

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD**



Casa abierta al tiempo

**INFLUENCIA DE LA NICOTINAMIDA EN LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS
DE NOVO EN HÍGADO GRASO: PARTICIPACIÓN DE LA GLUCOSA-6-
FOSFATO DESHIDROGENASA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

SELENE ÁNGELES MEJÍA

COMITÉ TUTORAL

Codirectoras:

DRA. MARGARITA DÍAZ FLORES

DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ PÉREZ

ASESOR:

DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

COMITÉ TUTORIAL

Co-Directora: Dra. Margarita Díaz Flores

Investigadora Asociada D

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XX, Instituto Mexicano del
Seguro Social

Co-Directora: Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Profesor Titular C

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman


Profesor Titular C

Laboratorio en Biología del Desarrollo, Unidad de Morfología y Función, Facultad de
Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

Los miembros del jurado designado por la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la Tesis titulada: **“Influencia de la nicotinamida en la síntesis de ácidos grasos de novo en hígado graso: participación de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa”**, que presento la M. en Biol. Exp. Selene Ángeles Mejía, el veinticinco de julio del dos mil dieciocho.

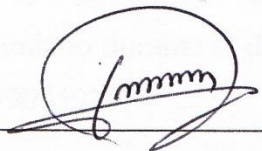
PRESIDENTE

Dra. Elizabeth Hernández Pérez
Universidad Autónoma Metropolitana



SECRETARIO

Dra. Margarita Díaz Flores
Instituto Mexicano del Seguro Social



VOCAL

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman
Universidad Nacional Autónoma de México

Rebeca García Macedo

VOCAL

Dra. Leticia Manuel Apolinar
Instituto Mexicano del Seguro Social



VOCAL

Dr. Adán Valladares Salgado
Instituto Mexicano del Seguro Social



El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XX, Instituto Mexicano del Seguro Social, en colaboración con el Laboratorio de Farmacología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa bajo la Co-dirección de la Dra. Margarita Díaz Flores, la Dra. Elizabeth Hernández Pérez y con la asesoría del Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

El Doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) con el convenio PFP-20-93.

Agradezco al CONACyT por la beca otorgada con número de registro (CVU/becario) 229583; 229583/212822 y al IMSS por el apoyo económico brindado durante el desarrollo del presente trabajo a través de la beca con número de registro 99095929.

Agradecimientos

A la Dra. Margarita Díaz Flores

Por ser mi apoyo, mi maestra, mi guía, y darme la maravillosa oportunidad de trabajar con ella, además de trasmitirme sus grandes conocimientos

A la Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Por haberme brindado todo el apoyo de realizar una meta más y darme la oportunidad de tener experiencia en mi vida profesional

Al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Por sus acertadas sugerencias en la elaboración de todo el trabajo, por trasmitirme sus enseñanzas y su apoyo

A la Dra. Leticia Manuel Apolinar

Por todo el apoyo brindado y acogerme como su alumna, además de las acertadas observaciones para la realización de este trabajo

Al Dr. Adán Valladares Salgado

Por todo su apoyo, comprensión y sus correctas sugerencias para finalizar el trabajo

Al Dr. Miguel Cruz

Por haberme brindado la oportunidad de ser su ayudante de investigación y sus enormes enseñanzas

A la Dra. Ángeles Fortis

Por su enorme apoyo y por la amistad tan bonita que hemos tenido

A la Maestra Martha

Por su apoyo, consejos y por una linda amistad que ha nacido

A mis amigos del Laboratorio de Farmacología

Taly, Gerardo, Mimí, Iván, Norma, Frida y Lolita

Por tu su apoyo y sobre todo por entregarme su amistad sincera

A mis amigos de la Unidad de Investigación en Bioquímica y Endocrinología

Saraí, Mari Carmen, Gaby, Carmelita y Armando

Por todo su apoyo y por compartir su tiempo en el área de trabajo

Dedicatorias

A mis padres

Fran y Luis

Por creer en mí, por regalarme la vida, por todos sus sacrificios, el esfuerzo y empeño que pusieron en mí y el apoyo brindado desde toda la vida para que yo pudiera realizarme en mi vida académica

Gracias por todo y los amo

A mis hermanas y sobrinas

Itzel, Yazmin, Rosita, Erandi, Melanie y Elisa

Por darme su apoyo grandioso, su ánimo, por creer siempre en mí y por compartir los bellos momentos de nuestras vidas

A mi abuelita Paz

Por todo el amor que me tuvo, por sus consejos y sus plegarias

Dedicatorias

A mi esposo Beto

Por ser una persona maravillosa, por ser muy comprensivo, por ser mi conciencia, por todo el apoyo incondicional para la realización de mí trabajo, por ser el amor de mi vida, por creer en mí y por compartir el mismo destino

A mi nueva familia

A mis suegros Sabino y Juanita, mis cuñados José, Maty, Sofi, Hilda, Benita, Juan y Margarita, y mis sobrinos Miguel, Vianeth y Lizeth

Por todo el apoyo sincero, su amor, su comprensión y sobre todo por dejarme compartir experiencias maravillosas de la vida

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLA	I
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ABREVIATURAS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Enfermedad del hígado graso no alcohólico	1
1.1.1. Definición y prevalencia	1
1.1.2. Fisiopatología y diagnóstico de EHGNA	2
1.1.3. Lipogénesis <i>de novo</i> hepática	3
1.1.4. Resistencia a la insulina periférica	5
1.2. Glucosa y fructosa	6
1.2.1. Antecedentes de bebidas endulzadas con glucosa y fructosa	6
1.2.2. Metabolismo de glucosa y fructosa	7
1.2.3. Efecto de glucosa y fructosa en la saciedad	10
1.3. Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa	11
1.3.1. Generalidades	11
1.3.2. Regulación hormonal, nutricional, factores de crecimiento y estrés oxidante de G6PD	12
1.3.3. NADPH en sistemas oxidantes y antioxidantes	14
1.4. Nicotinamida	15
1.4.1. Generalidades	15

1.4.2. Administración, tolerabilidad y farmacocinética de NAM	15
1.4.3. Dosis de NAM	16
1.4.4. Efectos terapéuticos de NAM	17
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivos particulares	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1.1. Materiales y reactivos	20
5.1.2. Declaración ética	20
5.1.3. Animales	20
5.1.4. Inducción de esteatosis hepática y tratamientos	21
5.1.5. Obtención de muestras biológicas	21
5.2. Métodos	21
5.2.1. Análisis de marcadores metabólicos	21
5.2.2. Cuantificación de insulina, ácidos grasos libres y TNF α	22
5.2.3. Actividad específica de G6PD	22
5.2.4. Determinación de GSH y GSSG	22
5.2.5. Determinación del potencial redox	23
5.2.6. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	23
5.2.7. Extracción y determinación de nucleótidos de piridina	24
5.2.8. Técnica de Western blot	24
5.2.9. Extracción de RNA y RT-PCR	24

5.2.10. Evaluación histológica	25
5.2.11. Análisis estadístico	25
6. RESULTADOS	26
6.1. NAM mejora el perfil metabólico alterado por el consumo de glucosa o fructosa	26
6.2. NAM decrece la esteatosis hepática inducida por glucosa o fructosa	28
6.3. Perturbación del estado redox del glutatión por glucosa o fructosa y su mejoría con NAM	30
6.4. NAM modifica el potencial redox GSH/GSSG y reduce la concentración de TNF α	32
6.5. NAM disminuye la expresión y actividad específica de G6PD hepática inducidos por glucosa o fructuosa	34
6.6. NAM decrece el aumento de TBARS y expresión de NOX4 hepáticos inducidos por glucosa o fructosa	36
6.7. NAM decrece el aumento de nucleótidos de piridina inducidos por glucosa o fructosa	38
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIÓN	44
9. PERSPECTIVAS	45
10. REFERENCIAS	45

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1	Efecto de NAM sobre alteraciones metabólicas inducidas por carbohidratos en ratas.	27
---------	--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de glucosa y fructosa.	7
Figura 2	Comparación del metabolismo de glucosa y fructosa.	8
Figura 3	Estructura de nicotinamida.	15
Figura 4	Análisis histológico de hígado de rata. A) Control, B) Glucosa, C) Fructosa, D) Glucosa+0.06% NAM, E) Glucosa+0.12% NAM y F) Fructosa+0.12% NAM. Tinción de Hematoxilina & Eosina y tricrómica de Masson.	29
Figura 5	Estado redox del glutatión. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. $^{\theta}P < 0.05$ comparado con glucosa. $^{\#}P < 0.05$ comparado con fructosa.	31
Figura 6	Efecto de NAM sobre A) potencial redox GSH/GSSG y B) TNF α . Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. $^{\theta}P < 0.05$ comparado con glucosa. $^{\Omega}P < 0.05$ comparado con glucosa o glucosa + 0.06% NAM. $^{\#}P < 0.05$ comparado con fructosa.	33
Figura 7	A) Cantidad, B) expresión y C) actividad de G6PD. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. $^{\theta}P < 0.05$ comparado con glucosa. $^{\Omega}P < 0.05$ comparado con el control o glucosa. $^{\#}P < 0.05$ comparado con fructosa.	35
Figura 8	Efecto de NAM en A) NOX4 y B) TBARS. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. $^{\theta}P < 0.05$ comparado con glucosa. $^{\Omega}P < 0.05$ comparado con fructosa.	37

Figura 9

Efecto de NAM sobre los nucleótidos de piridina. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. ^θ $P < 0.05$ comparado con glucosa. ^Ω $P < 0.05$ comparado con glucosa o glucosa + 0.06% NAM. # $P < 0.05$ comparado con fructosa. & $P < 0.05$ comparado con el control o glucosa.

39

ABREVIATURAS

EHGNA	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
EHNA	Estetohepatitis no alcohólica
RE	Retículo endoplásmico
RI	Resistencia a la insulina
ALT	Alanina aminotrasnferasa
AST	Aspartato aminotrasferasa
AGL	Ácidos grasos libres
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AGS	Ácido graso sintasa
CTP1a	Carnitina palmitoiltransferasa 1 alfa
AMP	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	AMP activado proteína cinasa
PKC	Proteína cinasa C
DT2	Diabetes tipo 2
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
HFCS	Aceite de maíz alto en fructosa
SM	Síndrome metabólico
ATP	Adenosina-5-trifosfato
PPAR α	Receptor alfa-proliferador activado de peroxisomas
ApoB	Apolipoproteína B
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GSH	Glutación

CAT	Catalasa
SOD	Superóxido dismutasa
NAM	Nicotinamida
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GA3-P	Gliceraldehído 3-fosfato
DHA-P	Dihidroxiacetona fosfato
ELOVL6	Enzima de elongación de ácidos grasos de cadena larga proteína 6
SCD1	Estearoil- CoAdesaturasa 1
GPAT	Glicerol 3-fosfato aciltransferasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
NO	Óxido nítrico
STZ	Estreptozotocina
HSL	Lipasa sensible a hormonas
SREBP-1c	Proteína 1c del elemento de unión regulador de esteroles
ChREBP	Proteína del elemento de unión que responde al carbohidrato

RESUMEN

El desajuste de la homeostasis del estado redox, la sobre-expresión de factores de transcripción de enzimas lipogénicas inducidos por el aumento del consumo de precursores lipogénicos contenidos en bebidas endulzadas son determinantes para el desarrollo del hígado graso no alcohólico.

El presente estudio evalúa la acción de nicotinamida (NAM) sobre la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en un modelo experimental de esteatosis hepática no alcohólica inducida con glucosa ó fructosa al 30%. Ratas macho distribuidas en 6 grupos fueron sujetas a los siguientes tratamientos: 1) Control; 2) Glucosa; 3) Glucosa+NAM 0.06%; 4) Glucosa+NAM 0.12%; 5) Fructosa; 6) Fructosa+NAM 0.12%. Los carbohidratos fueron administrados en el agua de beber *ad libitum* por 12 semanas. El tratamiento de NAM inició 30 días posteriores a la administración de los carbohidratos por 5 horas durante las siguientes 8 semanas. Los parámetros evaluados fueron: perfil bioquímico, actividad, expresión y cantidad de G6PD, marcadores de estrés como glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG), dinucleotido de nicotinamida adenina (fosfato) reducido en relación a su respectiva forma oxidada [NAD(P)H/NAD(P)], sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Así como, la concentración del factor de necrosis tumoral α (TNF α), el mRNA de la NADPH oxidasa 4 (NOX4) y análisis histológico. Los resultados demostraron que el consumo crónico de glucosa ó fructosa provoca ganancia de peso corporal, aumento de glucosa, insulina, triacilgliceroles, ácidos grasos libres, transaminasas y TBARS en suero. A nivel hepático se incrementó actividad, expresión y cantidad de G6PD; así como las concentraciones de GSSG y TBARS junto con decremento de GSH/GSSG. Todas éstas alteraciones fueron prevenidas por NAM; a

través de disminuir el aumento de la actividad de G6PD junto con NADPH/NADP⁺ y aumentar GSH/GSSG, disminuyendo la esteatosis hepática.

ABSTRACT

The disruption of redox state homeostasis, the overexpression of lipogenic transcription factors and enzymes induced by the increase in the consumption of lipogenic precursors contained in sweetened beverages are determinants of the development of nonalcoholic fatty liver disease.

This study evaluated the action of nicotinamide (NAM) on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and redox, oxidative, and inflammatory states in a model of nonalcoholic hepatic steatosis induced by high and chronic consumption of carbohydrates. Male rats were provided drinking water with 30% glucose or fructose *ad libitum* for 12 weeks. Additionally, 30 days after the beginning of carbohydrate administration, some rats were simultaneously provided with water containing 0.06% or 0.12% NAM for 5 h daily over the next 8 weeks. Biochemical profiles and expression levels of G6PD, tumor necrosis factor α (TNF α), and NADPH oxidase 4 (NOX4) were evaluated together with glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)/nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) [NAD(P)H/NAD(P)] ratios and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results showed that hepatic steatosis induced by the chronic consumption of glucose or fructose was associated with body weight gain and increased levels of serum glucose, insulin, triacylglycerols, free fatty acids, transaminases, and TBARS. In the liver, the expression and activity of G6PD increased along with the GSSG, TBARS, and TG

concentrations. These alterations were reduced by NAM treatment through the attenuation of increases in G6PD expression and activity and in the NADPH/NADP⁺ ratio, thereby slowing liver steatosis. NAM prevents redox, oxidative, and inflammatory alterations induced by high carbohydrate consumption.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Enfermedad del hígado graso no alcohólico*

1.1.1. *Definición y prevalencia*

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) es un término general utilizado para describir una gama de trastornos relacionados (Cohen et al., 2011). La etapa más temprana es la esteatosis hepática, que se caracteriza por depósitos de triacilgliceroles (TG) como gotas de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos. La esteatosis hepática se define como la presencia de gotas de TG en citoplasma en más del 5% de los hepatocitos como resultado de un desequilibrio entre la entrada y salida de lípidos (Koo, 2013; Berlanga et al., 2014). Los TG se acumulan en forma de vacuolas lipídicas de tipo micro y macrovesicular (vacuola grande que desplaza el núcleo hacia la periferia celular) (Haque y Sanyal, 2002). La esteatosis hepática a menudo es benigna, asintomática y auto-limitada, pero puede progresar a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). En etapas finales de la esteatosis, la acumulación de TG hepática induce lipotoxicidad, estrés del retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial e inflamación originando la fibrosis, característica distintiva de la EHNA (Neuschwander-Tetri, 2010; Ramadori et al., 2015). La EHNA se distingue de la esteatosis simple por la presencia de lesión del hepatocito (degeneración balonzante y muerte celular), un infiltrado inflamatorio, y/o depósitos de colágeno (fibrosis). La presencia de fibrosis se presenta principalmente en zonas peri-venosa y perisinusoidales en la zona 3 del acino hepático distorsionando la arquitectura hepática (Contos y Sanyal, 2002). La EHNA a su vez, puede progresar a cirrosis; entre el 10 y el 29% de las personas con EHNA desarrollan cirrosis dentro de los 10 años. En la cirrosis, los hepatocitos se reemplazan por tejido cicatrizante compuesto principalmente de colágeno tipo 1, producido por células especializadas llamadas células estrelladas o estelares, que son activadas por lesión hepática y tienen una función clave en la regeneración hepática. La cirrosis puede finalmente progresar a cáncer de hígado; 4 a 27% de las personas con cirrosis inducida por EHNA desarrollan carcinoma hepatocelular. El contenido hepático de TG puede cuantificarse por medio de métodos no invasivos como los de captura de imágenes, pero se requieren biopsias hepáticas para determinar la etapa de EHGNA.

Los factores que promueven la acumulación de TG en el hígado y la transición de esteatosis a la esteatohepatitis y cirrosis en humanos no han sido claramente definidos. Sin embargo los modelos experimentales que recapitulan ciertas características de la enfermedad humana han proporcionado posibles mecanismos patológicos que contribuyen a su desarrollo. La EHGNA se considera como un problema de salud pública de emergencia en el mundo, con una prevalencia del 25.24% de la población general (Younossi et al., 2016). Con respecto a la comunidad hispana, los de origen mexicano tienen una alta prevalencia de la enfermedad de un 33% (Younossi et al., 2017). Un estudio multicéntrico que utilizó resonancia magnética para el diagnóstico de esteatosis encontró una prevalencia de esteatosis del 45% en población hispana, siendo la incidencia de EHGNA del 14 % en población adulta en la Ciudad de México (Browning et al., 2004). Por otra parte, en México, en el estudio realizado en pacientes con síndrome metabólico (SM), 122 varones (63.2%) y 71 mujeres (36.8%), se encontró una prevalencia de EHGNA del 82.9% en sus diferentes estadios, siendo mayor en hombres (86.9%) que en mujeres (76.1%). En otro grupo de estudio, la mayor proporción de los pacientes presentaron una severidad leve (52.3%) o moderada (22.3%) del hígado graso detectado por ultrasonido, solo el 8.3 % tuvieron un grado grave (Castro et al., 2014).

1.1.2. Fisiopatología y diagnóstico de EHGNA

La fisiopatología de EHGNA más común se basa en la teoría del “doble golpe”; la esteatosis representa el primer golpe, la cual sensibiliza el hígado para un daño mediado por un “segundo golpe” en la cual hay una secreción de adipocinas proinflamatorias y protrombóticas que reducen la producción de adiponectina, la cual es un potente agente antiinflamatorio y sensibilizador de insulina (Pagano et al., 2005).

La resistencia a la insulina (RI) se considera el factor fisiopatológico individual más importante en el desarrollo de la esteatosis (Charlton et al., 2002; Pagano et al., 2002; Sanyal, 2001). De no adaptarse a esta condición, el hepatocito se vuelve disfuncional pudiendo producirse muerte celular por necrosis o apoptosis y el subsiguiente fallo hepático (Chitturi y Farrell, 2001; James y Day, 1999). Si se adapta el hepatocito preserva su

viabilidad funcional, pero queda vulnerable ante aquellos estímulos que desencadenan una respuesta inflamatoria y muerte celular (Day y James, 1998).

En el segundo impacto pueden verse implicados factores autocrinos, paracrinos y endocrinos capaces de desencadenar estrés oxidativo, peroxidación lipídica (Sanyal, 2001), producción anormal de citocinas, desórdenes en el metabolismo de ácidos grasos y disfunción mitocondrial (James y Day, 1999). La inflamación crónica hepática puede provocar además, un aumento en la concentración de mediadores proinflamatorios, que activan de forma paracrina la fibrogénesis en las células estelares (Oneta y Dufour, 2002; Harrison et al., 2002).

El paciente con EHGNA es diagnosticado a partir de hallazgos incidentales en anomalías de estudio de laboratorio, generalmente aumento de 2 a 4 veces de alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) séricas. El ultrasonido tiene una alta sensibilidad y especificidad para la detección de esteatosis moderada a severa del 89-93% (Ratziu et al., 2002). El grado de esteatosis se basa en la evaluación de la ecogenicidad: grado cero, ecogenicidad normal; grado 1, aumento ligero y difuso de la ecogenicidad del parénquima hepático con visualización del diafragma y los bordes de la vasculatura hepática; grado 2 aumento marcado de la ecogenicidad con pobre visualización de los bordes de los vasos intrahepáticos. Sin embargo, el ultrasonido no es útil para identificar la esteatohepatitis o el grado de fibrosis (Roldan-Valadez et al., 2008). El mejor método de imagen para detectar y cuantificar el grado de esteatosis es la resonancia magnética. Para detectar el grado de fibrosis se recurre a la elastografía (Fibroscan), un método no invasivo, que calcula el grado de fibrosis con base a la velocidad de propagación de las ondas registradas. Sin embargo, la biopsia hepática es el único estudio que permite el diagnóstico certero del estado de la EHGNA por lo que continúa siendo el estándar de oro en el diagnóstico de esta patología (Adams et al., 2005).

1.1.3. Lipogénesis de novo hepática

La lipogénesis *de novo* es la vía que permite la conversión y almacenamiento de carbohidratos en ácidos grasos. Esta ruta biosintética se lleva a cabo en el citosol de hepatocitos y adipocitos cuando hay exceso de acetil-CoA. Las enzimas más importantes

que participan en la síntesis de ácidos grasos *de novo* son: la acetil CoA carboxilasa (ACC), la sintasa de ácidos grasos (AGS), la enzima de elongación de ácidos grasos de cadena larga 6 y la estearil-CoA desaturasa 1 (Bianchi et al., 1990). A su vez, la expresión de enzimas de esta vía metabólica es regulada por 2 factores de transcripción: la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) y la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 1c (SREBP-1c).

La expresión de ChREBP es inducida por una dieta alta en carbohidratos (Dentin et al., 2005), está reportado que los intermediarios de la vía glucolítica, la vía de las pentosas y la insulina juegan un papel importante en su regulación (Sirek et al., 2009; Arden et al., 2012). Por ejemplo, los ratones knock-out del receptor de insulina muestran aumento en la expresión de ChREBP después de la alimentación *ad libitum* (Haas et al., 2012). En el caso de SREBP, el cual posee 3 isoformas: 1a, 1c y 2. La SREBP-1c promueve la expresión de enzimas lipogénicas cuando el blanco mecánico del complejo de rapamicina 1 (mTORc1) es activado por la presencia de carbohidratos o por la señalización de insulina. En este contexto, fructosa induce el aumento de los niveles del mRNA de SREBP-1c y en consecuencia los mRNA de las enzimas lipogénicas. Por otro lado, la unión de la insulina a su receptor activa la vía fosfatidil-inositol 3 cinasa/proteína cinasa B que resulta en la activación proteolítica de SREBP-1c y su liberación en el aparato de Golgi.

La lipogénesis *de novo* incrementa por disponibilidad de sustratos lipogénicos generados durante el catabolismo de carbohidratos y por el efecto estimulante de la insulina. Tres residuos de acil-CoA de los ácidos grasos recién sintetizados se esterifican secuencialmente al glicerol por acción de tres tipos de transferasas (glicerol fosfato aciltransferasa, acilglicerolfosfato aciltransferasa, diacilglicerol fosfato aciltransferasa), para construir los TG. Posteriormente, los TG son ensamblados a la apoB en el retículo endoplásmico por la proteína de transferencia microsomal para la formación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), donde la insulina actúa como regulador del ensamblaje y su secreción en forma de lipoproteína.

1.1.4. Resistencia a la insulina periférica

La RI es el desajuste en la capacidad de insulina para regular el metabolismo de la glucosa y los lípidos, el cual es un defecto temprano y crucial asociado con la obesidad y diabetes tipo 2 (DT2) (Giugliano et al., 2008; Greenfield y Campbell, 2004; Weiss, 2007). La etiología de la RI no se conoce completamente, pero se ha demostrado que hay una fuerte asociación entre la RI y un exceso en la acumulación de lípidos, fuera del tejido adiposo, particularmente en el músculo y el hígado (Greenfield y Campbell, 2004; Blaak, 2005; Noto et al., 2006). En esta condición, la glucosa postprandial no retorna a concentraciones normales promoviendo una mayor producción de insulina.

En el tejido adiposo, la insulina frena la lipólisis de los TG almacenados al provocar la inactivación de la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Jaworski et al., 2007), aumenta la entrada de glucosa y su oxidación glucolítica, que proporciona glicerol 3-fosfato y activa a la lipoproteína lipasa (LPL) (Jaworski et al., 2007), del endotelio vascular que rompe los TG en los quilomicrones (QM) y en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), liberando los ácidos grasos que entran por difusión al adipocito.

En el músculo esquelético y cardiaco, la insulina incrementa la entrada de glucosa, debido a que promueve la translocación de los transportadores GLUT 4 a la membrana plasmática (Haque y Sanyal, 2002), activándose también su oxidación mediante la glucólisis y su almacenamiento en forma de glucógeno. Al mismo tiempo se frena la β -oxidación de los ácidos grasos y la glucogenólisis, aumenta el contenido de grasa y la masa del tejido adiposo; así como la reserva de glucosa y ácidos grasos en el tejido muscular, a costa de reducir la glucemia y la lipemia postprandial.

La insulina induce la fosforilación cruzada en residuos de tirosina de las cadenas interiores de su receptor que actúan como puntos de anclaje para sustratos del receptor de la insulina tales como IRS-1 e IRS-2, ó para Grb-2. La señal se transmite desde las proteínas del IRS a través de una serie de moléculas ancladas a la membrana fosfatidil-inositol 3 cinasa (PI₃K) a una proteína cinasa que finalmente deja la membrana. La proteína cinasa B o Akt es la proteína que se mueve a través de la célula para fosforilar dianas que incluyen componentes que controlan el tráfico del receptor de glucosa GLUT4, así como las enzimas que regulan la síntesis de glucógeno y de proteínas.

