



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Efecto de la L-carnitina sobre el estrés oxidativo en un
modelo experimental inducido con dieta rica en
fructosa**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Química Clínica

AUTOR

Marilin Paola MAGUIÑA ALFARO

ASESOR

Silvia SUÁREZ CUNZA

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Maguiña, M. (2021). *Efecto de la L-carnitina sobre el estrés oxidativo en un modelo experimental inducido con dieta rica en fructosa*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Marilyn Paola Maguiña Alfaro
DNI	42013800
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-8318-9843
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	SILVIA SUAREZ CUNZA.
DNI	08043525
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7848-0102
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.1.5.3. Nutracéuticos
Grupo de investigación	Alimentos Nativos, Recursos Naturales y Metabolismo oxidativo - ANURMET
Agencia de financiamiento	Financiamiento parcial Nombre completo del programa financiero: PCONFIGI Código proyecto: A17012211 Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado.

Ubicación geográfica de la investigación	Coordinadas en grados decimales GD donde Edificio: Instituto de Bioquímica y Nutrición País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Centro Poblado: Cercado de Lima Latitud: -11.7375634 Longitud: -77.1466204
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Marzo 2017 - octubre 2019 2017 - 2019
URL de disciplinas OCDE	Área: Ciencias Médicas y de Salud Sub área: Medicina Básica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado



ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA CLÍNICA

Siendo las **15:05 hrs. del 09 de octubre de 2021** se reunieron mediante la plataforma de Google meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de tesis, presidido por el Dr. Juan Manuel Parreño Tipian e integrado por los siguientes miembros: Dra. Silvia Suárez Cunza (Asesora), Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez y Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **“EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO EXPERIMENTAL INDUCIDO CON DIETA RICA EN FRUCTOSA”**, presentado por la Bachiller en Medicina Humana **MARILIN PAOLA MAGUIÑA ALFARO**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la Tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Química Clínica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por la graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

20 (VEINTE) EXCELENTE

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue a la Bachiller en Medicina Humana **MARILIN PAOLA MAGUIÑA ALFARO**, el Grado Académico de Magister en **Química Clínica**.

Siendo las 16:22 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **16:22 hrs.** del 09 de octubre de 2021.

.....
Dr. Juan Manuel Parreño Tipián (P.P., T.C.)
Presidente

.....
Dra. Silvia Suárez Cunza (P. P., T.C.)
Miembro - Asesora

.....
Dr. Carlos Alejandro Bell Cortez (P. P., T.C.)
Miembro

.....
Mg. Gloria Clotilde Gordillo Rocha (P. P., T.C.)
Miembro

Observaciones:

.....

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi amado Sebastian Gael, mi hijo, por estar a mi lado desde el inicio de esta travesía, por llenarme de amor cada día, por ser mi motivo para continuar esta vida, por el regalo de ser su madre, su guía y su compañía.

Agradecimiento

Agradezco a Dios por guiar siempre mi camino y estar rodeada de buenos seres humanos

A Sebastian Gael, por el amor que me da cada día

A mis padres, Vidal y Maura por todo el apoyo y cuidado brindado.

A mi hermano Conrad, por ser mi ejemplo a seguir, por brindarme consejos y enseñarme a vivir la vida con alegría.

A mi hermana Sonia, por ser mi segunda madre, por sus cuidados y su amor

A Mitsuo, por darme ánimos, consejos y aliento para continuar

A cada miembro de mi familia, sobrinos, y a mis cuñados, Julia y Roberto, por los cuidados a mi amado hijo

A mi asesora, Dra. Silvia Suárez, por ser mi guía y acompañarme en cada etapa de este proceso.

A Luis, por brindarme su apoyo en el desarrollo del proyecto

A la Dra. Joana del Valle y al Dr. Eddy Segura por su ayuda

A cada profesional que participo en el desarrollo de dicho proyecto

Al Instituto Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina San Fernando, por haberme permitido desarrollar mi investigación.

INDICE

	Página
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1 Antecedentes	3
2.2 Aspectos teóricos.....	5
2.2.1 Enfermedades crónicas no transmisibles y dieta rica en fructosa	5
2.2.2 Estrés oxidativo.....	6
2.2.3 Antioxidantes.....	8
2.2.3.1 <i>Sistemas enzimáticos</i>	9
2.2.3.2 <i>Antioxidante no enzimático</i>	11
2.2.4 L-carnitina.....	11
 CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	
3.1 Tipo de investigación.....	13
3.2 Diseño de investigación.....	13
3.3 Materiales y métodos.....	13
3.3.1 Reactivos.....	13
3.3.2 Equipos.....	13
3.3.3 Animales y alimentación.....	13
3.3.4 Aspectos éticos.....	14
3.3.5 Protocolo experimental.....	14
3.3.6 Preparación de la fructosa y L-carnitina.....	15
3.3.7 Procesamiento para la obtención de muestra biológica.....	15
3.3.8 Evaluación de peso corporal.....	16
3.3.9 Parámetros bioquímicos del estudio experimental:	
3.3.9.1 <i>Medición de glucosa y colesterol total</i>	16
3.3.9.2 <i>Medición de insulina y HOMA-IR</i>	16
3.3.9.3 <i>Medición de la L-carnitina libre</i>	17
3.3.9.4 <i>Medición de proteínas totales</i>	18
3.3.9.5 <i>Determinación de la actividad de Catalasa</i>	18
3.3.9.6 <i>Determinación de la actividad de Superóxido dismutasa</i>	19
3.3.9.7 <i>Determinación de la actividad de Glutation peroxidasa</i>	19

3.3.9.8 <i>Determinación la actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa</i> ...	20
3.3.9.9 <i>Determinación de Glutación total hepático</i>	20
3.3.9.10 <i>Determinación de lipoperoxidación (TBARS)</i>	21
3.3.10 <i>Análisis Estadísticos</i>	22

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 <i>Peso corporal</i>	23
4.2 <i>Parámetros bioquímicos del estudio experimental</i>	23
4.2.1 <i>Parámetros en plasma</i>	23
4.2.2 <i>Parámetros en hígado</i>	24
4.3 <i>Medición de insulina plasmática y páncreas</i>	25
4.4 <i>Medición de la actividad específica del superóxido dismutasa en hígado</i>	26
4.5 <i>Medición de la actividad específica de catalasa en hígado</i>	27
4.6 <i>Relación entre CAT/SOD</i>	28
4.7 <i>Medición de la actividad específica de glutatión peroxidasa y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en hígado</i>	29
4.8 <i>Relación entre CAT/GPx</i>	30
4.9 <i>Medición de lipoperoxidación y glutatión total en hígado</i>	31
4.10 <i>Evaluación anatomo-patológico</i>	32

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

33

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....

51

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....

52

CAPÍTULO VIII: ANEXOS

64

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Reducción univalente de oxígeno	7
Figura 2. Cadena de reacción de la peroxidación lipídica.	8
Figura 3. Sistemas antioxidantes coordinados.....	9
Figura 4. El rol de la L-carnitina en la matriz mitocondrial.....	12
Figura 5. Flujograma del protocolo experimental.	15
Figura 6. Niveles de insulina plasmática y pancreática de los grupos del estudio.....	25
Figura 7. Actividad específica del superóxido dismutasa en el hígado.....	26
Figura 8. Actividad específica de la catalasa en el hígado.....	27
Figura 9. Relación entre CAT/SOD en los grupos estudiados.....	28
Figura 10. Actividad específica de Glutacion peroxidasa y actividad específica de Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa en el hígado.....	29
Figura 11. Relación entre CAT/ GPx en los grupos estudiados.....	30
Figura 12. Niveles de malondialdehído y nivel de glutatión total en hígado.....	31
Figura 13. Fotomicrografía de cortes de tejido pancreático. Hematoxilina/eosina 10x.....	32

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Reactivos para la determinación de glutatión total.....	21
Tabla 2. Pesos y variación de peso en porcentaje en los grupos del estudio.	23
Tabla 3. Parámetros en plasma y en hígado en los grupos del estudio.....	24

ABREVIATURAS

AKT/PKB: Proteína cinasa B.

ANOVA: Análisis de varianza.

CAT: Catalasa.

ChREBP: Proteína de unión a elementos regulados por carbohidratos

CPT1: Carnitina palmitoil transferasa 1.

COX-2: Ciclooxygenasa-2.

DPTA: Acido pentacetico dietileno triamina.

DTNB: Acido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico.

EDTA: Acido etilendiaminotetra acético.

EROs: Especies reactivas de oxígeno.

FADH₂: Flavín adenín dinucleótido reducido.

GLUT: Glucotransportadores.

GPx: Glutación peroxidasa.

GSH: Glutación.

GST: Glutación transferasa.

HOMA-IR: Modelo de la Homeostasis de Resistencia de insulina.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

IL 1: Interleucina 1.

IL 6: Interleucina 6.

km: Constante de Michaelis-Menten.

LC: L-carnitina.

MafA: Factor de transcripción MafA.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno.

MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos.

MDA: Malondialdehído.

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido.

NADPH: Nicotidamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NRF2: Factor nuclear erotroide 2.

OCTN2: Transportador de catión orgánico 2.

OMS: Organización Mundial de la salud.

O²⁻: Anión superóxido.

PDX1: Pancreatic and duodenal homeobox-1.

PPA2A: Proteína fosfatasa 2 A.

PKC: Proteína cinasa C.

PI3K: Fosfatidilinositol 3 cinasa.

PIP3: Fosfatidilinositol3,4,5-trisfosfato.

PPAR- γ : Receptor activado por proliferadores peroxisomales- γ .

PPAR- α : Receptor activado por proliferadores peroxisomales- α .

RXR: receptor retinoide X.

SOD Mn: Superóxido dismutasa Mn.

SOD Cu/Zn: Superóxido dismutasa Cu/Zn.

SREBP-1c: Proteína de unión a elementos regulados por esteroides.

TBA: Acido tiobarbitúrico.

TCA: Acido tricloroacético.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

TRL-4: Receptor tipo toll 4.

UCP-2: Proteína desacopladora 2.

RESUMEN

Objetivo. Evaluar el efecto de la L-carnitina (LC) sobre el estrés oxidativo en modelo experimental inducido con dieta rica en fructosa. **Materiales y métodos.** Se usaron 24 ratas machos Holtzman repartidos en 4 grupos: Control (C), Control+L-carnitina (C+LC), Fructosa (F) y Fructosa+L-carnitina (F+LC). La bebida con fructosa al 40% fue a libre demanda durante 56 días en los grupos F y F+LC; el tratamiento con LC fue en los últimos 28 días a dosis de 500mg/kg/24h vía oral en los grupos C+LC y F+LC. En hígado, se midieron LC libre, proteínas mitocondriales y posmitocondriales, además de malondialdehído, glutatión total, superóxido dismutasa-Mn, superóxido dismutasa Cu/Zn, catalasa, glutatión peroxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. A nivel pancreático, se dosificó insulina y el estudio histológico. En plasma se midió glucosa, colesterol total, HOMA-IR e insulina. **Resultados.** El grupo F reportó aumento de malondialdehído en 21% ($p=0,03$), disminución de las actividades de superóxido dismutasa Cu/Zn en 21,5% ($p>0,05$), catalasa en 20,7%, ($p>0,05$), y glutatión peroxidasa en 27% ($p=0$). El grupo C+LC mostró disminución en 66,3% de malondialdehído ($p=0$), aumento de las actividades de superóxido dismutasa-Mn ($p>0,05$) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ($p>0,05$) y disminución significativa de glutatión peroxidasa ($p<0,05$) en hígado; aumentó el nivel de insulina en páncreas en 387% ($p<0,001$) comparado al grupo C. El grupo F+LC incrementó el glutatión total ($p=0,036$) en hígado. Asimismo, en plasma se produjo disminución de HOMA-IR en 25,8% ($p>0,05$); aumento en tejido hepático de las actividades de superóxido dismutasa-Mn en 28,3% ($p>0,05$), catalasa en 41,3% ($p=0,013$) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en 77% ($p=0,017$). En este mismo grupo, la LC mejora en 100 % el nivel de insulina pancreática. Histológicamente, LC aumentó el número y tamaño de islotes de Langerhans en el grupo C+LC. **Conclusiones.** LC fomenta cambios metabólicos que ratifica su rol antioxidante y ante el uso de fructosa ayuda a mejorar homeostasis redox.

Palabras Clave: L-Carnitina; Estrés Oxidativo; Fructosa; Antioxidantes; (DeCS BIREME).

ABSTRACT

Objective. To evaluate the effect of L-carnitine (LC) on oxidative stress, in an experimental model induced with a diet rich in fructose. **Materials and methods.** 24 Holtzman male rats were used divided into 4 groups: Control (C), Control + L-carnitine (C + LC), Fructose (F) and Fructose + L-carnitine (F + LC). The 40% fructose drink was on demand for 56 days in groups F and F + LC; treatment with LC was in the last 28 days at doses of 500mg / kg / 24h orally in the C + LC and F + LC groups. In the liver, free LC, mitochondrial and post-mitochondrial proteins were measured, in addition to malondialdehyde, total glutathione, Mn-superoxide dismutase, Cu / Zn superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. At the pancreatic level, insulin and the histological study were dosed. Glucose, total cholesterol, HOMA-IR and insulin were measured in plasma. **Results.** Group F reported an increase in malondialdehyde in 21% ($p = 0.03$), a decrease in superoxide dismutase activities Cu / Zn in 21.5% ($p > 0.05$), catalase in 20.7%, ($p > 0.05$), and glutathione peroxidase in 27% ($p = 0$). Group C + LC showed a 66.3% decrease in malondialdehyde ($p = 0$), an increased of superoxide dismutase-Mn activities ($p > 0.05$) and glucose-6-phosphate dehydrogenase ($p > 0.05$) and significant decrease in glutathione peroxidase ($p < 0.05$) in liver; insulin level in pancreas increased by 387% ($p < 0.001$) compared to group C. Group F + LC increased total glutathione ($p = 0.036$) in liver. Likewise, in plasma there was a 25.8% decrease in HOMA-IR ($p > 0.05$); an increase in liver tissue of superoxide dismutase-Mn activities in 28.3% ($p > 0.05$), catalase in 41.3% ($p = 0.013$) and glucose-6-phosphate dehydrogenase in 77% ($p = 0.017$). In this same group, LC improves the level of pancreatic insulin by 100%. Histologically, LC increased the number and size of islets of Langerhans in the C + LC group. **Conclusions.** LC promotes metabolic changes that confirms its antioxidant role and when fructose is used, it helps to improve redox homeostasis.

Keywords: L-carnitine; Oxidative stress; Fructose; Antioxidants (MeSH NLM)

CAPITULO I. INTRODUCCION

En el Perú, según el INEI-2 016, en la población de 15 años a más, el 2,9 % es diagnosticada de diabetes mellitus tipo 2, el 35,5 % es diagnosticada de sobrepeso, el 18,3 % es diagnosticada de obesidad y el 12,7 % es diagnosticada de hipertensión arterial. Todas son enfermedades no transmisibles crónicas debido al estilo de vida poco saludable y al consumo excesivo de una dieta malsana; siendo uno de los componentes de esta dieta malsana la fructosa, que se encuentra en bebidas azucaradas y alimentos procesados. Diversos estudios con animales han demostrado que una dieta rica en fructosa causa estrés oxidativo, inflamación subclínica, alteración en el metabolismo de lípidos conllevando a desarrollar resistencia a la insulina y síndrome metabólico, la persistencia de estas condiciones puede llevar a desarrollar diabetes mellitus tipo 2.

Estas enfermedades constituyen un problema de salud pública en el Perú. Según la Sociedad Internacional de Farmacoeconomía e Investigación de Resultados (ISPOR) hay alrededor de 2 millones de peruanos con diabetes mellitus tipo 2; el costo por año es aproximadamente 348 dólares en los pacientes diabéticos controlados y 4 905 dólares en los pacientes no controlados. Se realizó un estudio donde el 14,3 % del presupuesto en el 2 014 del programa Presupuestal Enfermedades no Transmisibles fue para el tratamiento de pacientes diabéticos no complicados ⁽¹⁾.

En este contexto, el estudio sobre el uso de la L-carnitina (LC) como antioxidante es importante porque aporta una nueva alternativa que podría utilizarse para reducir el estrés oxidativo en pacientes que presentan resistencia a la insulina, hiperglicemia, sobrepeso, obesidad, hiperinsulinismo o diabetes mellitus tipo 2, ya que estas alteraciones metabólicas se asocian al consumo excesivo de dieta rica en fructosa y al modo de vida poco saludable, además sirve de base para futuros estudios sobre este antioxidante. Asimismo, los resultados brindan información relevante y la población beneficiada probablemente con este estudio es más del 50 % de la población peruana que sufre de obesidad, sobrepeso y diabetes tipo 2, siendo esto un problema importante de salud pública.

Por otro lado, en este estudio se ha estandarizado el modelo experimental de estrés oxidativo en ratas inducido con dieta rica en fructosa, su relevancia es marcada por la ausencia de investigaciones previas en el Perú. Este modelo permitirá realizar nuevos estudios sobre los daños que la fructosa ocasiona a nivel biológico, histológico y genético, así como observar los efectos de nuevos antioxidantes como LC.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la L-carnitina sobre el estrés oxidativo en modelo experimental inducido con dieta rica en fructosa.

OBJETIVO ESPECIFICO

1. Determinar el nivel de insulina plasmática y pancreática.
2. Determinar el nivel total de LC libre en tejido hepático.
3. Cuantificar los niveles de metabolitos pro-oxidantes de estrés oxidativo en tejido hepático.
4. Analizar la actividad de enzimas antioxidantes en tejido hepático.

Las direccionalidades de los objetivos propuestos estuvieron basadas en la hipótesis que la LC ejerce efecto antioxidante sobre el estrés oxidativo en un modelo experimental inducido con dieta rica en fructosa. Por otro lado, la contribución del estudio de la L-carnitina en el modelo estandarizado es que es el primer reporte en el Perú sobre los efectos de la LC en el tejido pancreático y en los parámetros de estrés oxidativo hepático.

CAPITULO II. MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes:

En la actualidad, el estilo de vida moderna ha llevado a preparar bebidas azucaradas industrializadas y consumir alimentos procesados con el consiguiente uso de azúcares refinados, entre los que se encuentra la fructosa por su mayor poder edulcorante. Este consumo cotidiano lleva a un mayor riesgo de alteraciones metabólicas como dislipidemia, obesidad, resistencia a la insulina , hiperinsulinismo o diabetes mellitus tipo 2 ⁽²⁻⁵⁾.

En diversos modelos experimentales de animales con dieta rica en fructosa se evidencia la inducción de diabetes mellitus tipo 2 similar a la que presentan los humanos con ese tipo de alimentación.

Se ha reportado investigaciones realizadas en ratas bajo el modelo de dieta rica en fructosa. Así como un modelo de inducción de síndrome metabólico con dieta rica en fructosa al 20 % y al 25 % durante 8 semanas, donde se observó obesidad, dislipidemia, hipertensión e hiperglicemia ⁽⁵⁾. En otra investigación, con fructosa al 30 % en bebida a libre demanda durante 30 días, demostró que las ratas desarrollaron hiperglicemia y resistencia a la insulina, encontrándose además disminución del nivel de glutatión (GSH) y de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), además de valores elevados de lipoperoxidación ⁽⁶⁾.

Adicionalmente, se realizó un estudio en ratas donde la dieta fue con fructosa al 60 % durante 10 semanas, se le agregó como antioxidante la cúrcuma; este tipo de dieta causó resistencia a la insulina, estrés oxidativo e inflamación. Se demostró incremento de malondialdehído (MDA) y disminución de la actividad de GPx en músculo de las ratas. Se advierte entonces, que no hay un valor preciso de consumo de fructosa para ocasionar las alteraciones metabólicas.

Por otro lado, en diferentes enfermedades agudas o crónicas de diversas etiologías, se observa el efecto beneficio del uso de LC, ya sea por vía oral o vía intraperitoneal, debido a la disminución del estrés oxidativo. Estos estudios se realizan en modelo experimentales con animales o en estudios observacionales en pacientes. Por ejemplo, Mescka *et al.*⁽⁷⁾ realizaron un estudio en ratas de inducción química de la enfermedad de jarabe de arce (maple syrup urine disease, MSUD), produciéndose un incremento de metabolitos que

estimulan la peroxidación lipídica y disminución en el cerebro de la actividad de los antioxidantes enzimáticos. El tratamiento con LC 100 mg/kg/24 h vía intraperitoneal por un periodo de 14 días, demostró de manera eficiente que la LC fue capaz de prevenir los efectos del estrés oxidativo causado por la inyección BCAA (aminoácidos de cadena ramificada), mejoró la actividad de las enzimas antioxidantes como la catalasa (CAT) y el GPx, pero sin cambio en la actividad de SOD; además redujo el daño oxidativo de los lípidos y proteínas con disminución de MDA. Estos resultados expresan un posible papel neuroprotector para LC como terapia adyuvante potencial a los pacientes afectados con MSUD.

Otro estudio en ratas realizado por Zambrano *et al.* ⁽⁸⁾, indujeron hipertensión arterial con la administración de L-NAME (NG – NITRO – L – arginina metil éster). Se administró por vía oral 400 mg/ kg de peso de LC diluida en agua durante 2 semanas. La hipertensión arterial incrementó el estrés oxidativo, disminuyendo la actividad de enzimas antioxidantes como GPx y SOD, asimismo, aumentando la actividad del glutatión reductasa, en la corteza del riñón de ratas medicadas con L-NAME frente a ratas normotensas. Cuando se administró simultáneamente LC, todas las alteraciones se redujeron a nivel de los valores que se encuentran en ratas normotensas. Además, hubo una reducción de MDA en ratas tratadas con L- NAME + LC.

Asimismo, en otro trabajo observaron los efectos de la LC en ratas que indujeron hipertiroidismo con la administración de tiroxina fue realizado por Yildirin *et al.* ⁽⁹⁾. El hipertiroidismo generó estrés oxidativo. Se administró LC por 10 días vía intraperitoneal a un grupo 100mg/kg/día y a otro grupo 500mg/kg/día. Se reportó que, en tejido hepático, CAT, GPx y mieloperoxidasa fue más bajo en ratas hipertiroideas que en ratas control. Luego de la administración de LC, las enzimas antioxidantes incrementaron su actividad y se produjo disminución de MDA. En este estudio no se observó diferencias significativas de los efectos de administración de LC a diferentes dosis.

Se desarrolló un estudio en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina, seguido de la administración de LC a dosis de 200mg/kg durante 6 días. Se observó disminución de MDA. La conclusión a la que llegaron fue que la administración de LC disminuyó el estrés oxidativo e incrementó la concentración de LC en plasma, y la mejora de la contractilidad muscular ⁽¹⁰⁾. De igual manera, Rajasekha *et al.* ⁽¹¹⁾ realizaron una investigación en ratas Wistar, donde se les alimentó con dieta con fructosa (60g/100g de alimento) y para revertir el efecto se usó LC 300 mg/kg/24h vía intraperitoneal,

evidenciando mejora significativa de la actividad de SOD, CAT, GPx y disminución de MDA en tejido muscular.

En una revisión sistemática y metaanálisis de los efectos de la LC en Diabetes Mellitus tipo 2, en un total de 4 estudios con 284 pacientes, se mostró que el tratamiento con LC disminuyó la glicemia, y los niveles del colesterol total y LDL⁽¹²⁾. Son escasos los estudios sobre el efecto antioxidante de LC sobre las enzimas antioxidantes o enzimas que contribuye al funcionamiento de la barrera antioxidante, así como los metabolitos implicados en el estrés oxidativo sobre un modelo experimental inducido con dieta rica en fructosa en el Perú.

