



**UCSC**

**MOB** | **UCSC**  
Magíster en Ciencias Biomédicas UCSC



**Facultad de  
Medicina**  
Universidad Católica de la Santísima Concepción

**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN**

**TESIS DE MAGISTER: EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE GLUT8 EN EL  
ADIPOCITO DEL TABE. EFECTOS DE DIETAS ALTAS EN FRUCTOSA.**

**POR:**

**Jorge Ferreira Bastías**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Tutor: Dra. Lorena Mardones Leiva  
Departamento de Ciencias Básicas.  
Facultad de Medicina  
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Cotutor: Dr. Reginald, del Pozo Iribarren.  
Departamento de Ciencias Básicas.  
Facultad de Medicina  
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Evaluador interno: Dr. Marcelo Villagrán Orellana  
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología  
Facultad de Medicina  
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Evaluador externo: Dr. Valeska Ormazabal Valladares  
Departamento de Farmacología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

**Concepción, Chile  
2024**

## Dedicatoria

*Cuando yo decía: Mi pie resbala, Tu misericordia, oh, Jehová, me sustentaba. En la multitud de mis pensamientos dentro de mí, Tus consolaciones alegraban mi alma.*

*Salmos 94:18-19.*

## **Agradecimientos.**

A Dios por su inagotable amor y fidelidad. Quien me levantó en cada momento que caí y me dio la sabiduría para poder afrontar este camino.

A mis padres, hermanos y sobrino por su alegría y ser una fuente de paz y refugio cuando todo se complicó. Además, por todo el esfuerzo, ánimo, comprensión y amor que han entregado en todo tiempo.

A mi tutora de tesis, Dra. Lorena Mardones Leiva, por su inagotable paciencia, compromiso, incluso en tiempos que no le correspondía atender mis solicitudes. Por su buena voluntad para explicar las veces que fuera necesario para comprender los diferentes temas y su perseverancia para ayudarme a concluir este proyecto de tesis.

A mi co-tutor de tesis, Dr. Reginald del Pozo Iribarren, por su aporte en conocimiento y ánimo durante el desarrollo de este trabajo.

A los revisores Dra. Valeska Órmazabal Valladares, quién fue mi docente en pregrado y aportó un grano de arena para interesarme en este campo, con su docencia dinámica, transformando lo complejo en algo fácil de comprender, y siempre con una gran empatía con sus alumnos.

Al Dr: Matias Hepp, por su perseverancia, su calidez humana, y por su siempre buena disposición a ayudar en lo que fuera posible. Por dar esa cercanía y confianza para resolver dudas y por su constante motivación y palabras de corrección.

Al Dr. Marcelo Villagrán, por tremenda calidad humana, su comprensión, sutileza y sabiduría para conversar situaciones complejas. Destaco su calidad de docencia y la claridad con que transmite su trabajo.

Al comité del magíster por tener consideración y comprender mi situación, dándome la oportunidad de poder continuar mi proceso formativo.

A Katia Muñoz, por su importante apoyo y guía durante la realización de diferentes experimentos, con una excelente voluntad para enseñar y apoyar el proceso formativo.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado, y a la Dirección de Postgrado de la Universidad Católica de la Santísima Concepción, por sus aportes económicos para llevar a cabo actividades asociadas a la presente investigación.

## Resumen

**Introducción:** Las DAF aumentan la expresión de GLUT8 en hepatocitos y activan la lipogénesis de novo, desarrollándose hígado graso; en tejido adiposo provocan hipertrofia e hiperplasia, pero se desconoce su efecto en GLUT8 de adipocitos.

**Objetivo:** examinar el rol de GLUT8 del adipocito del tejido adiposo epididimal (TABE) en los cambios del metabolismo lipídico inducidos por DAF en ratones macho Balb/C.

**Métodos:** Se trabajó con un grupo control de ratones y dos grupos con DAF (30%, F30 y 50% , F50) por 4 meses (n=3 c/u). Se registró glicemia y peso corporal mensualmente; test de tolerancia a la glucosa, glicemia, fructosemia y lípidos plasmáticos al término del tratamiento. En TABE se registró el peso total, el tamaño de los adipocitos, y la colocalización de GLUT8 con GLUT4, GLUT12, ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Alpha 1 y LAMP2.

**Resultados:** En F30 aumentaron los niveles séricos de colesterol total (97%), triglicéridos (88%), HDLc (78%), glucosa (50,1%), fructosa (81%) e insulina (3,9 veces). El peso del TABE aumentó 2,6 (F30) y 2,9 (F50) veces y el diámetro de los adipocitos 2,2 (F30) y 2,8 (F50) veces. La expresión de los transportadores fue GLUT4>GLUT8>>GLUT12 en los controles. Las DAFs aumentaron la expresión de GLUT4 (F30: 2,3 y F50: 2,5 veces) y GLUT8 (F30: 6,6 veces), disminuyeron la de GLUT12 (<1%) y aumentaron la colocalización de GLUT8 con LAMP2 en F30 y con ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Alpha 1 en F50.

**Conclusiones:** El fenotipo obesogénico inducido por las DAF se asocia con una mayor expresión de GLUT4 y GLUT8 en los adipocitos del TABE, y una movilización de GLUT8 al lisosoma y a la membrana plasmática. Es necesario dilucidar si esos cambios del adipocito se asocian con mayor captación de fructosa y/o glucosa, con hipertrofia, hiperplasia y lipogénesis y con el desarrollo de las alteraciones cardiometabólicas de la obesidad.

**Palabras Claves:** Alta fructosa, obesidad, TABE, GLUT8, lipogénesis.

## Abstract

**Introduction:** High Fructose Diets (HFDs) increase GLUT8 expression, activate de novo lipogenesis and contribute to fatty liver development. In fat tissue, they induce hypertrophy and hyperplasia, but the effect of HFDs in adipose GLUT8 is unknown.

**Objective:** to examine the role of GLUT8 in adipocytes of epididymal adipose white tissue (eTAB) in DAF-induced-lipid metabolism changes in male Balb/C mice.

**Methods:** We worked with a control group and two DAF groups (30%, F30 and 50%, F50) for 4 months (n=3 each group). Glycemia and body weight were recorded monthly, and a glucose tolerance test, glycemia, fructosemia and plasma lipid levels were measured at the end of the treatments. Total weight and diameter of eTAB adipocytes as well as colocalization of GLUT8 with GLUT4, GLUT12, ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Alpha 1 and LAMP2 were analyzed.

**Results:** The F30 treatment increased serum levels of total cholesterol (97%), triglycerides (88%), HDLc (by 78%), glucose (50.88%), fructose (81%) and insulin (3.9 times). The TABE weight increased by 2,6 (F30) and 2,9 times (F50) and the adipocyte diameter 2.2 (F30) and 2.8 times (F50). In control group, the expression of the transporters was found to be GLUT4>GLUT8>>GLUT12. However, HFDs increased the expression of GLUT4 (2,3 and 2,5 times) and GLUT8 (6.6 times in F30), decreased the expression of GLUT12 (<1%), and increased the colocalization of GLUT8 with LAMP2 in F30 and with ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Alpha 1 at F50.

**Conclusions:** The obesogenic phenotype induced by HFD is associated with increased expression of GLUT4 and GLUT8 in eTAB adipocytes, as well as the mobilization of GLUT8 at their lysosome and plasma membrane. It is necessary to elucidate whether these changes are associated with an increase in fructose and/or glucose uptake, hypertrophy, hyperplasia, lipogenesis as well as to the development of cardiometabolic alterations in obesity.

**Keywords:** High fructose, obesity, TABE, GLUT8, lipogenesis.

## Índice general

Agradecimientos.....	3
Resumen .....	4
Abstract.....	5
Índice de figuras. ....	8
Índice de Tablas.....	9
I. Introducción.....	10
1. Epidemiología de la obesidad.....	10
2. Absorción y metabolización de fructosa .....	13
2.Pregunta de investigación.....	21
3. Hipótesis .....	21
4. Objetivos.....	21
5. Materiales y métodos:.....	22
5.3 Determinaciones mensuales: .....	22
5.4 Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TTGIP): .....	22
5.5 Protocolo Quirúrgico:.....	22
5.6 Parámetros bioquímicos séricos: .....	22
5.6.1 Glicemia: .....	22
5.6.2 Fructosemia: .....	22
5.6.3 Insulina: .....	24
5.6.4 Triglicéridos: .....	24
5.6.5 Colesterol Total (CT): .....	24
5.6.6 Colesterol HDL (cHDL):.....	24
5.6.7 Colesterol LDL (cLDL):.....	24
5.7 Procesamiento TABE .....	24
5.8 Expresión de transportadores de glucosa GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en muestras histológicas .....	24
5.8.1 Preparación histológica: .....	24
5.8.2 Tinción por Hematoxilina-Eosina y análisis de diámetros y áreas de adipocitos	24
5.8.9 Tinción Inmunohistoquímica por Peroxidasa.....	25
5.8.5 Cultivo células HeLa: .....	25
5.8.4 Tinción por Inmunofluorescencia:.....	25
5.8.9 Tinción por Inmunofluorescencia en cultivos celulares: .....	26
5.9 Expresión de transportadores de glucosa a nivel de ARN mensajero .....	26

5.9.1 Obtención de ARN total y síntesis de cDNA: .....	26
5.9.2 PCR Convencional: .....	26
5.9.3 PCR cuantitativa en tiempo real: .....	29
5.10 Expresión de resultados y análisis estadístico: .....	29
6. RESULTADOS .....	31
6.1 Alteraciones antropométricas asociadas a dietas altas en fructosa.....	31
6.2 Alteraciones en niveles de carbohidratos séricos asociadas a dietas altas en fructosa .....	33
6.3 Alteraciones en los niveles de lípidos séricos asociadas a dietas altas en fructosa ....	35
6.4 Alteraciones del TABE asociadas a dietas altas en fructosa .....	37
6.5 Expresión de transportadores GLUTs en el TABE y sus alteraciones inducidas por dietas altas en fructosa.....	40
6.6 Localización sub-celular del transportador GLUT8 en el TABE y efecto de dietas altas en fructosa .....	46
7. DISCUSIÓN.....	50
7.1 Las dietas altas en fructosa favorecen el desarrollo de un fenotipo obesogénico en ratones BALB/c .....	50
7.2 Las dietas altas en fructosa provocan cambios en la expresión y localización de transportador GLUT8 en adipocitos del TABE de ratones Balb/C.....	55
8. REFERENCIAS: .....	60
9. Anexos.....	68
9.1. Anexo 1 .....	68
9.2 Anexo 2.....	69
9.3 Anexo 3 .....	70
9.4 Anexo 4.....	71

## Índice de figuras.

Figura 1. Mapas globales de consumo global de azúcar añadida e incidencia de obesidad .	11
Figura 2. Metabolismo de la fructosa y lipogénesis de novo en hígado, riñón, musculoesquelético y Tejido adiposo blanco.	19
Figura 3. Protocolo experimental de ratones BALB/c de 3 meses y dietas altas en fructosa.	23
Figura 4. Estandarización de inmunofluorescencia en TABE:	28
Figura 5. Efectos de dietas altas en fructosa en el peso corporal de ratones BALB/c.	32
Figura 6. Efectos de dietas altas en fructosa en carbohidratos plasmáticos de ratones BALB/c.	34
Figura 7. Efectos de dietas altas en fructosa en los niveles de lípidos séricos de ratones BALB/c	36
Figura 8. Efectos de dietas altas en fructosa en el peso del TABE de ratones BALB/c.	38
Figure 9. Efectos de dietas altas en fructosa en la histología del TABE de ratones BALB/c	39
Figura 10. Efectos de dietas altas en fructosa la expresión de ARNm de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TABE de ratones BALB/c:	41
Figura 11. Efectos de dietas altas en fructosa la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TABE de ratones BALB/c:	42
Figura 12. Efectos de dietas altas en fructosa la expresión de GUT4, GLUT8 y GLUT12 en TABE de ratones BALB/c:	43
Figura 13. Estudio de co-localización de GLUT8 con GLUT4 y GLUT12 en adipocitos de TABE de ratones BALB/c tratados con fructosa.	44
Figura 14. Cuantificación de la intensidad de expresión de GLUT8, GLUT4 y GLUT12 y de co-localización de GLUT8 con GLUT4 y GLUT12 en adipocitos de TABE de ratones BALB/c tratados con fructosa.	45
Figura 15. Estudio de co-localización de GLUT8 y ATPasa Na <sup>+</sup> /k <sup>+</sup> 1 Alpha en adipocitos de TABE de ratones BALB/c tratados con fructosa.	47
Figura 16. Estudio de co-localización de GLUT8 y LAMP2 en adipocitos de TABE de ratones BALB/c tratados con fructosa.	48
Figura 17. Cuantificación de co-localización de GLUT8 con ATPasa alfa 1 y LAMP2 en adipocitos de TABE de ratones BALB/c tratados con fructosa.	49
Figura 18. Resumen de efectos sistémicos de dietas altas en fructosa y en TABE de ratones BALB/c macho.	58
Figura 19. Resumen de efectos en la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 y localización de GLUT8 producido por dietas altas en fructosa en TABE de ratones BALB/c macho.	59
Figura S1 Controles (-) de la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TABE de ratones BALB/c:	68
Figura S2. Controles negativos de la expresión de GUT4, GLUT8 y GLUT12 en TABE de ratones BALB/c	69
Figura S3. Controles positivos y negativos de ATPasa Na <sup>+</sup> /k <sup>+</sup> Alpha 1, LAMP2, en células epiteliales de útero humano (HeLa).	70

## Índice de Tablas.

Tabla I. Transportadores Facilitativos de Hexosas (GLUTs) y los co-transportadores sodio-glucosa (SGLT).....	14
Tabla II. Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.....	27
Tabla III. Secuencias de primarios usada en PCR convencional y RT- qPCR.....	30

# I. Introducción

## 1. Epidemiología de la obesidad.

La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación excesiva de grasa, según rangos de índice de masa corporal definidos por la OMS y que resultan ser perjudiciales para la salud (OMS, 2014). En la actualidad, la prevalencia de sobrepeso y obesidad se ha triplicado desde 1975, lo que ha llevado a catalogarla como la nueva pandemia del siglo XXI (OMS, 2014). Al respecto, la OMS indica que, en la región de las Américas, el 62,5% de los adultos poseen sobrepeso u obesidad, mientras que en Chile, el 74% de la población sufre de obesidad o sobrepeso (OMS, 2014; ENS, 2016-2017). Dado que la obesidad es uno de los mayores factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiometabólicas, tales como, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico, dislipidemias, enfermedad coronaria, entre otro. Además, su mayor prevalencia se asocia con un aumento del riesgo de muerte prematura y/o discapacidad (Pérez-Campos *et al.*, 2020; Polizos *et al.*, 2021). La obesidad tiene su origen en diferentes factores de riesgo, siendo los principales: la genética, el sedentarismo y la mal nutrición por exceso. La mal nutrición por exceso resulta ser la causa más relevante de obesidad, y se define como un desbalance energético originado por un aumento en el consumo de calorías, sumado a un bajo gasto energético (Bray *et al.*, 2004). Actualmente, la ingesta calórica excesiva se ha relacionado con el consumo de alimentos ultraprocesados ricos en grasas saturadas y en azúcares simples (sacarosa y fructosa) y de porciones más grandes (Ozkan *et al.*, 2019).

En los últimos 50 años, el consumo de azúcares simples (glucosa, fructosa, sacarosa) se ha triplicado en todo el mundo (Lustig *et al.*, 2012). Este patrón es similar al de la prevalencia mundial de sobrepeso y obesidad de la OMS, Figura 1 (OMS, 2014). En Chile, en particular, se presenta un alto porcentaje de población con exceso de peso y nuestro país lidera el consumo de carbohidratos simples presentes en alimentos ultraprocesados, liderando el consumo mundial de bebidas azucaradas, con una ingesta cercana a las 200 Kcal per cápita al día (Petermann *et al.*, 2017).

El uso de la fructosa como el principal endulzante de la industria alimentaria ha generado un aumento en su consumo. La fructosa es un monosacárido que se encuentra de manera natural en frutas y la miel, pero también forma parte del disacárido sacarosa (junto con la glucosa) y está presente en el jarabe de maíz en partes iguales con la glucosa.

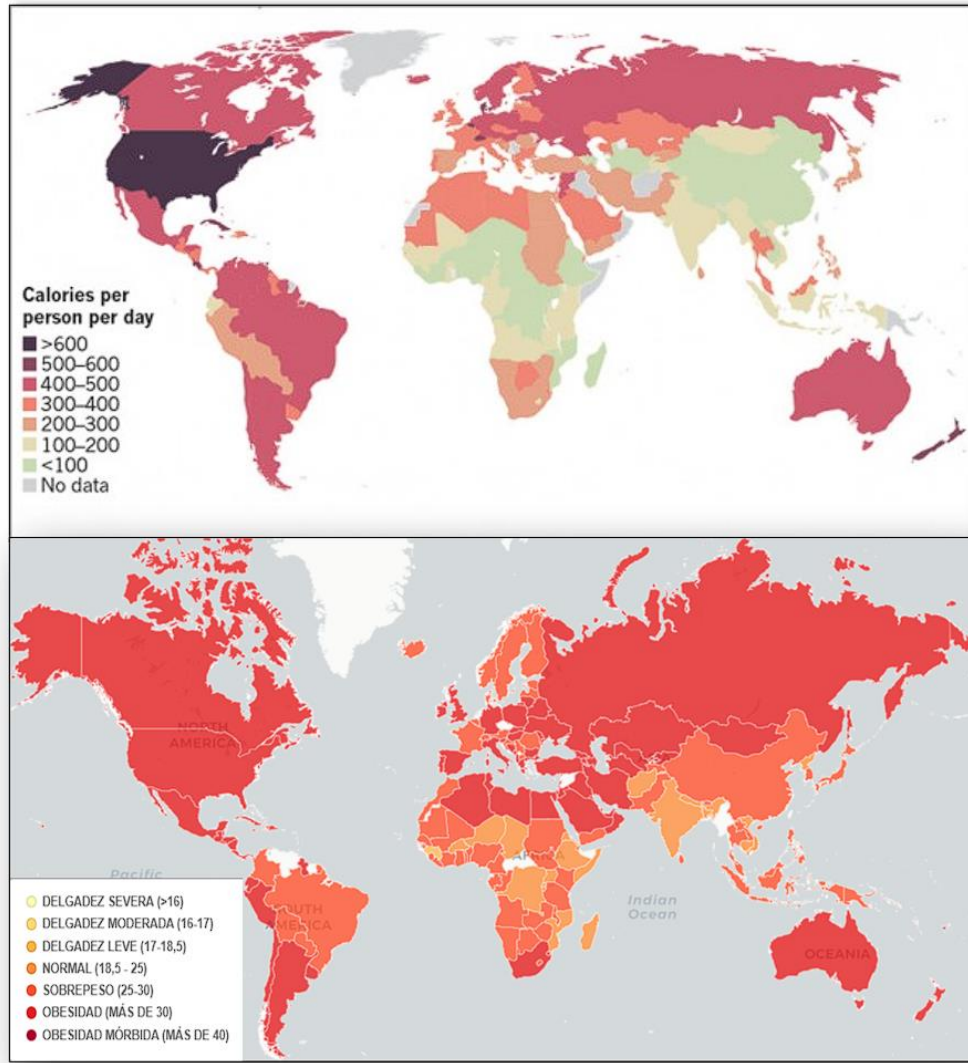


Figura 1. Mapas globales de consumo global de azúcar añadida (A) e incidencia de obesidad (B) (Lusting et al., 2012, OMS 2014).

