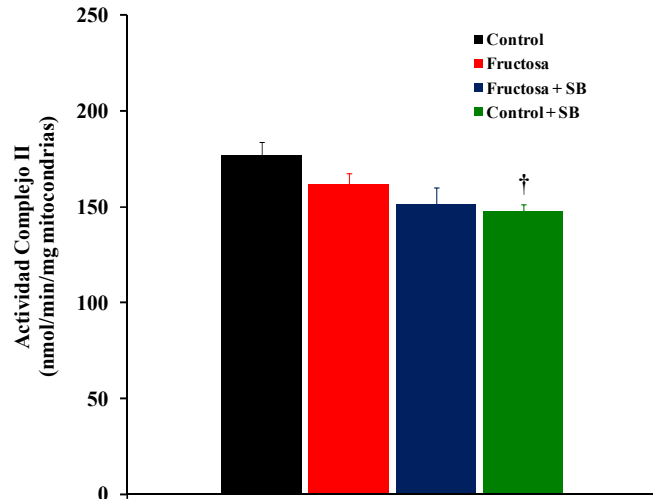


Figura 55. Efecto de la silibinina sobre la actividad del complejo II en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

La determinación del complejo II se realizó monitorizando la bajada en la absorbancia del dicloroindofenol (DCIP) (100 μ M) a 600 nm. 24 μ g de mitocondrias se añadieron sobre 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 2.5 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos, antimicina A 9.3 μ M, rotenona 5 μ M, decilubiquinona 50 μ M y succinato 30 mM. Los resultados se expresan como media \pm EEM de n = 4 preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. † p<0.05 valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

5.3. Actividad del complejo III de la cadena respiratoria 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 intermembranoso 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.

Al investigar la actividad del complejo III (Figura 56), se observa que la dieta rica en fructosa no provoca ningún efecto sobre su actividad comparada con los resultados obtenidos en ratas control. El tratamiento con SB durante dos semanas lleva a una disminución no significativa de la actividad del complejo III. Por último, en este caso, también se observa que la SB es capaz de inhibir la actividad del complejo III cuando es administrada a ratas control durante dos semanas.

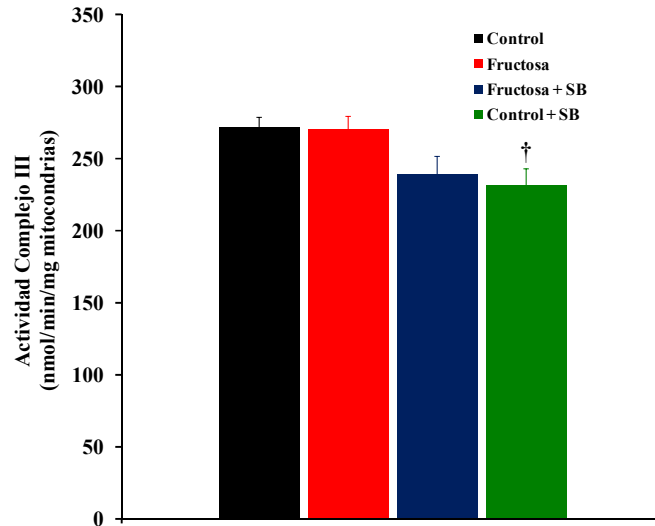


Figura 56. Efecto de la silibinina sobre la actividad del complejo III en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

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°C , suplementado con $10 \mu\text{g}$ de mitocondrias, 1 mg/ml de albúmina libre de ácidos grasos, EDTA 5 mM , KCN 1 mM , decilubiquinona reducida $105.6 \mu\text{M}$ en mitocondrias aisladas de los cuatro grupos experimentales. Los resultados se expresan como media \pm EEM de $n = 4$ preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales. † $p < 0.05$ valores del grupo control + SB respecto al grupo control.

6. EFECTO DE LA SILIBININA SOBRE LA APERTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN MITOCONDRIAL EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA

La apertura del poro de transición mitocondrial, que se determina 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. Por esta razón, se decidió determinar si la SB ejerce algún tipo de efecto sobre este parámetro en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Para ello, se determina la apertura del PTP, en presencia de SM (Figura 57A) y GM (Figura 57B) como sustratos, en mitocondrias aisladas de los diferentes grupos experimentales, cuya metodología se ha descrito en la sección de Material y Métodos.

La tendencia general observada con ambos sustratos fue que la dieta rica en fructosa no ejerce un efecto significativo sobre la apertura del PTP, en comparación con los valores obtenidos en ratas control. El tratamiento con SB, a la dosis de 50 mg/kg/día; i.p., tampoco tiene efectos significativos pero muestra, con ambos sustratos, una tendencia a favorecer en un 11% la apertura del PTP.

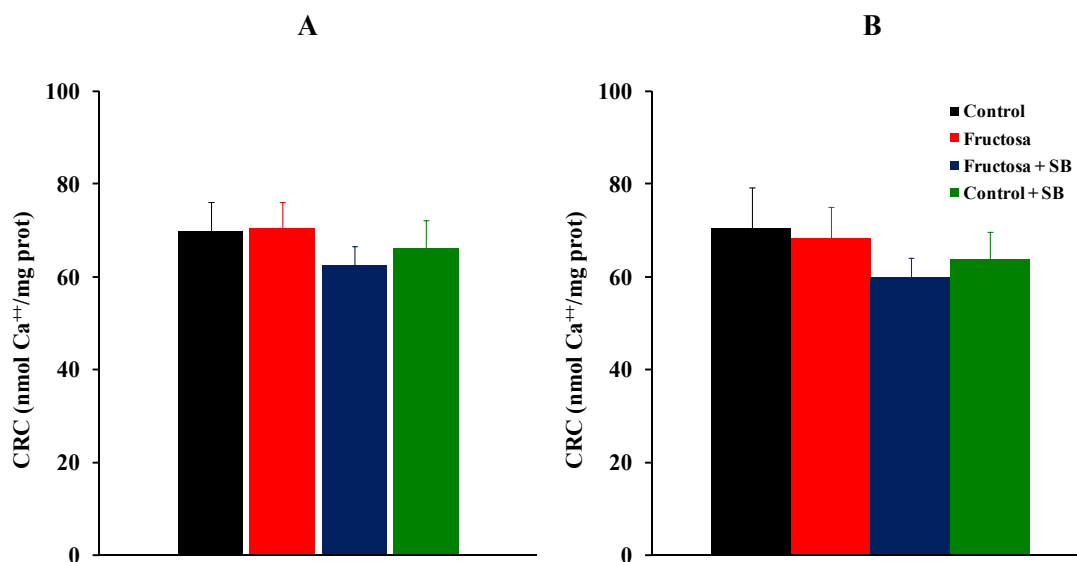


Figura 57. Efecto de la silibinina sobre la apertura del poro de transición mitocondrial en un modelo nutricional de dieta rica en fructosa

Las mitocondrias (1 ó 2 mg/ml) 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 (5/0.5 mM) (Figura A) o de GM (5/2.5 mM) (Figura B) y de una sonda fluorescente al calcio-extramitocondrial (Calcium Green-5N). La capacidad de retención cálcica se determina mediante la adición de pulsos de Ca⁺⁺ 25 μ M cada minuto. Los resultados se expresan como media \pm EEM de n = 4 preparaciones distintas de mitocondrias para cada uno de los grupos experimentales.

7. DISCUSIÓN

Dada la estrecha relación entre las alteraciones mitocondriales y el desarrollo de la DM 2 y su tratamiento (Sivitz y Yorek, 2010), se consideró importante investigar si la SB ejerce acciones mitocondriales hepáticas en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa, lo cual podría contribuir a los efectos antidiabéticos del flavonoide.

Por este motivo, se investigó en primer lugar, los efectos de la SB sobre la respiración en hepatocitos intactos en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. A la luz de los resultados obtenidos, se decidió abrir una nueva línea de investigación que abarcara la mayor parte de los parámetros de función mitocondrial y que pudiesen ser determinados en base a las técnicas existentes en nuestro laboratorio: respiración en mitocondrias aisladas, rendimiento de la fosforilación oxidativa, producción de radicales libres y actividad de los complejos respiratorios. Además, la existencia de algunas publicaciones en las que se muestra que la SB ejerce efectos mitocondriales hepáticos directos reafirmó aún más la realización de este estudio mitocondrial (Detaille et al, 2008; Guigas et al, 2007).

Es necesario señalar que la inhibición de la glucólisis y de la gluconeogénesis por la SB en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa podría afectar a la respiración celular. De hecho, cuando se determinó la respiración en hepatocitos intactos, procedentes de los distintos grupos experimentales, tras una breve incubación de 30 minutos, se comprobó que el tratamiento con SB normalizaba el incremento de la respiración celular en su estado basal, en presencia de oligomicina (inhibidor de la ATPasa mitocondrial) y de dinitrofenol (DNP, desacoplador de la cadena respiratoria) en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Dicho efecto se localiza aparentemente antes del complejo V de la cadena respiratoria.

Este aumento de la respiración celular, obtenido en el caso de las ratas fructosa ya había sido observado en otros estudios realizados en adipocitos, aislados de ratas alimentadas con este tipo de dieta durante 12 semanas (Streiff et al, 2007). Asimismo, el efecto inhibitorio de la SB sobre la respiración celular ya había sido señalado previamente en estudios *in vitro*, de manera que, a una concentración de 100 μM , el flavonoide inhibía la respiración celular en hepatocitos intactos (Guigas et al, 2007).

La DM 2 no solamente provoca alteraciones sobre la función mitocondrial, sino que también afecta al número, a la morfología e incluso a la biogénesis mitocondrial. Por ello, se decidió investigar la actividad de la citrato sintasa, que es una enzima mitocondrial, implicada en el ciclo de Krebs y que puede usarse como marcador del contenido mitocondrial de la célula (Smith et al, 2011). Así pues, tal y como se expone en

los resultados, la dieta rica en fructosa causó un incremento en el número de mitocondrias, mientras que el tratamiento con SB durante dos semanas no modificó esa masa mitocondrial, aunque parece que la SB tendía a incrementar el número de mitocondrias en el grupo control + SB.

El incremento de la actividad de la citrato sintasa es totalmente coherente con lo obtenido por otros grupos en mitocondrias aisladas de hígados de ratas alimentadas durante 12 semanas con una dieta rica en grasas y sacarosa (Feillet-Coudray et al, 2009). Sin embargo, paradójicamente, otros estudios mostraron un descenso de la actividad de la citrato sintasa en mitocondrias aisladas del músculo de pacientes diabéticos tipo 2 (Kelley et al, 2002). Por otra parte, el efecto de la SB sobre la actividad de la citrato sintasa resulta bastante novedoso, ya que hasta el momento no se había estudiado el efecto de la SB sobre la actividad de dicha enzima. Este resultado es coincidente con lo obtenido en mitocondrias hepáticas aisladas de ratones alimentados con una dieta rica en grasas y tratados con resveratrol (Baur et al, 2006), aunque existen estudios realizados con antidiabéticos orales como la pioglitazona que mostraron un efecto totalmente contrario en adipocitos de pacientes diabéticos tipo 2 (Bogacka et al, 2005).

Cuando se expresa la respiración celular en función de la actividad de la citrato sintasa, al igual que se ha hecho en otros estudios (Boushel et al, 2007), se llega a la conclusión de que el incremento de la respiración celular observado en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa se debe a un incremento de la masa mitocondrial, de manera que, en realidad, el consumo de oxígeno por unidad mitocondrial es mucho menor que en las ratas control. Este aumento en la masa mitocondrial constituye un mecanismo compensatorio que podría conducir hacia una situación de “disfunción mitocondrial”. Por su parte, la SB, a la dosis de 50 mg/kg/día, i.p.; inhibió el consumo de oxígeno con respecto a las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa sin variar el número de mitocondrias, por lo que posiblemente el mecanismo por el cual el flavonoide inhibía la respiración es completamente distinto al de la dieta rica en fructosa.

Esta medida de la respiración en hepatocitos intactos es una medida mucho más fisiológica pero tiene el inconveniente de que a partir de ella es muy difícil deducir a qué nivel actúa la SB en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Por ello, se decidió analizar el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígados de rata.

A pesar de que en mitocondrias aisladas no llegan a observarse diferencias tan claras, las gráficas obtenidas en el estado 3 (estado fosforilante en presencia de cantidades saturantes de ADP) con los sustratos respiratorios succinato/malato (SM) y glutamato/malato (GM) (Figura 48) y en el estado desacoplado solamente con SM (Figura

49B) se asemejan bastante a las obtenidas en la respiración celular en función de la actividad de la citrato sintasa (**Figura 47**).

La dieta rica en fructosa inhibía de manera no significativa la respiración mitocondrial en el estado 3, además de reducir el consumo de oxígeno tanto en presencia de oligomicina con GM como en el estado desacoplado con ambos sustratos respiratorios. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otro grupo en ratas tratadas con una dieta rica en sacarosa durante 1 semana. Así, estos estudios mostraron que dicha dieta disminuía el consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado y de músculo a nivel del estado 3 (**Lambert et al, 2003**). Asimismo, estudios realizados en ratas ZDF mostraron una inhibición de la respiración mitocondrial en el músculo a nivel del estado 3 en presencia de glutamato y palmitato (**Lenaers et al, 2010**).

En cuanto a la SB, administrada a la dosis de 50 mg/kg/día, i.p.; inhibió la respiración mitocondrial, en comparación con las ratas fructosa, a nivel del estado 3 con ambos sustratos respiratorios y en el estado desacoplado solamente con SM. Sin embargo, el flavonoide llegó a normalizar la respiración en presencia de oligomicina con SM y en el estado desacoplado con GM. Estos resultados de la SB sobre la respiración mitocondrial en la resistencia a la insulina resultan totalmente novedosos, ya que hasta ahora no se había estudiado sus efectos mitocondriales en ningún modelo de resistencia a la insulina. Pero existen estudios *in vitro*, realizados por nuestro grupo, que muestran que la SB a una concentración de 100 μM inhibía la respiración mitocondrial en el estado 3 y en el estado desacoplado (**Detalle et al, 2008**), lo cual se repitió especialmente en el grupo control + SB, por lo que, tal como se sugiere en ese artículo, es posible que el efecto del flavonoide se localice a nivel de los complejos respiratorios I, II y III en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa.

Por otra parte, se estudió la posibilidad de que la SB afecte a la eficacia de la fosforilación oxidativa (ATP/O) en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa. Para ello, se estudió la eficacia de la fosforilación oxidativa usando una técnica que evalúa la relación entre la síntesis de ATP y la respiración mediante el método de la hexoquinasa, que mide la fosforilación oxidativa a concentraciones subsaturantes de ADP (**Fontaine et al, 1997**) en presencia de GM, SM y GSM como sustratos respiratorios.

Los resultados obtenidos en este estudio, trazando las relaciones entre la producción de ATP y la respiración (JO_2) indican que la dieta rica en fructosa provocó tanto un descenso de la producción de ATP como de la eficacia de la fosforilación oxidativa tal y como muestra el desplazamiento de las curvas correspondientes hacia la derecha. Este descenso en la producción de ATP ya había sido observado en otros modelos de resistencia a la insulina pero sin llegar a afectar al ATP/O (**Boudina et al, 2007; Vial et al, 2011**).

La administración de SB en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa mejoró el rendimiento de la fosforilación oxidativa sobre todo en presencia de SM y glutamato/succinato/malato (GSM). Para ello, la SB reducía o al menos mantenía la producción de ATP en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa, a la vez que disminuía el flujo de la respiración. Para explicar el mecanismo mediante el cual la SB aumentó la eficacia de la fosforilación oxidativa, nos referimos a lo publicado por Groen y cols (Groen et al, 1990), que demostraron que en una situación de *slipping* experimental inducido, la curva ATP/O se desplazaba hacia la derecha como ocurre en el caso de las ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. Basándonos en este estudio, se puede proponer que la SB, que desplaza la curva de ATP/O hacia la izquierda, aumenta la eficacia de la fosforilación oxidativa mediante la disminución de los fenómenos de *slipping* a nivel de la cadena respiratoria. Recordemos que el *slipping* es un cambio en la estequiometría de las bombas de protones debido a un desacoplamiento de las reacciones químicas y el transporte de protones (Brand et al, 1988). No obstante, serán necesarios estudios más completos para dilucidar los efectos de la SB sobre los fenómenos tanto de *slipping* como de *proton leak* en la resistencia a la insulina, fenómenos que disipan la energía y provocan una pérdida de acoplamiento entre la óxido-reducción y la fosforilación del ADP para formar ATP.

Como ya se expuso en la introducción de este trabajo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) muestran una implicación importante en la patología de la DM 2 así como en el desarrollo de las complicaciones a largo plazo asociadas a la misma. Así, la hiperglucemia provoca una mayor producción y liberación de especies reactivas de oxígeno desde las mitocondrias (Leverve, 2003), las cuales imposibilitan la acción de la insulina en el tejido periférico y participan en el desarrollo de la insulinoresistencia (Bashan et al, 2009). Sin embargo, contrariamente a lo que podría pensarse, la dieta rica en fructosa, al cabo de las 6 semanas de tratamiento, mostraba una inhibición en la producción de ROS mitocondrial. Este descenso en la formación de ROS se manifestó, fundamentalmente, en presencia de rotenona, la cual con el sustrato GM no estimuló adecuadamente la producción de ROS a nivel del complejo I. Esto induce a pensar que posiblemente el efecto mitocondrial de la dieta rica en fructosa se localice a nivel de este complejo respiratorio. Estudios similares realizados por otros grupos en otros modelos experimentales de DM 2 no han mostrado ningún efecto o simplemente un ligero descenso en la producción de ROS en mitocondrias aisladas de corazón, músculo e hígado (Bugger et al, 2008; Herlein et al, 2009; Sivitz y Yorek, 2010), aunque existen investigaciones realizadas por otros grupos que indicaban un exceso de producción de superóxido en el corazón de ratas tratadas con una dieta rica en fructosa (Delbosc et al, 2005).

La administración de SB durante dos semanas, a una dosis de 50 mg/kg/día, aproximó los niveles de producción de ROS a valores normales. Sin embargo, en presencia del sustrato respiratorio GM y de antimicina A se observó un aumento en la

producción de ROS mucho menor del que correspondería, lo cual lleva a pensar que, probablemente, exista un efecto de la SB a nivel del complejo III. Previamente a este trabajo, ya se había observado que en mitocondrias hepáticas, la SB inhibía la producción de ROS en presencia del sustrato SM (Detaillé et al, 2008), al igual que se observó en el caso del grupo control + SB.

El estudio del efecto de la dieta rica en fructosa sobre la producción de ROS mitocondrial indicaba claramente que su acción mitocondrial se localiza probablemente en el complejo I de la cadena respiratoria. Para ello, se investigó la actividad de este complejo, además de la actividad de los complejos II y III, los cuales se intuía que no estaban implicados en tales efectos mitocondriales, pero gracias a su estudio se pudo confirmar esta hipótesis. La inhibición de la actividad del complejo I por la ingesta de una dieta rica en fructosa concuerda con los resultados obtenidos en mitocondrias musculares de pacientes diabéticos tipo 2 (Kelley et al, 2002) y en mitocondrias aisladas de hígados de ratas tratadas con una dieta rica en grasas durante 8 semanas (Vial et al, 2011). Además, la dieta rica en fructosa disminuyó ligeramente la actividad del complejo II y no modificó la del complejo III.

Por tanto, la inhibición clara y significativa del complejo I en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa confirma una alteración del complejo I que explica la menor producción de ROS, especialmente en presencia del efecto estimulador de rotenona. Sin embargo, esta inhibición de la actividad del complejo I en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa no causó una inhibición significativa de la respiración mitocondrial. Así, se sabe que en mitocondrias no sinápticas aisladas de cerebro de rata fue necesaria una disminución de más del 72% en la actividad del complejo I para que empezaran a observarse alteraciones significativas sobre la respiración mitocondrial (Davey y Clark, 1996). De acuerdo con esto, la inhibición de la actividad del complejo I en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa es totalmente insuficiente como para que afecte significativamente a la respiración mitocondrial.

La administración de SB durante dos semanas mostró un incremento significativo de la actividad del complejo I en comparación con ratas tratadas con una dieta rica en fructosa, por lo que parece que la SB mejora la funcionalidad del complejo I, lo cual podría asociarse a sus propiedades hepatoprotectoras. En todo este caso, este resultado es totalmente contrario al observado en el grupo control + SB y al obtenido *in vitro* con otros antidiabéticos orales como la metformina (Batandier et al, 2006; El-Mir et al, 2000). Por otra parte, la SB mostró una tendencia a disminuir la actividad de los complejos respiratorios II y III. Esta tendencia a reducir la actividad del complejo III confirma, en cierta manera, el menor incremento en la producción de ROS en presencia de antimicina A causado por la SB en ratas tratadas con una dieta rica en fructosa. Esta ligera inhibición de la actividad de ambos complejos también concuerda con los resultados obtenidos en el grupo control + SB.

En definitiva, a pesar de la complejidad de los resultados obtenidos, se puede concluir que la SB mejora las alteraciones mitocondriales causadas por la ingesta de una dieta rica en fructosa mediante un aumento de la actividad del complejo I, lo cual parece estar en consonancia con sus propiedades hepatoprotectoras. No obstante, serán necesarias investigaciones mitocondriales más profundas en el futuro en este mismo modelo o en otros modelos experimentales de DM 2, con el fin de clarificar el mecanismo de acción mitocondrial de la SB en un estado de resistencia a la insulina.

CONCLUSIONES

1. La administración de silibinina durante dos semanas, a una dosis de 50 mg/kg/día, i.p., mejora el estado de resistencia a la insulina en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa y en ratas Zucker diabéticas obesas disminuyendo la hiperglucemia y la hiperinsulinemia.

Silibinin administration for two weeks, at a dose of 50 mg/kg/day, i.p, improves insulin resistance state in high-fructose fed rats and in Zucker diabetic fatty rats by reducing hyperglycemia and hyperinsulinemia.

2. El tratamiento con silibinina revierte el aumento del metabolismo hepático de la dihidroxiacetona tanto en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa como en ratas Zucker diabéticas obesas mediante una disminución de la glucólisis y de la gluconeogénesis hepáticas.

Silibinin treatment reverses increased dihydroxyacetone hepatic metabolism in both high-fructose fed rats and Zucker diabetic fatty rats by decreasing hepatic glycolysis and gluconeogenesis.

3. La silibinina también inhibe la glucogenolisis estimulada por el glucagón en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa.

Silibinin also inhibits glucagon-stimulated glycogenolysis in high-fructose fed rats.

4. La silibinina ejerce sus acciones antidiabéticas en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa inhibiendo la hidrólisis de la glucosa 6-fosfato.

Silibinin exerts its antidiabetic actions in high-fructose fed rats by inhibiting glucose 6-phosphate hydrolysis.

5. El efecto inhibitorio de la silibinina sobre la gluconeogénesis y sobre la glucogenolisis en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa está mediado por una inhibición de la enzima gluconeogénica más importante: la glucosa 6-fosfatasa.

The inhibitory effect of silibinin on gluconeogenesis and glycogenolysis in high fructose-induced insulin resistance is mediated by inhibition of the most important gluconeogenic enzyme: glucose 6-phosphatase.

6. El tratamiento con silibinina inhibe la degradación de la glucosa liberada desde el glucógeno por glucogenolisis hasta la formación de lactato más piruvato en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa.

SB treatment inhibits released glucose degradation from glycogen by glycogenolysis to lactate-plus-pyruvate production in high-fructose fed rats.

7. El efecto inhibitor de la silibinina sobre la glucólisis y sobre la degradación de la glucosa liberada en la glucogenolisis en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa está mediado por una inhibición de la enzima glucolítica más importante: la piruvato quinasa.

The inhibitory effect of silibinin on glycolysis and on released glucose degradation by glycogenolysis in high fructose-induced insulin resistance is mediated by inhibition of the most important glycolytic enzyme: pyruvate kinase.

8. La silibinina incrementa la actividad del ciclo de las pentosas fosfato en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa, lo cual lleva a una mejora del estrés oxidativo mediante un incremento de los niveles hepáticos de glutatión.

Silibinin increases the activity of pentose phosphate pathway in high-fructose fed rats, which leads to an improvement of oxidative stress by increasing hepatic glutathione levels.

9. El tratamiento con silibinina inhibe la respiración celular en la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa sin modificar el número de mitocondrias.

Silibinin treatment inhibits cellular respiration in high fructose-induced insulin resistance without modifying the number of mitochondria.

10. La silibinina mejora el rendimiento de la fosforilación oxidativa en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa.

Silibinin improves oxidative phosphorylation yield in high-fructose fed rats.

11. La silibinina normaliza la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno en ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa mediante un incremento de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria, por lo que la silibinina mejora la disfunción mitocondrial inducida por la ingesta de una dieta rica en fructosa durante seis semanas.

Silibinin normalizes mitochondrial reactive oxygen species production in high-fructose fed rats by increasing the activity of respiratory chain complex I, so silibinin improves mitochondrial dysfunction induced by feeding a high-fructose diet for six weeks.