El tejido adiposo es una fuente importante de señales moleculares que regulan la acción de la insulina (Youssef y McCullough, 2002) como son el TNF α (Oneta y Dufour, 2002; Youssef y McCullough, 2002), la interleucina 6 o IL-6 (Bulcão et al., 2006), la resistina (Ahima y Osei, 2008), los ácidos grasos (Neuschwander-Tetri y Caldwell, 2003), la leptina (Soodini, 2004) y la adiponectina (Soodini, 2004). Numerosas evidencias indican que el TNF α , y la IL-6 (Wieckowska et al., 2008) son responsables del desarrollo de la RI al desajustar la fosforilación cruzada de su receptor (Oneta y Dufour, 2002). En individuos obesos hay un incremento en la producción de TNF α , de esteatosis hepática y RI. Además en los pacientes con EHGNA se ha encontrado un polimorfismo en el promotor de TNF α asociado con la RI (Fernández-Real et al., 2002; Skoog et al., 2001; Valenti et al., 2002). En pacientes con DT2, se presentan elevados niveles de ácidos grasos libres (AGL; Fong et al., 2000), RI e hiperinsulinemia causados por TNF α (Oneta y Dufour, 2002). La hipertrigliceridemia es uno de los factores asociados a la resistencia periférica a la insulina y de EHGNA, que se puede agravar si además aumenta la producción hepática de VLDL (Fong et al., 2000).

1.2. Glucosa y fructosa

1.2.1. Antecedentes de bebidas endulzadas con glucosa y fructosa

El jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS) es el edulcorante con gran aporte calórico que se emplea en refrescos, jugos, conservas, jaleas, productos horneados, cereales, etc. En los años de 1970 se empleaba <1% como endulzante calórico en Norteamérica, rápidamente éste porcentaje aumentó para 1980, y para el año 2000 representó el 42%. El HFCS contiene entre el 55-90% de fructosa y un porcentaje menor de glucosa.

Las dietas enriquecidas con fructosa con el desarrollo de obesidad, SM o DT2 (Lim et al., 2010). Previamente se observó que la sacarosa (un disacárido de glucosa con fructosa) induce ganancia de peso, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia en ratas (Kawasaki et al., 2005). Otro estudio realizado en Israel, demostró que el consumo de refrescos está asociado con EHGNA de manera independiente del SM (Abid et al., 2009), o en ausencia de los factores tradicionales de riesgo, incluyendo obesidad, diabetes o hiperlipidemia (Assy et al., 2008). Estas evidencias indican que el consumo de fructosa por

sí misma promueve la enfermedad. Estudios previos en roedores demostraron varias alteraciones histológicas en hígado después del alto consumo de fructosa, incluyendo inflamación local en regiones periportales (Sanchez-Lozada et al., 2010), y esteatosis macro y microvesicular (Ackerman et al., 2005; Armutcu et al., 2005). Además se ha reportado la inflamación lobular en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa (70%) por 5 semanas, la cual conduce a esteatohepatitis no alcohólica (Kawasaki et al., 2009). Estudios epidemiológicos han sugerido la posible relación entre el consumo de fructosa y de EHGNA (Zelber-Sagi et al., 2007; Ouyang et al., 2008; Abdelmalek et al., 2010). Por ejemplo, en un estudio de 427 personas se demostró que el consumo diario de fructosa fue asociado con alto grado de fibrosis en biopsias hepáticas (Abdelmalek et al., 2010).

1.2.2. Metabolismo de glucosa y fructosa

La fructosa es un azúcar simple con fórmula química $C_6H_{12}O_6$ similar al de la glucosa, presenta un grupo ceto unido al carbono 2, mientras que la glucosa tiene un grupo aldehído en el carbono 1 (Figura 1).

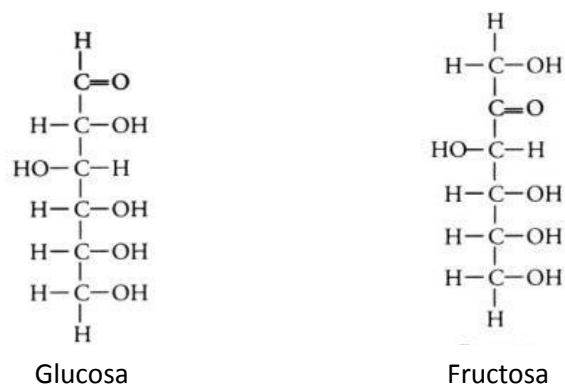


Figura 1. Estructura de glucosa y fructosa.

La glucosa se absorbe dentro del enterocito por un co-transportador apical junto con NaCl (transportador de glucosa-sodio 1, SGLT1), entra a los hepatocitos vía GLUT2, es fosforilada por la glucocinasa y es usada para sintetizar glucógeno por la glucógeno sintasa (Agius, 2008). En estado de ayuno, el glucógeno es hidrolizado por la glucógeno fosforilasa

para generar glucosa (glucogenólisis). La glucosa-6-fosfato es un precursor para la síntesis de glucógeno y también es un inhibidor alostérico de la glucógeno fosforilasa y un activador alostérico de la glucógeno sintasa, aumentando así los niveles de glucógeno en el hígado.

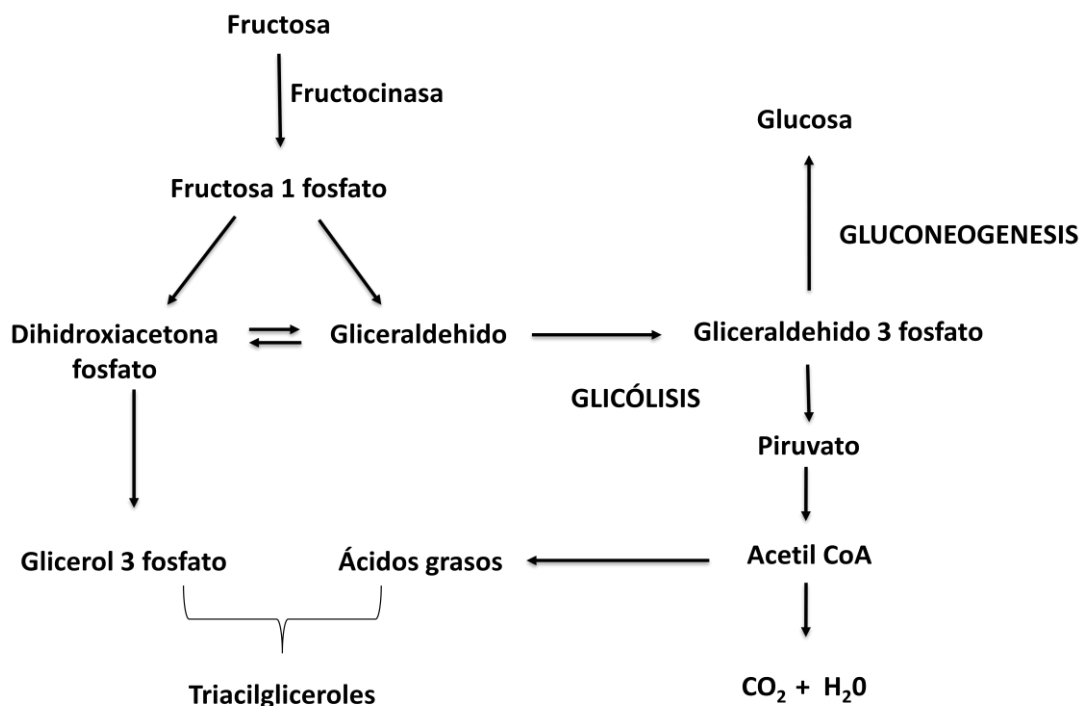


Figura 2. Comparación del metabolismo de glucosa y fructosa.

Por otra parte la fructosa entra pasivamente desde el lumen intestinal hacia la sangre y se ve favorecida por el transportador de glucosa GLUT5, el cual es un transportador específico para la fructosa (Havel, 2005). Esta absorción resulta en la captación masiva de fructosa en el hígado, donde es fosforilada por la fructocinasa, formando fructosa 1-fosfato; tanto glucosa y fructosa son convertidos en moléculas de 3 carbonos como GA3-P y DHA-P. Moléculas que pueden ser convertidas en glucosa, a través de la gluconeogénesis o usadas para generar TG.

El metabolismo de glucosa tiene puntos de regulación donde la glucosa entra a la vía glucolítica: el citrato y la adenosina-5-trifosfato (ATP) proporcionan una inhibición

alostérica de la fosfofructocinasa reduciendo la conversión de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato. Sin embargo, el metabolismo de la fructosa pasa por alto la fosfofructocinasa, permitiendo que los carbonos provenientes de su degradación entren a la glucólisis río abajo, es decir las moléculas de 3 carbonos son utilizadas para la síntesis de glicerol y ácidos grasos, y a través de la esterificación formar TG.

Después de un alto consumo de fructosa, las triosas fosfato son las principales precursoras lipogénicas, que pueden ser convertidas en piruvato y posteriormente oxidadas en CO₂ y H₂O en el ciclo del ácido tricarbóxico mitocondrial (Park et al., 1992). Cuando hay exceso de acetil-CoA en la mitocondria del hígado y no se puede metabolizar, esta molécula pasa al citosol en forma de citrato, redirigiéndose a la lipogénesis *de novo* (Park et al., 1992).

La lipogénesis *de novo* es regulada por ChREBP y SREBP-1c (Denechaud et al., 2008; Koo et al., 2009). La fructosa induce la activación de ChREBP y actúa sinérgicamente con SREBP-1c para incrementar la expresión de genes lipogénicos incluyendo la ACC, AGS, entre otras (Uyeda y Repa, 2006). SREBP-1c es responsable de que insulina induzca las enzimas lipogénicas en hígado (Denechaud et al., 2008) a su vez que es expresado independientemente de la insulina en el metabolismo de la fructosa (Matsuzaka et al., 2004).

La lipogénesis *de novo* hepática es acelerada por diferentes efectos de la síntesis de ácido grasos y efecto indirecto como los niveles elevados de malonil-CoA, la cual reduce la entrada de ácidos grasos en la mitocondria por la inhibición de la carnitina palmitiltransferasa 1 alfa (CTP1a) (McGarry, 1995). Esta enzima limitante de la beta oxidación regula la transferencia de acil-CoA de cadena larga desde el citosol a la mitocondria, produciendo un cambio oxidativo a una vía de reesterificación (Brown et al., 1995).

Otra de las moléculas importantes en la regulación de fructosa es el receptor alfa del activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR α), la cual pertenece a la superfamilia de ligandos nucleares de receptores a hormonas; la fructosa 1-fosfato reduce los niveles de mRNA de PPAR α hepáticos, y la disminución de PPAR α reduce la expresión de enzimas de oxidación de ácidos grasos (Nagai et al., 2002; Roglans et al., 2007; Roglans et al., 2002). También se ha observado que la alteración de PPAR α puede inducir un deterioro en

la transducción de la señal de la leptina, las ratas alimentadas con fructosa pero no con glucosa, desarrollan hiperleptinemia (Roglans et al., 2007; Roglans et al., 2002; Vilà et al., 2008).

Después los ácidos grasos son convertidos en TG por la esterificación, que pueden ser exportados del hígado en partículas de VLDL, las cuales están formadas por la incorporación de TG dentro de apolipoproteína B (apoB). Se ha sugerido que la síntesis y degradación hepática de apoB son mediadas por factor nuclear KB (NF-KB) (Tsai et al., 2009). La disminución en la degradación de apoB resulta en la acumulación de apoB en el retículo endoplasmático (RE), lo cual induce estrés del RE. En ratones ob/ob el estrés del RE promueve la activación de SREBP-1c, contribuyendo a la lipogénesis *de novo* (Kammoun et al., 2009).

1.2.3. Efecto de glucosa y fructosa en la saciedad

El consumo de glucosa o fructosa resulta en el aumento de calorías y ganancia de peso corporal a través de la activación de las señales de hambre y la supresión de señales de saciedad, así como la activación de los componentes de recompensa (Lindqvist et al., 2008). Algunos estudios han demostrado que una carga de fructosa reduce la ingesta de alimentos (Rodin, 1990; Tordoff y Friedman, 1988), sin embargo este efecto no se observa cuando se consume fructosa junto con una comida mixta (Rodin, 1991).

El aumento de la glucemia postprandial desempeña un papel importante en los mecanismos que controlan la saciedad y la ingesta de alimentos, es probable que este efecto se atenúe con la fructosa; ya que su índice glucémico es aproximadamente 5 veces menor que la glucosa, la ingesta de dietas elaboradas con fructosa provoca una menor supresión de la hormona estimulante del apetito que es la grelina y un menor aumento de leptina, en comparación con dietas que contienen una cantidad equivalente de glucosa (Teff et al., 2004), lo que sugiere que la fructosa puede ser menos eficiente que la glucosa para suprimir el consumo de alimentos. La ingesta aguda de fructosa se asocia con un aumento significativo de leptina en ayunas en murinos y humanos (Lê et al., 2006), esto indica que la sobrealimentación con fructosa ejerce efectos metabólicos en las células adiposas, que a largo plazo puede contribuir a suprimir la ingesta de alimentos. También se observó que la

alta ingesta de fructosa perturba acciones de la leptina, que provoca un estado de resistencia a la leptina.

La glucosa se ha demostrado que es el principal combustible para el cerebro y que los cambios en su concentración pueden actuar como una señal que informa al cerebro sobre el estado metabólico y nutricional del organismo. Cuando se administra glucosa en los ventrículos cerebrales se suprime la ingesta de alimentos a través de un aumento en la relación ATP/AMP y un mayor aumento de malonil-CoA en las áreas hipotalámicas (Hu et al., 2003). Cuando se administró la fructosa se observaron efectos opuestos, una caída en la relación ATP/AMP, disminución de malonil-CoA y aumento de la ingesta de alimentos (Cha et al., 2008). En roedores alimentados con una dieta alta en fructosa aumentan su peso corporal y masa grasa; debido a una mayor ingesta de energía total. Esto puede deberse a una estimulación de receptores a lo dulce en la boca, lo que activa las vías de recompensa dentro del cerebro.

Estudios comprueban que las proteínas y los carbohidratos provocan una respuesta de saciedad robusta, mediada en parte por el aumento de la insulina, la fructosa ejercen menor efecto en la saciedad que el almidón o la glucosa, posiblemente por inducir una menor respuesta en la liberación de insulina (Tappy, 2012). Evidencias en humanos confirman que una comida que contiene 30% de fructosa comparado con una comida similar del 30% de glucosa, provoca concentraciones más bajas de glucosa, insulina y leptina y concentraciones altas de grelina (hormona orexigenica) en la sangre.

1.3. Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa

1.3.1. Generalidades

La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD, EC1.1.1.49) es la enzima central de la vía de las pentosas fosfato; ya que controla el flujo de carbono y produce equivalentes reductores en forma de NADPH para satisfacer las necesidades celulares de biosíntesis reductiva y mantenimiento del estado redox celular (Kletzien et al., 1994). Tiene una importante función en el mantenimiento de la función celular y está presente en la mayoría de tejidos y organismos multicelulares. La importancia de esta enzima se ejemplifica con el ejemplo del síndrome de deficiencia de G6PD, una enfermedad que se manifiesta en los glóbulos rojos.

El estrés oxidante generado por fuentes dietéticas o farmacéuticas, se ha demostrado que causa hemólisis en los eritrocitos de individuos deficientes, subsecuentemente las mutaciones del gen representa una de las anomalías genéticas humanas más comunes que afectan aproximadamente 400 millones de personas en todo el mundo (Vulliamy et al., 1992; Beutler, 1992). El gen de la enzima está ligado al cromosoma X, y por lo tanto se presenta como una sola unidad de transcripción en humanos y en otros mamíferos, así como en *Drosophila*.

1.3.2. Regulación hormonal, nutricional, factores de crecimiento y estrés oxidante de G6PD

La G6PD se activa después de la exposición a diversos oxidantes extracelulares (Kletzien et al., 1994) que conducen a la disminución de NADPH. Se ha demostrado que la G6PD es altamente regulada a nivel de transcripción, traducción, postraducción y ubicación intracelular, por lo que la enzima es el objetivo de varias vías de señalización. La enzima es regulada por vitamina D, insulina, PI3-K, Akt y mTOR (Bao et al., 2008; Duvel et al., 2010; Wagle et al., 1998). Además de SREBP y el factor de transcripción que responde a estrés oxidante (Nrf2); este último regula varios genes de elementos de respuesta antioxidante (Zhang y Wang, 2007). Los reguladores negativos de G6PD son AMP cíclico y proteína cinasa A dependiente de cAMP (PKA) (Costa Rosa et al., 1995). Previamente fue demostrado que PKA conduce a un aumento en la fosforilación de serina/treonina de G6PD que probablemente desempeña un papel en la regulación negativa de la actividad de G6PD (Xu et al., 2005; Zhang et al., 2000). Además cAMP puede disminuir la actividad de G6PD al disminuir la transcripción del gen de la enzima.

El TNF α también disminuye la actividad de G6PD (Zhang y Wang, 2007), lo hace por medio del regulador transcripcional p53. En una línea celular de cáncer de colon, se demostró que p53 se une directamente a G6PD en el citoplasma y disminuye su actividad posiblemente a través de la formación de un dímero o un tetrámero (Jiang et al., 2011). Se ha visto que solo el 10% de G6PD parecía estar unida a p53. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también induce el mRNA de G6PD, lo que sugiere que la estimulación

del crecimiento de las células está relacionada con la inducción del gen de la enzima (Yoshimoto et al., 1983).

Stanton et al. (1991) han demostrado que la G6PD se activa en células corticales renales de rata dentro de 1 min de tratamiento con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La rápida activación de la enzima sugiere la posibilidad de un control mediante un mecanismo fosfo/desfosforilación; sin embargo existe evidencia de que la enzima está sujeta a un control por fosforilación, aunque la relación disminuida NADPH/NADP⁺ podría acelerar el flujo de carbono a través de la ruta. Stanton et al., sugieren que el control de la actividad es a través de un mecanismo que implica la unión de G6PD a las membranas intracelulares, es decir, la enzima está inactiva cuando se une y se activa al ser liberada.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también induce el mRNA de G6PD, lo que sugiere que la estimulación del crecimiento de las células está relacionada con la inducción del gen de la enzima (Yoshimoto et al., 1983).

Por otra parte, G6PD es considerada como un miembro de la familia de enzimas lipogénicas, donde se incluyen la AGS, ACC y la enzima málica. Este grupo de enzimas se induce en el hígado durante episodios de exceso de carbohidratos en la dieta y es responsable de la síntesis de ácidos grasos, un proceso generalmente regulado por la insulina. La actividad elevada de G6PD parece depender de la insulina, glucocorticoides y carbohidratos de la dieta (Kletzien y Berdanier, 1993). Un experimento muy utilizado ha sido someter a las ratas a un ayuno breve (24 o 48 horas) seguido de una dieta alta en carbohidratos, lo que conduce a un aumento en la actividad de la enzima (Kletzien y Berdanier, 1993). Se ha sugerido que un metabolito de los azúcares está involucrado en la regulación positiva de la expresión hepática de G6PD (Fukuda et al., 1992).

Otros estudios han demostrado que los ácidos grasos de la dieta pueden reprimir la inducción de la actividad de la enzima (Kletzien y Berdanier, 1993), del mRNA (Katsurada et al., 1989; Tomlinson et al., 1988) y de la transcripción del gen (Katsurada et al., 1989; Iritani, 1992) después del ayuno/realimentación. Estudios comprueban un aumento de 9 veces en el mRNA en grasa del epidídimo de rata después de una sobrealimentación de carbohidratos.

En *E. coli* se comprobó que los agentes que producen radicales de oxígeno inducen a la G6PD a través de un regulador el factor de transcripción SoxR, el cual controla a la enzima y otros genes necesarios para proteger a la célula del daño de los radicales libres (Greenberg et al., 1990). Además se ha demostrado que en cardiomiocitos adultos la actividad de la enzima aumenta rápidamente en respuesta al estrés oxidante celular, con la translocación de G6PD a la membrana celular, por lo tanto la G6PD es una enzima antioxidante citosólica crítica, esencial para el mantenimiento del estado redox citosólico en cardiomiocitos, y su deficiencia puede contribuir a la disfunción cardiaca a través de una mayor susceptibilidad de los radicales libres y al deterioro del transporte de calcio intracelular (Jain et al., 2003).

1.3.3. NADPH en sistemas oxidantes y antioxidantes

NADPH es producido por 4 enzimas en células de mamíferos que son G6PD, 6-fosfogluconato deshidrogenasa (PGD), enzima málica y la isocitrato deshidrogenasa. G6PD posee importancia única para muchos procesos celulares que utilizan NADPH; ya que las demás enzimas no proporcionan cantidades suficientes de esta coenzima para mantener procesos en niveles normales.

El sistema antioxidante depende de la producción de NADPH para el correcto funcionamiento, sus tres componentes enzimáticos principales son el sistema de glutatión, catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD) (Zhang et al., 2010). El primero depende de la producción del glutatión reducido (GSH) por la glutatión reductasa (GR) que depende de NADPH. La CAT no necesita NADPH para convertir el peróxido de hidrógeno en agua, pero tiene un sitio de unión alostérico para NADPH que mantiene a la catalasa en su conformación activa. La SOD no necesita NADPH para convertir el superóxido en peróxido de hidrógeno, pero si depende del buen funcionamiento del sistema del glutatión y CAT, y si su actividad no es la adecuada, los niveles de peróxido de hidrogeno aumentarán e inhibirán la SOD. Por lo tanto, el sistema antioxidante depende de NADPH.

Otro conjunto de enzimas que requieren de NADPH son las óxido nítrico sintasa (NOS) (Leopold et al., 2003). NADPH proporciona el potencial reductor para que la NOS pueda convertir la arginina a citrulina y óxido nítrico (NO). Otro sistema que depende de NADPH

es la familia de enzimas NADPH oxidasas, que tienen muchas funciones fisiológicas esenciales (crecimiento celular, función de glóbulos blancos) y en muchas patologías se han determinado (diabetes, enfermedad cardiovascular) como fuente principal de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Guzik y Griendling, 2009).

Hay otros sistemas que depende de NADPH incluidas las enzimas que intervienen en la producción de lípidos como 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa y NADPH-citocromo p450 oxidoreductasa que es requerida para el metabolismo de fármacos y la biosíntesis de esteroides, entre otras (Iyangi, 2007).

1.4. Nicotinamida

1.4.1. Generalidades

La nicotinamida (NAM) comúnmente conocida como vitamina B3 fue aislada del salvado de arroz en 1911. Es una amida derivada del ácido nicotínico, blanca, inodora, con sabor amargo, soluble en agua y su deficiencia causa pelagra en humanos. Su estructura consiste en un anillo de piridina con un grupo amida en la posición 3 (Figura 3).

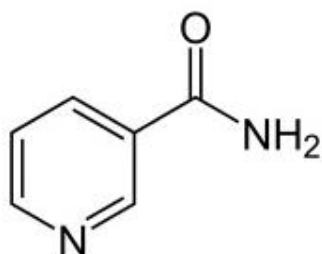


Figura 3. Estructura de nicotinamida.

1.4.2. Administración, tolerabilidad y farmacocinética de NAM

La farmacocinética de la NAM depende de la dosis, especie, sexo y la vía del tratamiento (Gluecksohn et al., 1996; Fumagalli, 1971; MC Creanor y Bender, 1986). Su metabolismo difiere entre cada especie estudiada (Handler, 1944). Se absorbe fácilmente vía parenteral, a partir del tracto gastrointestinal (Marcus y Coulston, 1996). Las concentraciones más altas

se detectan a la hora de su administración por vía oral en el humano desapareciendo rápidamente de la circulación para su posterior distribución en los tejidos (Petley et al., 1995).

La NAM se considera uno de los principales precursores para la formación y mantenimiento de la poza celular de NAD^+ , es metabolizada en el hígado con participación del citocromo P450 donde puede ser oxidada a nicotinamida-N-oxido, metilada a N-metil-nicotinamida, ó hidroxilada a 6-hidroxinicotinamida, también en humano y roedores la NAM es metabolizada a ácido nicotínico (Petley et al., 1995; Gillmor et al., 1999). La metilación hepática es importante para la detoxificación de la NAM; para ello se emplea L-metionina como donador del grupo metilo (Fumagalli, 1971), la N-metil-nicotinamida es excretada en la orina y la NAM se reabsorbe por los túbulos renales (Gillmor et al., 1999). La N-metil nicotinamida es oxidada en el hígado, en la circulación y los productos finales son N-metil-2-piridona-5- ácido carboxílico amida (2 pyr) y N-metil-4-piridona-3- ácido carboxílico amida (4 pyr). La porción de los dos metabolitos difieren con la especie y el sexo. En humanos se forma exclusivamente 2 pyr (Gillmor et al., 1999).

1.4.3. Dosis de NAM

La dosis letal media (LD_{50}) de la nicotinamida en ratas es 1.68 g/kg (Anonymous, 1989), y se estima que en ratones es 4.5 g/kg cuando se da oralmente y 2.5 g/kg cuando se da por vía intravenosa (Hoffer, 1967). Dosis altas de NAM son terapéuticamente efectivas en una gran variedad de enfermedades o condiciones. La administración oral u otras vías de administración han demostrado ser potentes en animales y alteraciones dermatológicas (Oblong, 2014), DT2 (Stevens et al., 2007), cáncer (Santidrian et al., 2014), isquemia cerebral (Ayoub y Maynard, 2002; Lee et al., 2006; Sakakibara et al., 2000), esclerosis múltiple (Kaneko et al., 2006), enfermedad de Alzheimer (Bayrakdar et al., 2014), infecciones virales, microbianas (Murray, 2003) y enfermedades inflamatorias (Maiese et al., 2009). También protege a las neuronas y disminuye el estrés oxidativo (Chong et al., 2002; Kiuchi et al., 2002).

1.4.4. Efectos terapéuticos de NAM

Estudios previos indican que NAM brinda protección a las células β después de administrar compuestos citotóxicos, tales como la estreptozotocina (STZ). El cual es un agente diabético, por contener en su molécula un grupo nitroso que alquila el ADN, responsable de daño en roedores (Klaidman et al., 2001). La generación de radicales libres, el rompimiento de las cadenas de ADN, la activación de PARP y la depleción intracelular de NAD^+ , son factores comunes de la muerte de las células β pancreáticas inducida por STZ (Corbett et al., 1992; Heller et al., 1995; O' Brien et al., 1996). NAM antagoniza el daño de la STZ mediante inhibir a PARP suprimiendo la depleción del NAD^+ y glutatión por lo que protegen a las células contra la apoptosis (Kretowski et al., 1996).