Debido a la mayor capacidad endulzante de la fructosa, la industria alimentaria ha generado el jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), que posee 55% de fructosa (Lin, M., *et al.* 2016). Por ejemplo, en Estados Unidos, el consumo de fructosa, proveniente principalmente de bebidas azucaradas, ha llegado a superar las 600 Kcal/día (Lustig *et al.*, 2012). La situación resulta ser similar en Chile, el exceso en el consumo de fructosa se asocia con el consumo de bebidas azucaradas, que se ha triplicado desde 1956 (Petermann *et al.* 2017). Así lo evidencia también un estudio que develó que el consumo de fructosa en los adolescentes chilenos entre 12 y 18 años representa 19,7% de la ingesta calórica total equivalente a 397 Kcal, más de la mitad de las calorías aportadas por azúcares añadidos que se consumen por persona en EE.UU, llegando hasta 72,6 g/día (Farias *et al.*, 2020), lo que representa 47,6 g/día más que el consumo recomendado, que es de 25 g/día (Zago *et al.*, 2017). En línea con lo anterior, existe evidencia que asocia el consumo crónico y agudo de fructosa con el desarrollo de obesidad. Por ejemplo, el seguimiento por 8 años de una población estadounidense (3.682 participantes) evidencia que el consumo de tres bebidas endulzadas artificialmente por día se asocia con el doble de probabilidad de desarrollar obesidad/sobrepeso (Fowler *et al.*, 2008). Lamentablemente, el estudio no detalla el volumen consumido de las bebidas, que podría estar entre 250 y 750 ml. Adicionalmente, el estudio prospectivo de Framingham, que realizó un seguimiento durante 6 años sobre una cohorte de tercera generación, evidenció que los individuos que beben bebidas azucaradas a diario tenían un 29% más de Tejido Adiposo Blanco (TAB) visceral que los no consumidores (Ma *et al.*, 2016). Asimismo, cuando las bebidas endulzadas representaron 25% del requerimiento energético diario por un período de 10 semanas en sujetos estadounidenses con sobrepeso y obesidad (n=32), estos aumentaron la adiposidad visceral, lo que no se observó en sujetos que consumieron una bebida endulzada con glucosa isocalórica (Stanhope *et al.*, 2009). Por otro lado, al evaluar el efecto de JMAF en particular como aportante del 20% de la ingesta calórica en 28 pacientes diabéticos, se observó un aumento la producción de triglicéridos en el plasma e hígado, el perfil lipídico y el peso corporal (Bantle *et al.*, 1992). También existen varios estudios que relacionan el consumo alto en fructosa con la hipertensión arterial, la obesidad, la resistencia a la insulina y la diabetes (Ozkan *et al.*, 2019). En particular, dos meta-análisis basados en estudios de cohortes (n=310.819 y n=10.126.754) mostraron que las personas con una alta ingesta de bebidas azucaradas tienen un mayor riesgo de desarrollar obesidad, síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Malik *et al.*, 2010; Imamura *et al.*, 2015).

Por otro lado, también existe evidencia derivada de estudios animales, así por ejemplo, en ratas albinas Wistar machos, una dieta de fructosa al 27% por 90 días, produjo hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, predisponiendo al desarrollo de enfermedades cardiometabólicas e hígado graso (Jang *et al.*, 2022). Adicionalmente, otro estudio evidenció que en ratones Wistar machos, una dieta al 60% de fructosa durante 9 semanas, genera aumento del tejido adiposo visceral y aumento de TG, que se relacionan directamente con mayor riesgo de enfermedades cardiometabólicas (Bursác *et al.*, 2014)

## 2. Absorción y metabolización de fructosa

El metabolismo de azúcares es una de las principales vías de generación de energía que tienen los mamíferos. El organismo posee proteínas transportadoras específicas que regulan el ingreso y egreso de azúcares simples (glucosa, fructosa, galactosa), entre las que se encuentran los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs y los co-transportadores sodio-glucosa (SGLT). En la actualidad, se han identificado 15 miembros de la familia de transportadores de hexosas (GLUT 1-14 y HMIT), agrupados en 3 familias, según su estructura, especificidad y localización subcelular. Específicamente, los transportadores de la clase II (GLUT5, GLUT7, GLUT9 y GLUT11) son transportadores de fructosa, junto con GLUT2, de la clase I, y GLUT8 con GLUT12, de la clase III (Chadt, A, et al., 2020). Estos transportadores se han identificados en distintos tejidos, como se describe en la Tabla I.

**GLUT5:** es el principal transportador de fructosa a nivel intestinal, expresándose a nivel del borde cepillo de los enterocitos del intestino delgado. Por otro lado, GLUT5 también se expresa en tejido adiposo, renal, musculo esquelético, testículos y cerebro (Hernández *et al.*; 2019, Farias *et al.*, 2020). En adipocitos, GLUT5 se expresa principalmente durante la etapa de diferenciación de los preadipocitos, en donde se evidencia la sobreexpresión de hasta un 40% más de esta proteína cuando las células fueron cultivadas con 0,3 g/L de fructosa, como única fuente de carbohidratos (Legeza *et al.*, 2014). Asimismo, se ha descrito que adipocitos de ratas Zucker obesas aumentan 1,8 veces la expresión de GLUT5 y que se correlaciona con un aumento de 5 veces más en la captación de fructosa. Por otro lado, GLUT5 decrece su expresión en membrana plasmática hasta 12 veces en ratones obesos de mayor edad y con mayor resistencia a la insulina (Litherland *et al.*, 2004).

**Tabla I.**

**Transportadores Facilitativos de Hexosas (GLUTs) y los co-transportadores sodio-glucosa (SGLT)**

Clase	Proteína	Sustratos	Localización	Locus
I	GLUT1	Glucosa, galactosa, manosa, glucosamina y ácido deshidroascórbico	Eritrocitos, cerebro, barrera hematoencefálica	1p35-31.3
	GLUT2	Glucosa, galactosa, <b>fructosa</b> , manosa y glucosamina.	Hígado, intestino, cerebro, islotes de Langerhans, riñón	3q26.2-27
	GLUT3	Glucosa, galactosa, manosa y ácido deshidroascórbico	Neuronas, Testículos	12p 17.3
	GLUT4	Glucosa, xilosa, glucosamina y ácido deshidroascórbico	Tejido adiposo blanco, músculo cardíaco y esquelético	17p13
II	GLUT5	Fructosa	Intestino delgado, riñón	1p36.2
	GLUT7	Huérfano		1p36.2
	GLUT9 (GLUTX)	Urato	Riñón, hígado, placenta, intestino delgado, pulmón, leucocitos	4p15.3-16
	GLUT11 (GLUT10)	Glucosa, <b>fructosa</b> , ácido deshidroascórbico	Corazón, músculo esquelético	22q11.2
III	GLUT6 (GLUT9)	Glucosa	Cerebro, bazo, leucocitos	9q34
	GLUT8 (GLUTX1)	Glucosa, galactosa, <b>fructosa</b> , ácido deshidroascórbico	Testículos, cerebro, pulmón, glándulas adrenales, hígado, bazo, tejido adiposo pardo	9
	GLUT10	Glucosa, galactosa	Corazón, pulmón, hígado, cerebro, placenta, músculo esquelético, riñón, páncreas	20q12-13.1
	GLUT12	Ácido deshidroascórbico, Glucosa, <b>fructosa</b>	Corazón, músculo esquelético	6q 23.2
	HMIT (GLUT13)	Mio-inositol/H+	Cerebro, tejido adiposo	12q11.23
	GLUT14	Huérfano	Testículos.	12p13.3

Uldry, M., Thorens, B. 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflügers Arch.* 2004 Feb;447(5):480-9. doi: 10.1007/s00424-003-1085-0.

Adicionalmente, se ha descrito que la sobreexpresión de GLUT5 genera un aumento de la diferenciación de adipocitos de células 3T3-L1, mientras que su *knockdown* o el uso de un inhibidor específico de GLUT5 condujo a una menor diferenciación de adipocitos blancos (Du *et al.*, 2012). Otro estudio demostró que la hipoxia asociada con la proliferación de los adipocitos induce una mayor expresión de GLUT5, lo que sugiere que este transportador de fructosa generaría mecanismos locales que permiten la expansión del TAB (Wood *et al.*, 2007).

**GLUT8:** este transportador presenta afinidad tanto por glucosa como por fructosa y se ha asociado al transporte de fructosa en hepatocitos, al desarrollo de esteatosis hepática y a la síntesis de lactosa en el Golgi de las células mamarias (Lizák *et al.*, 2019, Mardones *et al.*, 2016). En hepatocitos, también sería responsable del 25% del transporte de glucosa, siendo GLUT2 el responsable del 75% restante (Chadt *et al.*, 2020).

En relación a la participación de GLUT8 en la regulación del metabolismo lipídico hepático en un contexto de alta fructosa, el estudio de Novelle *et al.*, 2021 evidenció que el silenciamiento de la expresión de GLUT8 en hepatocitos y células estrelladas hepáticas, reduce la lipogénesis y aumenta la omega oxidación de ácidos grasos. Estos hallazgos se confirman y complementan con los estudios DeBosch *et al.*, 2014 quienes encontraron respuesta similar al silenciamiento de GLUT8 en hepatocitos, pero, además, encontraron que su sobreexpresión generaba un aumento en la captación de fructosa y de la lipogénesis.

Además de la relación entre GLUT8 y el desarrollo de esteatosis hepática, la evidencia actual deja claro que la regulación de este transportador resulta sumamente compleja, dependiendo del tipo celular involucrado. Por ejemplo, en blastocito GLUT8 es capaz de translocar a membrana en respuesta a insulina y al factor de crecimiento similar a insulina (IGF1) (Pinto *et al.*, 2002). Por otro lado, en hígado, colon, riñón y cerebro, su expresión es regulada al alza en respuesta a alta glucosa/alta fructosa (DeBosch *et al.*, 2014; Sankar *et al.*, 2002) y en neuronas del hipocampo, responde a glucosa movilizándose desde Golgi a retículo (Widmer *et al.*, 2005). Además, en modelo de diabetes mellitus tipo II (hiperinsulinemia y normoglicemia), aumentan en forma moderada la expresión del GLUT8 en hígado (Gorovits *et al.*, 2003; Schiffer *et al.*, 2005), mientras que en hipoglicemia, disminuye su expresión en adipocitos y en células del epitelio coriónico de la placenta, no así en riñón ni en glándula mamaria (Schiffer *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005; Scheepers *et al.*, 2001; Limesad *et al.*, 2004).

Específicamente en tejido adiposo, se ha descrito la expresión de GLUT8, junto con GLUT1, GLUT4, GLUT5, GLUT10 y GLUT12. Cada uno de estos transportadores se expresaría en niveles distintos y en forma diferencial dependiendo de la localización del depósito de tejido adiposo blanco (Wood *et al.*, 2003; Scheepers *et al.*, 2001; Legeza *et al.*, 2014; Mardones *et al.*, 2021). Por otro lado, Scheepers *et al.*, 2001, en particular, señaló que GLUT8 se encuentra principalmente en testículos y en segundo lugar en TAB. Sumado a lo anterior, Lisinski *et al.*, 2001, describieron que en cultivo primario de adipocitos, GLUT8 no transloca a la membrana plasmática en respuesta a insulina, mientras que Scheepers *et al.*, 2001 encontraron que la deprivación glucosa reduce los niveles de ARNm de GLUT8 en células 3T3-L1 en forma tiempo-dependiente, hasta 64 h.

**GLUT12:** este transportador de glucosa/fructosa se ha descrito en enterocitos, células musculares, células renales, células epiteliales mamarias y adipocitos (Pujol *et al.*, 2013; Gil *et al.*, 2020). En las células epiteliales mamarias de glándula lactante se localiza a nivel basolateral y en enterocitos, en membrana apical. Interesantemente, en enterocitos se observa que el GLUT8KO aumenta la expresión de GLUT12 en membrana, y por consiguiente, la absorción de fructosa (DeBosch *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha descrito que la obesidad genera una disminución cercana al 70% de la expresión de este transportador en intestino, riñón, musculoesquelético y TAB (Gil *et al.*, 2020). En particular en adipocitos de TAB mesentérico, se ha descrito la localización peri nuclear de GLUT12 (Gil *et al.*, 2020). Además, se destaca que GLUT12 responde a insulina, translocando a membrana en el adipocito y responde a leptina y adiponectina, reduciendo su expresión en membrana plasmática (Gil *et al.*, 2019). Por otro lado, en el TAB visceral y en la línea de preadipocitos 3T3-L1, se describió que el TNF- $\alpha$  y la hipoxia aumenta la translocación de GLUT12 a la membrana plasmática (Gil *et al.*, 2019). En base a estos datos, se hipotetiza que GLUT12 contribuiría a modular la absorción de azúcar en condiciones fisiológicas, proporcionando soporte a GLUT4 en el tejido adiposo (Gil *et al.*, 2019). En esta línea, Wood *et al.*, 2003, estudiaron la expresión de GLUT4, GLUT10 y GLUT12 en TAB de distinta localización (TABE, tejido adiposo perirrenal (TABPr), mesentérico (TABMs), omental (TABOm) y subcutáneo blanco (TABSc); marrón interescapular). Los autores encontraron que estos transportadores pueden estar solo en los adipocitos, solo en el estroma o en ambos componentes del tejido. Adicionalmente, describieron que GLUT12 predomina en TABOm, TABPr y TABMs, pero se encuentra en muy baja expresión en TABE y TABSc. Por otro lado, GLUT4, predomina en TABPr, TABMs y TABSc, Sin embargo presenta baja expresión en TABOm omental y TABE (Wood *et al.*, 2003).

La metabolización de la fructosa depende de la concentración alcanzada a nivel intestinal. Si esta es inferior a 1 mM, la mayor proporción de fructosa se convierte en glucosa en los enterocitos, la cual se transportándose vía GLUT2 y llegando al hígado a través de la vena porta donde también es captada vía GLUT2. Por el contrario, si la concentración de fructosa intestinal aumenta por encima de 1mM, parte de esta pasa a la circulación portal, también siendo transportado por el GLUT2 de la membrana basolateral del hepatocito. Una vez en el hígado, es captada por GLUT2 y GLUT8, donde se metaboliza entre el 50 al 70% (Zhang *et al.*, 2017;Farias *et al.*, 2020). Adicionalmente, el resto de la fructosa circulante es absorbida y metabolizada por otros tejidos, como el riñón y el tejido adiposo, gracias a los distintos transportadores de fructosa que expresan (GLUT5, GLUT12) (Zhang *et al.*, 2017).

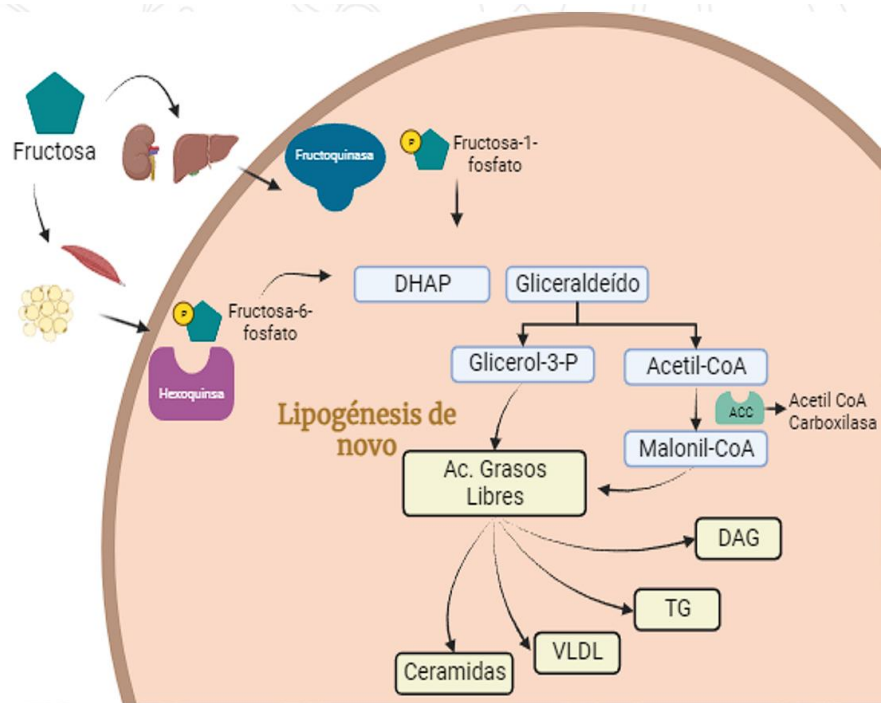
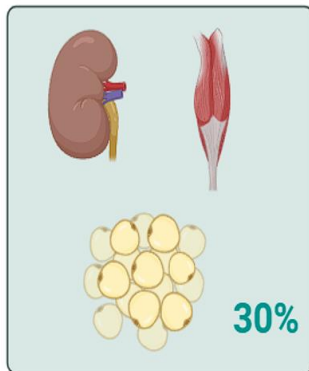
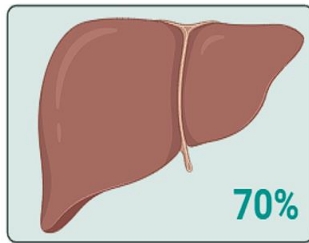
La concentración de fructosa plasmática que se logra alcanzar una vez ingerida, presenta un comportamiento distinto al de la glucosa, ya que esta última tiende a mantenerse estable, gracias a la regulación hormonal por insulina y glucagón. En este contexto, Farncey *et al.*, 2019, reportaron que en adultos sanos que ingirieron 30,4 g de fructosa, se alcanzó una concentración de fructosa en plasma en ayuna de  $17,9 \pm 0,6 \mu\text{mol/L}$ , con una concentración máxima de  $37,3 \pm 1,4 \mu\text{mol/L}$  a los 30 minutos, y de  $35.4 \pm 1.3 \mu\text{mol/L}$  a los 120 min fue de Adicionalmente, otro estudio demostró que la ingesta de 39,2 g de fructosa en una bebida con JMAF, aumentaba la concentración de fructosa de  $5,4 \mu\text{M}$  a  $363,4 \mu\text{M}$  en sangre venosa periférica, durante un periodo de 120 min (Le *et al.*, 2012). Por otro lado, un estudio preclínico, utilizando ratas Wistar mostró que una dosis de 2 g/kg de fructosa, provoca niveles plasmáticos entre  $20 \mu\text{M}$  y  $146 \mu\text{M}$ , hasta los 60 minutos (Sugimoto *et al.*, 2010). Así, en concreto, se ha aceptado que los niveles séricos de fructosa pueden alcanzar hasta  $550 \mu\text{M}$  (Hernández *et al.*, 2019).

Como se señaló, la metabolización de la fructosa se realiza principalmente en el hígado. Este proceso incluye una serie de reacciones metabólicas sucesivas, comenzando con la fosforilación de la fructosa por la enzima fructoquinasa C (FFK o hexokinasa C), produciendo fructosa-1-fosfato (F-1-P). Durante este paso se consume una importante cantidad de ATP, producto de que esta enzima no tiene retroalimentación negativa, como la glucoquinasa (Hernández *et al.*, 2019). Posteriormente, la acción de la enzima aldolasa B sobre F-1-P, genera fosfato de dihidroxiacetony gliceraldehído, que son utilizados por la triosa fosfato isomerasa en la gluconeogénesis. Además, el glicerol-3-P participa en la vía de lipogénesis *de novo*, generando Ácidos Grasos Libres (AGL) y Triglicéridos (TG). Una vez que los TG se han formado, son empaquetados en VLDL, asociados

a apolipoproteína B100 y liberados a la circulación (Zhang *et al.*, 2017). Por otro lado, el gliceraldehído puede formar acetil-CoA por una serie de reacciones, donde participan la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglicerato quinasa, la fosfoglicerato mutasa, la enolasa, la piruvato quinasa y la piruvato deshidrogenasa. La acetil-CoA puede ser utilizada tanto en la vía para la formación de AGL o TG, o ingresar al Ciclo del Ácido Tricarboxílico. Otra molécula intermediaria en la metabolización de la fructosa es la ceramida, que se genera desde el metabolismo del ácido palmítico (Zhang *et al.*, 2017) (figura 2).