EVROPEAN PH.D. SUMMARY

AIM

Silymarin, one of the oldest traditional herbal medicines, is a lipophilic extract from the milk thistle *Silybum marianum* which is predominantly composed of four flavonolignan isomers: silibinin, isosilibinin, silidianin and silichristin. Silibinin (SB) constitutes 50-70% of the silymarin mixture and has been identified as the major biologically active component (Abenavoli et al, 2010). It has been repeatedly observed that SB is efficient in several hepatic diseases such as cirrhosis or acute and chronic viral hepatitis (Wellington and Jarvis, 2001). In addition, SB has been reported to protect the liver against toxicity induced by a wide range of chemical and environmental agents, effects partly bound to its radical-scavenging properties (Saller et al, 2001). SB received further attention due to its beneficial effects in other organs besides liver. These include mostly anticancer and chemopreventive actions as well as various interesting activities as neuroprotective, cardioprotective and nephroprotective (Kren and Walterova, 2005).

Likewise, SB has recently proposed to be beneficial in type 2 diabetes since treatment with an oral formulation (Legalon®) improved glycemic control in type 2 diabetics as it induced a decrease in both fasting insulin and exogenous insulin requirements during mealtime (Lirussi et al, 2002; Velussi et al, 1997). This likely derives from an inhibition of hepatic glucose output through a mechanism which yet remains elusive. Therefore, given that SB has important antihyperglycaemic and insulin-sensitizing effects and its efficacy against insulin resistance has hardly been studied in any animal model of type 2 diabetes mellitus, we decided to investigate the capacity *in vivo* of SB to reverse metabolic abnormalities and oxidative stress, associated to insulin resistance induced by feeding a high-fructose diet in Wistar rats. We also considered it was important to confirm some beneficial effects of SB against insulin resistance in other experimental models of type 2 diabetes mellitus, as Zucker diabetic fatty (ZDF) rat model.

INTRODUCTION

1. Regulation of energy metabolism in liver

Liver is the major organ in the regulation of energy metabolism. This organ is responsible for the majority of endogenous glucose production by gluconeogenesis and glycogenolysis. The kidney performs the remaining 15% by gluconeogenesis. Metabolic pathways are very highly regulated by insulin and glucagon, two hormones with antagonistic actions. Insulin activates glycolysis and inhibits β -oxidation, glucagon promotes gluconeogenesis, glycogenolysis and lipid oxidation (Hue, 2001).

2. Type 2 diabetes mellitus (DM)

The term type 2 DM designates not a single disease but a heterogeneous collection of hyperglycaemic syndromes. Some 90% of cases of type 2 DM have a multifactorial pathogenesis due to complex interaction between unhealthy life-style habits (overnutrition, lack of physical activity, overconsumption of alcohol, etc...). The remaining 10% of cases of type 2 DM are accounted for by monogenic forms of maturity onset diabetes of the young (MODY) and rare syndrome forms (Gerich, 2001).

Type DM 2 has already reached epidemic proportions currently affecting over 200 million people worldwide. A significant growth is foreseen for the next years with a very severe socioeconomic impact on developing countries in Africa, Asia and South America. In most developed countries (U.S., Canada, Australia and Europe), DM has already reached an average prevalence of 6%. The prevalence of diabetes for all age-groups worldwide was estimated to be 2.8% in 2000 and 4.4% in 2030. The total number of people with diabetes is being projected to rise from 171 million in 2000 to 366 million in 2030. The most important factors to diabetes prevalence across the world are aging (proportion of people >65 years of age), physical activity and obesity. Obesity prevalence in children and adolescents, mostly in developed countries, warrants special attention (Zimmet, 2003).

2.1. *Physiopathology*

Type 2 DM is a complex, polygenic disease characterized by both hyperinsulinemia and hyperglycemia, at least early in its pathogenesis. It is thought to be the result of an imbalance between insulin sensitivity and secretion, with failure of pancreatic β -cells to compensate for the increased insulin requirement created by insulin resistance leading to hyperglycaemia.

There is a clear link between loss of β -cell mass and development of type 2 diabetes in humans. Increasing evidence emerging from clinical and epidemiological studies indicates that a primary β -cell failure resulting in an appropriate low insulin secretion to glucose stimulus and insulin resistance are present in a significant number of type 2 patients (Rhodes, 2005). β -cell failure is thought to occur as a combined consequence of metabolic overload and oxidative stress leading to increased β -cell apoptosis and loss of expression of fundamental components of the insulin granule secretory machinery. It was suggested that over the time β -cell exhaustion may ensue, a phenomenon that can be accelerated by progressive increase in plasma glucose and free-fatty acid (FFA) levels, leading to development of hyperglycemia (Kaiser et al, 2003; McGarry, 2002).

Insulin resistance can be defined as a diminished ability of the cell to respond to the action of insulin. It is the most important pathophysiological feature in many pre-diabetic states and is the first detectable defect in type 2 diabetes. Insulin resistance is usually compensated by hyperinsulinemia. Although moderate hyperinsulinemia might be tolerated in the short term, chronic hyperinsulinemia exacerbates insulin resistance and contributes directly to β -cell failure and diabetes (Gastaldelli et al, 2010). Skeletal muscle is the organ in which insulin resistance is first detectable. However, insulin resistance can originate in adipose tissue, where it leads to an increase in lipolysis, with a subsequent release of glycerol and free fatty acids (FFA) into the circulation. It is widely accepted that increased availability and utilization of FFA contribute to development of skeletal muscle insulin resistance, as well as to increased hepatic glucose production (Boden et al, 2002; Clore et al, 2000).

Natural history of type DM 2 is variable resulting from long duration of silent hyperglycemia (at fasting, postprandially), often clinically revealed by symptoms and signs of specific macrovascular (ischemic heart disease, stroke, peripheral arterial disease, foot ulcer, polyneuropathies) and/or microvascular complications such as renal disease (any stage, from microalbuminuria to end-stage renal failure), retinopathy (any stage macular, edema), arterial hypertension and its consequences, dyslipidemias and obesity.

2.2. Treatment

The treatment goals of type 2 DM patients are effective control of blood glucose, blood pressure and lipids (if elevated) and, ultimately, to avert the serious complications associated with sustained tissue exposure to excessively high glucose concentrations. Prevention and control of diabetes with diet, weight control and physical activity has been difficult. So, treatment of type 2 DM has focused on increasing insulin levels, either by direct insulin administration or oral agents that promote insulin secretion, improving sensitivity to insulin in tissues, or reducing the rate of carbohydrate

absorption from the gastrointestinal tract. Current therapeutic agents available for type 2 DM include:

Sulphonylureas: These oral antidiabetic agents include glyburide, gliclazide and glipizide. They have been extensively used for the treatment of type 2 DM nearly 50 years and lower blood glucose concentrations primarily by stimulating insulin secretion from the β -cells of the pancreatic islets (Turner et al, 1999).

Meglitinides: This type of oral antidiabetic agents includes repaglinide and nateglinide. They bind to pancreatic β -cells and stimulate insulin release in a manner similar to sulphonylureas, but are structurally different from sulphonylureas and bind to a nonsulphonylurea receptor. These drugs are taken preprandially and have a rapid onset and limited duration of action (Lebovitz, 2009).

α -Glucosidase inhibitors: These oral antidiabetic agents include acarbose, miglitol and voglibose. Members of this class act by slowing the absorption of carbohydrates from the intestines and thereby minimize the postprandial rise in glucose (Hsieh et al, 2010).

Biguanides: Metformin is only biguanide available in Europe and US. Glucose lowering by the drug occurs primarily by decreasing hepatic glucose production and, to lesser extent, by decreasing peripheral insulin resistance (Holman, 2007). It is ideally suited for obese patients with type 2 DM who are unresponsive to diet alone and are presumed to be insulin resistant. It is effective as monotherapy or in combination with other agents, such as insulin secretagogues, other insulin-sensitizing drugs or inhibitors of glucose absorption.

Thiazolidinediones: This class of oral antidiabetics includes pioglitazone and rosiglitazone. They improve whole-body insulin sensitivity via multiple actions on gene regulation. These effects result from stimulation of a nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), for which thiazolidinediones are potent synthetic agonists (Israili, 2009).

Incretin mimetics: The recent development of pharmacological agents taking advantage of the entero-insular axis has revolutionized the management of type 2 DM. Two major approaches have been used to take advantage of this axis from a therapeutic perspective: agents which are agonists of the human glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor such as exenatide and liraglutide and drugs that delay the plasma degradation of GLP-1 by dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV). They increase glucose-mediated insulin secretion, decrease glucagon secretion and delay gastric emptying (Amori et al, 2007).

Insulin: Insulin therapy is indicated in the treatment of type 2 DM for initial therapy of severe hyperglycemia, after failure of oral agents. Insulin has been used in multiple

combinations in type 2 DM and new insulin analogs are in clinical trials (**Wright et al, 2002**)

2.3. Animals models in type 2 diabetes research

Due to complex interaction among multiple susceptibility genes and between genetic and environmental factors, analysis of diabetes is difficult and poorly understood in humans. Moreover, diabetes research in humans is impeded by obvious ethical considerations. Animal models of diabetes are therefore greatly useful and advantageous in biomedical studies because they offer promise of new insights into human diabetes (**Srinivasan and Ramarao, 2007**).

Animals exhibiting a syndrome of insulin resistance and type 2 diabetes, with characteristics similar to humans, comprise a wide range of species with genetic, experimental or nutritional causation. Current experimental animal models for the study of type 2 DM include:

- Spontaneous or genetically derived diabetic animals
- Diet/nutrition induced diabetic animals
- Chemically induced diabetic animals
- Surgical diabetic animals
- Transgenic/knock-out diabetic animals

According to the objective of this Ph.D., now we are only focusing on two animal models of insulin resistance, used in this thesis:

2.3.1. Nutritional model of a high-fructose diet

Due to its insulin-independent metabolism and low glycaemic index, fructose was initially investigated as a potential beneficial sweetener in patients with type 2 DM. In addition to that, fructose-1-phosphate, which directly results from fructose metabolism, markedly stimulates hepatic glucokinase and may contribute to the improvement of glucose homeostasis (**McGuinness and Cherrington, 2003**).

In sharp contrast with the apparent beneficial effects of fructose over glucose when acutely administered, chronic feeding high-fructose diets to various animal species was shown to be associated with several metabolic and cardiovascular adverse effects: a high-fructose diet for several weeks leads to the development of nearly all features of the metabolic syndrome, that is dyslipidaemia, insulin resistance, impaired glucose homeostasis, increased body fat and high blood pressure among which insulin resistance plays a central role (**Le and Tappy, 2006**). Fructose supplementation leads to tissue-specific alterations in insulin sensitivity in humans, since it increases fasting

hepatic glucose production and impairs its suppression at low plasma insulin concentration, but does not reduce whole body insulin-mediated glucose disposal at high plasma insulin concentrations, thus indicating fructose-induced hepatic insulin resistance. Fructose also impairs insulin-mediated suppression of plasma free fatty acids, suggesting adipose tissue insulin resistance (Faeh et al, 2005; Wei and Pagliassotti, 2004).

Indeed, hyperlipidaemia appears to be a major effect of high-fructose feeding (Basciano et al, 2005). In rats, increased dietary fructose rapidly leads to high plasma triglyceride concentration, and more specifically to increased very low density lipoprotein (VLDL) triglycerides. This increase appears to be related to an increased hepatic VLDL triglycerides secretion rate, with a possible contribution of a decreased extrahepatic clearance of VLDL triglycerides (Arner, 2001).

2.3.2. Zucker diabetic fatty (ZDF) rat model

Zucker diabetic fatty rat is a substrain of Zucker fatty rat (ZFR) selectively inbred for hyperglycaemia and is highly useful for the investigation of mechanism of type 2 DM. Firstly, obesity results from the simple autosomal recessive (fa) gene on chromosome 5. Therefore, this rat is characterized by hyperphagia and early onset of obesity which appear at 4 week of age along with increased growth of subcutaneous fat depot (Durham and Truett, 2006).

Male ZDF rats progress to frank diabetes due to failure to compensate adequately for insulin resistance. In fact, it is less obese but more insulin resistant than ZFR (Lin and Sun, 2010). ZDF rats develop diabetes usually at 7-10 week after birth. Its ability to over secrete insulin to compensate peripheral insulin resistance is limited, and the beta cells are brittle, easily succumbs to over secretion pressure. Studies on cells turnover in these animals suggest that the primary defect lies not in an ability of β -cells to proliferate but rather in an enhanced rate of apoptosis. Down regulation of β -cell GLUT-2 transporters coupled with impaired insulin synthesis has been reported to be responsible for hyperglycaemia in ZDF rats. Decreased glucose transport activity associated with decreased GLUT-4 levels is also observed in adipose tissue and skeletal muscle in ZDF rats. Overall, this ZDF rat has been most commonly used for investigating the mechanisms associated with insulin resistance and β -cell dysfunction in type 2 DM, as well as for testing several antidiabetic agents (Pick et al, 1998; Shafrir and Ziv, 1998).

3. Silibinin

Silybum marianum, commonly known as milk thistle, is one of the oldest and thoroughly researched plants in the treatment of liver diseases. It has been used for more than 2000 years to treat liver and gallbladder disorders, including hepatitis, cirrhosis and jaundice, and to protect the liver against poisoning from chemical and environmental toxins including mushroom poisoning and alcohol (Rambaldi et al, 2005).

The active constituents of the plant are obtained from the dried seeds and collectively known as silymarin, which is a complex mixture of four flavonolignan isomers, namely silibinin, isosilibinin, silydianin and silychristin. Among the isomers, silibinin (SB) is the major and most active component and represents about 60-70%, followed by silychristin (20%), silydianin (10%) and isosilibinin (5%) (Saller et al, 2001).

SB is considered to be very safe and there are only a few reports on the adverse effects. Recently, SB received attention due to its alternative beneficial activities that are not directly bound to its hepatoprotective and antioxidant effects. These include mostly anticancer and chemopreventive actions, as well as hypocholesterolemic, cardioprotective, neuroactive and neuroprotective activities. Moreover, the extent of its application has been broadened to other organ systems besides liver, since SB seems to be prospective also in treatment of pancreas problems and balancing glycaemia, treatment of lung problems and kidney diseases.

3.1. Physiological effects of SB

3.1.1. Hepatoprotective effects

Hepatoprotective effects of SB have been demonstrated by various researchers from all over the world against partial hepatectomy models and toxic models in experimental animals by using acetaminophen, carbon tetrachloride (CCl₄), ethanol, D-galactosamine and *Amanita phalloides* toxin. It has been also found that SB protects liver cells from injury caused by ischaemia and radiation. Animal studies and clinical trials suggest that SB can be used in the management of alcoholic and non-alcoholic liver diseases, liver cirrhosis and viral hepatitis by improving hepatic enzymes and liver dysfunction (Pradhan and Girish, 2006).

3.1.2. Antidiabetic effects

SB has been recently proposed to be beneficial in type 2 diabetes. A commercial pharmacological preparation of SB (Legalon[®]) is being successfully used in human medicine to improve glycemic control in type 2 diabetic patients with cirrhosis as it induced a decrease in both fasting insulin and exogenous insulin requirements during

mealtime (Lirussi et al, 2002; Velussi et al, 1997). This likely derives from an inhibition of hepatic glucose output through a mechanism which yet remains elusive. Besides, administration of silymarin alone or as an adjunct to hypoglycaemic drugs as glibenclamide improved glycemic control in type 2 diabetics (Huseini et al, 2006; Hussain, 2007), and aqueous extracts of milk thistle seeds exhibited potent hypoglycaemic and antihyperglycemic effects in both streptozotocin- and alloxan-induced diabetic rats (Maghrani et al, 2004; Soto et al, 2003).

On the other hand, it has been recently demonstrated that SB, at concentrations ranging from 25 to 100 μ M, induced a short-term inhibition of gluconeogenesis in hepatocytes perfused with a variety of gluconeogenic sources, an event related with a decrease in glucose 6-phosphate hydrolysis (Guigas et al, 2007).

3.1.3. Nephroprotective effects

Besides liver, SB also exerts its beneficial effects in other organs as kidney. SB was found to have similar stimulatory effects to the kidney cells as described in liver cells. In the kidney cells damaged *in vitro* by paracetamol, cisplatin, and vincristin was demonstrated that administration of SB before or after the chemical-induced injury can reduce or avoid nephrotoxic effects (Sonnenbichler et al, 1999).

3.1.4. Cancerprotective and chemoprotective effects

Application of SB as a chemoprotective and cancerprotective agent could be considered for its antiradical potential and consequently its cytoprotective activity. Owing to its chemopreventive effect, SB inhibits carcinogenic action of many chemicals (Dorai and Aggarwal, 2004). Also, silymarin led to growth inhibition and death of human epidermoid carcinoma cells (Bhatia and Agarwal, 2001). One of the most promising activities of SB is its anticancer activity and potential use of this compound as an adjuvant in the cancerostatic therapy by other chemotherapeutics. Here, SB acts mainly as an antioxidant to protect tissues against the oxidative stress generated by chemotherapeutics and mainly to eliminate their hepatotoxicity (Abenavoli et al, 2010).

3.1.5. Other effects

SB is naturally best known as hepatoprotectant and cholereitics, however, also other gastrointestinal problems can be treated or prevented by its preparations. So, oral pretreatment with silymarin attenuated colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Cruz et al, 2001). SB also has shown cardioprotective effects during the cancer treatment with cardiotoxic drugs as doxorubicin (Psotova et al, 2002). Finally, silibinin has a protective effect in the early phase of allergic asthma, which may be related to a

negative influence of the flavonoid on bronchial responsiveness to histamine (**Breschi et al, 2002**).

3.2. Mechanisms of action of SB

The mechanisms underlying of the actions of silibinin are multiple. These actions may be mainly due to its antioxidant and antiinflammatory properties and its effects on membrane permeability and DNA expression.

3.2.1. Regulation of cellular membrane permeability

Silymarin has a regulatory action on cellular and mitochondrial membrane permeability in association with an increase in membrane stability against xenobiotic injury (**Wu et al, 2003**). It can prevent the absorption of toxins into the hepatocytes by occupying the binding sites as well as inhibiting many transport proteins at the membrane. These actions make a silibinin a suitable candidate for the treatment of toxic liver diseases (**Saller et al, 2007**).

3.2.2. Anti-inflammatory actions

The molecular bases of the anti-inflammatory and anti-carcinogenic effects of silibinin might be related to the inhibition of the transcription factor NF- κ B, which regulates and coordinates the expression of various genes involved in the inflammatory processes, cytoprotection and carcinogenesis. Silymarin was found to suppress both NF- κ B DNA binding activity and its dependent gene expression (**Manna et al, 1999**). Silymarin also inhibited the TNF- α -induced activation of mitogen-activated protein kinase and abrogated caspase activation (**Saller et al, 2008**).

3.2.3. Antioxidant properties

Free and lipid peroxide radicals have been implicated in liver diseases. These reactive oxygen species (ROS) damage the cellular membrane and cause further oxidation of membrane lipids and proteins. The cytoprotective effects of SB are mainly attributable to its antioxidant and free radical scavenging properties (**Detaille et al, 2008**). SB can also interact directly with cell membrane components to prevent any abnormalities in the content of lipid fraction responsible for maintaining normal fluidity (**Miguez et al, 1994**).

3.2.4. Stimulation of protein synthesis

SB can enter inside the nucleus and act on RNA polymerase enzymes resulting in increased ribosomal formation, leading to hasten proteins and DNA synthesis. This

action has important therapeutic implications in the repair of damaged hepatocytes and restoration of normal functions of liver (**Pradhan and Girish, 2006**).

3.2.5. Anti-fibrotic actions

Liver fibrosis can result in remodelling of liver architecture leading to hepatic insufficiency, portal hypertension and hepatic encephalopathy. In the initial phase there will be proliferation of hepatic parenchymal cells. The conversion of hepatic stellate cells (HSC) into myofibroblast is considered as the central event in fibrogenesis. SB inhibits NF- κ B and also retards HSC activation (**Gebhardt, 2002**).

3.2.6. Other mechanisms of action

SB has other less important mechanisms of action but worth mentioning. The first one aims at neuro-immunomodulation. SB treatment resulted in the expression of major histocompatibility complex (MHC) I in neuronal and neuroblastoma cells, stimulating immune system to be able quickly to identify intracellular pathogens and remove the viruses from the central nervous system (**Sakai et al, 2001**).

In the other hand, it has been observed that some polyphenolic compounds have antiestrogenic and antiandrogenic effects leading to inhibition of steroid hormone receptor-dependent proliferation of cancer cells. According to this, SB elicits antiandrogenic activity in the prostate cancer line LNCaP (**Thelen et al, 2004**). Finally, SB is an inhibitor of P-glycoprotein (Pgp), implicated in multidrug resistance (**Dzubak et al, 2006**).

MATERIALS AND METHODS

1. Animals and treatment

1.1. High-fructose diet

Adult male Wistar rats of body weight from 180-200 g were used in this study. They were maintained in a temperature-controlled room with a fixed 12-h light-dark cycle. Animals experiments and handling were performed according to the principles and guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals. The animals were divided into 4 experimental groups:

Group 1: Control animals received the control diet (Harlan Global Diet 2014, Italy) containing starch and tap water *ad libitum*.

Group 2: Fructose-fed animals received a high-fructose diet (60%) (Harlan, Madison, WI) and tap water *ad libitum* for 6 weeks.

Group 3: Fructose-fed animals received a high fructose-diet (60%) and tap water *ad libitum* for 6 weeks. They were treated with 50 mg of SB/kg/day, i.p. for the last 2 weeks, prior to sacrifice

Group 4: Control animals received the control diet and water *ad libitum*. They were treated with 50 mg of SB/kg/day, i.p.; for the last 2 weeks, prior to sacrifice.

The composition of high-fructose diet and control diet are presented in **Table 1**. Food intake and body weight changes were measured weekly.

Ingredients	Control diet	High-fructose diet
Carbohydrates	50	-
Fructose	-	60
Casein (fat free)	20.7	20.7
Groundnut oil	5	5
Cellulose	18	8
DL-Methionine	0.3	0.3
Salt mixture	5	5
Vitamin mixture	1	1

Table 1. Composition of diet (g/100 g)

1.2. Zucker diabetic fatty rat model

Male ZDF rats (fa/fa) and their controls (Fa/?) were purchased from Charles River Laboratories at the age of six weeks. They were maintained in a temperature-controlled room with a fixed 12-h light-dark cycle. Rats were sacrificed at the 11th week of age. The animals were divided into 4 groups:

Group 1: Lean rats received standard diet and tap water *ad libitum*.

Group 2: Zucker diabetic fatty rats received standard diet and tap water *ad libitum*.

Group 3: Zucker diabetic fatty rats received standard diet and tap water *ad libitum*. They were treated with 50 mg of SB/kg/day, i.p.; for the last 2 weeks prior to sacrifice.

Group 4: Lean rats received standard diet and water *ad libitum*. They were treated with 50 mg of SB/kg/day, i.p.; for the last 2 weeks prior to sacrifice.

Food intake and body weight changes were measured regularly from the 9th week of age. In both experimental models, silibinin was dissolved in a water-based dosing solution containing 0.9% sodium chloride (w/v) and 0.04% Tween 80.

2. Biochemical analysis

At the end of the experimental period, blood was collected from jugular vein and plasma was separated. The levels of glucose, triglycerides, total cholesterol, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-c) and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-c) were measured in plasma in collaboration with the Biochemistry Unit of the University Hospital of Salamanca. Plasma insulin was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit, using rat insulin as standard (Merckodia, Uppsala, Sweden). Serum insulin and fasting serum glucose values were then employed to estimate insulin resistance by HOMA-IR, using the following formula: $[(\text{Serum Insulin } (\mu\text{U/ml}) \times \text{fasting blood glucose (mmol/L)})] / 22.5$ (Matthews et al, 1985).

3. Techniques used with isolated hepatocytes

3.1. Hepatocyte isolation

Liver cells were prepared from fed or 24 hours-starved rats (300-400 g). Animals were anaesthetized with intraperitoneal injection of sodium thiopental (0.2 ml/100 g body weight) and hepatocytes were isolated in the presence of collagenase

according to the method of Berry and Friend (Berry and Friend, 1969), as modified by Groen et al (Groen et al, 1982).

3.2. Perifusion of hepatocytes

Two kinds of perifusion experiments were accomplished for studying the antihyperglycaemic and antiglycogenolytic effects of SB in insulin resistance. Firstly, isolated hepatocytes (200-250 mg dry cells) from 24h-starved rats of different experimental groups, were perifused at 37°C with Krebs-bicarbonate-calcium (120 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 24 mM NaHCO₃, 1.3 mM CaCl₂, pH 7.4) saturated with O₂/CO₂ (19:1) at a flow rate of 5 ml/min, according to the method of Van der Meer and Tager (Van Der Meer and Tager, 1976), as modified by Groen et al (Groen et al, 1986). After 35 min, when the initial steady state has been reached, seven steady states were obtained in the presence of increasing dihydroxyacetone (DHA) concentrations (0.15; 0.3; 0.6; 1.2; 2.4; 4.8 mM). At the end of each steady state of 15 min, both extracellular medium (“perifusate”) and cell samples, collected at the exit or inside the perifusion chamber respectively, were taken out for subsequent analysis.