2.1 Aspectos teóricos:

2.2.1 Enfermedades crónicas no transmisibles y dieta rica en fructosa

Las enfermedades no transmisibles crónicas se han incrementado en los últimos años, causando la muerte de 41 millones de personas cada año, siendo un 71 % del total de muertes en el mundo según OMS ⁽¹³⁾. En estas patologías se han observado un incremento excesivo del estrés oxidativo e inflamación crónica. Todas estas enfermedades están asociadas al incremento del consumo de alimentos procesados, bebidas azucaradas, estilo de vida sedentario, consumo de tabaco y alcohol. La fructosa se encuentra en la sacarosa o azúcar de mesa, este disacárido tiene como componente la glucosa y particularmente la fructosa unidas mediante el enlace alfa-4 ⁽¹⁴⁾.

La fructosa es una hexosa isómero funcional (C₆H₁₂O₆) de la glucosa, esta es una cetohexosa y la glucosa es una aldohexosa. El grupo carbonilo que comparten conserva capacidad de reacción, de oxidación o de glicación. Una dieta rica en ácidos grasos favorece a una mayor absorción de la fructosa; esta se absorbe principalmente en el duodeno, a través del transportador GLUT 5, sin gasto de ATP e independiente de transporte de sodio, a diferencia del proceso de absorción de la glucosa. En la parte basolateral del enterocito, ambos azúcares pasan a la circulación enterohepática por el transportador GLUT 2 ⁽³⁾. El GLUT 5 se puede encontrar en pocas cantidades, pero puede ser estimulada su presencia, cuando hay un excesivo consumo de fructosa y provocar un mayor proceso de absorción ⁽¹⁵⁾.

En el hígado, la fructosa es metabolizada por la enzima fructokinasa, el cual presenta un km bajo (0,5Mm) indicando una afinidad alta. La fructosa es transformada a fructosa-1-

fosfato, por diversas reacciones ingresa a la glucólisis a nivel de la formación de gliceraldehído -3- fosfato. Esta ruta permite que la fructosa evite los puntos de control de las enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa, importantes para la regulación energética. La conversión de fructosa a triosa es independiente a insulina y una porción de esta es convertida a lactato. De igual manera, la vía glucolítica aporta glicerol- 3 fosfato para la síntesis de triglicéridos. El metabolismo rápido de la fructosa puede incrementar los niveles de Acetil – CoA, con lo cual se favorece la formación de ácidos grasos, con un incremento de triglicéridos y formación de colesterol. Además, el exceso de la fructosa inhibe la oxidación de ácidos grasos y produce alteraciones en la utilización de glucosa en el hepatocito ⁽¹⁴⁾.

Según lo reportado por Havel ⁽¹⁶⁾, el consumo de fructosa a grandes cantidades puede favorecer la síntesis de APO B, siendo esta lipoproteína importante para la formación de VLDL, lo cual con el tiempo puede provocar aumento de triglicéridos en plasma y relacionarse con mayor riesgo a desarrollar aterosclerosis, aunado a la observación de una menor actividad enzimática de la lipoproteína lipasa. Debido a estos cambios metabólicos, diversas investigaciones refieren que la ingesta de fructosa se ha relacionado con aumento de peso, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, aumento de HOMA-IR, e hiperinsulinemia provocando con el tiempo síndrome metabólico e incluso Diabetes Mellitus tipo 2 ^(2,3,5).

Esto sumado a que la ingesta incrementada de fructosa facilita la producción de gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROs), provocando estrés oxidativo. Dentro de esta situación se puede encontrar disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, GPx, CAT y del nivel de GSH con aumento de niveles de MDA como lo reportan diversos estudios ^(6,11,17-19).

2.2.2 Estrés oxidativo

La definición de estrés oxidativo hasta hace unos años, era considerado situación en la que cualquier sistema biológico puede ser afectado, cuando la producción de radicales libres es mayor a la capacidad del sistema antioxidante en contrarrestarlo; sin embargo, se ha desarrollado un concepto más completo, actualmente se define como estado celular donde hay una alteración del equilibrio de moléculas oxidantes y moléculas antioxidantes, donde se produce lesión macromolecular y afectación del sistema redox

tiológico, lo cual tiene como consecuencia afectación de los mecanismos de controles y señalización redox ⁽²⁰⁾.

El oxígeno es el elemento químico más abundante del aire, siendo parte de muchos compuestos orgánicos e inorgánicos. Más del 95 % del O₂ se reduce a H₂O durante el proceso de respiración celular. La estructura electrónica del oxígeno es interesante debido a que tiene dos electrones desapareados ocupando dos orbitales moleculares diferentes, siendo esta estructura su estado basal. La reducción univalente del oxígeno es cuando gana electrones y produce especies no reducidas totalmente de oxígeno, como el anión superóxido (O²⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (Figura 1).

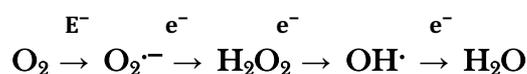


Figura 1. Reducción univalente de oxígeno

El H₂O₂ no es un radical, pero puede producirlos, es así que los EROs abarcan a los radicales libres (anión superóxido, radical hidroxilo, radical peroxilo, radical alcoxilo, radical hidroxiperoxilo) y a los no radicales (oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, ozono, anión peroxinitrito, ácido hipocloroso y ácido hipobromoso) derivados de oxígeno ⁽²¹⁾. Los EROs tienen la capacidad de oxidar directamente y dañar diferentes estructuras como DNA, proteínas y lípidos, como consecuencia se les han asociado con la patogénesis de las enfermedades crónicas no transmisibles como la aterosclerosis, insuficiencia renal, cáncer, Alzheimer o diabetes, entre otras ⁽²²⁾.

Cuando se produce el daño a nivel de lípido se da el proceso de lipoperoxidación que consiste en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. El proceso inicia cuando un radical libre produce una abstracción del hidrogeno del grupo metileno del ácido graso polinsaturado o de membrana, produciendo un radical alquilico; se desarrolla una cadena de reacciones que traen como consecuencia la formación de dienos conjugados, radical hidroperóxil lipídico y los productos finales que son MDA y 4-hidroxil-nonenal, los productos más tóxicos de la lipoperoxidación gracias a su capacidad de reaccionar con macromoléculas como las proteínas ⁽²³⁾. En esta investigación, se usó la cuantificación de MDA como parámetro pro-oxidante de estrés oxidativo.

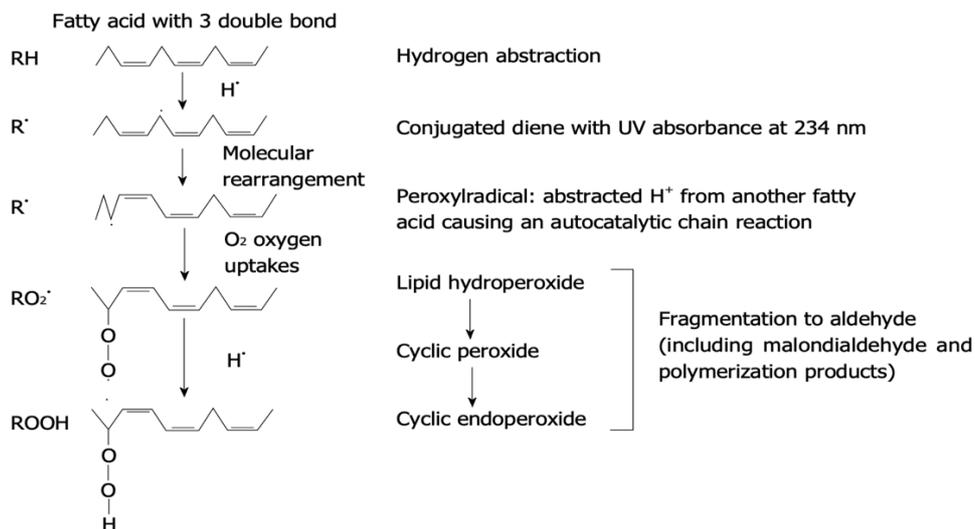


Figura 2. Cadena de reacción de la peroxidación lipídica.

Fuente: Tangvarasittichai Surapon. “Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 Diabetes Mellitus. *Word Journal of Diabetes*.2015”.

2.2.3 Antioxidantes

El antioxidante es una molécula que se encuentra en menor concentración comparado al sustrato oxidable, que puede retrasar o evitar la oxidación del sustrato ⁽²⁴⁾. Según Halliwell y Gutteridge ⁽²⁵⁾, se clasificó en:

- Moléculas con actividad enzimática que remueven a los EROs, como SOD, CAT, GPx, etc.
- Proteínas que contrarrestan la biodisponibilidad de los prooxidantes Cu^{+2} o Fe^{+2} , tenemos a la ferritina, ceruplasmina, etc.
- Proteínas que evitan el daño utilizando otros mecanismos como las proteínas de choque térmico (HSP).
- Moléculas de bajo peso molecular que se une directamente a las especies reactivas como el glutatión, α -tocoferol, vitamina c, etc.

Para evitar el daño ocasionado por los EROs, se dispone de un complejo sistema de defensa antioxidante que utiliza diferentes niveles. Según Ighodaro *et al.* ⁽²⁶⁾ hay cuatro niveles:

- Primer nivel: los antioxidantes suprimen la formación de especies reactivas en las células; neutralizando rápidamente cualquier molécula capaz de convertirse en especie reactiva o generar más especies reactivas. En primer lugar, están las enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx. También tenemos a la ceruloplasmina o transferrina que quela o secuestra al cobre o al hierro.

- Segundo nivel: Los antioxidantes eliminan a las especies reactivas donándoles electrones para evitar que desencadenen la propagación de diferentes reacciones. Gracias a estos, se forman nuevas especies pero que son fácilmente neutralizables por otros antioxidantes. Aquí se encuentra el glutatión, vitamina C, ácido úrico, alfa-tocoferol, etc.
- Tercer nivel: Los antioxidantes son enzimas que reparan el daño hecho a nivel de proteínas, lípidos y ADN. También, se encargan de eliminar las moléculas dañadas. Tenemos ADN polimerasas, nucleasas, proteasas, peptidasas, etc.
- Cuarto nivel: Los antioxidantes participan en mecanismos de adaptación, en las que se usan las señales para evitar la producción de especies reactivas.

2.2.3.1 Sistemas enzimáticos

Las enzimas antioxidantes tienen como rol disminuir los niveles intracelulares de EROs, actuando de forma coordinada (figura 3).

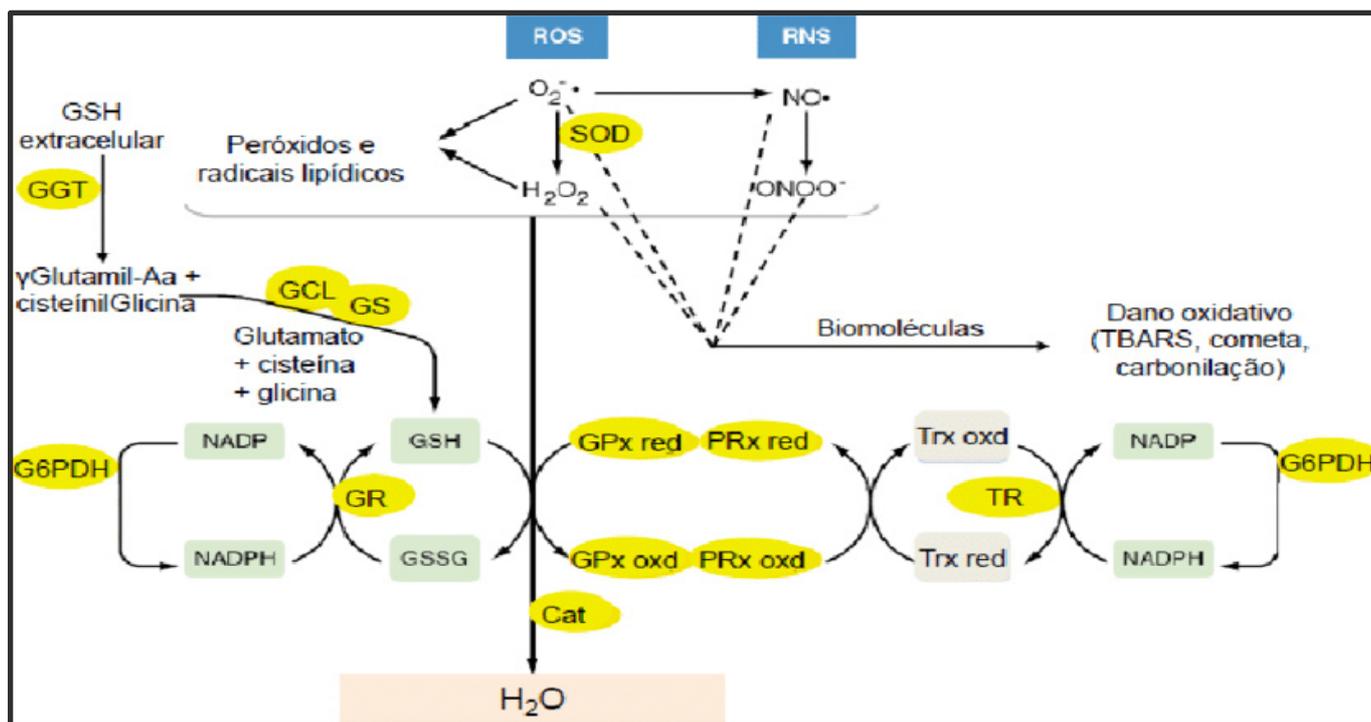


Figura 3. Sistemas antioxidantes coordinados.

SOD: superóxido dismutasa; Cat: catalasa; GPx red: glutatión peroxidasa reducido; GPx oxd: glutatión peroxidasa oxidada; GR: glutatión reductasa; GGT: gamma- glutamiltranspeptidasa; GS: glutatión sintetasa; Trx-red: tioredoxina reducida; Trx-oxi: tioredoxina oxidada; TR: Tioxioredoxina reductasa; G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

FUENTE: Trevisan Rafael. Defesas celulares e sistema antioxidante em bivalves marinos (mytilus edulis e perna perna) expostos a metais. *Recharge* 2010

Superóxido Dismutasa (SOD; E.C 1.15.1.1):

Pertenece a la familia de oxidoreductasa, tiene como función catalizar la dismutación de dos moléculas de anión superóxido a H_2O_2 . Se localiza en mitocondria (SOD Mn), citosol (SOD Cu/Zn) y fluido extracelular (SOD Cu/Zn). Los genes que codifican a SOD Cu/Zn y SOD Mn son los cromosomas 21q22.1 y 6q21. Los iones metálicos unen los elementos estructurales de la enzima, además proporcionan funciones catalíticas. Se realizó un estudio donde observaron que una sobreproducción de sustrato puede inhibir la actividad de SOD Mn para que no haya mayor formación de H_2O_2 ⁽²⁷⁾.

Catalasa (CAT; E.C. 1.11.1.6):

Se encuentra distribuida por todo el organismo, y su actividad enzimática varía dependiendo del tejido, siendo mayor en el hígado y en los riñones. Es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular es de 240 kD. Cada subunidad contiene un grupo hemo (ferroprotoporfirina) en su sitio activo y está unido a NADPH, el cual favorece a que la enzima tenga una mejor actividad ⁽²⁸⁾. La catalasa tiene como función catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, aunque también tiene actividad de peroxidasa ya que reacciona eficazmente con donantes de hidrogeno como etanol, metanol o fenoles ⁽²⁶⁾.

Glutación peroxidasa (GPx; E.C. 1.11.1.9):

Son una familia de selenoproteínas que tiene varias isoformas GPx1-GPx8, cuya función es catalizar la reducción de H_2O_2 o hidroperóxidos orgánicos usando como agente reductor al glutatión. Se encuentra distribuida principalmente en mitocondria, y algunas veces en citosol y en membrana plasmática ⁽²⁹⁾.

Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (G6PDH; E.C. 1.1.1.49):

Enzima limitante en la vía de las pentosas, siendo un NADP-oxidoreductasa. Esta enzima proporciona principalmente NADPH para reacciones de síntesis y de defensa antioxidante, también produce pentosas para la síntesis de nucleótidos. Su función es la reducción de la $NADP^+$ a NADPH, debido a la oxidación de la glucosa-6-fosfato hasta 6-fosfogluconolactona.

El papel fundamental de la G6PDH se manifiesta en su participación en diferentes procesos metabólicos, ya que permite la formación de NADPH, que es coenzima para diversas enzimas con actividad antioxidante como glutatión reductasa, tioredoxina

reductasa y peroxiredoxinas, así como parte estructural de CAT. De igual manera, ayuda a la producción del colesterol, de los ácidos grasos, y en la síntesis del óxido nítrico (30,31).

2.2.3.2 *Antioxidante no enzimático*

Glutation

Es un tripéptido de bajo peso molecular, sintetizado a partir de los aminoácidos L-cisteína, L-glutamato y glicina en dos fases, con gasto de ATP. En la primera fase, se une la cisteína con el glutamato gracias a la enzima γ -glutamato cisteína ligasa, conocida también como γ -glutamylcisteína sintetasa; y la segunda fase se le agrega glicina, catalizado por glutatión sintetasa. El GSH se caracteriza por tener su grupo tiólico reactivo y su enlace γ -glutamilo. Por otra parte, se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, y la forma oxidada solo se encuentra en menos del 5% del total (29).

El GSH protege los grupos sulfhídricos de las proteínas ya que puede reaccionar con sustancias electrofílicas y oxidantes como radical hidroxilo, anión superóxido y H_2O_2 , además de un excelente reductor en diferentes reacciones de detoxificación como la anulación del daño peroxidativo (32).

El órgano con alta capacidad de producir GSH es el hígado, usando exclusivamente la vía de la cistationina, en donde el 80% de la metionina de la dieta se convierte en cisteína (33). En el hepatocito, hay GSH citoplasmático que se encuentra en constante recambio y GSH mitocondrial estacionario. El nivel de GSH intracelular varía constantemente, dependiendo de su uso y de su síntesis. Cuando se incrementa la producción de H_2O_2 es utilizado por GPx, con la formación de GSH oxidado, el cual es rápidamente reducido con el glutatión reductasa a expensas del NADPH (29). Asimismo, la glutatión-transferasa (GST) lo usa para los procesos de conjugación y eliminación de xenobióticos (32).

2.2.4 L-carnitina

Es un aminoácido no proteico, altamente polar y soluble en agua (7), que tiene como fuente principal la síntesis endógena (25%) y la dieta (75%). Su síntesis se produce en el hígado y en el riñón, a partir los aminoácidos esenciales como lisina y metionina, teniendo como cofactor al ácido ascórbico (12). Esta distribuida en todo el cuerpo, principalmente en el musculo esquelético, el cerebro, el corazón y el hígado. Se ha estimado que la L-carnitina total en el cuerpo humano es cerca de 300mg/kg y que el 98 % se encuentra en el espacio intracelular, como LC libre (80 %) y esteres de acil carnitina. Aproximadamente, el hígado contiene 500-1 000 nmol del total de LC por gramo y el músculo esquelético es 3 000-5

000 nmol total de LC por gramo. La LC ingresa a la células a través del transportador de catión orgánico (OCTN2), que se encuentra localizado en membrana plasmática. Este transportador presenta elevada afinidad por la LC y utiliza sodio para su acción ⁽³⁴⁾.

La biodisponibilidad de LC en la dieta (alimentos como carne, pollo, pescado y lácteos) es de 54-78 % mientras que la biodisponibilidad de los suplementos de LC es 14-20 %, y lo que no es absorbido es degradado por la flora intestinal a trimetilamina ⁽³⁵⁾. La LC es eliminada principalmente por la vía urinaria, pero el 98-99 % de la carga filtrada es reabsorbida a nivel tubular ⁽³⁴⁾.

LC tiene diversas funciones en nuestro organismo, siendo la más conocida como molécula transportadora de ácidos grasos de cadena larga del citosol a la matriz mitocondrial, en el cual se desarrolla el proceso de β -oxidación; para este proceso se utilizan diversas enzimas (figura 4). Así también modula la relación Acil-CoA/CoA, permite procesos de acetilación de proteínas, preserva la integridad de la membrana mitocondrial como sus funciones y favorece el almacenaje de energía como acil-carnitina ⁽³⁵⁾.

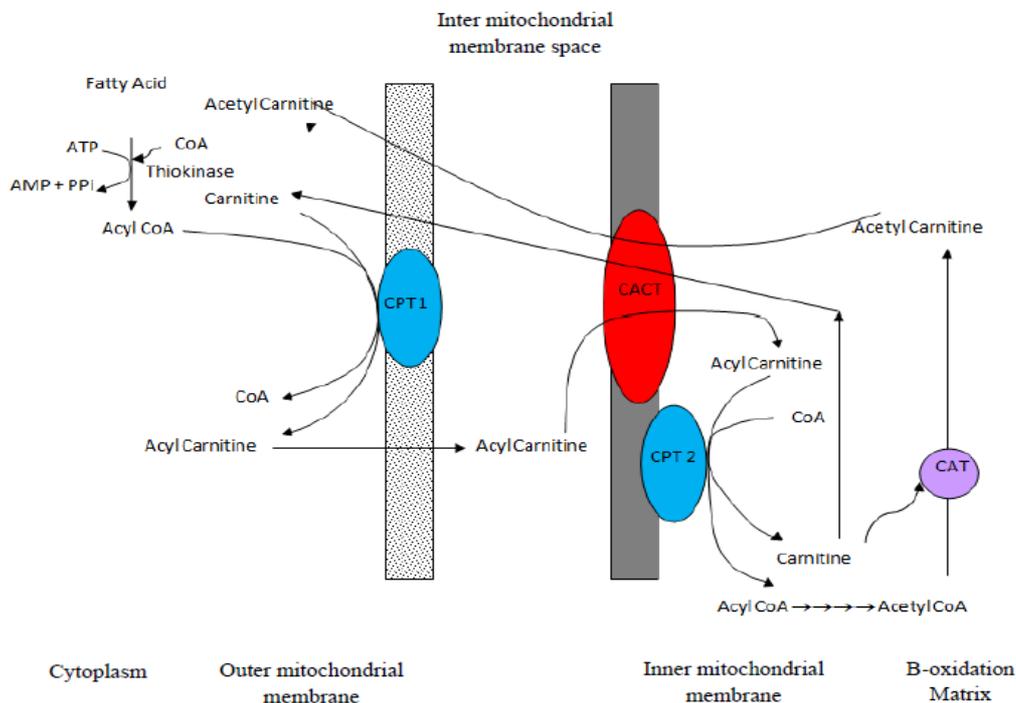


Figura 4. El rol de la LC en la matriz mitocondrial.

CPT-1 Carnitina palmitoil transferasa -I; **AT**: carnitina acetil-transferasa; **CACT** carnitina acil carnitina translocasa; **CPT-2** Carnitina palmitoil transferasa -II **C. FUENTE:** Dayanand, Krishnamurthy. Carnitine: A novel health factor - An overview. *J Pharm Biomed Res* 2011

CAPITULO III: METODOLOGIA

3.1 Tipo de investigación:

Cuantitativo

3.2 Diseño de investigación:

Experimental

La investigación se realizó en los laboratorios del “Instituto Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición”, perteneciente a la “Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos” (UNMSM).

3.3 Materiales y métodos:

3.3.1 Reactivos:

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Los siguientes reactivos fueron adquiridos de la casa Sigma-Aldrich: ácido 2,2- azinobis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), 1,2,3-trihidroxibenceno (pirogalol), ácido pentacético dietileno triamina (DTPA), ácido (\pm)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), ácido gálico, ácido tiobarbitúrico (TBA), tris HCl, trizma base, ácido etilendiaminotetra acético (EDTA), ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), albumina bovina, kit específico de ELISA para insulina y kit específico de ELISA para LC libre.

De la casa Merck, fueron adquiridos los siguientes: cloruro de amonio, carbonato de sodio, acetato de sodio, etanol, metanol 100%, cloruro de potasio, fosfato monosódico, fosfato disódico, ácido tricloroacético (TCA), ácido clorhídrico y H_2O_2 .

3.3.2 Equipos:

Centrifuga refrigerada MPW-380R, centrifuga PowerSpin BX, espectrofotómetro Genesys 10S Vis Thermo Scientific, balanza analítica Sartorius BP 2, homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem con émbolo de teflón, estufa Kerlab, baño maría Tomos CDK-S22 y balanza digital para animales.