En riñón, la metabolización de la fructosa sería similar, mientras que en el tejido adiposo y el músculo esquelético, la primera etapa la realizará la hexokinasa II (Burcelín, R., et al. 1993), generando fructosa-6-fosfato, la cuál puede convertirse en glucosa-6-fosfato y continuar su catabolismo en la ruta de la glucólisis y la lipogénesis (Legeza *et al.*, 2017). Al respecto, un estudio evidenció que una concentración de fructosa entre 1 y 5mM provocaba lipólisis y consumo de CO<sub>2</sub> en adipocitos de rata aislados, generando CO<sub>2</sub>, ácidos grasos y glicerol (Bellido *et al.*, 1978), lo que fue confirmado por Varma *et al.*, 2015, utilizando la línea celular de preadipocitos humanos provenientes de individuos con el Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel. En particular, la generación de acetil-CoA en el adipocito y en el musculoesquelético, se asocia también con la lipogénesis *de novo*, gracias a la acción de la enzima Acetil-CoA-Carboxilasa (ACC) (Legeza *et al.*, 2017; Richard *et al.*, 2020). En esta línea, Singh, describió que en ratones macho C57BL/6J sometidos a dietas altas en fructosa (60%) durante 10 semanas, genera acumulación de lípidos en TÁBE, acompañado con aumento significativo de factores de transcripción y enzimas que regulan la adipogénesis y la lipogénesis, tales como el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), la proteína de unión a elementos sensible a los carbohidratos (ChREB), la proteína 1 de unión a los elementos regulatorios de esteroides (SREBP-1c) junto con Ácido Grasos Sintasa (FAS) y Acetil CoA Carboxilasa (ACC) (Singh *et al.*, 2022). Por otra parte, para mantener la homeostasis sistémica, cuando hay un periodo de ayunas, por ejemplo, el adipocito activa el proceso de lipólisis, en dónde la enzima Lipasa Adipocítica de Triglicéridos (ATGL por sus siglas en inglés) tiene un rol fundamental al iniciar el proceso, el cual culmina con la liberación de AGL al torrente sanguíneo. (Zhang *et al.*, 2017).

### % Metabolismo fructosa



**Figura 2. Metabolismo de la fructosa y lipogénesis de novo en hígado, riñón, musculoesquelético y Tejido adiposo blanco.**

Proceso de metabolismo de la fructosa en hígado y tejido adiposo, muscular y renal. Se evidencia la modificación en el sitio de la fosforilación de la fructosa para ingresar a la célula. Además, se muestra lipogénesis *de novo* de los tejidos descritos y metabolitos resultantes inducidos por fructosa. ACC: Acetil CoA Carboxilasa; DHAP: Dihidroxiacetona Fosfato; DAG: Diacilglicerol; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad. TG: Triglicéridos. Diseñado en Biorender.com

En resumen, GLUT8 ha adquirido un rol importante en el metabolismo en los últimos años. Su función se ha esclarecido principalmente en el hígado en condiciones de alta fructosa, donde ha resultado ser un transportador clave en la lipogénesis *de novo*, y por ende, en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. Además, tiene efectos en la regulación de la captación de fructosa en enterocitos e hígado. Sin embargo, aun no se conoce con claridad su función y localización en otros órganos donde se expresa. Debido su capacidad para regular la lipogénesis en condiciones de alta fructosa, sumado al desarrollo de obesidad que produce el consumo elevado de fructosa, nace la necesidad de estudiar GLUT8 en el TABE.

## **2.Pregunta de investigación.**

¿Cuál es la participación de GLUT8 en las modificaciones del metabolismo lipídico inducidos por alta fructosa en adipocitos?

## **3. Hipótesis**

Existe asociación entre la expresión de GLUT8 en el adipocito y las modificaciones del metabolismo lipídico inducidos por alta fructosa.

## **4. Objetivos**

### **General**

Examinar el rol de GLUT8 del adipocito en los cambios del metabolismo lipídico inducidos por dietas altas en fructosa en ratones machos Balb/C.

### **Específicos**

1. Determinar los efectos de la dieta alta en fructosa a nivel sistémico en ratones machos Balb/C
2. Determinar los efectos de la dieta alta en fructosa en la localización y expresión de GLUT8 en los adipocitos del TABE *in vivo*.

## 5. Materiales y métodos:

### 5.1 Animales

Se utilizaron 9 ratones cepa BALB/c macho de 3 meses edad adquiridos desde el Instituto de Salud Pública de Chile. Los ratones se mantuvieron en Bioterio provisto de rack ventilado Ecoflo Allentown, bajo ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a 22°C y temperatura ambiente. Los animales se aclimataron por dos semanas antes de iniciar el tratamiento con acceso a agua y comida estándar (LabDiet) *ad libitum* (Del Pozo, R., et al, 2021). Los aspectos éticos del trabajo con animales fueron revisados por el comité de Ética, Bioética y Bioseguridad institucional (norma N° 48/ 2021), regido por las normas bioéticas de ANID.

### 5.2 Protocolo experimental:

Los ratones se separaron en 3 grupos, incorporando fructosa en el agua de bebida, según se detalla en la **Figura 3**. Las distintas concentraciones de fructosa (peso por porcentaje de volumen) fueron administradas en el agua de bebida.

**5.3 Determinaciones mensuales:** se controló el peso total y la glicemia de los 9 animales durante 4 meses. El peso se midió con balanza Adam Core balance CQT251. La glicemia se determinó en sangre venosa de la cola utilizando bandas reactivas y equipo Accucheck, expresando resultados en mg/dL.

**5.4 Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (TTGIP):** luego de 12 horas de ayuno, se les administró a los animales un bolo de 30 mg de glucosa intraperitoneal (equivalente a 1 g/kg peso). La glicemia se determinó en tiempo 0; 0,5; 1; 1,5 y 2 horas de la misma forma que la determinación de glicemia mensual. Los resultados se expresan en gráficos de glicemia *versus* tiempo y área bajo la curva para cada grupo (García *et al.*, 2013).

**5.5 Protocolo Quirúrgico:** Al finalizar el TTGI, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (2 mg/kg peso i.p). Posteriormente, se procedió a hacer un corte longitudinal por capas en el abdomen, exponiendo la cavidad abdominal. Se realizó extracción de sangre desde la vena cava inferior, prosiguiendo con la extracción total del TABE y el sacrificio del animal por sobredosis del anestésico.

**5.6 Parámetros bioquímicos séricos:** Se obtuvo suero de cada animal luego de reposo de la sangre obtenida por 30 minutos, seguido por centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos en Centrífuga Biofuge pico Heraeus Instruments. El suero se almacenó a -20°C para la posterior determinación de los parámetros séricos por métodos espectrofotométricos, usando un espectrofotómetro Riele 5010 V5+.

**5.6.1 Glicemia:** se determinó por método glucosa-oxidasa con kit Glucosa PAP Liquiform Labtest. Este método determina la generación de antipirilquinonimina por acción de la glucosa oxidasa sobre la glucosa, registrando absorbancia 490 nm. Los resultados se expresan en mg/dL.

**5.6.2 Fructosemia:** Se determinó por protocolo Roe modificado (Foreman, et al. 1973). 10 µL de suero y 90 µL de PCA 5% se centrifugaron a 10.000 rpm por 3 min para decantar y extraer el sobrenadante. A 50 µL del sobrenadante se agregaron 50 µL de resorcinol al 0,1% en etanol al 95%, y 150 µL de HCl 30% y se calentaron a 80°C por 1 hora. Se registró la absorbancia a 410 nm. Los valores de fructosemia se determinaron en relación a una curva de calibración realizada con concentraciones de fructosa entre 5 y 25 µg/mL. Los resultados se expresan en µg/dL.

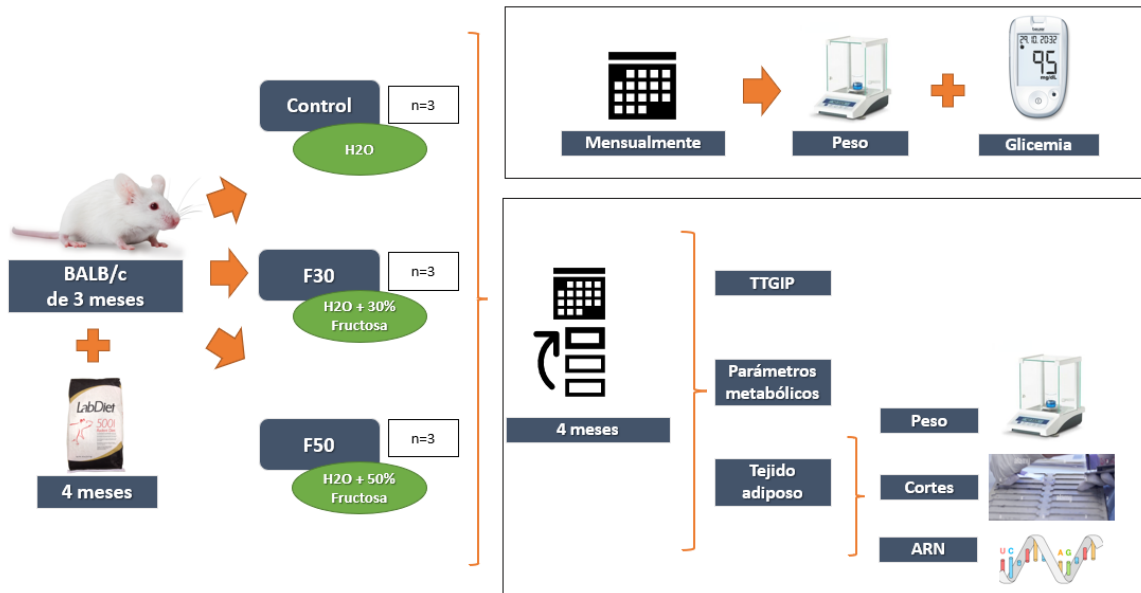


Figura 3. Protocolo experimental de ratones BALB/c de 3 meses y dietas altas en fructosa.

**5.6.3 Insulina:** se determinó usando el kit Rat/mouse Insulin Enzyme Linked-immunoassay sandwich EMD Milipore. La cantidad de proteína se detecta por reacción del Enzyme Conjugate con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, registrando absorbancia a 450 nm. Los resultados se expresan en ng/mL y se obtienen interpolando la absorbancia contra de curva estándar.

**5.6.4 Triglicéridos:** Se determinó por método enzimático por reacción de punto final con el kit Triglicéridos Liquiform Labtest. Inicialmente, la lipoproteína lipasa hidroliza los TAG a ácidos grasos libres y glicerol; éste último es convertido en glicerol-3-fosfato mediante la glicerol quinasa en presencia de ATP. El glicerol-3-fosfato formado es oxidado por la glicerol-fosfatasa-oxidasa, produciendo peróxido de hidrogeno. La acción de la enzima peroxidasa sobre el peróxido de hidrógeno en presencia de 4-aminoantipirina y 4-clorofenol, genera Quinoneimina, que se registra a 505 nm. Los resultados se expresan en mg/dL.

**5.6.5 Colesterol Total (CT):** Se determinó por método enzimático con Kit Colesterol Liquiform Labtest. El método inicia con la hidrolización de los ésteres de colesterol por la enzima colesterol esterasa a colesterol libre y ácidos grasos. El producto final de la reacción es antipirilquinonimina que tiene una absorbancia máxima a 500 nm. Los resultados se expresan en mg/dL.

**5.6.6 Colesterol HDL (cHDL):** Se determinó por método enzimático con Kit HDL Cholesterol Liquicolor. El método inicia con la destrucción de quilomicrones y colesterolos VLDL y LDL por reacción enzimática. Luego, se determina la fracción HDL a través de reacción de enzimas en presencia de surfactantes específicos para HDL. Luego se realiza registra la absorbancia a 590 nm. Los resultados se expresan en mg/dL.

**5.6.7 Colesterol LDL (cLDL):** Se determinó según la fórmula de Martin (Martin *et al.*, 2013) que considera valores estandarizados. El cálculo se basa en valores cHDL y TG. Los resultados se expresan en mg/dL.

**5.7 Procesamiento TABE:** se extrajo y se pesó el total del TABE de cada animal, para luego separar en 2 fracciones. Una, almacenada en ARN Later a -80°C, para realizar qPCR y otra, almacenada en paraformaldehído (PFA) 4%, para realizar los estudios inmunohistoquímicos e inmunofluorescencia .

## **5.8 Expresión de transportadores de glucosa GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en muestras histológicas**

**5.8.1 Preparación histológica:** Los tejidos fijados en PFA fueron incluidos en parafina, generando cortes de 5 µm. Para eliminar el PFA y deshidratar las muestras, se realizarán dos lavados con Xilol 2 veces por 5 min, 2 lavados de alcohol al 100% por 3 min, 1 lavado con alcohol 96% por 3 minutos, 1 lavado con alcohol al 80% por 3 minutos, 1 lavado con alcohol al 70% por 3 minutos, un lavado con agua corriente por 5 min y un lavado con PBS por 5 minutos.

### **5.8.2 Tinción por Hematoxilina-Eosina y análisis de diámetros y áreas de adipocitos**

En este caso, los cortes fueron teñidos con Hematoxilina de Mayer por 5 minutos y lavados con agua corriente por 15 minutos y con agua destilada 1 minuto 2 veces. Luego se realizó la tinción con Eosina al 0.2% en Agua durante 2 minutos. Para realizar la rehidratación de las muestras se procedió a realizar lavados con alcohol 96% por 20 segundos, alcohol 100% por 3 minutos 3 veces, xilol 10 min 2 veces. Las preparaciones fueron montar con Entellan, visualizadas en microscopio ZEISS Axiolab, y fotografiadas con cámara Omax A35140U, utilizando el software ToupView Versión 4.1 y aumento 40x y 100x. Para el procesamiento de las imágenes, se utilizó el software imageJ versión 1.53t calibrado con portaobjeto graduado Motic. Se realizaron mediciones de

áreas en  $\mu\text{m}^2$  de adipocito que mantuviera su estructura y morfología completa en el campo visual y se midió el perímetro mayor de cada adipocito, clasificándose en % de adipocitos pequeños ( $<30 \mu\text{m}$ ), % de adipocitos medianos ( $30$  y  $50 \mu\text{m}$ ) y % de adipocitos grandes ( $> 50 \mu\text{m}$ ).

**5.8.9 Tinción Inmunohistoquímica por Peroxidasa:** En este caso, luego de la deshidratación de los cortes, se realizó el bloqueo de peroxidasa endógena con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 5% en metanol por 15 minutos. Posteriormente, se permeabilizó con seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en PBS durante 3 horas a temperatura ambiente y se incubó con los distintos anticuerpos primarios diluidos en BSA 1% durante una noche en cámara humidificadas a  $4^\circ\text{C}$ , para luego lavar con tampón fosfato salino (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4) los portaobjetos durante 2 minutos 3 veces. Se prosiguió con la incubación en presencia del anticuerpo secundario correspondiente por 3 horas, seguido de lavado con PBS por 2 min 3 veces (Tabla 2).

Se realizó el revelado con diaminobenzidina (DAB) preparado con 1 gota de DAB en 1 ml de inmunodetector (Dako). Luego se incubó por 10 minutos en oscuridad, se dejó escurrir el DAB y se enjuagó con PBS, para posteriormente lavar con agua corriente por 5 minutos. Continuando, se sumergieron las preparaciones en agua destilada y se tiñó con Hematoxilina de Harris filtrada por 45 segundos, para obtener contratinción nuclear. Finalmente, se lavó en agua corriente por 5 minutos, se re-hidrataron las muestras, se montaron con Entellan y se visualizaron en el mismo microscopio que en el caso de las muestras teñidas con Hematoxilina- Eosina. Se tomaron fotografía con cámara Omax A35140U y software ToupView Versión 4.1 a aumento 10x, 40x y 100x.

**5.8.5 Cultivo células HeLa:** Se trabajó con línea celular HeLa que corresponden a células cancerígenas epiteliales de útero humanas para estandarizar el uso de anticuerpos de inmunofluorescencia. El cultivo se realizó en placas con medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 4 mM, bicarbonato de sodio 1,5 mg/mL y glucosa 4,5 mg/mL. A cada medio se le adicionó penicilina-estreptomicina 50 U/mL, y de ser necesario, Fungizona 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (anfotericina B 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , desoxicolato de sodio 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La incubación de todas las líneas celulares se realizó a  $37^\circ\text{C}$  en un ambiente de 5%  $\text{CO}_2$ .

**5.8.4 Tinción por Inmunofluorescencia:** El protocolo realizado incluye un bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente, seguido por una incubación con anticuerpos primarios durante una noche en cámara humidificadas a  $4^\circ\text{C}$ , y posterior lavado con PBS 3 veces durante 2 minutos. La incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes se realiza por 3 horas a temperatura ambiente, continuando con 3 lavados con PBS por 2 minutos, tinción con DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol, Vector Labs) y montaje con Fluomount-G (Electron Microscopy Sciences). Se utilizó anticuerpos contra GLUT4, GLUT8, GLUT12 y contra proteínas para identificar proteína asociada a lisosoma (LAMP2) para lisosomas; y la subunidad alfa de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , para detectar la membrana plasmática. El detalle de los anticuerpos y sus diluciones se presentan en la tabla II. Inicialmente, se realizó bloqueo con BSA al 1% en PBS durante 1 hora (figura 4A), pero debido a que se observó un alto grado de autofluorescencia, se exploraron distintas condiciones de bloqueos utilizando anticuerpo primario contra LAMP2 (1:100) y anticuerpo secundario Alexa-Fluor 594 donkey anti-rabbit (1:200) (Figura 4C-G). Dado que, junto con disminuir la autofluorescencia, se disminuía la inmunoreactividad, también se perfundió PBS al TABE recién extraído y se realizó recuperación antigénica de los cortes por inmersión durante 30 minutos en tampón citrato 0,01 M y pH 6,0 dentro de una vaporera Tristar Model FS-4000. Esta

última condición resultó ser la más adecuada, pues removió los glóbulos rojos del tejido, los principales causantes de la autofluorescencia.

Poteriormente, se realizaron las inmunotinciones de los transportadores de glucosa en TABE en forma independiente y las co-localizaciones de GLUT8 con GLUT4, GLUT12 y las proteínas de los distintos organelos. Las preparaciones se visualizaron en microscopio Nikon Eclipse E600 y se fotografiaron en microscopio multifotón espectral, LSM780 Zeiss del Centro de Microscopía Avanzada de la Universidad de Concepción.