For the time-course experiments, hepatocytes from fed rats (120 mg dry cells) were perifused as described above without addition of exogenous substrate. 10⁻⁷ M glucagon was added in both chambers after 25 min and perifusate was collected at the indicated time. Cell samples were also removed from the chamber for determination of intracellular glucose 6-phosphate (G6P) level at the indicated time.

3.3. Determination of metabolic fluxes and intracellular intermediates

Proteins in perifusate were denatured by heating in a warm water bath (80°C for 10 minutes), were centrifuged (8000 g for 10 min) and kept at 4°C. The extracellular intermediates glucose, lactate and pyruvate were then measured by enzymatic procedures with spectrophotometric assays (Specord 205/Analytik Jena Group, Germany) according to the method of Bergmeyer (Bergmeyer, 1974) based on the transformation of NAD⁺ to NADH or reverse. The net rates of glucose ($J_{Glucose}$) or lactate-plus-pyruvate (J_{L+P}) were calculated from the total cell content of the perifusion chamber, the flow rate through the system and the concentration of each metabolite in the perifusate, and were expressed as $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g dry cells}^{-1}$. The total metabolic flux from DHA (J_{DHA}) was expressed as three-carbon equivalents and calculated from the sum of $2\times J_{Glucose}$ and J_{L+P} .

Once removed from the chamber, the cell sample was centrifuged through a layer of silicone oil (Rhodorsil 640 V 100) into HClO₄ (10% mass/vol) to separate intracellular content from extracellular medium. The acid-soluble fraction was the

neutralized with KOH/MOPS (2/0.3 M) and frozen at -20°C for subsequent determination of intracellular metabolites. Dihydroxyacetone phosphate (DHAP), glucose 6-phosphate (G6P) and fructose 6-phosphate (F6P) concentrations were determined fluorimetrically, as described according to the method of Bergmeyer (Bergmeyer, 1974).

3.4. Measurement of enzyme activities

3.4.1. Glucose 6-phosphatase

Glucose-6-phosphatase (G6Pase) activity was assessed in hepatocytes pre-incubated for 30 minutes in closed vials containing Krebs-bicarbonate-calcium buffer saturated with O₂/CO₂ (19:1) in presence of 20 mM DHA. After centrifugation of cell suspension, G6Pase activity was assessed on resuspended cell pellets after hypo-osmotic shock and cell disruption by sonication. Briefly, cell homogenate was incubated in closed vials for 10 minutes at 37°C in a sucrose/Tris (250 mM /20 mM) buffer, pH 7.3, in presence of increasing concentrations of G6P (from 0.5 to 20 mM). Samples of homogenate suspension were removed from the vials and the reaction was stopped by addition of ascorbic acid/perchloric acid (2%-10%, mass/vol).

The accumulation of inorganic phosphate (Pi) was then determined by colorimetric assay, as described (Baginski et al, 1975). The contribution of non-specific phosphatase activity was estimated via the hydrolysis of α - and β -glycerophosphate instead of G6P under the same conditions and subtracted from all measurements. The enzyme activity was expressed as nmol of Pi produced per min and per mg of protein and its kinetics parameters were calculated using the Ultrafit software (Biosoft, Cambridge, UK).

3.4.2. Pyruvate kinase

Hepatocytes, isolated from rats of four experimental groups, were first incubated for 30 min in closed vials containing Krebs-Ringer-bicarbonate-calcium saturated with O₂/CO₂ (19:1) and supplemented with 20 mM DHA. After centrifugation of cell suspension, PK activity was assessed on resuspended cell pellets as previously reported (Ichai et al, 2001). Briefly, the enzyme was first incubated at 22°C for 4 minutes in the absence of phosphoenolpyruvate (PEP) before adding it in the assay mixture which was composed of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM ADP and 1.5 unit of lactate dehydrogenase. The initial rate of the reaction was then measured by recording the decrease in absorbance at 340 nm. Enzyme activity was expressed as the ratio (\square/V_{\max}) of activity measured at 0.4 mM PEP to that at 4 mM PEP, because this expression has been shown to reflect the phosphorylated state of the enzyme (Claus et al,

1979). The enzyme activity was expressed as nmol of PEP per min and per mg of protein.

3.4.3. Citrate synthase

The occlusion of citrate synthase inside mitochondria makes it a useful mitochondria marker enzyme and is also used to assess the integrity of the mitochondrial preparation. This assay measures the reaction of the free thiol groups liberated in the reaction with [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)] (DTNB) according to Shepherd and Garland (Shepherd and Garland, 1969). Hepatocytes samples were freeze-thawed 3 times to break up the membranes and release all the protein. The freezing was done by immersing into liquid nitrogen, thawing by placing in a water bath at 30°C. Citrate synthase activity was determined by spectrophotometric assay at 412 nm and at 30°C. In brief, 20 µl of sample were added in the assay mixture which was composed 100 mM Tris, pH 8.0; 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mM Acetyl-CoA and 0.2 mM DTNB. Once a stable baseline is recorded, the reaction is initiated by the addition of 10 µl of 10 mM oxaloacetic acid (OAA). Enzyme activity is calculated by relating the rate of the assay to the mitochondrial protein in the cuvette and was expressed as nmol of OAA per min and per mg of protein

3.5. Measurement of the activity of pentose-phosphate pathway (PPP)

The activity of PPP was measured essentially as described by Hothersall et al. (Hothersall et al, 1979) based on the determination of the difference in $^{14}\text{CO}_2$ production from [1- ^{14}C]-glucose (decarboxylated by the 6-phosphogluconate dehydrogenase-catalyzed reaction and by the Krebs cycle) and from [6- ^{14}C]-glucose (decarboxylated only by the Krebs cycle). Hepatocytes, isolated from fed-rats, were pre-incubated for 30 min in closed vials containing Krebs-bicarbonate-calcium saturated with O_2/CO_2 (19:1) and supplemented with glucose 5 mM. Aliquots (150 µl) of the suspension were placed in Erlenmeyer flasks containing 0.5 µCi of D-[1- ^{14}C]-glucose or D-[6- ^{14}C]-glucose. Each Erlenmeyer flask was equipped with a central well containing an eppendorf tube with benzethonium hydroxide. The flask atmosphere was flushed with O_2 for 20 s, after which the flask was sealed with a rubber cap. Sealed flasks were incubated for 60 min at 37°C in a water bath shaking before adding by injection 0.2 ml of 2M HClO_4 into the main well to stop the incubation, although shaking was continued for 1 hour to facilitate the entrapment of $^{14}\text{CO}_2$.

The radioactivity trapped by benzethonium hydroxide was measured in scintillation fluid (Scintisafe 2, Fisher Scientific, Madrid) by liquid scintillation counting (LS 6500, Beckman Instruments). Blanks without cells were used in parallel to measure background radioactivity, which was subtracted from the sample values. For

the calculations, the specific radioactivity (dpm/mol) of glucose was used and the results are expressed as nmol of glucose transformed into CO₂/min/cells.

3.6. Determination of reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels

To assay glutathione, liver were isolated from all studied groups, washed with Krebs-bicarbonate calcium buffer and frozen at -80°C for subsequent determination. A portion of liver (250-300 mg) was homogenized by sonication in a buffer solution containing 100 mM sodium phosphate, 5 mM EDTA-Na₂; pH 8.0. Both GSH and GSSG were measured by a fluorometric method according to Hissin and Hilf (**Hissin and Hilf, 1976**). For GSH measurement, 10 µl of liver homogenate were incubated with 10 µl of ophthalaldehyde solution (1 mg/ml) and 180 µl phosphate buffer (100 mM sodium phosphate, 5 mM EDTA-Na₂, pH 8.0) for 15 min at room temperature. Then, the fluorescence was measured in a plate-reader spectrofluoremeter (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fischer Scientific, Madrid). A standard curve of known GSH concentrations was prepared and processed with the samples.

For GSSG concentration measurement, 25 µl of liver homogenate was pre-incubated with 10 µl N-ethylmaleimide solution (5 mg/ml) for 40 min at room temperature, and then alkalinized with NaOH 0.1N. Aliquots of 10 µl were incubated with 10 µl of ophthalaldehyde solution and 180 µl NaOH 0.1N for 15 min at room temperature. The fluorescence was then measured and the GSSG concentrations were calculated according to a standard curve prepared accordingly. The levels of GSH and GSSG are expressed in nmol/mg/protein.

3.7. Determination of oxygen consumption rate in intact hepatocytes

Hepatocytes (10 mg dry cells.ml⁻¹) were incubated in a shaking water bath at 37°C in closed vials containing 2 ml Krebs-Ringer-bicarbonate calcium buffer saturated with O₂/CO₂ (19:1) and supplemented with 20 mM DHA. After 30 min of incubation, the cell suspension was saturated again with O₂/CO₂ for 1 min and immediately transferred into a stirred oxygraph vessel equipped with a Clark oxygen electrode. The oxygen consumption rate (*JO*₂) was measured at 37°C before and after successive addition of 6 µg.ml⁻¹ oligomycin and 100 µM DNP (2,4-dinitrophenol).

4. Techniques used with isolated mitochondria

4.1. Isolation of rat liver mitochondria

Rat liver mitochondria were isolated from liver and prepared according to standard differential centrifugation procedures in a medium containing 250 mM

sucrose, 1 mM EGTA and Tris-HCl 20 mM, pH 7.2, according to the standard method described by Klingenberg and Slenczka (Klingenberg M. and Slenczka, 1959). Mitochondrial proteins were estimated by the Biuret method using BSA as standard (Gornall and Bardawill, 1948).

4.2. Determination of oxygen consumption rate in rat liver mitochondria

Isolated mitochondria were incubated at 30°C in the oxygraph vessel containing 2 ml of a KCl medium (125 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 5 mM Pi-Tris; pH 7.2). Respiration was initiated (state 4) by the addition of different substrates (5 mM glutamate/2.5 mM malate (GM) or 5 mM succinate/0.5 mM malate (SM) + 1.25 µM rotenone). State 3 (phosphorylating respiration) was obtained after the addition of 1 mM ADP. Oligomycin (1.25 µg/mg proteins), a specific inhibitor of the mitochondrial ATP synthase, was then added to the mitochondrial suspension to determine the nonphosphorylating respiratory rate (real state 4). The uncoupled respiratory rate and the maximal activity of cytochrome oxidase were measured after successive additions of 75 µM DNP, 0.15 µg.ml⁻¹ antimycin and 1 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) plus 5 mM ascorbate. All experiments were done in the presence of 0.1% of free fatty acid (FFA)-BSA to rid the medium of FFA that might induce an uncoupling of the oxidative phosphorylation.

4.3. Measurement of oxidative phosphorylation yield

Oxidative phosphorylation yield, assessed by ATP/O ratio, was determined from the ATP synthesis rate (J_{ATP}) versus respiratory rate (JO_2) with an ADP-regenerating system, based on hexokinase plus glucose. Rat liver mitochondria were suspended in the respiration buffer, added with 20 mM glucose, 1 mM MgCl₂ and 125 µM ATP. Oxygen consumption, in the presence of SM (5/0.5 mM) or GM (5/2.5 mM) or GSM (2.5/2.5/1.25 mM), and ATP synthesis were titrated by addition of increasing concentrations of hexokinase (0.17-0.7 UI.ml⁻¹). Mitochondrial suspension (300 µl) was withdrawn from the cuvette, quenched in HClO₄ (4% vol/vol final concentration), and neutralized with 2 M KOH/0.3 M MOPS for enzymatic measures. Production of ATP was determined by monitoring glucose 6-phosphate formation (Fontaine et al, 1997).

4.4. Mitochondrial H₂O₂ production

Reactive oxygen species (ROS) production was estimated by the release of mitochondrial H₂O₂. The rate of released H₂O₂ was by monitoring the linear increase in fluorescence ($\lambda_{ex} = 560$ nm and $\lambda_{em} = 584$ nm) resulting from the oxidation of Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) by H₂O₂ in the presence of horseradish peroxidase (HRP) with a F-2500 fluorometer (Hitachi, Tokyo, Japan).

ROS production was assayed by incubating mitochondria in a stirred 2 ml volume with 0.5 mg of mitochondrial protein/ml, 10 UI/ml HRP and 2 μ M Amplex Red in the respiration buffer, supplemented with 2.5 mM Pi and 0.1% BSA-FFA. Mitochondria were energized with GM (2.5/1.25 mM), SM (2.5/0.25 mM) or GSM (2.5/2.5/1.25 mM) as respiratory substrates and further incubated in the presence of 1.25 μ M rotenone and 3 μ M antimycin. Mitochondrial ROS production was calibrated against H₂O₂ standards.

4.5. Measurement of activity of the respiratory chain complexes I, II and III (Lacraz et al, 2008)

The specific activity of respiratory complexes was assayed spectrophotometrically using liver mitochondrial resulting from 3 cycles of freezing-thawing. Enzyme activity was expressed as nmoles of reduced or oxidized substrate per minute and per mg of mitochondrial protein.

4.5.1. Activity of the respiratory chain complex I (rotenone-sensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase)

Complex I activity was assayed as the rate of NADH oxidation at 340 nm. A total of 24 μ g of mitochondrial proteins were added in 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.5) buffer containing 3.75 mg/ml fat-free BSA, 100 μ M decylubiquinone as an electron acceptor and 200 μ M NADH. Addition of 10 μ M rotenone was used to inhibit specifically this enzyme complex whose activity was calculated from difference between NADH oxidation with and without rotenone.

4.5.2. Activity of the respiratory chain complex II (succinate-ubiquinone reductase)

Complex II activity was quantified by measuring the decrease in the absorbance due to the reduction of 100 μ M 2,6-dichloroindophenol (DCIP) (synthetic electron acceptor from respiratory complex II) at 600 nm. 24 μ g of mitochondrial proteins were added in 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.5) buffer supplemented with 2.5 mg/ml fat-free BSA, 9.3 μ M antimycin A, 5 μ M rotenone, 100 μ M DCIP and 30 mM succinate. Enzyme activity was calculated from the difference before and after the addition of 50 μ M decylubiquinone, natural electron acceptor from complex II.

4.5.3. Activity of the respiratory chain complex III (ubiquinone cytochrome c reductase)

Complex III activity was determined by monitoring the reduction of oxidized cytochrome c at 550 nm. Only 5 μ g were added in 100 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.5) buffer with 1 mg/ml fat-free BSA, 50 μ M EDTA, 1 mM KCN and 10 μ M oxidized cytochrome c. The reaction was started by the addition of 105.6 μ M decylubiquinol,

which was prepared by chemical reduction of decylubiquinone with sodium dithionite. Enzyme complex activity was measured from difference between cytochrome c reduction with and without 9.1 μ M antimycin A.

5. Statistical analyses

All the results are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.D.). Data are analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by posthoc with Tukey's Multiple Comparison test to determine significance between groups. A value of $p < 0.05$ was considered significant (* significant compared with control rats; # significant compared with high-fructose rats; † significant compared with control rats).

RESULTS

1. Effects of silibinin on plasma biochemical parameters in insulin resistance

1.1. Effects of SB on plasma glucose, insulin and lipid levels in insulin resistance induced by a high-fructose diet

The mean final body weight and weight gain did not significantly vary between the groups (Table 2). The levels of plasma glucose and insulin were significantly elevated in fructose-fed rats as compared to control rats. This situation was associated with an important increase in insulin resistance, as demonstrated by the significantly higher value of insulin resistance index (HOMA-IR) in high-fructose animals. Plasma glucose, plasma insulin and HOMA-IR values were decreased significantly by SB treatment (50 mg/kg/día; i.p.) for 2 weeks.

High-fructose-induced insulin resistance was associated with a significant increase in plasma TG and a significant decrease in LDL-c as compared with control animals. No significant changes were observed in plasma lipid levels in SB-treated high-fructose fed rats.

Parameters	Control	Fructose	Fructose + SB	Control + SB
Body weight (g)	361 ± 11	353 ± 11	345 ± 7	354 ± 13
Weight gain (g)	161 ± 4	161 ± 11	151 ± 6	161 ± 7
Glucose (mmol/L)	7.63 ± 0.36	9.89 ± 0.24***	8.15 ± 0.32###	7.52 ± 0.20
Insulin (ng/mL)	0.88 ± 0.12	4.07 ± 0.19***	2.43 ± 0.19###	0.55 ± 0.14
HOMA-IR	7.46 ± 0.35	44.78 ± 1.10***	22.02 ± 0.86###	4.60 ± 0.12
TG (mmol/L)	0.42 ± 0.04	0.85 ± 0.12***	0.80 ± 0.06	0.46 ± 0.05
CT (mmol/L)	1.63 ± 0.08	1.56 ± 0.06	1.53 ± 0.10	1.46 ± 0.08
HDL-c (mmol/L)	1.43 ± 0.09	1.09 ± 0.07*	1.13 ± 0.09	1.24 ± 0.12
LDL-c (mmol/L)	0.29 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.08	0.31 ± 0.06

Table 2. Effect of SB on body weight, glycemic homeostasis and lipid parameters in fructose-induced insulin resistance

1.2. Effects of SB on glucose, insulin and lipid levels in ZDF rat model

The mean final body weight and weight gain of obese Zucker rats were significantly higher than that of their lean littermates (Table 3). Chronic intraperitoneal administration of SB for 2 weeks did not produce changes in body weight in either rat

strain. Plasma glucose was significantly higher in ZDF rats. Similarly, plasma insulin was approximately 15-fold higher in ZDF animals than in lean rats. After 2 weeks of SB administration, ZDF rats presented levels of plasma glucose close to lean animals and showed significantly reduced plasma insulin levels compared with the values observed in ZDF rats. As expected, ZDF rats had greater insulin resistance, expressed as HOMA-IR than did lean rats. This parameter was significantly improved by SB administration to ZDF rats.

Plasma triglycerides, total cholesterol, HDL-c and LDL-c levels were higher in ZDF rats than in lean rats. SB only decreased the plasma concentration of total cholesterol as compared to ZDF rats. Among lean rats no differences were found between the rats given SB and their controls.

Parameters	Lean	ZDF	ZDF + SB	Lean + SB
Body weight (g)	281 ± 3	439 ± 9***	439 ± 7	303 ± 15
Weight gain (g)	63 ± 8	136 ± 8***	142 ± 6	71 ± 3
Glucose (mmol/L)	6.19 ± 0.75	10.69 ± 0.4***	8.19 ± 1.08 [#]	6.88 ± 0.39
Insulin (ng/mL)	2.00 ± 0.1	33.31 ± 0.8***	23.18 ± 0.8 ^{###}	1.96 ± 0.26
HOMA-IR	14.83 ± 0.64	395.93 ± 9.8***	211.02 ± 7.8 ^{###}	16.59 ± 1.36
TG (mmol/L)	0.40 ± 0.01	2.74 ± 0.22***	2.47 ± 0.49	0.49 ± 0.07
CT (mmol/L)	1.81 ± 0.03	4.42 ± 0.21***	3.34 ± 0.2 ^{##}	2.29 ± 0.23
HDL-c (mmol/L)	1.33 ± 0.05	2.18 ± 0.14***	1.77 ± 0.15	1.24 ± 0.12
LDL-c (mmol/L)	0.42 ± 0.02	0.90 ± 0.13**	0.64 ± 0.06	0.56 ± 0.05

Table 3. Effect of SB on body weight, glycemic homeostasis and lipid parameters in ZDF rat model.

2. Effects of silibinin on global hepatic metabolism in insulin resistance

2.1. Effects of SB on DHA metabolism in fructose-induced insulin resistance

We used the cell perfusion system to study the capacity *in vivo* of SB to reverse the hepatic metabolic abnormalities related to insulin resistance induced by a high-fructose diet. Indeed, the rates of glucose and lactate-plus-pyruvate production strictly reflect the gluconeogenic and glycolytic fluxes, respectively since glycogen content is negligible in hepatocytes from 24 h-starved rats.

As shown in **Figure 1**, high-fructose rats showed alterations of hepatic glucose metabolism by increasing significantly both gluconeogenesis ($J_{Glucose}$) (**Figure 1A**) and glycolysis (J_{L+P}) (**Figure 1B**) as compared to control rats by 23% and 25%, respectively, thus leading to a rise in the overall DHA metabolism rate expressed as three-carbon equivalents (J_{DHA}) (**Figure 1C**). SB treatment completely reversed these metabolic

alterations in fructose-fed animals by returning $J_{Glucose}$ and J_{L+P} to normal values. Control rats administered SB showed decreased DHA metabolism by reducing significantly both $J_{Glucose}$ and J_{L+P} .

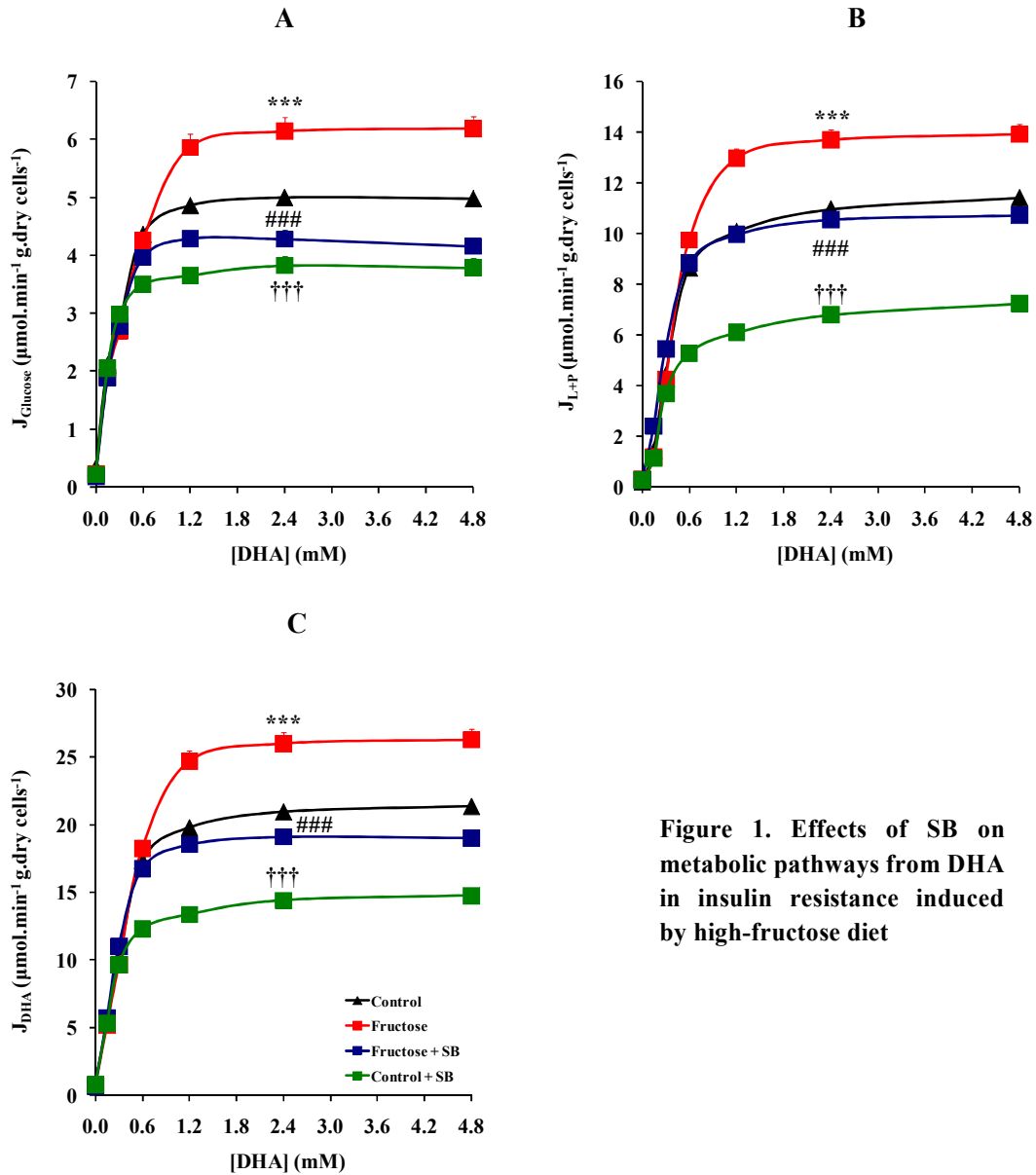


Figure 1. Effects of SB on metabolic pathways from DHA in insulin resistance induced by high-fructose diet

To further investigate the effect of SB on hepatic DHA metabolism in insulin resistance induced by a high-fructose diet, the intracellular concentration of key intermediates was measured at each steady state, allowing gluconeogenesis and glycolysis to be accurately dissected. Firstly, DHAP concentrations did not significantly vary between the groups (Figure 2A), suggesting that neither high-fructose diet nor SB exert an effect on DHA phosphorylation. However, a clear modification of the relationship between DHAP and $J_{Glucose}$ by silibinin treatment in high-fructose fed rats was also evidenced. For a given DHAP concentration, the resultant $J_{Glucose}$ was indeed

increased in high fructose-fed rats as compared to control (Figure 2B). SB treatment for 2 weeks normalized the relationship between $J_{Glucose}$ and DHAP in high-fructose fed rats. In the same way, SB fully reversed the relationship between J_{L+P} and DHAP in high-fructose fed rats (Figure 2C). These results suggest that the flavonoid could exert its actions on increased hepatic metabolism both upstream and downstream of DHA phosphorylation in insulin resistance induced by a high-fructose diet.