Por otra parte, la administración del mononucleótido de nicotinamida (otro intermediario de la síntesis de NAD^+) en un modelo de DT2 inducida con una dieta alta en grasa en ratón, incrementa la poza de NAD^+ mejorando la sensibilidad a la insulina mediante disminuir la expresión de genes relacionados con estrés oxidante, inflamación y desacetilación de proteínas catalizada por sirtuínas (SIRT) (Yoshino et al., 2011).

Los efectos de NAM se derivan en parte por su conversión a NAD^+ con el incremento de los niveles de NAD^+ y por la modificación de su relación redox NAD^+/NADH . NAD^+ desempeña un papel crítico para activar a SIRT 1 y otras sirtuínas, las cuales desempeñan un papel importante en la salud celular y longevidad mediante la modulación del metabolismo así como reguladoras de la función y la calidad mitocondrial (Yao et al., 2014). Los efectos de NAM son dosis dependientes, bajas dosis pueden estimular el crecimiento y la proliferación (Bai et al., 2008) e inhibir la expresión de pequeños genes (Kolb y Burkart, 1999).

Las evidencias de nuestro grupo de trabajo ha demostrado que en adipocitos 3T3-L1, NAM mediante una inhibición no competitiva modula la actividad específica de G6PD (Torres et al., 2013). Debido al efecto inhibitorio de NAM sobre el estrés oxidante y la acumulación de lípidos en preadipocitos se puede proponer como agente terapéutico en el tratamiento y prevención de la obesidad y enfermedades asociadas con la obesidad (Torres et al., 2013).

Además NAM disminuye las concentraciones del superóxido mitocondrial a corto y largo plazo lo que resulta en la proliferación potencial de fibroblastos normales, queratinocitos y células inmunes (Choi et al., 2015; Kang y Hwang, 2009; Kang et al., 2006).

También se ha sugerido que el tratamiento de NAM activa a SIRT 1, la cual impulsa la mitofagia que es selectiva para las mitocondrias que experimentan bajos y altos niveles de generación de ERO. Se ha sugerido que NAM abate la formación de superóxido porque reduce el transporte de electrones e incrementa los potenciales de membrana, disminuyendo la formación de poros de la membrana mitocondrial. Por lo tanto, el tratamiento de NAM puede usarse como agente terapéutico para mejorar la calidad mitocondrial a través de activar la mitofagia selectiva en células que proliferan normalmente (Song et al., 2017).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La RI y la sobrecarga de energía en forma de glucosa, fructosa y ácidos grasos en tejido hepático favorecen el inicio de la esteatohepatitis, ocasionada por un desencadenante metabólico que causa esteatosis y posteriormente un segundo estímulo que lleva a un estado de estrés oxidante; debido al incremento de ERO y lipoperoxidación. En el origen de la esteatohepatitis hay que considerar dos procesos metabólicos que contribuyen al depósito de lípidos intracelulares, como son la lipogénesis y lipólisis. En fase temprana la desregulación de la lipogénesis y lipólisis por parte del tejido adiposo promueve la liberación de ácidos grasos que ingresarán a tejidos periféricos y favorecerán un decremento en la sensibilidad a la insulina, como sucede en músculo esquelético que pierde la capacidad de captar glucosa, la cual será ingresada por el tejido hepático facilitando la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Otra respuesta del hígado ante la falta de señal por parte del músculo es iniciar la producción de glucosa, concomitante a ello su transformación a ácidos grasos tanto en él, como en el adiposo. Durante la síntesis *de novo* de ácidos grasos es indispensable contar con la maquinaria enzimática y los equivalentes reductores en forma de NADPH para que funcione adecuadamente. Con este conocimiento la G6PD que proporciona NADPH se encuentra aumentada específicamente los hepatocitos productores de ácidos grasos. Alterando la relación NADPH/NADP⁺ que regula la síntesis de colesterol y a enzimas pro-oxidantes, lo que refleja en niveles bajos de GSH; ya que NADPH es

indispensable para que éste sea regenerado mediante la vía redox de GSH. Considerando la importancia de G6PD en la síntesis *de novo* y sus secuelas es posible que al intervenir su expresión y actividad, se pudiera frenar la acumulación de ácidos grasos y la esteatosis y su avance a esteatohepatitis.

3. HIPÓTESIS

La nicotinamida al reducir la actividad y expresión de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, junto con NADPH/NADP⁺ induce cambios en el estado redox celular, disminuyendo el estrés oxidante y la acumulación de lípidos en el hígado en ratas alimentadas con una dieta suplementada con glucosa y fructosa al 30%.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Intervenir la actividad y expresión de la G6PD mediante la administración de nicotinamida en un modelo de esteatosis hepática no alcohólica, con la finalidad de prevenir las alteraciones del estado redox y reducir la acumulación de lípidos, estrés oxidante y marcadores de daño hepático.

4.2. Objetivos particulares

En ratas macho Sprague Dawley con un peso aproximado de 250 g con dislipidemia y daño hepático, sin tratamiento, o con tratamiento de nicotinamida:

- Determinar alteraciones metabólicas (ganancia de peso, insulina, glucosa, TG (suero e hígado), AGL, colesterol, ALT, AST y TBARS (suero e hígado)).
- Determinar la actividad específica y expresión de G6PD hepática.
- Determinar los cambios de GSH, GSSG, GSH + GSSG y GSH/GSSG hepático.
- Determinar los cambios de NAD⁺, NADH, NADPH y NADP⁺ hepático.

- Evaluación histológica hepática, mediante las tinciones de hematoxilina-eosina, y tricrómica de Masson.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1. Materiales y Reactivos

Los químicos fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, E,U); membranas PVDF (Merck Millipore, Bedford, MA, USA); RNeasy Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA); inhibidor de proteasa (GenDepot, Houston, TX, USA); TriPure isolation reagent (ROCHE, Indianapolis, USA), First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Massachusetts); Fast Start DNA Master SYBR Green Plus (ROCHE, Mannheim, Alemania); Rat Insulin ELISA kit (ALPCO, Nuevo Hampshire, USA); Free Fatty Acid Quantification Kit (BioVision, Milpitas, USA); Rat TNF α immuoassay ELISA (R&D, Systems, Inc. Minneapolis, USA). Los iniciadores fueron manufacturados por Invitrogen (CA, USA) y los anticuerpos primarios y secundarios por Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA).

5.1.2. Declaración ética

El diseño experimental y manejo de los procedimientos en los animales fueron aprobados por el Comité Local de Investigación en Salud del IMSS conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2001) para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

5.1.3. Animales

Ratas macho Sprague Dawley (250 ± 5 g) fueron proporcionadas por el Bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS. Una semana antes de iniciar los experimentos, los roedores fueron aclimatados con períodos de luz/obscuridad (12/12 h) y ventilación para garantizar condiciones óptimas de humedad (50%) y temperatura ambiente (23°C).

5.1.4. *Inducción de esteatosis hepática y tratamientos*

Treinta animales fueron distribuidos de forma aleatoria en 6 grupos y sujetos a los siguientes tratamientos: 1). Control; 2). Glucosa; 3). Glucosa + 0.06% NAM; 4). Glucosa + 0.12% NAM; 5). Fructosa; 6) Fructosa + 0.12% NAM. La glucosa o fructosa al 30% disuelta en el agua de beber fue administrada por 12 semanas *ad libitum*; sin embargo a partir de la 5ª semana todas las mañanas se retiraron los carbohidratos por 5 h para dar los tratamientos con las diferentes concentraciones de NAM en el agua de beber. Concluidas las 5 h se retiraban los tratamientos de NAM para continuar con la administración de glucosa o fructosa. Durante el período de tratamiento se registró consumo de alimento, líquidos y peso corporal. El grupo control recibió agua *ad libitum* y todos los animales fueron alimentados a base de la fórmula Chow 5008 (Purina) *ad libitum*.

5.1.5. *Obtención de muestras biológicas*

Finalizados los tratamientos los animales fueron pesados y anestesiados con pentobarbital (25 mg/kg, i.p.). Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardiaca y puestas en tubos con y sin anticoagulante (EDTA), centrifugadas a 5,200 g por 15 min en una centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6 R (Thermo Scientific). Suero y plasma fueron almacenados a -70°C y descongelados antes de su análisis. Además, fragmentos de hígado fueron removidos, algunos conservados en formaldehído al 10 % (análisis histológico), otros en TriPure (RT-PCR) y el resto almacenados a -70 °C hasta su uso (actividad y western blot).

5.2. *Métodos*

5.2.1. *Análisis de marcadores metabólicos*

Las concentraciones de marcadores séricos (glucosa, TG, colesterol, ALT y AST) fueron determinadas mediante el equipo automatizado COBAS-INTEGRA 400 (Roche Diagnostics International). Unas muestras fueron usadas para determinar TG hepáticos y fueron preparadas bajo las mismas condiciones como los sobrenadantes usados para G6PD (sección 5.2.3).

5.2.2. Cuantificación de insulina, ácidos grasos libres y TNF α

Las concentraciones de insulina, AGL y TNF α fueron determinados mediante los equipos Rat Insulin ELISA, Free Fatty Acid Quantification y Rat TNF α immuoassay ELISA siguiendo los protocolos del fabricante. Las absorbancias fueron obtenidas a 450, 570 y 450 nm, respectivamente, usando el lector Multiskan EX 96-well microplate (Labsystems, Helsinki, Finland).

5.2.3. Actividad específica de G6PD

Fragmentos de hígado fueron homogeneizados al 10 % (p/v) en PBS 0.1M pH 7.5 mediante un homogenizador Polytron PT 1200, posteriormente fueron centrifugados a 83,500 g a 4°C durante 20 min en una centrifuga Sorvall ST 40R (Thermo Scientific). La actividad se determinó en los sobrenadantes por la producción de NADPH. Las absorbancias fueron monitoreadas a 340 nm durante 10 min usando un espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA). La mezcla de reacción contenía 35 mM glucosa 6-fosfato, 0.1M MgCl₂, 11mM NADP⁺ y 0.1M trietanolamina. La actividad fue expresada como U/mg de proteína; 1 unidad de enzima oxida 1 mol de sustrato por minuto en presencia de NADP⁺. La concentración de proteína se evaluó por el método de Bradford (1976).

5.2.4. Determinación de GSH y GSSG

Fragmentos de hígado fueron homogeneizados (10% p/v) en ácido metafosfórico al 5% o PBS 0.1 M pH 7.5 para determinar GSH o GSSG, respectivamente. Los homogeneizados fueron centrifugados a 83,500 g por 20 min a 4 °C y en los sobrenadantes se realizaron las determinaciones. GSH se determinó espectrofotométricamente empleando el reactivo de Ellman (5-5'-ditiobis (2-nitro ácido benzoico) o DTNB). El ensayo se basa en la reacción estequiometría entre el DTNB y el grupo tiol del GSH. El nitromercapto benzoato formado presenta una absorbancia máxima a 412 nm proporcional a la concentración de GSH. Para GSSG fue utilizado un método enzimático, previo tratamiento del sobrenadante con 1-metil-2-vinilpiridium trifluorometanosulfonato 10 mM (M2VP), el cual secuestra grupos tioles sin interferir con la glutatión reductasa (GR) presente en el ensayo. GSSG fue

reducido a GSH por acción de GR en presencia de NADPH y el GSH formado fue cuantificado con el reactivo de Ellman. El cambio de color durante la reacción y la velocidad de reacción son proporcionales a las concentraciones de GSH y GSSG.

5.2.5. Determinación del potencial redox

Los potenciales redox de la pareja redox del glutatión fueron calculados utilizando las concentraciones de GSH y GSSG determinadas experimentalmente en la ecuación de Nernst como sigue:

$$E_h = E^{\circ} - (RT/nF) \log ([GSH]^2/[GSSG])$$

E° es el potencial estándar para la pareja redox acoplada GSH/GSSG (-240 mV a pH 7 en tejido), R la constante de los gases ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T la temperatura absoluta, F la constante de Faraday ($9.6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$) y n es el número de electrones transferidos. La ecuación de Nernst fue empleada a $T 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (298.15 K) usando 2.303 como factor convencional para \ln en \log_{10} . Valores relativamente más negativos indican un estado más reducido, mientras valores menos negativos lo contrario.

5.2.6. Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Alícuotas de homogeneizados de hígado (PBS 0.1 M pH 7.5) y plasma fueron utilizadas para determinar el grado de lipoperoxidación evaluado como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante una técnica espectrofotométrica. El fundamento del método se basa en la reacción producida entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el producto de lipoperoxidación, malondialdehído, que origina TBARS que puede medirse mediante espectrofotometría a 595 nm. Brevemente, a alícuotas de suero y homogeneizados de hígado (PBS) se les ajustó a ácido tricloroacético 10%, se reposó en hielo y centrifugó a 85,500 g por 15 min. Al sobrenadante se agregó TBA agitando vigorosamente e incubando a $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 min, se enfrió a temperatura ambiente, mezcló, centrifugó y en el sobrenadante se midió la absorbancia a 535 nm. El estándar de MDA se preparó con 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano.

5.2.7. Extracción y determinación de nucleótidos de piridina

Fragmentos de hígado fueron procesados para determinar la forma oxidada y reducida de los nucleótidos de piridina. Para determinar NADH y NADPH se prepararon homogeneizados con una solución de extracción conteniendo NaOH 0.02 N y cisteína 0.5 mM. Las muestras fueron calentadas a 60°C por 10 min y neutralizadas con glicilglicina 0.25 M pH 7.6. La extracción de NAD⁺ y NADP⁺ fue realizada con HClO₄ 0.1 N y neutralizada con KOH 0.5 N. Todos los homogeneizados fueron centrifugados a 83,500 g por 30 min. Las coenzimas fueron determinadas enzimáticamente monitoreando la absorbancia a 340 nm. La concentración de las coenzimas fue reportada como μM.

5.2.8. Técnica de “Western blot”

Homogeneizados de hígado fueron preparados con un amortiguador de lisis conteniendo 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, 0.2% NP-40 y un coctel de inhibidores de proteasas. Después de centrifugar a 3000 g por 20 min, las proteínas de alícuotas de sobrenadantes (40 μg proteína) fueron separadas por electroforesis en geles al 10% SDS-PAGE y transferidos a membranas de PVDF. Las membranas previamente fueron bloqueadas con albúmina al 5% en TBS-T por 2 h, y fueron incubadas a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios anti-G6PD y anti-β-actina (1:1000 en 1% BSA, TBS y 0.1% Tween-20). Después de lavar las membranas, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h con los anticuerpos secundarios anti-conejo y anti-ratón (1:2000) marcados con peroxidasa. Las bandas fueron detectadas por un sistema de quimioluminiscencia Amersham ECL Plus (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, MI, USA), y un escáner Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, Rochester, NY, USA).

5.2.9. Extracción de RNA y RT-PCR

El RNA total fue aislado usando el reactivo TriPure siguiendo el protocolo del fabricante. Para comprobar la pureza del RNA de cada muestra, se midió a 260 y 280 nm, las relaciones fueron entre 1.9 ± 0.2 , consistente con ausencia de contaminantes proteicos. Para confirmar la integridad, 1μg de RNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al

1%, el RNA se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó usando un analizador de imágenes (BioRad). Se detectaron dos principales bandas de rRNA ribosomal (28 y 18S), sin degradación del RNA (datos no mostrados). A partir de 2 µg de RNA total fue sintetizado el cDNA utilizando el kit First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific), siguiendo los protocolos del fabricante, en un volumen final de 20 µL. La qPCR fue realizada en un volumen final de 20 µL en el LightCycler 2.0, utilizando el Fast Start DNA Master Plus SYBR Green Plus (Roche). La mezclas de qPCR contenían 0.5 mM de iniciadores para **G6PD** (F5`-CCTGATGATCCCAAATTCATCAAATAG-3`, R5`-CTGGAACCGCATCATAGTGGAG-3` [283pb]). NADPH oxidasa 4 (F5`-GCTCATTTCCCACAGACCTGG-3`, R5`-AGGTTTGTGCTCCGGATGCA-3`). **18S** (F5`-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3`, R5`-CGCTGAGCCAGT TCAGTGTA -3` [218 pb]), como control interno. La PCR se realizó por duplicado, las condiciones de reacción fueron las siguientes: se inició a 95° por 10 min, seguido de 35 ciclos (95°C por 10 s, 61°C por 7 s, 72°C por 10 s). La cuantificación de los genes G6PD y NOX4 fue expresado como niveles relativos de mRNA comparados con el control. El cálculo se realizó después de la normalización con 18S mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

5.2.10. Evaluación histológica

Para el estudio histológico fragmentos de hígado se preservaron en formaldehído al 10% y posteriormente fueron embebidos en parafina. Las secciones de hígado de 6 µm fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina y tricrómica de Masson. Las biopsias fueron clasificadas en 4 grados de esteatosis, dependiendo de la acumulación de grasa usando la clasificación de Kleiner.

5.2.11. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± D.E. La comparación entre grupos se realizó con ANOVA y para el análisis entre grupos se usó la prueba de Tukey-Kramer. Los cálculos estadísticos fueron ejecutados en un software NCSS 2007 (Kaysville, UT, USA) con una $p < 0.05$ los cuales fueron considerados como significativos.

6. RESULTADOS

6.1. NAM mejora el perfil metabólico alterado por el consumo de glucosa o fructosa

El consumo de glucosa o fructosa incrementó el peso corporal (~56%) comparado con el grupo control, lo cual se reflejó en aumentos en glucemia (>100%), insulinemia (~2 veces), TG séricos (~4- 5 veces) y hepáticos (~1.6 veces), AGL (~2 veces), TBARS (~4.3 veces), sin cambios en colesterol. Glucosa o fructosa también aumentaron marcadores de daño hepático usualmente utilizados ALT (11 y 170%, respectivamente) y AST (~ 52% con ambos carbohidratos) éstos cambios fueron significativos con respecto al grupo control (Tabla1).

Los grupos con glucosa o fructosa suplementados con NAM 0.06 y 0.12 % mostraron efectos protectores destacando decrementos de ALT (Glucosa+NAM: 48 y 23%, respectivamente; Fructosa+NAM: 73%), AST (Glucosa+NAM: ~13%, con ambas dosis; Fructosa+NAM: 35%), AGL (Glucosa+NAM: >3.1 y 4.8%, respectivamente; Fructosa+NAM: 1.4%), TBARS (Glucosa+NAM: ~30% con ambas dosis; Fructosa+NAM: 50%) y TG hepáticos (Glucosa+NAM: 14.12% y 31.3%, respectivamente; Fructosa+NAM: 24.22%). Todos estos decrementos fueron analizados con respecto a los grupos que recibieron exclusivamente glucosa o fructosa (Tabla 1).

Tabla 1

Efecto de NAM sobre alteraciones metabólicas inducidas por carbohidratos en ratas.

	Control	Glucosa	Glucosa + 0.06% NAM	Glucosa + 0.12 % NAM	Fructosa	Fructosa + 0.12 % NAM
Inicio (g)	252 ± 2.18	251 ± 2.77	250.5 ± 3.32	252.4 ± 2.65	253 ± 1.78	252.5 ± 2.65
Final (g)	424.33 ± 3.68	528 ± 2.82^a	519.4 ± 3.58	502.4 ± 3.65	516.6 ± 2.07^a	502.5 ± 1.41
Ganancia de peso (g)	172.33 ± 18.95	277 ± 31.77^a	268.9 ± 3.22	250 ± 23	263.6 ± 26.58^a	250 ± 23.5
Insulina (ng/ml)	1.64 ± 0.42	3.45 ± 0.66^a	2.76 ± 0.43	2.70 ± 0.48	3.81 ± 0.68^a	3.05 ± 0.37
Glucosa (mg/dl)	112.5 ± 9.19	229.5 ± 2.12^a	187 ± 43.30	179.33 ± 20.79	206 ± 23.64^a	181 ± 14.93
TG (mg/dl)	38.5 ± 0.70	160.66 ± 18.77^a	147 ± 45.21	121 ± 29.81	202.33 ± 44.27^a	201 ± 19.75
AGL (nmol/μl)	11.58 ± 6.92	27.68 ± 1.48^a	8.92 ± 6.36^b	5.81 ± 0.28^b	21.02 ± 2.52^a	15.28 ± 2.49^d
Colesterol (mg/dl)	64 ± 4.58	72.5 ± 12.87	73 ± 6.92	54.75 ± 0.95^b	66 ± 7.31	72 ± 4.16
ALT (u/l)	33.6 ± 4.47	50.97 ± 4.93^a	44.9 ± 3.01	43.96 ± 7.01	50.85 ± 9.93^a	33.06 ± 3.32^d
AST (u/l)	116.06 ± 11.86	129.34 ± 12.30^a	67.75 ± 2.16^b	99.17 ± 12.98^c	312.8 ± 68.3^a	84.25 ± 4.72^d
TBARS (nM)	7.78 ± 0.92	35.28 ± 0.70^a	11.37 ± 0.5^b	12.42 ± 3.14^b	31.48 ± 6.87^a	15.5 ± 1.70^d
TG hepático (mg/dl)	7.67 ± 1.52	106.75 ± 3.77^a	91.67 ± 2.08^b	73.33 ± 1.52^c	129.66 ± 1.52^a	98.25 ± 0.95^d

Los valores son expresados como media ± D.E. de 5 animales por grupo. ^a*P*<0.05 comparado con el control. ^b*P*<0.05 comparado con glucosa. ^c*P*<0.05 comparado con glucosa o glucosa + 0.06% NAM. ^d*P*<0.05 comparado con fructosa.

6.2. NAM decrece la esteatosis hepática inducida por glucosa o fructosa

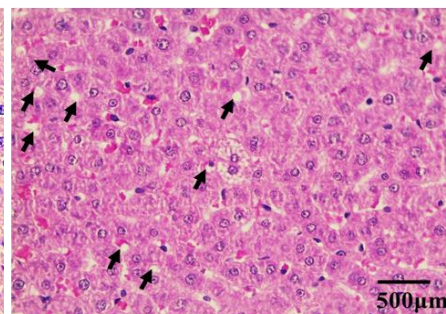
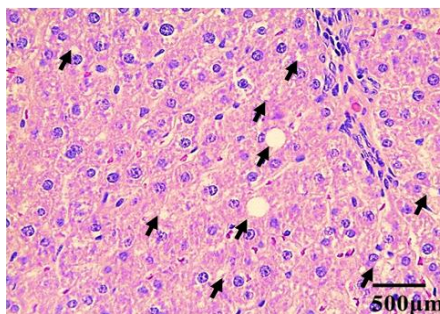
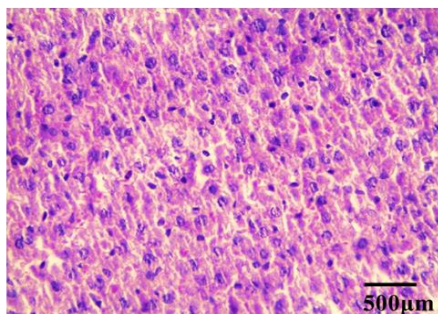
Las ratas que consumieron glucosa o fructosa al 30% por 90 días presentaron esteatosis franca de grado 0 y 1 (5 y 10% gotas lipídicas, respectivamente) con respecto al grupo control (Figura 4. A). Además los carbohidratos alteraron la arquitectura con presencia de hepatocitos con degeneración balonizante, sinusoides dilatados, y sin datos de fibrosis (Figura 4. B y C). El suplemento de NAM disminuyó el grado de esteatosis conservando la arquitectura tisular (Figura 4. D, E y F). Reforzando lo anterior, la concentración de TG hepáticos también aumentó con el consumo alto en carbohidratos y dicho aumento fue prevenido parcialmente por NAM.

A) Control

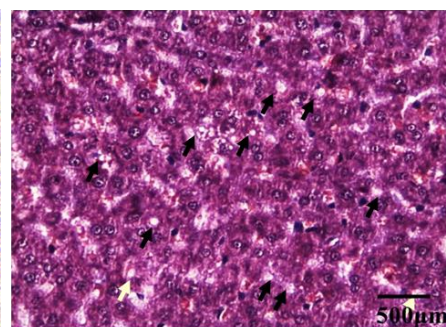
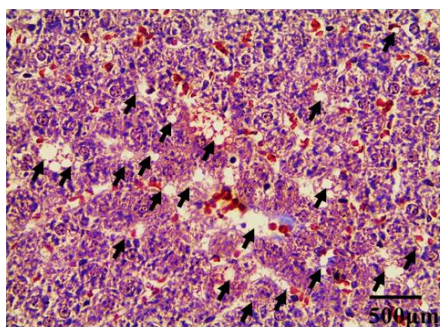
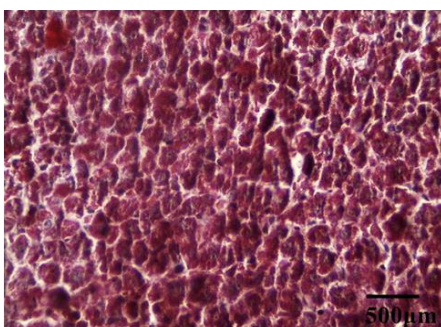
B) Glucosa

C) Fructosa

H&E



Masson

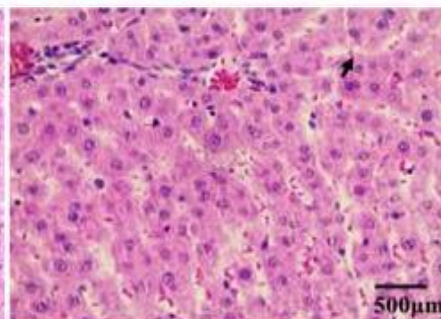
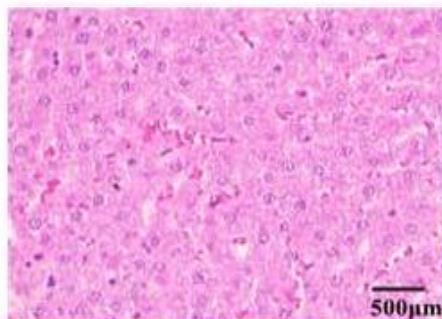
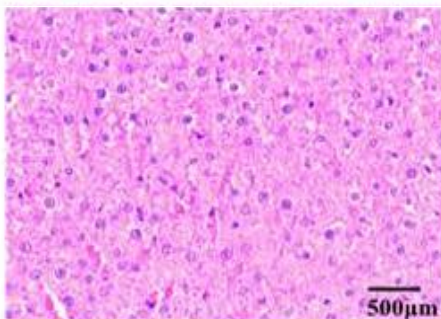


D) Glucosa+0.06%NAM

E) Glucosa+0.12%NAM

F) Fructosa+0.12%NAM

H&E



Masson

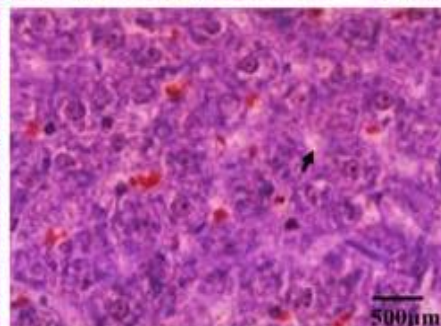
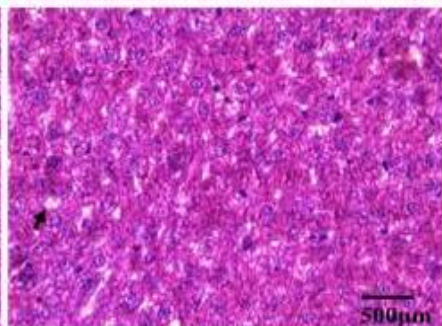
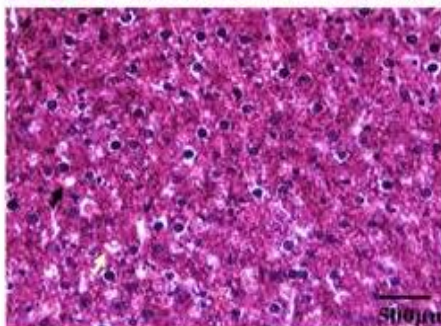


Figura 4. Análisis histológico de hígado de rata. A) Control, B) Glucosa, C) Fructosa, D) Glucosa+0.06% NAM, E) Glucosa+0.12% NAM y F) Fructosa+0.12% NAM. Tinción de Hematoxilina & Eosina y tricrómica de Masson.