3.3.3 Animales y alimentación:

En el estudio se usaron 24 ratas machos de 2 meses de edad de la cepa Holtzman, siendo sus pesos de 217 ± 42 g aproximadamente, obtenidos del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú). Las ratas se mantuvieron durante 7 días en aclimatación a una temperatura ambiente (aproximadamente 22 ± 2 °C, con período día/noche de 12 horas) en el bioterio del Instituto Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de

Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La alimentación durante toda la investigación comprendió un concentrado comercial para animales de laboratorio adquirido en la Universidad Nacional Agraria la Molina y la bebida fue agua de grifo a libre demanda, con diferencia en el contenido, dependiendo del grupo de la investigación, debido al preparado de fructosa al 40 % y de LC al 10 %.

3.3.4 Aspectos éticos:

El manejo de los animales de experimentación fue basado en “los principios de normas éticas de animales de laboratorio”, usando la “guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio” (INS-MINSA) y la ley peruana N. 30 407, Ley de Protección y Bienestar Animal.

3.3.5 Protocolo experimental

Después del período de aclimatación, se dividió en cuatro grupos de experimentación mediante un muestreo aleatorio simple a través del programa OpenEpi versión 3.01. Cada grupo estuvo formado por igual número de ratas (n=6).

Grupo control (C): durante todo el estudio recibió alimento y agua de grifo.

Grupo control + L-carnitina (C + LC): durante todo el estudio, recibió alimento y agua de grifo, y a partir del día 28 se le administró LC 500 mg/kg/24h por vía oral con cánula orogástrica.

Grupo fructosa (F): durante todo el estudio, recibió alimento y bebida con fructosa al 40 %.

Grupo fructosa + L-carnitina (F + LC): durante todo el estudio, recibió alimento y bebida con fructosa al 40 %, y a partir del día 28 se le administró LC 500 mg/kg/24h por vía oral con cánula orogástrica.

Las ratas estuvieron en ayunas durante 12 horas, los días 27 y 56 del estudio; y las tomas de sangre para la medición de la glicemia fueron los días 28 y 57 del estudio. El día 57 del estudio, los animales de experimentación fueron eutanasiados mediante decapitación, con sedación previa utilizando éter.

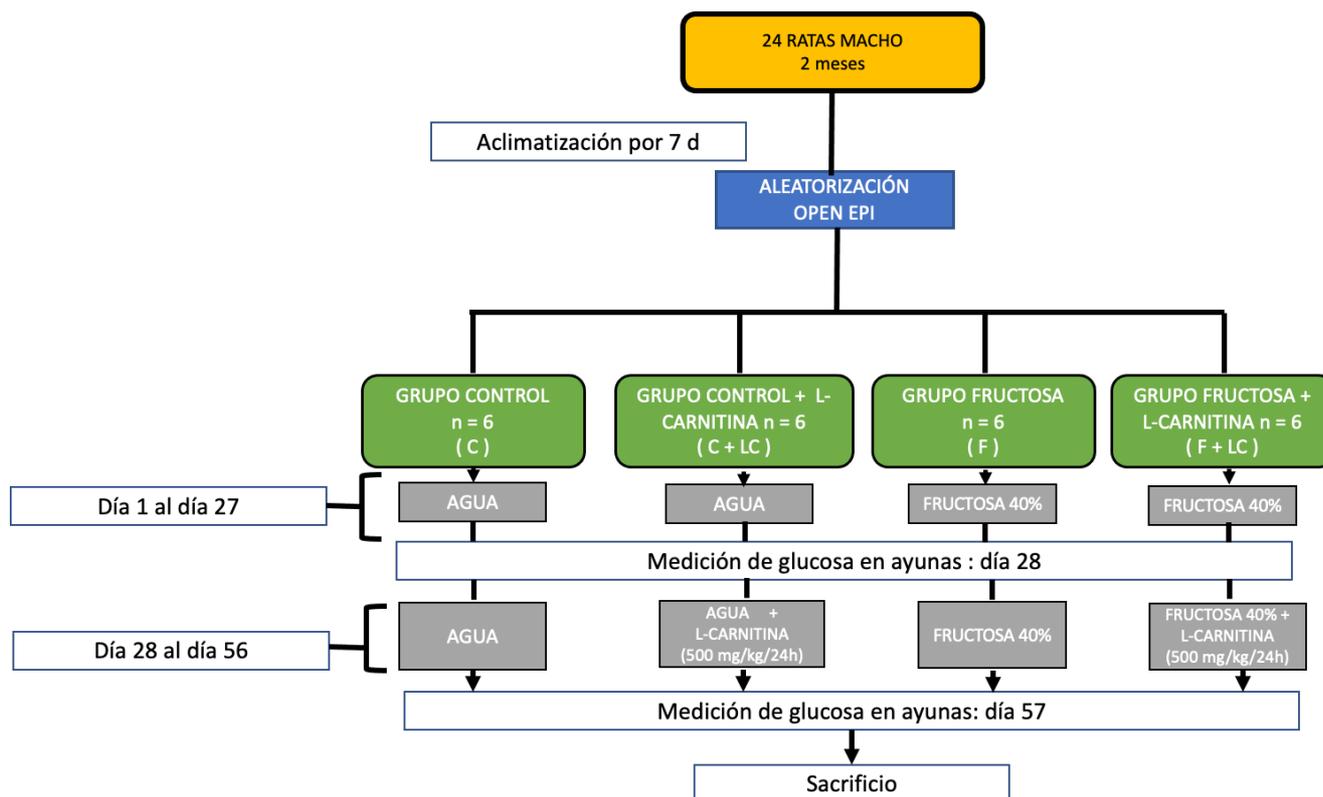


Figura 5. Flujograma del protocolo experimental.

3.3.6 Preparación de la fructosa y L-carnitina

La solución de fructosa al 40 % se preparó a partir de la D-fructosa >99 % (Omnichem S.A.C, Wuhi, China). La solución se preparó con agua de grifo, se pesó 40 g de fructosa por cada 100 mL de solución. Asimismo, se elaboró la solución de LC al 10 % (Omnichem S.A.C, Ningbo, China), es decir, 10 g de LC por cada 100 ml de solución. Las soluciones se preparaban todos los días.

3.3.7 Procesamiento para la obtención de muestra biológica:

La extracción del hígado y la preparación del homogeneizado se llevó a cabo en baño de hielo. El tejido hepático se limpió por perfusión con KCl 0,154 M frío para eliminar los residuos de sangre. Las muestras de homogeneizados fueron elaboradas al 10 % en *buffer* fosfato salino pH 7,4; utilizando como homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem con émbolo de teflón. Se realizó tres centrifugaciones continuas a 4 °C. La primera centrifugación fue a 700 gravedades durante 5 minutos, el sobrenadante obtenido fue centrifugado a 9 500 gravedades durante 15 minutos. El sobrenadante de esta segunda centrifugación corresponde a la fracción posmitocondrial (microsomas y citosol) y el

precipitado corresponde a la fracción mitocondrial. Este último, fue lavado dos veces con el *buffer* PBS. Para la tercera centrifugación, se usó las mismas condiciones del proceso anterior, se conservó el precipitado y el sobrenadante fue descartado. El precipitado obtenido es resuspendido con 2 mL del *buffer* PBS.

De igual manera, se extrajo y se elaboró la muestra del homogeneizado de páncreas; solamente se efectuó una centrifugación a 700 gravedades por un periodo de 5 minutos, los ensayos se realizaron en el sobrenadante y el precipitado fue descartado.

Para la evaluación del tejido pancreático, se colocó en formol tamponado al 10 %, de manera individual, luego se fijó en parafina. Las secciones delgadas de muestras de tejido (5 μ m) fueron teñidas mediante la tinción hematoxilina-eosina.

3.3.8 Evaluación de peso corporal: Los animales fueron pesados a las 08 am en ayunas, una vez por semana durante todo el estudio.

3.3.9 Parámetros bioquímicos del estudio experimental:

3.3.9.1 Medición de glucosa y colesterol total

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena de la cola, donde se midieron las concentraciones de glucosa en ayunas y colesterol total mediante el método conductimétrico en un glucómetro (Accu-chek instant) el día 57 y solamente se midió glucosa en ayunas el día 28.

3.3.9.2 Medición de insulina y HOMA-IR

Para la evaluación de la insulina, las muestras de sangre se colectaron en tubos con EDTA, se centrifugaron a 1 100 g por un periodo de 10 minutos a 4 °C para obtener el plasma. La dosificación de la insulina plasmática y en la muestra del homogeneizado de páncreas se desarrolló en el día 57, mediante el kit específico de ELISA.

Los reactivos que pertenecían al kit eran *wash buffer*, *lyophilized rat insulin protein standard*, *biotinylated rat insulin detection antibody*, *HRP-streptavidin*, *Elisa colorimetric TMB reagent*, *Elisa stop solution*, *Elisa assay sample diluent buffer C y B*; asimismo una placa con 96 pocillos.

Se preparó el estándar mezclando 400 μ L de *Elisa assay sample diluent buffer* dentro del vial que contiene *lyophilized rat insulin protein standard*, obteniendo una solución estándar a 14 000 μ UI/ mL. A los pocillos de la placa se le agregó 100 μ L de las muestras y 100 μ L del estándar, se le incubó durante 2,5 horas (22-23 °C), luego se desechó la

solución y se lavó por 4 veces con *wash buffer* (300 μ L). Se colocó la placa de manera inversa y se secó con papel. Posteriormente se le agregó 100 μ L de *biotinylated detection antibody* preparado a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Asimismo, se descartó la solución y se lavó 4 veces. Luego se colocó la solución de *HRP-streptavidina* a cada pocillo, y se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, nuevamente se eliminó y se lavó, después de este procedimiento se le agregó 10 mL de *Elisa colorimetric TMB reagent* a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos, como procedimiento final se agrega 50 mL de solución *stop* y se leyó a 450 nm inmediatamente. Los resultados fueron expresados en μ UI/mL. La resistencia a la insulina fue evaluada a través del Modelo de la Homeostasis de Resistencia de Insulina (HOMA-IR).

HOMA-IR= glucosa (mg/dL) x insulina (μUI/mL)/405
--

UI: unidades internacionales

3.3.9.3 Medición de la L-carnitina libre

La dosificación de la LC libre en la muestra de homogeneizado hepático se hizo mediante el kit específico enzimático a 570nm.

Los reactivos que incluían el kit fueron: *carnitine assay buffer* 25 mL, *carnitine probe* 0,2 mL, *carnitine converting enzyme* 1vL, *carnitine substrate mix* 0,4 mL, *carnitine development mix* 1vL y *carnitine standard* 1vL.

Se preparó la muestra del homogeneizado, agregando al tejido 100 μ L del *carnitine assay buffer*, posteriormente se centrifugó 700 gravedades durante 10 minutos.

Luego de preparar la muestra, se diluyó 10 μ L de *carnitine standard* 100 mM con 990 μ L de agua, que sirvió para preparar una solución standard de carnitina a 1mM. En cada pocillo de la placa se agregó 0, 2, 4, 6, 8, y 10 μ L de la solución y se completó con *carnitine assay buffer* hasta llegar a un volumen final de 50 μ L.

Asimismo, se preparó una solución que contenía 40 μ L de *carnitine assay buffer*, 2 μ L de *carnitine probe*, 2 μ L de *carnitine converting enzyme*, 4 μ L de *carnitine substrate* y 2 μ L *carnitine development*, el cual se le agregó a cada pocillo de las muestras y el estándar. El volumen de las muestras empleadas fue 50 μ L, siendo el volumen final 100 μ L. Posteriormente, se incubó por un periodo de media hora a temperatura ambiental y se protege a la placa de la luz natural durante la incubación. Se ejecutó la lectura a una longitud de onda de 570 nm. Los datos fueron expresados en nmol/g de tejido.

3.3.9.4 Medición de proteínas totales

Se aplicó el método de Biuret ⁽³⁶⁾; siendo su fundamentó, la formación de un complejo entre los iones cúpricos y las uniones peptídicas a pH alcalino, con la aparición de una coloración violeta-púrpura.

Para este estudio, se colocó en un tubo 150 μ L de agua destilada, 150 μ L de CuSO_4 40 mM y 1 mL NaOH 2,5 M, se incubó a 37°C durante 5 minutos, inmediatamente se agregó 100 μ L de la muestra del homogeneizado y se mantuvo en baño maría durante 5 minutos, luego se leyó a una longitud de onda de 540 nm. De la misma manera se realizó para el estándar.

Las proteínas fueron medidas en la fracción mitocondrial y posmitocondrial, extraídas del homogeneizado al 10 %.

$$\text{Proteínas totales (mg/dL)} = \frac{[\text{ST}] \times \text{Absorbancia MP}}{\text{Absorbancia ST}}$$

[ST]= concentración del estándar
MP= muestra problema

3.3.9.5 Determinación de la actividad de Catalasa

El método utilizado fue en base a la técnica de Aebi ⁽³⁷⁾, que consiste en la capacidad de la catalasa para descomponer H_2O_2 en H_2O y O_2 .

Para este estudio, el homogeneizado de hígado se diluyó 1/900; se procedió a colocar en la cubeta de 1mL de capacidad, el volumen de 0,6 mL de homogeneizado y se le adicionó 0,3 mL de H_2O_2 30 mM preparado en *buffer* fosfato (fosfato monopotásico y fosfato disódico) 50 mM pH 7,0 a temperatura ambiente, donde se midió el cambio de absorbancia a una longitud de onda 240 nm durante 1,5 minutos. El H_2O_2 se elaboró inmediatamente antes de su uso a fin de evitar su descomposición.

Equivalencia de U CAT = $\mu\text{mol}/\text{min}$. Los resultados se expresan en U/mg de proteína.

$$\text{Actividad específica (}\mu\text{mol/min.mg proteína)} = \frac{\Delta \text{Absorbancia/min} \times \text{volumen total (mL)} \times \text{FD} \times \text{1 mL de homogeneizado}}{\epsilon \times \text{longitud de cubeta (cm)} \times \text{volumen (mL)} \times \text{mg proteína}}$$

Δ Absorbancia/min= variación de la absorbancia en un minuto de muestra problema
Volumen de MP=volumen de muestra problema
FD= factor de dilución
Coeficiente de extinción (ϵ 240) = $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

3.3.9.6 Determinación de la actividad de Superóxido dismutasa

El método de Marklund & Marklund ⁽³⁸⁾ fue utilizado para esta medición. Se sustenta en la medición cinética de la capacidad de la SOD para inhibir la autooxidación del pirogalol en pH 8,2. El pirogalol es un compuesto que en medio alcalino se autooxida rápidamente formándose la pirogalina y generando radicales superóxidos. La presencia de la enzima SOD en la muestra produce la dismutación del radical superóxido conduciendo a la inhibición de la autooxidación del pirogalol y entonces menor formación de pirogalina. La pirogalina se mide espectrofotométricamente a 420 nm.

Para este ensayo, se procedió a evaluar la autooxidación espontánea del pirogalol, para lo cual, en un pocillo de 1mL de capacidad se puso 950 μ L de *buffer* Tris HCl 50mM pH 8,2 con DPTA 1 mM, luego incubándose en baño María a 37 °C durante 60 segundos; posteriormente, una vez colocado la solución en la cubeta en el espectrofotómetro, se le adicionó 50 μ L de pirogalol 2 mM, disuelto en HCl 10 mM, para finalmente leer el cambio de absorbancia a 420 nm durante 4 minutos, a una velocidad de 0,02/min.

Las muestras del homogeneizado de hígado fueron diluidas para dar lecturas de cambio de absorbancia de 0,01/min \pm 10 %. Así, las muestras de la fracción mitocondrial (SOD Mn) se diluyeron $\frac{1}{2}$, mientras que la fracción posmitocondrial (SOD Cu/Zn) se diluyó al $\frac{1}{20}$.

La actividad específica se informó como USOD/mg de proteína. La unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para inhibir la autooxidación del pirogalol en un 50%. 1U SOD = Δ de absorbancia del pirogalol 0,02 /2 min (\pm 10%).

$\text{Actividad específica (USOD/mg de proteína)} = \frac{\text{USOD} \times \text{volumen total (mL)} \times \text{FD} \times 1 \text{ mL homogenizado}}{\Delta \text{ Abs} \times \text{volumen (mL)} \times \text{mg proteína}}$
--

USOD = Unidades de superoxido dismutasa

Δ Abs = absorbancia de la muestra problema

FD = factor de dilución

3.3.9.7 Determinación de la actividad de Glutation peroxidasa

Se desarrolló en base al método de Paglia y Valentine ⁽³⁹⁾. La actividad de la enzima se mide mediante la reacción acoplada que produce finalmente la oxidación del NADPH por la reducción de la GSSG (mediante el glutatión reductasa), producida cuando GPx cataliza la reducción del H₂O₂ en presencia de GSH. El NADPH tiene un pico de absorbancia a 340 nm, su oxidación lleva a la disminución o desaparición de la absorbancia.

Se preparó el *buffer* sustrato compuesto de 9,6 mL de *buffer* fosfato pH 7,0 0,1 M, EDTA 1 mM, en la que se añade NaN_3 4 mM, GSH 6,1 mg, 0,2 μL de NADPH 10 nM y 10 μL de glutatión reductasa 1000 u/mL en volumen final.

Se colocó en una cubeta 980 μL de *buffer* sustrato y 10 μL de la muestra del homogeneizado de hígado, luego se incubó en baño maría a 25°C durante 5 minutos, posteriormente se le agregó 10 μL de H_2O_2 8,8 mM. Se leyó el cambio de absorbancia por un período de 3 minutos a una longitud de onda de 340 nm.

$\text{Actividad específica (nmol/min.mg proteína)} = \frac{\Delta \text{ Absorbancia/min} \times \text{volumen total (mL)} \times \text{FD} \times \text{homogeneizado (mL)}}{\epsilon \times \text{longitud de cubeta (cm)} \times \text{volumen (mL)} \times \text{mg proteína}}$
--

Δ Absorbancia/min= variación de la absorbancia en un minuto de muestra problema

Coefficiente de extinción (ϵ 340) = 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Volumen = volumen de muestra problema

3.3.9.8 Determinación la actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La técnica empleada fue el método de Kjeldsberg ⁽⁴⁰⁾. El fundamento de este estudio se basa en la medición cinética de la reducción del NADP gracias a que la glucosa-6-fosfato es oxidado. La variación de absorbancia se mide en base a la aparición del NADPH a una longitud de onda 340nm.

Se colocó en una cubeta de 1,2 mL, 200 μL de Tris-HCl pH 8,8 50 mM, 160 μL de MgCl_2 0,1 mM, 40 μL de NADP 6,0 mM, 720 μL de agua destilada y 40 μL del homogeneizado de hígado, se le incuba en baño maría a 30 °C durante 2 minutos. Luego se le agrega 40 μL glucosa 6 fosfato 360 mM, se leyó durante 2 minutos a 340 nm.

$\text{Actividad específica (nmol /min.mg proteína)} = \frac{\Delta \text{ Absorbancia/min} \times \text{volumen total (mL)} \times \text{FD} \times \text{homogeneizado (mL)}}{\epsilon \times \text{longitud de cubeta (cm)} \times \text{volumen (mL)} \times \text{mg proteína}}$

Δ Absorbancia/min= variación de la absorbancia en un minuto de muestra problema

Coefficiente de extinción (ϵ 340) = 6220 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Volumen MP = volumen de muestra problema

3.3.9.9 Determinación de Glutatión total hepático

Se empleó el método de Boyne y Ellman ⁽⁴¹⁾. Se cuantifica por la reacción entre el glutatión reducido y DTNB, formándose el complejo GSH-DNTB de color amarillo que se mide a una longitud de onda de 412 nm.

Previamente el contenido del glutatión debe ser reducido usando una solución reductora formada con la vitamina C y el ácido glioxílico.

El GSH es un metabolito soluble de bajo peso molecular, debe ser separado de las proteínas para evitar la cuantificación de sulfhídricos proteicos, pues el fundamento está basado en la reacción entre el sulfhídrico libre y el DTNB.

Tabla 1. Reactivos para la determinación de glutatión total

	Reductor mL Vit C +. Ac. Glioxilico	H2O μ L	μ L ST GSH 0.4 mmol/L	μ L desproteínizado
Blanco	1	200		-
ST 1	1	120	80	-
ST 2	1	100	100	-
MP	1	-	-	200

Para realizar la determinación de GSH total, se preparó 4 tubos con los reactivos de acuerdo con la tabla 1. Ellos se colocaron en baño maría durante 5 minutos a 67 °C, posteriormente se les enfrió con agua de grifería. Se les agregó 200 μ L de DTNB 1,5mg/mL en *buffer* fosfato de potasio 0,5 mmol/L pH 6,8, se esperó durante 5 minutos y se leyó a una longitud de onda 412 nm a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra:

Se desproteínizó 950 μ L de la muestra del homogeneizado en 50 μ L de TCA al 100 %, se movió intensamente y se centrifugó a 13 000 revoluciones por minuto durante 5 minutos. El sobrenadante es la muestra para el ensayo.

$$\text{GSH (nmol/mg de tejido)} = \frac{[\text{masa ST}] (\text{nmol}) \times \text{Abs MP}}{\text{Abs ST} \times \text{masa real}}$$

[ST] = concentración del estándar

Abs ST= absorbancia del estándar

Abs MP= absorbancia de la muestra problema

3.3.9.10 Determinación de lipoperoxidación (MDA)

Esta técnica colorimétrica en base a Buege y Aust ⁽⁴²⁾, permite medir los niveles de uno los productos aldehídicos de la lipoperoxidación: el MDA. Se fundamenta en la reacción entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el MDA, formando un complejo TBA-MDA de color rosado medido a 535 nm. La concentración del complejo TBA-MDA es directamente proporcional a AGP oxidados, por tanto, es un marcador de lipoperoxidación

Se colocó en una cubeta, 0,6 mL TCA al 20 % y 0,3 mL de la muestra problema de homogeneizado, se incubó en baño maría a 100 °C durante 15 minutos, luego la solución fue enfriada con agua de grifería a temperatura ambiente. Después de este procedimiento

se le añadió 0,9 mL de TBA al 0,67 % en HCl 0,25 N. Se le colocó nuevamente en baño maría a 100 °C durante 30 minutos, luego de enfría con agua helada. Asimismo, se llevó a centrifugación a 7 000 revoluciones por minuto por un periodo de 10 minutos y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 535 nm.

$\text{MDA (nmol/mg de tejido)} = \frac{\text{Abs} \times \text{volumen total (mL)} \times \text{FD} \times \text{homogenizado (mL)}}{\epsilon \times \text{longitud de cubeta (cm)} \times \text{volumen (mL)} \times \text{g de tejido}}$

Abs = absorbancia de la muestra problema

Coefficiente de extinción $\epsilon_{340} = 1.56 \times 10^{+5} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Volumen = volumen de muestra problema

3.3.10 Análisis Estadísticos

La evaluación de normalidad se utilizó la prueba de Shapiro Wilk. Asimismo, se usó la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA) y para las comparaciones múltiples se utilizó como prueba *post hoc* a Scheffé, por ser muestras pequeñas.

En todas las pruebas se asumió la significancia estadística de un valor $p < 0,05$. El paquete estadístico utilizado fue Stata versión 13.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Peso corporal

La variación de los pesos (%) entre los cuatro grupos mostró diferencia significativa en las primeras cuatro semanas (entre el día 1 al día 27); sin embargo, no mostró diferencia significativa en las últimas cuatro semanas (entre el día 28 al día 56) de los grupos estudiados. En la variación de peso en porcentaje entre el día 1 y día 28 se observó aumento significativo de 63 % en el grupo control en comparación con los grupos F y C+LC (tabla 2).

Tabla 2. Pesos y variación de peso en porcentaje en los grupos del estudio.