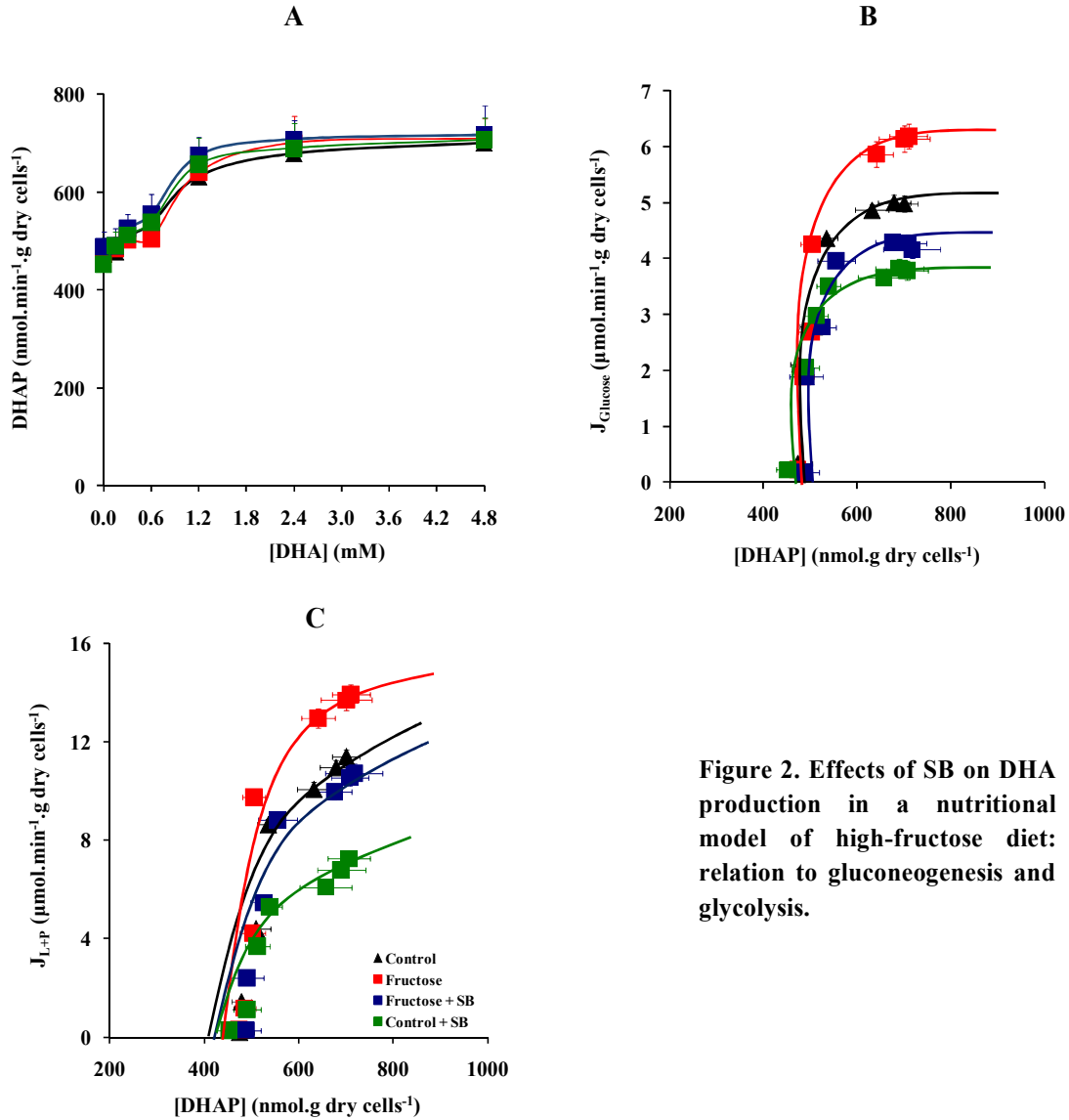


Figure 2. Effects of SB on DHA production in a nutritional model of high-fructose diet: relation to gluconeogenesis and glycolysis.

2.2. Effects of SB on DHA hepatic metabolism in a ZDF rat model

As silibinin reversed the alterations of DHA hepatic metabolism due to insulin resistance induced by a high-fructose diet, we decided to research whether these beneficial effects of SB were also observed in a Zucker diabetic fatty rat model.

Hepatocytes isolated from ZDF rats showed significant increases both $J_{Glucose}$ (Figure 3A) and J_{L+P} (Figure 3B) by 33% and 90%, respectively, leading to an increase of J_{DHA} (Figure 3C) as compared to lean rats. Interestingly, SB administration normalized the overall DHA metabolism rate by returning $J_{Glucose}$ to normal values and reducing significantly J_{L+P} . Among lean rats no differences were found between the rats given SB and their controls.

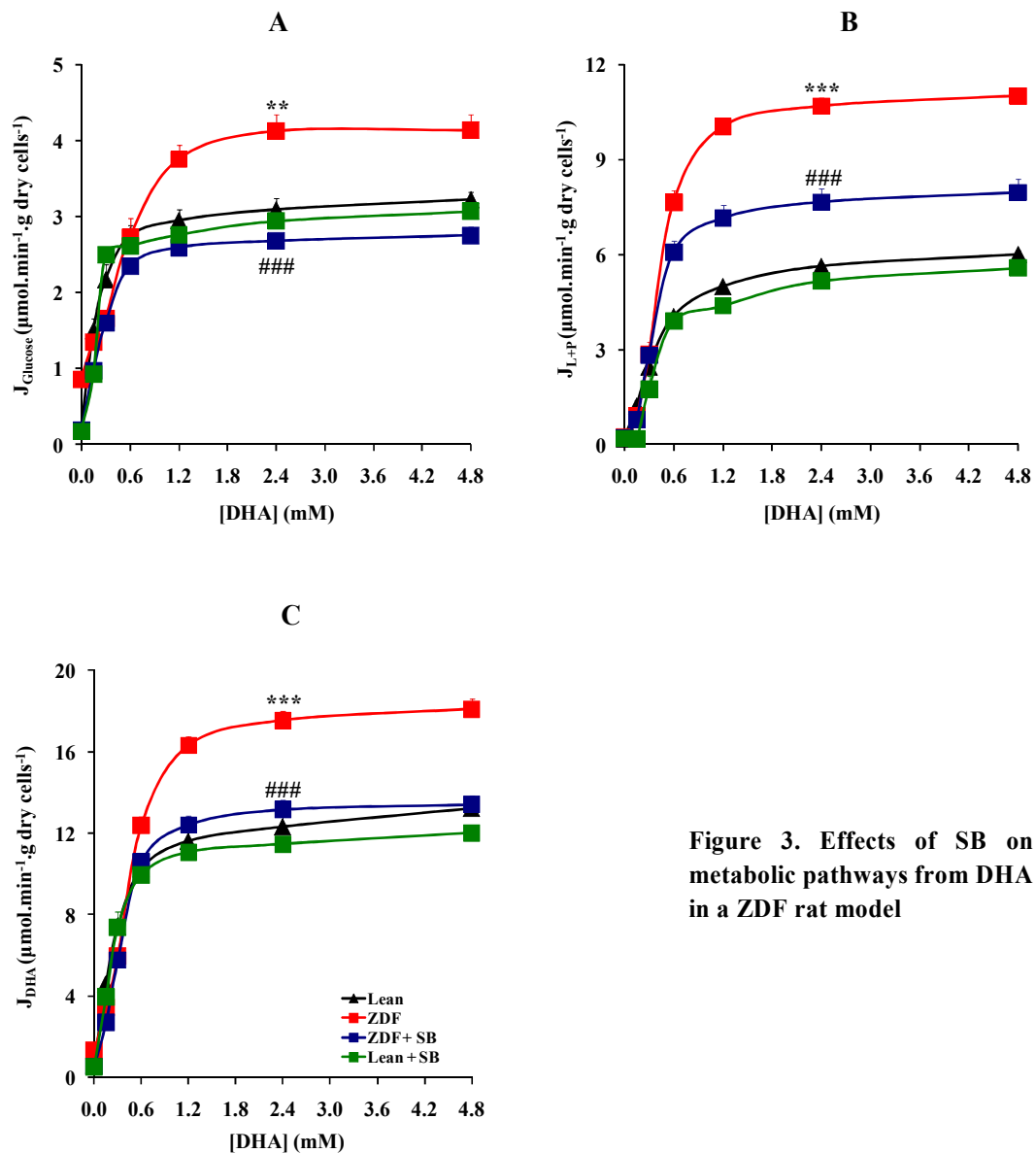


Figure 3. Effects of SB on metabolic pathways from DHA in a ZDF rat model

3. Effects of silibinin on hepatic glycolysis in insulin resistance induced by a high-fructose diet

To further identify the step(s) involved in the inhibition of glycolysis from DHA by SB in insulin resistance induced by a high-fructose diet, we determined the

intracellular concentrations of key intermediates of this pathway at each metabolic steady state. Using our perfusion system, the kinetics of PK can be directly assessed in liver cells by measuring the relationships between intracellular PEP concentrations and J_{L+P} at several rates and under true steady-state conditions. In this case, where lactate and pyruvate are continuously rinsed out, PK flux can be reflected by the net J_{L+P} . As shown in **Figure 4A**, we evidenced the classic sigmoid shape of PK in control hepatocytes perfused with increasing concentrations of DHA. In hepatocytes, isolated from high-fructose fed rats, the relationship between PEP and J_{L+P} was shifted to left, indicating an effect on PK activity. SB, administered for 2 weeks to high-fructose fed rats, reversed the effect of high-fructose diet on PK and normalized the relationship between PEP and J_{L+P} .

In rat liver cells, PEP is present in both cytosol and mitochondrial matrix, while the substrate for PK is localized within the cytosol. Determination of 3-PG, a purely cytosolic intermediate in equilibrium with cytosolic PEP, further confirms that SB treatment normalized PK activity (**Figure 4B**) in an experimental model of insulin resistance induced by a high-fructose diet.

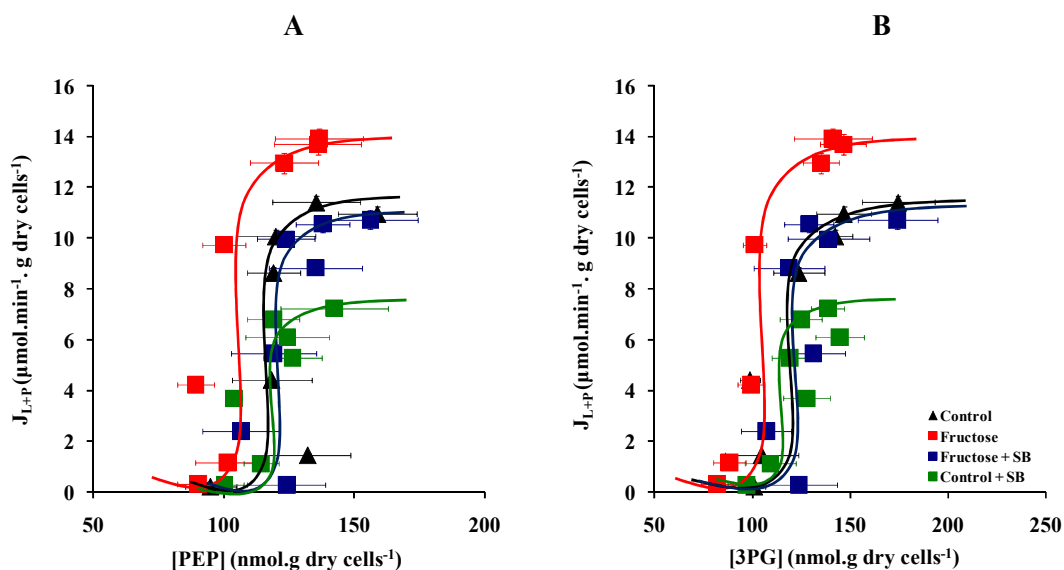


Figure 4. Effects of SB on the relationships between PEP or 3-PG concentrations and glycolytic flux in fructose-induced insulin resistance

With respect to this apparent effect of SB on altered PK activity in high-fructose fed rats, we analyzed its activity after extraction and partial purification from hepatocytes of all groups, pretreated with DHA as energetic substrate. As shown in **table 4**, feeding a high-fructose diet caused an increase of PK activity since a rise in V_{\max} was evidenced in both non-purified and partially purified enzyme extracts, with a significant increase of v/V_{\max} in partially purified fraction. SB treatment inhibited PK activity in

high-fructose fed rats by reducing V_{\max} in both fractions and v/V_{\max} in partially purified enzyme extracts.

Pyruvate kinase	v/V_{\max}		V_{\max}	
	Non purified	Partially purified	Non purified	Partially purified
	<i>nmol.min⁻¹.mg proteins⁻¹</i>		<i>nmol.min⁻¹.mg proteins⁻¹</i>	
Control	0.53 ± 0.02	0.53 ± 0.01	200 ± 6	278 ± 18
Fructose	0.54 ± 0.01	0.57 ± 0.01*	441 ± 34***	653 ± 42***
Fructose + SB	0.54 ± 0.02	0.50 ± 0.01###	277 ± 21###	413 ± 27###
Control + SB	0.56 ± 0.02	0.49 ± 0.03†	235 ± 17	311 ± 30

Table 4. Effects of SB on PK kinetics in fructose-induced insulin resistance

4. Effects of silibinin on hepatic gluconeogenesis in insulin resistance induced by a high-fructose diet

To further investigate the effect of SB on gluconeogenesis from DHA in high fructose-induced insulin resistance, the intracellular concentrations of key intermediates were measured and plotted against gluconeogenic flux at each steady state. So, a clear modification of the relationship between F6P (Figure 5A), G6P (Figure 5B) and $J_{Glucose}$ was evidenced in high-fructose fed rats, but SB normalized these relationships in fructose-induced insulin resistance, indicating a powerful inhibition of G6P hydrolysis.

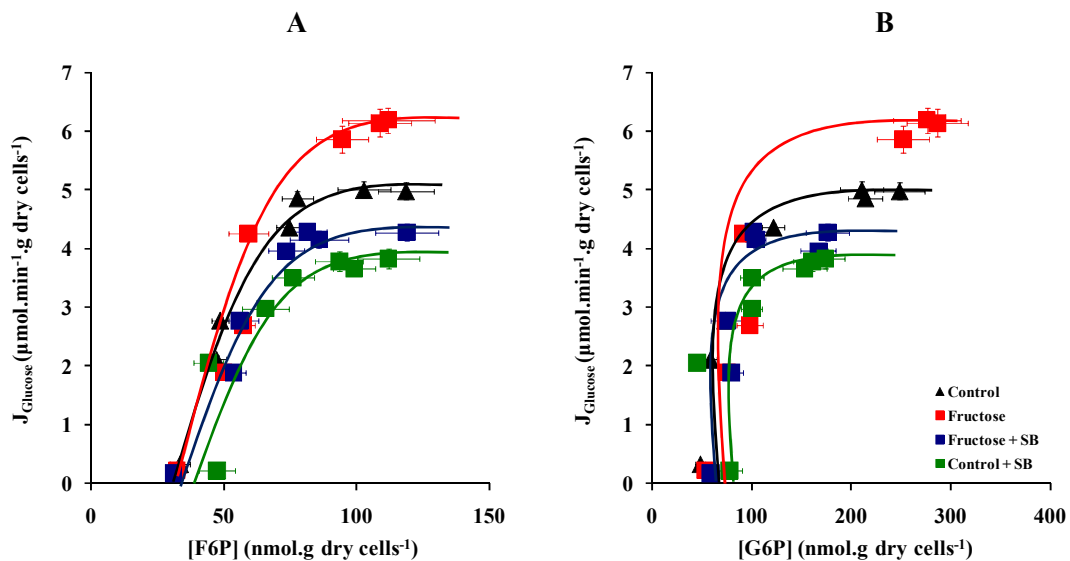


Figure 5. Effects of SB on the relationships between F6P or G6P concentrations and gluconeogenic flux in fructose-induced insulin resistance

Therefore, our results suggest that the inhibition of G6P hydrolysis by SB in high-fructose fed rats could be due to an effect on G6Pase. High-fructose diet increased G6Pase activity by 21% as compared to control rats (**Figure 6**) while SB reversed G6Pase activity in high-fructose fed rats. Control rats administered SB showed a significant decreased G6Pase activity.

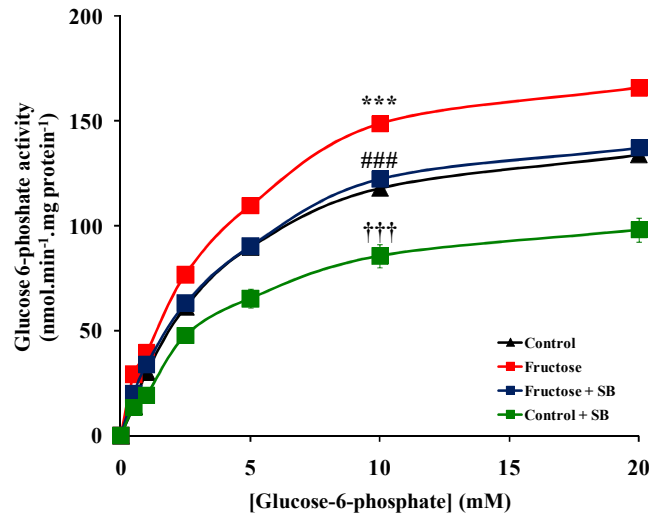


Figure 6. Effects of SB on G6Pase activity in fructose-induced insulin resistance

Determination of G6Pase kinetics in isolated hepatocytes indicated that a high-fructose diet increased V_{max} and decreased the K_m of the enzyme (**Table 5**). SB treatment for 2 weeks normalized G6Pase activity by returning V_{max} to normal values, without modifying the K_m . SB also inhibited significantly V_{max} in control rats.

Glucose 6-phosphatase	K_m	V_{max}
	<i>mM</i>	<i>nmol.min⁻¹.mg proteins⁻¹</i>
Control	5.05 ± 0.36	160 ± 5
Fructose	3.63 ± 0.24**	212 ± 14*
Fructose + SB	3.65 ± 0.28	160 ± 9[#]
Control + SB	4.75 ± 0.11	101 ± 9[†]

Table 5. Effects of SB on G6Pase kinetics in insulin resistance induced by a high-fructose diet

5. Effects of silibinin on glycogenolysis in insulin resistance induced by a high-fructose diet

In a second set of perfusion experiments, we analyzed the effects of silibinin on hepatic glycogenolysis in high fructose-induced insulin resistance. Then, perfusion of hepatocytes from high-fructose fed rats revealed an increase in glycogenolysis rate as compared to control rats (Figure 7A). This activation of the glucagon-induced stimulation of glycogenolysis was normalized by SB treatment. As evidenced with the previous perfusion experiments, the decrease in $J_{Glucose}$ from glycogen in SB treated-fructose rats was also clearly associated with a powerful inhibition in G6P hydrolysis (Figure 7B).

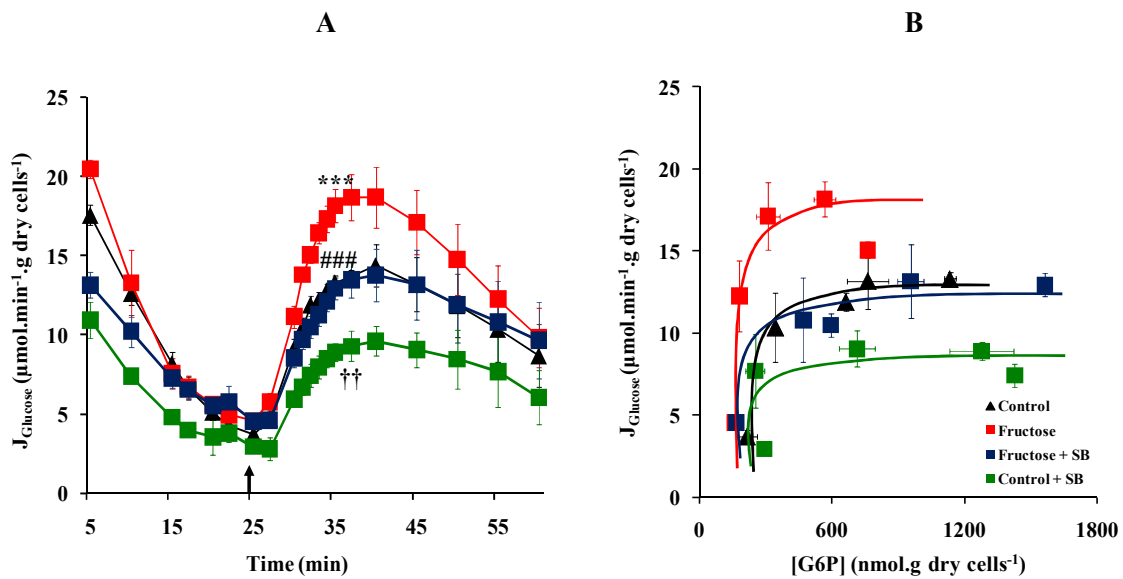


Figure 7. Effects of SB on glycogenolysis in insulin resistance induced by a high-fructose diet

6. Effects of silibinin on pentose phosphate pathway in insulin resistance induced by a high-fructose diet

Inhibition of G6Pase by SB in high-fructose fed rats could be associated to diversion of G6P from G6Pase and hepatic glucose production to the benefit of the pentose phosphate pathway. To confirm this hypothesis, we studied the effect of SB on PPP activity in high fructose-induced insulin resistance. Our results showed that high-fructose diet reduced significantly PPP activity as compared to control rats (Figure 8). However, SB treatment, at a dose of 50 mg/kg/day for 2 weeks, completely reversed this effect of high-fructose diet, so SB diverts G6P to PPP.

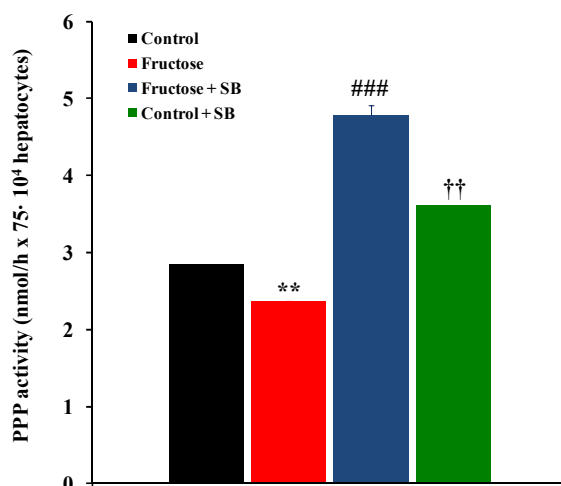


Figure 8. Effects of SB on PPP activity in insulin resistance induced by a high-fructose diet

7. Effects of silibinin on hepatic glutathione levels in high fructose-induced insulin resistance

Glucose oxidation through PPP is a key component of the cytosolic NADPH which is mainly used as a cofactor for the regenerating pathway of antioxidant glutathione (GSH), the major soluble antioxidant in the cell. So, activation of PPP by SB in high-fructose fed rats suggests that SB could improve oxidative stress in insulin resistance. To study the effects of SB on oxidative stress in insulin resistance, we measured total glutathione, GSH, GSSG and GSSG/GSH ratio in the liver of all studied groups. High-fructose fed rats showed a decrease of GSH levels and a rise of GSSG levels and GSSG/GSH ratio, suggesting a state of oxidative stress in high-fructose fed rats (Table 6). SB administration reversed these effects and improved oxidative stress in high fructose-induced insulin resistance, according to its antioxidant properties.