6.3. Perturbación del estado redox del glutati3n por glucosa o fructosa y su mejoría con NAM

La esteatosis hepática inducida por glucosa o fructosa alteró el estado redox del glutati3n, disminuyendo GSH (~69%, Figura 5. A) y aumentando GSSG (~72%, Figura 5. B). Éstos cambios se manifestaron en el decremento de la relaci3n GSH/GSSG (>85%; Figura 5. C) y de la poza GSH+GSSG (~67%; Figura 5. D) todo comparado con el grupo control.

NAM (0.06 y 0.012%) incrementó significativamente GSH (Glucosa+NAM: ~43% con ambas dosis; Fructosa+NAM: 62%; Figura 5. A) junto con decremento de GSSG (Glucosa+NAM: ~20% con ambas dosis; Fructosa+NAM: 9%, Figura 5. B). Los cambios de GSH y GSSG inducidos por NAM se manifestaron en aumentos significativos en la relaci3n GSH/GSSG (Glucosa+NAM: 128 y 86%, respectivamente; Fructosa+NAM: 98%; Figura 5. C) y de la poza GSH+GSSG (Glucosa+NAM: 50 y 31%, respectivamente; Fructosa+NAM: 62%, Figura 5. D) cuando se comparan con respecto al grupo glucosa o fructosa.

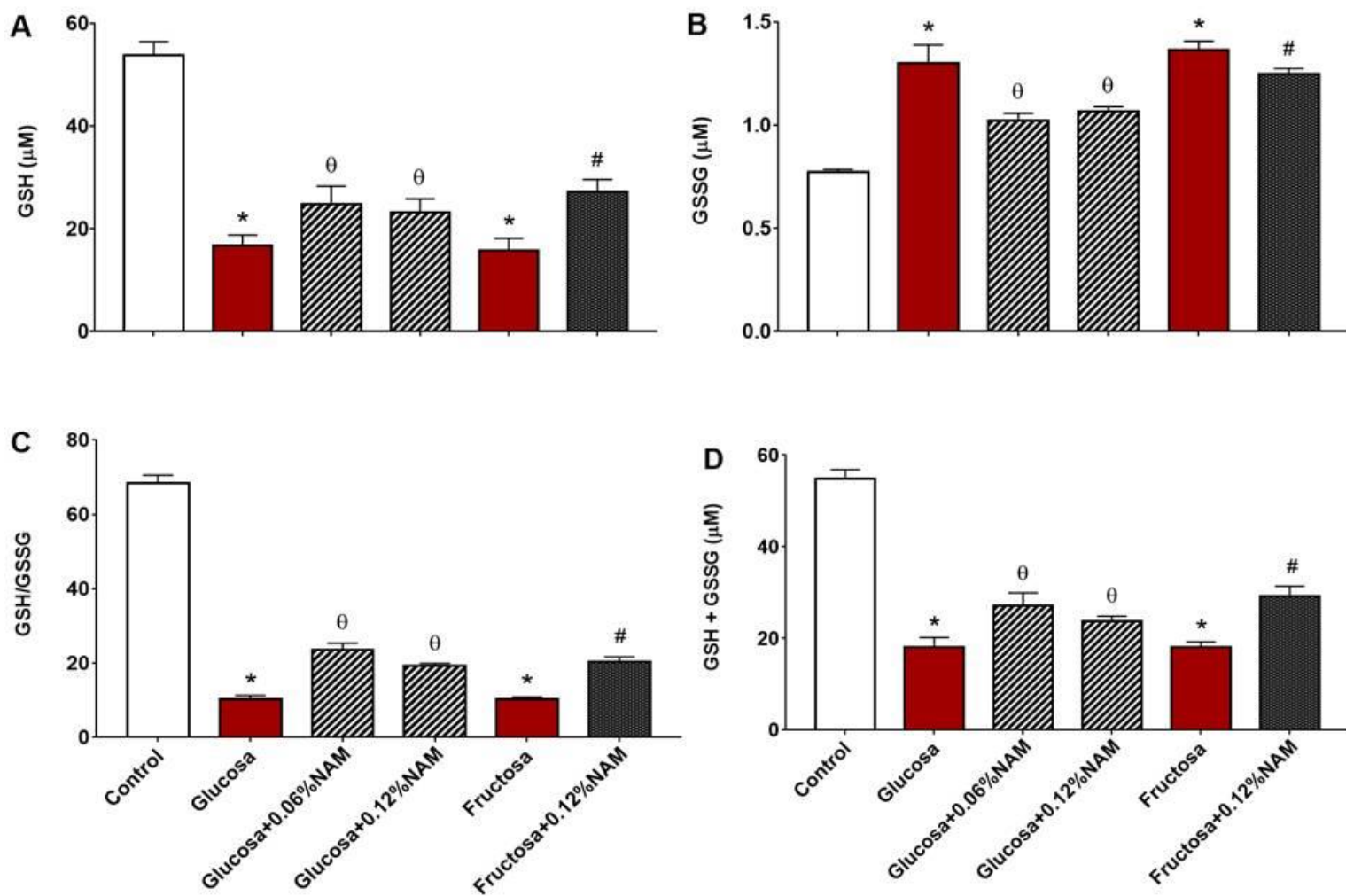


Figura 5. Estado redox del glutatión. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo.

* $P < 0.05$ comparado con el control. ^θ $P < 0.05$ comparado con glucosa. [#] $P < 0.05$ comparado con fructosa.

6.4. NAM modifica el potencial redox GSH/GSSG y reduce la concentración de TNF α

El potencial redox evaluado por la ecuación de Nerst demostró que los grupos tratados con glucosa o fructosa son significativamente más pro-oxidantes (-280; Figura 6. A) comparados con el control. Los grupos glucosa o fructosa que recibieron NAM 0.06 y 0.12% disminuyeron el estado pro-oxidante (Glucosa+NAM, -290.42 y -287.96, respectivamente; Fructosa+ NAM, -288.75; Figura 6. A) comparado con el grupo de glucosa o fructosa.

La concentración de TNF α incrementó significativamente (~ 4 veces) con glucosa o fructosa 30% con respecto al control. En contraste, NAM con ambas dosis administrada a los grupos glucosa o fructosa disminuyó significativamente la concentración de la citocina proinflamatoria (~ 35%) (~1.3 veces; Figura 6. B) comparado con el grupo de glucosa o fructosa (Figura 6. B).

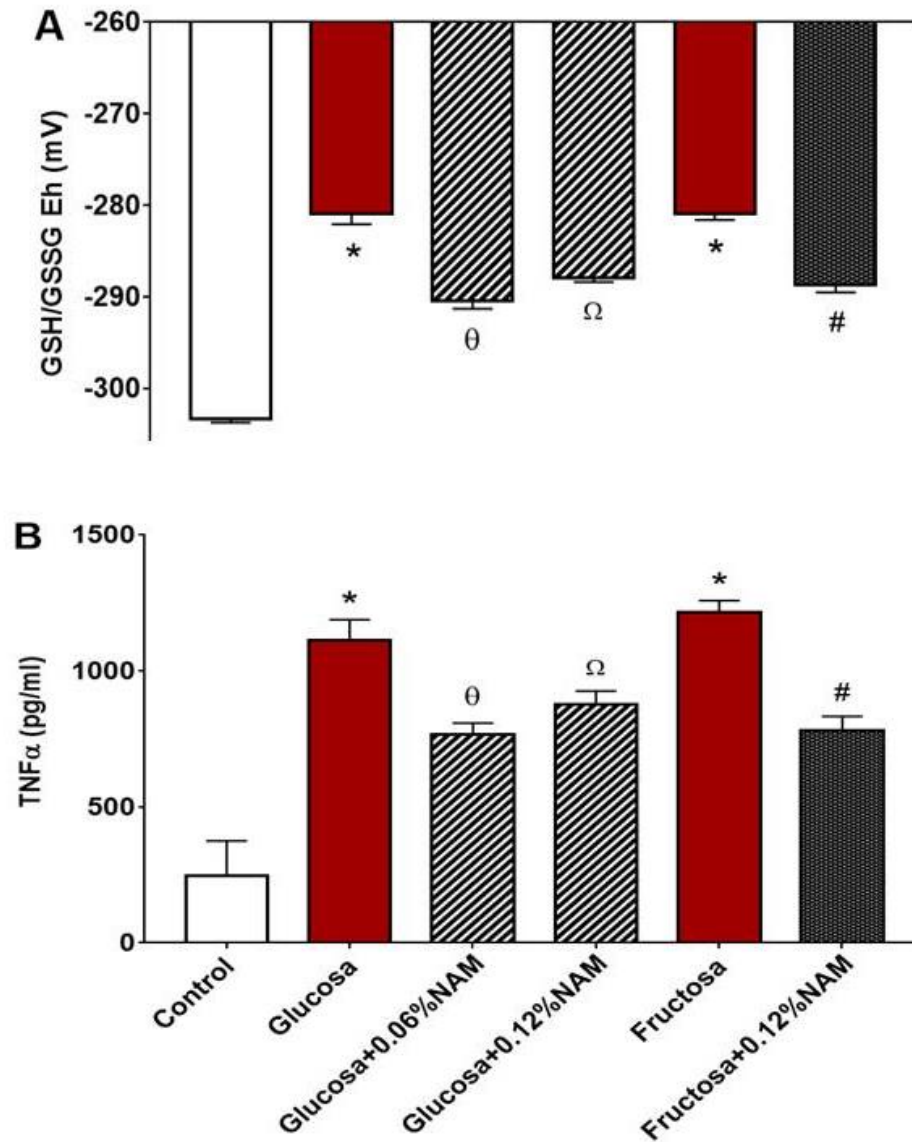


Figura 6. Efecto de NAM sobre A) potencial redox GSH/GSSG y B) TNF α . Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. ^θ $P < 0.05$ comparado con glucosa. ^Ω $P < 0.05$ comparado con glucosa o glucosa + 0.06% NAM. # $P < 0.05$ comparado con fructosa.

6.5. NAM disminuye la expresión y actividad específica de G6PD hepática inducidos por glucosa o fructuosa

Glucosa o fructosa 30% administrada por 90 días incrementaron, la concentración de proteína (2.03 y 2.75 veces, Figura 7. A), mRNA (1.38 y 2.4 veces; Figura 7. B) y actividad específica (4.08 y 8.13 veces; Figura 7. C), de G6PD respectivamente, cuando se compara con el grupo control. NAM (0.06 y 0.12%) disminuyó la cantidad de proteína (Glucosa+NAM; ~1.6 veces con ambas dosis; Fructosa+NAM: 2.72 veces; Figura 7. A), mRNA (Glucosa+NAM:- 8.62 y -6.9 veces, respectivamente o Fructosa+NAM: -15 veces; Figura 7. B) y actividad específica (Glucosa+NAM: ~1.5 veces, ambas dosis o Fructosa+NAM: 1.76 veces; Figura 7. C). Estos cambios con respecto a los grupos de glucosa o fructosa. No obstante que los grupos tratados con glucosa ó fructosa suplementados con NAM presentan un decremento del mRNA (80%); sus actividades están arriba del grupo control, así como la cantidad de proteína (1.16 veces con ambos carbohidratos).

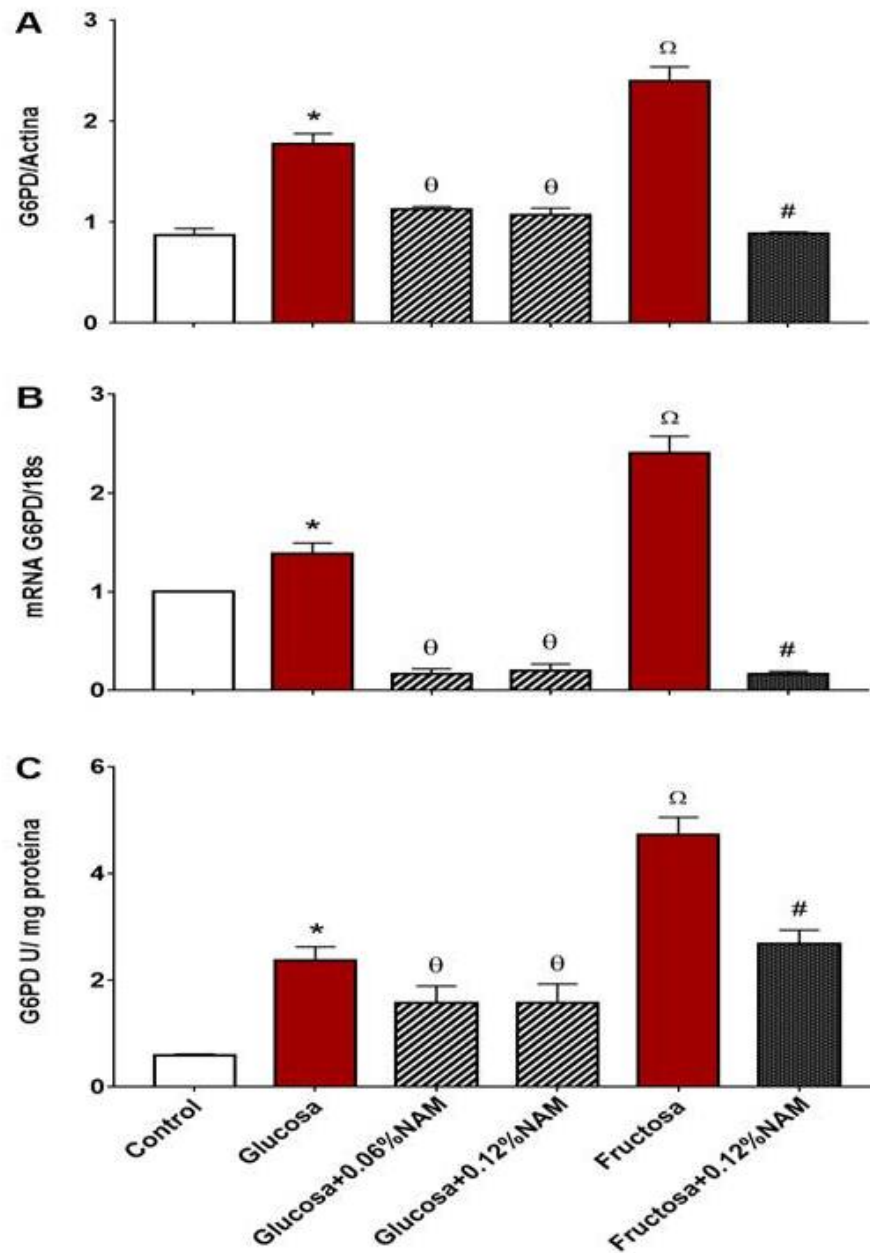


Figura 7. A) Cantidad, B) expresión y C) actividad de G6PD. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. ^θ $P < 0.05$ comparado con glucosa. ^Ω $P < 0.05$ comparado con el control o glucosa. # $P < 0.05$ comparado con fructosa.

6.6. NAM decrece el aumento de TBARS y expresión de NOX4 hepáticos inducidos por glucosa o fructosa

El consumo alto y crónico de glucosa o fructosa incrementaron el mRNA de NOX4 (79 y 93%, respectivamente), que fue abatido por NAM 0.06 y 0.12% (Glucosa+NAM: 42 y 66%, respectivamente; Fructosa+NAM: 20%; Figura 8. A) con respecto a su grupo control de glucosa y fructosa; Figura 8. A). Paralelo a esto, ambos carbohidratos aumentaron las concentraciones de TBARS (~544%) comparado con el grupo control; en el caso de NAM (0.06 y 0.12%) decreció TBARS dependiendo de la dosis (Glucosa+NAM: 55 y 66%, respectivamente; Fructosa+NAM: 63%; Figura 8. B).

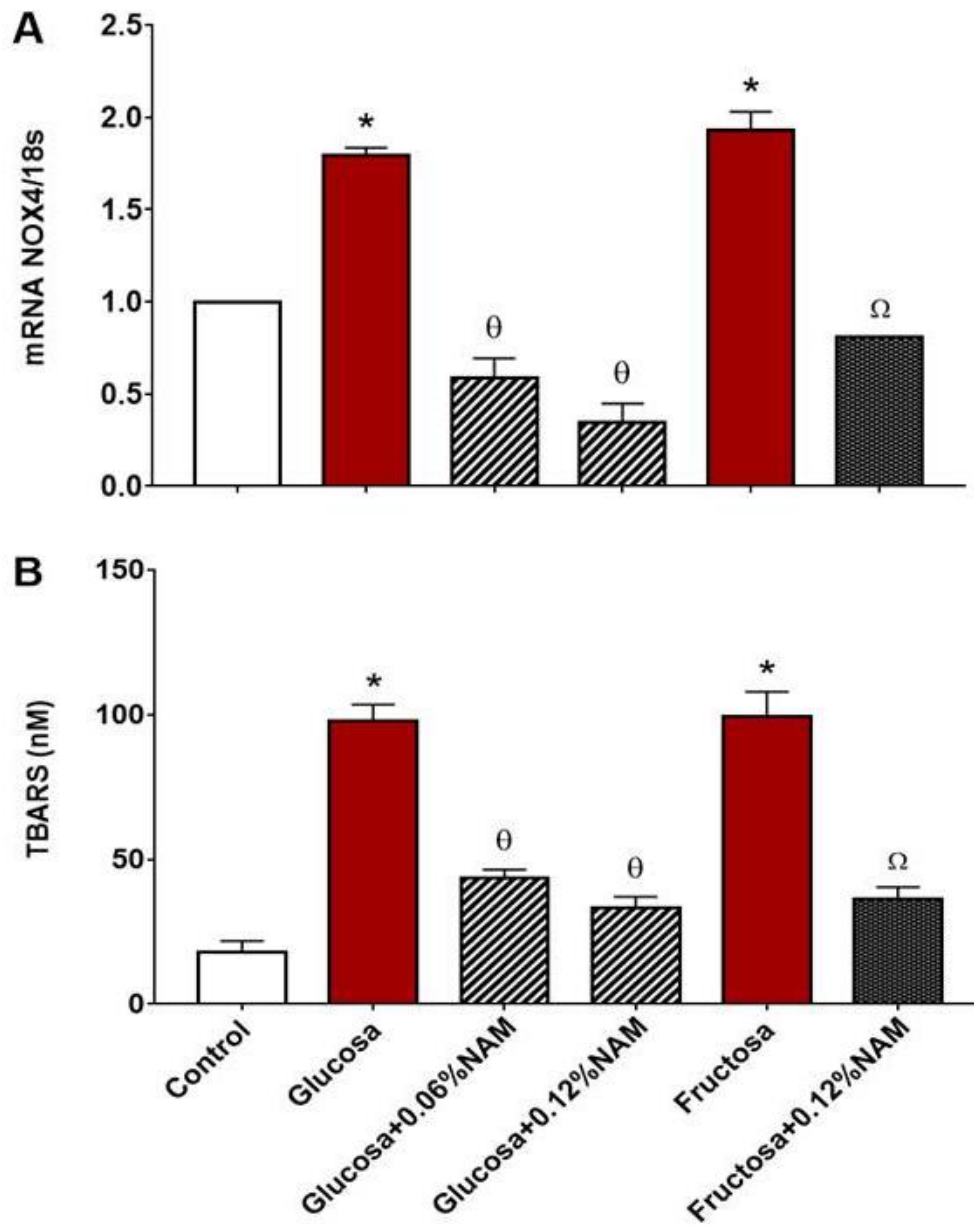


Figura 8. Efecto de NAM en A) NOX4 y B) TBARS. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. ^θ $P < 0.05$ comparado con glucosa. ^Ω $P < 0.05$ comparado con fructosa.

6.7. NAM decrece el aumento de nucleótidos de piridina inducidos por glucosa o fructosa

La relación NADH/NAD^+ incrementó en los grupos tratados con glucosa o fructosa al 30% (19.46 y 44.8 veces, respectivamente; Figura 9. A), que fue abatida por NAM 0.06 y 0.12% (Glucosa+NAM: 2.9 y 6 veces, respectivamente; Fructosa+ NAM: 2.33 veces; Figura 9. A).

Llamó la atención que la relación $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ incrementó (1.37 veces) exclusivamente en el grupo glucosa con respecto al control; este incremento fue disminuido con NAM 0.06 y 0.12% (-2.69 y 2.17 veces, respectivamente; Figura 9. B). Además, la relación disminuyó en el grupo con fructosa comparado con el control teniendo en este caso la fructosa el efecto contrario que el de la glucosa y el suplemento de NAM aumentó (1.39 veces) con respecto al grupo fructosa (Figura 9. B).

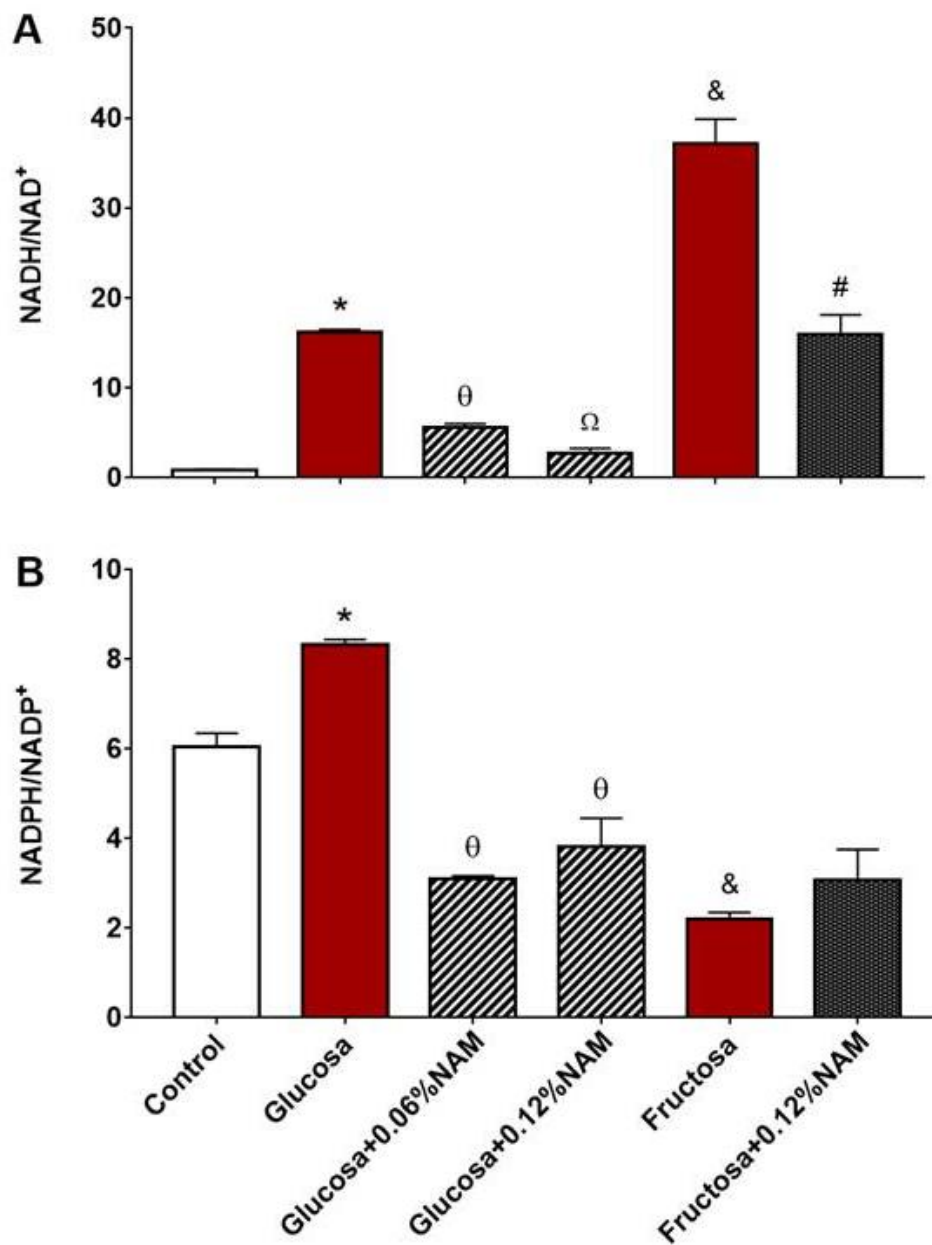


Figura 9. Efecto de NAM sobre los nucleótidos de piridina. Los valores son expresados con media \pm D.E. de 5 animales por grupo. * $P < 0.05$ comparado con el control. $\theta P < 0.05$ comparado con glucosa. $\Omega P < 0.05$ comparado con glucosa o glucosa + 0.06% NAM. # $P < 0.05$ comparado con fructosa. & $P < 0.05$ comparado con el control o glucosa.