**5.8.9 Tinción por Inmunofluorescencia en cultivos celulares:** células de cáncer cérvico-uterino humano (HeLa) fueron crecidas en medio Eagle modificado de Dulbecco con alta glucosa (pH 7.4), suplementado con 10% (v/v) suero bovino fetal y penicilina/estreptomicina (100 U/ml) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se realizó la inmunotinción para los distintos organelos a las 24 horas luego de sembrar 100.00 células sobre vidrios redondos de 12 mm en placas de 24 pocillos.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% preparado en PBS por 10 minutos, lavadas tres veces con PBS y permeabilizadas por 10 minutos en Tritón X-100 al 0,1%. Luego de tres lavados con PBS, las muestras se bloquearon por 1 hora con BSA al 1% e incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios anti ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, y LAMP2 según tabla II. Las preparaciones se fotografiaron en microscopio Nikon Eclipse E600 aumento 40 y 100x (ver anexo 2)

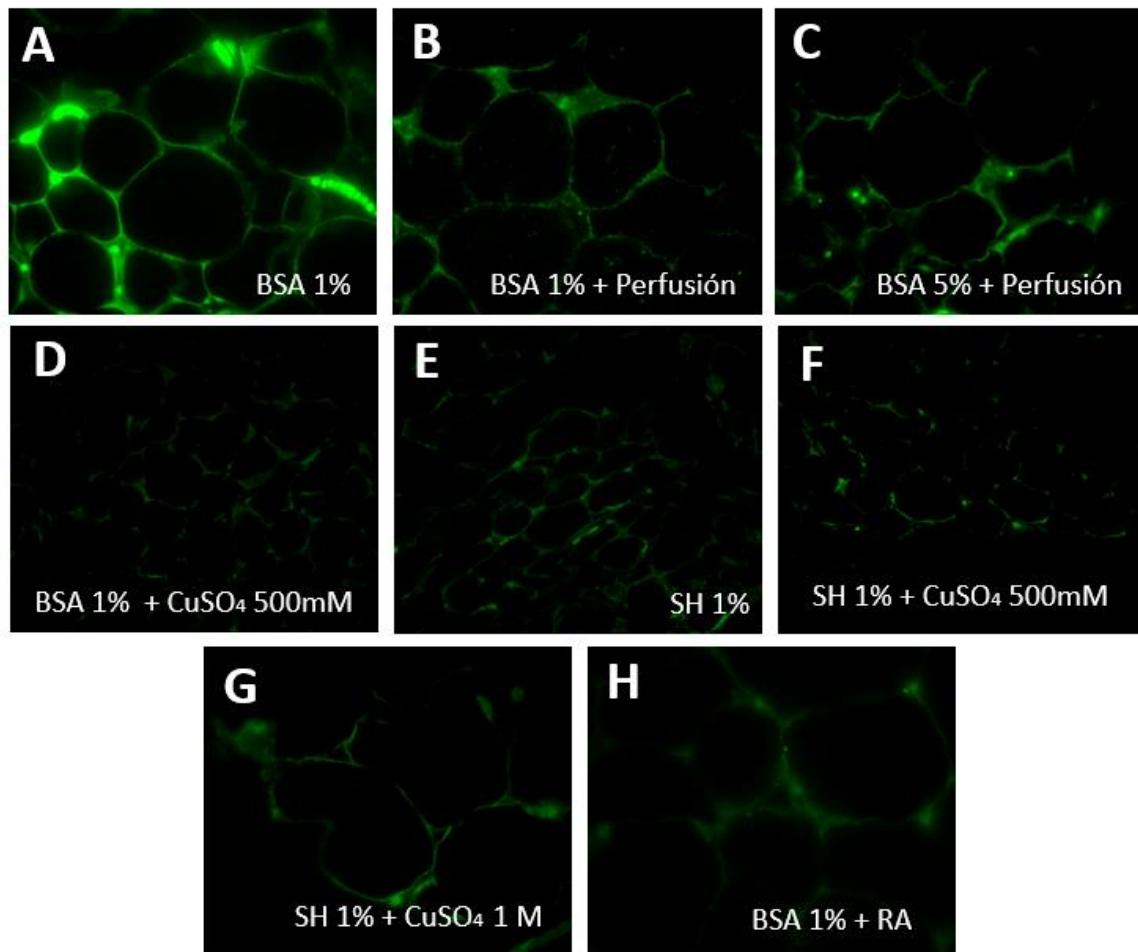
## **5.9 Expresión de transportadores de glucosa a nivel de ARN mensajero**

**5.9.1 Obtención de ARN total y síntesis de cDNA:** Para la obtención de ARN total, las muestras de TABE se mantuvieron congelada a -80°C. Se utilizaron 40 mg de tejido para aislar el ARN con minikit Absolutely RNA Miniprep (Agilent). Posteriormente se preparó el ADNc a través del kit de transcripción inversa AccuScript High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis, (Agilent).

**5.9.2 PCR Convencional:** Se utilizó 5 L del mix de polimerasa Sapphire Amp Fast (Takara), 0,3 µl de cada primers forward y reverse por cada gen, 3,6 µL de Agua libre de nucleasas. Los tubos se dividieron en control, F30, F50 y control negativo (sin ADNc). Los tubos fueron ingresados a termociclador marca MiniAmpPlus Thermal Cycler, por 60 minutos. Para estandarizar la reacción de PCR, se probaron 3 temperaturas de annealing: 50, 55 y 60°C. Para visualizar los productos de amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con 3 µL de intercalante Mastro Safe, (MaestroGen). Se utilizaron 3 temperaturas de 50, 55 y 60°C. En todos los casos se observó una expresión muy baja o expresión nula, por lo que se optó por realizar qPCR a temperatura de hibridación de 60°C, en base a la experiencia con la amplificación de otros genes.

**Tabla II.**  
**Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Compañía</b>	<b>Dilución Peroxidasa</b>	<b>Dilución Fluorescencia</b>
GLUT4	Millipore	1:200	1:200
GLUT8	Abnova	1:200	1:200
GLUT12	Abcam	1:200	1:100
Subunidad Alfa de la ATPasa Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> (ATPasa)	Novus Biological	--	1:100
Proteína asociada a lisosoma tipo 2 (LAMP2)	Proteintech	--	1:100
Alexa-Fluor 594 donkey anti-rabbit	Jackson	--	1:200
Alexa-Fluor 458 horse anti-goat	Jackson	--	1:200
Donkey anti-rabbit peroxidasa	Jackson	1:200	--
Horse anti-goat peroxidasa	Jackson	1:200	--



**Figura 4. Estandarización de inmunofluorescencia en TAFE:**

Se presenta inmunotinción utilizando anticuerpo primario LAMP2 y secundario conjugado con Alexa Fluor 594 en TAFE bajo diferentes condiciones. **A:** bloqueo con BSA 1%, sin perfusión; **B:** bloqueo con BSA 1%, perfusión con PBS; **C:** bloqueo con BSA 5%, perfusión con PBS; **D:** bloqueo con BSA 1% y  $\text{CuSO}_4$  500 mM, perfusión con PBS; **E:** bloqueo con SH 1% y perfusión con PBS; **F:** bloqueo con SH 1% y  $\text{CuSO}_4$  500 mM; **G:** bloqueo con SH 1% y  $\text{CuSO}_4$  1 M; **H:** bloqueo con BSA 1% y  $\text{CuSO}_4$  500 mM, perfusión con PBS y RA. TAFE: tejido adiposo epididimal, LAMP2: proteína lisosomal tipo 2; BSA: seroalbúmina bovina; SH: suero humano; RA: recuperación antigénica. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ .

Las muestras fueron corridas en presencia de 2  $\mu$ L de buffer de carga Purple Dy. La electroforesis se realizó en un equipo Major Science, con voltaje 130 v por 30 minutos

**5.9.3 PCR cuantitativa en tiempo real:** El RT qPCR se realizó con Sybr Select Master Mix (Applied Biosystems) en termociclador Quant Studio 3, Applied Biosystems Thermo Fisher Scientific. Los tubos se dividieron en control, F30, F50 y control negativo (sin ADNc) La expresión génica se determinó por el método de ciclo de umbral comparativo ( $\Delta\Delta$  CT) según, Bustin, 2009 (Bustin, S., *et al.* 2009). La secuencia de cebadores se presenta en la tabla siguiente (Tabla III).

**5.10 Expresión de resultados y análisis estadístico:** los resultados se representan como promedio  $\pm$  desviación estándar ( $X \pm SD$ ). El análisis estadístico de los resultados fue realizado usando el test one-way ANOVA con Dunnet's post hoc Tukey test. Valores de  $p < 0,05$  y  $< 0,01$  se consideraron como significativos (\*) y altamente significativos (\*\*), respectivamente. Para el caso de determinación de tamaño/área celular, se procesaron 10 campos por muestras, seleccionando 5 diferentes campos para cada muestra. Para el caso de las colocalizaciones, intensidad de fluorescencia y determinación de tamaño/área celular, se procesaron 10 sectores de diferentes campos para cada muestra, determinando el coeficiente de co-localización de Pearson utilizando el programa ImageJ. Para ese caso, se utilizaron 4-10 ROI donde existiera expresión de GLUT8.

**Tabla III.**  
**Secuencias de partidores usada en PCR convencional y RT- qPCR.**

<b>N°</b>	<b>Gen</b>	<b>Partidor (sentido 3' a 5')</b>	<b>Tamaño producto (pb)</b>
1	GLUT8	F: TCTTCATTGCTGGCTTTGCG	179
		R: AGATGCTCAGACCCTACGGT	
2	GLUT4	F: CACTAGATCCCGGAGAGCCT	165
		R: TTATTGCAGCGCCTGAGTCT	
3	GLUT12	F: GGAGCTAGCAAAGGCCGA ACT	144
		R: CTGTGTGGAAGGGGACAGTC	
4	BACTINA	F:AGCCATGTACGTAGCCATCC	227
		R: TTCACCACCACAGCTGAGAG	

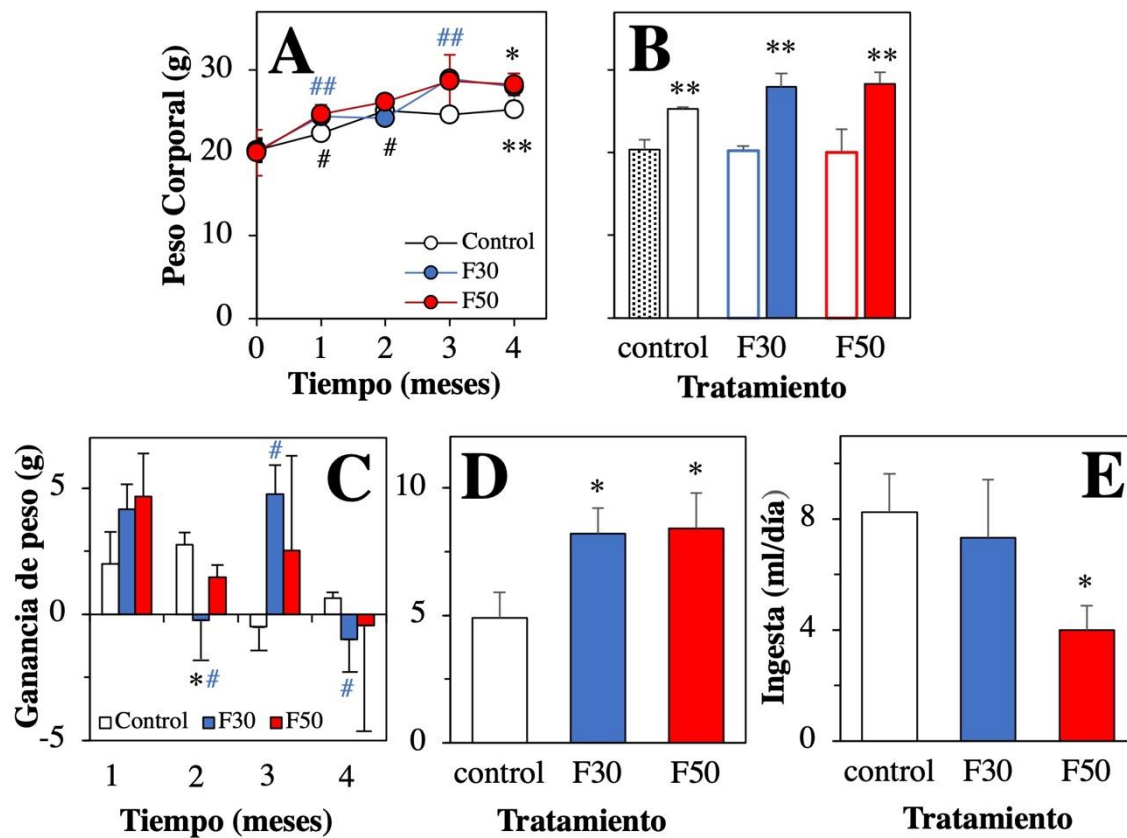
Las secuencias de los partidores se presentan en el sentido 5'→3'. GLUT: transporatdor facilitativo de glucosa, F: partidor sentido, R: partidor antisentido, pb: pares de bases. GLUT8: Glucose Transporter 8; GLUT4: Glucose Transporter 4; GLUT12: Glucosa Transporter 12.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Alteraciones antropométricas asociadas a dietas altas en fructosa

Para conocer los efectos sistémicos del tratamiento de 4 meses con alta fructosa en ratones BALB/c, se realizaron mediciones antropométricas mensualmente. En el registro del peso mensual, se observa una tendencia al alza tanto en el grupos control, como en los grupos tratados con fructosa al 30 y al 50 % (F30 y F50) (Figura 5A). Se observa una tendencia a ganar peso durante todo el tratamiento en los tres grupos experimentales, que resultó ser significativa a 1 y 2 meses para el grupo control ( $p < 0,05$ ) y altamente significativa para 1 y 3 meses en el grupo F30 ( $p > 0,01$ ). Por otro lado, al comparar las diferencias entre grupos en cada mes de tratamiento, ambos grupos tratados con fructosa presentaron diferencias con respecto al grupo control al 4 mes de tratamiento ( $p < 0,01$  para F30 y  $p < 0,05$  para F50). Además, al analizar la diferencia entre el peso corporal al inicio y al término del tratamiento, se aprecia una ganancia de peso significativa en los tres grupos experimentales (Figura 5B,  $p < 0,01$ ). Complementariamente, se representan los datos como ganancia de peso mensual (Figura 5C). Junto con observar distinto comportamiento entre grupos y dentro del mismo grupo, para el grupo F30 hubo diferencia en la ganancia de peso entre el primer y el segundo mes de tratamiento, entre el segundo y el tercero y entre el tercero y el cuarto ( $p < 0,05$ ) y con respecto al grupo control entre el primer y segundo mes ( $p < 0,05$ ). Al determinar la ganancia de peso durante el tiempo total de tratamiento, los grupos F30 y F50 presentaron diferencias significativas con el grupo control (Figura 5D,  $p < 0,05$ ).

Complementando el registro y análisis de peso corporal, se evaluó el consumo de líquido diario promedio durante el primer mes de tratamiento en los tres grupos experimentales. En este caso, se observó que los animales alimentados con fructosa al 50% ingiere significativamente menos volumen de líquido que el grupo control ( $4,0 \pm 0,9$  v/s  $8,2 \pm 1,4$ ) ( $p > 0,05$ ) (Figura 5E).



**Figura 5. Efectos de dietas altas en fructosa en el peso corporal de ratones BALB/c.**

A: Peso corporal mensual; B: Peso corporal al término del tratamiento; C: Ganancia de peso corporal mensual; D: Ganancia de peso corporal al término del tratamiento; E: Promedio de consumo diario de líquido, \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ , significativo con respecto al grupo control a igual mes de tratamiento; #  $p < 0,05$ , significativo con respecto a mes anterior en grupo control, # y ##, significativo ( $p < 0,05$ ) y altamente significativo ( $p < 0,01$ ) respecto a mes anterior del mismo grupo (F30). Los valores son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n=3$ . F30: fructosa al 30%, F50: fructosa al 50%.

## 6.2 Alteraciones en niveles de carbohidratos séricos asociadas a dietas altas en fructosa

Para conocer el efecto de las dietas altas en fructosa sobre los niveles de carbohidratos simples en ratones BALB/c, se evaluaron los niveles de glicemia mensualmente y los niveles de glicemia y fructosemia al final del tratamiento. Además, para estudiar el posible efecto de las dietas alta en fructosa en la regulación de la glicemia y desarrollo de resistencia a insulina, se realizó un test de tolerancia a la administración de 30 mg de glucosa intraperitoneal al final del tratamiento (TTGI) y determinación de niveles de insulina.

En la Figura 6A se observa que los niveles de glicemia presentaron un rango entre 84,5 y 136,5 mg/dL, pero sólo resultaron significativamente alterados en el grupo F50 al comparar el cuarto mes de tratamiento con respecto al control ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, al medir los niveles de glicemia al final del tratamiento, se observa que el grupo F30 presenta un aumento significativo de la glicemia con respecto al grupo control ( $251,4 \pm 86,5$  mg/dL v/s  $127,7 \pm 37,2$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) (Figura 6B). También los niveles de fructosa resultaron significativamente aumentados en el grupo F30 ( $16,5 \pm 0,71$  mg/dL v/s  $20,3 \pm 1,25$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) (Figura 6C).

Finalmente, los resultados del TTGI evidencian un comportamiento similar en los tres grupos experimentales, observando un valor máximo de  $159,3 \pm 47,4$  mg/dL a los 30 minutos post-inyección de glucosa (Figura 6D), Sin cambios significativos en todo el test. Por otro lado, al graficar el área bajo la curva generada por el TTGI, no se observaron diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos experimentales (Figura 6E). En relación a los niveles de insulina séricos, se observó aumento de 3,9 y 3,2 veces el grupo control para las condiciones F30 y F50, respectivamente ( $p < 0,01$  y  $p < 0,05$ ) (Figura 6F).

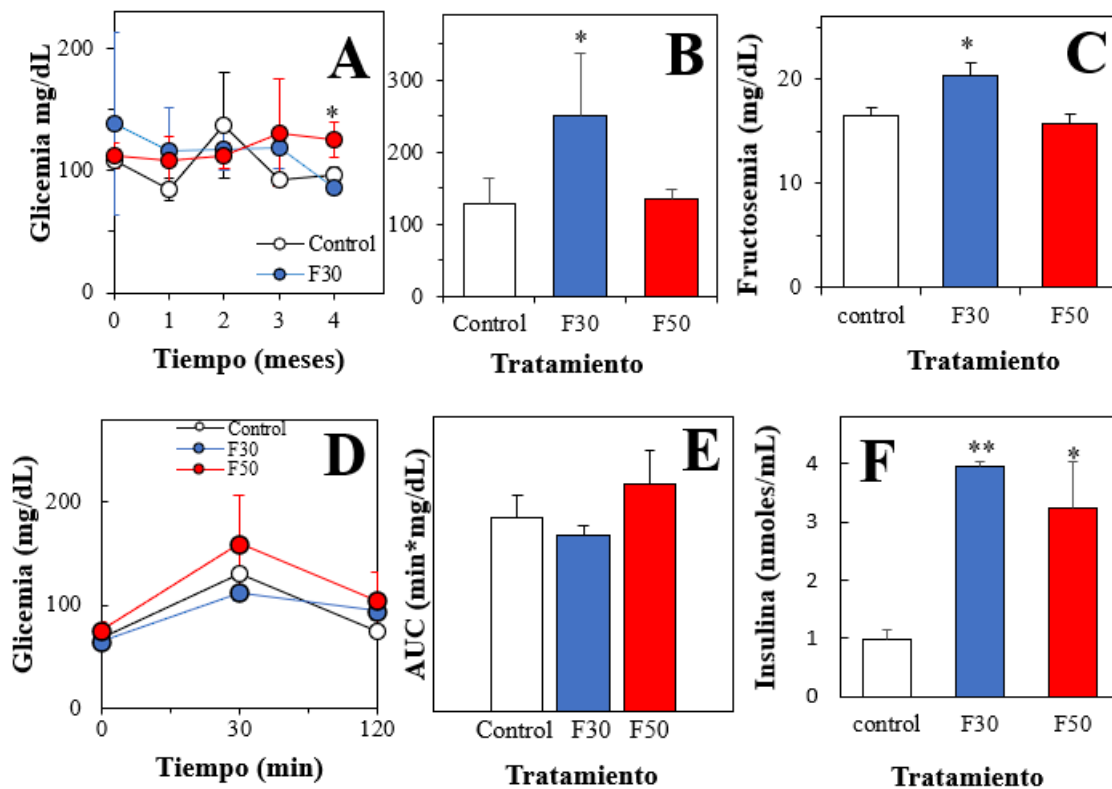


Figura 6. Efectos de dietas altas en fructosa en carbohidratos plasmáticos de ratones BALB/c.

A: Niveles de glicemia mensual; B: Niveles de glicemia al final de tratamiento; C: Niveles de fructosemia al final de tratamiento; D: Test de tolerancia a glucosa intraperitoneal al final de tratamiento; E: Área bajo la curva del test de tolerancia a glucosa intraperitoneal. F: Niveles de insulinemia final de tratamiento. \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . Los valores son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n=3$ . F30: fructosa al 30%, F50: fructosa al 50%, ABC: área bajo la curva.

### **6.3 Alteraciones en los niveles de lípidos séricos asociadas a dietas altas en fructosa**

Para conocer el efecto de las dietas altas en fructosa sobre el metabolismo lipídico en ratones BALB/c, se evaluaron los niveles de triglicéridos (TG), colesterol total (CT), colesterol HDL (cHDL) y colesterol LDL (cLDL) en plasma al final del tratamiento.

En la Figura 7 se observa que el grupo F30 presentó un aumento significativo en los niveles séricos de TG, CT y cHDL con respecto al grupo control. Para el caso de los niveles de TG, el aumento fue de 97% ( $49,7 \pm 23,7$  v/s  $26,0 \pm 8,5$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) (Figura 7A). Por su parte, los niveles de CT aumentaron un 88% ( $101,7 \pm 6,4$  v/s  $63,5 \pm 7,8$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) (Figura 7B), mientras que los niveles de cHDL aumentaron un 78% ( $33,0 \pm 1,4$  v/s  $58,3 \pm 6,5$  mg/dL,  $p < 0,05$ ) (Figura 7C). No se encontraron diferencias significativas en el caso de los valores de cLDL (Figura 7D).