	GSH	GSSG	Total Glutathione	GSSG/GSH
	<i>nmol.mg proteins⁻¹</i>	<i>nmol.mg proteins⁻¹</i>	<i>nmol.mg proteins⁻¹</i>	
Control	19.69 ± 0.65	1.86 ± 0.06	21.44 ± 0.66	9.68 ± 0.52
Fructose	15.52 ± 0.24***	2.76 ± 0.07***	19.01 ± 0.57	17.52 ± 0.57***
Fructose + SB	19.99 ± 0.38##	1.84 ± 0.09##	21.52 ± 1.25	9.60 ± 0.68###
Control + SB	20.63 ± 2.13	1.45 ± 0.09††	21.69 ± 1.67	6.76 ± 1.12†

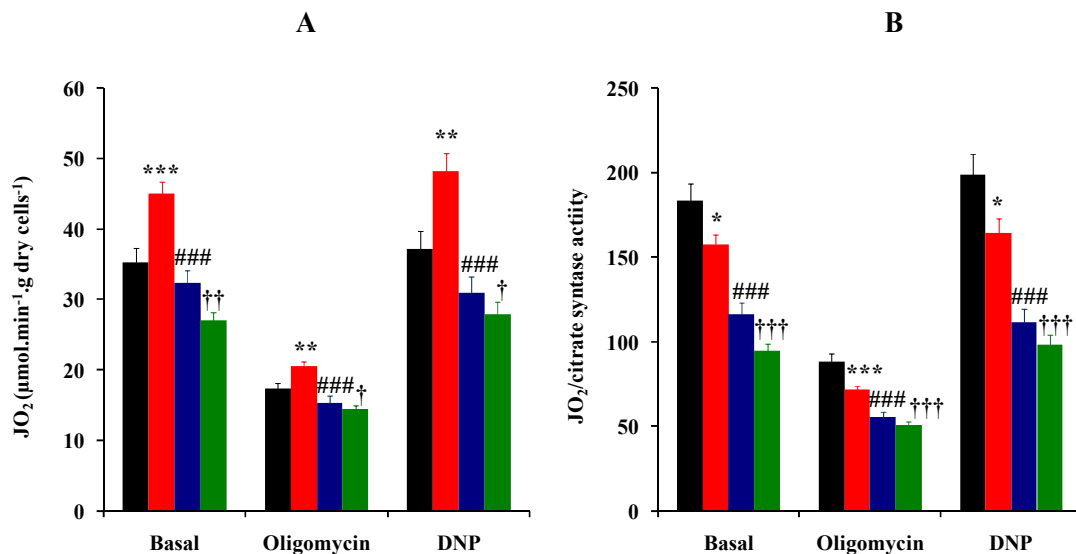
Table 6. Effects of SB on hepatic GSH, GSSG and total glutathione levels and GSSG/GSH ratio in insulin resistance induced by a high-fructose diet

8. Effects of silibinin on cellular and mitochondrial respiration in insulin resistance induced by a high-fructose diet

As the major sites for energy deposition, it should not be surprising that mitochondria appear to be important in multiple aspects of insulin resistance and DM 2, including cause, complications, management and prevention, so we decided to study the mitochondrial effects of SB in high fructose-induced insulin resistance.

In a first set of experiments we studied the effects of SB on cellular respiration in a nutritional model of insulin resistance. After 30 min of incubation, intact hepatocytes isolated from high-fructose fed rats showed a significant increase of basal JO_2 as compared to control rats (**Figure 9A**), but SB treatment fully reversed this activation. Furthermore, after successive addition of oligomycin (an inhibitor of the F0 subunit of ATP synthase) and DNP (an uncoupler of mitochondrial phosphorylation), high-fructose rats also showed an activation of cellular respiration. SB also normalized this increase as in the basal state.

When cellular respiration was expressed according to citrate synthase activity (that is a good mitochondrial marker), it is observed that due an increase of citrate synthase activity in high-fructose fed rats, oxygen consumption by mitochondrial unit is lower than control rats. Therefore, the increase of cellular respiration in high-fructose fed rats was due to an increase in the number of mitochondria (**Figure 9B**). In the other hand, SB treatment inhibited oxygen consumption as compared to high-fructose fed rats without modifying citrate synthase activity. By isolating mitochondria from all studied groups, we have obtained similar figures to those of cellular respiration expressed according to citrate synthase activity, especially in presence of ADP with both energetic substrates, glutamate/malate (**Figure 9C**) and succinate/malate (**Figure 9D**).



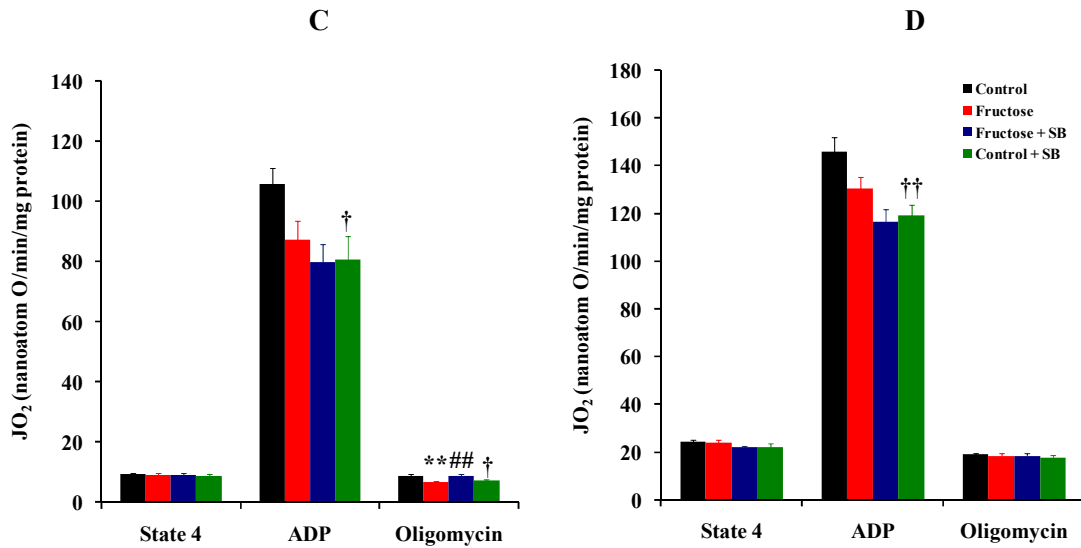


Figure 9. Effects of SB on oxygen consumption from intact hepatocytes and isolated liver mitochondria in insulin resistance induced by a high-fructose diet

9. Effects of silibinin on oxidative phosphorylation yield

To further investigate the oxidative phosphorylation process, its yield was assessed by studying the ATP/O relation. In high-fructose fed rats, ATP/O relation was shifted to the right in presence of both GM (Figure 10A) and SM (Figure 10B), suggesting a drop in mitochondrial efficiency as compared to control rats. In other words, to reach a similar ATP synthesis, high-fructose fed rats required a higher level of oxygen consumption. SB treatment for 2 weeks improved slightly the decrease in oxidative phosphorylation yield.

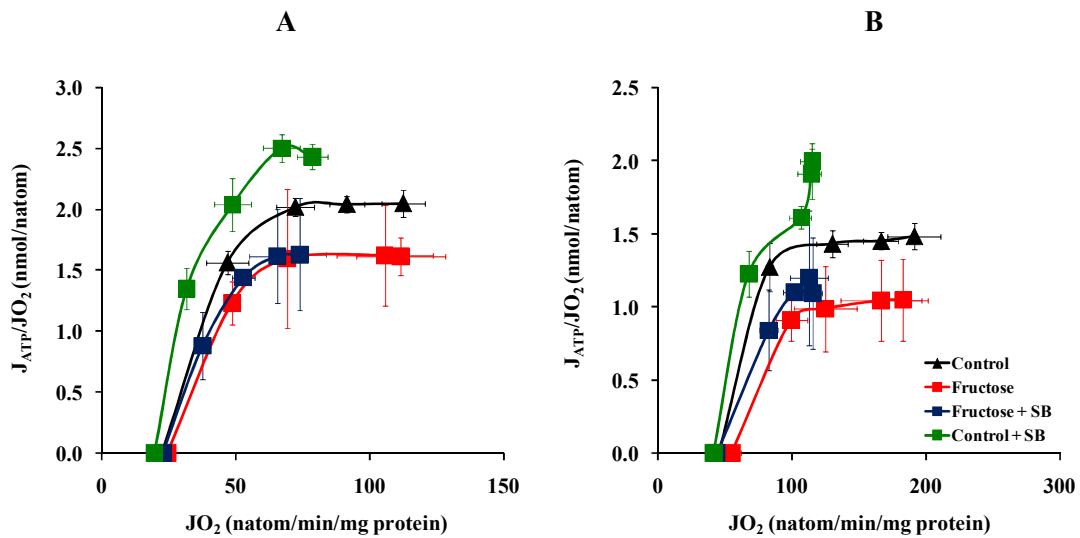


Figure 10. Effects of SB on ATP/O relation in high fructose-induced insulin resistance

10. Effects of silibinin on ROS production in insulin resistance induced by a high-fructose diet

Mitochondria are well recognized as one of the sites of ROS production. We therefore studied the effects of SB on H₂O₂ production in high fructose-induced insulin resistance. In presence of GM as respiratory substrate, ROS production did not vary between the groups at baseline (Figure 11A). After addition of rotenone (that stimulates ROS production in complex I in presence of GM), mitochondria isolated from high-fructose fed rats showed lower ROS production as compared to control rats, indicating a possible alteration of complex I activity in high-fructose fed rats. SB treatment for 2 weeks normalized this drop in ROS production in high fructose-induced insulin resistance. In presence of antimycin A (that stimulates ROS production in complex III) the previously observed difference between control and fructose groups was maintained. However, in this case, SB did not reverse the decrease in ROS production, suggesting a possible effect of SB on complex III.

By using SM as respiratory substrate, we have observed that a high-fructose diet reduced ROS production as compared to control rats, especially at baseline and in presence of rotenone (Figure 11B). SB administration to high-fructose fed rats for two weeks normalized ROS production. Finally, control rats administered SB showed decreased ROS production at baseline.

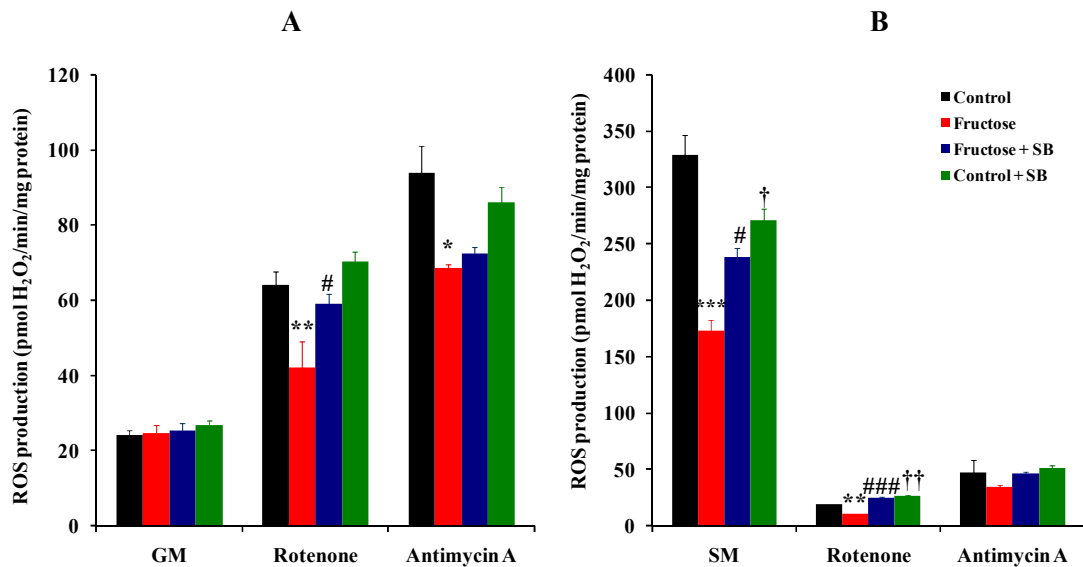


Figure 11. Effects of SB on H₂O₂ production in insulin resistance induced by a high-fructose diet

11. Effects of silibinin on activity of respiratory chain complexes I, II and III

To complete the study of mitochondrial effects of SB in insulin resistance induced by a high-fructose diet, we investigate the activity of respiratory chain complexes I, II and III in isolated mitochondria from all studied groups. Complex I activity was significantly reduced by feeding a high-fructose diet as compared to control rats (Figure 12A). Hence, the decreased mitochondrial ROS production in high-fructose fed rats is linked to the diminished complex I activity. In the other hand, SB treatment for 2 weeks normalized activity of respiratory chain complex I.

Regarding complexes II and III, a high-fructose diet reduced slightly complex II activity (Figure 12B) and did not modify complex III activity (Figure 12C). SB administration for two weeks tended to reduce the activity of complexes II and III as compared to high-fructose fed rats. Finally, control rats administered SB showed a significant inhibition of enzyme activity of respiratory complexes I, III and III.

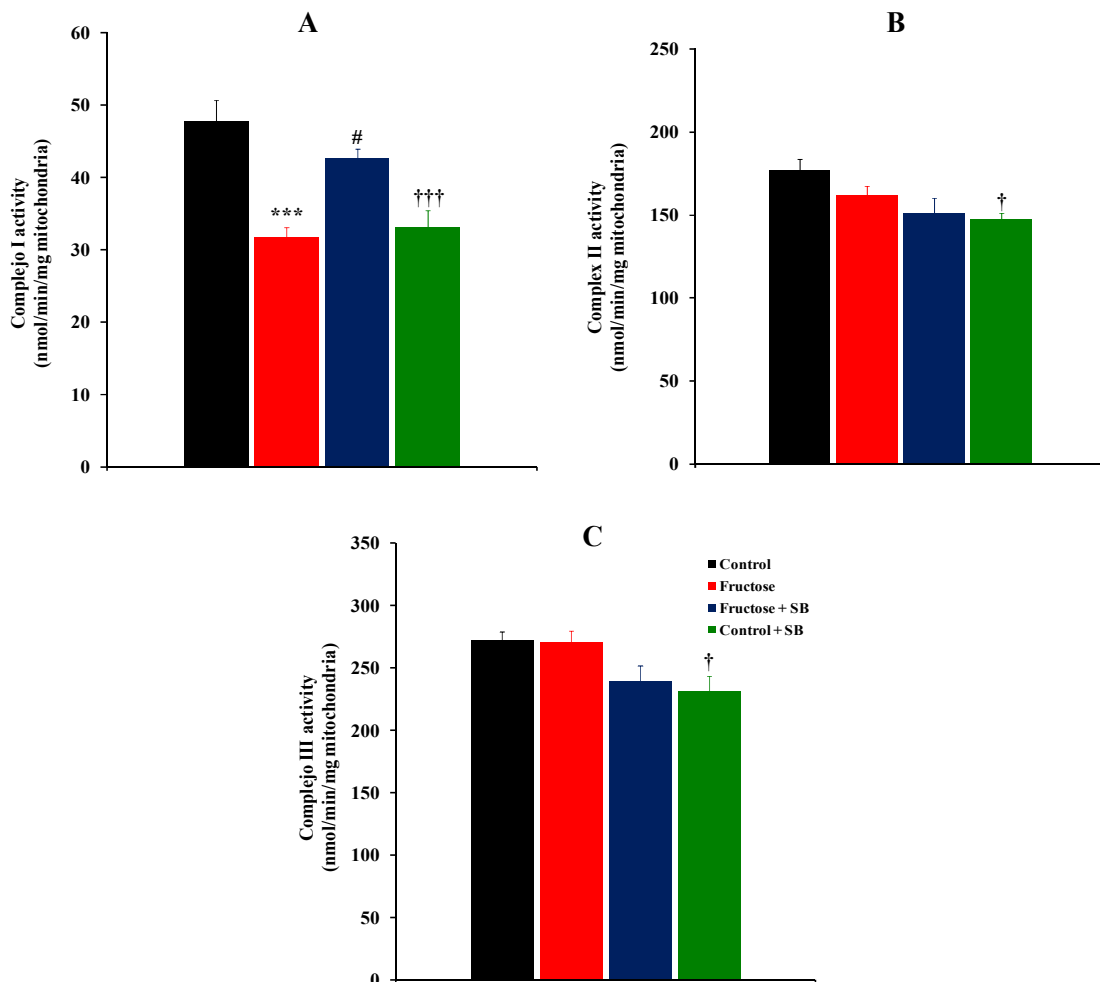


Figure 12. Effects of SB on enzyme activity of respiratory complexes I, II and III in high fructose-induced insulin resistance

DISCUSSION

From the present data, it can be suggested that SB has capacity *in vivo* to reverse the metabolic abnormalities and oxidative stress related to insulin resistance in both a nutritional model of high-fructose diet and Zucker diabetic fatty rat model. The main objective of present work was to determine whether SB can ameliorate hepatic metabolic derangements in high-fructose fed rats and in a Zucker diabetic fatty rat model. Wistar rats fed a high-fructose diet for 6 weeks and Zucker diabetic fatty rats at 11th week of age showed increased plasma insulin, glucose, triglycerides and HOMA, which are the prominent manifestations of insulin resistance. The treatment with SB for 2 weeks, at a dose of 50 mg/kg/day, i.p., ameliorated insulin resistance state in both animal models by reducing hyperglycemia and hyperinsulinemia. This indicates that SB reversed the metabolic derangements induced by insulin resistance and improved the insulin action in liver.

In present work, we found that, feeding high-fructose diet impaired hepatic metabolism in presence of dihydroxyacetone (DHA) as energetic substrate by increasing both gluconeogenesis and glycolysis due to increased activity of glucose 6-phosphatase (G6Pase) and pyruvate kinase (PK), respectively. High-fructose diet also increased glucagon-activated glycogenolysis and reduced pentose-phosphate pathway activity. This indicates that, high-fructose diet-induced hyperglycemia in rats is due to increased endogenous glucose production.

SB treatment normalized hepatic DHA metabolism in both animal models of insulin resistance by decreasing both glucose and lactate-plus-pyruvate production. The most striking finding of this work is the potent inhibitory effect of SB on both G6P hydrolysis and G6Pase activity, leading to normalize of increased both hepatic gluconeogenesis and glucagon-activated glycogenolysis. Hence, as a result of these effects, SB reduces hyperglycemia and hyperinsulinemia in high-fructose fed rats. We also demonstrated that SB increased the activity of the pentose-phosphate pathway in high-fructose fed rats, indicating that G6P from G6Pase could be diverted to the benefit of the pentose-phosphate pathway, which generates NADPH and protection against oxidative stress. In fact, we found that, due to the activation of the pentose-phosphate pathway, SB improved oxidative stress in high fructose-induced insulin resistance by normalizing hepatic glutathione levels. In the other hand, SB inhibited hepatic glycolysis in high-fructose fed rats and ZDF rats by normalizing PK activity. These results were confirmed by inhibition of lactate-plus-pyruvate production from hepatic glycogen in high-fructose fed rats.

These antihyperglycaemic effects of SB are very similar to those obtained with other antidiabetic agents as metformin or rosiglitazone and flavonoids as resveratrol in the same experimental models of insulin resistance (Anurag and Anuradha, 2002; Chen et al, 2001; Kim et al, 2010; Rivera et al, 2008; Rivera et al, 2009; Walker et al, 1999; Yadav et al, 2009). Besides, mostly of the antihyperglycaemic effects of SB had been suggested in *in vitro* experiments performed with the perfusion cell system (Guigas et al, 2007). In conclusion, these antigluconeogenic and antiglycogenolytic properties of SB suggest that the flavonoid, either alone or as an adjunct to hypoglycemic drugs, could be beneficial for the treatment of type 2 diabetes.

Given that mitochondria appear to be important in multiple aspects of insulin resistance (cause, management and prevention), we further investigated the mitochondrial effects of SB in insulin resistance induced by a high-fructose diet. In the present study, we found that, feeding a high-fructose diet for 6 weeks increased cellular respiration in intact hepatocytes, due to an increase in the number of mitochondria, indicating that oxygen consumption per mitochondrial unit is lower as compared to control rats. Therefore, high-fructose fed rats increase the number of mitochondria to compensate the drop in oxygen consumption per mitochondria, which might lead to mitochondrial dysfunction. SB treatment for 2 weeks normalized cellular respiration in high-fructose fed rats without modifying the number of mitochondria, indicating that SB reduced oxygen consumption per mitochondria as compared to high-fructose rats. Albeit in isolated mitochondria differences between groups were not significant, mitochondrial effects of high-fructose diet and SB were similar to those obtained in intact hepatocytes according to mitochondrial mass.

The results obtained in intact hepatocytes and isolated mitochondria indicate that the mitochondrial effects of a high-fructose diet could be located before respiratory complex V. In fact, our results demonstrate that feeding a high-fructose diet attenuated ROS production as compared to control rats, due to an inhibition of activity of respiratory chain complex I. However, this drop in complex I activity was insufficient to cause a significant inhibition of mitochondrial respiration as compared to control rats (Davey and Clark, 1996). In the other hand, SB treatment normalized ROS production in high-fructose fed rats by increasing complex I activity as compared to high-fructose rats. At the same time, SB could also exert an inhibitory effect on complex III activity. Therefore, SB improved mitochondrial abnormalities related to insulin resistance in high-fructose fed rats by increasing complex I activity but this issue merits further research in other models of insulin resistance.

CONCLUSIONS

- Treatment with the flavonoid silibinin, at a dose of 50 mg/kg/day, i.p. for 2 weeks, improves insulin resistance by reducing hyperglycaemia and hyperinsulinaemia in high-fructose fed rats and in Zucker diabetic fatty rats
- Silibinin administration reverses completely increased hepatic DHA metabolism by inhibiting gluconeogenesis and glycolysis pathways in high fructose-fed rats and in Zucker diabetic fatty rats.
- Silibinin treatment reverses increased hepatic glycolysis by inhibiting pyruvate kinase activity in high-fructose induced insulin resistance.
- Silibinin normalizes gluconeogenesis and glycogenolysis in high fructose-fed rats by an inhibition of glucose 6-phosphate hydrolysis due to an inhibitory effect on hepatic glucose 6-phosphatase.
- The flavonoid silibinin diverts glucose-6-phosphate from gluconeogenesis and glycogenolysis to pentose phosphate pathway, leading to an improvement of oxidative stress in high-fructose fed rats.
- Silibinin administration improves mitochondrial dysfunctioning induced by a high-fructose diet, since silibinin mildly inhibits respiration without modifying the number of mitochondria.
- Silibinin improves slightly oxidative phosphorylation yield in high-fructose induced insulin resistance.
- Silibinin normalizes ROS production in high-fructose fed rats by increasing activity of respiratory chain complex I.

BIBLIOGRAFÍA

- Abenavoli L, Bardazzi G, Cracolici F, Quaranta C, Santini G, Graziosi S, Polero L, Leggio L, Addolorato G** (2008). "Complementary therapies for treating alcoholism. First Annual meeting by Complementary Medicine Research Group of the Italian Society for Alcohol Studies-May 5, 2006, Florence, Italy". *Fitoterapia* 79(2), 142-147.
- Abenavoli L, Capasso R, Milic N, Capasso F** (2010). "Milk thistle in liver diseases: past, present, future". *Phytother Res* 24(10), 1423-1432.
- ADA. The expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus** (1997). "Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of the Diabetes Mellitus". *Diabetes Care* 20(7), 1183-1197.
- ADA. The Expert Committee for the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus** (2003). "Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus". *Diabetes Care* 26(11), 3160-3167.
- ADA** (2004). "Gestational diabetes mellitus (Position Statement)". *Diabetes Care* 27(1), S88-S90.
- ADA** (2008). "Economic costs of diabetes in the U.S. in 2007". *Diabetes Care* 31(3), 596-615.
- Addabbo F, Montagnani M, Goligorsky MS** (2009). "Mitochondria and reactive oxygen species". *Hypertension* 53(6), 885-892.
- Agarwal C, Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Tecklenburg M, Sclafani RA, Agarwal R** (2003). "Silibinin upregulates the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and causes cell cycle arrest and apoptosis in human colon carcinoma HT-29 cells". *Oncogene* 22(51), 8271-8282.
- Agius L** (2008). "Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism". *Biochem J* 414(1), 1-18.
- Agoston M, Orsi F, Feher E, Hagymasi K, Orosz Z, Blazovics A, Feher J, Vereckei A** (2003). "Silymarin and vitamin E reduce amiodarone-induced lysosomal phospholipidosis in rats". *Toxicology* 190(3), 231-241.
- Aherne SA, O'Brien NM** (2002). "Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism". *Nutrition* 18(1), 75-81.
- Al-Anati L, Essid E, Reinehr R, Petzinger E** (2009). "Silibinin protects OTA-mediated TNF-alpha release from perfused rat livers and isolated rat Kupffer cells". *Mol Nutr Food Res* 53(4), 460-466.
- 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". *Diabet Med* 15(7), 539-553.
- Aleixandre A, Miguel M** (2009). "Experimental rat models to study the metabolic syndrome". *Br J Nutr* 102(9), 1246-1253.
- Allain H, Schuck S, Lebreton S, Streng-Hesse A, Braun W, Gandon JM, Brissot P** (1999). "Aminotransferase levels and silymarin in de novo tacrine-treated patients with Alzheimer's disease". *Dement Geriatr Cogn Disord* 10(3), 181-185.
- Amdur MO, Doull J, Klaassen CD** (1991). "Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons". McGraw Hill, New York.
- Amori RE, Lau J, Pittas AG** (2007). "Efficacy and safety of incretin therapy in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis". *JAMA* 298(2), 194-206.
- Anderson JW, Gowri MS, Turner J, Nichols L, Diwadkar VA, Chow CK, Oeltgen PR** (1999). "Antioxidant supplementation effects on low-density lipoprotein oxidation for individuals with type 2 diabetes mellitus". *J Am Coll Nutr* 18(5), 451-461.
- Anurag P, Anuradha CV** (2002). "Metformin improves lipid metabolism and attenuates lipid peroxidation in high fructose-fed rats". *Diabetes Obes Metab* 4(1), 36-42.
- Arana C, Cutando A, Ferrera MJ, Gomez-Moreno G, Worf CV, Bolaños MJ, Escames G, Acuña-Castroviejo D** (2006). "Parameters of oxidative stress in saliva from diabetic and parenteral drug addict patients". *J Oral Pathol Med* 35(9), 554-559.
- Arcari M, Brambilla A, Brandt A, Caponi R, Corsi G, Di Rella RM, Solinas F, Wachter WP** (1992). "A new inclusion complex of silibinin and beta-cyclodextrins: in vitro dissolution kinetics and in vivo absorption in comparison with traditional formulations". *Boll Chim Farm* 131(5), 205-209.