	CONTROL (C)	CONTROL L-CARNITINA (C+LC)	FRUCTOSA (F)	FRUCTOSA + L-CARNITINA (F + LC)	Valor de p ^a
Peso día 1	185,3 ± 25	258,6 ± 18	226,1 ± 53	195,8 ± 18	
Variación de peso en % entre el día 1 al día 27	63 ± 1,5	32 ± 1,3 *	33 ± 17,1 *	42 ± 9,1	0.0014
Peso día 28	299 ± 24	341 ± 22	294,6 ± 43	277,8 ± 20	
Variación de peso en % entre el día 28 al día 57	24 ± 6,4	14 ± 8,7	28 ± 12,2	26 ± 5,3	0.08
Peso día 57	371,6 ± 41	388,5 ± 29	358 ± 33	348,8 ± 18	

Resultados expresados promedio ± desviación estándar.

Estadísticamente significativo cuando * p<0,05 frente al grupo C.

^a Valor de p comparado en todos los grupos del estudio mediante la prueba de ANOVA.

4.2 Parámetros bioquímicos del estudio experimental:

4.2.1 Parámetros en plasma

Los resultados obtenidos en la medición de colesterol total no mostraron diferencia significativa entre los grupos estudiados. Sin embargo, se observó que el consumo de LC incrementó ligeramente los niveles en el grupo C+LC y en el grupo F+LC.

En la medición de glucosa en ayunas en los diferentes días de la evaluación y en los valores de HOMA-IR no se observó diferencia significativa. A pesar de ello, en los resultados del HOMA-IR, la ingesta de fructosa en el grupo F provocó un incremento de 28,3 % en comparación al grupo C. La administración de la LC provocó un descenso de 25,8 % en el grupo F+LC en comparación al grupo F (tabla 3).

4.2.2 Parámetros en hígado

El nivel de proteínas mitocondriales, proteínas posmitocondriales y la LC libre, mostraron variación estadísticamente significativa.

A nivel de proteínas, en el grupo C+LC comparado al grupo C se evidenció un aumento significativo 51,1 % ($p=0,020$) y 47,8 % ($p=0,011$) en proteínas totales mitocondriales y posmitocondriales totales respectivamente.

Asimismo, en el nivel de LC libre, la única diferencia significativa en la evaluación de pares fue el aumento de 21,6 % en el grupo F+LC frente al grupo C ($p=0,043$). Sin embargo, también se observó en el grupo C+LC el incremento de 19 % comparado al grupo C (tabla 3).

Tabla 3. Parámetros en plasma y en hígado en los grupos del estudio.

	CONTROL (C)	CONTROL L-CARNITINA (C+LC)	FRUCTOSA (F)	FRUCTOSA + L-CARNITINA (F + LC)	Valor de p ^a
<i>Parámetros en plasma</i>					
Glucosa en ayunas - día 28 (mg/dl)	85,1 ± 8,6	82,5 ± 3,9	85,5 ± 6,3	81,8 ± 16,4	0,9124
Glucosa en ayunas - día 57 (mg/dl)	76,5 ± 12,9	85,3 ± 5,2	78,8 ± 10,6	77,6 ± 4,3	0,6887
Colesterol total día 57 (mg/dl)	178 ± 28	217 ± 54	172 ± 34	221 ± 54	0,1413
HOMA - IR	2,4 ± 0,4	2,8 ± 0,5	3,1 ± 0,1	2,32 ± 0,3	0,1305
<i>Parámetros en hígado</i>					
Nivel de LC libre(nmol/g de tejido)	554 ± 96,8	659 ± 42,3	603 ± 48,1	674 ± 44,6*	0,0373
Proteínas totales mitocondriales (mg/dl)	50,5 ± 11,1	76,3 ± 14,7*	62,0 ± 12,6	65,7 ± 10,2	0,0184
Proteínas totales postmitocondriales (mg/dl)	27,8 ± 6,7	41,1 ± 5,8*	32,2 ± 1,4	36,5 ± 6,9	0,0075

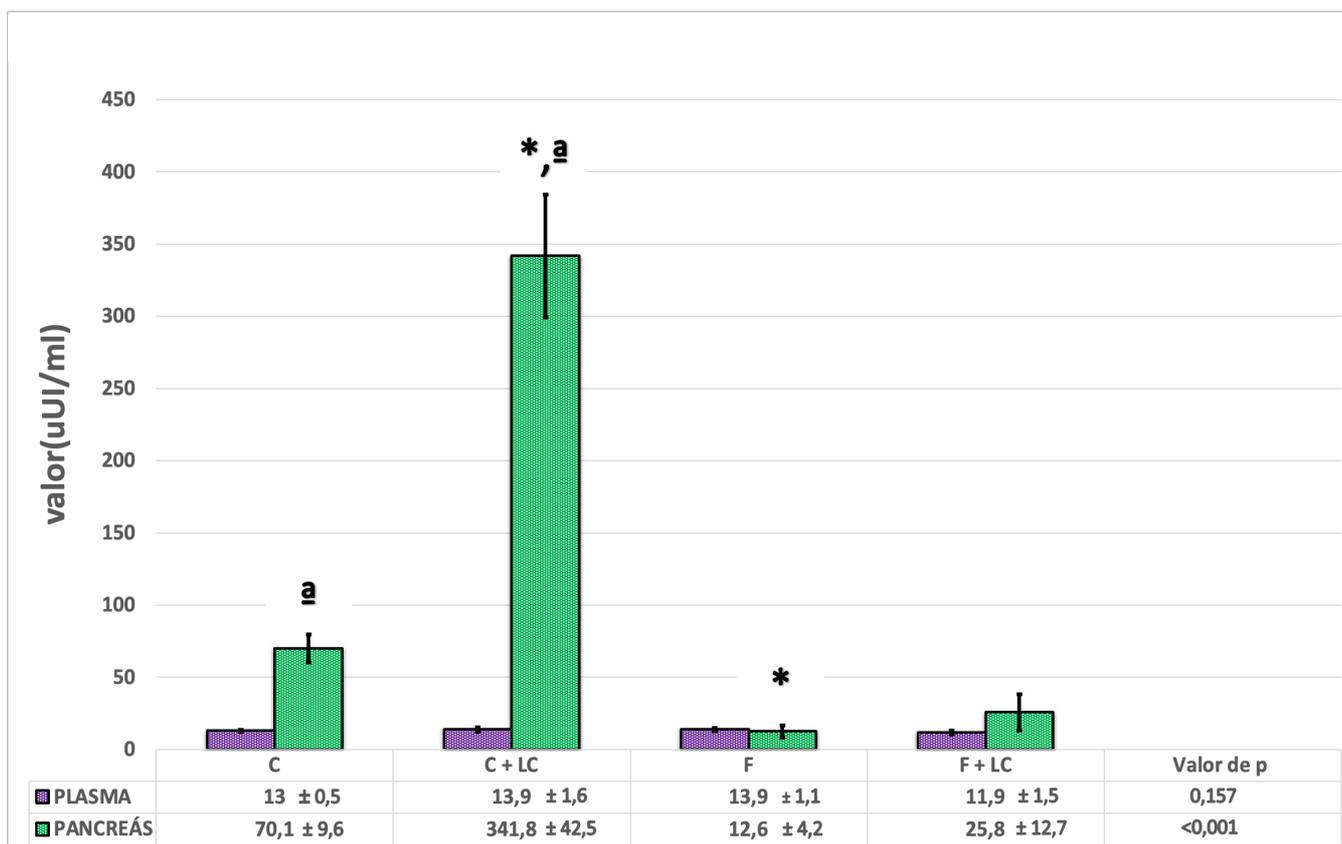
Resultados expresados promedio ± desviación estándar.

Estadísticamente significativo cuando * $p<0,05$ frente al grupo C.

^a Valor de p comparado en todos los grupos del estudio mediante la prueba de ANOVA.

4.3 Medición de insulina plasmática y páncreas

En el nivel de insulina en el páncreas, se observó un cambio significativo en los diferentes grupos del estudio ($p = 0$). La ingesta de fructosa provocó disminución significativa ($p < 0,05$) comparado al grupo C. La administración de LC llevó al incremento de la producción de insulina en la porción endocrina del páncreas, pudiendo observarse un aumento significativo ($p < 0,001$) de los niveles de insulina en el grupo C+LC comparado con el grupo C, llevando un incremento en 387 %. De igual manera, la administración de LC produjo una recuperación del 100 % de nivel de insulina en el grupo F+LC frente al grupo F pero no logra igualar el nivel de insulina del grupo C. En el nivel de insulina en plasma no se evidencia diferencia alguna (figura 6).



Grupo C: control, **Grupo C+LC:** control+L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F+LC:** fructosa+L-carnitina
Resultados expresados en promedio ± desviación estándar

Prueba ANOVA. Estadísticamente significativo * $p < 0,05$ comparado al grupo C.

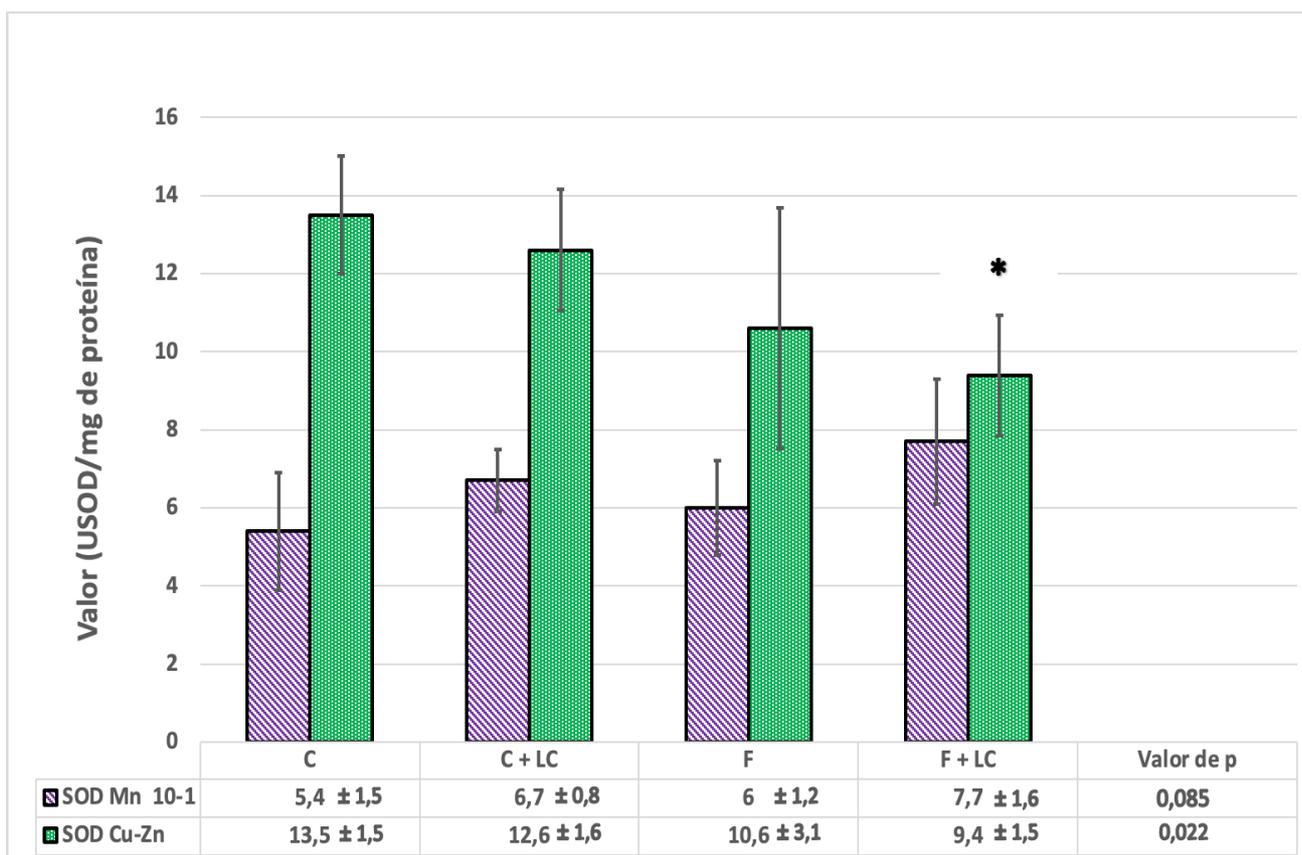
^a $p < 0,05$ comparado al grupo F.

Figura 6. Niveles de insulina plasmática y pancreática de los grupos del estudio.

4.4 Medición de la actividad específica del Superóxido dismutasa en el hígado

La actividad específica de SOD Cu/Zn mostró diferencia significativa entre los cuatro grupos del estudio ($p = 0,02$). El tratamiento con LC en el grupo F+LC reveló disminución significativa de 30,5 % en comparación al grupo C ($p < 0,05$). De igual manera, se pudo observar que el consumo de fructosa en el grupo F produjo en la actividad específica del SOD Cu/Zn una disminución en 21,5 % ($p > 0,05$) en comparación con el grupo C.

La actividad enzimática de SOD-Mn no mostró diferencia significativa dentro los cuatro grupos del estudio ($p = 0,085$). Asimismo, se mostró que la administración de LC, en la actividad de SOD Mn en el grupo C+LC aumentó en 24 % ($p > 0,05$) en comparación al grupo C y así como, en el grupo F+LC aumentó 28,3 % ($p > 0,05$) en comparación con el grupo F. En la figura 7 es evidente el cambio compensatorio que se dio en ambas partes, mientras a nivel posmitocondrial se observó disminución de la actividad, a nivel mitocondrial se reportó aumento de esta.



Grupo C: control, **Grupo C+LC:** control+L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F+LC:** fructosa+L-carnitina

Resultados expresados en promedio ± desviación estándar

SOD-Mn : Superóxido dismutasa Mn (fracción mitocondrial)

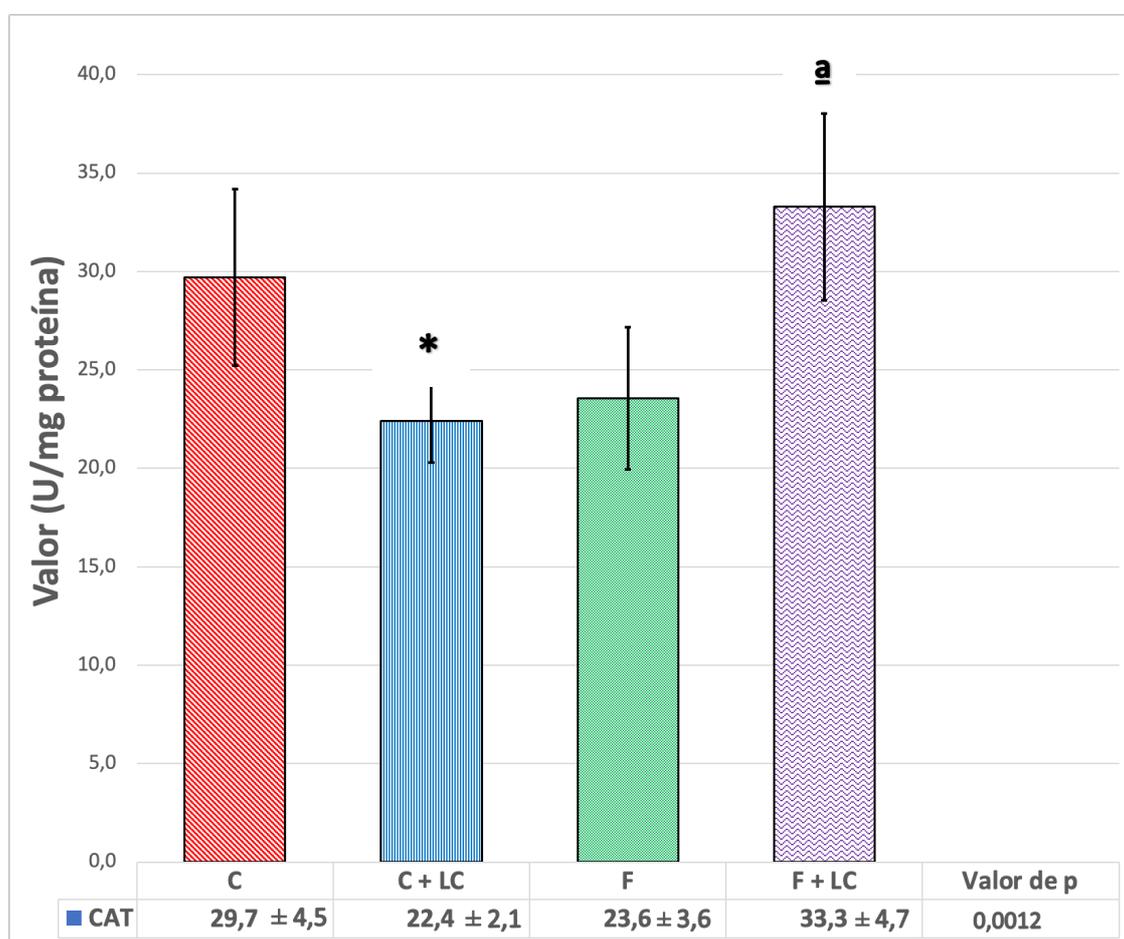
SOD Cu/Zn : Superóxido dismutasa Cu/Zn (fracción posmitocondrial)

Prueba ANOVA. Estadísticamente significativo * $p < 0,05$ frente al grupo C.

Figura 7. Actividad específica del superóxido dismutasa en el hígado.

4.5 Medición de la actividad específica de la Catalasa en el hígado

En la actividad específica de CAT se encontró diferencia significativa entre los grupos del estudio ($p = 0,0012$). En la evaluación de pares, la ingesta de fructosa condujo a un descenso en 20,7 % ($p > 0,05$) en el grupo F frente al grupo C. El tratamiento con LC en el grupo C+LC demostró una disminución significativa en 24,6 % ($p < 0,05$) en comparación al grupo C; en contraparte provocó un incremento significativo en 41,3 % en el grupo F+LC frente al grupo F ($p = 0,013$) (figura 8).

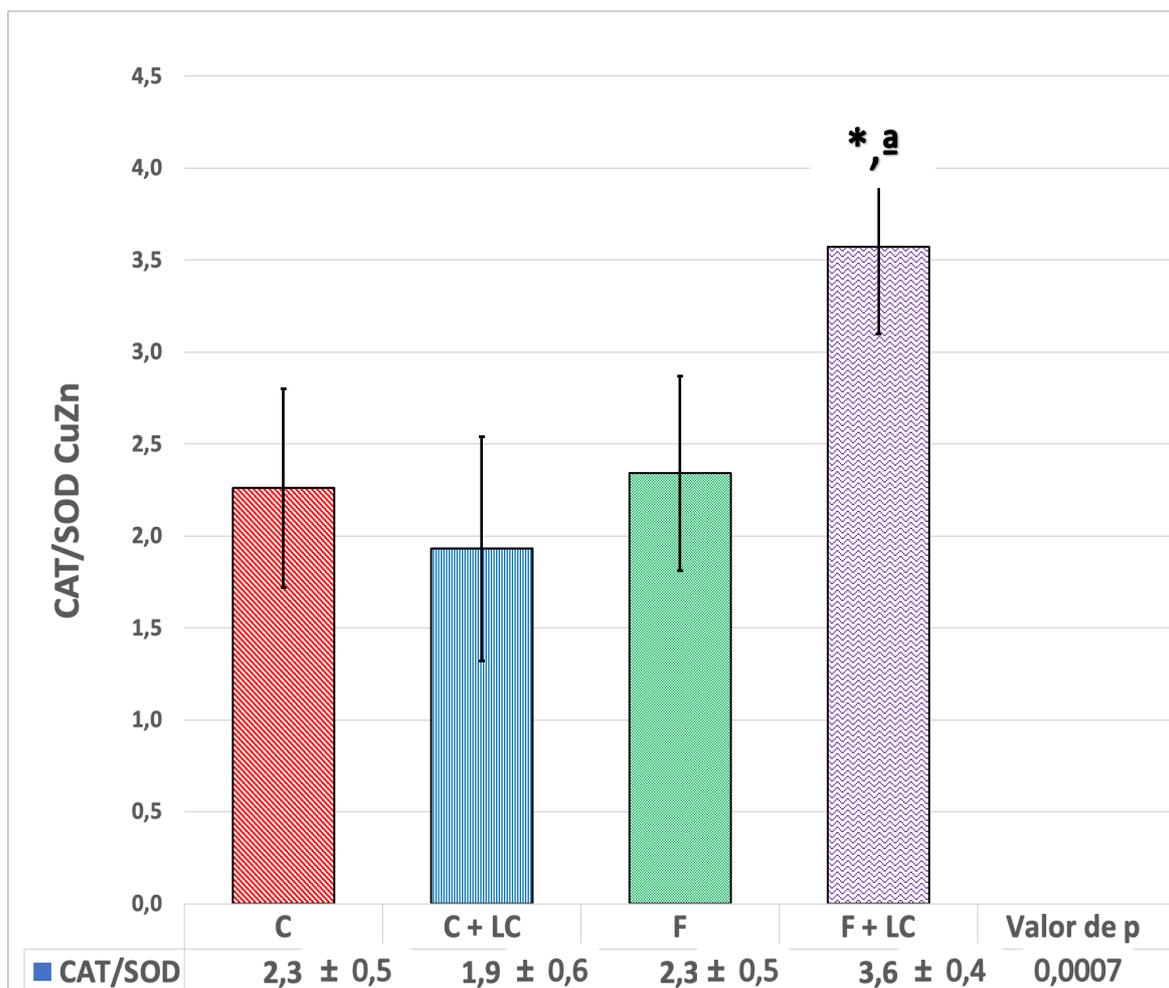


Grupo C: control, **Grupo C+LC:** control+L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F+LC:** fructosa+L-carnitina
 Resultados expresados en promedio \pm desviación estándar
 Prueba ANOVA. Estadísticamente significativo * $p < 0,05$ comparado al grupo C.
^a $p < 0,05$ comparado al grupo F.

Figura 8. Actividad específica de la catalasa en el hígado

4.6 Relación entre CAT/SOD

En la relación entre CAT/SOD se observó diferencia significativa entre los grupos estudiados. En la evaluación por pares, se mostró el incremento significativo en el grupo F+LC en 57 % ($p = 0,015$), en 57 % ($p = 0,012$) y 89 % ($P = 0,001$) frente al grupo F, al grupo C y al grupo C+LC, respectivamente (figura 9).