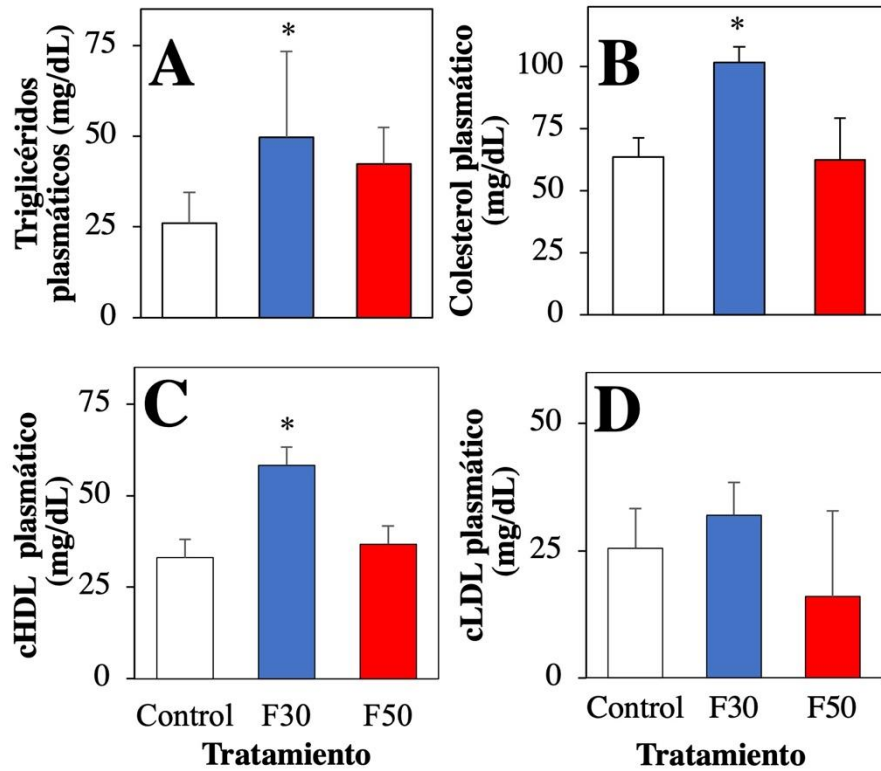


Figura 7. Efectos de dietas altas en fructosa en los niveles de lípidos séricos de ratones BALB/c

A: Niveles séricos de triglicéridos; B: Niveles séricos de colesterol total; C: Niveles séricos de colesterol HDL; D: Niveles séricos de colesterol LDL. \*  $p < 0,05$ . Los valores son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar con  $n=3$ . F30: fructosa al 30%, F50: fructosa al 50%, cHDL: colesterol HDL y cLDL: colesterol LDL.

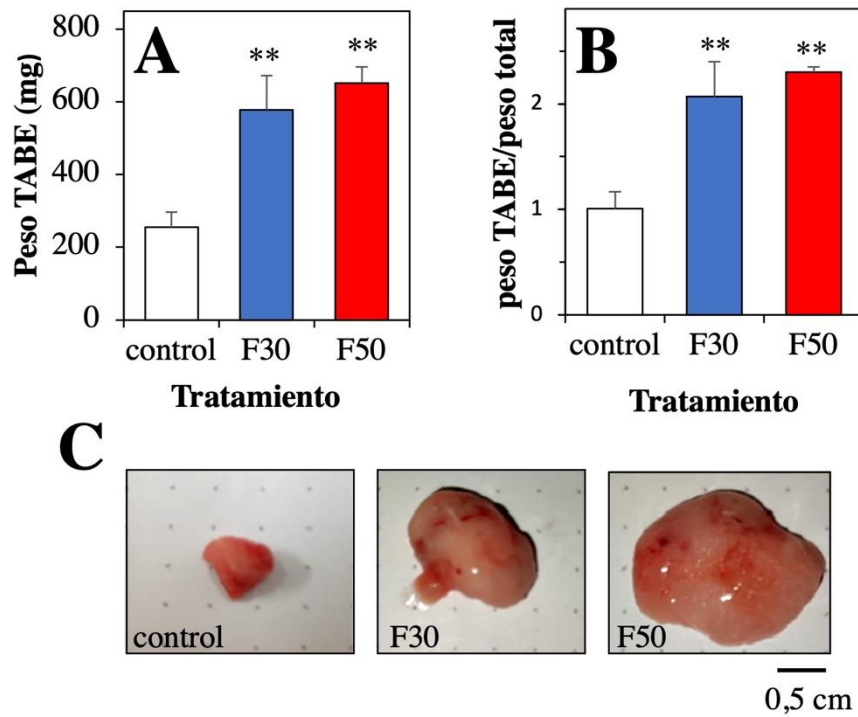
#### 6.4 Alteraciones del TAFE asociadas a dietas altas en fructosa

Para conocer los efectos del tratamiento de 4 meses con alta fructosa en el tejido adiposo de ratones BALB/c, se analizó registró el peso total del TAFE al finalizar el tratamiento con fructosa al 30 y 50% y su histología.

El registro del peso del TAFE completo evidencia un alza significativa en ambos grupos tratados con fructosa con respecto al grupo control ( $p<0,01$ ) (Figura 8A). Este aumento alcanzó 1,26 veces para el grupos F30 y 1,55 veces para el grupo F50.

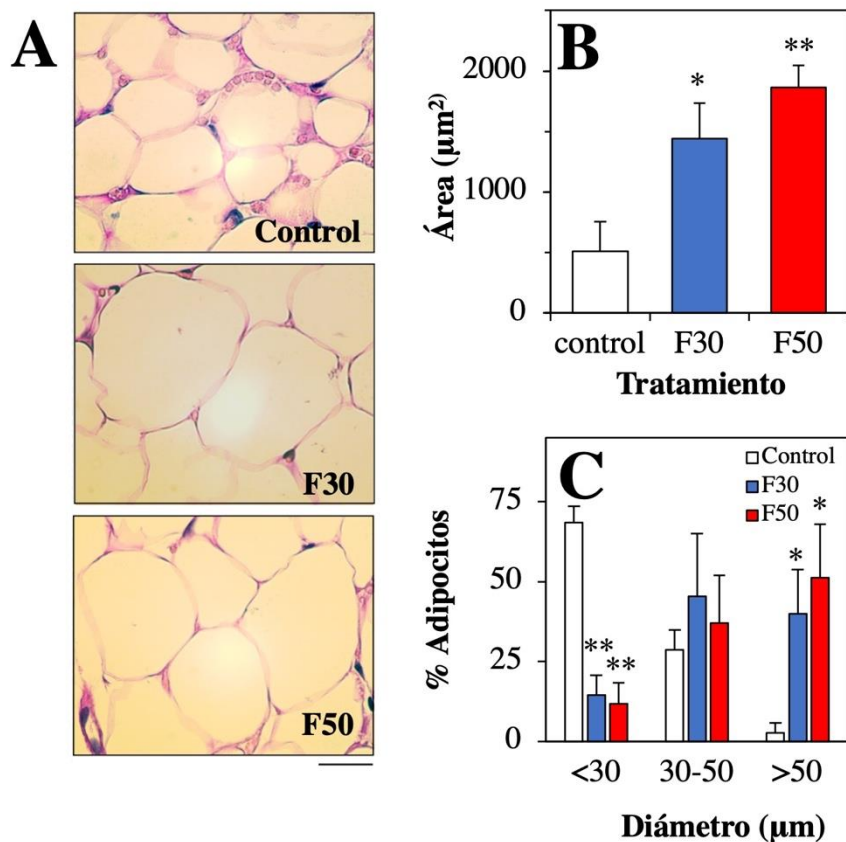
Junto con el registro de peso del TAFE, se determinó el porcentaje del TAFE en relación al peso corporal total al final el tratamiento (Figura 8B). En este caso, se observó que en el grupo control el TAFE representa el  $1,01\pm 0,16\%$  del peso corporal, mientras que en los grupos F30 y F50, este representa el  $2,07\pm 0,33$  y  $2,30\pm 0,05\%$ , respectivamente ( $p<0,01$ ). Este aumento en la proporción TAFE/peso corporal representa un incremento de 1,0 y 1,3 veces para los grupos F30 y F50, respectivamente. El aumento del tamaño del TAFE también se evidencia en la Figura 8C, que presenta las fotografías de una muestra representativa del TAFE en los tres grupos.

En forma complementaria, se analizó la microestructura del TAFE mediante análisis de cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina. Las microfotografías presentadas en la figura 9A evidencian que las dietas altas en fructosa F30 y F50 provocan un aumento significativo del tamaño de los adipocitos del TAFE expresado como área celular promedio, que representa un aumento aproximado de 2,8 y 3,2 veces respectivamente ( $p<0,01$ , Figura 9B). Como una forma de analizar en mas detalle la distribución del tamaño celular en las tres condiciones, se realizó también una clasificación de los adipocitos por tamaño, considerándolos pequeños (diámetro  $<30\ \mu\text{m}$ ); medianos (diámetro entre 30 y  $50\ \mu\text{m}$ ); y grandes (diámetro  $>50\ \mu\text{m}$ ). En la figura 9C se evidencia que en los grupos F30 y F50 disminuye el porcentaje de adipocitos pequeños con respecto al grupo control ( $p<0,01$ ), y que a su vez presentan significativamente mayor porcentaje de adipocitos grandes ( $p<0,05$ ).



**Figura 8. Efectos de dietas altas en fructosa en el peso del TBE de ratones BALB/c.**

A: Ganancia total de peso TBE; B: Relación entre peso TBE y peso corporal al final del tratamiento. C: Fotos de TBE total. \*\*  $p < 0,01$ . Los valores son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar en A y B con  $n=3$ . En C se presenta una muestra representativa del TBE completo para cada grupo. TBE: Tejido adiposo blanco epididimal, F30: fructosa al 30%, F50: fructosa al 50%.



**Figure 9. Efectos de dietas altas en fructosa en la histología del TAFE de ratones BALB/c**

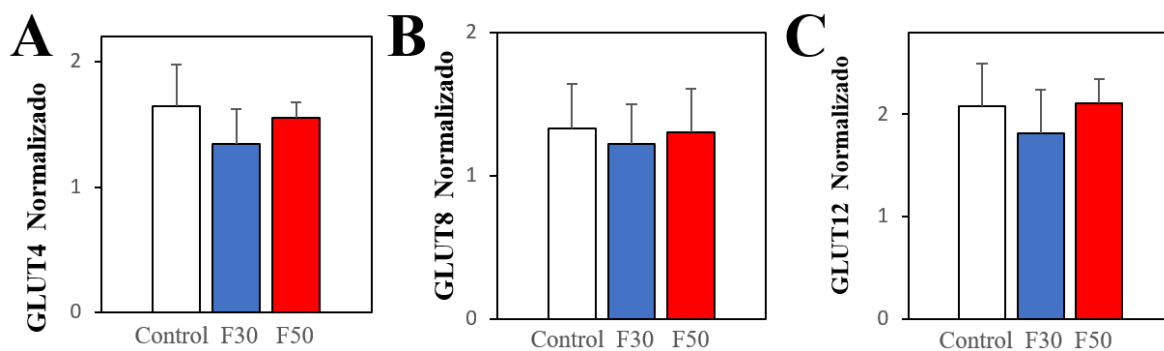
A: Microfotografías representativas de microscopía óptica con tinción de Hematoxilina-Eosina, barra 100  $\mu\text{m}$ ;  
 B: Porcentaje de adipocitos según diámetros, pequeño (<30  $\mu\text{m}$ ), medianos (30-50  $\mu\text{m}$ ) y grandes (>50  $\mu\text{m}$ ) en los 3 grupos experimentales. Los valores son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar, con n=3 por grupo y contabilizando 100 células por muestra en B y C (n=3 por grupo). \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ . F30: fructosa al 30%, F50: fructosa al 50%.

## 6.5 Expresión de transportadores GLUTs en el TABE y sus alteraciones inducidas por dietas altas en fructosa

Para evaluar las posibles alteraciones inducidas por las dietas altas en fructosa en la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en el TABE, se realizó RT-qPCR y ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para los tres transportadores.

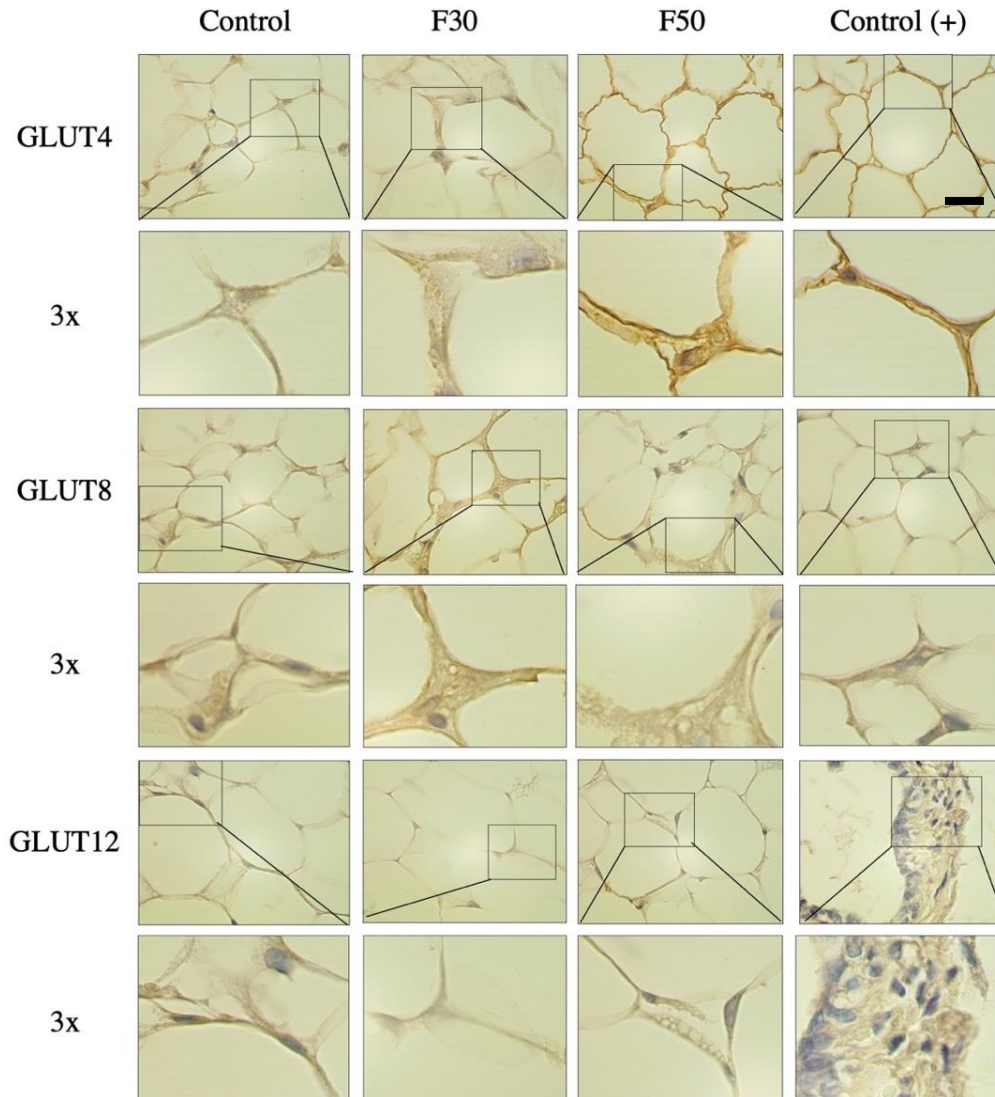
Los análisis de RT-qPCR revelan que los tres transportadores son expresados en niveles similares en los adipocitos del TABE, sin presentarse diferencia entre grupos (Figura 10). La inmunohistoquímica muestran un comportamiento diferencial complejo (Figura 11). En general, la expresión fue GLUT4>GLUT8>>GLUT12, aunque en F30 los niveles de GLUT8 fueron mayores que los de GLUT4, y los de GLUT12, menores a los de las otras condiciones. En los tres casos, el patrón de expresión predominantemente citoplasmático, aunque para GLUT4 en F50 y GLUT8 en F30 también se observa expresión hacia la periferia de la célula.

En los ensayos de inmunofluorescencia, se observa un patrón de expresión similar al de los estudios de inmunohistoquímica (GLUT4>GLUT8>>GLUT12, Figura 12). Para GLUT4, en F30 se observa aumento en intensidad y células teñidas, mientras que para F50, aumenta la intensidad y disminuyen las células teñidas. Para GLUT8, aumenta la intensidad de reactividad en zonas celulares discretas para F30 y F50, mientras que, para GLUT12, disminuyen las células teñidas en F30 y F50, pero su intensidad es mayor. El patrón de expresión es predominantemente puntiforme, con presencia en la periferia celular en ciertos casos (GLUT4 en F50, GLUT8 en F30 y GLUT12 en F50). Para analizar la co-localización de GLUT8 con GLUT4 y GLUT12, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con doble marcaje. En las Figura 13, se observa que GLUT8 co-localiza moderadamente con GLUT4 en el grupo control, sin embargo, en la condición F30 y F50 co-localiza fuertemente con ambos, teniendo un aumento significativo en su co-localización en el grupo F50. En relación con GLUT12, GLUT8 co-localiza fuertemente en los 3 grupos, teniendo un aumento significativo en el grupo F50. El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia revela que GLUT4 aumenta 2,3 veces en F30 y 2,5 en F50 ( $p<0,01$ ) y GLUT8 6,6 veces en F30 ( $p<0,01$ ), mientras que GLUT12 disminuyó a menos del 1% en F30 y F50 (Figura 14A). Por otro lado, el análisis de co-localización de GLUT8 revela valores de coeficiente de Pearson en el grupo control de  $0,474 \pm 0,09$ ; F30:  $0,564 \pm 0,027$  y F:50:  $0,694 \pm 0,096$ , para GLUT4. Para GLUT12 revela valores de coeficiente de Pearson para el control de  $0,604 \pm 0,488$ ; F30:  $0,652 \pm 0,116$  y F50:  $0,748 \pm 0,047$ , indicando mayor co-localización en F50 en ambos casos (Figura 14B y 14C).