- Argaud D, Halimi S, Catelloni F, Leverve XM** (1991). "Inhibition of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes after chronic treatment with phenobarbital". *Biochem J* 280 (Pt 3), 663-669.
- Argaud D, Roth H, Wiernsperger N, Leverve XM** (1993). "Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes". *Eur J Biochem* 213(3), 1341-1348.
- Arion WJ, Carlson PW, Wallin BK, Lange AJ** (1972). "Modifications of hydrolytic and synthetic activities of liver microsomal glucose 6-phosphatase". *J Biol Chem* 247(8), 2551-2557.
- Arion WJ, 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(7), 2372-2379.
- Arner P** (2001). "Free fatty acids--do they play a central role in type 2 diabetes?" *Diabetes Obes Metab* 3, (Suppl 1), S11-S19.
- Azzone GF, Zoratti M, Petronilli V, Pietrobon D** (1985). "The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling". *J Inorg Biochem* 23(3-4), 349-356.
- Baer-Dubowska W, Szafer H, Krajka-Kuzniak V** (1998). "Inhibition of murine hepatic cytochrome P450 activities by natural and synthetic phenolic compounds". *Xenobiotica* 28(8), 735-743.
- Baginski ES, Epstein E, Zak B** (1975). "Review of phosphate methodologies". *Ann Clin Lab Sci* 5(5), 399-416.
- Bailey CJ, Day C** (2004). "Avandamet: combined metformin-rosiglitazone treatment for insulin resistance in type 2 diabetes". *Int J Clin Pract* 58(9), 867-876.
- Bakker SJ, IJzerman RG, Teerlink T, Westerhoff HV, Gans RO, 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(1), 17-21.
- Balkan B, Steffens AB, Bruggink JE, Strubbe JH** (1991). "Hyperinsulinemia and glucose tolerance in obese rats with lesions of the ventromedial hypothalamus: dependence on food intake and route of administration". *Metabolism* 40(10), 1092-1100.
- Barthel A, Schmoll D** (2003). "Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(4), E685-E692.
- Bartrons R, Van Schaftingen SE, Hers HG** (1984). "The ability of adenosine to decrease the concentration of fructose 2,6-bisphosphate in isolated hepatocytes. A cyclic AMP-mediated effect". *Biochem J* 218(1), 157-163.
- Barzaghi N, Crema F, Gatti G, Pifferi, G, Perucca E** (1990). "Pharmacokinetic studies on IdB 1016, a silybin- phosphatidylcholine complex, in healthy human subjects". *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 15(4), 333-338.
- Barzilai N, Rossetti L** (1993). "Role of glucokinase and glucose-6-phosphatase in the acute and chronic regulation of hepatic glucose fluxes by insulin". *J Biol Chem* 268(33), 25019-25025.
- Basciano H, Federico L, Adeli K** (2005). "Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia". *Nutr Metab (Lond)* 2(1), 5-19.
- Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A** (2009). "Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species". *Physiol Rev* 89(1), 27-71.
- Batandier C, Fontaine E, Keriell C, Leverve XM** (2002). "Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects". *J Cell Mol Med* 6(2), 175-187.
- 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.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le CD, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo CR, Sinclair DA** (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet". *Nature* 444(7117), 337-342.

- Bavarva JH, Narasimhacharya AV** (2010). "Leucas cephalotes regulates carbohydrate and lipid metabolism and improves antioxidant status in IDDM and NIDDM rats". *J Ethnopharmacol* 127(1), 98-102.
- Bays H, Mandarino L, De Fronzo 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(2), 463-478.
- Bedoya FJ, Matschinsky FM, Shimizu T, O'Neil JJ, Appel MC** (1986). "Differential regulation of glucokinase activity in pancreatic islets and liver of the rat". *J Biol Chem* 261(23), 10760-10764.
- Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M** (1999). "Chemistry, physiology and pathology of free radicals". *Life Sci.* 65(18-19), 1865-1874.
- Bergeron R, Previs SF, Cline GW, Perret P, Russell RR, Young LH, Shulman GI** (2001). "Effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside infusion on in vivo glucose and lipid metabolism in lean and obese Zucker rats". *Diabetes* 50(5), 1076-1082.
- Bergman RN, Ader M** (2000). "Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus". *Trends Endocrinol Metab* 11(9), 351-356.
- Bergmeyer HU** (1974). "Methods in Enzymatic Analysis". Academic Press, New York.
- Bernardi P, Vassanelli S, Veronese P, Colonna R, Szabo I, Zoratti M** (1992). "Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations". *J Biol Chem* 267(5), 2934-2939.
- Bernardi P, Veronese P, Petronilli V** (1993). "Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability". *J Biol Chem* 268(2), 1005-1010.
- Berry MN, Friend DS** (1969). "High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study". *J Cell Biol.* 43(3), 506-520.
- Bertelsen M, Anggard EE, Carrier MJ** (2001) "Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro". *Diabetologia* 44(5), 605-613.
- Bhatia N, Agarwal R** (2001). "Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, genistein and epigallocatechin 3-gallate on epigenetic events in human prostate carcinoma DU145 cells". *Prostate* 46(2), 98-107.
- Bialecka M** (1997). "The effect of bioflavonoids and lecithin on the course of experimental atherosclerosis in rabbits". *Ann Acad Med Stetin.* 43, 41-56.
- Bizeau ME, Thresher JS, Pagliassotti MJ** (2001). "A high-sucrose diet increases gluconeogenic capacity in isolated periportal and perivenous rat hepatocytes". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(5), E695-E702.
- Bizeau ME, Pagliassotti MJ** (2005). "Hepatic adaptations to sucrose and fructose". *Metabolism* 54(9), 1189-1201.
- Bjornholm M, Zierath JR** (2005). "Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes". *Biochem Soc Trans* 33(Pt 2), 354-357.
- Ble-Castillo JL, Carmona-Diaz E, Mendez JD, Larios-Medina FJ, Medina-Santillan R, Cleva-Villanueva G, Diaz-Zagoya JC** (2005). "Effect of alpha-tocopherol on the metabolic control and oxidative stress in female type 2 diabetics". *Biomed Pharmacother* 59(6), 290-295.
- Boden G, Lebed B, Schatz M, Homko C, Lemieux S** (2001). "Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects". *Diabetes* 50(7), 1612-1617.
- Boden G, Cheung P, Stein TP, Kresge K, Mozzoli M** (2002). "FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(1), E12-E19.
- Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR** (2005). "Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo". *Diabetes* 54(5), 1392-1399.

- Boigk G, Stroedter L, Herbst H, Waldschmidt J, Riecken EO, Schuppan D** (1997). "Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats". *Hepatology* 26(3), 643-649.
- Bolaños JP, Delgado-Esteban M, Herrero-Mendez A, Fernandez-Fernandez S, Almeida A** (2008). "Regulation of glycolysis and pentose-phosphate pathway by nitric oxide: impact on neuronal survival". *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8), 789-793.
- Bouche C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB** (2004). "The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes". *Endocr Rev* 25(5), 807-830.
- Boudina S, Sena S, Theobald H, Sheng X, Wright JJ, Hu XX, Aziz S, Johnson JI, Bugger H, Zaha VG, Abel ED** (2007). "Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins". *Diabetes* 56(10), 2457-2466.
- Boushel R, Gnaiger E, Schjerling P, Skovbro M, Kraunsoe R, Dela F** (2007). "Patients with type 2 diabetes have normal mitochondrial function in skeletal muscle". *Diabetologia* 50(4), 790-796.
- Boveris A, Chance B** (1973). "The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen". *Biochem J* 134(3), 707-716.
- Braatz R, Gurler K, Bergish G, Halbach G, Soicke H, Schmidt K** (1985). "Czech. Patent 273610". *Chem Abstract* 105, P127476b.
- Brand MD, Hafner RP, Brown GC** (1988). "Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain". *Biochem J* 255(2), 535-539.
- Bray GA** (2010). "Soft drink consumption and obesity: it is all about fructose". *Curr Opin Lipidol* 21(1), 51-57.
- Breschi MC, Martinotti E, Apostoliti F, Nieri P** (2002). "Protective effect of silymarin in antigen challenge- and histamine-induced bronchoconstriction in in vivo guinea-pigs". *Eur J Pharmacol* 437(1-2), 91-95.
- Brodsky SV, Gao S, Li H, Goligorsky MS** (2002). "Hyperglycemic switch from mitochondrial nitric oxide to superoxide production in endothelial cells". *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5), H2130-H2139.
- Brown GC** (1992). "Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells". *Biochem J* 284 (Pt 1), 1-13.
- Bugger H, Boudina S, Hu XX, Tuinei J, Zaha VG, Theobald HA, Yun UJ, McQueen AP, Wayment B, Litwin SE, Abel ED** (2008). "Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein 3". *Diabetes* 57(11), 2924-2932.
- Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G** (2005). "Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease". *Hepatology* 42(5), 987-1000.
- Buzzelli G, Moscarella S, Giusti A, Duchini A, Marena C, Lampertico M** (1993). "A pilot study on the liver protective effect of silybin-phosphatidylcholine complex (IdB1016) in chronic active hepatitis". *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 31(9), 456-460.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO** (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria". *Arch Biochem Biophys* 180(2), 248-257.
- Cahill GF** (1970). "Starvation in man". *N Engl J Med* 282(12), 668-675.
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE** (2005). "Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB". *Nat Med* 11(2), 183-190.
- Cali AM, Caprio S** (2008). "Prediabetes and type 2 diabetes in youth: an emerging epidemic disease?" *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 15(2), 123-127.
- Campos R, Garrido A, Guerra R, Valenzuela A** (1989). "Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver". *Planta Med* 55(5), 417-419.

- Capasso R, Aviello G, Capasso F, Savino F, Izzo AA, Lembo F, Borrelli F** (2009). "Silymarin BIO-C, an extract from *Silybum marianum* fruits, induces hyperprolactinemia in intact female rats". *Phytomedicine* 16(9), 839-844.
- Carmona A, Freedland RA** (1989). "Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis". *J Nutr* 119(9), 1304-1310.
- Carr AC, McCall MR, Frei B** (2000). "Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(7), 1716-1723.
- Chance B, Williams GR** (1956). "The respiratory chain and oxidative phosphorylation". *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17, 65-134.
- Chen CC, Wang HJ, Shih HC, Sheen LY, Chang CT, Chen, RH, Wang TY** (2001) "Comparison of the metabolic effects of metformin and troglitazone on fructose-induced insulin resistance in male Sprague-Dawley rats". *J Formos Med Assoc* 100(3), 176-180.
- Chiarelli F, Di Marzio D** (2008). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives". *Vasc Health Risk Manag* 4(2), 297-304.
- Chiueh CC** (1999). "Neuroprotective properties of nitric oxide". *Ann NY Acad Sci* 890, 301-311.
- Cho JY, Kim PS, Park J, Yoo ES, Baik KU, Kim YK, Park MH** (2000). "Inhibitor of tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells from *Amorpha fruticosa*". *J Ethnopharmacol.* 70(2), 127-133.
- Chrungoo VJ, Singh K, Singh J** (1997). "Silymarin mediated differential modulation of toxicity induced by carbon tetrachloride, paracetamol and D-galactosamine in freshly isolated rat hepatocytes". *Indian J Exp Biol* 35(6), 611-617.
- Civitaresse AE, Ravussin E** (2008). "Mitochondrial energetics and insulin resistance". *Endocrinology* 149(3), 950-954.
- Claus TH, El-Maghrabi MR, Pilkis SJ** (1979). "Modulation of the phosphorylation state of rat liver pyruvate kinase by allosteric effectors and insulin". *J Biol Chem* 254(16), 7855-7864.
- Clerc P, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E** (2007). "Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency". *J Bioenerg Biomembr* 39(2), 158-166.
- Clore JN, Stillman J, Sugerman H** (2000). "Glucose-6-phosphatase flux in vitro is increased in type 2 diabetes". *Diabetes* 49(6), 969-974.
- Combettes-Souverain M, Issad T** (1998). "Molecular basis of insulin action". *Diabetes Metab* 24(6), 477-489.
- Crabtree B, Newsholme EA** (1978). "Sensitivity of a near-equilibrium reaction in a metabolic pathway to changes in substrate concentration". *Eur J Biochem* 89(1), 19-22.
- Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G** (2001). "Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ". *Diabetes* 50(4), 740-746.
- Cruz T, Galvez J, Crespo E, Ocete MA, Zarzuelo A** (2001). "Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis". *Planta Med* 67(1), 94-96.
- 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, Ceriello A.** (2004). "Antioxidant therapy in diabetic complications: what is new?" *Curr Vasc Pharmacol* 2(4), 335-341.
- Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A** (2004). "The preventive anti-oxidant action of thiazolidinediones: a new therapeutic prospect in diabetes and insulin resistance". *Diabet Med* 21(11), 1249-1252.
- Dai S, McNeill JH** (1995). "Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent". *J Pharmacol Toxicol Methods* 33(2), 101-107.
- Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A** (2005). "Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics". *Mass Spectrom Rev* 24(1), 55-99.

- Daly ME, Vale C, Walker M, Alberti KG, Mathers JC** (1997). "Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications". *Am J Clin Nutr* 66(5), 1072-1085.
- Darko D, Dornhorst A, Kelly FJ, Ritter JM, Chowienczyk PJ** (2002). "Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes". *Clin Sci (Lond)* 103(4), 339-344.
- Das SK, Elbein SC** (2006). "The Genetic Basis of Type 2 Diabetes". *Cellscience* 2(4), 100-131.
- Das SK, Vasudevan DM** (2006). "Protective effects of silymarin, a milk thistle (*Silybium marianum*) derivative on ethanol-induced oxidative stress in liver". *Indian J Biochem Biophys* 43(4), 306-311.
- Davey GP, Clark JB** (1996). "Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria". *J Neurochem* 66(4), 1617-1624.
- De Lemos ET, Reis F, Baptista S, Pinto R, Sepodes B, Vala H, Rocha-Pereira P, Silva A, Teixeira F** (2007). "Exercise training is associated with improved levels of C-reactive protein and adiponectin in ZDF (type 2) diabetic rats". *Med Sci Monit* 13(8), BR168-BR174.
- Deak G, Muzes G, Lang I, Niederland V, Nekam K, Gonzalez-Cabello R, Gergely P, Feher J.** (1990). "Immunomodulator effect of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases". *Orv Hetil* 131(24), 1291-1296.
- Decoursey TE, Ligeti E** (2005). "Regulation and termination of NADPH oxidase activity". *Cell Mol Life Sci* 62(19-20), 2173-2193.
- Dehmloew C, Murawski N, de Groot GH** (1996). "Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of arachidonic acid metabolism by silibinin in human cells". *Life Sci* 58(18), 1591-1600.
- Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G, Azay J** (2005). "Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat". *Atherosclerosis* 179(1), 43-49.
- Dene BA, Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB** (2005). "Effects of antioxidant treatment on normal and diabetic rat retinal enzyme activities". *J Ocul Pharmacol Ther* 21(1), 28-35.
- 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 Sci* 82(21-22), 1070-1076.
- Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R** (2002). "Silibinin inhibits constitutive and TNFalpha-induced activation of NF-kappaB and sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to TNFalpha-induced apoptosis". *Oncogene* 21(11), 1759-1767.
- Di Pierro F, Callegari A, Carotenuto D, Tapia MM** (2008). "Clinical efficacy, safety and tolerability of BIO-C (micronized Silymarin) as a galactagogue". *Acta Biomed* 79(3), 205-210.
- Di Sario A, Bendia E, Taffetani S, Omenetti A, Candelaresi C, Marzoni M, De Minicis MS, Benedetti, A** (2005). "Hepatoprotective and antifibrotic effect of a new silybin-phosphatidylcholine - Vitamin E complex in rats". *Dig Liver Dis* 37(11), 869-876.
- Diamond J** (2003). "The double puzzle of diabetes". *Nature* 423(6940), 599-602.
- Dietzmann J, Thiel U, Ansoerge S, Neumann KH, Tager M** (2002). "Thiol-inducing and immunoregulatory effects of flavonoids in peripheral blood mononuclear cells from patients with end-stage diabetic nephropathy". *Free Radic Biol Med* 33(10), 1347-1354.
- Donath MY, Halban PA** (2004). "Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications". *Diabetologia* 47(3), 581-589.
- Donmoyer CM, Ejiofor J, Lacy DB, Chen SS, McGuinness OP** (2001). "Fructose augments infection-impaired net hepatic glucose uptake during TPN administration". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(5), E703-E711.
- Dorai T, Aggarwal BB** (2004). "Role of chemopreventive agents in cancer therapy". *Cancer Lett* 215(2), 129-140.
- Drews G, Kramer C, Dufer M, Krippeit-Drews P** (2000). "Contrasting effects of alloxan on islets and single mouse pancreatic beta-cells". *Biochem J* 352 (Pt 2), 389-397.

- Drucker DJ, Nauck MA** (2006). "The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes". *Lancet* 368(9548), 1696-1705.
- Durham HA, Truett GE** (2006). "Development of insulin resistance and hyperphagia in Zucker fatty rats". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(3), R652-R658.
- Dzubak P, Hajdich M, Gazak R, Svobodova A, Psotova J, Walterova D, Sedmera P, Kren V** (2006). "New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity". *Bioorg Med Chem* 14(11), 3793-3810.
- El-Kamary SS, Shardell MD, Abdel-Hamid M, Ismail S, El-Ateek M, Metwally M, Mikhail N, Hashem M, Mousa A, Aboul-Fotouh A, El-Kassas M, Esmat G, Strickland GT** (2009). "A randomized controlled trial to assess the safety and efficacy of silymarin on symptoms, signs and biomarkers of acute hepatitis". *Phytomedicine* 16(5), 391-400.
- El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Averet N, Rigoulet M, Leverve X** (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I". *J Biol Chem* 275(1), 223-228.
- Elliott, SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ** (2002). "Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome". *Am J Clin Nutr* 76(5), 911-922.
- Elmali E, Altan N, Bukan N** (2004). "Effect of the sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozocin-induced diabetic rats". *Drugs RD* 5(4), 203-208.
- Enjalbert F, Rapior S, Nouguiet-Soule J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C** (2002). "Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis". *J Toxicol Clin Toxicol* 40(6), 715-757.
- Erecinska M, Wilson DF** (1982). "Regulation of cellular energy metabolism". *J Membr Biol* 70(1), 1-14.
- Erel O** (2004). "A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation". *Clin Biochem* 37(4), 277-285.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM** (2002). "Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes". *Endocr Rev* 23(5), 599-622.
- Exton JH, Park CR** (1967). "Control of gluconeogenesis in liver. I. General features of gluconeogenesis in the perfused livers of rats". *J Biol Chem* 242(11), 2622-2636.
- Faeh D, Minehira K, Schwarz JM, Periasamy R, Park S, Tappy L** (2005). "Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men". *Diabetes* 54(7), 1907-1913.
- Faulstich H, Jahn W, Wieland T** (1980). "Silybin inhibition of amatoxin uptake in the perfused rat liver". *Arzneimittelforschung* 30(3), 452-454.
- Favari L, Perez-Alvarez V** (1997). "Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl₄-chronic liver damage in rats". *Arch Med Res* 28(1), 11-17.
- Federico A, Trappoliere M, Tuccillo C, De Sio I, Di Leva A, Del Vecchio C, Loguercio C** (2006). "A new silybin-vitamin E-phospholipid complex improves insulin resistance and liver damage in patients with non-alcoholic fatty liver disease: preliminary observations". *Gut* 55(6), 901-902.
- Feher J, Lang I, Nekam K, Muzes G, Deak G** (1988). "Effect of free radical scavengers on superoxide dismutase (SOD) enzyme in patients with alcoholic cirrhosis". *Acta Med Hung* 45(3-4), 265-276.
- Feher J, Deak G, Muzes G, Lang I, Niederland V, Nekam K, Karteszi M** (1989). "Liver-protective action of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases". *Orv Hetil* 130(51), 2723-2727.
- Feillet-Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, Cristol JP, Coudray C** (2009). "Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems". *Free Radic Biol Med* 46(5), 624-632.
- Fenton AW, Tang Q** (2009). "An activating interaction between the unphosphorylated n-terminus of human liver pyruvate kinase and the main body of the protein is interrupted by phosphorylation". *Biochemistry* 48(18), 3816-3818.
- Ferrannini E, Groop LC** (1989). "Hepatic glucose production in insulin-resistant states". *Diabetes Metab Rev* 5(8), 711-726.

- Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K** (1998). "Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease". *Am J Gastroenterol* 93(2), 139-143.
- Fontaine EM, Devin A, Rigoulet M, Leverve XM** (1997). "The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux". *Biochem Biophys Res Commun* 232(2), 532-535.
- Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME** (2008). "Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes". *Diabetes* 57(6), 1446-1454.
- Forsyth RJ, Bartlett K, Burchell A, Scott HM, Eyre JA** (1993). "Astrocytic glucose-6-phosphatase and the permeability of brain microsomes to glucose 6-phosphate". *Biochem J* 294 (Pt 1), 145-151.
- Foster JD, Nordlie RC** (2002). "The biochemistry and molecular biology of the glucose-6-phosphatase system". *Exp Biol Med (Maywood)* 227(8), 601-608.
- Foufelle F, Girard J, Ferre P** (1996). "Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms". *Adv Enzyme Regul* 36, 199-226.
- Foufelle F, Ferre P** (2002). "New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c". *Biochem J* 366(Pt 2), 377-391.
- Francini F, Castro MC, Schinella G, Garcia ME, Maiztegui B, Raschia MA, Gagliardino JJ, Massa ML** (2010). "Changes induced by a fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system". *Life Sci* 86(25-26), 965-971.
- Fuhlendorff J, Rorsman P, Kofod H, Brand CL, Rolin B, MacKay P, Shymko R, Carr RD** (1998). "Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes". *Diabetes* 47(3), 345-351.
- Gamberucci A, Marcolongo P, Fulceri R, Giunti R, Watkins SL, Waddell ID, Burchell A, Benedetti A** (1996). "Low levels of glucose-6-phosphate hydrolysis in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle: involvement of glucose-6-phosphatase". *Mol Membr Biol* 13(2), 103-108.
- Gao L, Mann GE** (2009). "Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signaling". *Cardiovasc Res* 82(1), 9-20.
- Gardner LB, Liu Z, Barrett EJ** (1993). "The role of glucose-6-phosphatase in the action of insulin on hepatic glucose production in the rat". *Diabetes* 42(11), 1614-1620.
- Gartner L, Hiatt J** (2003). "Histología. Texto y Atlas". McGraw-Hill Interamericana, 1ª Edición.
- Gastaldelli A, Natali A, Vettor R, Corradini SG** (2010). "Insulin resistance, adipose depots and gut: interactions and pathological implications". *Dig Liver Dis* 42(5), 310-319.
- Gatti G, Perucca E** (1994). "Plasma concentrations of free and conjugated silybin after oral intake of a silybin-phosphatidylcholine complex (silipide) in healthy volunteers". *Int J Clin Pharmacol Ther* 32(11), 614-617.
- Gazak R, Svobodova A, Psotova J, Sedmera P, Prikrylova V, Walterova D, Kren V** (2004). "Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity". *Bioorg Med Chem* 12(21), 5677-5687.
- Gebhardt R** (2002). "Oxidative stress, plant-derived antioxidants and liver fibrosis". *Planta Med* 68(4), 289-296.
- Geier J, Fuchs TH, Wahl R** (1990). "Anaphylactic shock due to an extract of *Silybum marianum* in a patient with immediate-type allergy to kiwi fruit". *Allergologie* 13, 387-388.
- Gerich JE** (2001). "Matching treatment to pathophysiology in type 2 diabetes". *Clin Ther* 23(5), 646-659.
- Gerschmann R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO** (1954). "Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common". *Science* 119(3097), 623-626.
- Gezginci-Oktayoglu S, Basaraner H, Yanardag R, Bolkent S** (2009). "The effects of combined treatment of antioxidants on the liver injury in STZ diabetic rats". *Dig Dis Sci* 54(3), 538-546.
- Ghfourifar P, Cadenas E** (2005). "Mitochondrial nitric oxide synthase". *Trends Pharmacol Sci* 26(4), 190-195.