7. DISCUSIÓN

NAM tiene propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias que indica su posible valor terapéutico en la esteatosis hepática. En este estudio en modelo experimental murino encontramos que la administración de NAM disminuye alteraciones hepáticas en G6PD y el estado redox, además atenuó el incremento en AGL séricos, inflamación, estrés oxidativo, esteatosis y daño hepático inducidos por el alto consumo de glucosa o fructosa,.

El consumo crónico y elevado de carbohidratos altera señales de saciedad, estimulando mayor ingesta calórica y ganancia de peso; justificando lo observado en los grupos glucosa o fructosa. Además, sobreactiva la lipogénesis *de novo* en el hígado y enterocitos del intestino, que junto con productos de la lipólisis del adipocito incrementaron AGL y TG circulantes. El aumento en los niveles de TG séricos y hepáticos fue mayor en el grupo fructosa comparados con el grupo control, sugiriendo que es debido a su rápida absorción en el lumen intestinal por GLUT5 específico para fructosa (Douard y Ferraris, 2008) lo que se ha asociado con un aumento en la lipogénesis y formación de quilomicrones en los enterocitos (Stenson et al., 2017), además gran parte de la fructosa se metaboliza en los hepatocitos, la fructosa en los hepatocitos y enterocitos es fosforilada en una reacción que escapa del control por el estado energético celular. Finalmente, en gran medida el de los carbonos de fructosa es la formación de TG sirviendo como intermediarios los ácidos grasos. Por ello, fructosa es considerada más lipogénica que glucosa. Colesterol no presentó cambios con ninguno de los tratamientos.

Los incrementos de AGL, TG (séricos y hepáticos) y la esteatosis hepática en ambos grupos se asociaron con hiperinsulinemia e hiperglucemia; indicativo de resistencia a la insulina. El ácido palmítico, primer producto de lipogénesis *de novo*, promueve resistencia a la insulina y muerte en la mayoría de las estirpes celulares (Wei y Pagliassotti, 2004). En hepatocitos cultivados con ácido palmítico se incrementa la fosforilación en serina del IRS-1 previniendo la señalización por insulina, y así evitando activación de PI3K/Akt. La fosforilación de serina es inducida por activación de JNK por TNF α y ERO o activación de PKC θ por diacilglicerol (Nakamura et al., 2009; Samuel y Shulman, 2012).

La acción del aumento de ERO en ambos grupos sobre el aumento intracelular de ácidos grasos genera 4-hidroxi-nonanal y MDA, más los cuerpos hialinos o de Mallory que

perturban el citoesqueleto del hepatocito modificando la permeabilidad de membrana, viabilidad celular, y salida de proteínas al medio extracelular; justificando los incrementos TBARS, ALT y AST.

A pesar que NAM disminuyó TG hepáticos, no disminuyó significativamente glucosa y TG séricos, sí previene total o parcialmente el incremento de AGL, transaminasas y TBARS séricos indicando que frena el daño hepático y que el grado de daño se presenta en relación directa con la concentración de AGL. El efecto citoprotector de NAM se atribuye a que previene el agotamiento de NAD^+ , en parte por inhibir enzimas que lo consumen como PARPs y SIRTs, aunque en algunos casos puede ser activador de SIRT. Durante la gluconeogénesis SIRT tiene una función relevante, porque la mayoría de enzimas hepáticas y algunos factores de transcripción que regulan gluconeogénesis son acetilados en respuesta a nutrientes. SIRT2 desacetila y estabiliza a PEPCK-C, PGC-1 α y FOXO1 incrementando la gluconeogénesis. En contraste, la depleción de SIRT1 hepática disminuye la gluconeogénesis en ratones obesos. En el modelo de diabetes inducida por dieta alta en grasa en ratas obesas, NAM aumentó la expresión de SIRT1 y nicotinamida fosforibosiltransferasa incrementando la síntesis de NAD^+ y NAD^+/NADH ; la disponibilidad de NAD^+ activa a SIRT1 mejorando la homeostasis de glucosa y la función mitocondrial (Yang et al., 2014).

Es posible que la dosis y el tiempo de NAM empleados en el presente estudio fueron insuficientes para controlar la glicemia. Sin embargo, el efecto central de NAM en el grupo glucosa fue disminuir el estado reductor dado por NADH/NAD^+ y $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. En el grupo fructosa NAM también disminuyó NADH/NAD^+ , sin afectar $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$. Por tanto, disminuir el estrés reductor indica menor producción de ácidos grasos, menor trabajo para la β oxidación y formación de NADH ; impidiendo sobre-flujo de electrones a la cadena respiratoria mitocondrial y menor formación de ERO.

Dentro de los cambios redox críticos inducidos por glucosa o fructosa estuvieron la disminución de GSH y GSH/GSSG ; en concordancia con lo que ocurre cuando la esteatosis hepática es inducida con dieta alta en grasa (El-Din et al., 2014; Ren et al., 2014; Lin et al., 2014; El-Lakkany et al., 2016) y en EHGNA (Liu et al., 2015). La actividad antioxidante del glutatión depende de su síntesis *de novo* y de su ciclo redox. El ciclo elimina

hidroperóxidos y productos finales de peroxidación de lípidos regenerando GSH; su eficiencia depende de NADPH y de la acción coordinada de GPx y GR. GPx reduce peróxidos a expensas de GSH formando GSSG, el cual es transformado a GSH por GR. La caída abrupta de GSH hepática puede reflejar aumento en la producción de oxidantes excediendo la capacidad de desintoxicación de GSH. Conjuntamente, fallas en la eficiencia de la vía redox para mantener GSH a falta de NADPH. El encuentro que NAM previno ligeramente la disminución de GSH y GSH/GSSG puede ser explicado por un daño en la vía de transulfuración, exportación del GSSG que puede mediar reacciones de oxidación y la conjugación del GSH con moléculas intracelulares para proteger de la oxidación.

Todas las NOX producen superóxido utilizando NADPH, de aquí el vínculo de G6PD con NOX. Consistente con esto, el mRNA de NOX4 incrementó en los grupos con ingesta alta de glucosa o fructosa. Pacientes con EHNA, roedores con dieta deficiente en colina o tratadas con fructosa al 10%, y cultivo primario de hepatocitos con ácido palmítico presentan incremento del mensajero de p22(phox) y p47(phox) de NOX (Bettaieb et al., 2015; Ganji et al., 2015; Abreu et al., 2014; Castro et al., 2014). En nuestro modelo el incremento de NOX4 por glucosa o fructosa fue simultáneo con aumentos de G6PD, NADPH y TBARS indicando una posible asociación entre NOX4 y la actividad de G6PD.

A pesar que el análisis histológico no mostró fibrosis, las concentraciones de TNF α incrementaron en ambos grupos. TNF α se asocia con inflamación, resistencia a la insulina y fibrosis hepática (Liu, 2014; Eslamparast et al., 2014). Los ácidos grasos y NOX elevan la producción de ERO dañando biomoléculas y activando al NF κ B, que promueve expresión de citocinas pro-inflamatorias incluyendo TNF α (Ji et al., 2011). Por otra parte, el decremento de GSH y baja actividad de enzimas antioxidantes (Choi et al., 2016; Koroğlu et al., 2016; Kobyljak et al., 2016; Yang et al., 2016) sensibilizan las células para que TNF α pueda iniciar apoptosis o necrosis. En sustento a lo mencionado, los resultados de E_{hc} del par GSH/GSSG indican que en ambos grupos pudo haber sido modificado el ambiente redox alterando la traducción de señales. Al parecer los cambios en GSH/NOX4/TNF α en ambos grupos dependen del desajuste dado por GSH/GSSG, NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺.

Llama la atención que ambos grupos presentaron un ambiente altamente reductor, dado por NADH/NAD⁺ siendo más marcado con fructosa (2.4 veces más) indicativo del aumento de NADH vía glicolítica, ciclo de Krebs y β oxidación; todas a expensas de NAD⁺ y activación de enzimas que consumen NAD⁺. Así mismo, existe posible desacoplamiento entre formación de NADH y su reoxidación y presencia de hipoxia (Lefere et al., 2016). Adicionalmente, NADPH/NADP⁺ contribuyó al estrés reductor incrementado con glucosa e inesperadamente, una caída de NADPH/NADP⁺ por fructosa, contrastada con el aumento de NADH/NAD⁺. A pesar de esto, las concentraciones de NADPH fueron altas (datos no mostrados) con respecto al control; lo cual dependió probablemente de síntesis y disponibilidad de NADP⁺ mediante la fosforilación de NAD(H) por NAD⁺ cinasa (Pollak et al., 2007). Con esta apreciación, el grupo fructosa mostró decremento de NAD⁺ (- 2 veces) aumentando NADP⁺ (1.6 veces) con respecto a glucosa (datos no mostrados). Esto debió reflejarse en aumento de NADPH/NADP⁺ aunque no ocurrió, posiblemente suceda a mayor gasto de NADPH durante la lipogenesis *de novo*, elongación de ácidos grasos, así como eventos que requieren NADPH (evidenciado por aumentos de TG y ERO). No obstante que se reconoce la función crítica de NAD(P)⁺ y su estado redox, falta entender su dinámica celular y su metabolismo en abundancia crónica de carbohidratos.

El incremento observado de NADPH/NADP⁺ en el grupo glucosa es consecuencia de la sobre-activación de G6PD. No obstante que no se observó aumento de NADPH/NADP⁺ con fructosa a pesar de que en este grupo la actividad de G6PD aumentó un 100% más que en el grupo de glucosa siendo evidente que la actividad, concentración y mensajero de G6PD fue mayor significativamente en éste grupo comparado con el control y glucosa; reforzando lo encontrado con la caída de NADPH/NADP⁺.

El efecto de carbohidratos sobre G6PD ha sido estudiado ampliamente utilizando diferentes modelos (Ragab et al., 2015; Takeuchi et al., 2014; Castro et al., 2014; Zheng et al., 2014) (Kumar y Bhandari, 2015; Wang et al., 2012). El mecanismo que media los incrementos de G6PD es a través de nutrientes y factores hormonales o locales que activan SREBP-1c, LXR y ChREBP, los que a su vez inducen la transcripción de genes lipogénicos y glucolíticos. El gen de G6PD tiene sitios de respuesta para hormonas, nutrientes, SREBP y ChREBP.

Fue evidente que en los grupos suplementados con NAM disminuyó la expresión, cantidad y actividad de G6PD junto con NOX4 y TNF α aumentando GSH; lo cual se reflejó en decremento de TBARS y AGL disminuyendo la esteatosis hepática.

Previamente demostramos en adipocitos 3T3-L1 que NAM regula a la actividad de G6PD mediante una inhibición no competitiva mixta (Torres et al., 2013). En éste trabajo, observamos nuevamente el efecto regulador de NAM sobre G6PD, aunque a nivel de transcripción. Considerando que NADPH/NADP⁺ es el principal regulador de G6PD, se esperaría que la actividad sea baja; sin embargo, esto no ocurre en los grupos glucosa o fructosa. Probablemente, G6PD se encuentre fosforilada por alguna cinasa tipo AMP cinasa, c-Src, mTOR, PI3K/Akt; ya que en estudios previos se demostró que la inhibición de las cinasas mejoran GPx y GR, restaurando las concentraciones de GSH; similar a nuestros resultados (Wagle et al., 1998; Gupte et al., 2009). Así, además de aumentar la poza de NAD⁺, NAM pudiera regular a G6PD de forma indirecta al impedir su fosforilación.

En fibrosis pulmonar, la forma ácida de NAM restaura el equilibrio redox celular, disminuyendo lipoperoxidación al incrementar la actividad de GPx (Arauz et al., 2015). Por otra parte, la administración de NAM en el ratón *GNMT-KO* previene el hígado graso y fibrosis, debido a que decrece SAME a través de inhibir una red de genes inducidos por Ras y JAK/STAT; permitiendo la síntesis de GHS (Varela et al., 2010). Src, Ras, JAK/STAT son activadas por ERO los cuales son producidos por NOX4.

Por tanto, NAM abate el desequilibrio metabólico y celular provocado por glucosa o fructosa, mediante la disminución del aumento de G6PD y NADPH/NADP⁺ mejorando GSH/GSSG y en consecuencia frenando la esteatosis hepática no alcohólica.

8. CONCLUSIÓN

- Con el consumo crónico y excesivo de glucosa y fructosa por 90 días indujo el aumento de peso corporal y sobreactivación de la lipogénesis *de novo*, justificados por incrementos en AGL y TG.

- Hay incrementos significativos de G6PD junto con NOX4 con ambos carbohidratos.
- Glucosa y fructosa provocan un ambiente reductor dado por NADH/NAD⁺ y NADPH/NADP⁺ que indica mayor producción de AG y ERO.
- NAM disminuyó TG, AGL, ALT, AST y TBARS, frenando el daño hepático.
- NAM disminuyó la cantidad, expresión y actividad de G6PD, así mismo NOX4 y TNF α , en contraste aumenta GSH, lo cual se refleja en disminución de AGL, disminuyendo la esteatosis hepática.
- NAM abatió el desequilibrio metabólico y celular provocado por glucosa y fructosa, mediante la disminución del aumento de G6PD y NADPH/NADP⁺ mejorando GSH/GSSG y en consecuencia frenando la esteatosis hepática mejorando la arquitectura tisular.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar cambios post-traduccionales de la G6PD, como glicosilación, acetilación y fosforilación.
- Evaluar la síntesis *de novo* de GSH.
- Medir la enzima para la síntesis de NAD⁺ (nicotinamida fosforibosiltransferasa) y NADP⁺ (NAD cinasa).

10. REFERENCIAS

Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, Diehl AM. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Increased fructose consumption is

associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010. 51(6):1961-1971. doi: 10.1002/hep.23535.

Abid A, Taha O, Nseir W, Farah R, Grosovski M, Assy N. Soft drink consumption is associated with fatty liver disease independent of metabolic syndrome. *J Hepatol*. 2009. 51(5):918-924. doi: 10.1016/j.jhep.2009.05.033.

Abreu IC, Guerra JF, Pereira RR, Silva M, Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML. Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014. 58, 251-259.

Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M, Rosenthal T, Pappo O, Link G, Sela BA. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*. 2005. 45(5):1012-1018.

Adams L, Angulo P, Lindor K. Nonalcoholic fatty liver disease. *CMAJ*. 2005. 172:899-905.

Agius L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *Biochem J*. 2008. 414(1):1-18. doi: 10.1042/BJ20080595.

Ahima RS, Osei SY. Adipokines in obesity. *Front Horm Res*. 2008. 36:182-197. doi: 10.1159/0000115365.

Anonymous. Niacinamide. En: Budavari S (Ed.). *The Merck Index*. 11 th Edn. Merck and Co, Rahway. 1989. pp 1025-1026.

Arauz J, Rivera-Espinoza Y, Shibayama M, Favari L, Flores-Beltrán RE, Muriel P. Nicotinic acid prevents experimental liver fibrosis by attenuating the prooxidant process. *Int Immunopharmacol*. 2015. 28 (1): 244-251.

Arden C, Tudhope SJ, Petrie JL, AlOanzi ZH, Cullen KS, Lange AJ, Towle HC, Agius L. Fructose 2,6-bisphosphate is essential for glucose-regulated gene transcription of glucose-6-phosphatase and other ChREBP target genes in hepatocytes. *Biochem J*. 2012. 443, 111–123.

Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Kanter M, Can M, Ucar F, Unalacak M. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem*. 2005. 38(6):540-547.

Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W, Beniashvili Z, Djibre A, Grosovski M. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol*. 2008. 22(10):811-816.

Ayoub IA and Maynard KI. Therapeutic window for nicotinamide following transient focal cerebral ischemia. *Neuroreport*. 2002. 13, 213-216.

Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS. Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem*. 2008, 307(1-2):129-140. PubMed PMID: 17851734.

Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer*. 2008. 122:2699– 2706.

Bayrakdar ET, Armagan G, Uyanikgil Y, Kanit L, Koylu E and Yalcin A. Ex vivo protective effects of nicotinamide and 3 aminobenzamide on rat synaptosomes treated with Abeta(1-42). *Cell Biochem*. 2014. *Funct*. 32 , 557-564.

Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014. 7: 221-239 [DOI: 10.2147/ CEG.S62831]

Bettaieb A, Jiang JX, Sasaki Y, Chao TI, Kiss Z, Chen X, Tian J, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C, Xi Y, Szyndralewicz C, Schröder K, Shah A, Brandes RP, Haj FG, Török NJ. Hepatocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 4 regulates stress signaling, fibrosis, and insulin sensitivity during development of steatohepatitis in mice. *Gastroenterology*. 2015. 149, 468-480.

Beutler, E. The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects. *Annu Rev Med*.1992. 43, 47-59.

Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*. 1990. 265, 1502–1509.

Blaak EE. Metabolic fluxes in skeletal muscle in relation to obesity and insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005. 19(3):391-403.

Brown NF, Weis BC, Husti JE, Foster DW, McGarry JD. Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase I isoform switching in the developing rat heart. *J Biol Chem*. 1995. 270(15):8952-7.

Browning, JD. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*. 2004. 40, 1387–1395.

Bulcão C, Ferreira SR, Giuffrida FM, Ribeiro-Filho FF. The new adipose tissue and adipocytokines. *Curr Diabetes Rev*. 2006. 2(1):19-28.

Castro MC, Francini F, Gagliardino JJ, Massa ML. Lipoic acid prevents fructose-induced changes in liver carbohydrate metabolism: role of oxidative stress. *Biochim Biophys. Acta* 2014. 1840, 1145–1151.

Cha SH, Wolfgang M, Tokutake Y, Chohnan S, Lane MD. Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl-CoA and food intake. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105: 16871–16875.

Charlton M, Sreekumar R, Rasmussen D, Lindor K, Nair KS. Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2002. 35(4):898-904.

Chitturi S, Farrell GC. Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Semin Liver Dis*. 2001. 21(1):27-41.

Choi HJ, Jang SY, Hwang ES. High-dose nicotinamide suppresses ROS generation and augments population expansion during CD8(+) T cell activation. *Mol Cells* 38, (2015). 918-924.

Choi RY, Ham JR, Lee MK. Esculetin prevents non-alcoholic fatty liver in diabetic mice fed high-fat diet. *Chem Biol Interact*. 2016. 260,13-21.

Chong ZZ, Lin SH and Maiese K. Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J. Vasc. Res*. 2002. 39 , 131–147.

Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 2011. 332: 1519-1523 [DOI: 10.1126/science.1204265].

Contos MJ, Sanyal AJ. The clinicopathologic spectrum and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Adv Anat Pathol*. 2002. 9(1):37-51.

Corbett JA, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, McDaniel ML. Interleukin 1 beta induces the formation of nitric oxide by beta-cells purified from rodent islets of Langerhans. Evidence for the beta-cell as a source and site of action of nitric oxide. *J Clin Invest* 1992. 90(6):2384-2392.

Costa Rosa LF, Curi R, Murphy C, Newsholme P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O₂ metabolism. Evidence for cyclic AMP-dependent protein kinase mediated inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase and activation of NADP⁺-dependent malic enzyme. *Biochem J*. 1995. 310(Pt 2):709–714.

Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998. 114(4):842-5.

Denechaud PD, Dentin R, Girard J, Postic C. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008. 582(1):68-73.

Dentin R, Benhamed F, Pegorier JP, Foufelle F, Viollet B, Vaulont S, Girard J, Postic C. Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *J Clin Invest*. 2005.115, 2843–2854.

Douard V, Ferraris RP. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008. 295, 227-237.

Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010. 39:171–183.

El-Din SH, Sabra AN, Hammam OA, Ebeid FA, El-Lakkany NM. Pharmacological and antioxidant actions of garlic and or onion in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *J Egypt Soc Parasitol*. 2014. 44, 295-308.

El-Lakkany NM, Seif El-Din SH, Sabra AA, Hammam OA, Ebeid FA. Co-administration of metformin and N-acetylcysteine with dietary control improves the biochemical and histological manifestations in rats with non-alcoholic fatty liver. *Res Pharm Sci*. 2016. 11, 374-382.

Eslamparast T, Poustchi H, Zamani F, Sharafkhah M, Malekzadeh R, Hekmatdoost A. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am J Clin Nutr*. 2014. 99, 535-542.

Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Ricart W. to: T. Skoog et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) polymorphisms -857C/A and -863C/A are associated with TNF-alpha secretion from human adipose tissue. *Diabetologia* 44: 654-655. *Diabetologia*. 2002. 45(1):149-150. PubMed PMID: 11845240.

Fong DG, Nehra V, Lindor KD, Buchman AL. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology*. 2000. 32(1):3-10.

Fukuda H, Katsurada A and Iritani N. Nutritional and hormonal regulation of mRNA levels of lipogenic enzymes in primary cultures of rat hepatocytes. *J Biochem*. 1992. 111, 25-30.

Fumagalli R. Pharmacokinetics of nicotinic acid and some of its derivatives. En: Gey KF, Carlson LA (Eds.) Metabolic effects of nicotinic acid and its derivatives. Hans Huber Publishers, Bern. 1971. 33-50.

Ganji SH, Kashyap ML, Kamanna VS. Niacin inhibits fat accumulation, oxidative stress, and inflammatory cytokine IL-8 in cultured hepatocytes: Impact on non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism*. 2015. 64, 982-990.

Gillmor HA, Bolton CH, Hopton M et al. Measurement of nicotinamide and N-methyl-2-pyridone-5-carboxamide in plasma by high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 1999. 13: 360-362.

Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am J Clin Nutr*. 2008. Jan;87(1):217S-222S. Review. PubMed PMID: 18175761.

Gluecksohn-Waelsch S, Greengard P, Quinn GP, Teicher LS. Genetic variations of an oxidase in mammals. *J Biol Chem*. 1996. 242: 1271-1273.

Greenberg JT, Monach P, Chou JH, Josephy PD and Demple B. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. 87, 6181-6185.

Greenfield JR, Campbell LV. Insulin resistance and obesity. *Clin Dermatol*. 2004. 22(4):289-295.

Gupte RS, Floyd BC, Kozicky M, George S, Ungvari ZI, Neito V, Wolin MS, Gupte SA. Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates Superoxide in type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. *Free Radic Biol Med*. 2009. 47, 219-228.

Guzik TJ, Griendling KK. NADPH oxidases: molecular understanding finally reaching the clinical level? *Antioxid Redox Signal*. 2009.11:2365–2370.

HaasJT, MiaoJ, ChandaD, WangY, ZhaoE, HaasME, HirscheyM, VaitheesvaranB, FareseRV, Jr, Kurland IJ, et al. Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metab*. 2012. 15, 873–884.

Handler P. The effect of excessive nicotinamide feeding on rabbits and guinea-pigs. *J Biol Chem* 1944. 154: 203-206.

Haque M, Sanyal AJ. The metabolic abnormalities associated with non-alcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002. 16(5):709-731. Harrison SA, Kadakia S,

Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *Am J Gastroenterol*. 2002. 97(11):2714-24.

Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev*. 2005.63: 133-157.

Heller B, Wang ZQ, Wagner EF, Radons J, Burkle J, Fehsel K, et al. Inactivation of the poly (ADP- ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J Biol Chem*. 1995. 270(19):11176-1180.

Hoffer A. Biochemistry of nicotinic acid and nicotinamida. *Psychosomatics*. 1967. 8: 95-100.

Hu Z, Cha SH, Chohnan S, Lane MD. Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. 100: 12624–12629.

Iritani N. Nutritional and hormonal regulation of lipogenic enzyme gene expression in rat liver. *Eur J Biochem*. 1992. 205, 433-442.

Iyanagi T. Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol*. 2007. 260:35–112.

Jain M, Brenner DA, Cui L, Lim CC, Wang B, Pimentel DR, Koh S, Sawyer DB, Leopold JA, Handy DE, Loscalzo J, Apstein CS, Liao R. Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates cytosolic redox status and contractile phenotype in adult cardiomyocytes. *Circ Res*. 2003. 93(2):e9-16.

James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet*. 1999. 353(9165):1634-1636.

Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007. 293(1):G1-4.

Ji F, Li Z, Deng H. Antiviral treatment for HCV-related cirrhosis: is the effort worth it ?. *J Gastrointest Liver Dis*. 2011. 20, 445-446.

Jiang P, Du W, Wang X, Mancuso A, Gao X, Wu M, Yang X. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol*. 2011. 13:310–316.

Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferré P, Fougère F. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2009. 119(5):1201-1215. doi: 10.1172/JCI37007.

Kaneko S, Wang J, Kaneko M, Yiu G, Hurrell JM, Chitnis T, Khoury SJ and He Z. Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models. *J. Neurosci* 2006. 26, 9794-9804.

Kang HT and Hwang ES. Nicotinamide enhances mitochondria quality through autophagy activation in human cells. *Aging Cell* 2009. 8, 426-438.

Kang HT, Lee HI and Hwang ES. Nicotinamide extends replicative lifespan of human cells. *Aging Cell* 2006. 5, 423-436.

Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Matsumura Y, Noguchi T and Tanaka T. Effects of nutrients and insulin on transcriptional and post-transcriptional regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1989. 1006, 104-110.

Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T, Yamanouchi T. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *J Nutr*. 2009. 139(11):2067-2071.

Kawasaki T, Kashiwabara A, Sakai T, Igarashi K, Ogata N, Watanabe H, Ichiyanagi K, Yamanouchi T. Long-term sucrose-drinking causes increased body weight and glucose intolerance in normal male rats. *Br J Nutr*. 2005. 93(5):613-618.

Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Matsumura M, Tsubura A. Nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats and C57BL mice. *Exp Eye Res*. 2002. 74, 383-392.

Klaidman LK, Mukherjee SK, Adams JD Jr. Oxidative changes in brain pyridine nucleotides and neuroprotection using nicotinamide. *Biochim Biophys Acta*. 2001. 1525(1-2):136-148.

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J*. 1994. 8(2):174-181.

Kletzien R F and Berdanier CD. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: diet and hormonal influences on de novo enzyme synthesis. En: *Nutrition and Gene Expression* (Berdanier, C. D., Hargrove, J. L., Eds) 1993. pp. 187-206, CRC Press, Boca Raton.