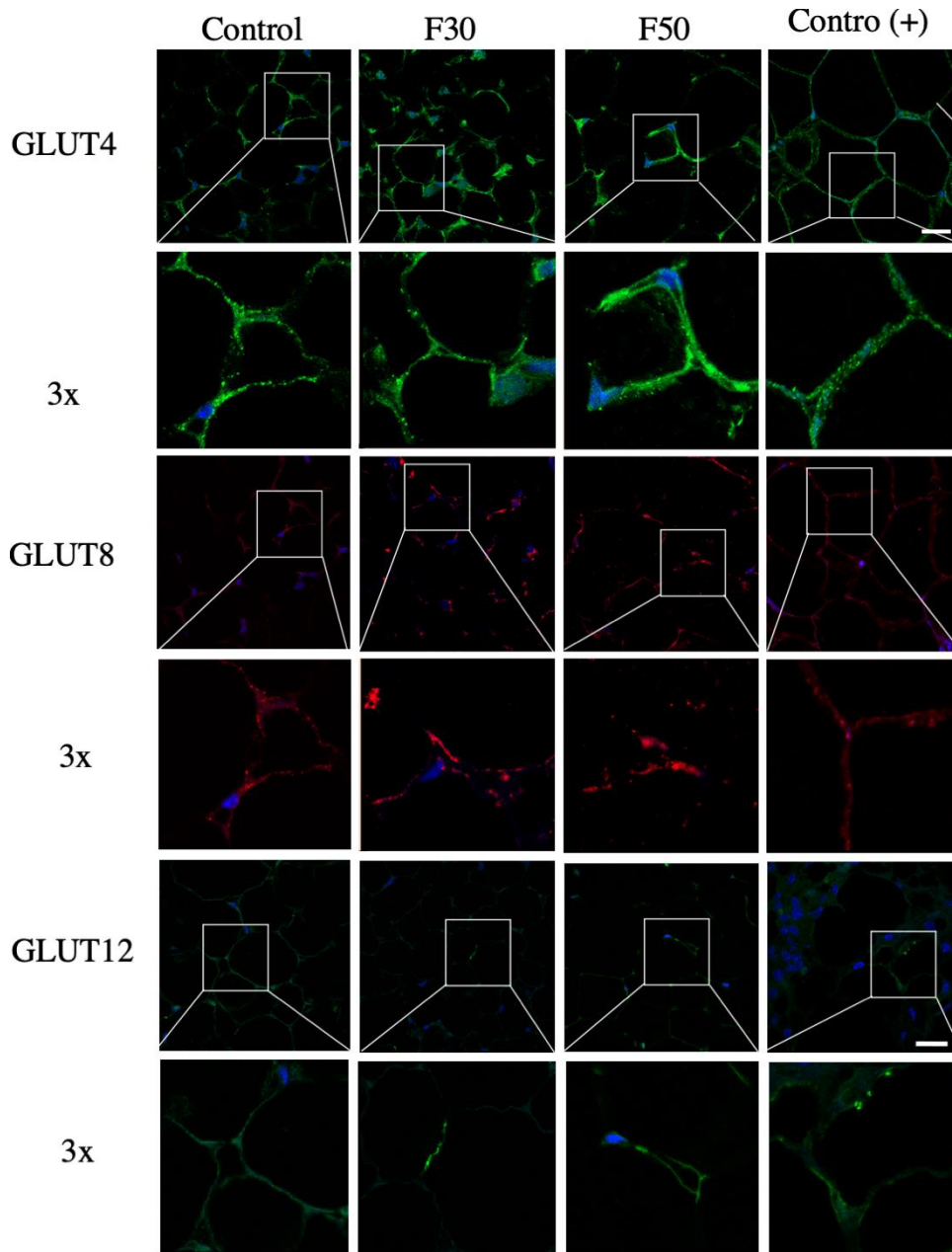
**Figura 10. Efectos de dietas altas en fructosa la expresión de ARNm de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TUBE de ratones BALB/c:**

Se presenta resumen de expresión por qRT-PCR normalizado con beta actina. **A:** niveles de ARNm para GLUT4 **B:** niveles de ARNm de GLUT8. **C:** niveles de ARNm de GLUT12. Datos expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar de 3 determinaciones diferentes. El control (+) corresponde a epitelio mamario de ratón y el control (-) a ARN total de TUBE en ausencia de la ADN polimerasa. Los valores fueron normalizados en relación a la expresión de  $\beta$ actina.



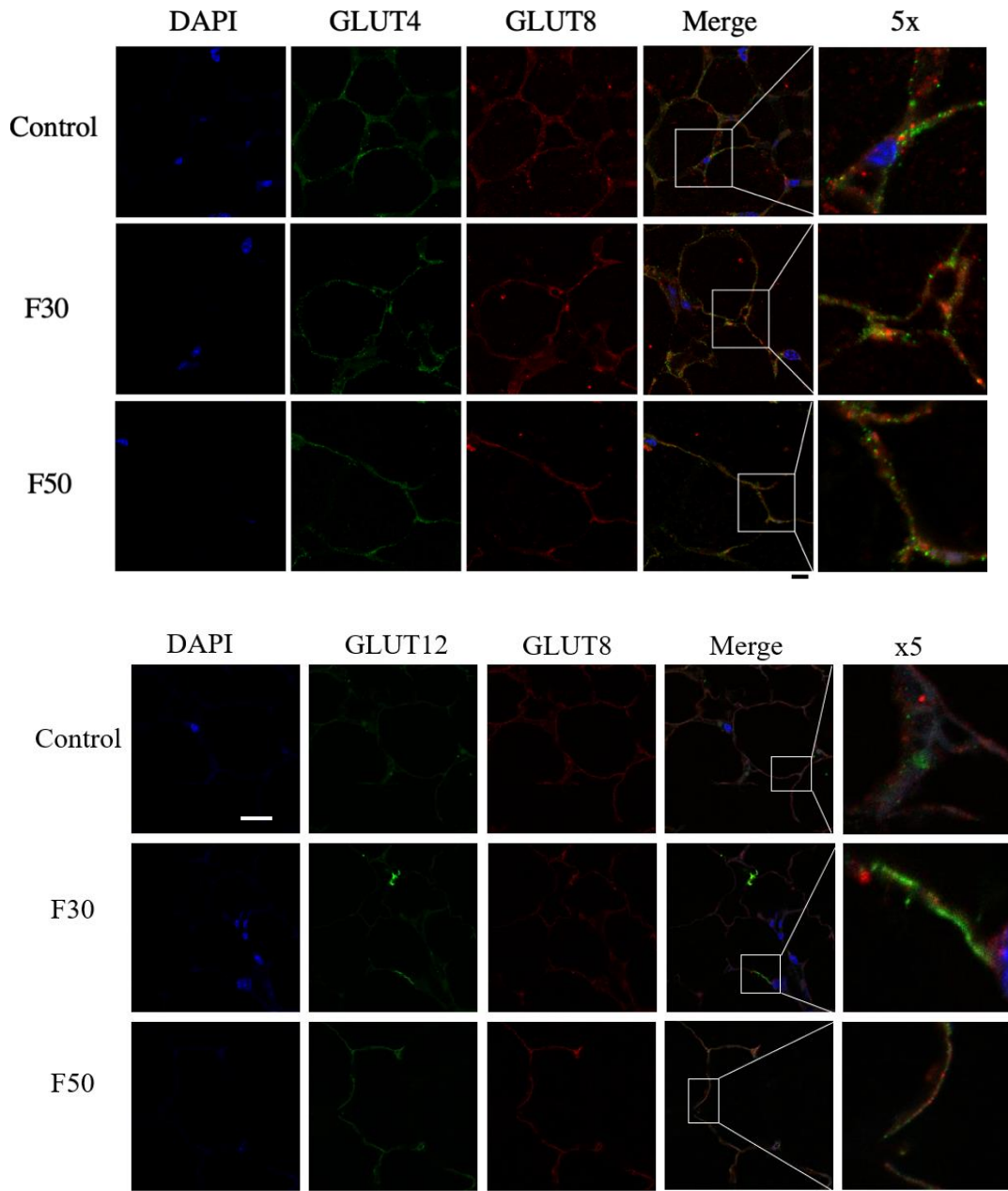
**Figura 11. Efectos de dietas altas en fructosa la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TAFE de ratones BALB/c:**

Inmunotinción utilizando anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, revelado con diaminobenzidina y contra-tinción nuclear con Hematoxilina de Harris. Se incluye una magnificación 3x para cada caso. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu$ m. Los controles (+) corresponde a TAB mamario (GLUT4 y GLUT8) y a epitelio mamario (GLUT12). El control (-) corresponde a TAFE en ausencia del anticuerpo primario (anexo 1, Figura S1). F30: fructosa al 30%; F50: fructosa al 50%; control (+): control positivo, tejido mamario; GLUT: transportador facilitativo de glucosa.



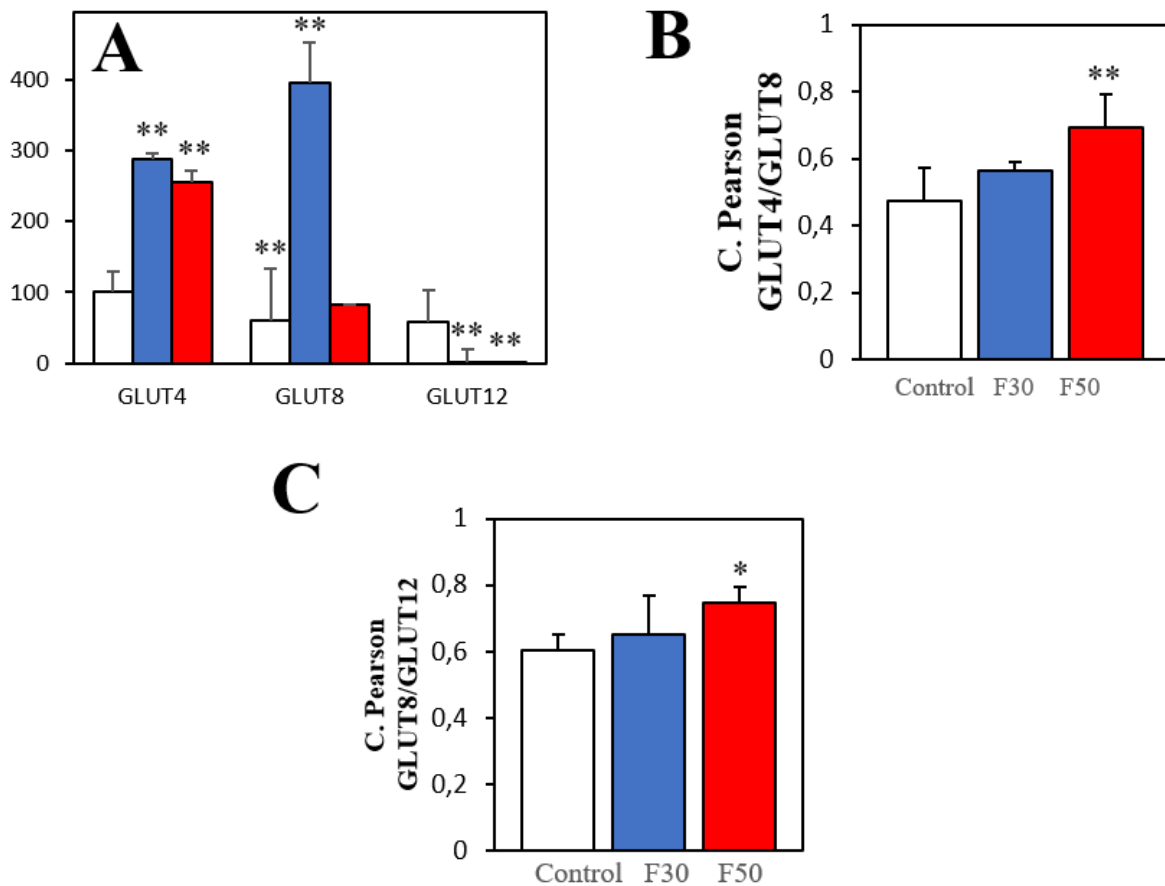
**Figura 12. Efectos de dietas altas en fructosa la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TAME de ratones BALB/c:**

Se presenta inmunotinción utilizando anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 para GLUT4 y GLUT12, y Alexa 594 GLUT8 con contra-tinción nuclear con DAPI. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu$ m. Se incluye una magnificación 3x en cada caso. El control (+) corresponde a epitelio mamario de ratón. Los controles (-) se presenta en anexo 2 (Figura S2) y corresponde a TAME en ausencia del anticuerpo primario. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol, F30: fructosa al 30%; F50: fructosa al 50%; control (+): control positivo. GLUT: transportador facilitativo de glucosa.



**Figura 13. Estudio de co-localización de GLUT8 con GLUT4 y GLUT12 en adipocitos de TAFE de ratones BALB/c tratados con fructosa.**

**A:** Co-tinción GLUT8-GLUT4. **B:** Co-tinción GLUT8-GLUT12. Se utilizó anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 para GLUT8 y con Alexa 488 para GLUT4 y GLUT12, y contra-tinción nuclear con DAPI. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50 µm. Se incluye una magnificación 5x en cada caso. Los controles (-) se presenta en anexo 2 (Figura S2) y corresponde a TAFE en ausencia del anticuerpo primario. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol, F30: fructosa al 30%; F50: fructosa al 50%; GLUT: transportador facilitativo de glucosa.



**Figura 14. Cuantificación de la intensidad de expresión de GLUT8, GLUT4 y GLUT12 y de co-localización de GLUT8 con GLUT4 y GLUT12 en adipocitos de TABE de ratones BALB/c tratados con fructosa.**

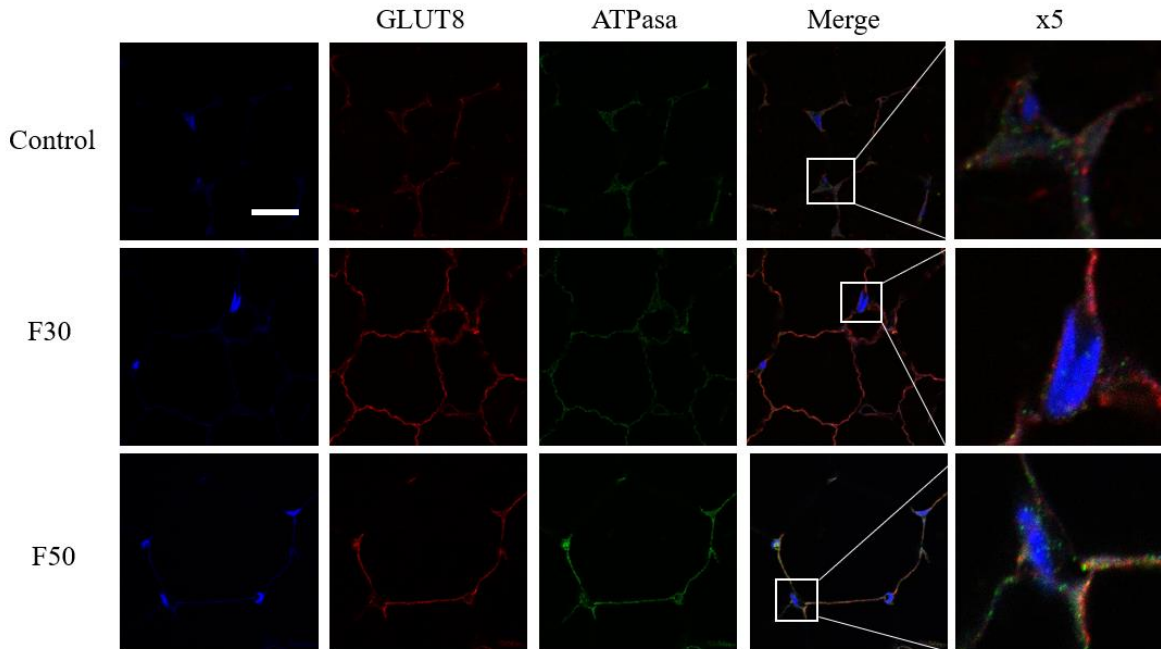
**A:** Cuantificación de intensidad de tinción. **B:** Coeficiente de Pearson de GLUT8 y GLUT4. **C:** Coeficiente de Pearson de GLUT8 y GLUT12. Los datos son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 diferentes sectores en muestras distintas de cada grupo.\*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$  con respecto a condición control. F30: fructosa al 30%; F50: fructosa al 50%.

## 6.6 Localización sub-celular del transportador GLUT8 en el TABE y efecto de dietas altas en fructosa

Para evaluar las posibles alteraciones inducidas por las dietas altas en fructosa en la localización sub-celular de GLUT8 en el TABE, se realizaron estudios de su co-localización con la subunidad alfa de la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> y LAMP2, como marcadores de membrana plasmática, lisosoma, respectivamente. Estos ensayos de co-localización se realizaron en las tres condiciones de tratamiento.

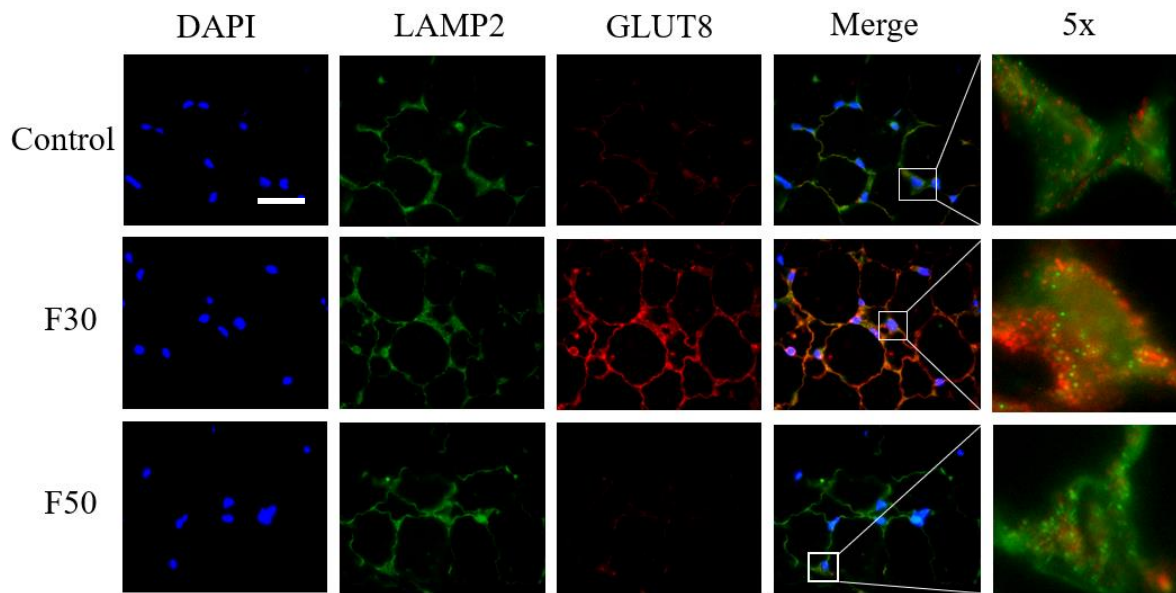
En primer lugar, en la Figura 15 se observa una co-localización fuerte de GLUT8 con el marcador de membrana plasmática ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Alpha 1, que aumenta significativamente en la condición F50, donde se presenta mayor inmunoreactividad de GLUT8. Por otro lado, al hacer los ensayos de co-localización de GLUT8 con LAMP2, se observó co-localización fuerte con LAMP2 en la condición control, F30 y F50. Teniendo un aumento significativo de su co-localización en el grupo F30 (Figuras 15 y 16).

Los resultados obtenidos de las microfotografías de co-localización fueron confirmadas al obtener los respectivos valores del coeficiente de Pearson (Figura 17). En el caso de la co-localización de GLUT8 con ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 1 Alpha, se obtuvo un coeficiente de Pearson de  $0,7 \pm 0,2$  para el grupo control;  $0,64 \pm 0,06$  para el grupo F30 y  $0,79 \pm 0,03$  para el grupo F50 ( $p < 0,05$ ). En el caso de su co-localización con lisosomas (LAMP2), se obtuvo un coeficiente de Pearson de  $0,62 \pm 0,10$  para el grupo control,  $0,78 \pm 0,05$  ( $p < 0,05$ ) para el grupo F30 y  $0,52 \pm 0,10$  para el grupo F50.