- Giacomelli S, Gallo D, Apollonio P, Ferlini C, Distefano M, Morazzoni P, Riva A, Bombardelli E, Mancuso S, Scambia G** (2002) "Silybin and its bioavailable phospholipid complex (IdB 1016) potentiate in vitro and in vivo the activity of cisplatin". *Life Sci* 70(12), 1447-1459.
- Gornall AG, Bardawill CJ** (1948). "A study of liver function in dogs". *Rev Can Biol* 7(1), 183.
- Grant CM** (2008). "Metabolic reconfiguration is a regulated response to oxidative stress". *J Biol* 7(1), 1.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M** (2000). "Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling". *Regul Pept* 91(1-3), 21-27.
- Groen AK, Sips HJ, Vervoorn RC, Tager JM** (1982). "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, Tager JM** (1982). "Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration". *J Biol Chem* 257(6), 2754-2757.
- Groen AK, Vervoorn RC, Van Der Meer R, 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(23), 14346-14353.
- Groen AK, van Roermund CW, Vervoorn RC, 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(2), 379-389.
- Groen BH, Berden JA, van Dam K** (1990). "Differentiation between leaks and slips in oxidative phosphorylation". *Biochim Biophys Acta* 1019(2), 121-127.
- Guigas B, Detaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, Leverve X** (2004). "Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study". *Biochem J* 382(Pt 3), 877-884.
- Guigas B, Naboulsi R, Villanueva GR, Taleux N, Lopez-Novoa JM, Leverve XM, 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(6), 925-934.
- Guyton A, Hall J** (2006). "Tratado de Fisiología Médica". Mc Graw-Hill Interamericana, 11ª Edición.
- Haddad Y, Vallerand D, Brault A, Haddad PS** (2009). "Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis". *Evid Based Complement Alternat Med*.
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1999). "Free radicals in biology and medicine". Oxford University Press, 3rd edition.
- Hanefeld M, Schaper F** (2008). "Acarbose: oral anti-diabetes drug with additional cardiovascular benefits". *Expert Rev Cardiovasc Ther* 6(2), 153-163.
- Haque M, Sanyal AJ** (2002). "The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease". *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16(5), 709-731.
- Harborne JB, Williams CA** (2000). "Advances in flavonoid research since 1992". *Phytochemistry* 55(6), 481-504.
- Harrower AD** (1994). "Comparison of efficacy, secondary failure rate, and complications of sulfonylureas". *J Diabetes Complications* 8(4), 201-203.
- Havsteen BH** (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids". *Pharmacol Ther* 96(2-3), 67-202.
- Haworth RA, Hunter DR** (1979). "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site". *Arch Biochem Biophys* 195(2), 460-467.
- He Y, MacLeod KM** (2002). "Modulation of noradrenaline-induced vasoconstriction in isolated perfused mesenteric arterial beds from obese Zucker rats in the presence and absence of insulin". *Can J Physiol Pharmacol* 80(3), 171-179.
- Hederstedt L** (2003). "Structural biology. Complex II is complex too". *Science* 299(5607), 671-672.
- Hellerstein MK, Schwarz JM, Neese RA** (1996). "Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans". *Annu Rev Nutr* 16, 523-557.

- Hellerstein MK, Neese RA, Letscher A, Linfoot P, Turner S** (1997). "Hepatic glucose-6-phosphatase flux and glucose phosphorylation, cycling, irreversible disposal, and net balance in vivo in rats. Measurement using the secreted glucuronate technique". *Metabolism* 46(12), 1390-1398.
- Henkel E, Menschikowski M, Koehler C, Leonhardt W, Hanefeld M** (2005). "Impact of glucagon response on postprandial hyperglycemia in men with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus". *Metabolism* 54(9), 1168-1173.
- Henly DC, Chauvet MC, Phillips JW** (1999). "Hepatic glucose cycling does not contribute to the development of hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats". *Diabetes* 48(2), 342-346.
- Herlein JA, Fink BD, O'Malley Y, Sivitz WI** (2009). "Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats". *Endocrinology* 150(1), 46-55.
- Hers HG, Hue L** (1983). "Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis". *Annu Rev Biochem* 52, 617-653.
- Hinkle PC, Kumar MA, Resetar A, Harris DL** (1991). "Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation". *Biochemistry* 30(14), 3576-3582.
- Hirst J, King MS, Pryde KR** (2008). "The production of reactive oxygen species by complex I". *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5), 976-980.
- Hissin PJ, Hilf R** (1976). "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues". *Anal Biochem* 74(1), 214-226.
- Holman R** (2007). "Metformin as first choice in oral diabetes treatment: the UKPDS experience". *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 13-20.
- Hong S, 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.
- Hothersall JS, Baquer N, Greenbaum AL, McLean P** (1979). "Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain during development and the effect of phenazine methosulfate on the integration of metabolic routes". *Arch Biochem Biophys* 198(2), 478-492.
- Hsieh SH, Shih KC, Chou CW, Chu CH** (2010). "Evaluation of the efficacy and tolerability of miglitol in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus inadequately controlled by diet and sulfonylureas". *Acta Diabetol* 48(1), 71-77.
- 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, Sobrino F, 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), 779-786.
- Hue L** (2001). "Regulation of gluconeogenesis in liver". *Handbook of Physiology*. Oxford University Press. Volume II: The endocrine pancreas and regulation of metabolism: 649-657.
- Hugués-Hernandorena B, Rodríguez-García JC, Rodríguez-González JC y Marrero-Rodríguez M** (2002). "Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2". *Rev Cubana Endocrinol* 13(2), 160-168.
- Huseini HF, Larijani B, Heshmat R, Fakhrzadeh H, Radjabipour B, Toliat T, Raza M** (2006). "The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial". *Phytother Res* 20(12), 1036-1039.
- Hussain SA** (2007). "Silymarin as an adjunct to glibenclamide therapy improves long-term and postprandial glycemic control and body mass index in type 2 diabetes". *J Med Food* 10(3), 543-547.
- Hutton JC, O'Brien RM** (2009). "Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family". *J Biol Chem* 284(43), 29241-29245.
- Ichai C, Guignot L, El-Mir MY, Nogueira V, Guigas B, Chauvin C, Fontaine E, Mithieux G, Leverve XM** (2001). "Glucose 6-phosphate hydrolysis is activated by glucagon in a low temperature-sensitive manner". *J Biol Chem* 276(30), 28126-28133.

- 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), 6398-6403.
- 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.
- Islam MS, Loots du T.** (2009). "Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review". *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 31(4), 249-261.
- Israili ZH** (2009). "Advances in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus". *Am J Ther* 18(2), 117-152.
- Iyenedjian PB** (2009). "Molecular physiology of mammalian glucokinase". *Cell Mol Life Sci* 66(1), 27-42.
- Jacobs BP, Dennehy C, Ramirez G, Sapp J y Lawrence VA** (2002). "Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis". *Am J Med* 113(6), 506-515.
- Jeong DH, Lee GP, Jeong WI, Do SH, Yang HJ, Yuan DW, Park HY, Kim KJ, Jeong, KS** (2005). "Alterations of mast cells and TGF-beta1 on the silymarin treatment for CCl(4)-induced hepatic fibrosis". *World J Gastroenterol* 11(8), 1141-1148.
- Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D** (2001). "Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1". *J Hepatol* 35(3), 392-398.
- Jiang G, Zhang BB** (2003). "Glucagon and regulation of glucose metabolism". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(4), E671-E678.
- Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV** (2008). "Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase". *Biochem J* 413(3), 369-387.
- Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Choi MS** (2004). "The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice". *J Nutr* 134(10), 2499-2503.
- Jungermann K, Kietzmann T** (1996). "Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver". *Annu Rev Nutr* 16, 179-203.
- Jurgens H, Haass W, Castaneda TR, Schurmann A, Koebnick C, Dombrowski F, Otto B, Nawrocki AR, Scherer PE, Spranger J, Ristow M, Joost HG, Havel PJ, Tschop MH** (2005). "Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice". *Obes Res* 13(7), 1146-1156.
- Kadenbach B, Napiwotzki J, Frank V, Arnold S, Exner S, Huttemann M** (1998). "Regulation of energy transduction and electron transfer in cytochrome c oxidase by adenine nucleotides". *J Bioenerg Biomembr* 30(1), 25-33.
- Kadenbach B, Arnold S** (1999). "A second mechanism of respiratory control". *FEBS Lett* 447(2-3), 131-134.
- Kahn SE, Andrikopoulos S, Verchere CB** (1999). "Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes". *Diabetes* 48(2), 241-253.
- 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.
- Kamuren ZT, Sanders R, Watkins JB** (2006). "Low-carbohydrate diet and oxidative stress in diabetic and nondiabetic rats". *J Biochem Mol Toxicol* 20(5), 259-269.
- Kang JS, Jeon YJ, Kim HM, Han SH, Yang KH** (2002). "Inhibition of inducible nitric-oxide synthase expression by silymarin in lipopolysaccharide-stimulated macrophages". *J Pharmacol Exp Ther* 302(1), 138-144.
- Kang JS, Jeon YJ, Park SK, Yang KH, Kim HM** (2004). "Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1beta and prostaglandin E2 synthesis by silymarin". *Biochem Pharmacol* 67(1), 175-181.
- Kannappan S, Jayaraman T, Rajasekar P, Ravichandran MK, Anuradha CV** (2006) "Cinnamon bark extract improves glucose metabolism and lipid profile in the fructose-fed rat". *Singapore Med J* 47(10), 858-863.

- Kannappan S, Anuradha CV** (2009). "Insulin sensitizing actions of fenugreek seed polyphenols, quercetin & metformin in a rat model". *Indian J Med Res* 129(4), 401-408.
- Karimi G, Ramezani M, Tahoonian Z** (2005). "Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats". *Evid Based Complement Alternat Med* 2(3), 383-386.
- Katz J, McGarry JD** (1984). "The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?" *J Clin Invest* 74(6), 1901-1909.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB** (2002). "Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes". *Diabetes* 51(10), 2944-2950.
- Kelley GL, Allan G, Azhar S** (2004). "High dietary fructose induces a hepatic stress response resulting in cholesterol and lipid dysregulation". *Endocrinology* 145(2), 548-555.
- Khan A, Hong-Lie C, Landau BR** (1995). "Glucose-6-phosphatase activity in islets from ob/ob and lean mice and the effect of dexamethasone". *Endocrinology* 136(5), 1934-1938.
- Khayyal MT, el-Ghazaly MA, Kenawy SA, Seif-el-Nasr M, Mahran LG, Kafafi YA, Okpanyi SN** (2001). "Antiulcerogenic effect of some gastrointestinally acting plant extracts and their combination". *Arzneimittelforschung* 51(7), 545-553.
- Kim DH, Jin YH, Park JB, Kobashi K** (1994). "Silymarin and its components are inhibitors of beta-glucuronidase". *Biol Pharm Bull* 17(3), 443-445.
- Kim HY, Okubo T, Juneja LR, Yokozawa T** (2010). "The protective role of amla (*Emblica officinalis* Gaertn.) against fructose-induced metabolic syndrome in a rat model". *Br J Nutr* 103(4), 502-512.
- Kittur S, Wilasrusmee S, Pedersen WA, Mattson MP, Straube-West K, Wilasrusmee C, Lubelt B, Kittur DS** (2002). "Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on neurons in culture". *J Mol Neurosci* 18(3), 265-269.
- Klatt P, Lamas S** (2000) "Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress". *Eur J Biochem* 267(16), 4928-4944.
- Klingenberg M, Slenczka W** (1959). "Pyridine nucleotide in liver mitochondria. An analysis of their redox relationships". *Biochem Z* 331, 486-517.
- Koceir EA, Dahmani Y, Leverve X** (2003). "Low rate of glucose 6-phosphate hydrolysis in liver cells is a physiological feature of non-diabetic wild sand rats (*Psammomys obesus*)". *Diabetes Metab* 29(4 Pt 1), 363-374.
- Koo HY, Wallig MA, Chung BH, Nara TY, Cho BH, Nakamura MT** (2008). "Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver". *Biochim Biophys Acta* 1782(5), 341-348.
- Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT** (2009). "Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus". *Biochem Biophys Res Commun* 390(2), 285-289.
- Kosina P, Kren V, Gebhardt R, Grambal F, Ulrichova J, Walterova D** (2002). "Antioxidant properties of silybin glycosides". *Phytother Res* 16 (Suppl 1), S33-S39.
- Kosina P, Maurel P, Ulrichova J, Dvorak Z** (2005). "Effect of silybin and its glycosides on the expression of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in primary cultures of human hepatocytes". *J Biochem Mol Toxicol* 19(3), 149-153.
- Kren V, Walterova D** (2005). "Silybin and silymarin--new effects and applications". *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149(1), 29-41.
- Kropacova K, Misurova E, Hakova H** (1998). "Protective and therapeutic effect of silymarin on the development of latent liver damage". *Radiats Biol Radioecol* 38(3), 411-415.
- Ktorza A, Bernard C, Parent V, Penicaud L, Froguel P, Lathrop M, Gauguier D** (1997). "Are animal models of diabetes relevant to the study of the genetics of non-insulin-dependent diabetes in humans?" *Diabetes Metab* 23 (Suppl 2), 38-46.
- Kurland IJ, Pilkis SJ** (1995). "Covalent control of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: insights into autoregulation of a bifunctional enzyme". *Protein Sci* 4(6), 1023-1037.

- 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), 629-638.
- Ladas EJ, Kelly KM** (2003). "Milk thistle: is there a role for its use as an adjunct therapy in patients with cancer?" *J Altern Complement Med* 9(3), 411-416.
- Lambert K, Py G, Robert E, Mercier J** (2003). "Does high-sucrose diet alter skeletal muscle and liver mitochondrial respiration?" *Horm Metab Res* 35(9), 546-550.
- Lancaster CR** (2002). "Succinate:quinone oxidoreductases: an overview". *Biochim Biophys Acta* 1553(1-2), 1-6.
- Lang I, Nekam K, Deak G, Muzes G, Gonzales-Cabello R, Gergely P, Csomos G, Feher J** (1990). "Immunomodulatory and hepatoprotective effects of in vivo treatment with free radical scavengers". *Ital J Gastroenterol* 22(5), 283-287.
- Lardy H, Hughes PE** (1984). "Regulation of gluconeogenesis at phosphoenolpyruvate carboxykinase". *Curr Top Cell Regul* 24, 171-179.
- Larrabee MG** (1990). "Evaluation of the pentose phosphate pathway from $^{14}\text{CO}_2$ data. Fallibility of a classic equation when applied to non-homogeneous tissues". *Biochem J* 272(1), 127-132.
- Le KA y Tappy L** (2006). "Metabolic effects of fructose". *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(4), 469-475.
- Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC** (1992). "Beta-cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion". *Diabetes Care* 15(3), 442-455.
- Lebovitz HE** (1999). "Type 2 diabetes: an overview". *Clin Chem* 45(8 Pt 2), 1339-1345.
- Lebovitz HE** (2001). "Diagnosis, classification, and pathogenesis of diabetes mellitus". *J Clin Psychiatry* 62 (Suppl 27), 5-9.
- Lebovitz HE, Melander A** (2004). "Sulfonylureas: basic aspects and clinical use". John Wiley and sons Ltd, 3rd edition.
- Lebovitz HE** (2009). "Insulin secretagogues: sulfonylureas, repaglinide and nateglinide". American Diabetes Association, 5th Edition.
- 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), 345-350.
- Lee YH, White MF** (2004). "Insulin receptor substrate proteins and diabetes". *Arch Pharm Res* 27(4), 361-370.
- Lenaers E, De Feyter HM, Hoeks J, Schrauwen P, Schaart G, Nabben M, Nicolay K, Prompers JJ, Hesselink MK** (2010). "Adaptations in mitochondrial function parallel, but fail to rescue, the transition to severe hyperglycemia and hyperinsulinemia: a study in Zucker diabetic fatty rats". *Obesity (Silver Spring)* 18(6), 1100-1107.
- Leonard BL, Watson RN, Loomes KM, Phillips AR, Cooper GJ** (2005). "Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes". *Acta Diabetol* 42(4), 162-170.
- Leverve XM, Groen AK, Verhoeven AJ, Tager JM** (1985). "Kinetic analysis of short-term effects of alpha-agonists on gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes". *FEBS Lett* 181(1), 43-46.
- Leverve XM, Verhoeven AJ, Groen AK, Meijer AJ, Tager JM** (1986). "The malate/aspartate shuttle and pyruvate kinase as targets involved in the stimulation of gluconeogenesis by phenylephrine". *Eur J Biochem* 155(3), 551-556.
- Leverve XM, Caro LH, Plomp PJ, Meijer AJ** (1987). "Control of proteolysis in perfused rat hepatocytes". *FEBS Lett* 219(2), 455-458.
- Leverve XM, Fontaine E, Putod-Paramelle F, 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(3), 967-974.

- Leverve XM** (2003). "Hyperglycemia and oxidative stress: complex relationships with attractive prospects". *Intensive Care Med* 29(4), 511-514.
- Li L, Zeng J, Gao Y, He D** (2010). "Targeting silibinin in the antiproliferative pathway". *Expert Opin Investig Drugs* 19(2), 243-255.
- Lin Y, Sun Z** (2010). "Current views on type 2 diabetes". *J Endocrinol* 204(1), 1-11.
- Lindstrom TH, Arnqvist HJ, von Schenck HH** (1992). "Effect of conventional and intensified insulin therapy on free-insulin profiles and glycemic control in NIDDM". *Diabetes Care* 15(1), 27-34.
- Lirussi F, Beccarello A, Zanette G, De Monte A, Donadon V, Velussi M, Crepaldi G** (2002). "Silybin-beta-cyclodextrin in the treatment of patients with diabetes mellitus and alcoholic liver disease. Efficacy study of a new preparation of an anti-oxidant agent". *Diabetes Nutr Metab* 15(4), 222-231.
- Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Chang CJ** (2011). "Angelica acutiloba root attenuates insulin resistance induced by high-fructose diet in rats". *Phytother Res*.
- Liu Y, Fiskum G, Schubert D** (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain". *J Neurochem* 80(5), 780-787.
- Llorente P, Marco R, Sols A** (1970). "Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads". *Eur J Biochem* 13(1), 45-54.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ** (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J Biol Chem* 193(1), 265-275.
- Luper S** (1998). "A review of plants used in the treatment of liver disease: part 1". *Altern Med Rev* 3(6), 410-421.
- Maggini S, Stoecklin-Tschan FB, Morikofer-Zwez S, Walter P** (1993). "A physiological role of Mn²⁺ in the regulation of cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase from rat liver is unlikely". *Biochem J* 292 (Pt 2), 365-370.
- Maghrani M, Zeggwagh NA, Lemhadri A, El Amraoui M, Michel JB, Eddouks M** (2004). "Study of the hypoglycaemic activity of Fraxinus excelsior and Silybum marianum in an animal model of type 1 diabetes mellitus". *J Ethnopharmacol* 91(2-3), 309-316.
- Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI** (1992). "Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ¹³C nuclear magnetic resonance study". *J Clin Invest* 90(4), 1323-1327.
- Mahadev K, Zilbering A, Zhu L, 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(24), 21938-21942.
- Mahmoud MS, Wang P, Chaudry IH** (1997). "Administration of ATP-MgCl₂ following hemorrhage and resuscitation increases hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and decreases pyruvate kinase activities". *Biochim Biophys Acta* 1336(3), 549-556.
- Maitrejean M, Comte G, Barron D, El-Kirat K, Conseil G, Di Pietro A** (2000). "The flavanolignan silybin and its hemisynthetic derivatives, a novel series of potential modulators of P-glycoprotein". *Bioorg Med Chem Lett* 10(2), 157-160.
- Mallikarjuna G, Dhanalakshmi S, Singh RP, Agarwal C, Agarwal R** (2004). "Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling". *Cancer Res* 64(17), 6349-6356.
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB** (1999). "Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis". *J Immunol* 163(12), 6800-6809.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB** (2003). "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review". *J Biochem Mol Toxicol* 17(1), 24-38.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari 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), 577-586.

- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC** (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man". *Diabetologia* 28(7), 412-419.
- Mayes PA** (1993). "Intermediary metabolism of fructose". *Am J Clin Nutr* 58(Suppl 5), 754S-765S.
- McCarty MF** (2005). "Potential utility of natural polyphenols for reversing fat-induced insulin resistance". *Med Hypotheses* 64(3), 628-635.
- McGarry JD** (2002). "Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes". *Diabetes* 51(1), 7-18.
- McGuinness OP, Cherrington AD** (2003). "Effects of fructose on hepatic glucose metabolism". *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6(4), 441-448.
- Medina J, Moreno-Otero R** (2005). "Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease". *Drugs* 65(17), 2445-2461.
- Miguez MP, Anundi I, Sainz-Pardo LA, Lindros KO** (1994). "Comparative study of the hepatoprotective effect of silymarin and silybin on isolated rat hepatocytes". *Toxicol In Vitro* 8(4), 581-583.
- Minassian C, Daniele N, Bordet JC, Zitoun C, Mithieux G** (1995). "Liver glucose-6 phosphatase activity is inhibited by refeeding in rats". *J Nutr* 125(11), 2727-2732.
- Minehira K, Bettschart V, Vidal H, Vega N, Di Vetta V, Rey V, Schneiter P, Tappy L** (2003). "Effect of carbohydrate overfeeding on whole body and adipose tissue metabolism in humans". *Obes Res* 11(9), 1096-1103.
- Mitchell P** (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism". *Nature* 191, 144-148.
- Mithieux G, Vega FV, Riou JP** (1990). "The liver glucose-6-phosphatase of intact microsomes is inhibited and displays sigmoid kinetics in the presence of alpha-ketoglutarate-magnesium and oxaloacetate-magnesium chelates". *J Biol Chem* 265(33), 20364-20368.
- Mithieux G, Bordeto JC, Minassian C, Ajzannay A, Mercier I, Riou JP** (1993). "Characteristics and specificity of the inhibition of liver glucose-6-phosphatase by arachidonic acid. Lesser inhibibility of the enzyme of diabetic rats". *Eur J Biochem* 213(1), 461-466.
- Mithieux G, Zitoun C** (1996). "Mechanisms by which fatty-acyl-CoA esters inhibit or activate glucose-6-phosphatase in intact and detergent-treated rat liver microsomes". *Eur J Biochem* 235(3), 799-803.
- Mithieux G, Daniele N, Payrastré B, Zitoun C** (1998). "Liver microsomal glucose-6-phosphatase is competitively inhibited by the lipid products of phosphatidylinositol 3-kinase". *J Biol Chem* 273(1), 17-19.
- Mithieux G, Guignot L, Bordet JC, Wiernsperger N** (2002). "Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet". *Diabetes* 51(1), 139-143.
- Moore MC, Davis SN, Mann SL, Cherrington AD** (2001). "Acute fructose administration improves oral glucose tolerance in adults with type 2 diabetes". *Diabetes Care* 24(11), 1882-1887.
- Morazzoni P, Magistretti MJ, Giachetti C, Zanolo G** (1992). "Comparative bioavailability of Silipide, a new flavanolignan complex, in rats". *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 17(1), 39-44.
- Morazzoni P, Bombardelli F** (1995). "Silybum marianum (Carduus Marianus)". *Fitoterapia* 66, 3-42.
- Munter K, Mayer D, Faulstich H** (1986). "Characterization of a transporting system in rat hepatocytes. Studies with competitive and non-competitive inhibitors of phalloidin transport". *Biochim Biophys Acta* 860(1), 91-98.
- Muñoz MC, Barbera A, Dominguez J, Fernandez-Alvarez J, Gomis R, Guinovart JJ** (2001). "Effects of tungstate, a new potential oral antidiabetic agent, in Zucker diabetic fatty rats". *Diabetes* 50(1), 131-138.
- Muriel P, Mourelle M** (1990). "Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl₄ liver damage". *J Appl Toxicol* 10(4), 275-279.

- Muriel P, Moreno MG, Hernandez MC, Chavez E, Alcantara LK** (2005). "Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicinic acid". *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96(5), 375-380.
- Murphy MP** (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species?". *Biochem J* 417(1), 1-13.
- Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ** (2006). "A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome". *Am J Physiol Renal Physiol* 290(3), F625-F631.
- Nandhini AT, Anuradha CV** (2002). "Taurine modulates kallikrein activity and glucose metabolism in insulin resistant rats". *Amino Acids* 22(1), 27-38.
- Nencini C, Giorgi G, Micheli L** (2007). "Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain". *Phytomedicine* 14(2-3), 129-135.
- Newgard CB, Moore SV, Foster DW, McGarry JD** (1984). "Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway". *J Biol Chem* 259(11), 6958-6963.
- Newgard CB, Foster DW, McGarry JD** (1984). "Evidence for suppression of hepatic glucose 6-phosphatase with carbohydrate feeding". *Diabetes* 33(2), 192-195.
- Newsholme EA, Leech A** (1983). "Biochemistry for medical sciences". Chichester, New York, Brisbane, Toronto and Singapore, John Wiley & Sons.
- Nguyen H, Zhang S, Morris ME** (2003). "Effect of flavonoids on MRP1-mediated transport in Panc-1 cells". *J Pharm Sci* 92(2), 250-257.
- Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P** (1993). "Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation". *Biochemistry* 32(16), 4461-4465.
- Nielsen LL** (2005). "Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors for the treatment of type 2 diabetes". *Drug Discov Today* 10(10), 703-710.
- Noguchi T, Tanaka T** (1995). "Insulin resistance in obesity and its molecular control". *Obes Res* 3 (Suppl 2), 195S-198S.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB** (2004). "Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology". *Chem Rev* 104(12), 6255-6285.
- 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, Lange AJ** (1999). "Regulation of glucose production by the liver". *Annu Rev Nutr* 19, 379-406.
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG** (1993). "Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production". *J Clin Invest* 91(6), 2546-2551.
- 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-R32.
- Otto M, Jacobasch G, 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), 201-206.
- Owen MR, Doran E, 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), 607-614.
- Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA** (1996). "Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats". *Am J Physiol* 271 (5 Pt 2), R1319-R1326.
- Pares A, Planas R, Torres M, Caballeria J, Viver JM, Acero D, Panes J, Rigau J, Santos J, Rodes J** (1998). "Effects of silymarin in alcoholic patients with cirrhosis of the liver: results of a controlled, double-blind, randomized and multicenter trial". *J Hepatol* 28(4), 615-621.