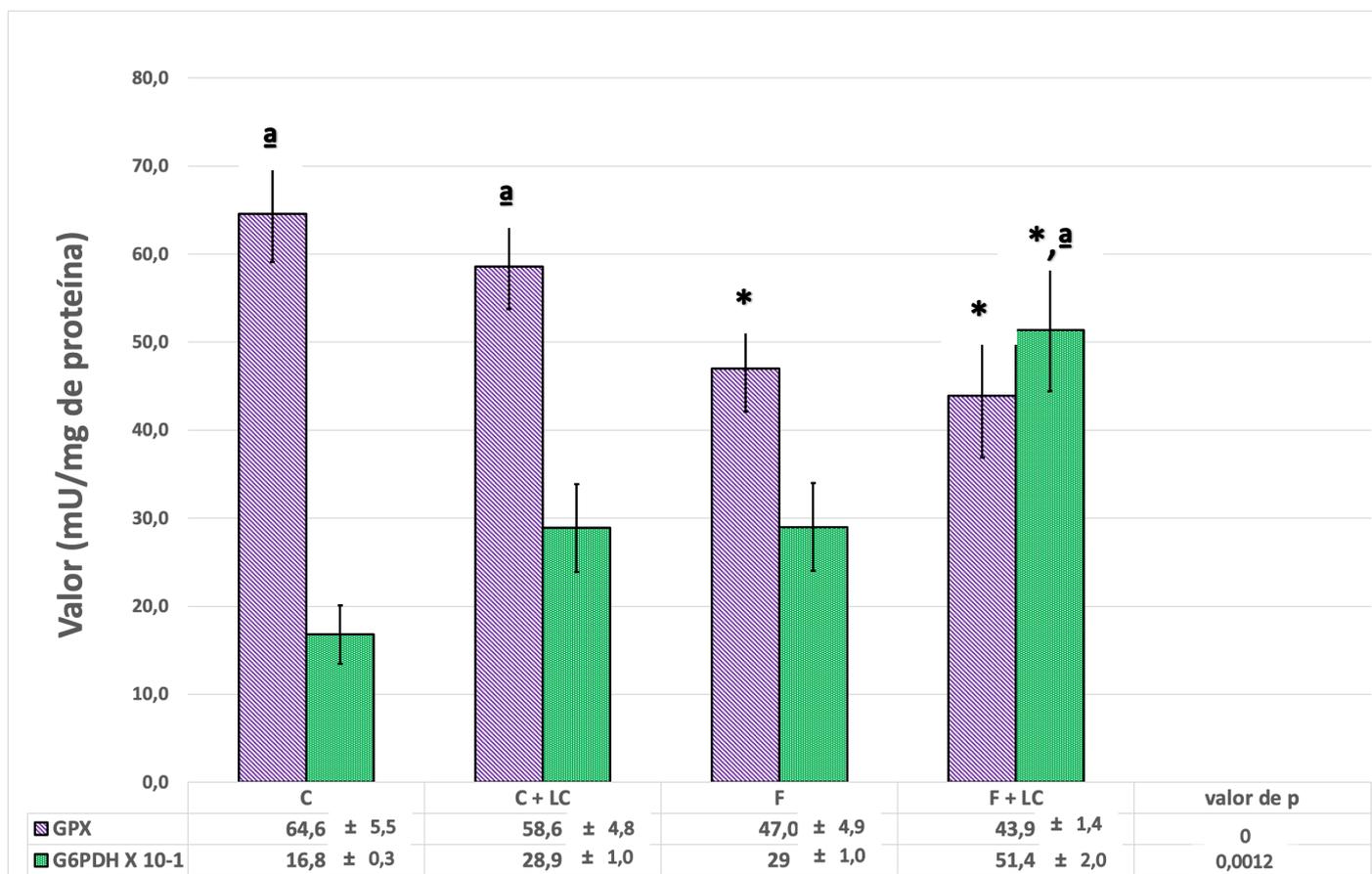
Grupo C: control, **Grupo C+LC:** control+L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F+LC:** fructosa+L-carnitina
 Resultados expresados en promedio \pm desviación estándar
 Prueba ANOVA. Estadísticamente significativo * $p < 0,05$ comparado al grupo C.
^a $p < 0,05$ comparado al grupo F.

Figura 9. Relación entre CAT/SOD en los grupos estudiados.

4.7 Medición de la actividad específica de Glutación peroxidasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

En la actividad del GPx se observó diferencia significativa entre los grupos ($p=0$). Así mismo, se observó disminución significativa en 27 % ($p=0$) en el grupo F y en 32 % ($p=0$) en el grupo F+LC, ambos, frente al grupo C. Sin cambio cuando se administró LC. En la actividad específica de la G6PDH, se observó diferencia significativa entre los grupos ($p=0,0012$).

En la evaluación por pares, se mostró que la administración de LC incrementó la actividad de la enzima en 72 % ($p>0,05$) en el grupo C+LC comparado al grupo C y aumentó significativamente en 77 % ($p=0,017$) en el grupo F+LC en comparación al grupo F. También se puede observar que el consumo de fructosa incrementó la actividad enzimática en 72 % ($p>0,05$) en el grupo F en comparación con el grupo C (figura 10).



Grupo C: control, **Grupo C+LC:** control+L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F+LC:** fructosa+L-carnitina
Resultados expresados en promedio ± desviación estándar

Prueba estadística ANOVA. Significativo

* $p<0,05$ comparado al grupo C.

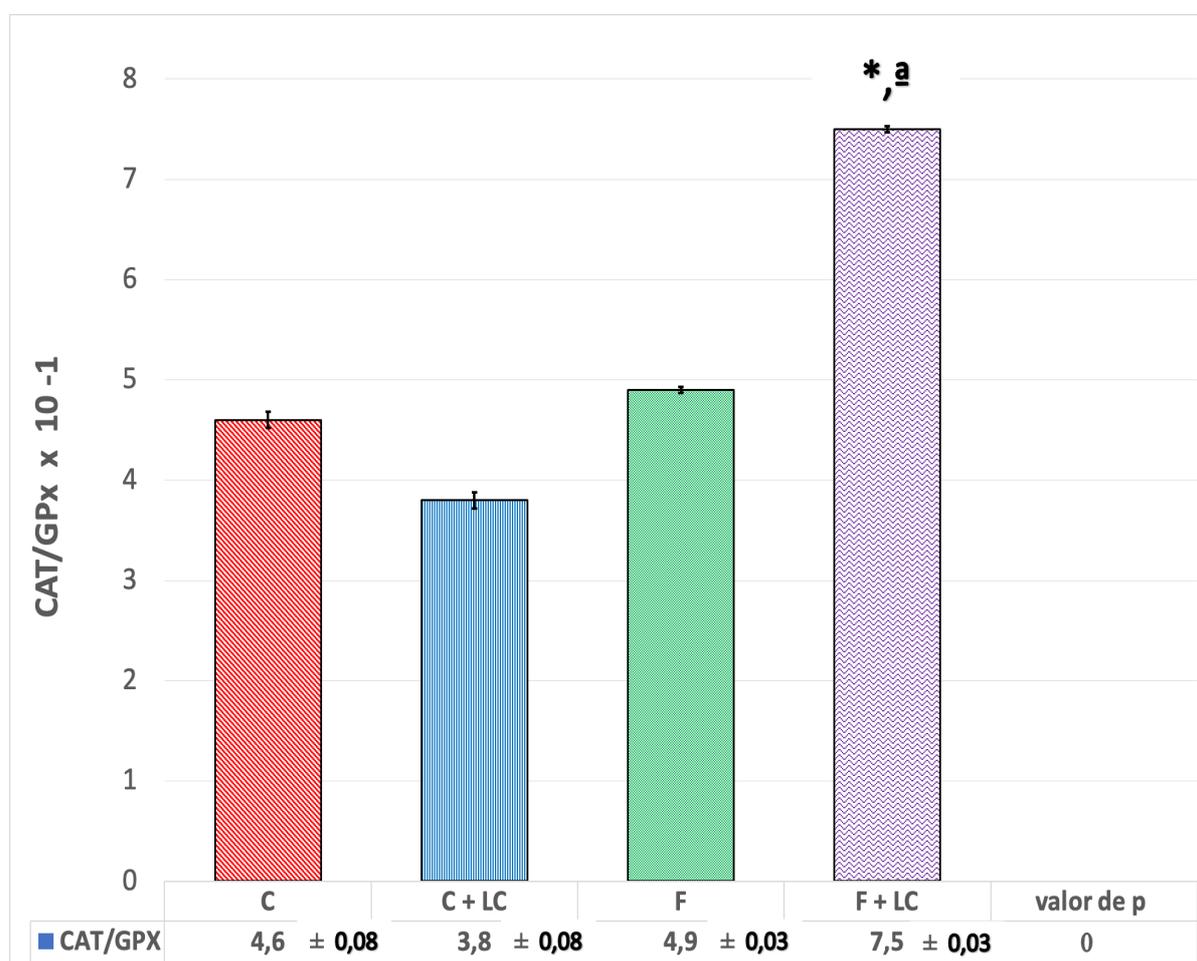
^a $p<0,05$ comparado al grupo F.

Figura 10. Actividad específica de Glutación peroxidasa y actividad específica de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en el hígado.

4.8 Relación entre CAT/GPx

En la relación entre CAT/GPx se observó diferencia significativa entre todos los grupos (figura 11).

En la evaluación por pares, se observó incremento significativo en el grupo F+LC en 53 % (p=0), en 63 % (p=0) y en 98 % (p=0) frente a los grupos F, C y C+CL, respectivamente.



Grupo C: control, **Grupo C+LC:** control+L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F+LC:** fructosa+L-carnitina
Resultados expresados promedio \pm desviación estándar

Prueba ANOVA. Estadísticamente significativo * p < 0,05 comparado al grupo C.

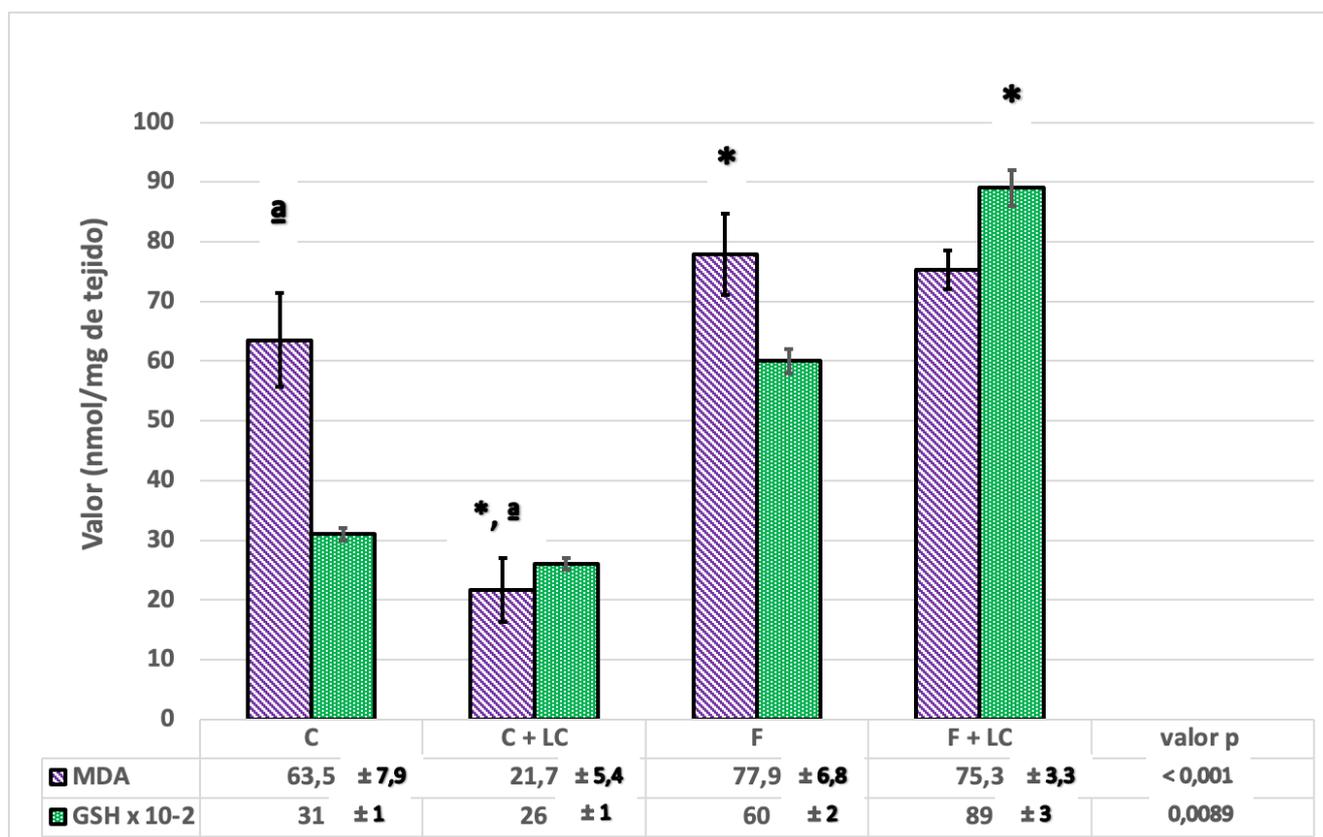
p < 0,05 comparado al grupo F.

Figura 11. Relación entre CAT/ GPx en los grupos estudiados.

4.9 Medición de lipoperoxidación (MDA) y glutatión total.

En la evaluación de lipoperoxidación medido como MDA (TBARS) se observó diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. El consumo de fructosa condujo a un aumento con significancia estadística en 21 % ($p=0,03$) en el grupo F comparado al grupo C. El tratamiento con LC disminuyó la lipoperoxidación de manera significativa en 63 % ($p=0$) en el grupo C+LC comparado al grupo C, sin embargo, no hubo mejora en el grupo F + LC frente al grupo F.

A nivel del GSH total, el uso de fructosa produjo un aumento en 96 % en el grupo F frente comparado con el grupo C. Asimismo, se evidenció aumento significativo en el grupo F+LC de 187 % ($p=0,036$) comparado al grupo C, en 242 % ($p=0,022$) comparado al grupo C+LC y en 45 % ($p>0,005$) comparado al grupo F (figura 12).



Grupo C: control, **Grupo C+LC:** control+L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F+LC:** fructosa+L-carnitina

Resultados expresados en promedio ± desviación estándar

Prueba ANOVA. Estadísticamente significativo * $p < 0,05$ comparado al grupo C.

^a $p < 0,05$ comparado al grupo F.

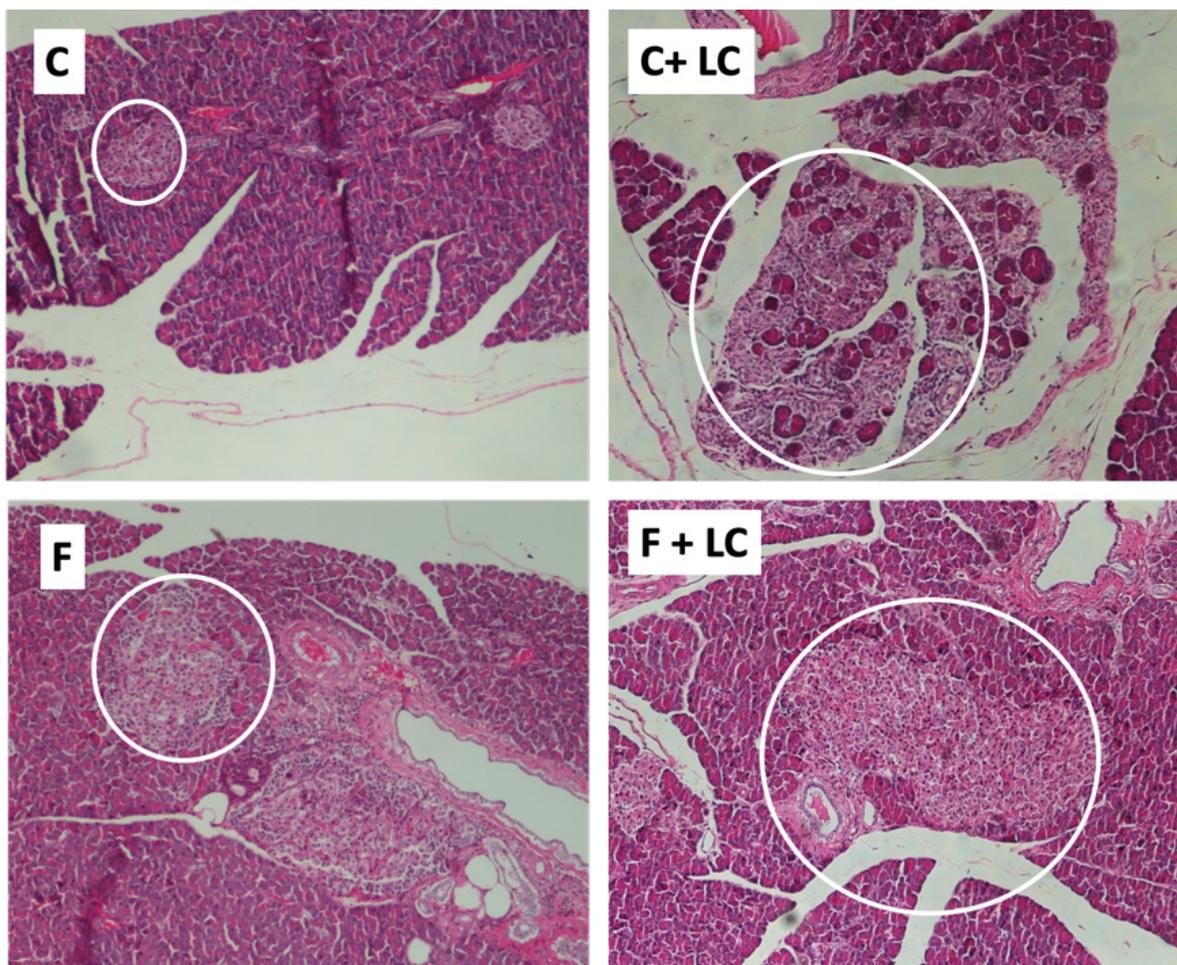
Figura 12. Niveles de MDA (TBARS) y nivel de glutatión total en hígado.

4.10 Evaluación anátomo-patológico:

En el estudio macroscópico, se observó la distribución adecuada de la grasa abdominal y el tamaño estándar de los órganos en las ratas del grupo C y grupo C+LC (anexo 1). Asimismo, el consumo de fructosa incrementó el tejido adiposo en la región abdominal (esta comprendió mesenterio y retroperitoneo), incluso diversos órganos se encontraban rodeados; además de la disminución del tamaño de los órganos, de todos los participantes del grupo F y del grupo F+LC en comparación con los grupos C y C+LC.

En el estudio histológico del páncreas, se evidenció el tamaño de islotes de Langerhans incrementado en 100 % en las zonas alrededor de los vasos sanguíneos en los grupos F y F+LC frente al grupo C.

En todas las muestras del tejido pancreático en el grupo C+LC, se observó aumento de tamaño y número de los islotes de Langerhans, siendo aún mayor en cantidad que los ácinos frente a los otros grupos (figura 13).



Grupo C: control, **Grupo C+LC:**control+L-carnitina, **Grupo F:**fructosa, **Grupo F+LC:**fructosa+L-carnitina
Se visualiza de 2 a 3 islotes de Langerhans en el grupo C, sin otro cambio. Se aprecia aumento de número y tamaño de los islotes de Langerhans en el grupo C+LC. En los grupos F y F+LC se observa aumento en el tamaño de los islotes de Langerhans, mostrando mayor cambio en el grupo F+LC.

Figura 13. Fotomicrografía de cortes de tejido pancreático. Hematoxilina/eosina 10x.

CAPITULO V. DISCUSION

Hoy en día, el consumo de alimentos procesados se ha incrementado, siendo un componente importante la fructosa; esto se inició en 1960, cuando se usó para endulzar bebidas y refrescos; debido a su elevado poder edulcorante^(1,2-1,8) comparado a la glucosa (0,6) y sacarosa (1)⁽⁴³⁾. A pesar de que la fructosa es un azúcar de bajo índice glicémico (IG= 25), su consumo excesivo y el metabolismo propio de este monosacárido produce cambios a nivel bioquímico e histológico y se ha ligado con el desarrollo de obesidad, dislipidemia, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2. El uso de la fructosa como modelo de estrés oxidativo inducido, se utiliza por las alteraciones que genera a nivel metabólico, sérico y tisular, con la formación de gran cantidad de EROS tanto *in vivo* como *in vitro*^(2,3,5,44).

El consumo de fructosa en las primeras 4 semanas en el grupo F produjo un incremento en la variación en el porcentaje de peso en 33 % frente al aumento significativo del grupo C en 63 %, en las siguientes 4 semanas no se reportó tal diferencia (tabla 2). A pesar de ello, en el momento del sacrificio, se pudo observar que los participantes del grupo C, tenían una distribución habitual del tejido adiposo en la parte abdominal y sus músculos esqueléticos se encontraban sin cambios aparentes, en contraparte, en el grupo F se observó que presentaron abundante tejido adiposo en la parte abdominal, incluso sus órganos se encontraban rodeados de abundante tejido adiposo, y sus músculos esqueléticos eran más pequeños en algunas regiones, probablemente estos cambios macroscópicos no permitieron que los pesos varíen en el grupo F (anexo 1).

La administración de fructosa puede generar estos cambios ya que favorece la lipogénesis *de novo*. Esto podría explicarse debido al metabolismo de la fructosa. Esta se absorbe en el enterocito mediante el transportador GLUT 5. El paso de la fructosa desde el epitelio intestinal a la circulación se realiza a través del GLUT 2 en competencia con la glucosa y por circulación enterohepática llega al hígado a través de los transportadores GLUT 2, 8 y 9⁽⁴⁵⁾ para ser fosforilada vía fructoquinasa, que presenta un Km bajo (0,5 mM), permitiendo rápidamente su ingreso y posterior metabolismo.

A nivel intracelular, la fructosa tiene una ruta metabólica propia, este azúcar es transformado a fructosa-1-fosfato mediante la fructoquinasa y luego mediante la actividad de la aldolasa B, se degrada a gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato, de igual manera se isomeriza a gliceraldehído-3-fosfato para ingresar a la glucólisis y obtener piruvato. Una diferencia importante entre las rutas metabólicas de la glucólisis de la

glucosa y de la fructosa, es que la fructosa evita los puntos de control de las enzimas reguladoras hexoquinasa y fosfofructoquinasa-1, que son importantes para mantener el equilibrio energético; por ejemplo, evade la regulación negativa del aumento de la concentración de ATP y de citrato a la fosfofructoquinasa-1. Por este motivo hay incremento de las vías metabólicas de triosas fosfatos no controladas como la glicolisis, la glucogénesis, la gluconeogénesis, la lipogénesis *de novo* y las esterificaciones de ácidos grasos ^(3,46,47).

La fructosa tiene un efecto activador de la piruvato deshidrogenasa hepática, este permite la formación del acetil-CoA a partir de la descarboxilación por oxidación del piruvato, debido a la inhibición de la piruvato deshidrogenasa quinasa ⁽⁴⁸⁾. El acetil- CoA formado ingresa al ciclo de Krebs para obtener ATP, NADH y FADH₂, pero ante una ausencia de demanda energética y sobreabastecimiento de ATP y de acetil-CoA, este se convierte en sustrato del citrato sintasa, la primera enzima del ciclo de Krebs, para salir inmediatamente de la mitocondria en forma de citrato, y en el citosol gracias al citrato liasa se regenera en acetil- CoA.

De igual manera, la fructosa favorece la expresión de SREBP-1c y de ChREBP, factores de transcripción, que permiten la expresión de enzimas que participan en la lipogénesis como acetil-CoA carboxilasa, ácido graso sintasa, etc ⁽³⁾. El acetil- CoA que ha sido restituído es usado como sustrato para la síntesis de ácidos grasos. De otra parte, la dihidroxiacetona fosfato puede convertirse en glicerol-3-fosfato mediante glicerol 3-fosfato deshidrogenasa y ser sustrato para la síntesis de triglicéridos ⁽⁴⁷⁾. La fructosa consumida de forma prolongada puede generar un estado de lipotoxicidad con acumulación de triglicéridos y alteración en el uso de energía en el tejido muscular; así como también a nivel hepático se podría producir esteatosis hepática no alcohólica ⁽⁴⁹⁾.

A pesar del incremento del tejido adiposo en el parte abdominal en el grupo F, que reflejaría una obesidad central, no hubo incremento en la variación en el porcentaje de peso significativa en comparación con el grupo C (tabla 2) por que probablemente hubo una disminución del tejido magro. Es así como, Andrade *et al.*⁽⁴⁴⁾ informaron resultados parecidos, en donde utilizando un modelo de bebida *ad libitum* fructosada al 10 % en ratas Sprague Dawley durante 18 semanas. Asimismo, De Moura *et al.* ⁽⁵⁰⁾ no observó incremento de peso en un tratamiento de fructosa 10 % en la bebida a libre demanda en ratas Wistar durante 8 semanas y Köselér *et al.* ⁽⁵¹⁾ reportaron que tampoco no hubo diferencia en el peso con un tratamiento de fructosa al 10 % y al 30 % durante 6 semanas en ratas Wistar. Sin embargo, Mamikutty *et al.*⁽⁵⁾ evidenciaron incremento en la variación

del peso significativo con un tratamiento de 20 % y 25 % de fructosa durante 8 semanas en ratas Wistar, así como Sandeva *et al.*⁽⁵²⁾ demostraron el incremento significativo de peso en un tratamiento con fructosa al 20 % durante 8 semanas en ratas Wistar. Estos resultados en diferentes investigaciones, también podría ser explicado por las variaciones genéticas que muestran cada cepa de rata, en el presente estudio se usaron ratas Holtzman⁽⁵³⁾.