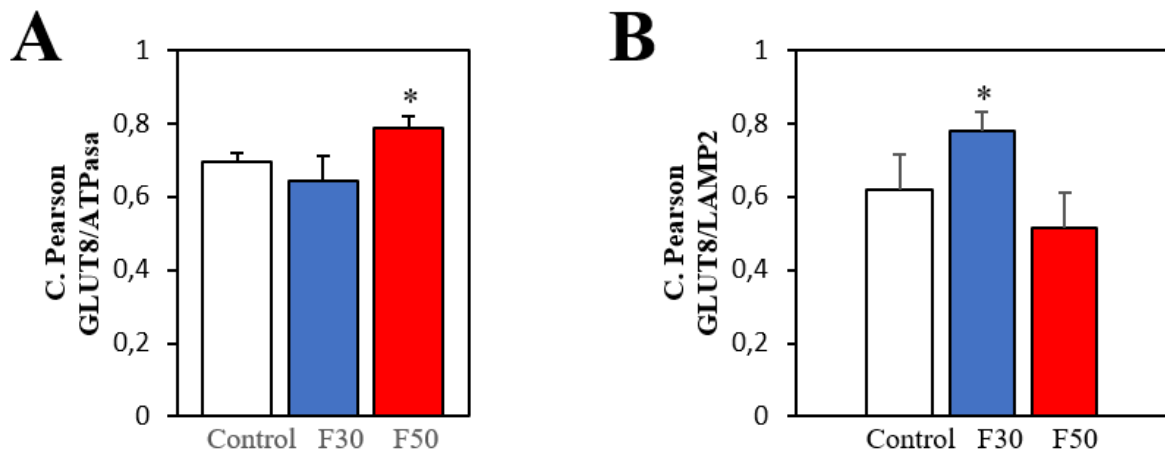
**Figura 15. Estudio de co-localización de GLUT8 y ATPasa Na<sup>+</sup>/k<sup>+</sup> 1 Alpha en adipocitos de TAFE de ratones BALB/c tratados con fructosa.**

Se presenta inmunotinción utilizando anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 para GLUT8 y Alexa 488 para ATPasa Na<sup>+</sup>/k<sup>+</sup> 1 Alpha con contratinción nuclear con DAPI. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu$ m. Se incluye una magnificación de 5x en cada caso. Los controles (-) se presenta en anexo 2 (Figura S2) y corresponde a TAFE en ausencia del anticuerpo primario. Los controles (+) corresponden a tejido epitelial mamario para GLUT8 (Figura 12) y células HeLa para ATPasa (Anexo 3 , Figuras S3. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol, F30: fructosa al 30%; F50: fructosa al 50%.



**Figura 16. Estudio de co-localización de GLUT8 y LAMP2 en adipocitos de TAFE de ratones BALB/c tratados con fructosa.**

Se presenta inmunotinción utilizando anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594 para GLUT8 y Alexa 488 para LAMP2 con contratinción nuclear con DAPI. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . Se incluye una magnificación de 5x en cada caso. Los controles (-) se presenta en anexo 2 (Figura S2) y corresponde a TAFE en ausencia del anticuerpo primario. Los controles (+) corresponden a tejido adiposo mamario para GLUT8 (Figura 12) y células HeLa para LAMP2 (Anexo 3, Figura S3), respectivamente. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol, F30: fructosa al 30%; F50: fructosa al 50%; control (+): control positivo; control (-): control negativo.



**Figura 17.** Cuantificación de co-localización de GLUT8 con ATPasa alfa 1 y LAMP2 en adipocitos de TABE de ratones BALB/c tratados con fructosa.

**A:** Coeficiente de Pearson de GLUT8 y ATPasa alfa 1. **B:** Coeficiente de Pearson de GLUT8 y LAMP2. Los datos son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar de 5 diferentes sectores en muestras distintas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  con respecto a condición control. F30: fructosa al 30%; F50: fructosa al 50%.

## 7. DISCUSIÓN

Nuestros estudios evidencian que un tratamiento de 4 meses con dietas altas en fructosa (F30 y F50) provoca efectos deletéreos en la composición corporal y en el tejido adiposo de ratones Balb/C. Estas alteraciones se asocian con un fenotipo obesogénico, evidenciado por un aumento moderado del peso corporal e hipertrofia del TAFE, acompañados por hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. Específicamente a nivel de los adipocitos del TAFE, el tratamiento prolongado con dietas altas en fructosa provocó hipertrofia celular y cambios en la expresión de GLUT8, GLUT4 y GLUT12, destacándose una mayor expresión de GLUT4 y GLUT8, y la movilización de este último hacia el lisosoma en F30 y hacia la membrana plasmática en F50. Los cambios en la expresión y localización de estos transportadores podría indicar mayor captación de fructosa y/o glucosa por los adipocitos del TAFE. Interesantemente, algunos de los cambios se observaron sólo en el grupo F30.

### 7.1 Las dietas altas en fructosa favorecen el desarrollo de un fenotipo obesogénico en ratones BALB/c

En primer lugar, observamos que los grupos F30 y F50 ganaron 25% más peso que el grupo control durante los 4 meses de tratamiento, lo cual que acompañado por una hipertrofia de mas del doble en el TAFE. La ganancia de peso observado en el grupo control, se asocia al desarrollo normal de ratones, dado que comenzaron el tratamiento a los 2 meses de edad, cuando recién están alcanzando la madurez sexual. Estudios previos han evidenciado que no hay ganancia de peso por efecto de una dieta al 60% de fructosa en dos cepas de ratones distintas, pero con distinta respuesta del tejido adiposo (Novelle *et al.*, 2021; De Bosch *et al.*, 2013). En el caso de Novelle *et al.*, 2021, que trataron ratones C57BL/6 hembras por 22 semanas, tampoco encontraron cambios en la distribución corporal, mientras que De Bosch *et al.*, 2013, al tratar ratones machos Sv129 machos por 24 semanas, encontraron aumento del 21% peso de la masa grasa y disminución en un 12% de la masa magra. Por otro lado, Novelle *et al.*, 2021, reportaron un 50% de aumento de peso del TAB gonadal a las 12 semanas de tratamiento, sin cambios en TAB visceral y subcutáneo; mientras que, Bursac, *et al.*, 2014, reportaron aumento de un 40% del TAB del epiplón visceral en ratas Wistar macho expuestas a 60% de fructosa por 9 semanas. Otro estudio, realizado en ratas Wistar machos, encontró que dietas de fructosa al 10 y 60% por 4 y 8 semanas no afectan el peso de los animales, pero que la concentración más alta de fructosa aumentó entre 40 y 50% el peso de los depósitos de TAB mesentérico, TABsc y TAB retroperitoneal en animales adultos (90 días de edad), no así en animales jóvenes (28 días de edad) (de Moura *et al.*, 2009). Por otro lado, 30. Kovačević *et al.*, 2021, tratando ratas Wistar de ambos sexos con una dieta de 10% fructosa por 9 semanas no encontraron cambios en peso corporal ni en el tejido adiposo. El desarrollo del tejido adiposo por dietas altas en fructosa ha sido evidenciado también en otros estudios (Furuhashi *et al.*, 2004; Hernández-Díascouder *et al.*, 2019; Bursac *et al.*, 2014). La disparidad del efecto de dietas altas en fructosa en el peso corporal, la composición corporal y el desarrollo de distintos depósitos de tejido adiposo refleja que los resultados no sólo depende del tiempo de tratamiento y la dosis administrada, sino que también es influenciada por la especie, la cepa, la edad y el sexo de los animales tratados (Vila *et al.*, 2011, Reed *et al.*, 2007; Nishikawa *et al.*, 2007). En el caso del efecto del sexo, se ha descrito una mayor inducción de la fructoquinasa hepática en ratones hembras, que favorecería la metabolización de fructosa y sus efectos obesogénicos, influenciado por las hormonas sexuales esteroidales

(Vila *et al.*, 2011). También se ha descrito que las hembras poseen mayor cantidad de precursores adipocíticos en TAB inguinal y gonadal, que responderían a las dietas hipercalóricas con hipertrofia e hiperplasia (Horwitz *et al.*, 2023). En nuestro estudio, se usaron ratones BALB/c machos jóvenes (2 meses), una de las cepas menos susceptible a los efectos de las dietas hipercalóricas (Montgomery *et al.*, 2013). A pesar de lo anterior, es posible que el tratamiento prolongado permitiera ver efectos a nivel del desarrollo del TABE. Lamentablemente, no evaluamos composición corporal, ni el comportamiento de otros TAB, que sería interesante de conocer, para conocer si hay cambios significativos a nivel de la masa grasa y el contenido de agua, y si hay otros TAB que hipertrofian en nuestro modelo. La ganancia de peso del TABE forma parte del fenotipo adipogénico, ya que se ha establecido que el TAB perivisceral, en particular la ubicada en el mesenterio y el omento, resulta ser más perjudicial que la TABsc, correlacionándose con el aumento en el riesgo de enfermedad metabólica y cardiovascular, por lo cual cobra relevancia la determinación del perímetro de cintura como indicador de obesidad en humanos (Horwitz *et al.*, 2023; Moreno, 2010) Además, en Chile se ha descrito que un 7% de la población con IMC normal presenta un fenotipo no saludable, asociado a una obesidad central (Fernández-Verdejo *et al.* 2020)

Nuestros resultados mostraron que la hipertrofia del TABE fue acompañada de hipertrofia celular. Histológicamente, fue evidente que en el grupo control, el tejido está bien vascularizado, con abundante matriz extracelular y con presencia de algunos adipocitos con pequeñas gotas lipídicas, que son más característico de tejido adiposo beige (Dobner *et al.*, 2017). Por otro lado, en los grupos F30 y F50, el TABE se observó menos vascularización, con reducción del tejido conectivo y con predominio de adipocitos mas grandes y con una gota lipídica de gran tamaño, similar lo observado en TAB del epiplón visceral en respuesta a dietas alta en fructosa (Dobner *et al.*, 2017, Richard *et al.*, 2023). Tanto la fructosa, como los metabolitos de la fructolisis, podrían ingresar al adipocito, aumentando la lipogénesis y desencadenando su hipertrofia (Legeza, 2017). El TAB visceral, en general, posee una función de almacenamiento de energía a la forma de TG y su aumento se asocia con el aumento de la lipogénesis *de novo* que tiene lugar a nivel hepático al metabolizar la fructosa, y a la circulación de lípidos asociados a lipoproteínas y como ácidos grasos libres (Dobner *et al.* , 2017, Bursác *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha descrito que otros órganos, además del intestino y el hígado pueden captar y metabolizar la fructosa, dentro de los que se encuentra el TAB y el riñón (Bellido, *et al.*, 1978; Zhang *et al.*, 2017). Estudios anteriores han evidenciado que la expansión del tejido adiposo por dietas hipercalóricas se debe tanto a la hipertofia de los adipocitos, asociada a la activación y aumento significativo de enzimas lipogénicas como Lipina-1 microsomal, FAS y ACC, sumado a una disminución significativa de enzimas lipolíticas como HSL y ATGL en adipocitos (Kim *et al.* 2016). Lo cual gatilla la proliferación y diferenciación de los precursores pre-adipocitos, asociado al incremento de factores de transcripción adipogénicos, como ChREBP, PPAR $\gamma$  y SREBP-1 (Bursác *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2022; Hernández-Díazcouder *et al.*, 2019; Kim, *et al.*, 2016). Sin embargo, existirían diferencia entre los distintos depósitos de TAB, predominando la hipertrofia en los depósitos abdominales inguinales, mientras que en TAB gonadal se presentaría hiperplasia e hipertrofia (Horwitz *et al.*, 2023). La hipertrofia de los adipocitos se asocia también a la presencia de hipoxia e inflamación, así como a la producción alteradas de adipoquinas y citoquinas inflamatorias (Dobner *et al.*, 2017). Al aumentar

la población y el tamaño de los adipocitos, se produce un desequilibrio en el aporte de oxígeno, lo que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias (Richard *et al.*, 2020). Esto se ve potenciado debido al rápido agotamiento de ATP, al aumento en la degradación de purinas por la enzima xantina oxidasa y al consiguiente aumento del ácido úrico (Zhang *et al.*, 2017). Lamentablemente, en nuestro estudio no determinamos marcadores moleculares de hipertrofia, hiperplasia, lipogénesis, ni inflamación pero sería interesante de considerarlo en el futuro.

En relación a las alteraciones en los parámetros bioquímicos séricos inducidos por las dietas altas en fructosa, evidenciamos que la glicemia mensual presenta una alta variación entre los grupos, lo que concuerda con varios otros estudios (Dobner *et al.*, 2017, DeBosch *et al.* 2012, 2013, Kovacevic *et al.*, 2021). En el caso del registro de glicemia al final de cada tratamiento, evidenciamos un aumento significativo en los niveles de glucosa en sangre los ratones del grupo F30, lo que también concuerda con reportes anteriores (Ozkan *et al.*, 2019). Esto refleja que la fructosa se metaboliza hacia la formación de glucosa, proceso que ocurriría preferentemente en el hígado, pero también en el intestino, el riñón y el TAB (Legeza *et al.*, 2017 Bellido, *et al.*, 1978; Zhang *et al.*, 2017). La alta variación en la glicemia mensual podría deberse a que la toma de muestra que realizamos se hizo en ayuno nocturno y lo recomendado es un ayuno diurno de 4 horas, debido a que los roedores son animales nocturnos y podrían cursar con hipoglicemia luego de ayuno nocturno (Andrikopoulos *et al.*, 2008, Reid, *et al.*, 2010). También se describe que los ratones son altamente susceptibles al estrés, su sola manipulación afecta la glicemia (Rubio, *et al.*, 2023). Otras posibles causas de la diferencia entre los datos de glicemia mensual y la del final de tratamiento, puede ser el método de determinación, la primera se realizó con tiras reactivas con sangre total y la segunda por método enzimático en suero (Pariente *et al.*, 2017); también podría haber interferido la presencia de fructosa en ambos casos, como se ha descrito para otros mono y disacáridos (maltosa, xilosa y lactosa) (Schleis *et al.*, 2007).

Por otro lado, evidenciamos que todos los grupos presentan fructosa en sangre, incluso el grupo control, lo cual se debió a que el alimento sólido administrado posee como ingredientes principales, harina de soja y harinillas de maíz, que contienen hasta 1g de fructosa por cada 100g, según lo indica la Asociación Madrileña de Pediatría en Atención Primaria. (AMPAP, 2014). Adicionalmente, la dieta posee 51,2% de extracto libre de nitrógeno, que se compone principalmente de almidón y azúcares en forma de mono o polisacáridos. Sin embargo, el etiquetado nutricional de la dieta usada (5P00 Prolab RMH 3000 de LabDiet) muestra solo un 1,46% de sacarosa (que también aportaría fructosa a la dieta), y no menciona el detalle del resto de los carbohidratos, por ende no permite realizar un cálculo certero de la cantidad exacta de fructosa que consumen los ratones en base a la dieta sólida (Anexo 4). A pesar de lo anterior, evidenciamos que en el grupo F30 el aumento fue significativo. Existen diversos estudios que han determinado fructosemia (Sugimoto *et al.*, 2010; DeBosch *et al.*, 2013). Se ha descrito que la fructosa puede alcanzar hasta los 550  $\mu\text{M}$  en humanos (Hernández-Díazcorder *et al.*, 2019). Sin embargo, los ratones de nuestro estudio pueden alcanzar niveles de 900 y 1.000  $\mu\text{M}$  en el grupo control y F50, respectivamente, y un valor 22% que el grupo control en el grupo F30. En esta línea, se han descrito que en ratones Sv129 los niveles pueden alcanzar valores cercanos a los 2.000 y 2.500  $\mu\text{M}$  cuando se les administraba una carga de 2 g/kg, con valores en ayuno cercanos a los 200  $\mu\text{M}$  y niveles estables cercanos a 500  $\mu\text{M}$

(DeBosch, *et al.*, 2013). Adicionalmente, se evidenció que los niveles de fructosa en ratones C56BL/6, con dieta estándar pueden estar en el orden de los 300  $\mu$ M (Lee, *et al.*, 2022). Las diferencias podrían atribuirse a los métodos ocupados para medir fructosa los cuales no se mencionan o son distintos al utilizado en nuestro estudio. En nuestro estudio, resulta interesante evaluar los niveles de fructosa y AGL en sangre de vena porta y vena hepática, para conocer cuánto de la fructosa está metabolizando en el intestino y en el hígado y, cuánto de ellos se distribuye en la circulación general.

Al determinar el desarrollo de resistencia a insulina por efecto de dietas altas en fructosa, encontramos que no hubo cambios en el TTGIP entre los 3 grupos, pero sí se evidenció una hiperinsulinemia importante, que fue mayor para F30, lo que refleja que los animales fueron capaces de regular su glicemia a costa de una mayor secreción de insulina y mayor captación periférica de glucosa. Estos resultados concuerdan con experimentos anteriores en hembras C57BL/6 y machos Sv129, al administrar fructosa al 60% por 22 y 24 meses (Novelle *et al.*, 2021 DeBosch *et al.*, 2013). Para tratamientos más cortos (18 semanas), DeBosch *et al.*, 2013, no evidenciaron diferencias. Al igual que como se discutió en el caso de los cambios de peso corporal y peso de TAB, las diferencias en los cambios bioquímicos sistémicos entre los distintos estudios podrían atribuirse las cepas utilizadas, el tiempo de tratamiento y el sexo de los animales (Dobner *et al.*, 2017, Vila *et al.*, 2011, Reed *et al.*, 2007; Nishikawa *et al.*, 2007).

Otra alteración metabólica sistémica encontrada en los ratones tratados con fructosa fue una dislipidemia, asociada con aumento de TG, CT, que se acompañaron por mayores niveles de cHDL en el grupo F30. Los resultados de CT y TG concuerdan parcialmente con el estudio de DeBosch *et al.*, 2012; sin embargo, en su caso, también encontraron mayores niveles de cLDL y no evaluaron cHDL. El aumento en cHDL del grupo F30 podría indicar un aumento en la remoción del colesterol circulante y un fenotipo menos dañino, como propusieron los mismos autores (DeBosch *et al.*, 2012, 2013). La dislipidemia causada por las dietas altas en fructosa se asocia principalmente a su metabolización hepática (70%), generando AGL y lipoproteínas conteniendo TG y colesterol, sin embargo, también el enterocito, el adipocito y el tejido renal metabolizan la fructosa (Bellido, *et al.*, 1978; Zhang *et al.*, 2017, Legeza *et al.*, 2017). Se ha reportado que el exceso lípidos y carbohidratos en sangre, provoca una activación de la adipogénesis en el tejido adiposo, lo que permite la mantención de la homeostasis metabólica (Singh *et al.*, 2022). En particular, la fructosa ingresada al adipocito puede activar adipogénesis, mediante la activación de diferentes factores de transcripción como los de la familia C/EBP (pCCAAT/viral Enhancer Binding Proteins, por sus siglas en inglés), Factor de Transcripción tipo Kruppel 5 y 9 (Klf5, Klf9 por sus siglas en inglés), y PPAR $\gamma$  (Hernández-Díazcouder *et al.*, 2019). Asimismo, fructosa es capaz de activar la lipogénesis en hígado y adipocitos, mediante la activación transcripcional de enzimas como la ACC y la esteroil-CoA desaturasa-1 (Singh *et al.*, 2022; Hernández-Díazcouder *et al.*, 2019). También se ha observado una asociación del alto consumo de fructosa con la actividad de la tríada 11- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, hexosa-6-fosfo deshidrogenasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, promoviendo la lipogénesis (Legeza *et al.*, 2017).

Como se comentó, en varios resultados se evidenciaron mayores cambios en el grupo F30, no en el grupo F50. Esto, fue asociado a un 50% menos de consumo del líquido de bebida en el grupo F50. Al respecto, Kovačević

*et al.*, 2021 mostraron que ratas Wistar disminuían el consumo de fructosa, si se administraba en alimento sólido, pero lo aumentaban si se administraba líquido. Por otro lado, Bursai *et al.*, 2014, encontró que ratas Wistar machos reducían el volumen de líquido ingerido cuando este contenía fructosa, lo que se asoció con activación de los mecanismos de saciedad. Si bien nosotros no medimos la ingesta calórica de los animales, datos del laboratorio de animales tratados con dieta alta en fructosa evidencian que los animales ajustan su consumo de alimento a su requerimiento energético (Torres, 2023). Por otro lado, observamos, que al administrar fructosa al 50% en alimento sólido (jalea), no hubo diferencia en la cantidad de fructosa ingerida, en relación con su administración en medio líquido (datos no publicados). Por lo anterior concluimos que la menor ingesta de fructosa en el grupo F50 refleja una activación de mecanismos de saciedad

En resumen, al analizar nuestros resultados y la evidencia bibliográfica, concluimos que los animales desarrollan un fenotipo obesogénico en respuesta a dietas altas en fructosa. Es importante destacar, que, los resultados se ven influenciados por la especie, la cepa, la edad, el sexo de los animales utilizados, así como por la concentración de fructosa a administrar, el tiempo y la vía de tratamiento. Resultaría interesante medir niveles de citoquinas y adipocinas circulatorias, así como expresión en TABE de factores de transcripción que estimulan la adipogénesis y de enzimas que participan de la fructolisis y de la lipogénesis.