- Penckofer S, Schwertz D, Florczak K** (2002). "Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and pro-oxidants". *J Cardiovasc Nurs* 16(2), 68-85.
- Pepping J** (1999). "Milk thistle: *Silybum marianum*". *Am J Health Syst Pharm* 56(12), 1195-1197.
- Perez-Matute P, Zulet MA, Martinez JA** (2009). "Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health". *Curr Opin Pharmacol* 9(6), 771-779.
- Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W, Bonner-Weir S, Polonsky KS** (1998). "Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat". *Diabetes* 47(3), 358-364.
- Pickavance LC, Brand CL, Wassermann K, Wilding JP** (2005). "The dual PPARalpha/gamma agonist, ragaglitazar, improves insulin sensitivity and metabolic profile equally with pioglitazone in diabetic and dietary obese ZDF rats". *Br J Pharmacol* 144(3), 308-316.
- Pietrangelo A, Montosi G, Garuti C, Contri M, Giovannini F, Ceccarelli D, Masini A** (2002). "Iron-induced oxidant stress in nonparenchymal liver cells: mitochondrial derangement and fibrosis in acutely iron-dosed gerbils and its prevention by silybin". *J Bioenerg Biomembr* 34(1), 67-79.
- Pilkis SJ, El-Maghrabi MR, Claus TH** (1988). "Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis". *Annu Rev Biochem* 57, 755-783.
- Pilkis SJ, Granner DK** (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis". *Annu Rev Physiol* 54, 885-909.
- Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC** (2005). "Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives". *Physiology (Bethesda)* 20, 152-161.
- Ponczek MB, Wachowicz B** (2005). "Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins". *Postepy Biochem* 51(2), 140-145.
- Porte D, Kahn SE** (1995). "The key role of islet dysfunction in type II diabetes mellitus". *Clin Invest Med* 18(4), 247-254.
- Pradhan SC, Girish C** (2006). "Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine". *Indian J Med Res* 124(5), 491-504.
- Psotova J, Chlopcikova S, Grambal F, Simanek V, Ulrichova J** (2002). "Influence of silymarin and its flavonolignans on doxorubicin-iron induced lipid peroxidation in rat heart microsomes and mitochondria in comparison with quercetin". *Phytother Res* 16 (Suppl 1), S63-S67.
- Racker E** (1961). "Mechanisms of synthesis of adenosine triphosphate". *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 23, 323-399.
- Radziuk J, Pye S** (2001). "Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis". *Diabetes Metab Res Rev* 17(4), 250-272.
- Rahman K** (2007). "Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors". *Clin Interv Aging* 2(2), 219-236.
- Rajasekar P, Anuradha CV** (2007). "Fructose-induced hepatic gluconeogenesis: effect of L-carnitine". *Life Sci* 80(13), 1176-1183.
- Ramasamy K, Agarwal R** (2008). "Multitargeted therapy of cancer by silymarin". *Cancer Lett* 269(2), 352-362.
- Rambaldi A, Jacobs BP, Iaquinto G, Glud C** (2005). "Milk thistle for alcoholic and/or hepatitis B or C liver diseases--a systematic cochrane hepato-biliary group review with meta-analyses of randomized clinical trials". *Am J Gastroenterol* 100(11), 2583-2591.
- Reaven GM, Ho H, Hoffman BB** (1990). "Effects of a fructose-enriched diet on plasma insulin and triglyceride concentration in SHR and WKY rats". *Horm Metab Res* 22(7), 363-365.
- Rebrin K, Steil GM, Getty L, Bergman RN** (1995). "Free fatty acid as a link in the regulation of hepatic glucose output by peripheral insulin". *Diabetes* 44(9), 1038-1045.
- Rector RS, Warner SO, Liu Y, Hinton PS, Sun GY, Cox RH, Stump CS, Laughlin MH, Dellsperger KC, Thomas TR** (2007). "Exercise and diet induced weight loss improves measures of oxidative stress

and insulin sensitivity in adults with characteristics of the metabolic syndrome". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2), E500-E506.

Reed MJ, Ho H, Donnelly R, Reaven GM (1994). "Salt-sensitive and carbohydrate-sensitive rodent hypertension: evidence of strain differences". *Blood Press* 3(3), 197-201.

Renger G, Hanssum B (2009). "Oxygen detection in biological systems". *Photosynth Res* 102 (2-3): 487-498.

Rhodes CJ (2005). "Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death?" *Science* 307(5708), 380-384.

Richman A, James PW (2000). "Herb sales hit records levels. Sixth Annual herb products sales survey". *Whole Foods* 23(11), 52-59.

Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L (2004). "6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis". *Biochem J* 381(Pt 3), 561-579.

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, Meijer AJ (1987). "Stimulation by glucose of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from starved rats". *Biochem J* 245(3), 661-668.

Rigoulet M, Ouhabi R, Leverve X, Putod-Paramelle F, Guerin B (1989). "Almitrine, a new kind of energy-transduction inhibitor acting on mitochondrial ATP synthase". *Biochim Biophys Acta* 975(3), 325-329.

Riou JP, Claus TH, Pilkis SJ (1978). "Stimulation of glucagon of in vivo phosphorylation of rat hepatic pyruvate kinase". *J Biol Chem* 253(3), 656-659.

Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M (2008). "Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats". *Obesity (Silver Spring)* 16(9), 2081-2087.

Rivera L, Moron R, Zarzuelo A, Galisteo M (2009) "Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats". *Biochem Pharmacol* 77(6), 1053-1063.

Robbins BL, Foster JD, Nordlie RC (1991). "Metabolic intermediates as potential regulators of glucose-6-phosphatase". *Life Sci* 48(11), 1075-1081.

Roberts CK, Sindhu KK (2009). "Oxidative stress and metabolic syndrome". *Life Sci* 84(21-22), 705-712.

Robertson RP, Harmon JS (2006). "Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell". *Free Radic Biol Med* 41(2), 177-184.

Romestaing C, Piquet MA, Letexier D, Rey B, Mourier A, Servais S, Belouze M, Rouleau V, Dautresme M, Ollivier I, Favier R, Rigoulet M, Duchamp C, Sibille B (2008). "Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(1), E110-E119.

Ross SM (2008). "Milk thistle (*Silybum marianum*): an ancient botanical medicine for modern times". *Holist Nurs Pract* 22(5), 299-300.

Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N (1998). "Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes". *Diabetes* 47(10), 1562-1569.

Rydgren T, Sandler S (2002). "Efficacy of 1400 W, a novel inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in preventing interleukin-1beta-induced suppression of pancreatic islet function in vitro and multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in vivo". *Eur J Endocrinol* 147(4), 543-551.

Sakai K, Li Y, Shirakawa T, Kitagawa Y, Hirose G (2001). "Induction of major histocompatibility complex class I molecules on human neuroblastoma line cells by a flavoid antioxidant". *Neurosci Lett* 298(2), 127-130.

Salehi A, Vieira E, Gylfe E (2006). "Paradoxical stimulation of glucagon secretion by high glucose concentrations". *Diabetes* 55(8), 2318-2323.

- Saliou C, Rihn B, Cillard J, Okamoto T, Packer L** (1998). "Selective inhibition of NF-kappaB activation by the flavonoid hepatoprotector silymarin in HepG2. Evidence for different activating pathways". *FEBS Lett* 440(1-2), 8-12.
- Saller R, Meier R, Brignoli R** (2001). "The use of silymarin in the treatment of liver diseases". *Drugs* 61(14), 2035-2063.
- Saller R, Melzer J, Reichling J, Brignoli R, Meier R** (2007). "An updated systematic review of the pharmacology of silymarin". *Forsch Komplementmed* 14(2), 70-80.
- Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R** (2008). "An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin". *Forsch Komplementmed* 15(1), 9-20.
- Saltiel AR** (2000). "Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases". *J Clin Invest* 106(2), 163-164.
- Samuel VT, Beddow SA, Iwasaki T, Zhang XM, Chu X, Still CD, Gerhard GS, Shulman GI** (2009). "Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes". *Proc Natl Acad Sci USA* 106(29), 12121-12126.
- Sasaki S, Nio Y, Hirahara N, Sato Y, Inoue Y, Iguchi C, Yamasawa K, Tamura K** (2000). "Intraperitoneally implanted artificial pancreas with transkaryotic beta-cells on microcarrier beads in a diffusion chamber improves hyperglycemia after 90% pancreatectomy in rats". *In Vivo* 14(4), 535-541.
- Sazanov LA** (2007). "Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain". *Biochemistry* 46(9), 2275-2288.
- Schandalik R, Gatti G, Perucca E** (1992). "Pharmacokinetics of silybin in bile following administration of silybin and silymarin in cholecystectomy patients". *Arzneimittelforschung* 42(7), 964-968.
- Scheen AJ** (2010). "Sitagliptin-metformin fixed combination (Janumet)". *Rev Med Liege* 65(11), 648-654.
- Schmitz-Peiffer C** (2000). "Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply". *Cell Signal* 12(9-10), 583-594.
- Schultz BE, Chan SI** (2001). "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes". *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30, 23-65.
- Schumann J, Prockl J, Kiemer AK, Vollmar AM, Bang R, Tiegs G** (2003). "Silibinin protects mice from T cell-dependent liver injury". *J Hepatol* 39(3), 333-340.
- Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC** (1999). "Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system". *Am J Clin Nutr* 69(4), 584-596.
- Selmidis 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), 254-291.
- Seufert J, Urquhart R** (2008). "2-year effects of pioglitazone add-on to sulfonylurea or metformin on oral glucose tolerance in patients with type 2 diabetes". *Diabetes Res Clin Pract* 79(3), 453-460.
- Shafrir E, Ziv, E** (1998). "Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance: the desert rodent *Psammomys obesus* and other animals in which insulin resistance leads to detrimental outcome". *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9(2-4), 347-385.
- Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Schwenk WF, Rizza RA** (2000). "Lack of suppression of glucagon contributes to postprandial hyperglycemia in subjects with type 2 diabetes mellitus". *J Clin Endocrinol Metab* 85(11), 4053-4059.
- Shalan MG, Mostafa MS, Hassouna MM, El-Nabi SE, El-Refaie A** (2005). "Amelioration of lead toxicity on rat liver with Vitamin C and silymarin supplements". *Toxicology* 206(1), 1-15.
- Shepherd D, Garland PB** (1969). "The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria". *Biochem J* 114(3), 597-610.
- Shimabukuro M, Wang MY, Zhou YT, Newgard CB, Unger RH** (1998). "Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression". *Proc Natl Acad Sci USA* 95(16), 9558-9561.
- Shulman GI** (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance". *J Clin Invest* 106(2), 171-176.

- Singh RP, Mallikarjuna GU, Sharma G, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Chan DC, Agarwal C, Agarwal R** (2004). "Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance". *Clin Cancer Res* 10(24), 8641-8647.
- Sivitz WI, Yorek MA** (2010). "Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities". *Antioxid Redox Signal* 12(4), 537-577.
- Skinner AM, Turker MS** (2005). "Oxidative mutagenesis, mismatch repair, and aging". *Sci Aging Knowledge Environ* 2005(9), re3.
- Skoog SM, Bharucha AE** (2004). "Dietary fructose and gastrointestinal symptoms: a review". *Am J Gastroenterol* 99(10), 2046-2050.
- Skottova N, Krecman V** (1998). "Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug". *Physiol Res* 47(1), 1-7.
- Skottova N, Svagera Z, Vecera R, Urbanek K, Jegorov A, Simanek V** (2001). "Pharmacokinetic study of iodine-labeled silibinins in rat". *Pharmacol Res* 44(3), 247-253.
- Skottova N, Kazdova L, Oliyarnyk O, Vecera R, Sobolova L, Ulrichova J** (2004). "Phenolics-rich extracts from *Silybum marianum* and *Prunella vulgaris* reduce a high-sucrose diet induced oxidative stress in hereditary hypertriglyceridemic rats". *Pharmacol Res* 50(2), 123-130.
- Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM** (2004). "Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress". *Curr Med Chem* 11(9), 1135-1146.
- Smith BJ, Huang K, Kong G, Chan SJ, Nakagawa S, Menting JG, Hu SQ, Whittaker J, Steiner DF, Katsoyannis PG, Ward CW, Weiss MA, Lawrence MC** (2010). "Structural resolution of a tandem hormone-binding element in the insulin receptor and its implications for design of peptide agonists". *Proc Natl Acad Sci USA* 107(15), 6771-6776.
- Smith BK, Jain SS, Rimbaud S, Dam A, Quadrilatero J, Ventura-Clapier R, Bonen A, Holloway G** (2011). "FAT/CD36 is located on the outer mitochondrial membrane, upstream of long chain acyl-CoA synthetase, and regulates palmitate oxidation". *Biochem J*.
- Somogyi A, Ecsedi GG, Blazovics A, Miskolczi K, Gergely P, Feher J** (1989). "Short term treatment of type II hyperlipoproteinaemia with silymarin". *Acta Med Hung* 46(4), 289-295.
- Sonnenbichler J, Goldberg M, Hane L, Madubunyi I, Vogl S, Zetl I** (1986). "Stimulatory effect of Silibinin on the DNA synthesis in partially hepatectomized rat livers: non-response in hepatoma and other malign cell lines". *Biochem Pharmacol* 35(3), 538-541.
- Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R** (1999). "Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells". *J Pharmacol Exp Ther* 290(3), 1375-1383.
- Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C, Favari L** (2003). "Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 136(3), 205-212.
- Soto C, Mena R, Luna J, Cerbon M, Larrieta E, Vital P, Uria E, Sanchez M, Recoba R, Barron H, Favari L, Lara A** (2004). "Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats". *Life Sci* 75(18), 2167-2180.
- Sparks JD, Shaw WN, Corsetti JP, Bolognino M, Pesek JF, Sparks CE** (2000). "Insulin-treated Zucker diabetic fatty rats retain the hypertriglyceridemia associated with obesity". *Metabolism* 49(11), 1424-1430.
- 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), 524-531.
- Srinivasan K, Ramarao P** (2007). "Animal models in type 2 diabetes research: an overview". *Indian J Med Res* 125(3), 451-472.
- Srivastava S, Srivastava AK, Srivastava S, Patnaik GK, Dhawan BN** (1994). "Effect of picroliv and silymarin on liver regeneration in rats". *Indian J Pharmacol* 26, 19-22.
- Srividhya S, Anuradha CV** (2002). "Metformin improves liver antioxidant potential in rats fed a high-fructose diet". *Asia Pac J Clin Nutr* 11(4), 319-322.

- Stanley Mainzen PP, Kamalakkannan N** (2006). "Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes". *J Biochem Mol Toxicol* 20(2), 96-102.
- Stark G** (2005). "Functional consequences of oxidative membrane damage". *J Membr Biol* 205(1), 1-16.
- Stewart HB, El-Maghrabi MR, Pilkis SJ** (1985). "Evidence for a phosphoenzyme intermediate in the reaction pathway of rat hepatic fructose-2,6-bisphosphatase". *J Biol Chem* 260(24), 12935-12941.
- Streiff EL, Stanhope KL, Graham J, Havel PJ, King JC** (2007). "Fructose consumption and moderate zinc deficiency influence growth and adipocyte metabolism in young rats prone to adult-onset obesity". *Biol Trace Elem Res* 118(1), 53-64.
- Striffler JS, Garfield SA, Cardell EL, Cardell RR** (1984). "Effects of glucagon on hepatic microsomal glucose-6-phosphatase in vivo". *Diabetes Metab* 10(2), 91-97.
- Suzuki M, Nomura C, Odaka H, Ikeda H** (1997). "Effect of an insulin sensitizer, pioglitazone, on hypertension in fructose-drinking rats". *Jpn J Pharmacol* 74(4), 297-302.
- 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), 1283-1297.
- Tasduq SA, Peerzada K, Koul S, Bhat R, Johri RK** (2005). "Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin". *Hepatol Res* 31(3), 132-135.
- Tedesco D, Tava A, Galletti S, Tameni M, Varisco G, Costa A, Steidler S** (2004). "Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows". *J Dairy Sci* 87(7), 2239-2247.
- Teff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ** (2004). "Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women". *J Clin Endocrinol Metab* 89(6), 2963-2972.
- Thelen P, Jarry H, Ringert RH, Wuttke W** (2004). "Silibinin down-regulates prostate epithelium-derived Ets transcription factor in LNCaP prostate cancer cells". *Planta Med* 70(5), 397-400.
- Thirone AC, Huang C, Klip A** (2006). "Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport". *Trends Endocrinol Metab* 17(2), 72-78.
- Thirunavukkarasu V, Anitha Nandhini AT, Anuradha CV** (2004). "Cardiac lipids and antioxidant status in high fructose rats and the effect of alpha-lipoic acid". *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 14(6), 351-357.
- Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sonksen PH** (1996). "Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications". *Clin Sci (Lond)* 91(5), 575-582.
- 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(21), 2005-2012.
- Tyagi AK, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R** (2004). "Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells". *Oncol Rep* 11(2), 493-499.
- 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(1), 44-84.
- Van Cromphaut SJ** (2009). "Hyperglycaemia as part of the stress response: the underlying mechanisms". *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 23(4), 375-386.
- Van Der Meer R, Tager JM** (1976). "A simple method for the perfusion of isolated liver cells". *FEBS Lett* 67(1), 36-40.
- Van Schaftingen E, Davies DR, Hers HG** (1981). "Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic". *Biochem Biophys Res Commun* 103(1), 362-368.

- Van Schaftingen E, Davies DR, Hers HG** (1982). "Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver". *Eur J Biochem* 124(1), 143-149.
- Van Schaftingen E, Gerin I** (2002). "The glucose-6-phosphatase system". *Biochem J* 362(Pt 3), 513-532.
- Van Tilburg J, van Haeften TW, Pearson P, Wijmenga C** (2001). "Defining the genetic contribution of type 2 diabetes mellitus". *J Med Genet* 38(9), 569-578.
- Vasdev S, Ford CA, Longerich L, Parai S, Gadag V, Wadhawan S** (1998). "Aldehyde induced hypertension in rats: prevention by N-acetyl cysteine". *Artery* 23(1), 10-36.
- Velussi M, Cernigoi AM, De Monte A, Dapas F, Caffau C, Zilli M** (1997). "Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients". *J Hepatol* 26(4), 871-879.
- Verma S, Bhanot S, McNeill JH** (1996). "Decreased vascular reactivity in metformin-treated fructose-hypertensive rats". *Metabolism* 45(9), 1053-1055.
- Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Cottet-Rousselle C, Taleux N, Athias A, Galinier A, Casteilla L, Leverve XM** (2011). "Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver". *J Hepatol* 54(2), 348-356.
- Vincent MF, Marangos PJ, Gruber HE, Van den Berghe G** (1991). "Inhibition by AICA riboside of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes". *Diabetes* 40(10), 1259-1266.
- Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR** (1999). "Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance". *J Clin Invest* 103(7), 931-943.
- Vogel G, Trost W, Braatz R, Odenthal KP, Brusewitz G, Antweiler H, Seeger R** (1975). "Pharmacodynamics, site and mechanism of action of silymarin, the antihepatotoxic principle from *Silybum mar. (L) Gaertn. 1. Acute toxicology or tolerance, general and specific (liver-) pharmacology*". *Arzneimittelforschung* 25(1), 82-89.
- 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(6), 814-818.
- Voinovich D, Perissutti B, Grassi M, Passerini N, Bigotto A** (2009). "Solid state mechanochemical activation of *Silybum marianum* dry extract with betacyclodextrins: Characterization and bioavailability of the coground systems". *J Pharm Sci* 98(11), 4119-4129.
- Von Schonfeld J, Weisbrod B, Muller MK** (1997). "Silibinin, a plant extract with antioxidant and membrane stabilizing properties, protects exocrine pancreas from cyclosporin A toxicity". *Cell Mol Life Sci* 53(11-12), 917-920.
- Votyakova TV, Reynolds IJ** (2001). "DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria". *J Neurochem* 79(2), 266-277.
- Wagner H, Diesel P, Seitz M** (1974). "The chemistry and analysis of silymarin from *Silybum marianum* Gaertn". *Arzneimittelforschung* 24(4), 466-471.
- Walker AB, Chattington PD, Buckingham RE, Williams G** (1999). "The thiazolidinedione rosiglitazone (BRL-49653) lowers blood pressure and protects against impairment of endothelial function in Zucker fatty rats". *Diabetes* 48(7), 1448-1453.
- Walter L, Nogueira V, Leverve X, Heitz MP, Bernardi P, Fontaine E** (2000). "Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site". *J Biol Chem* 275(38), 29521-29527.
- Wamelink MM, Struys EA, Jakobs C** (2008). "The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review". *J Inherit Metab Dis* 31(6), 703-717.
- Wanders RJ, Groen AK, Meijer AJ, Tager JM** (1981). "Determination of the free-energy difference of the adenine nucleotide translocator reaction in rat-liver mitochondria using intra- and extramitochondrial ATP-utilizing reactions". *FEBS Lett* 132(2), 201-206.
- Wang M, Grange LL, Tao J** (1996). "Hepatoprotective properties of *Silybum marianum* herbal preparation on ethanol-induced liver damage". *Fitoterapia* 67, 167-171.

- Wang MJ, Lin WW, Chen HL, Chang YH, Ou HC, Kuo JS, Hong JS, Jeng KC** (2002) "Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation". *Eur J Neurosci* 16(11), 2103-2112.
- Wang Y, Jia JD** (2005). "Effect of silymarin on the anti-fibrosis of liver and its mechanism". *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 85(17), 1219-1221.
- Wei Y, Pagliassotti MJ** (2004). "Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(5), E926-E933.
- Weisiger RA, Fridovich I** (1973). "Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization". *J Biol Chem* 248(13), 4793-4796.
- Weiss H, Friedrich T, Hofhaus G, Preis D** (1991). "The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria". *Eur J Biochem* 197(3), 563-576.
- Wellington K, Jarvis B** (2001). "Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders". *BioDrugs* 15(7), 465-489.
- Weyhenmeyer R, Mascher H, Birkmayer J** (1992). "Study on dose-linearity of the pharmacokinetics of silibinin diastereomers using a new stereospecific assay". *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 30, 134-138.
- Wiernsperger NF** (2003). "Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy". *Diabetes Metab* 29(6), 579-585.
- Wikstrom M** (2004). "Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump". *Biochim Biophys Acta* 1655(1-3), 241-247.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H** (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030". *Diabetes Care* 27(5), 1047-1053.
- 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), 330-336.
- Wu CG, Chamuleau RA, Bosch KS, Frederiks WM** (1993). "Protective effect of silymarin on rat liver injury induced by ischemia". *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 64(5), 259-263.
- Wu DF, Peng RX, Ye LP, Yu P** (2003). "The effects of silymarin on hepatic microsomal and mitochondrial membrane fluidity in mice". *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 28(9), 870-872.
- Wu JW, Lin LC, Hung SC, Chi CW, Tsai TH** (2007). "Analysis of silibinin in rat plasma and bile for hepatobiliary excretion and oral bioavailability application". *J Pharm Biomed Anal* 45(4), 635-641.
- 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), 500-508.
- Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, 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, 25096-25100.
- Yanez AJ, Bertinat R, Concha II, Slebe JC** (2003). "Nuclear localization of liver FBPase isoenzyme in kidney and liver". *FEBS Lett* 550(1-3), 35-40.
- Yang SH, Lin JK, Chen WS, Chiu JH** (2003). "Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line". *J Surg Res* 113(1), 133-138.
- Yoo HG, Jung SN, Hwang YS, Park JS, Kim MH, Jeong M, Ahn SJ, Ahn BW, Shin BA, Park RK, Jung YD** (2004). "Involvement of NF-kappaB and caspases in silibinin-induced apoptosis of endothelial cells". *Int J Mol Med* 13(1), 81-86.
- Zhang BB, Moller DE** (2000). "New approaches in the treatment of type 2 diabetes". *Curr Opin Chem Biol* 4(4), 461-467.
- Zhang F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, Chen G, Luo T, Guang M, Liu Y, Zhang D, Zheng S, Yang J, Gu Y, Xie X, Luo M** (2003). "The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters". *Exp Anim* 52(5), 401-407.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue". *Nature* 372(6505), 425-432.

- Zhao J, Agarwal R** (1999). "Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin, in mice and its association with enhancement of phase II enzymes: implications in cancer chemoprevention". *Carcinogenesis* 20(11), 2101-2108.
- Zhao J, Lahiri-Chatterjee M, Sharma Y, Agarwal, R** (2000). "Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR mouse skin". *Carcinogenesis* 21(4), 811-816.
- Zhu W, Zhang JS, Young CY** (2001). "Silymarin inhibits function of the androgen receptor by reducing nuclear localization of the receptor in the human prostate cancer cell line LNCaP". *Carcinogenesis* 22(9), 1399-1403.
- Zimmet P** (2003). "The burden of type 2 diabetes: are we doing enough?" *Diabetes Metab* 29, 6S9-18.
- Zuber R, Modriansky M, Dvorak Z, Rohovsky P, Ulrichova J, Simanek V, Anzenbacher P** (2002). "Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities". *Phytother Res* 16(7), 632-638.
- Zucker LM, Zucker TF** (1961). "Fatty, a new mutation in the rat". *J Heredity* 52, 275-278.