Kobyliak N, Abenavoli L, Falalyeyeva T, Virchenko O, Natalia B, Beregova T, Bodnar P, Spivak M. Prevention of NAFLD development in rats with obesity via the improvement of pro/antioxidant state by cerium dioxide nanoparticles. *Clujul Med.* 2016. 89, 229-235.

Kolb H, Burkart V. Nicotinamide in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 1999. 22: B16-B20.

Koo HY, Miyashita M, Cho BH, Nakamura MT. Replacing dietary glucose with fructose increases ChREBP activity and SREBP-1 protein in rat liver nucleus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009. Dec 11;390(2):285-289. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.109.

Koo SH. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol.* 2013. 19: 210-215 [DOI: 10.3350/cmh.2013.19.3.210].

Köroğlu E, Canbakan B, Atay K, Hatemi İ, Tuncer M, Dobrucalı A, Sonsuz A, Gültepe I, Şentürk H. Role of oxidative stress and insulin resistance in disease severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Turk J Gastroenterol.* 2016. 27, 361-366.

Kretowski A, Szelachowska M, Gorska M, Zendzian- Piotrowska M, Wysocka-Solowie B, Kinalska I. Orally given nicotinamide inhibits the decreasing of glutathione content in the pancreas of streptozotocin diabetic rats *Horm Metab Res* 1996. 28(1):35-36.

Kumar P, Bhandari. Fenugreek Seed Extract Prevents Fat Deposition in monosodium glutamate (MSG)-obese rats. *Drug Res (Stuttg).* 2015. 66, 174-180.

[Lê](#) KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, Boesch C, Ravussin E, Tappy L. A. 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 2006. 84: 1374–1379.

Lee EJ, Wu TS, Chang GL, Li CY, Chen TY, Lee MY, Chen HY and Maynard KI. Delayed treatment with nicotinamide inhibits brain energy depletion, improves cerebral microperfusion, reduces brain infarct volume, but does not alter neurobehavioral outcome following permanent focal cerebral ischemia in Sprague Dawley rats. *Curr Neurovasc Res.* 2006. 3, 203-213.

Lefere S, Van Steenkiste C, Verhelst X, Van Vlierberghe H, Devisscher L, Geerts A. Hypoxia-regulated mechanisms in the pathogenesis of obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol Life Sci.* 2016. 73, 3419-3431.

Leopold JA, Walker J, Scribner AW, Voetsch B, Zhang YY, Loscalzo AJ, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *JBiol Chem.* 2003. 278:32100–32106.

Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010. 7(5):251-264. doi: 10.1038/nrgastro.2010.41.

Lin Z, Cai F, Lin N, Ye J, Zheng Q, Ding G.. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor- κ B expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Exp Ther Med*. 2014. 7, 365-370.

Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept*. 2008. 150(1-3):26-32. doi: 10.1016/j.regpep.2008.06.008.

Liu J, Zhou G, Lu W. Plasma interleukin 17 in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 39 cases. *J Cancer Res Ther*. 2014. 10, 304-306.

Liu W, Baker SS, Baker RD, Zhu L1. Antioxidant mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Drug Targets*. 2015. 6(12), 1301-1314.

Maiese K, Chong ZZ, Hou J, Shang YC. The vitamin nicotinamide: translating nutrition into clinical care. *Molecules*. 2009. 14, 3446-3485.

Marcus R, Coulston AM. Water-soluble vitamins. The vitamin B complex and ascorbic acid. En: Goodman-Gilman A (Ed). *The pharmacological basis of therapeutiics*. 9th end. Mc Gram-Hill, New York, 1996. pp 1555-1571.

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Ohashi K, Tomita S, Sekiya M, Hasty A, Nakagawa Y, Sone H, Toyoshima H, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. Insulin-independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*. 2004. 53(3):560-9.

McCreanor GM, Bender DA. The metabolism of high intakes of tryptophan, nicotinamide and nicotinic acid in the rat. *Br J Nutr* 1986. 56: 577-586.

McGarry JD. Malonyl-CoA and carnitine palmitoyltransferase I: an expanding partnership. *Biochem Soc Trans*. 1995. 23(3):481-485.

Murray MF. Nicotinamide: an oral antimicrobial agent with activity against both *Mycobacterium tuberculosis* and human immunodeficiency virus. *Clin. Infect Dis*. 2003. 36, 453-460.

Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002. 282(5):E1180-1190.

Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem.* 2009. 284, 14809-14818.

Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2003. 37(5):1202-1219. Erratum en: *Hepatology.* 38(2):536.

Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology.* 2010. 52: 774-788

Noto A, Zahradka P, Yurkova N, Xie X, Nitschmann E, Ogborn M, Taylor CG. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis, improves liver function, and favorably modifies lipid metabolism in obese insulin-resistant rats. *Lipids.* 2006. 41(2):179-188.

Oblong JE. The evolving role of the NAD⁺/nicotinamide metabolome in skin homeostasis, cellular bioenergetics, and aging. *DNA Repair (Amst).* 2014. 23, 59-63.

O'Brien BA, Harmon BV, Cameron DP, Allan DJ. Beta cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol.* 1996. 178(2):176-181.

Oneta CM, Dufour JF. Non-alcoholic fatty liver disease: treatment options based on pathogenic considerations. *Swiss Med Wkly.* 2002. 132(35-36):493-505.

Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, Johnson RJ, Abdelmalek MF. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2008. 48(6):993-999. doi: 10.1016/j.jhep.2008.02.011.

Pagano G, Degan P, d'Ischia M, Kelly FJ, Nobili B, Pallardó FV, Youssoufian H, Zatterale A. Oxidative stress as a multiple effector in Fanconi anaemia clinical phenotype. *Eur J Haematol.* 2005. 75(2):93-100.

Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N, Cassader M, David E, Cavallo-Perin P, Rizzetto M. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology.* 2002. 35(2):367-372.

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*. 1992. 282 (Pt 3):753-757.

Petley A, Macklin B, Renwick AG, Wilkin TJ. The Pharmacokinetics of nicotinamide in humans and rodents. *Diabetes*. (1995). 44: 152-155.

Pollak KI, Oncken CA, Lipkus IM, Lyna P, Swamy GK, Pletsch PK, Peterson BL, Heine RP, Brouwer RJ, Fish L, Myers ER. Nicotine replacement and behavioral therapy for smoking cessation in pregnancy. *Am J Prev Med*. 2007. 33, 297-305.

Ragab SM, Abd-Elghaffar SK, El-Metwally TH, Badr G, Mahmoud MH, Omar HM. Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids Health Dis*. 2015. 14-83.

Ramadori P, Kroy D, Streetz KL. Immunoregulation by lipids during the development of non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015. 4: 11-23.

Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH, Giral P, Grimaldi A, Opolon P, Poynard T. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma in obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*. 2002. 35(6):1485-1493.

Ren T, Huang C, Cheng M. Dietary blueberry and bifidobacteria attenuate nonalcoholic fatty liver disease in rats by affecting SIRT1-mediated signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2014. 2014-469059.

Rodin J. Comparative effects of fructose, aspartame, glucose, and water preloads on calorie and macronutrient intake. *Am J Clin Nutr*. 1990. 51: 428-435.

Rodin J. Effects of pure sugar vs. mixed starch fructose loads on food intake. *Appetite*. 1991. 17: 213-219,

Roglans N, Sanguino E, Peris C, Alegret M, Vázquez M, Adzet T, Díaz C, Hernández G, Laguna JC, Sánchez RM. Atorvastatin treatment induced peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression and decreased plasma nonesterified fatty acids and liver triglyceride in fructose-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002. 302(1):232-239.

Roglans N, Vilà L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology*. 2007. 45(3):778-788.

Roldan-Valadez E, Favila R, Martínez-López M, Uribe M, Méndez-Sánchez N. Imaging techniques for assessing hepatic fat content in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2008. 7: 204-212.

Sakakibara Y, Mitha AP, Ogilvy CS, Maynard KI. Posttreatment with nicotinamide (vitamin B(3)) reduces the infarct volume following permanent focal cerebral ischemia in female Sprague-Dawley and wistar rats. *Neurosci Lett.* (2000). 281 ,111-114.

Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell.* 2012. 148, 852-871.

Sánchez-Lozada LG, Mu W, Roncal C, Sautin YY, Abdelmalek M, Reungjui S, Le M, Nakagawa T, Lan HY, Yu X, Johnson RJ. Comparison of free fructose and glucose to sucrose in the ability to cause fatty liver. *Eur J Nutr.* 2010. 49(1):1-9. doi:10.1007/s00394-009-0042-x.

Santidrian AF, LeBoeuf SE, Wold ED, Ritland M, Forsyth JS, Felding BH. Nicotinamide phosphoribosyltransferase can affect metastatic activity and cell adhesive functions by regulating integrins in breast cancer. *DNA Repair (Amst).* 2014. 23 79-87.

Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease in the Indian subcontinent: a medical consequence of globalization? *Indian J Gastroenterol.* 2001.20(6):215-216.

Song SB, Jang SY, Kang HT, Wei B, Jeoun UW, Yoon GS, Hwang ES. Modulation of mitochondrial membrane potential and ROS generation by nicotinamide in a manner independent of SIRT1 and mitophagy. *Mol Cells.* 2017. 40(7): 503-514.

Sirek AS, Liu L, Naples M, Adeli K, Ng DS, Jin T. Insulin stimulates the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by attenuating the repressive effect of Pit-1, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 homeodomain protein octamer transcription factor-1. *Endocrinology.* 2009. 150, 3483–3492.

Skoog T, Eriksson P, Hoffstedt J, Rydén M, Hamsten A, Arner P. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) polymorphisms-857C/A and -863C/A are associated with TNF-alpha secretion from human adipose tissue. *Diabetologia.* 2001.44(5):654-655.

Soodini GR. Adiponectin and leptin in relation to insulin sensitivity. *Metab Syndr Relat Disord.* 2004. 2(2):114-123. doi: 10.1089/met.2004.2.114.

Stanton RC, Seifter JL, Boxer DC, Zimmerman E Cantley LC. Rapid release of bound glucose-6-phosphate dehydrogenase by growth factors.]. *Biol. J* 1991. 266, 12442-12448.

Stenson S, Umpleby AM, Lovegrove JA, Jackson KG Fielding BA. Role of the enterocyte in fructose-induced hypertriglyceridaemia. *Nutrients*. 2017. 9(349) doi:10.3390/nu9040349.

Stevens MJ, Li F, Drel VR, Abatan OI, Kim H, Burnett D, Larkin D and Obrosova IG. Nicotinamide reverses neurological and neurovascular deficits in streptozotocin diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. 320, 458-464.

Stumpo DJ and Kletzien RF. The effect of ethanol, alone and in combination with the glucocorticoids and insulin, on glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis and mRNA in primary cultures of hepatocytes. *Biochem.* 1985. 226, 123-130.

Takeuchi H, Morita R, Shirai Y, Nakagawa Y, Terashima T, Ushikubo S, Matsuo T. Lowering effect of firefly squid powder on triacylglycerol content and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat liver. *J Oleo Sci*. 2014. 63, 1293-1301.

Tappy L. Q&A: 'toxic' effects of sugar: should we be afraid of fructose? *BMC Biol*. 2012. 10:42. doi: 10.1186/1741-7007-10-42.

Teff KL, Elliott SS, Tschoöp M, Kieffer TJ, Rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio DA, Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004. 89: 2963–2972.

Tomlinson JE, Nakayama R and Holten D. Repression of pentose phosphate pathway dehydrogenase synthesis and mRNA by dietary fat in rats. *J.Nutr*. 1988. 118, 408-415.

Tordoff MG, Friedman MI. Hepatic control of feeding: effect of glucose, fructose, and mannitol infusion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1988. 254: R969–R976.

Torres-Ramírez N, Baiza-Gutman LA, García-Macedo R, Ortega-Camarillo C, Contreras-Ramos A, Medina-Navarro R, Cruz M, Ibáñez-Hernández MÁ, DíazFlores M. Nicotinamide, a glucose-6-phosphate dehydrogenase non-competitive mixed inhibitor, modifies redox balance and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Life Sci*. 2013. 18, 975–985.

Tsai J, Zhang R, Qiu W, Su Q, Naples M, Adeli K. Inflammatory NF-kappaB activation promotes hepatic apolipoprotein B100 secretion: evidence for a link between hepatic inflammation and lipoprotein production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009. 296(6):G1287-1298. doi: 10.1152/ajpgi.90540.2008.

Uyeda K, Repa JJ. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metab*. 2006. 4(2):107-110.

Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Santorelli G, Branchi A, Taioli E, Fiorelli G, Fargion S. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms and insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002. 122(2):274-280.

Valverde AM, Benito M and Lorenzo M. Hormonal regulation of malic enzyme and G6PDH expression in fetal brown-adipocyte primary cultures under non-proliferative conditions. *Eur. J. Biochem*. 1992.203, 313-319.

Varela-Rey M, Martínez-López N, Fernández-Ramos D, Embade N, Calvisi DF, Woodhoo A, Rodríguez J, Fraga MF, Julve J, Rodríguez-Millán E, Frades I, Torres L, Luka Z, Wagner C, Esteller M, Lu SC, Martínez-Chantar ML, Mato JM. Fatty liver and fibrosis in glycine N-methyltransferase knockout mice is prevented by nicotinamide. *Hepatology*. 2010. 52,105-114.

Vilà L, Roglans N, Alegret M, Sánchez RM, Vázquez-Carrera M, Laguna JC. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) and a deficit of serine/threonine (Ser/Thr) phosphoproteins involved in leptin transduction mediate the effect of fructose on rat liver lipid metabolism. *Hepatology*. 2008. 48(5):1506-1516. doi: 10.1002/hep.22523.

Vulliamy T, Mason P and Luzzatto L. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Curr Trends Genet*. 1992. 8, 138-143.

Wagle A, Jivraj S, Garlock GL, Stapleton SR. Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1998. 273:14968–14974. .

Wang F, Zhao Y, Niu Y, Wang C, Wang M, Li Y, Sun C. Activated glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with insulin resistance by upregulating pentose and pentosidine in diet-induced obesity of rats. *Horm Metab Res*. 2012. 44, 938-942.

Wei Y, Pagliassotti M. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004. 287, 926-933.

Weiss R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? *Eur J Endocrinol*. 2007. Aug;157 Suppl 1:S39-45.

Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2008. 103(6):1372-1379. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01774.x.

Xu Y, Osborne BW, Stanton RC. Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005. 289:F1040–1047.

Yang SJ, Park NY, Lim Y. Anti-adipogenic effect of mulberry leaf ethanol extract in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Res Pract*. 2014. 8, 613-617.

Yang ZR, Wang HF, Zuo TC, Guan LL, Dai N. Salidroside alleviates oxidative stress in the liver with non-alcoholic steatohepatitis in rats. *BMC PharmacolToxicol*. 2016. 14, 17-16.

Yao Y, Yang Y and Zhu WG. Sirtuins: nodes connecting aging, metabolism and tumorigenesis. *Curr. Pharm. Des*. 2014. 20, 16141624.

Yoshimoto K, Nakamura T and Ichihara A. Reciprocal effects of epidermal growth factor on key lipogenic enzymes in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J. Biol Chem*. 1983. 258, 12355-12361.

Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai S. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁽⁺⁾ intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab*. 2011. 14(4):528-536. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.014.

Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018. 15(1):11-20. doi: 10.1038/nrgastro.2017.109.

Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016. 64(1):73-84. doi: 10.1002/hep.28431.

Youssef WI, McCullough AJ. Steatohepatitis in obese individuals. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2002. 16(5):733-747.

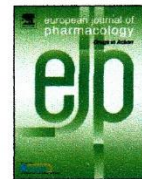
Zelber-Sagi S, Nitzan-Kaluski D, Goldsmith R, Webb M, Blendis L, Halpern Z, Oren R. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol*. 2007. 47(5):711-717.

Zhang HS, Wang SQ. Nrf2 is involved in the effect of tanshinone IIA on intracellular redox status in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 2007. 73:1358-1366.

Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J Biol Chem*. 2000. 275:40042-40047.

Zhang Z, Liew CW, Handy DE, Zhang Y, Leopold JA, Hu J, Guo L, Kulkarni RN, Loscalzo J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and beta-cell apoptosis. *FASEB J*. 2010. 24:1497-1505.

Zheng JL, Luo Z, Zhuo MQ, Pan YX, Song YF, Hu W, Chen QL. 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.* 2014. 112, 698-708.



Full length article

Nicotinamide prevents sweet beverage-induced hepatic steatosis in rats by regulating the G6PD, NADPH/NADP⁺ and GSH/GSSG ratios and reducing oxidative and inflammatory stress



Selene Ángeles Mejía^{a,b,c}, Luis Arturo Baiza Gutman^d, Clara Ortega Camarillo^b, Rafael Medina Navarro^e, Martha Catalina Sánchez Becerra^b, Leticia Damasio Santana^f, Miguel Cruz^b, Elizabeth Hernández Pérez^c, Margarita Díaz Flores^{b,*}

^a División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Ciudad de México, México

^b Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

^c Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud, Ciudad de México, México

^d Laboratorio en Biología del Desarrollo, Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México

^e Departamento de Metabolismo Experimental, Centro para la Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI-IMSS), Michoacán, México

^f Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Nicotinamide (PubChem CID: 936)

NADPH (PubChem CID: 52945042)

NADP⁺ (PubChem CID: 2724369)

NAD⁺ (PubChem CID: 5893)

NADH (PubChem CID: 2724710)

Glucose 6-phosphate (PubChem CID: 5958)

Glutathione (PubChem CID: 124886)

Glutathione disulfide (PubChem CID: 65359)

MDA (PubChem CID: 98528)

Keywords:

G6PD

NADPH/NADP⁺

GSH/GSSG

Nicotinamide

Nonalcoholic fatty liver

ABSTRACT

The disruption of redox state homeostasis, the overexpression of lipogenic transcription factors and enzymes, and the increase in lipogenic precursors induced by sweetened beverages are determinants of the development of nonalcoholic fatty liver disease.

This study evaluated the action of nicotinamide (NAM) on the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and redox, oxidative, and inflammatory states in a model of nonalcoholic hepatic steatosis induced by high and chronic consumption of carbohydrates. Male rats were provided drinking water with 30% glucose or fructose ad libitum for 12 weeks. Additionally, 30 days after the beginning of carbohydrate administration, some rats were simultaneously provided water with 0.06% or 0.12% NAM for 5 h daily over the next 8 weeks. Biochemical profiles and expression levels of G6PD, tumor necrosis factor α (TNF α), and NADPH oxidase 4 (NOX4) were evaluated together with glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) and reduced nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)/nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) [NAD(P)H/NAD(P)] ratios and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The results showed that hepatic steatosis induced by the chronic consumption of glucose or fructose was associated with body weight gain and increased levels of serum glucose, insulin, triacylglycerols, free fatty acids, transaminases, and TBARS. In the liver, the expression and activity of G6PD increased along with the GSSG, TBARS, and TG concentrations. These alterations were reduced by NAM treatment through the attenuation of increases in G6PD expression and activity and in the NADPH/NADP⁺ ratio, thereby slowing liver steatosis. NAM prevents redox, oxidative, and inflammatory alterations induced by high carbohydrate consumption.

1. Introduction

A chronic increase in the availability of carbohydrates and fats in the diet disturbs metabolically sensitive tissues, increasing the production of free fatty acids (FFA) and the accumulation of lipids (steatosis). Lipid overload and its effects on hepatocytes result from

fluctuations in the following relationships: reduced nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)/oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) (NADH/NAD⁺ and NADPH/NADP⁺) and glutathione/glutathione disulfide (GSH/GSSG) (Koek et al., 2011; Rolo et al., 2012). NADPH/NADP⁺ indicates the availability of reducing equivalents for *de novo* lipogenesis and the production of reactive

* Correspondence to: Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, Hospital de Especialidades (1er. Piso), “Bernardo Sepúlveda” Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, C.P. 06725, Ciudad de México, México.

E-mail address: mardiaz2001@yahoo.com (M.D. Flores).

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.048>

Received 16 May 2017; Received in revised form 19 October 2017; Accepted 20 October 2017

Available online 22 October 2017

0014-2999/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

oxygen species (ROS); excess ROS can induce the nonalcoholic steatohepatitis (NASH) associated with obesity.

NADPH is critical for antioxidant systems and reductive biosynthesis and is required by enzymes involved in the pathologies of metabolic disorders that generate ROS (Gómez-Sánchez et al., 2008; Legeza et al., 2013). In addition, NADPH is essential during *de novo* lipogenesis and cholesterol synthesis. The main source of NADPH is glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD, EC1.1.1.49).

G6PD limits the pentose phosphate pathway that generates NADPH and pentose phosphate. Overexpression of G6PD is associated with insulin resistance, oxidative stress, inflammation, and steatosis (Park et al., 2005, 2006; Yung et al., 2012; Wang et al., 2012; Ham et al., 2013). Regulating G6PD reverses these alterations by improving insulin sensitivity (Park et al., 2005, 2006; Yung et al., 2012). Therefore, the use of regulators of G6PD and the NADPH/NADP⁺ ratio, like nicotinamide (NAM), has been proposed as a therapeutic alternative for the prevention of alterations associated with metabolic diseases.

The NAM precursor of NAD⁺ is studied either as a protector (Lee et al., 2013; Koh, 2013; Jafary et al., 2014), or as a therapeutic agent (Lenglet et al., 2013; Libri et al., 2014). NAM at high pharmacological doses does not present cytotoxic, teratogenic, or oncogenic effects (Knip et al., 2000); however, there are reports that demonstrate that a long-term excess of NAM can induce metabolic disorders such as glucose intolerance, oxidative stress, insulin resistance (Zhou et al., 2009; Li et al., 2013), methylation, and lipotoxicity (Li et al., 2013). The therapeutic benefits of NAM for the prevention of pancreatic β -cell death (Hedman et al., 2006; Lee et al., 2013) are attributed to the inhibition of poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) and nitric oxide formation. NAM promotes NAD synthesis and inhibits NAD-dependent deacetylase or sirtuins (SIRT) in obese rats with type 2 diabetes, preventing alterations to glucose metabolism and hepatic steatosis. The inhibition of SIRT prevents the activation of acetyl-CoA 1 and 2 synthetase and therefore the production of acetyl-CoA, a precursor of fatty acids associated with steatosis.

In experimental models of diabetes induced by a high-fat diet, nicotinamide mononucleotide (a NAD⁺ synthesis intermediary) increases levels of NAD⁺, thus improving insulin sensitivity and decreasing the inflammatory response and SIRT activity by decreasing the expression of genes related to oxidative stress (Cantó et al., 2013). In the *GNMT-KO* mouse, the development of fatty liver and fibrosis was corrected by NAM, which decreased lipid synthesis, oxidative stress, inflammation, proliferation, and apoptosis (Varela-Rey et al., 2010). The acid form of NAM also has this effect on HepG2 cells and on primary hepatocyte cultures. A study performed by our group showed that NAM supplementation decreases oxidative stress and lipid accumulation by modulating G6PD activity in 3T3-L1 adipocytes grown with high levels of glucose (Torres-Ramírez et al., 2013).

The purpose of the present study was to evaluate whether NAM, by mitigating the increase in carbohydrate-induced G6PD activity, modifies the redox balance by lessening the accumulation of lipids, ROS, and TNF α , thereby halting or preventing the hepatic steatosis induced by carbohydrates in rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The chemicals used in this study were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Merck Millipore, Bedford, MA, USA), an RNeasy Isolation Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), a protease inhibitor (GenDepot, Houston, TX, USA), the TriPure isolation reagent (ROCHE, Indianapolis, IN, USA), a First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Massachusetts, USA), Fast Start DNA Master SYBR Green Plus (ROCHE, Mannheim, Germany), a Rat Insulin ELISA kit (ALPCO, New Hampshire, USA), a Free Fatty Acid Quantification Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA), and a

Rat TNF α Immunoassay ELISA (R & D, Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) were also used. The primers used were manufactured by Invitrogen (California, USA), and primary and secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

2.2. Ethical statement

The experimental design and animal management protocols were approved by the Local Health Research Committee of IMSS in accordance with the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999, revised 2001) for the care and use of laboratory animals.

2.3. Animals

Male Sprague Dawley rats (250 \pm 5 g) were provided by the Vivarium of the National Medical Center Siglo XXI of the IMSS. One week before the experiments began, the rats were acclimatized to light/dark periods (12/12 h) and ventilation to ensure optimum conditions of humidity (50%) and temperature (23 °C).

2.4. Induction of hepatic steatosis and treatments

Thirty animals were randomly distributed into 6 groups and subjected to the following treatments: 1) Control; 2) Glucose; 3) Glucose + NAM 0.06%; 4) Glucose + NAM 0.12%; 5) Fructose; and 6) Fructose + NAM 0.12%. A 30% glucose or fructose solution dissolved in drinking water was administered for 12 weeks ad libitum; however, from the 5th week onward, the carbohydrates were removed for 5 h each morning to administer treatments with different concentrations of NAM in drinking water. After 5 h, the NAM treatments were withdrawn to continue the administration of glucose or fructose. During the treatment period, the consumption of food and liquids and body weights were recorded. The control group received only water, and all animals were fed with ad libitum access to Chow 5008 (Purina).

2.5. Obtaining biological samples

At the end of the treatment period, the animals were weighed and anesthetized with pentobarbital (25 mg/kg, i.p.). Blood samples were obtained by cardiac puncture, placed in tubes with and without anticoagulant (EDTA), and then centrifuged at 5200 g for 15 min in a Thermo Scientific Sorvall Legend Mach 1.6 R centrifuge. Serum and plasma were stored at -70 °C and thawed immediately before use. Liver fragments were removed and either preserved in 10% formaldehyde (histological analysis), stored in TriPure (RT-PCR), or stored at -70 °C until use (enzyme activity and Western blot analyses).

2.6. Analysis of metabolic markers

Concentrations of serum markers (glucose, triacylglycerols (TG), total cholesterol (TC), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST)) and hepatic TG were determined using automated COBAS-INTEGRA 400 equipment.

Samples used for determining hepatic TG were prepared under the same conditions as the supernatants used for G6PD (2.8).