La administración de LC a los grupos F+LC y C+LC después de la cuarta semana no produjo una variación del porcentaje significativa en el peso comparado con sus pares en la segunda parte del periodo de la investigación (día 28 al día 56), sin embargo, se evidenció que el grupo L+LC solamente subió 14% en comparación con el grupo C que subió 24 % en las últimas 4 semanas (tabla 2), este menor aumento en el grupo C+LC podría deberse a que la LC facilita el ingreso de cadenas largas de ácidos grasos a la mitocondria para poder realizar el proceso de β -oxidación^(8,54).

De igual manera, no hubo diferencia entre los grupos F y F+LC (tabla 2), una explicación a esta situación podría ser que a pesar de no haber variación en el porcentaje de peso, la LC si podría estar produciendo cambios a nivel microscópico en el grupo F+LC, como favorecer una disminución en la lipogénesis hepática y una disminución en la acumulación de depósitos de triglicéridos en el tejido adiposo, tejido muscular esquelético e hígado, así como mejorar las reservas de glucógeno, restablecer el funcionamiento y la contractibilidad del miocito, además de tener una utilización adecuada de energía; probablemente estos cambios se están desarrollando pero no se han reflejado en el cambio de peso en el grupo F+LC⁽⁵⁴⁾.

Diversos estudios reportan estos cambios, Xia *et al.*⁽⁵⁵⁾ realizaron una investigación donde la administración de LC 125 mg/kg y 250 mg/kg vía oral en ratas diabetes mejoró los parámetros de hígado graso con disminución del tamaño y mejoramiento de la función hepática. Asimismo, Rajasekar *et al.*⁽¹¹⁾ mostraron que la administración de LC 300 mg/kg vía intraperitoneal en ratas diabéticas disminuye la acumulación de lípidos en el músculo, de la misma manera que Bin Aleem *et al.*⁽¹⁰⁾ evidenciaron que la administración de LC 200 mg/kg vía intraperitoneal mejora el desempeño y la contractibilidad del musculo esquelético, probablemente por la reposición de la reserva de glucógeno y amplia regeneración de ATP.

En los niveles plasmáticos de colesterol total no se mostró diferencias significativas entre el grupo C y grupo F (tabla 3), resultado similar fue reportado por Mamikutty *et al.*⁽⁵⁾ donde la administración de fructosa 20 % y 25 % durante 8 semanas no modificó los

valores; de igual manera, Lozano *et al.*⁽⁵⁶⁾ informaron que el uso de la fructosa al 25% durante 8 semanas tampoco modificó los niveles. En contraposición a esto, Bulboaca *et al.*⁽²⁾ reportaron que la administración de fructosa al 10 % por 12 semanas incrementó los niveles de colesterol total de manera significativa y De Angelis *et al.*⁽⁵⁷⁾ manifestaron que el consumo de fructosa al 10 % durante 15 días no produjo cambios en los niveles, no obstante, si evidenciaron cambios significativos en 60 días de administración . Siendo probablemente la causa de esta diferencia, el tiempo de administración.

Con la administración de la LC a los grupos C+CL y F+CL se mostró un ligero aumento no significativo en los niveles del colesterol total en comparación con sus pares (tabla 3). Similar situación reportaron Hong *et al.*⁽⁵⁸⁾, sus animales de experimentación fueron ratas Sprague – Dawley de 60 días de edad, a quienes se les administró LC 200mg/kg/24h por vía intraperitoneal durante dos semanas; no evidenciaron disminución de los niveles e incluso observaron ligero incremento de esta. Asimismo, Magesh *et al.*⁽⁵⁹⁾, utilizaron ratones albino Swiss, a los cuales se les administró por vía oral 50 mg/kg/24h y 100 mg/kg/24 h por un periodo de 30 días y no demostraron disminución en los niveles . Otro estudio fue el Mishra *et al.*⁽⁶⁰⁾, utilizaron ratas albino Swiss de 45 días de edad que fueron tratadas con LC 400 mg/kg/24 h y 800 mg/kg/24 h durante 45 días; ellos informaron que luego de ese periodo las ratas que usaron la dosis más bajas no presentaron cambios significativos, en cambio, las que usaron la dosis más alta si presentaron disminución significativa de los niveles de colesterol. Otra investigación fue la de Tanaka *et al.*⁽⁶¹⁾, utilizando ratas Fisher de 3 meses y 19 meses de edad bajo un periodo de 3 meses de tratamiento con LC 100 mg /kg/ 24h; hallaron que las ratas más jóvenes después de la administración del tratamiento no presentaron disminución de los niveles, mientras que las ratas mayores si presentaron disminución significativa.

Con estas investigaciones y los resultados presentados, puede deducirse que la edad de los animales de experimentación es un factor importante, debido a que los sistemas antioxidantes son más eficientes; y el efecto de la LC en animales con mayor edad es más evidente debido a que con la edad aumentan las reacciones oxidativas y mayor grado de dislipidemia como se pudo presentar en el trabajo de Tanaka *et al.*⁽⁶¹⁾ Los animales de experimentación de este estudio tenían 2 meses de edad, similar al estudio mencionado. En la presente investigación, el consumo de fructosa al 40 % *ad libitum* no alteró la glicemia en ayunas por un periodo de 2 meses en ratas Holtzman (tabla 2). Similar resultado informaron Andadre *et al.*⁽⁴⁴⁾, ellos administraron la fructosa al 10 % a libre demanda por un periodo de 18 semanas en ratas Sprague-Dawley, lo cual es explicable

por su bajo IG y su proceso de absorción. De igual modo, Baena *et al.*⁽⁶²⁾ reportaron que no hubo cambio en la glicemia con el consumo de fructosa al 10 % durante 2 meses en ratas Sprague-Dawley. Al contrario de estos resultados, Mamikutty *et al.*⁽⁵⁾ evidenciaron el incremento de la glucosa en plasma en ayunas utilizando fructosa al 20 % y 25 % durante 2 meses en ratas Wistar. También, reportaron Bulboaca *et al.*⁽²⁾ que usando la fructosa al 10 % se provocó aumento de glicemia en ayunas en ratas Wistar por un periodo de 10 semanas. Como antes se mencionó, la fructosa evade dos puntos de regulación importante que limitan la velocidad del metabolismo de la glucosa teniendo como resultado un mayor cantidad de sustrato que permite la activación de varias vías metabólicas (glucolisis, glucogenogénesis, gluconeogénesis, lipogénesis de novo, así como la esterificación de los ácidos grasos), además la formación de lactato; por lo cual no incrementaría la glucemia post-prandial como si lo haría la ingesta de grandes cantidades de glucosa^(3,47).

La dieta rica en fructosa tampoco modificó los niveles de insulina plasmática en los diferentes grupos de la investigación (figura 6), probablemente debido a que la fructosa no modificó notoriamente la glicemia; además, la fructosa no es un sensor en las células β -pancreáticas y esto debido a la ausencia GLUT 5, y la homeostasis del metabolismo de fructosa no depende de la insulina^(5,14).

Otro resultado obtenido en la investigación es que no hay diferencia significativa en el valor de HOMA-IR entre los grupos (tabla 3), siendo este un parámetro de resistencia a la insulina; sin embargo, un resultado para tener en cuenta es que el consumo de fructosa evidenció incremento de este parámetro en 28,3 % en el grupo F en comparación al grupo C. Con estos resultados se podría proponer que si se consume por más tiempo la fructosa, este podría producir resistencia a la insulina como lo reportan otros estudios^(2,3,5,52,63).

Como se ha explicado previamente el consumo crónico de fructosa genera incremento de lipogénesis *de novo* con aumento de depósitos de triglicéridos en diferentes órganos; asimismo, diversos estudios han evidenciado la asociación entre la acumulación de los depósitos de lípidos en el hígado y la resistencia a la insulina, siendo un factor determinante la formación y acumulación de los ácidos grasos, siendo precursores de ceramida, diacilglicerol y triglicéridos⁽⁶⁴⁾.

Si esto continua por tiempo prolongado, se produce hipertrofia e hiperplasia de las células del tejido adiposo, lo que conllevaría a provocar la liberación de MCP-1, que tiene como función ocasionar la movilización de macrófagos tipo M1 con excreción constante de moléculas inflamatorias como el TNF- α , IL 1e IL 6, todo este proceso llevaría a un

estado de inflamación crónica ⁽⁴⁹⁾. En este contexto, también se ha evidenciado que los ácidos grasos saturados actúan como ligando de TRL-4 activando el sistema inmune innato y favoreciendo la producción de ceramida, ya que aumenta la actividad de la esfingomielinasa ⁽⁶⁵⁾.

Hasta este punto es importante recordar la vía de señalización de la insulina mediante el cual se da la liberación del GLUT 4 en tejido muscular y tejido adiposo para el ingreso de glucosa. La insulina se une a su receptor tirosina kinasa. Este receptor se autofosforila y fosforila al IRS-1 en residuos de tirosina, activando a PI3K, que es un heterodímero que está formado por una subunidad reguladora y una subunidad catalítica, permitiendo la formación de PIP3, ella sirve de sitio de unión en la membrana para las cinasas como AKT/PKB, permitiendo la fosforilación de la proteína AS160 e inhibiéndola, teniendo como resultado la translocación del GLUT4 a la membrana ⁽⁶⁶⁾.

Uno de los mecanismos propuestos para la resistencia a la insulina es el incremento de la ceramida, mediante el cual aumenta la actividad de la fosfatasa PPA2A, este defosforila a AKT e inhibe su actividad o por un incremento de la actividad de PKC, cuya función es fosforilar a AKT en residuos de treonina, provocando disminución en su actividad ^(64,65). Otro mecanismo propuesto es que TNF- α inhibe la actividad tirosina kinasa del receptor de insulina, bloqueando la cascada de señalización de la insulina ⁽⁶⁷⁾. Cuando se encuentra en un estado de lipotoxicidad, hay mayor movilización de DAG, el cual activa a PKC, este fosforila al IR e IRS en residuos de treonina, provocando disminución en la actividad de la insulina hepática ⁽⁶⁴⁾.

Cuando se administró LC a los grupos F+LC y C+LC, no se observaron cambios notorios en los niveles de glucosa ni en los niveles de insulina, sin embargo, si hubo una reducción no significativa de HOMA-IR en 25,8 % en el grupo F+LC frente al grupo F (tabla 3); LC disminuye la relación acil-CoA/CoA intramitocondrial ya que facilita la oxidación de ácidos grasos, promueve la utilización oxidativa de la glucosa y mejora la sensibilidad a la insulina. También se ha reportado en diversas investigaciones que el LC reduce la acumulación de lípido en el músculo esquelético ⁽¹¹⁾.

Según la investigación realizada por Jiang *et al.* ⁽⁶⁸⁾ el tratamiento con LC favorece la expresión de CPT1 regulada por el factor de transcripción PPAR- γ , aumentando el proceso de β -oxidación. De igual forma, Ringseir *et al.* ⁽⁶⁹⁾ realizaron una revisión de seis investigaciones en ratas, en las cuales la LC disminuyó el nivel de glucosa y el nivel de HOMA-IR. La reducción obtenida de HOMA-IR en el estudio permite suponer que la LC

mejora la resistencia a la insulina, como se propone en diferentes estudios y sería más significativo el resultado si se prolonga más el tiempo de tratamiento.

Una explicación adicional de la falta de incremento en el nivel de la insulina plasmática en el grupo F (figura 6) podría ser que la sobrecarga metabólica causada por el consumo de fructosa trajo como consecuencia aumento de ATP y disminución de ADP, lo cual provocaría la inhibición de la cadena transportadora de electrones mitocondrial e incremento de generación de EROs. Este ambiente oxidativo favorece la expresión de UCP2 con la finalidad de regular los niveles de EROs, lo que posibilita el ingreso de protones al interior de la mitocondria, evitando la generación de ATP, que es utilizado por los canales K-dependientes de ATP para despolarizar la membrana de las células β del páncreas y favorece la liberación de la insulina; teniendo todo esto como consecuencia final que no se libere la insulina. Esto fue evidenciada por Castro *et al.*⁽⁷⁰⁾ en un estudio con consumo de fructosa al 10 % en la bebida en ratas Wistar durante 21 días, en donde demostraron el incremento de la expresión de UCP-2.

En el páncreas, la utilización de fructosa ocasionó un notorio descenso del valor de insulina en el grupo F (figura 6). Probablemente esta situación es debido al estado de inflamación crónica en que se encuentra, por el incremento de la lipogénesis; como se explicó anteriormente, hay aumento de la liberación de diversas citoquinas como por ejemplo el TNF- α . Esta citoquina permite la activación de las vías de señalización de NF- κ B, MAPK y AP-1, importantes factores de transcripción que permiten la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias^(71,72).

Otra función del TNF- α es producir muerte celular programada, uniéndose a su receptor TNFR1, se activa la vía extrínseca de la apoptosis, que lleva a la ruptura de Bid (proteína de la familia Bcl-2), el cual se transloca a la mitocondria y genera un cambio de potencial de membrana con la liberación de citocromo c, lo que provoca la activación de la vía intrínseca provocando la muerte de las células β del páncreas⁽⁷³⁾.

Asimismo, Maiztegui *et al.*⁽⁷⁴⁾ reportaron aumento del porcentaje de apoptosis, lo que provocó disminución de la masa de células β -pancreáticas; en su investigación utilizaron fructosa al 10 % a libre demanda por un período de 3 semanas. De igual manera lo hizo Malakumar *et al.*⁽⁷⁵⁾, ellos realizaron un estudio en ratas Wistar con un modelo de dieta rica en fructosa (65 % de las calorías de la dieta provenía de la fructosa) durante 4 meses, en donde evidenciaron disminución de las células β -pancreáticas debido a un aumento de expresión de caspasa 3.

Por otro lado, se observó el aumento en el tamaño de los islotes de Langerhans en la histología (figura 13). Esto puede ser debido a que probablemente las otras células de los islotes de Langerhans (células α , δ , F y G) son inducidas a aumentar de tamaño o número como efecto compensatorio, así lo reportó Asghar *et al.*⁽⁷⁶⁾ donde la ingesta de dieta rica en fructosa provocó aumento de la expresión de GLUT 5 y proliferación de las células α de los islotes de Langerhans .

Para contrarrestar este modelo de estrés inducido por el consumo de fructosa, se le administró LC, lo que permitió una recuperación del 100 % del nivel de insulina en el páncreas en el grupo F+LC frente al grupo F, este resultado daría un indicio del rol importante que tiene la LC a nivel pancreático. En contraste, la LC tuvo un comportamiento totalmente diferente en el grupo C + LC, ya que se evidenció un marcado incremento de 387 % en el nivel de insulina en la muestra de tejido pancreático, además de un mayor número y tamaño de los islotes de Langerhans, siendo por áreas mayor número de islotes que de los ácinos, todo esto en comparación con el grupo C (figura 6). Varias investigaciones reportaron que el tratamiento con LC inhibe la muerte celular programada. Una de ellas, fue la realizada por Bonomini *et al.*⁽⁷⁷⁾, donde hicieron una revisión de diversas investigaciones sugiriendo que la LC podría influir en la eritropoyesis al inhibir la apoptosis de las células precursoras, mediante el bloqueo de la caspasa 3. De igual manera, Agarwal *et al.*⁽⁷⁸⁾, después de analizar diversas investigaciones, informaron que el tratamiento con LC inhibió la caspasa 3, 7 y 8; del mismo modo, es capaz de controlar las proteínas supresoras de tumores, y de esa manera favorecería la supervivencia del ovocito y mejoraría la fertilidad en la mujer.

Otra es la realizada por Cao *et al.*⁽¹⁸⁾, donde informaron en su investigación *in vitro*, que la administración de LC ayuda a la reducción del ratio Bax/Bcl-2, que son moléculas pro-apoptóticas y suprimen la expresión de la caspasa 9 y 3 en células ganglionares retinales, además de disminuir la producción de EROs e inhibir la lipoperoxidación.

Asimismo, Mutomba *et al.*⁽⁷⁹⁾ realizaron su estudio *in vitro*, sus datos mostraron la capacidad de la LC para inhibir la actividad de las caspasas en varios puntos de la vía ligando Fas, siendo una de ellas, la caspasa 8; además inhibió la escisión de los sustratos de las caspasas. Otro trabajo de investigación reveló que el uso de la LC favoreció la expresión de p21, que se relaciona con la detención del ciclo celular, permitiendo que el ADN se repare si presenta algún tipo de daño e inhibiendo la apoptosis⁽⁸⁰⁾. En un reciente estudio realizado por Koohpeyma *et al.*⁽⁸¹⁾, se evidenció una reducción de la expresión génica de la caspasa 9 y un aumento de la expresión génica de BCL-2, ambos

significativos, debido a la administración de LC 100mg/kg/24h durante 6 meses a ratas Sprague-Dawley. La presencia de la LC disminuye los niveles de IL6, TNF- α y COX - 2, debido a la inhibición de NF- κ B, el cual favorece la transcripción de estos genes, de ese manera ayuda a evitar la apoptosis y la inflamación, según Jiang *et al.*(68).

Por todo lo descrito por los diferentes investigadores y los hallazgos del presente estudio, se podría pensar que la administración de LC inhibe la muerte celular programada de las células β del páncreas, con lo cual se provocó que el nivel de insulina en el páncreas incrementará de forma significativa en el grupo C+LC, en tanto, en el grupo F+LC no fue tan alto, a causa del daño previo. La administración con LC favorece la estabilidad de la membrana debido a su participación en la acetilación de los fosfolípidos de la membrana y a su naturaleza antipática ⁽⁸²⁾, mejora notoriamente la acumulación de ácidos grasos de cadena larga alrededor de las mitocondrias, pudiendo inhibir la despolarización y la permeabilidad de la membrana mitocondrial, teniendo como consecuencia menor liberación de citocromo c, evitando la apoptosis ⁽⁸³⁾.

En consecuencia, la suplementación con LC, sobretodo en el grupo C+LC, favoreció mayor nivel de insulina pancreática sin modificar la insulina plasmática. Este resultado obtenido podría explicarse no solamente por la inhibición de la apoptosis sino también porque la LC favorece la proliferación de las células β del páncreas y la síntesis de insulina.

El contenido de insulina en las células β -pancreáticas es muy dinámico, depende del estado nutricional de la célula, así como de una regulación transcripcional. Diversos factores regulan la expresión del gen de insulina como PDX1, que es un transactivador que se une al elemento TATA en la zona promotora del gen de la insulina y MafA que es un factor de transcripción que cuando se une RIPE3b, elemento potenciador, regula la expresión del gen de insulina ⁽⁸⁴⁾.

El estudio de Baumel-Alterzon *et al.*⁽⁸⁵⁾ evidenciaron que una disminución de los niveles de Nrf2 produjo una disminución de los niveles de insulina, además, esos hallazgos se correlacionaron con una disminución de la expresión de ARNm de PDX1 y MafA. Ellos concluyeron que el Nrf2 aumenta la proliferación y la masa de las células β -pancreáticas con lo cual aumenta la síntesis de la insulina y sería probablemente una diana terapéutica. Diversos estudios refieren que la LC aumenta la expresión de NRF2 ^(18,86,87), de esa manera se puede presumir que favorece la proliferación de las células β -pancreáticas así como aumento de síntesis de insulina.

A nivel hepático, los valores de la LC libre se incrementaron significativamente en 21,5 % debido a la aplicación de LC en el grupo F+LC en comparación al grupo C. Sin embargo, se reportó que el tratamiento con LC no mostró un aumento significativo en sus pares comparativas (tabla 3). Una explicación que puede plantearse es que, en situaciones metabólicamente estables como en el que se encuentra el grupo C+LC, los valores de la LC libre no varían notoriamente; empero, el comportamiento podría cambiar en situaciones patológicas como en el que sucede en el grupo F+LC; debido al incremento de la formación de EROs, la LC administrada actúa como *scavenger*, sin evidenciar incremento marcado de los niveles en el grupo F+LC frente al grupo F. Esto se apoya en el trabajo de investigación de Gülçin⁽⁸⁸⁾; en el cual concluye que la LC *in vitro* trabaja como *scavenger* de los EROs: peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radical hidroxilo; asimismo actúa favoreciendo la quelación del ion Fe^{+2} , sugiriendo que se puede dar entre el ion ferroso y los grupos hidroxilo y carboxilato. La LC gracias a su grupo carbonilo, podría darle estabilidad a los EROs en la posición α mediante conjugación⁽⁸⁹⁾.

De igual manera, diversas investigaciones refieren que la LC actúa como *scavenger* con propiedades antioxidantes^(35,90-92). En esta situación de estrés oxidativo, otro factor que podría haber influenciado es el informado por Chang *et al.*⁽⁹³⁾, ellos manifiestan que el transportador de carnitina OCTN-2, puede ser destruido por radicales libres, situación que evidenciaron cuando el nivel de expresión de OCTN-2 disminuyó en la hepatitis aguda, y eso podría provocar un absorción incompleta.

En el modelo de estrés oxidativo provocado por el consumo de fructosa, hay una gran de producción de EROs y disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes; esto ha sido reportado por varias investigaciones^(3,4,14,23,47,52,56,63). La fructosa cuando ingresa a nuestro organismo en su ruta metabólica de oxidación, continúa hacia a la formación de piruvato e ingresa al ciclo de Krebs, produciéndose gran cantidad de NADH y FADH₂, que son donadores de electrones; cuando ellos van a la cadena transportadora de electrones generan grandes cantidades de O²⁻ y este cuadro podría acentuarse más en un estado de sobrenutrición, donde también se incrementa la actividad de NADPH oxidasa, con producción de ROS⁽²³⁾. En el estudio de Furukawa *et al.*⁽⁹⁴⁾ informaron que se presentó aumento de la actividad enzimática de NADPH oxidasa en tejido adiposo de pacientes obesos asociado a un descenso de la expresión de enzimas antioxidantes, generando fácilmente estrés oxidativo.

En condiciones fisiológicas, el sistema antioxidante se encuentra estable y es regulado por factores de transcripción que controlan el sistema redox celular⁽²³⁾. Así como el factor transcripción Nrf-2 que se encuentra unido al inhibidor Keap1, y en condiciones basales, este complejo es ubiquitinizado y degradado por el proteosoma; en situaciones de estrés, Keap-1 se oxida en sus residuos de cisteína, en los sitios tiólicos, liberando al Nrf-2, con lo cual se trasloca al núcleo para transcripción de enzimas antioxidantes⁽⁹⁵⁾. Cuando hay una sobreproducción de EROs, se puede interferir con esta vía⁽⁹⁶⁾.

En diferentes investigaciones se ha informado que el uso de fructosa por tiempo prolongado puede alterar el sistema antioxidante, enzimático o no enzimático, con disminución de actividad de SOD, CAT, GPx y modificación de actividad de glutatión reductasa con incremento de los niveles de MDA^(2,11,18,23,63) y disminución sobre todo del nivel de GSH, esto asociado a lo descrito anteriormente genera estrés oxidativo.

Una de las primeras enzimas que responde ante esta agresión es SOD, que cataliza la dismutación del anión superóxido. Se pudo observar un comportamiento acoplado entre la SOD Cu/Zn y la SOD Mn; mientras que la primera disminuye, la segunda aumenta (figura 7). Así como lo reporta Suzuki *et al.*⁽⁹⁷⁾, cuando hay una sobreproducción de EROS, este puede provocar la inhibición de la actividad de SOD Cu/Zn e incremento de la actividad de SOD Mn, posiblemente como una respuesta adaptativa al incremento de EROS. Asimismo, Case⁽⁹⁸⁾ refiere que el SOD Mn es la forma más antigua de SOD y que ha evidenciado ser la más crítica para la supervivencia celular en estrés oxidativo.

Debido a la afectación del sistema antioxidante, la administración de la LC, como ya se mencionó al inicio favorece el proceso de β -oxidación, aumentando la proporción CoA/acetil-CoA en la mitocondria por la formación de acetil-LC con ayuda de la carnitina acetiltransferasa, saliendo por carnitina/acetilcarnitina translocasa; esto demuestra que la LC actúa como un transportador de grupos acetilos de la mitocondria al citosol y posteriormente puede ir al núcleo. Estos grupos acetilos son utilizados en los mecanismos de acetilación de proteínas o histonas generando cambios post-traduccionales, así como cambios epigenéticos^(99,100). Según Kerner *et al.*⁽¹⁰¹⁾, el tratamiento con acetilcarnitina *in vivo* aumentó la acetilación de proteínas mitocondriales previamente acetiladas o no acetiladas, siendo una de ellas la SOD Mn. Podría proponerse que la acetilación favorecería una mayor actividad enzimática.

Otro hallazgo en el estudio es el aumento significativo de valores de proteínas a nivel mitocondrial y posmitocondrial (proteínas citosólicas, microsomales, peroxisomales y lisosomales) que se observó en el grupo C+LC debido a la administración de la LC en

comparación al grupo C. De igual manera, en el grupo F se halló incremento en 22 % (proteínas totales mitocondriales) y en 16 % (proteínas totales posmitocondriales), aunque no significativo en comparación al grupo C. Sin embargo, la administración de LC al grupo F+LC no mostró incremento significativo, solo puede observar un leve aumento en ambos parámetros (tabla 3). Con estos resultados obtenidos se propone que la LC se comporta como un regulador de la actividad enzimática, además de favorecer la síntesis proteica, siendo uno de ellos, las enzimas antioxidantes.

En esta situación de estrés, también hay gran producción de H_2O_2 ; para este ERO se tiene un sistema antioxidante compuesto de catalasa, glutatión peroxidasa, peroxirredoxinas, tioredoxina y glutatión; siendo CAT, la vía principal de eliminación del peróxido de hidrógeno. En esta investigación se evidenció que la bebida con fructosa al 40 % a libre demanda generó una disminución en 20 % de la actividad enzimática de la CAT en el grupo F frente al grupo C (figura 8), esto podría ser por una inhibición directa de los EROs como el H_2O_2 , anión superóxido o radical hidroxilo ⁽¹⁰²⁾ o disminución de la expresión de mRNA de CAT.

Esta propuesta puede ser apoyado por el estudio por Lopes *et al.* ⁽¹⁰³⁾, quienes usando ratas Wistar administraron fructosa subcutánea 0.9 mg/g de peso en una dosis, mostrando la disminución de la actividad enzimática de CAT y sugiriendo que esta disminución es probablemente causada por una saturación de la enzima o inhibición directa por los EROs. De igual forma, Cavarape *et al.* ⁽¹⁹⁾ reportaron que el consumo de una dieta rica en fructosa (60 % de las calorías de la dieta) durante dos semanas en ratas Wistar provocó disminución significativa de la expresión mRNA de CAT.

Cuando se les dio como tratamiento LC al grupo F + LC, se reportó un incremento significativo de su actividad (figura 8), situación similar fue hallada por Yildirim *et al.* ⁽⁹⁾, donde evidenciaron el incremento de la actividad de CAT cuando se administró 100 mg/kg/24 h de LC durante 20 días en ratas hipertiroideas. En el estudio realizado por Li *et al.* ⁽¹⁰⁴⁾, provocaron estrés oxidativo con el uso de H_2O_2 en células hepáticas *in vitro*, observando que la administración de LC atenuaba la inhibición de la actividad y la disminución de la expresión de SOD y CAT provocada por el H_2O_2 , además informaron el incremento de la expresión de PPAR- α . Por otro lado, Tomaya *et al.* ⁽¹⁰⁵⁾ refieren que ligandos unidos a PPAR- α activan a CAT, con lo cual disminuye el nivel de H_2O_2 extracelular previniendo la fibrosis hepática. PPAR son una gran familia de receptores nucleares, que se unen con RXR formando un heterodímero; el dímero interactúa con

elemento de respuesta proliferador peroxisomal (PPRE) activando la transcripción de diversos genes ⁽¹⁰⁶⁾.

Con estas investigaciones, se propone que la LC pudiera incrementar la expresión de PPAR- α y de esta manera aumentaría la expresión y actividad de CAT. En cambio, cuando administramos LC al grupo C+LC, se evidencia una disminución significativa de la actividad enzimática y probablemente debido a que no hay una situación de estrés, por ende, no hay gran producción de H₂O₂ y no es necesario aumento de su actividad que si se observa en el grupo F+LC.

El consumo de fructosa al 40 % durante 2 meses no modificó la relación CAT/SOD hepática comparado con el grupo C (figura 9), probablemente la razón es que el consumo de fructosa provocó una disminución de la actividad de CAT y de la actividad de SOD, probablemente debido a una disminución en su síntesis, inactivación directa por los EROs o incluso por la glicación de proteínas. Un resultado diferente fue obtenido por Sözmen *et al.* ⁽¹⁰⁷⁾, donde evaluaron a 162 pacientes, diabéticos y controles, donde se determinó un incremento significativo de la relación CAT/SOD plasmática en diabéticos comparado al control, debido a un aumento de la actividad de CAT y disminución en la actividad de SOD; ellos proponen que probablemente este cambio fue debido al estrés oxidativo, sobretodo por el peróxido de hidrógeno, que induce la actividad de la CAT y reduce la actividad de la SOD.

Después de la administración de LC al grupo F+LC, se observó un incremento marcado de la relación (figura 8), ya que se evidenció que hay un mayor aumento de actividad de CAT en comparación de SOD, probablemente la LC favoreció la expresión de SOD, pero esta pudo ser inhibida por los EROs, en cambio, también hubo un incremento de la expresión de CAT asociado a otros sistemas antioxidantes que también degradan al H₂O₂ como el GPx, tioredoxina, GSH o peroxiredoxinas, y de esa forma evitando que el H₂O₂ inhiba a la enzima.

Otro mecanismo antioxidante de primera línea es el GPx, que permite la degradación del H₂O₂ o peróxidos orgánicos. Con el consumo de fructosa, en el presente estudio se reportó una reducción significativa de la actividad enzimática como lo reporta también Germoush *et al.* ⁽⁶⁾, con una dieta rica en fructosa al 30 % produjo disminución de la actividad enzimática de GPx y de SOD. Para tratar de disminuir el estrés oxidativo, se incrementaría la actividad del GPx en respuesta compensatoria, utilizando al glutatión para esta acción. Sin embargo, esta enzima podría ser inactivada por sus propios sustratos cuando hay en elevadas cantidades ^(102,108), así también se debe recordar que la fructosa puede glicar

proteínas y modificar su actividad enzimática ⁽¹⁰⁹⁾, siendo estas situaciones las causas que podrían explicar los resultados disminuidos en la actividad enzimática del GPx en el grupo F comparado al grupo C (figura 10).

Cuando se administró LC, no se evidenció mejora en la actividad enzimática en el grupo F+LC frente al grupo F (figura 10), esto difiere con otros estudios de estrés oxidativo causado por diversas enfermedades, donde si se evidenció que si que hay aumento en su actividad ^(7,9,110,111). Es así como, ElGendy *et al.*⁽¹¹¹⁾ elaboraron un estudio en ratas diabéticas Sprague Dawley inducido con estreptozotocina; para revertir los efectos de este fármaco, se usó como tratamiento LC 500 mg/kg/24h durante 21 días vía intraperitoneal, observándose mejora significativa en la actividad enzimática. Se plantea que probablemente debido al ambiente oxidativo creado por la fructosa, con la formación de grandes cantidades de peróxidos orgánicos, estos tienen la capacidad de inhibir la actividad enzimática de GPx a pesar del uso del LC, siendo la dosis y la vía de administración un punto importante a considerar, pues la vía peritoneal permite una mayor biodisponibilidad y mayor efecto en comparación a la vía oral (figura 10).

Un punto importante en la regulación del estrés oxidativo es la formación de NADPH, ya que es un agente reductor que es utilizado por diversas enzimas antioxidantes como glutatión reductasa, tioredoxina reductasa, hemooxigenasa y biliverdina reductasa; además forma parte estructural de CAT mejorando su actividad enzimática ⁽²⁸⁾; sin embargo, el NADPH también es usado por la enzimas cetoacil ACP reductasa y enoil CAP reductasa que participan en la formación de ácidos grasos y por la enzima aldosa reductasa en estado de hiperglicemia. La enzima que se encarga principalmente de su producción es la G6PDH.

En la presente investigación, se reportó que el uso de fructosa aumentó en 72 % la actividad de G6PDH (figura 10). Del mismo modo, Francini *et al.*⁽¹⁷⁾, quienes realizaron un estudio en ratas Wistar con fructosa al 10 % durante 21 días, mostrando aumento de los niveles de MDA y aumento de la actividad de G6PDH, disminución de la actividad de SOD, CAT y sin cambio en GPx. Complementariamente, Tchouagué *et al.*⁽¹¹²⁾ elaboraron un estudio donde evidenciaron que en estado de hipertermia hay mayor actividad de Nrf2, factor de transcripción que se activa en situación de estrés oxidativo, con aumento de expresión de peroxiredoxinas, GSH y G6PDH. Adicionalmente, Park *et al.*⁽³⁰⁾ reportaron que en la obesidad hay aumento de la actividad de G6PDH, debido a una mayor expresión de mRNA, con lo cual hay una mayor adipogénesis y lipogénesis. Estos

hallazgos concuerdan con los resultados presentados en este estudio, ya que hay aumento de tejido adiposo y también aumento de la actividad de G6PDH.

Cuando se administró LC al grupo F+LC, aumentó de manera significativa su actividad en comparación al grupo C (figura 10). Se realizó un estudio en peces *Elteobagrus fulvidraco*, a quienes se les suplemento la dieta con carnitina, poniéndose en evidencia el incremento de mRNA de G6PDH, por lo tanto incrementó su actividad, y se le asoció con aumento de la expresión del factor de transcripción PPAR- γ ⁽¹¹³⁾. Asimismo, Li *et al.* ⁽¹¹⁴⁾ realizaron una investigación *in vivo*; en donde reportaron que la LC protegió a las células HL 7702 del daño ocasionado por el peróxido de hidrógeno gracias a la activación de la vía NRF2 mediada por Akt. Otra investigación realizada por Ahmad *et al.* ⁽¹¹⁵⁾ informaron que la sobreexpresión de NRF2 induce a la expresión de enzimas de la vía de las pentosas como G6PDH. Se podría plantear que la LC aumentó la expresión de NRF2 y de PPAR- γ , con lo cual aumentó de transcripción de G6PDH, incrementando el nivel y la actividad de la enzima.

En la figura 10, se puede observar la relación inversa entre GPx y G6PDH, donde se observa la disminución de la primera y aumentó de la segunda. La GPx se encarga de degradar al H₂O₂ y peróxidos orgánicos, mediante el sistema de glutatión, en el cual se utiliza el NADPH, como agente reductor. La G6PDH se encarga de sintetizar NADPH. Por lo explicado debería ser una relación directamente proporcional, sin embargo, es inversamente proporcional. El NADPH, no solo es utilizado por GPx, sino también por otras enzimas como CAT, tioredoxina reductasa, tioredoxina.

La relación CAT/GPx en el grupo C, en el grupo C+LC y en el grupo F, no varía, por que el comportamiento de la actividad enzimática es directamente proporcional (figura 11). El Km de CAT es sobre los 25 mM y de GPx es 6 μ M, esto quiere decir que la CAT es > 4000 más alto, por ende el GPx tiene más afinidad y será la primera en poder degradar al peróxido de hidrógeno, pero la que tiene mayor capacidad de degradar es la CAT ⁽¹¹⁶⁾. En el grupo F, debido al estrés oxidativo generado, ambas disminuyen significativamente su actividad, ya que la CAT puede inactivarse por radical hidroxilo, anión superóxido y el H₂O₂, pero no lo inhibe los peróxidos orgánicos, mientras que GPx puede inactivarse por H₂O₂ y peróxidos orgánicos ⁽¹⁰²⁾, por lo que la relación no se afecta; asimismo, en el grupo C + LC, debido a que no hay situación de estrés oxidativo, y la LC directamente actúa como *scavenger*, habiendo una leve disminución en su actividad, por lo que la relación no varía significativamente.

Situación diferente sucede en la relación CAT/GPx en el grupo F + LC, donde el tratamiento con LC provocó aumento significativo de la relación, lo cual se debió a que hay un incremento significativo de la actividad de CAT, pero no de GPx. Roy et al. realizaron una investigación donde administraron LC vía intraperitoneal a dosis de 50mg/kg y 100mg/kg durante 7 días, con lo que se consideraron baja dosis y alta dosis. Reportaron que SOD y CAT aumentaron a bajas y altas dosis, sin embargo, GPx solo aumentó en dosis altas. Se podría proponer que, al aumentar la dosis, también mejoraría probablemente la actividad de GPx (figura 11).

En la presente investigación, se ha probado que la primera línea de defensa antioxidante ha sido afectada, todas las enzimas antioxidantes han disminuido sus actividades, en diferente escala por el consumo de fructosa. En una segunda línea de defensa están los antioxidantes *scavenger* ahí se encuentra el GSH, la clasificación se dio en base a la revisión que hicieron Ighodaro *et al.* ⁽²⁶⁾ sobre diversas publicaciones.

El consumo de fructosa casi duplicó el valor del nivel de glutatión en comparación al grupo C (figura 12). Este resultado podría ser explicado porque en situaciones de estrés se activa Nrf2 que permite la expresión de γ -glutamylcisteína sintetasa, que es la enzima limitante para la síntesis de GSH ⁽¹¹⁷⁾, además de una menor utilización por parte del GPx, ya que la actividad de esta enzima se encuentra disminuida significativamente en el presente estudio (figura 10).

Es así que Seghieri *et al.* ⁽¹¹⁸⁾ realizaron un estudio en 114 paciente diabéticos insulino-dependientes y pacientes sanos, donde evaluaron nivel de GSH, glutatión transferasa, glutatión peroxidasa en plaquetas y la relación con hemoglobina glicosilada. Ellos reportaron que se incrementó de manera significativa los niveles de GSH y la actividad de GSH reductasa, pero no hubo variación en la actividad de GPx en pacientes diabéticos; por otra parte, se observó un aumento marcado del nivel de GSH cuando se hallaba la HbA1 > 9%, sugiriendo que ese incremento del nivel de GSH probablemente es por una menor utilización del GPx y un aumento de la actividad de GSH transferasa.

Cuando se administró LC al grupo F+LC, aumentó el nivel de GSH en comparación al grupo C, y al grupo C+CL de manera significativa; y de manera no significativa cuando se le comparó con el grupo F (figura 12). Se puede proponer que si el tratamiento con LC durará más tiempo probablemente el aumento sería significativo.

De igual manera, Cao *et al.* ⁽⁸⁷⁾ realizaron un estudio en células retinales, donde administraron LC para disminuir el estrés oxidativo generado por altas cantidades de glucosa, mostrando un aumento en la expresión de NRF2, hemooxigenasa y γ -

glutamilcisteina sintetasa así como una disminución en la expresión de Keap-1. De igual forma, varias investigaciones han reportado que el aumento en la expresión de PPAR- γ favorece la expresión de NRF2^(119,120). Con estas evidencias se podría pensar que la LC favorece la expresión de γ -glutamilcisteina sintetasa vía Nrf2 y PPAR- γ .

El estrés oxidativo generado puede afectar ADN, proteínas y lípidos de membrana, especialmente los ácidos grasos polinsaturados, ya que por sus enlaces π son más susceptibles a la oxidación. La peroxidación lípica es un proceso que consiste en tres fases: iniciación, propagación y terminación (figura 2).

Los resultados en la figura 12 muestran que el consumo de fructosa a libre demanda en la bebida provocó un aumento de lipoperoxidación en 21 % en el grupo F, sin embargo, el tratamiento con LC no pudo menguar este incremento en hígado en el grupo F+LC. En el estudio elaborado por Rani *et al.*⁽¹²¹⁾, ellos usaron ratas jóvenes (4 meses) y ratas mayores (24 meses), en donde evaluaron la lipoperoxidación en cerebro luego de la administración de LC 300 mg /kg/24h vía intraperitoneal por un periodo de 21 días. En el estudio observaron que hubo una disminución de la peroxidación lipídica en ratas mayores, y conforme aumentaban los días de tratamiento el descenso fue más evidente, sin embargo, no hubo cambios en ratas menores. En el presente estudio se usaron ratas jóvenes de 2 meses, es posible que la edad sea una variable para considerar. Por otro lado, el tratamiento con LC provocó una reducción de 66,3 % en el nivel de MDA en el grupo C+LC, con lo cual se mostró el papel antioxidante y citoprotector de LC a nivel hepático, corroborando el rol de *scavenger* discutido previamente^(7,9,18,78,93,104). Con estos resultados diferentes al estudio de Rani *et al.*, podría plantearse que el daño oxidativo producido por la fructosa fue tan severo al punto que la LC no pudo mejorar esta situación, empero, si la duración del tratamiento hubiese sido mayor probablemente hubiera sido capaz de disminuir los niveles, como se manifiesta en diferentes investigaciones^(8,11,18,83,104).

También es posible que la LC ejerza su papel antioxidante a nivel de otras reacciones o productos ya formados de la cascada de lipoperoxidación como los dienos conjugados y los hidroperóxidos lipídicos (figura 2) por lo que no se observa un resultado efectivo a nivel de MDA.

En este estudio se produjo cambios notorios debido al consumo de fructosa al 40 % a libre demanda; a nivel de la defensa enzimática antioxidante se probó disminución significativa de la actividad de GPx ($p=0$) y tendencia a disminuir la actividad enzimática de SOD Cu/Zn y CAT en aproximadamente en 20 %, además del incremento en 72 % de

la actividad de G6PDH. Con el tratamiento con LC en el grupo F+LC se mostró, aumento en 100 % en el nivel de insulina en páncreas, y mejora del sistema antioxidante con aumento significativo de la actividad enzimática de CAT ($p=0,013$) y de G6PDH ($p=0,017$), así como aumento en 28,3 % en la actividad de SOD Mn pero sin cambio notorio en la actividad de SOD Cu/Zn y de GPx (figura 7, 8 y 10).

La LC posiblemente puede favorecer el incremento de la expresión de factores de transcripción, siendo uno de ellos, el PPAR- α que favorece la expresión y actividad de SOD Mn, SOD Cu-Zn, CAT. Otro factor de transcripción sería PPAR- γ que favorece la expresión y actividad de CAT y expresión de NRF2, de igual forma, el Nrf2 favorece la expresión de enzimas antioxidantes como GPx, G6PDH, SOD, CAT y γ -glutamylcisteina sintetasa, esta última se usa para la síntesis de GSH. Todos estos mecanismos pueden disminuir la peroxidación lipídica.

Finalmente, la L-carnitina, metabolito de síntesis principal en el tejido hepático y el renal, cuyo papel se relaciona principalmente con el proceso de β -oxidación, también ejerce un rol antioxidante que se refleja en el modelo de estrés oxidativo provocado por la fructosa. En el presente estudio, este papel antioxidante lo ejerce a nivel de la actividad de las enzimas SOD Mn, CAT y G6PDH, así como el incremento del nivel de GSH total.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

1. La L-carnitina aumenta significativamente los niveles de insulina pancreática en situación de estrés como en situación fisiológica.
2. La administración de L-carnitna no modifica significativamente los niveles de L-carnitina libre en el hígado.
3. La L-carnitina en situación de estrés producido por la dieta rica en fructosa no mejora el nivel de lipoperoxidación hepática, sin embargo, incrementa significativamente los niveles de glutatión total. La L-carnitina en situación fisiológica ejerce su efecto citoprotector, disminuyendo significativamente los niveles de lipoperoxidación.
4. La L-carnitina favorece la actividad de enzimas antioxidantes de primer nivel catalasa, superóxido dismutasa ligado a Mn y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. De manera significativa en la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima que forma parte del sistema de glutatión peroxidasa; y permite la recuperación de la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa ligado a Mn, en el modelo de estrés oxidativo generado por el consumo de fructosa al 40 % en la bebida a libre demanda.
5. El consumo de fructosa al 40% produjo estrés oxidativo a nivel del sistema antioxidante disminuyendo la actividad enzimática de superóxido dismutasa Cu/Zn, catalasa y glutatión peroxidasa en diferente magnitud e incremento de los niveles de lipoperoxidación.

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gutierrez-Aguado, Escobedo-Palza, timana-Ruiz. Costo De Diabetes Mellitus No Complicada En Los Establecimientos De Salud Del Perú [Internet]. ISPOR | International Society For Pharmacoeconomics and Outcomes Research. [citado 26 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.ispor.org/publications/journals/value-in-health/abstract/Volume-18--Issue-7/Costo-De-Diabetes-Mellitus-No-Complicada-En-Los-Establecimientos-De-Salud-Del-Per%C3%BA>
2. Bulboacă A, D Bolboacă S, Suci S. Protective effect of curcumin in fructose-induced metabolic syndrome and in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Iran J Basic Med Sci.* junio de 2016;19(6):585-93.
3. Tappy L, Lê K-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* enero de 2010;90(1):23-46.
4. Sun SZ, Empie MW. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab.* 2 de octubre de 2012;9(1):89.
5. Mamikutty N, Thent ZC, Sapri SR, Sahrudin NN, Mohd Yusof MR, Haji Suhaimi F. The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Res Int.* 2014;2014:263897.
6. Germoush M, Elgebaly H, Hassan S, Mahmoud A. Anti-diabetic effects of *Padina pavonia* in fructose-induced diabetic rats. *Aljoudf Univ Sci Eng J AUSEJ.* 1 de diciembre de 2015;2:10-6.
7. Mescka C, Moraes T, Rosa A, Mazzola P, Piccoli B, Jacques C, et al. In vivo neuroprotective effect of L-carnitine against oxidative stress in maple syrup urine disease. *Metab Brain Dis.* marzo de 2011;26(1):21-8.
8. Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, Miguel-Carrasco JL, Revilla E, Santa-María C, et al. The renoprotective effect of l-carnitine in hypertensive rats is mediated by modulation of oxidative stress-related gene expression. *Eur J Nutr.* 1 de septiembre de 2013;52(6):1649-59.
9. Yildirim S, Yildirim A, Dane S, Aliyev E, Yigitoglu R. Dose-dependent protective effect of L-carnitine on oxidative stress in the livers of hyperthyroid rats. *Eurasian J Med.* febrero de 2013;45(1):1-6.
10. Bin Aleem S, Mazhar Hussain M, Farooq Y. Levo-Carnitine Reduces Oxidative Stress and Improves Contractile Functions of Fast Muscles in Type 2 Diabetic Rats. *Iran Biomed J.* enero de 2013;17(1):29-35.