2.7. Quantification of insulin, FFA, and TNF α

The concentrations of insulin, FFA, and TNF α were determined using Rat Insulin ELISA, Free Fatty Acid Quantification, and Rat TNF α Immunoassay ELISA kits, respectively, following the manufacturer's protocols. Absorbances were obtained at 450, 570, and 450 nm, respectively, using a Labsystems Multiskan EX 96-well microplate reader (Helsinki, Finland).

2.8. G6PD specific activity

Liver fragments were homogenized at 10% (w/v) in 0.1 M PBS pH 7.5 by a Polytron PT 1200 homogenizer. The samples were then centrifuged at 83,500 g at 4 °C for 20 min in a Thermo Scientific Sorvall ST 40 R centrifuge. The activity in the supernatants was determined by assessing the production of NADPH (Rudack et al., 1971). Absorbances were monitored at 340 nm for 10 min using a Perkin-Elmer Lambda 25 spectrophotometer (Shelton, CT, USA). The reaction mixture contained 35 mM glucose 6-phosphate, 0.1 M MgCl₂, 11 mM NADP⁺, and 0.1 M triethanolamine. Activity was expressed as U/mg protein; 1 unit of enzyme oxidizes 1 mol of substrate per min in the presence of NADP⁺. Protein concentration was determined using the Bradford (1976) method.

2.9. Determination of GSH and GSSG

Liver fragments were homogenized (10% w/v) in 5% metaphosphoric acid or 0.1 M PBS pH 7.5 to determine GSH or GSSG, respectively. The homogenates were centrifuged at 83,500 g for 20 min at 4 °C, and measurements were performed on the supernatants. GSH was determined spectrophotometrically using the Ellman reagent [5-5'-dithiobis (2-nitro benzoic acid) or DTNB]. The assay is based on the stoichiometric reaction between DTNB and the thiol group of GSH. The nitromercapto benzoate that forms has a maximum absorbance at 412 nm proportional to the GSH concentration (Tietze, 1969). For GSSG, an enzymatic method was used after the supernatant was treated with 10 mM 1-methyl-2-vinylpyridium trifluoromethanesulfonate (M2VP), which sequesters thiol groups without interfering with glutathione reductase (GR) present in the assay. GSSG was reduced to GSH by the action of GR in the presence of NADPH⁺, and the GSH formed was quantified with Ellman reagent. The color change during the reaction and the reaction rate are proportional to the concentrations of GSH and GSSG.

2.10. Determination of the redox potential

The redox potentials of the glutathione redox pair were calculated using the experimentally determined GSH and GSSG concentrations in the Nernst equation (Schafer and Buettner, 2001) as follows:

$$E_{h-E^0} = (RT/nF) \log ([GSH]^2/[GSSG])$$

E^0 is the standard potential for the GSH/GSSG coupled redox pair (−240 mV at pH 7 in tissue), R is the gas constant (8.314 J K^{−1} mol^{−1}), T is the absolute temperature, F is the Faraday constant (9.6485 × 10⁴ C mol^{−1}), and n is the number of electrons transferred. The Nernst equation was employed at $T = 25$ °C (298.15 K) using 2.303 as the conventional factor for ln in log₁₀. Relatively more negative values indicate that the GSH/GSSG pair has a greater ability to act as a reductant.

2.11. Determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Aliquots of liver homogenates (PBS 0.1 M pH 7.5) and plasma were used to determine the degree of lipoperoxidation evaluated as TBARS by a spectrophotometric technique. The basis of the method used is the reaction between thiobarbituric acid (TBA) and the lipoperoxidation product malondialdehyde, which produces TBARS that can be measured by spectrophotometry at 595 nm. Briefly, 10% trichloroacetic acid was added to each serum aliquot and liver homogenate (PBS) sample; the mixtures were briefly stored on ice and centrifuged at 83,500 g for 15 min. TBA was added to aliquots of the supernatant, which were then shaken vigorously and incubated at 100 °C for 60 min, cooled to room temperature, mixed, centrifuged, and read at 535 nm. The MDA standard was prepared with 1,1,3,3-tetramethoxypropane.

2.12. Removal and determination of pyridine nucleotides

Liver fragments were processed to determine the levels of oxidized and reduced forms of pyridine nucleotides. To determine NADH and NADPH levels, homogenates were prepared with an extraction solution containing 0.02 N NaOH and 0.5 mM cysteine. The samples were heated to 60 °C for 10 min and neutralized with 0.25 M glycylglycine pH 7.6. The extractions of NAD⁺ and NADP⁺ were performed with 0.1 N HClO₄ and neutralized with 0.5 N KOH (Gupte et al., 2003). All homogenates were centrifuged at 83,500 g for 30 min. Coenzymes were determined enzymatically by monitoring the absorbance at 340 nm. The coenzyme concentration is reported as μM.

2.13. Western blot

Liver homogenates were prepared with a lysis buffer containing 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Tween 20, 0.2% NP-40, and a cocktail of protease inhibitors. After centrifugation at 3000 g for 20 min, aliquots of supernatants with equal amounts of protein (40 μg) were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with 5% albumin in Tris-buffered saline 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 2 h and were incubated at 4 °C overnight with the primary anti-G6PD and anti-β-actin antibodies (1:1000 in 1% bovine serum albumin (BSA)) in TBS-T. The membranes were washed and then incubated at room temperature for 2 h with peroxidase-labeled anti-rabbit and anti-mouse (1:2000) secondary antibodies. The bands were detected by an Amersham ECL Plus chemiluminescence system (GE Healthcare Life Sciences; Piscataway, NJ, USA) and a Kodak Gel Logic 200 Imaging System scanner (Rochester, NY, USA).

2.14. RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was isolated using the TriPure reagent following the manufacturer's protocol. To verify the purity of the RNA, each sample was measured at 260 and 280 nm, and the ratios were verified to be between 1.9 ± 0.2, which was consistent with the absence of protein contaminants. To confirm the integrity of the samples, 1 μg of RNA was subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide and was visualized using an imaging analyzer (BioRad). Two main ribosomal bands (28 and 18 S rRNA) were detected and showed no RNA degradation (data not shown). From 2 μg of total RNA, cDNA was synthesized using the Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis kit according to the manufacturer's protocols, in a final volume of 20 μl. qPCR was performed in a final volume of 20 μl on a LightCycler 2.0 using Fast Start DNA Master Plus SYBR Green Plus (Roche). The qPCR mixtures contained primers (0.5 mM) for G6PD (F5'-CCTGATGATCCCAAATTCATCAAATAG-3', R5'-CTGGAACCGCATCATAGTGGAG-3' [283 bp]), NADPH oxidase 4 (NOX4) (F5'-GCTCATTTCACAGACCTGG-3', R5'-AGGTTTGTGCTCCGGATGCA-3'), and 18 S (F5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3', R5'-CGCTGAGCCAGTTCAGTGT A-3' [218 bp]) as an internal control. PCR was performed in duplicate, and the reaction conditions were as follows: 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 10 s, 61 °C for 7 s and 72 °C for 10 s. Quantification of the G6PD and NOX4 genes was expressed as the relative level of mRNA compared to the control. The calculation was performed after normalization to 18 S using the formula 2^{−ΔΔCt}.

2.15. Histological evaluation

For histological analyses, liver fragments were preserved in 10% formaldehyde and subsequently embedded in paraffin. The 6-μm liver sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. Biopsies were classified into the 4 grades of steatosis depending on fat accumulation using the Kleiner (2005) classification.

Table 1
Effect of NAM on metabolic alterations induced with carbohydrates in rat.

	Control	Glucose	Glucose + 0.06% NAM	Glucose + 0.12% NAM	Fructose	Fructose + 0.12% NAM
Start (g)	252 ± 2.18	251 ± 2.77	250.5 ± 3.32	252.4 ± 2.65	253 ± 1.78	252.5 ± 2.65
Final (g)	424.33 ± 3.68	528 ± 2.82 ^a	519.4 ± 3.58	502.4 ± 3.65	516.6 ± 2.07 ^a	502.5 ± 1.41
Weight gain (g)	172.33 ± 18.95	277 ± 31.77 ^a	268.9 ± 3.22	250 ± 23	263.6 ± 26.58 ^a	250 ± 23.5
Insulin (ng/ml)	1.64 ± 0.42	3.45 ± 0.66 ^a	2.76 ± 0.43	2.70 ± 0.48	3.81 ± 0.68 ^a	3.05 ± 0.37
Glucose (mg/dl)	112.5 ± 9.19	229.5 ± 2.12 ^a	187 ± 43.30	179.33 ± 20.79	206 ± 23.64 ^a	181 ± 14.93
TG (mg/dl)	38.5 ± 0.70	160.66 ± 18.77 ^a	147 ± 45.21	121 ± 29.81	202.33 ± 44.27 ^a	201 ± 19.75
FFA (nmol/μl)	11.58 ± 6.92	27.68 ± 1.48 ^a	8.92 ± 6.36 ^b	5.81 ± 0.28 ^b	21.02 ± 2.52 ^a	15.28 ± 2.49 ^d
TC (mg/dl)	64 ± 4.58	72.5 ± 12.87	73 ± 6.92	54.75 ± 0.95 ^b	66 ± 7.31	72 ± 4.16
ALT (u/l)	33.6 ± 4.47	50.97 ± 4.93 ^a	44.9 ± 3.01	43.96 ± 7.01	50.85 ± 9.93 ^a	33.06 ± 3.32 ^d
AST (u/l)	116.06 ± 11.86	129.34 ± 12.30 ^a	67.75 ± 2.16 ^b	99.17 ± 12.98 ^c	312.8 ± 68.3 ^a	84.25 ± 4.72 ^d
TBARS (nM)	7.78 ± 0.92	35.28 ± 0.70 ^a	11.37 ± 0.5 ^b	12.42 ± 3.14 ^b	31.48 ± 6.87 ^a	15.5 ± 1.70 ^d
Hepatic TG (mg/dl)	7.67 ± 1.52	106.75 ± 3.77 ^a	91.67 ± 2.08 ^b	73.33 ± 1.52 ^c	129.66 ± 1.52 ^a	98.25 ± 0.95 ^d

Values are expressed as means ± S.D. of 5 animals for group.

^a *P* < 0.05 compared with the control.

^b *P* < 0.05 compared with glucose.

^c *P* < 0.05 compared with glucose or glucose + 0.06% NAM.

^d *P* < 0.05 compared with fructose.

2.16. Statistical analysis

The results are expressed as the mean ± SD. Comparisons between groups were performed with ANOVA, and the Tukey-Kramer test was used for analyses between groups. Statistical calculations were performed in NCSST 2007 software (Kaysville, UT, USA), and values of *p* < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. NAM improves metabolic profiles altered by glucose or fructose consumption

Glucose or fructose consumption increased body weight (~56%) compared to the control group, which was reflected in increases in glycemia (~100%), insulin (~2-fold), serum 4–5-fold and hepatic (~1.6-fold) TG, FFA (~2-fold), and TBARS (~4.3-fold), with no change in TC. Glucose or fructose also increased the levels of typical markers of liver damage: ALT (11% and 170%, respectively) and AST (~52% with both carbohydrates); these changes were significant in comparison to the control group (Table 1).

The glucose and fructose groups supplemented with NAM at 0.06% and 0.12% showed beneficial effects, with decreases in ALT (Glucose + NAM: 48% and 23%, respectively; Fructose + NAM: 73%), AST (Glucose + NAM: ~13% for both doses; Fructose + NAM: 35%), FFA (Glucose + NAM: > 3.1% and 4.8%, respectively; and Fructose + NAM: 1.4%), TBARS (Glucose + NAM: ~30% for both doses; Fructose + NAM: 50%) and hepatic TG (Glucose + NAM: 14.12% and 31.3%, respectively; Fructose + NAM: 24.22%). These decreases were analyzed with respect to the groups that received only glucose or fructose (Table 1).

These data indicate that high glucose or fructose consumption induces biochemical changes indicative of insulin resistance (hyperglycemia and hyperinsulinemia), dyslipidemia, oxidative stress, and hepatic damage and that NAM attenuates increases in levels of FFA, TBARS, and markers of hepatic damage induced by high glucose or fructose.

3.2. NAM decreases hepatic steatosis induced by glucose or fructose

Rats that consumed 30% glucose or fructose for 90 days exhibited 0 or 1 degree steatosis (5% and 10% lipid droplets, respectively) when compared with the control group (Fig. 1A). In addition, carbohydrates altered the hepatic architecture: hepatocytes with ballooning degeneration were observed, along with dilated sinusoids and no fibrosis

(Fig. 1B and C). NAM supplementation decreased the degree of steatosis while preserving tissue architecture (Fig. 1D–F).

3.3. Alteration of glutathione status by glucose or fructose modifies its redox potential, increasing the TNFα concentration and its improvement with NAM

Glucose- or fructose-induced hepatic steatosis altered the redox state of GSH, decreasing GSH (~69%, Fig. 2A) and increasing GSSG (~72%, Fig. 2B). These changes were mirrored by the GSH/GSSG redox potential evaluated by the Nernst equation, which showed that the groups treated with glucose or fructose were significantly more pro-oxidant (~280 mV; Fig. 2C) than the control group. When the capacity to detoxify the oxidants produced is exceeded, the cell will initiate a series of events including pro-inflammatory responses; therefore, TNFα was evaluated. The concentration of TNFα increased significantly with glucose or fructose (30%) relative to that of the control, indicating that the high consumption of glucose or fructose induced a pro-inflammatory condition.

The glucose or fructose groups that received NAM (0.06% and 0.12%) showed significantly increased levels of GSH (Glucose + NAM: ~43% for both doses; Fructose + NAM: 62%, Fig. 2A) and decreased levels of GSSG (Glucose + NAM: ~20% for both doses; Fructose + NAM: 9%, Fig. 2B). The GSH/GSSG redox potential in both groups exhibited a less pro-oxidant state (Glucose + NAM, -290.42 mV and -287.96 mV, respectively; Fructose + NAM, -288.75 mV, Fig. 2C) compared to those of the glucose or fructose group and a significantly decreased concentration of pro-inflammatory cytokines (~1.3-fold; Fig. 2D) compared to those of the glucose or fructose group (Fig. 2D).

These data indicate that NAM only partially prevented changes in the GSH and GSSG levels and redox potential, as well as pro-inflammatory conditions.

3.4. NAM mitigates increases in hepatic G6PD mRNA, protein levels, and specific activity induced by glucose or fructose

The administration of glucose or fructose at 30% for 90 days increased protein (2.03 and 2.75-fold, respectively; Fig. 3A) and mRNA (1.38 and 2.4-fold, respectively; Fig. 3B) concentrations and the specific activity (4.08 and 8.13-fold, respectively; Fig. 3C) of G6PD when compared to the control group.

NAM (0.06% and 0.12%) decreased the amount of protein (Glucose + NAM, ~1.6-fold for both doses, Fructose + NAM: 2.72-fold, Fig. 3A), mRNA (Glucose + NAM: ~8.62 and ~6.9-fold, respectively, or Fructose + NAM: ~15-fold; Fig. 3B) and specific activity (Glucose + NAM: ~1.5-

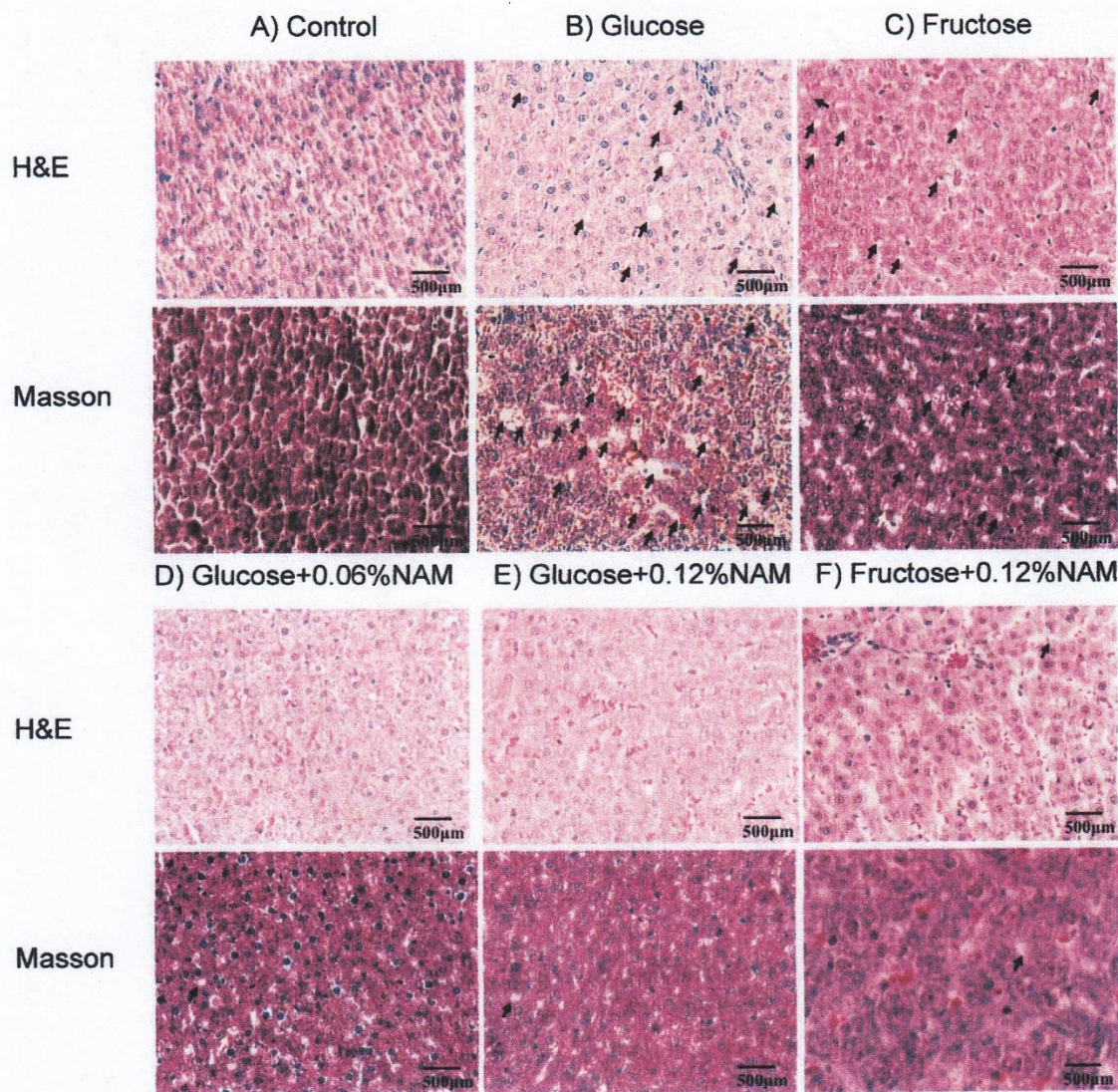


Fig. 1. Effect of NAM on histological sections in livers of rats. A) Control, B) Glucose, C) Fructose, D) Glucose + 0.06% NAM, E) Glucose + 0.12% NAM and F) Fructose + 0.12% NAM. Hematoxylin & Eosin and Masson staining.

fold, both doses; Fructose + NAM: 1.76-fold; Fig. 3C). These changes are reported with respect to the glucose or fructose groups.

Additionally, the glucose- and fructose-treated groups that received NAM exhibited lower concentrations of G6PD mRNA (80%) in comparison to the control group.

3.5. NAM mitigates the increase in TBARS and the expression of hepatic NOX4 induced by glucose or fructose

High and chronic glucose or fructose consumption increased the levels of NOX4 mRNA (79% and 93%, respectively), which was reduced by NAM 0.06% and 0.12% (Glucose + NAM: 42% and 66%, respectively; Fructose + NAM: 20%; Fig. 4A) relative to the levels in the glucose- and fructose-treated groups. Both carbohydrates increased the TBARS concentrations (~544%) compared to the control group; in groups supplemented with NAM (0.06% and 0.12%), TBARS decreased in a dose-dependent manner (Glucose + NAM: 55% and 66%, respectively; Fructose + NAM: 63%; Fig. 4B).

3.6. NAM mitigates the increase in pyridine nucleotides induced by glucose or fructose

The NADH/NAD⁺ ratio increased in the groups treated with 30% glucose or fructose (19.46 and 44.8-fold, respectively, Fig. 5A), an effect that was reduced by supplementation with NAM 0.06% and 0.12% (Glucose + NAM: 2.9 and 6-fold, respectively; Fructose + NAM: 2.33-fold; Fig. 5A).

The NADPH/NADP⁺ ratio increased (1.37-fold) exclusively in the glucose group with respect to the control. This increase was mitigated by NAM 0.06% and 0.12% (~2.69 and 2.17-fold, respectively; Fig. 5B). In addition, the ratio decreased in the fructose group compared with the control group, and the NAM supplementation increased (1.39-fold) this ratio relative to the fructose group (Fig. 5B).

4. Discussion

NAM has anti-inflammatory and antioxidant properties that indicate its possible therapeutic value in hepatic steatosis. This study found that NAM prevented hepatic alterations in G6PD and the redox state and

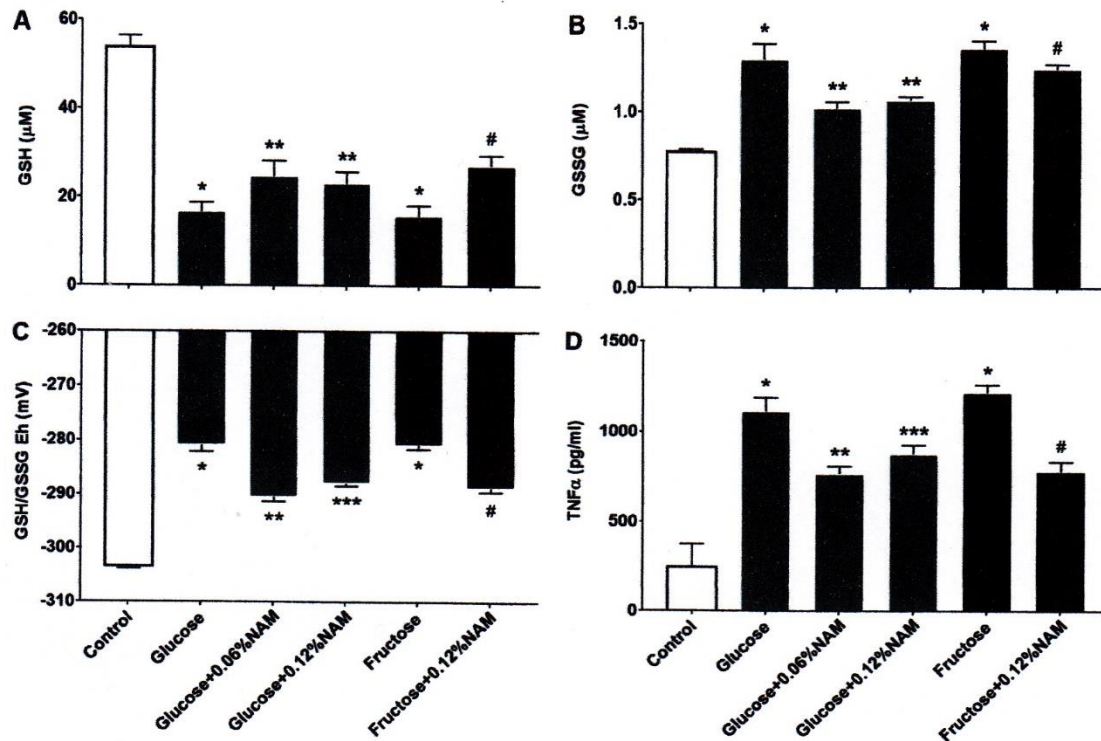


Fig. 2. Effect of NAM on A) GSH, B) GSSG, C) GSH/GSSG Eh (mV) and D) TNF α in livers of rats treated with 30% glucose or fructose in drinking water. Values are expressed as mean \pm S.D. of 5 animals for group. * $P < 0.05$ compared with the control. ** $P < 0.05$ compared with glucose. *** $P < 0.05$ compared with glucose or glucose + 0.06% NAM. # $P < 0.05$ compared with fructose.

attenuated increased serum FFA, inflammation, oxidative stress, and hepatic damage in high fructose or high glucose consumption-induced liver steatosis in rats.

Chronic and high carbohydrate consumption alters satiety signaling, stimulating greater caloric intake and weight gain, as has been observed. Additionally, this diet overactivates *de novo* lipogenesis and, together with adipocyte lipolysis, leads to increased circulating levels of FFA and TG. Higher increases in serum and hepatic TG levels were observed for the fructose group compared to the glucose group, due to rapid intestinal absorption by GLUT5, which is specific for fructose (Douard and Ferraris, 2008). Fructose is metabolized principally in hepatocytes, where fructose phosphorylation occurs in a reaction not controlled by the cellular energy state. Finally, fructose carbons are eventually used to form fatty acids and TG. For this reason, fructose is considered more lipogenic than glucose.

Increases in FFA, TG (serum and hepatic), and hepatic steatosis in both groups led to hyperinsulinemia and hyperglycemia, which are indicative of insulin resistance. Palmitic acid, the first product of *de novo* lipogenesis, promotes insulin resistance and cell death. In hepatocytes, palmitic acid induces serine phosphorylation of IRS-1, preventing insulin signaling and insulin resistance (Wei and Pagliassotti, 2004).

Markers of oxidative stress increased in both groups, indicating the increase in lipid peroxidation, which together with hyaline or Mallory bodies disrupt the hepatocyte cytoskeleton by modifying membrane permeability, cellular viability, and protein output to the extracellular medium. These changes explain the observed increases in TBARS, ALT, and AST.

Although NAM decreased hepatic TG, it did not diminish serum TG and glucose levels NAM did attenuate increases in FFA, aminotransferases, and serum TBARS, indicating that NAM slows liver damage and that the degree of damage is directly related to the FFA and ROS concentrations. The cytoprotective effect of NAM is attributed to its prevention of the depletion of NAD $^{+}$, partly by inhibiting NAD $^{+}$ -

consuming enzymes such as PARPs and SIRT5; however, in some cases, NAM may be a SIRT activator. During gluconeogenesis, SIRT plays a relevant role, as most hepatic enzymes and some transcription factors regulating gluconeogenesis are acetylated by nutrients. SIRT2 deacetylates and stabilizes PEPCK-C, PGC-1 α , and FOXO1, increasing gluconeogenesis. In contrast, hepatic SIRT1 knockdown decreases gluconeogenesis in obese mice. In the model of diabetes induced by a high-fat diet in obese rats, NAM increased the expression of SIRT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase by increasing NAD $^{+}$ synthesis and NAD $^{+}$ /NADH. The availability of NAD $^{+}$ activates SIRT1 by improving glucose homeostasis and mitochondrial function (Yang et al., 2014). It is possible that the dose and duration of NAM supplementation used in the present study were insufficient to control blood glucose. However, the primary effect of NAM in the glucose group was to decrease the redox stress generated by NADH/NAD $^{+}$ and NADPH/NADP $^{+}$. In the fructose group, NAM also decreased NADH/NAD $^{+}$ without affecting NADPH/NADP $^{+}$. Therefore, reducing the reductive stress leads to the lessened production of fatty acids and β oxidation, decreasing the formation of NADH and thereby preventing the overflow of electrons to the mitochondrial respiratory chain and decreasing ROS formation.

Among the critical redox changes induced by glucose or fructose were decreased GSH and GSH/GSSG values, which is consistent with hepatic steatosis induced by a high-fat diet (El-Din et al., 2014; Ren et al., 2014; Lin et al., 2014; El-Lakkany et al., 2016). The antioxidant activity of GSH depends on its *de novo* synthesis, or the redox cycle, which removes hydroperoxides and lipid peroxidation end products. The efficiency of the redox cycle depends on NADPH and the co-ordinated action of glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). GPx reduces peroxides at the expense of GSH, forming GSSG, which is converted to GSH by GR. An abrupt decrease in hepatic GSH may reflect the increased production of oxidants, exceeding the detoxification capacity of GSH and causing failure in GSH synthesis, GSH conjugation with toxic compounds, and secretion. All of these processes were only partially restored by NAM supplementation.

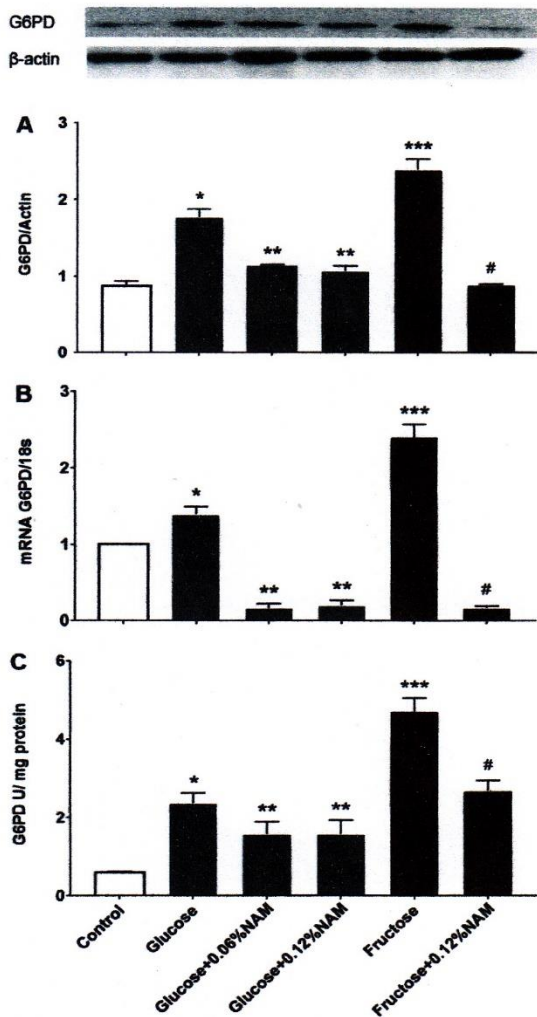


Fig. 3. Effect of NAM on A) amount, B) expression, and C) G6PD activity in livers of rats. Values are expressed as mean \pm S.D. of 5 animals for group. * $P < 0.05$ compared with the control. ** $P < 0.05$ compared with glucose. *** $P < 0.05$ compared with the control or glucose. # $P < 0.05$ compared with fructose.

NADPH produced by G6PD is also used by NOX to produce superoxide. Consistent with this connection, NOX4 mRNA levels increased in both groups. Patients with NASH, rodents with choline deficiency, rodents treated with 10% fructose, and hepatocytes cultured with palmitic acid all exhibit increases in mRNA levels of NOX subunits: p22(phox) and p47(phox) (Abreu et al., 2014; Castro et al., 2014; Bettaieb et al., 2015; Ganji et al., 2015). In our model, the increase in NOX4 caused by glucose or fructose occurred simultaneously with increases in G6PD, NADPH, and TBARS, indicating a direct dependence of NOX4 on G6PD activity.

Although histological analysis showed no fibrosis, TNF α concentrations increased in both groups. TNF α is associated with inflammation, insulin resistance, and liver fibrosis (Liu et al., 2014; Eslamparast et al., 2014). Fatty acids and NOX increase ROS production, damaging biomolecules and activating nuclear factor κ B (NF κ B), which promotes the expression of pro-inflammatory cytokines, including TNF α (Ji et al., 2011). However, decreases in GSH and the low activity of antioxidant enzymes sensitize cells, allowing TNF α to initiate apoptosis or necrosis (Choi et al., 2016; K roglu et al., 2016; Kobylak et al., 2016; Yang et al., 2016). Supporting these findings, the E_{hc} results for the GSH/GSSG pair indicated that both groups might undergo modifications in the redox environment via changes in signal

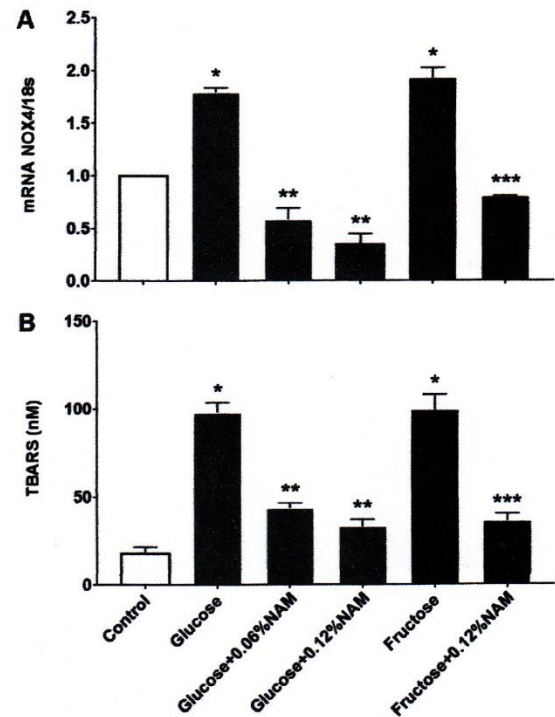


Fig. 4. Effect of NAM on A) NOX4 and B) TBARS in livers of rats treated with 30% glucose or fructose in drinking water. Values are expressed as mean \pm S.D. of 5 animals for group. * $P < 0.05$ compared with the control. ** $P < 0.05$ compared with glucose. *** $P < 0.05$ compared with fructose.

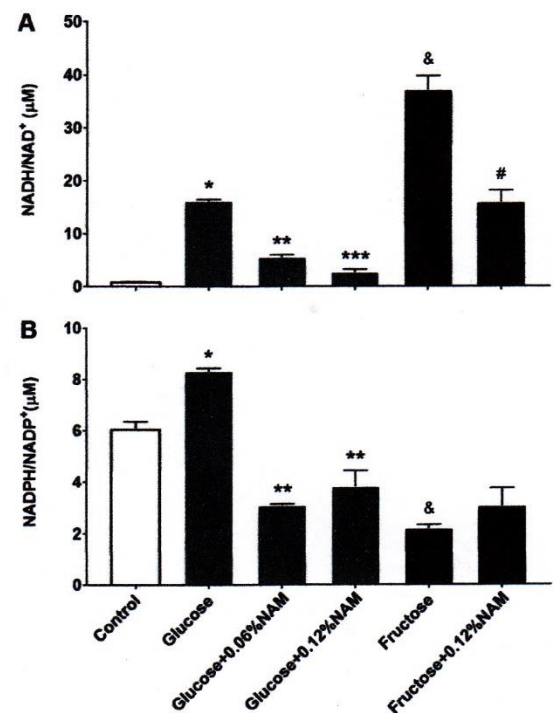


Fig. 5. Effect of NAM on pyridine nucleotides in livers of rats treated with 30% glucose or fructose. Values are expressed as mean \pm S.D. of 5 animals for group. * $P < 0.05$ compared with the control. ** $P < 0.05$ compared with glucose. *** $P < 0.05$ compared with glucose or glucose + 0.06% NAM. & $P < 0.05$ compared with fructose. # $P < 0.05$ compared with the control or glucose.

translation. The changes in GSH/NOX4/TNF α in both groups depend on the disruption reflected by GSH/GSSG, NADH/NAD $^{+}$, and NADPH/NADP $^{+}$.

Notably, both groups exhibited a highly reducing environment, as reflected by NADH/NAD $^{+}$, with more marked changes in the fructose group; this ratio is indicative of the increase in NADH via glycolysis, the Krebs cycle, and β oxidation, all of which occur at the expense of NAD $^{+}$ and the activation of NAD $^{+}$ -consuming enzymes. Likewise, there is a possible decoupling between NADH formation and its reoxidation and the presence of hypoxia (Lefere et al., 2016). NADPH/NADP $^{+}$ contributes to reductive stress; this value increased in the glucose group, and, unexpectedly, NADPH/NADP $^{+}$ decreased in the fructose group, in contrast to the increase in NADH/NAD $^{+}$. The NADPH concentrations were high (data not shown) relative to those of the controls, which likely depended on the synthesis and availability of NADP $^{+}$ via the phosphorylation of NAD by NAD $^{+}$ kinase (Pollak et al., 2007). The fructose group showed decreased NAD $^{+}$ and increased NADP $^{+}$ levels relative to the glucose group (data not shown). This result should have been reflected in an increased NADPH/NADP $^{+}$; this change did not occur, which might be due to higher NADPH expenditure during *de novo* lipogenesis, fatty acid elongation, and ROS production. Although the critical function of NAD(P) $^{+}$ and its redox state are known, there is little understanding of its cellular dynamics and metabolism under conditions of a chronic abundance of carbohydrates.

The observed increase in NADPH/NADP $^{+}$ in the glucose group is a consequence of the over-activation of G6PD. Although no increase in NADPH/NADP $^{+}$ occurred in the fructose group, G6PD activity and expression levels were significantly higher than in the control and glucose groups, thereby explaining the observed decrease in NADPH/NADP $^{+}$.

The effect of carbohydrates on G6PD has been studied extensively using different models (Wang et al., 2012; Takeuchi et al., 2014; Castro et al., 2014; Zheng et al., 2014; Ragab et al., 2015; Kumar and Bhandari, 2015). Increases in G6PD are mediated by nutrients and hormonal factors activating SREBP-1c, LXR, and ChREBP, which in turn induce the transcription of lipogenic and glycolytic genes. The G6PD gene has response sites for hormones, nutrients, SREBP, and ChREBP. In the NAM-supplemented groups, the expression and activity of G6PD decreased, along with NOX4 and TNF α , thus increasing GSH levels; this change was reflected in decreases in TBARS and FFA and the corresponding decrease in liver steatosis.

We have previously demonstrated in 3T3-L1 adipocytes that NAM regulates G6PD by mixed noncompetitive inhibition (Torres-Ramírez et al., 2013). Again, we observed the regulatory effect of NAM on G6PD, although this effect was found at the transcription level. Although NADPH/NADP $^{+}$ is the main regulator of G6PD, its activity would be expected to be low. However, this was not found in the glucose or fructose groups. G6PD is likely phosphorylated by AMP kinase, C-Src, mTOR, or PI3/Src, as previous studies have shown that kinase inhibition improves GPx and GR, restoring GSH concentrations; these changes were similar to those found in our results (Wagle et al., 1998; Gupte et al., 2009). Thus, along with increasing the pool of NAD $^{+}$, NAM could regulate G6PD indirectly by preventing its phosphorylation.

Therefore, NAM suppresses the metabolic and cellular imbalances caused by glucose or fructose by suppressing increases in G6PD and NADPH/NADP $^{+}$, thus improving GSH/GSSG and halting nonalcoholic liver steatosis.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the assistance of Dra. Mariela Sánchez Claudio. This research was partially supported by IMSS and Gonzalo Rio Arronte I.A.P. Foundations and funded by FIS/IMSS/PROT/MD 13/1260.

CONACYT (Scholarship 212822).

Conflicts of interest

All authors of this research declare that there is no conflict of any kind.

References

- Abreu, I.C., Guerra, J.F., Pereira, R.R., Silva, M., Lima, W.G., Silva, M.E., Pedrosa, M.L., 2014. Hypercholesterolemic diet induces hepatic steatosis and alterations in mRNA expression of NADPH oxidase in rat livers. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 58, 251–259.
- Bettaieb, A., Jiang, J.X., Sasaki, Y., Chao, T.I., Kiss, Z., Chen, X., Tian, J., Katsuyama, M., Yabe-Nishimura, C., Xi, Y., Szyndralewicz, C., Schröder, K., Shah, A., Brandes, R.P., Haj, F.G., Török, N.J., 2015. Hepatocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 4 regulates stress signaling, fibrosis, and insulin sensitivity during development of steatohepatitis in mice. *Gastroenterology* 149, 468–480.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248–254.
- Cantó, C., Sauve, A.A., Bai, P., 2013. Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. *Mol. Asp. Med.* 34, 1168–1201.
- Castro, M.C., Francini, F., Gagliardino, J.J., Massa, M.L., 2014. Lipic acid prevents fructose-induced changes in liver carbohydrate metabolism: role of oxidative stress. *Biochim Biophys. Acta* 1840, 1145–1151.
- Choi, R.Y., Ham, J.R., Lee, M.K., 2016. Esculetin prevents non-alcoholic fatty liver in diabetic mice fed high-fat diet. *Chem. Biol. Interact.* 260, 13–21.
- Douard, V., Ferraris, R.P., 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, 227–237.
- El-Din, S.H., Sabra, A.N., Hammam, O.A., Ebeid, F.A., El-Lakkany, N.M., 2014. Pharmacological and antioxidant actions of garlic and onion in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *J. Egypt Soc. Parasitol.* 44, 295–308.
- El-Lakkany, N.M., Seif El-Din, S.H., Sabra, A.A., Hammam, O.A., Ebeid, F.A., 2016. Co-administration of metformin and N-acetylcysteine with dietary control improves the biochemical and histological manifestations in rats with non-alcoholic fatty liver. *Res. Pharm. Sci.* 11, 374–382.
- Eslamparast, T., Poustchi, H., Zamani, F., Sharafkhan, M., Malekzadeh, R., Hekmatdoost, A., 2014. Synbiotic supplementation in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am. J. Clin. Nutr.* 99, 535–542.
- Ganji, S.H., Kashyap, M.L., Kamanna, V.S., 2015. Nicotinamide inhibits fat accumulation, oxidative stress, and inflammatory cytokine IL-8 in cultured hepatocytes: impact on non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 64, 982–990.
- Gomez-Sanchez, E.P., Romero, D.G., Rodriguez, A.F., Warden, M.P., Krozowski, Z., Gomez-Sanchez, C.E., 2008. Hexose-6-phosphate dehydrogenase and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-1 tissue distribution in the rat. *Endocrinology* 149, 525–533.
- Gupte, S.A., Arshad, M., Viola, S., Kaminski, P.M., Ungvari, Z., Rabbani, G., Koller, A., Wolin, M.S., 2003. Pentose phosphate pathway coordinates multiple redox-controlled relaxing mechanisms in bovine coronary arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, 2316–2326.
- Gupte, R.S., Floyd, B.C., Kozicky, M., George, S., Ungvari, Z.I., Neito, V., Wolin, M.S., Gupte, S.A., 2009. Synergistic activation of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD(P)H oxidase by Src kinase elevates Superoxide in type 2 diabetic, Zucker fa/fa, rat liver. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 219–228.
- Ham, M., Lee, J.W., Choi, A.H., Jang, H., Choi, G., Park, J., Kozuka, C., Sears, D.D., Masuzaki, H., Kim, J.B., 2013. Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress. *Mol. Cell Biol.* 33, 2425–2435.
- Hedman, M., Ludvigsson, J., Faresjö, M.K., 2006. Nicotinamide reduces high secretion of IFN-gamma in high-risk relatives even though it does not prevent type 1 diabetes. *J. Interferon Cytokine Res.* 26 (4), 207–213.
- Jafary, H., Ahmadian, S., Soleimani, M., 2014. Synergistic anticancer activity of valproate combined with nicotinamide enhances anti-proliferation response and apoptosis in MIA-Paca2 cells. *Mol. Biol. Rep.* 41, 3801–3812.
- Ji, F., Li, Z., Deng, H., 2011. Antiviral treatment for HCV-related cirrhosis: is the effort worth it? *J. Gastrointest. Liver Dis.* 20, 445–446.
- Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., Ferrell, L.D., Liu, Y.C., Torbenson, M.S., Unalp-Arida, A., Yeh, M., McCullough, A.J., Sanyal, A.J., 2005. Design and validation of a histological scoring system for non-alcoholic fatty liver disease. *Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network. Hepatology* 41, 1313–1321.
- Knip, M., Douek, L.F., Moore, W.P., Gillmor, H.A., McLean, A.E., Bingley, P.J., Gale, E.A., 2000. Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 43, 1337–1345.
- Kobyliak, N., Abenavoli, L., Falalyeyeva, T., Virchenko, O., Natalia, B., Beregova, T., Bodnar, P., Spivak, M., 2016. Prevention of NAFLD development in rats with obesity via the improvement of pro/antioxidant state by cerium dioxide nanoparticles. *Clujul Med.* 89, 229–235.
- Koek, G.H., Liedorp, P.R., Bast, A., 2011. The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin. Chim. Acta* 412, 1297–1305.
- Koh, P.O., 2013. Nicotinamide attenuates the injury-induced decrease of hippocampal calcium in ischemic brain injury. *Neurosci. Lett.* 545, 6–10.
- Köröglü, E., Canbakan, B., Atay, K., Hatemi, İ., Tuncer, M., Dobrucali, A., Sonsuz, A., Gültepe, I., Şentürk, H., 2016. Role of oxidative stress and insulin resistance in disease severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Turk. J. Gastroenterol.* 27, 361–366.
- Kumar, P., Bhandari, U., 2015. Fenugreek seed extract prevents fat deposition in

- monosodium glutamate (MSG)-obese rats. *Drug Res.* 66, 174–180.
- Lee, S.J., Choi, S.E., Jung, I.R., Lee, K.W., Kang, Y., 2013. Protective effect of nicotinamide on high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity to INS-1 beta cells is attributed to its inhibitory activity to sirtuins. *Arch. Biochem. Biophys.* 535, 187–196.
- Lefere, S., Van, Steenkiste, C., Verhelst, X., Van, Vlierberghe, H., Devisscher, L., Geerts, A., 2016. Hypoxia-regulated mechanisms in the pathogenesis of obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Mol. Life Sci.* 73, 3419–3431.
- Legeza, B., Balázs, Z., Nashev, L.G., Odermatt, A., 2013. The microsomal enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 faces the cytoplasm and uses NADPH generated by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Endocrinology* 154, 205–213.
- Lenglet, A., Liabeuf, S., Guffroy, P., Fournier, A., Brazier, M., Massy, Z.A., 2013. Use of nicotinamide to treat hyperphosphatemia in dialysis patients. *Drugs R. D.* 13, 165–173.
- Li, D., Tian, Y.J., Guo, J., Sun, W.P., Lun, Y.Z., Guo, M., Luo, N., Cao, Y., Cao, J.M., Gong, X.J., Zhou, S.S., 2013. Nicotinamide supplementation induces detrimental metabolic and epigenetic changes in developing rats. *Br. J. Nutr.* 110, 2156–2164.
- Libri, V., Yandim, C., Athanasopoulos, S., Loyse, N., Natisvili, T., Law, P.P., Chan, P.K., Mohammad, T., Mauri, M., Tam, K.T., Leiper, J., Piper, S., Ramesh, A., Parkinson, M.H., Huson, L., Giunti, P., Festenstein, R., 2014. Epigenetic and neurological effects and safety of high-dose nicotinamide in patients with Friedreich's ataxia: an exploratory, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 384, 504–513.
- Lin, Z., Cai, F., Lin, N., Ye, J., Zheng, Q., Ding, G., 2014. Effects of glutamine on oxidative stress and nuclear factor- κ B expression in the livers of rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Exp. Ther. Med.* 7, 365–370.
- Liu, J., Zhou, G., Lu, W., 2014. Plasma interleukin 17 in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 39 cases. *J. Cancer Res Ther.* 10, 304–306.
- Park, J., Rho, H.K., Kim, K.H., Choe, S.S., Lee, Y.S., Kim, J.B., 2005. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. *Mol. Cell Biol.* 25, 5146–5157.
- Park, J., Choe, S.S., Choi, A.H., Kim, K.H., Yoon, M.J., Suganami, T., Ogawa, Y., Kim, J.B., 2006. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. *Diabetes* 55, 2939–2949.
- Pollak, K.I., Oncken, C.A., Lipkus, I.M., Lyna, P., Swamy, G.K., Pletsch, P.K., Peterson, B.L., Heine, R.P., Brouwer, R.J., Fish, L., Myers, E.R., 2007. Nicotine replacement and behavioral therapy for smoking cessation in pregnancy. *Am. J. Prev. Med.* 33, 297–305.
- Ragab, S.M., Abd-Elghaffar, S.Kh., El-Metwally, T.H., Badr, G., Mahmoud, M.H., Omar, H.M., 2015. Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids Health Dis.* 14–83.
- Ren, T., Huang, C., Cheng, M., 2014. Dietary blueberry and bifidobacteria attenuate nonalcoholic fatty liver disease in rats by affecting SIRT1-mediated signaling pathway. *Oxid. Med Cell Longev.* 2014, 2014–469059.
- Rolo, A.P., Teodoro, J.S., Palmeira, C.M., 2012. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 59–69.
- Rudack, D., Chisholm, E.M., Holten, D., 1971. Rat liver glucose 6-phosphate dehydrogenase. regulation by carbohydrate diet and insulin. *J. Biol. Chem.* 246, 1249–1254.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1191–1212.
- Takeuchi, H., Morita, R., Shirai, Y., Nakagawa, Y., Terashima, T., Ushikubo, S., Matsuo, T., 2014. Lowering effect of firefly squid powder on triacylglycerol content and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat liver. *J. Oleo Sci.* 63, 1293–1301.
- Tietze, F., 1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.
- Torres-Ramírez, N., Baiza-Gutman, L.A., García-Macedo, R., Ortega-Camarillo, C., Contreras-Ramos, A., Medina-Navarro, R., Cruz, M., Ibáñez-Hernández, M.Á., Díaz-Flores, M., 2013. Nicotinamide, a glucose-6-phosphate dehydrogenase non-competitive mixed inhibitor, modifies redox balance and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Life Sci.* 18, 975–985.
- Varela-Rey, M., Martínez-López, N., Fernández-Ramos, D., Embade, N., Calvisi, D.F., Woodhoo, A., Rodríguez, J., Fraga, M.F., Julve, J., Rodríguez-Millán, E., Frades, I., Torres, L., Luka, Z., Wagner, C., Esteller, M., Lu, S.C., Martínez-Chantar, M.L., Mato, J.M., 2010. Fatty liver and fibrosis in glycine N-methyltransferase knockout mice is prevented by nicotinamide. *Hepatology* 52, 105–114.
- Wagle, A., Jivraj, S., Garlock, G.L., Stapleton, S.R., 1998. Insulin regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression is rapamycin-sensitive and requires phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 14968–14974.
- Wang, F., Zhao, Y., Niu, Y., Wang, C., Wang, M., Li, Y., Sun, C., 2012. Activated glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with insulin resistance by upregulating pentose and pentosidine in diet-induced obesity of rats. *Horm. Metab. Res.* 44, 938–942.
- Wei, Y., Pagliassotti, M.J., 2004. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase: implications for hepatic insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, 926–933.
- Yang, S.J., Park, N.Y., Lim, Y., 2014. Anti-adipogenic effect of mulberry leaf ethanol extract in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr. Res Pract.* 8, 613–617.
- Yang, Z.R., Wang, H.F., Zuo, T.C., Guan, L.L., Dai, N., 2016. Salidroside alleviates oxidative stress in the liver with non-alcoholic steatohepatitis in rats. *BMC Pharm.* 14 (17–16).
- Yung, H.W., Hemberger, M., Watson, E.D., Senner, C.E., Jones, C.P., Kaufman, R.J., Charnock-Jones, D.S., Burton, G.J., 2012. Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction. *J. Pathol.* 228, 554–564.
- Zheng, J.L., Luo, Z., Zhuo, M.Q., Pan, Y.X., Song, Y.F., Hu, W., Chen, Q.L., 2014. 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.* 112, 698–708.
- Zhou, S.S., Li, D., Sun, W.P., Guo, M., Lun, Y.Z., Zhou, Y.M., Xiao, F.C., Jing, L.X., Sun, S.X., Zhang, L.B., Luo, N., Bian, F.N., Zou, W., Dong, L.B., Zhao, Z.G., Li, S.F., Gong, X.J., Yu, Z.G., Sun, C.B., Zheng, C.L., Jiang, D.J., Li, Z.N., 2009. Nicotinamide overload may play a role in the development of type 2 diabetes. *World J. Gastroenterol.* (155674-15584).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00064

Matrícula: 210380894

INFLUENCIA DE LA NICOTINAMIDA EN LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS DE NOVO EN HÍGADO GRASO: PARTICIPACIÓN DE LA GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 25 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ELIZABETH HERNANDEZ PEREZ
DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR
DR. ADAN VALLADARES SALGADO
DRA. REBECA GARCIA MACEDO
DRA. MARGARITA DIAZ FLORES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: SELENE ANGELES MEJIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



SELENE ANGELES MEJIA
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ELIZABETH HERNANDEZ PEREZ

VOCAL

DRA. LETICIA MANUEL APOLINAR

VOCAL

DR. ADAN VALLADARES SALGADO

VOCAL

DRA. REBECA GARCIA MACEDO

SECRETARIA

DRA. MARGARITA DIAZ FLORES