11. Rajasekar P, Anuradha CV. Effect of L-carnitine on skeletal muscle lipids and oxidative stress in rats fed high-fructose diet. *Exp Diabetes Res.* 2007;2007:72741.
12. Vidal-Casariiego A, Burgos-Peláez R, Martínez-Faedo C, Calvo-Gracia F, Valero-Zanuy MÁ, Luengo-Pérez LM, et al. Metabolic effects of L-carnitine on type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* abril de 2013;121(4):234-8.
13. OMS. Enfermedades no transmisibles [Internet]. [citado 24 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
14. Malik VS, Hu FB. Fructose and Cardiometabolic Health: What the Evidence from Sugar-Sweetened Beverages Tells Us. *J Am Coll Cardiol.* 6 de octubre de 2015;66(14):1615-24.
15. Esquivel Solís V, Gómez Salas G. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarric Vol494 Pp198-202* [Internet]. 31 de agosto de 2007 [citado 24 de agosto de 2021]; Disponible en: <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/75116>
16. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev.* mayo de 2005;63(5):133-57.
17. Francini F, Castro MC, Schinella G, García ME, Maiztegui B, Raschia MA, et al. Changes induced by a fructose-rich diet on hepatic metabolism and the antioxidant system. *Life Sci.* 19 de junio de 2010;86(25-26):965-71.
18. Cao Y, Li X, Shi P, Wang L, Sui Z. Effects of L-Carnitine on High Glucose-Induced Oxidative Stress in Retinal Ganglion Cells. *Pharmacology.* 2014;94(3-4):123-30.
19. Cavarape A, Feletto F, Mercuri F, Quagliari L, Daman G, Ceriello A. High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *J Endocrinol Invest.* diciembre de 2001;24(11):838-45.
20. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* octubre de 2006;8(9-10):1865-79.
21. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res.* 16 de marzo de 2018;122(6):877-902.
22. Flores Meneses L. Estrés oxidativo y fibrogénesis en la diabetes mellitus tipo 1: Influencia del control glucémico y del consumo de tabaco. [Internet]. Universitat de

Barcelona; 2005 [citado 25 de agosto de 2021]. Disponible en: <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/42200>

23. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 15 de abril de 2015;6(3):456-80.
24. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*. junio de 1992;119(6):598-620.
25. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine* [Internet]. 5.^a ed. Oxford: Oxford University Press; 2015 [citado 26 de agosto de 2021]. 944 p. Disponible en: <https://oxford.universitypressscholarship.com/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478>
26. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alex J Med*. 1 de diciembre de 2018;54(4):287-93.
27. Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta*. febrero de 2010;1804(2):245-62.
28. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci*. agosto de 2010;1203:120-5.
29. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. septiembre de 2002;64(5-6):1019-26.
30. Park J, Rho HK, Kim KH, Choe SS, Lee YS, Kim JB. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol Cell Biol*. junio de 2005;25(12):5146-57.
31. Bonilla JF, Sánchez MC, Chuaire L. Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD): Respuesta de los hematíes y otras células humanas a la disminución en su actividad. *Colomb Médica*. marzo de 2007;38(1):68-75.
32. Angosto MC. Estrés oxidativo: envejecimiento y enfermedad [Internet]. 1999 [citado 26 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=195219>
33. Sierra AG. Regulacion del metabolismo de los aminoacidos azufrados en la rata sometida a estres quirurgico [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universitat de València; 1990 [citado 26 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=227503>
34. Adeva-Andany MM, Calvo-Castro I, Fernández-Fernández C, Donapetry-García

C, Pedre-Piñeiro AM. Significance of l-carnitine for human health. *IUBMB Life*. agosto de 2017;69(8):578-94.

35. Surai P. Antioxidant Action of Carnitine: Molecular Mechanisms and Practical Applications. *EC Vet Sci*. 5 de agosto de 2015;2:66-84.

36. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. febrero de 1949;177(2):751-66.

37. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.

38. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 16 de septiembre de 1974;47(3):469-74.

39. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. julio de 1967;70(1):158-69.

40. Kjeldsberg C, Beutler E, Bell C, Hougie C, Foucar K. Practical diagnosis of hematologic disorders - Google Académico [Internet]. Disponible en: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Practical+Diagnosis+of+Hematologic+Disorders&author=CR+Kjeldsberg&publication_year=1995&

41. Boyne AF, Ellman GL. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components. *Anal Biochem*. abril de 1972;46(2):639-53.

42. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.

43. Colonna WJ, Samaraweera U, Clarke M, Cleary M, Godshall M, White J. Sugar. En 2006.

44. Andrade N, Andrade S, Silva C, Rodrigues I, Guardão L, Guimarães JT, et al. Chronic consumption of the dietary polyphenol chrysin attenuates metabolic disease in fructose-fed rats. *Eur J Nutr*. 1 de febrero de 2020;59(1):151-65.

45. Cheeseman C, Long W. Structure of, and functional insight into the GLUT family of membrane transporters. *Cell Health Cytoskelet*. octubre de 2015;167.

46. Tappy L, de Endocrinología. Metabolismo de la fructosa desde una perspectiva funcional: implicaciones para los atletas. 2017;28(174):4.

47. Campbell E, Schlappal A, Geller E, Castonguay TW. Chapter 19 - Fructose-Induced Hypertriglyceridemia: A Review. En: Watson RR, editor. *Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2014 [citado 29 de julio de 2021]. p. 197-205. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124078697000192>

48. Park OJ, Cesar D, Faix D, Wu K, Shackleton CH, Hellerstein MK. Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridaemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem J.* 15 de marzo de 1992;282 (Pt 3):753-7.
49. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mayo de 2008;9(5):367-77.
50. de Moura RF, Ribeiro C, de Oliveira JA, Stevanato E, de Mello MAR. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr.* abril de 2009;101(8):1178-84.
51. Kösele E, Kızıltan G, Türker PF, Saka M, Ok MA, Bacanlı D, et al. The effects of glucose and fructose on body weight and some biochemical parameters in rats. *Prog Nutr.* 29 de marzo de 2018;20(1):46-51.
52. Sandeva, Rositsa V., Mihaylova, Stanislava M., Sandeva, Gergana N., Trifonova, Katya Y. and Popova-Katsarova, Ruska D. Effect Of High-Fructose Solution On Body Weight, Body Fat, Blood Glucose And Triglyceride Levels In Rats. *J Biomed Clin Res.* 10 de diciembre de 2015;8(1):5-8.
53. Lawson HA. Chapter 11 - Animal Models of Metabolic Syndrome. En: Conn PM, editor. *Animal Models for the Study of Human Disease* [Internet]. Boston: Academic Press; 2013 [citado 29 de julio de 2021]. p. 243-64. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124158948000117>
54. El-Sherbini E-S, El-Sayed G, El Shotory R, Gheith N, Abou-Alsoud M, Harakeh SM, et al. Ameliorative effects of l-carnitine on rats raised on a diet supplemented with lead acetate. *Saudi J Biol Sci.* 1 de septiembre de 2017;24(6):1410-7.
55. Xia Y, Li Q, Zhong W, Dong J, Wang Z, Wang C. L-carnitine ameliorated fatty liver in high-calorie diet/STZ-induced type 2 diabetic mice by improving mitochondrial function. *Diabetol Metab Syndr.* 15 de noviembre de 2011;3:31.
56. Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab.* 2016;13:15.
57. De Angelis K, Senador DD, Mostarda C, Irigoyen MC, Morris M. Sympathetic overactivity precedes metabolic dysfunction in a fructose model of glucose intolerance in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 15 de abril de 2012;302(8):R950-957.

58. Hong YM, Kim HS, Yoon H-R. Serum Lipid and Fatty Acid Profiles in Adriamycin-Treated Rats after Administration of L-Carnitine. *Pediatr Res.* febrero de 2002;51(2):249-55.
59. Magesh SB, Rajappa R, Ramkumar KM, Suryanarayanan S, Madhunapantula SV. Acetyl-L-Carnitine Restores Abnormal Lipid Metabolism Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin in Mice. *Biomed Pharmacol J.* 20 de junio de 2017;10(2):569-76.
60. Mishra S, Singh R. Effect of Mushroom on the Lipid Profile, Lipid Peroxidation and Liver Functions of Aging Swiss Albino Rats. *Open Nutraceuticals J.* 1 de enero de 2010;3:248-53.
61. Tanaka Y, Sasaki R, Fukui F, Waki H, Kawabata T, Okazaki M, et al. Acetyl-L-carnitine supplementation restores decreased tissue carnitine levels and impaired lipid metabolism in aged rats. *J Lipid Res.* abril de 2004;45(4):729-35.
62. Baena M, Sangüesa G, Dávalos A, Latasa M-J, Sala-Vila A, Sánchez RM, et al. Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Sci Rep.* 19 de mayo de 2016;6:26149.
63. Suwannaphet W, Meeprom A, Yibchok-Anun S, Adisakwattana S. Preventive effect of grape seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* julio de 2010;48(7):1853-7.
64. Aburasayn H, Al Batran R, Ussher JR. Targeting ceramide metabolism in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1 de agosto de 2016;311(2):E423-435.
65. Holland WL, Bikman BT, Wang L-P, Yuguang G, Sargent KM, Bulchand S, et al. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest.* mayo de 2011;121(5):1858-70.
66. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev.* 1 de octubre de 2018;98(4):2133-223.
67. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* octubre de 1994;94(4):1543-9.
68. Jiang F, Zhang Z, Zhang Y, Wu J, Yu L, Liu S. L-carnitine ameliorates the liver inflammatory response by regulating carnitine palmitoyltransferase I-dependent PPAR γ signaling. *Mol Med Rep.* febrero de 2016;13(2):1320-8.

69. Ringseis R, Keller J, Eder K. Role of carnitine in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity: evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency. *Eur J Nutr.* febrero de 2012;51(1):1-18.
70. Castro MC, Massa ML, Del Zotto H, Gagliardino JJ, Francini F. Rat liver uncoupling protein 2: changes induced by a fructose-rich diet. *Life Sci.* 24 de octubre de 2011;89(17-18):609-14.
71. Shi J-H, Sun S-C. Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Regulation of Nuclear Factor κ B and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Front Immunol.* 2018;9:1849.
72. Webster J. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Front Cell Dev Biol.* 1 de mayo de 2020;8:365.
73. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* diciembre de 2004;114(12):1752-61.
74. Maiztegui B, Borelli MI, Madrid VG, Del Zotto H, Raschia MA, Francini F, et al. Sitagliptin prevents the development of metabolic and hormonal disturbances, increased β -cell apoptosis and liver steatosis induced by a fructose-rich diet in normal rats. *Clin Sci Lond Engl 1979.* enero de 2011;120(2):73-80.
75. Balakumar M, Raji L, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Mohan V, et al. High-fructose diet is as detrimental as high-fat diet in the induction of insulin resistance and diabetes mediated by hepatic/pancreatic endoplasmic reticulum (ER) stress. *Mol Cell Biochem.* diciembre de 2016;423(1-2):93-104.
76. Asghar ZA, Cusumano A, Yan Z, Remedi MS, Moley KH. Reduced islet function contributes to impaired glucose homeostasis in fructose-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 1 de febrero de 2017;312(2):E109-16.
77. Bonomini M, Zammit V, Pusey CD, De Vecchi A, Arduini A. Pharmacological use of L-carnitine in uremic anemia: has its full potential been exploited? *Pharmacol Res.* marzo de 2011;63(3):157-64.
78. Agarwal A, Sengupta P, Durairajanayagam D. Role of L-carnitine in female infertility. *Reprod Biol Endocrinol RBE.* 26 de enero de 2018;16(1):5.
79. Mutomba MC, Yuan H, Konyavko M, Adachi S, Yokoyama CB, Esser V, et al. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. *FEBS Lett.*

28 de julio de 2000;478(1-2):19-25.

80. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. junio de 2009;9(6):400-14.

81. Schooneman MG, Houtkooper RH, Hollak CEM, Wanders RJA, Vaz FM, Soeters MR, et al. The impact of altered carnitine availability on acylcarnitine metabolism, energy expenditure and glucose tolerance in diet-induced obese mice. *Biochim Biophys Acta*. agosto de 2016;1862(8):1375-82.

82. Virmani A, Gaetani F, Imam S, Binienda Z, Ali S. Possible mechanism for the neuroprotective effects of L-carnitine on methamphetamine-evoked neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci*. mayo de 2003;993:197-207; discussion 287-288.

83. Mardanshahi T, Rezaei N, Zare Z, Malekzadeh Shafaroudi M, Mohammadi H. Effects of L-Carnitine on the sperm parameters disorders, apoptosis of spermatogenic cells and testis histopathology in diabetic Rats. *Int J Reprod Biomed*. mayo de 2019;17(5):ijrm.v17i5.4600.

84. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 1 de enero de 2013;9(1):25-53.

85. Baumel-Alterzon S, Katz LS, Brill G, Jean-Pierre C, Li Y, Biswal S, et al. Nrf2 Regulates β -cell Mass by Suppressing Cell Death and Promoting Proliferation [Internet]. 2021 mar [citado 17 de agosto de 2021] p. 2021.03.05.434145. Disponible en: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.03.05.434145v1>

86. Zhang D-M, Guo Z-X, Zhao Y-L, Wang Q-J, Gao Y-S, Yu T, et al. L-carnitine regulated Nrf2/Keap1 activation in vitro and in vivo and protected oxidized fish oil-induced inflammation response by inhibiting the NF- κ B signaling pathway in *Rhynchocypris lagowski Dybowski*. *Fish Shellfish Immunol*. octubre de 2019;93:1100-10.

87. Cao Y, Li X, Wang C-J, Li P, Yang B, Wang C-B, et al. Role of NF-E2-related factor 2 in neuroprotective effect of l-carnitine against high glucose-induced oxidative stress in the retinal ganglion cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. febrero de 2015;69:345-8.

88. Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*. 18 de enero de 2006;78(8):803-11.

89. Lee B-J, Lin J-S, Lin Y-C, Lin P-T. Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery

- disease: a randomized, placebo-controlled trial. *Nutr J.* 4 de agosto de 2014;13:79.
90. Calò LA, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Nicolai R, Calvani M, et al. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *Int J Cardiol.* 8 de febrero de 2006;107(1):54-60.
91. Koohepeyma F, Siri M, Allahyari S, Mahmoodi M, Saki F, Dastghaib S. The effects of L-carnitine on renal function and gene expression of caspase-9 and Bcl-2 in monosodium glutamate-induced rats. *BMC Nephrol.* 2 de mayo de 2021;22(1):162.
92. Tousson E, Hafez E, Zaki S, Gad A. The cardioprotective effects of L-carnitine on rat cardiac injury, apoptosis, and oxidative stress caused by amethopterin. *Environ Sci Pollut Res Int.* octubre de 2016;23(20):20600-8.
93. Chang B, Nishikawa M, Nishiguchi S, Inoue M. L-carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria. *Int J Cancer.* 20 de febrero de 2005;113(5):719-29.
94. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* diciembre de 2004;114(12):1752-61.
95. de Almeida AJPO, de Almeida Rezende MS, Dantas SH, de Lima Silva S, de Oliveira JCPL, de Lourdes Assunção Araújo de Azevedo F, et al. Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:1954398.
96. Nigro D, Menotti F, Cento AS, Serpe L, Chiazza F, Dal Bello F, et al. Chronic administration of saturated fats and fructose differently affect SREBP activity resulting in different modulation of Nrf2 and Nlrp3 inflammasome pathways in mice liver. *J Nutr Biochem.* abril de 2017;42:160-71.
97. Suzuki K, Miyazawa N, Nakata T, Seo HG, Sugiyama T, Taniguchi N. High copper and iron levels and expression of Mn-superoxide dismutase in mutant rats displaying hereditary hepatitis and hepatoma (LEC rats). *Carcinogenesis.* septiembre de 1993;14(9):1881-4.
98. Case AJ. On the Origin of Superoxide Dismutase: An Evolutionary Perspective of Superoxide-Mediated Redox Signaling. *Antioxidants.* 30 de octubre de 2017;6(4):82.
99. Madiraju P, Pande SV, Prentki M, Madiraju SRM. Mitochondrial acetylcarnitine provides acetyl groups for nuclear histone acetylation. *Epigenetics.* 16 de agosto de 2009;4(6):399-403.

100. McDonnell E, Crown SB, Fox DB, Kitir B, Ilkayeva OR, Olsen CA, et al. Lipids Reprogram Metabolism to Become a Major Carbon Source for Histone Acetylation. *Cell Rep.* 1 de noviembre de 2016;17(6):1463-72.
101. Kerner J, Yohannes E, Lee K, Virmani A, Koverech A, Cavazza C, et al. Acetyl-L-carnitine increases mitochondrial protein acetylation in the aged rat heart. *Mech Ageing Dev.* enero de 2015;145:39-50.
102. Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 15 de febrero de 1990;51(3):283-97.
103. Lopes A, Vilela TC, Taschetto L, Vuolo F, Petronilho F, Dal-Pizzol F, et al. Evaluation of the effects of fructose on oxidative stress and inflammatory parameters in rat brain. *Mol Neurobiol.* diciembre de 2014;50(3):1124-30.
104. Li J-L, Wang Q-Y, Luan H-Y, Kang Z-C, Wang C-B. Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biomed Sci.* 21 de marzo de 2012;19(1):32.
105. Toyama T, Nakamura H, Harano Y, Yamauchi N, Morita A, Kirishima T, et al. PPARalpha ligands activate antioxidant enzymes and suppress hepatic fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 12 de noviembre de 2004;324(2):697-704.
106. Liu X, Jang SS, An Z, Song H, Kim W-D, Yu J-R, et al. Fenofibrate decreases radiation sensitivity via peroxisome proliferator-activated receptor α -mediated superoxide dismutase induction in HeLa cells. *Radiat Oncol J.* junio de 2012;30 (2) : 88-95.
107. Sözmen EY, Sözmen B, Delen Y, Onat T. Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/paraoxonase (PON) ratios may implicate poor glycemic control. *Arch Med Res.* agosto de 2001;32(4):283-7.
108. Cichoski AJ, Rotta RB, Scheuermann G, Cunha Junior A, Barin JS. Investigation of glutathione peroxidase activity in chicken meat under different experimental conditions. *Food Sci Technol.* diciembre de 2012;32:661-7.
109. Sakai M, Oimomi M, Kasuga M. Experimental studies on the role of fructose in the development of diabetic complications. *Kobe J Med Sci.* diciembre de 2002;48(5-6):125-36.
110. Emami Naini A, Moradi M, Mortazavi M, Amini Harandi A, Hadizadeh M, Shirani F, et al. Effects of Oral L-Carnitine Supplementation on Lipid Profile, Anemia, and Quality of Life in Chronic Renal Disease Patients under Hemodialysis: A

Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *J Nutr Metab.* 2012;2012:510483.

111. ElGendy AA, Abbas AM. Effects of warfarin and L-carnitine on hemostatic function and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Physiol Biochem.* junio de 2014;70(2):535-46.

112. Tchouagué M, Grondin M, Glory A, Averill-Bates D. Heat shock induces the cellular antioxidant defenses peroxiredoxin, glutathione and glucose 6-phosphate dehydrogenase through Nrf2. *Chem Biol Interact.* 1 de septiembre de 2019;310:108717.

113. Zheng J-L, Luo Z, Zhuo M-Q, Pan Y-X, Song Y-F, Hu W, et al. Dietary L-carnitine supplementation increases lipid deposition in the liver and muscle of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) through changes in lipid metabolism. *Br J Nutr.* 14 de septiembre de 2014;112(5):698-708.

114. Li J, Zhang Y, Luan H, Chen X, Han Y, Wang C. l-carnitine protects human hepatocytes from oxidative stress-induced toxicity through Akt-mediated activation of Nrf2 signaling pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* mayo de 2016;94(5):517-25.

115. Ahmad F, Dixit D, Sharma V, Kumar A, Joshi SD, Sarkar C, et al. Nrf2-driven TERT regulates pentose phosphate pathway in glioblastoma. *Cell Death Dis.* 5 de mayo de 2016;7:e2213.

116. Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 18 de febrero de 2004;24(7):1531-40.

117. Ungvari Z, Bagi Z, Feher A, Recchia FA, Sonntag WE, Pearson K, et al. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* julio de 2010;299(1):H18-24.

118. Seghieri G, Di Simplicio P, De Giorgio LA, Anichini R, Alberti L, Franconi F. Relationship between metabolic glycaemic control and platelet content of glutathione and its related enzymes, in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* septiembre de 2000;299(1-2):109-17.

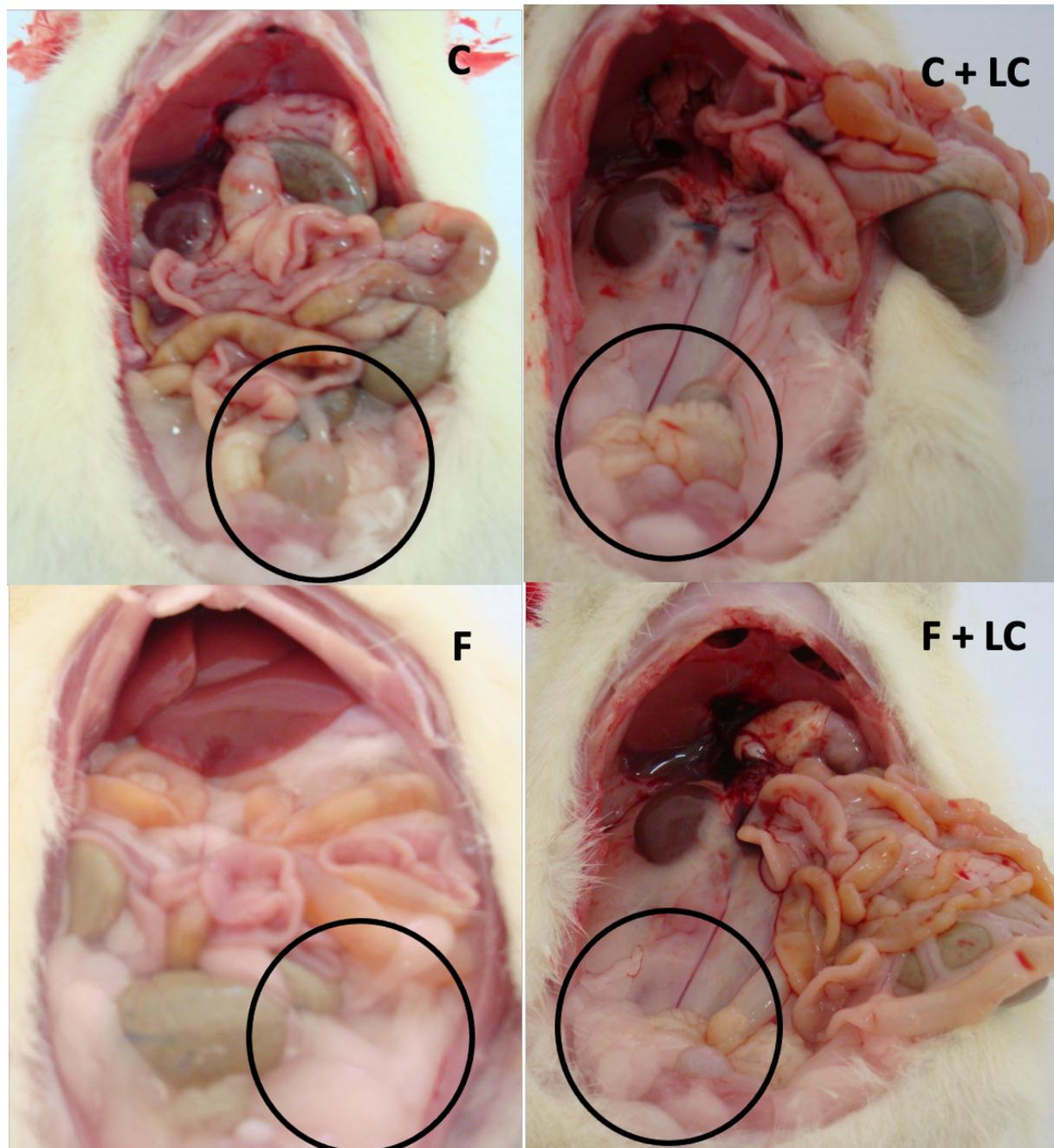
119. Hang H, Wang L-K, Ren S-Y, Song A-J, Wu G-F. Activating PPAR γ Increases NQO1 and γ -GCS Expression via Nrf2 in Thrombin-activated Microglia. *Curr Med Sci.* febrero de 2020;40(1):55-62.

120. Zhao X-R, Gonzales N, Aronowski J. Pleiotropic role of PPAR γ in intracerebral hemorrhage: an intricate system involving Nrf2, RXR, and NF- κ B. *CNS Neurosci Ther.*

abril de 2015;21(4):357-66.

121. Rani PJA, Panneerselvam C. Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* abril de 2002;57(4):B134-137.

CAPITULO VIII: ANEXOS



Grupo C: control, **Grupo C + LC:** control + L-carnitina, **Grupo F:** fructosa, **Grupo F + LC:** fructosa + L-carnitina

ANEXO 1. Los círculos demuestran los depósitos de tejido adiposo abdominal en el mesenterio y retroperitoneo en los grupos C, C + LC, F y F + LC. Los depósitos de tejido adiposo son mayores en los grupos F y F + LC, después de 8 semanas de tratamiento con fructosa al 40 %.