Extrapolando nuestros resultados a seres humanos, resulta relevante indicar la asociación descrita entre el consumo de alimentos ultra-procesados ricos en JMAF, como las bebidas azucaradas, y el desarrollo de obesidad en distintos estudios de meta-análisis y distintas cohortes (Fowler *et al.* 2008; Ozkan *et al.*, 2019; Hernández-Díazcouder *et al.*, 2019). Por ejemplo, el consumo de 3 bebidas azucaradas se asoció con una duplicación del peso corporal, mientras que la ingesta de 350 ml/día de bebida endulzada con JMAF produjo un aumento en la medición del circunferencia, indicador de desarrollo de TAB visceral, basado cintura (Fowler *et al.* 2008; Lin *et al.*, 2016). Otro estudio, encontró que el consumo de 75 g de bebida de fructosa por 12 semanas, llevó al desarrollo de hígado graso y expansión del TAB (Taskinen *et al.*, 2017). Por otro lado, el estudio prospectivo de Framingham correlacionó el consumo de bebidas azucaradas con un aumento de 29% en el TAB (Ma *et al.*, 2016).

En resumen, es importante destacar que, si bien la OMS recomienda reducir el consumo de azúcares simples al 10% del total de la ingesta calórica, correspondiente a 27,5 g/día (Agüero *et al.*, 2015; OMS, 2022; Zago *et al.*, 2017), en la actualidad, el consumo de fructosa puede llegar hasta los 72,6 g/día, equivalente a 290,4 Kcal/día, lo que corresponde a cerca del 15% de la ingesta calórica/día (Farias *et al.*, 2020). Al respecto, es preocupante que en Chile se presente una alta incidencia de obesidad y sobrepeso (ENS1016-2017), y, que a su vez, nuestro país lidere el consumo de bebidas azucaradas (Petermann *et al.* 2017), lo que refleja la necesidad imperiosa de educar a nuestra población, desde etapas tempranas, así como implementar políticas públicas efectivas que regulen su consumo. En este sentido, en el año 2016, se crea la Ley n° 20.606, con el fin de prevenir y evitar el aumento de la obesidad de la población, controlando el consumo de alimentos con exceso de energía, sodio, azúcares y grasas saturadas. Sin embargo, a pesar de que hay escasos estudios al respecto, los resultados en la actualidad no evidencian un efecto preventivo en población estudiantil (Zurita-Corvalan, *et al.* 2019), por lo que se debe continuar buscando estrategias más efectivas para el control de exceso de peso de la población.

## **7.2 Las dietas altas en fructosa provocan cambios en la expresión y localización de transportador GLUT8 en adipocitos del TAFE de ratones Balb/C.**

Evidenciamos que GLUT8 se expresa en adipocitos del TAFE y que las dietas altas en fructosa provocan variación en su expresión y localización. Estos cambios se observaron por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, no así por qRT-PCR y predominaron en el grupo F30. La expresión de GLUT8 presentó un patrón intracelular puntiforme, con zonas de patrón lineal cercana al borde celular y colocalizó mayormente con GLUT4, LAMP2 y GLUT12 en la condición F30, pero también con ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> en la condición F50. En el caso de la expresión de los otros transportadores, GLUT4, aumentó significativamente en F30 y F50, mientras que GLUT12, presentó una muy baja expresión en forma transversal, la cual fue incluso menor en F30 y F50.

Estos y otros transportadores de glucosa/fructosa han sido encontrados en tejido adiposo de distinta localización. GLUT4 es el transportador de glucosa más relevante en el tejido adiposo, dado que su movilización a la membrana plasmática es regulada por la insulina y, así, es capaz de regular la glicemia, pero no transporta fructosa (Abel, *et al.*, 2001). Por otro lado, GLUT8 y GLUT12, también han sido encontrados en TAFE de glándula mamaria y en cultivos celulares de adipocitos 3T3-L1 (Mardones *et al.*, 2021; Scheepers *et al.*, 2001, Wood *et al.*, 2003). En el trabajo de Wood *et al.*, 2003, estudiaron la expresión diferencial de GLUT4, GLUT10 y GLUT12 en distintos TAFE de ratones CD1. GLUT4 presentó mayor expresión a nivel de ARNm en TAFE pardo y menor expresión en TAFE y omento; la cual se correlacionó con expresión de la proteína para TAFE, TAFSc y TAFPr. Para el caso de GLUT12, el ARNm se presentó en niveles similares a GLUT4, con predominio en TAFPr y menor expresión en TAFE, TAFSc, y TAFPr, pero a nivel proteico, no se presentaron diferencias entre TAFE, TAFSc y TAFPr. Para GLUT10, predominó su expresión en TAFPr, tanto a nivel de mensajero, como de proteína, destacando una alta expresión en el estroma vascular del TAFE.

Nuestro estudio se centró en el transportador de fructosa GLUT8, dado que no existen muchos estudios sobre su regulación y función de GLUT8 en TAFE, aunque se ha establecido que es clave en el desarrollo de la esteatosis hepática inducida por alta fructosa (DeBosch *et al.*, 2013). Se destaca el reporte de Scheepers *et al.*, 2001, quienes encontraron que GLUT8 se expresa en preadipocitos 3T3-L1 y que su ARNm aumenta en adipocitos diferenciados y disminuye con privación de glucosa. Interesantemente, glucosa y galactosa fueron capaces de revertir el efecto de la privación de glucosa, no así fructosa o glucosamina, descartando efecto transcripcional de estos dos últimos carbohidratos sobre la expresión de GLUT8. En el mismo trabajo, se encontró que 12 horas de hipoxia reducen la expresión de GLUT8 en adipocitos diferenciados. Por otro lado, en el caso del tejido intestinal, se encontró que en células CaCo2, disminuye la expresión de ARNm GLUT8 y GLUT5 por alta fructosa (60% en dieta y 30% en bebida, 1 y 5 días de tratamiento), y que, al silenciar GLUT8, aumenta la expresión de GLUT12 y la captación de fructosa, lo que revela una asociación funcional entre ambos transportadores (DeBosch *et al.*, 2012). La expresión diferencial de GLUT8 en adipocitos bajo las distintas condiciones puede estar regulada por factores de transcripción como C/EBP, NF1 (Factor Nuclear 1, por su sigla en inglés) y/o PPAR $\gamma$  (Scheepers *et al.*, 2001). Si bien en nuestro estudio no encontramos variación de GLUT8 a nivel de ARNm, hubo un aumento significativo a nivel proteico en F30 y F50 y mayor colocalización

con ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, GLUT4 y GLUT12, proteínas localizadas en membrana plasmática, según la literatura (Augustin *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que GLUT8 tendría un rol importante en la captación de glucosa y/o fructosa en el adipocito del TABE, incluso, podría permitir que se priorizara la metabolización de la fructosa como fuente energética, por sobre glucosa, como se sugirió anteriormente (Legeza *et al.*, 2014). En general, GLUT8 se ha considerado un transportador de glucosa esencialmente intracelular, ubicado en distintos componentes del sistema endomembranoso (lisosoma, retículo y Golgi) (Schmidt *et al.*, 2009; Alexander *et al.* 2021; Chadt *et al.*, 2020; DeBosch *et al.*, 2012; Flessner *et al.*, 2009), incluso en el caso de adipocitos en particular, GLUT8 exógeno se localizó a nivel intracelular, sin cambiar su expresión en respuesta a insulina, éster de forbol (activador de proteína kinasa C) o hiperosmolaridad (Lisinki *et al.*, 2001). Previamente, sólo se había descrito que GLUT8 se expresa en la membrana plasmática de los hepatocitos, y que se moviliza hacia la membrana plasmática en respuesta a insulina en el caso de blastocitos (Carayannopoulos *et al.*, 2000; DeBosch *et al.*, 2014). La localización intracelular de GLUT8 se ha asociado con la presencia de un motivo dileucina en el N-terminal, aunque existiría una movilización activa de GLUT8 entre los compartimientos intracelulares y la membrana plasmática, con participación de otras proteínas, como la GTPasa plasmática dinamina (Lisinki *et al.*, 2001).

Como se había indicado previamente, GLUT8 es importante en el desarrollo de hígado graso no alcohólico inducido por alta fructosa (DeBosch *et al.*, 2013, 2014; Novelle *et al.*, 2021). Dichos autores encontraron que los ratones GLUT8KO no desarrollaban esteatosis hepática y que disminuían la expresión de los factores de transcripción ChREBP y PGC1 $\beta$  en los hepatocito. Estos factores de transcripción regulan la lipogénesis *de novo* en hígado (DeBosch, 2013). Dado que la respuesta hipertrófica de los adipocitos del TABE a alta fructosa en nuestro modelo se asocia con mayor expresión de GLUT8, es probable que también dichos factores, junto con otros y enzimas de la lipogénesis estén sobreexpresadas en TABE de los grupos F30 y F50, facilitando el almacenamiento de lípidos en el adipocito (Singh *et al.*, 2022). Por otro lado, también se había descrito que la administración de una dieta 60% de fructosa en ratones SV129, aumenta la expresión de GLUT8 en hepatocitos e intestino (DeBosch *et al.*, 2012, 2013, 2014).

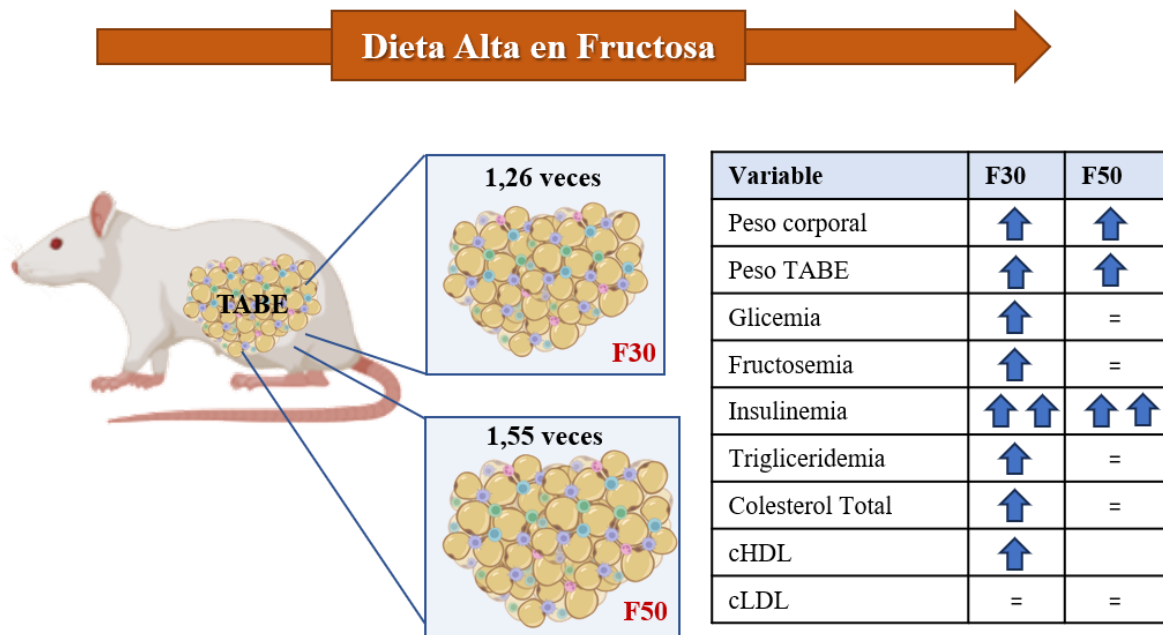
En relación a la regulación de la expresión en TABE de los otros transportadores de glucosa estudiados, para el caso de GLUT4, se ha descrito una disminución a nivel de ARNm en TAB visceral en respuesta a 10 semanas de tiramiento con dietas altas en grasas, altas en fructosa o la mezcla de ambas, lo cual estaría asociado a una desensibilización a la respuesta a la insulina (Dodner *et al.*, 2017). Dado que en nuestro estudio aumento la expresión proteica de GLUT4, pero no a nivel de ARNm, es posible que en nuestro modelo (ratones BALB/c, 4 meses de tratamiento, 30 y 50% de fructosa), la mayor expresión de GLUT4 en los grupos tratados se asocie con una regulación postraduccional, reduciendo la degradación de la proteína y aumentando su estabilidad, algo de lo que no hay evidencia a la fecha para estas proteínas, pero si en otros casos, como en línea celular de meduloblastoma humano (Vogel, *et al.* 2012). Para el caso de GLUT12, se ha descrito que su expresión disminuye en tejido adiposo y cultivo celular de fibroblastos 3T3-L1 respuesta a hipoxia, leptina, adiponectina, TNFalfa y ácido docosahexaenoico, mientras que aumenta su expresión y transloca a membrana en respuesta a insulina (Gil-Iturbe *et al.*, 2019). La hipoxia, las adipoquinas, las citoquinas proinflamatorias han sido

asociadas con dietas hipercalóricas y con obesidad (Gil-Iturbe *et al.*, 2019; Scheepers *et al.*, 2001; Singh, et al. 2022), por lo que pueden influenciar la baja expresión de GLUT12 observada en respuesta al tratamiento con fructosa en nuestro estudio. Por otra parte, se encontró un aumento de 5 veces la expresión de GLUT12 al tratar células CaCo-2 por 48 hrs con 500 mM de fructosa (DeBosch *et al.*, 2012), reflejando una respuesta tejido-dependiente de este transportador.

Existen otros transportadores de glucosa que se han estudiados en contexto de alta fructosa, destacando GLUT5, que es el transportador más importante de fructosa y se expresa principalmente en el enterocito y las células espermáticas, pero que también se expresa en el adipocito (Litherland, *et al.* 2004). Al respecto, se ha descrito que GLUT5 aumenta un 40% en su expresión durante la diferenciación de los adipocitos en la línea celular 3T3-L1 cuando hay presencia de 0,3 g/L de fructosa (Legeza B, *et al.*, 2014), mientras que su localización en membrana plasmática disminuye 12 veces en ratones obesos y con resistencia a la insulina expuestos a fructosa (Litherland *et al.*, 2004). En células CaCo-2 se ha observado que el aumento en GLUT5 se debe a una mayor estabilidad del ARNm mediado por señales dependientes de AMPc y de la proteína que interacciona con la proteína de unión a poliadenilación (Gouyon *et al.*, 2003). Para el caso de GLUT10, se ha documentado que los polimorfismos en su secuencia génica podrían influenciar la respuesta a dietas altas en grasas, disminuyendo la adipogénesis a través de la desmetilación del ADN en regiones promotoras específicas (Jiang *et al.*, 2020).

En resumen, el tratamiento de ratones BALB/c con dietas altas en fructosa por 4 meses induce un fenotipo obesogénico asociado con una mayor expresión de GLUT4 y GLUT8 en los adipocitos del TAFE, y con una mayor localización de GLUT8 en lisosomas y a nivel de su membrana plasmática. Los cambios en la expresión y localización de estos transportadores podría indicar mayor captación de fructosa y/o glucosa por los adipocitos del TAFE, favoreciendo en ellos la hipertrofia, la hiperplasia y la lipogénesis y el riesgo de desarrollar enfermedades cardiometabólicas asociadas a obesidad.

Proyectamos que en un futuro se puede complementar este estudio evaluando el efecto de las dietas altas en fructosa en otros tejidos adiposos viscerales y/o subcutáneos e *in vitro* en preadipocitos y/o adipocitos tratados con alta fructosa. Adicionalmente, creemos interesante evaluar la producción de adipocinas, enzimas y factores de transcripción que regulan el metabolismo de la fructosa y de la glucosa, y los procesos de adipogénesis, lipogénesis y lipólisis. Sumado a lo anterior, sería interesante evaluar los efectos inflamatorios que se podrían estar produciendo en el TAFE por efecto de dietas alta en fructosa, utilizando la medición de enzimas antioxidantes y citoquinas inflamatorias.



**Figura 18. Resumen de efectos sistémicos de dietas altas en fructosa y en TUBE de ratones BALB/c macho.**

Elaboración propia. Creado con Biorender.com y Power Point

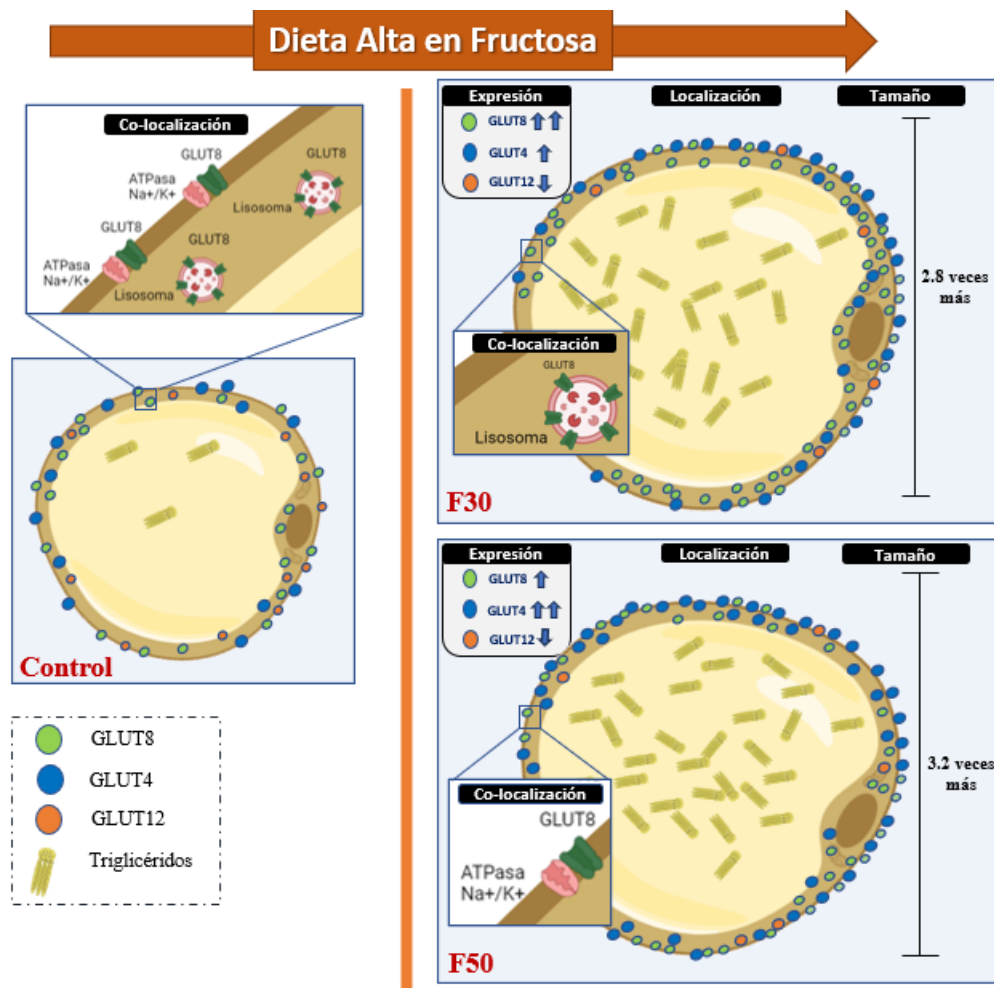


Figura 19. Resumen de efectos en la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 y localización de GLUT8 producido por dietas altas en fructosa en TABE de ratones BALB/c macho.

Elaboración propia. Creado con Biorender.com y Power Point

## 8. REFERENCIAS:

1. Abel E., Peroni, O., Kim, J., Kim, Y., Boss, O., Hadro, E., Minnemann, T., Shulman, G. y Kahn, B.B. (2001). Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*. 409(6821):729-33. doi: 10.1038/35055575.
2. Alexander, C., Martin, J., Oxman, E., Kasza, I., Senn, K. (2020). Dvunge H. Alternative Splicing and Cleavage of GLUT8. *Mol Cell Biol*. 41(1):e00480-20. doi: 10.1128/MCB.00480-20.
3. Andrikopoulos, S., Blair, A., Deluca, N., Fam, B., Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295(6):E1323-32. doi: 10.1152/ajpendo.90617.2008.
4. Asociación Madrileña de Pediatría en Atención Primaria. (AMPAP). (2014). Guías de actuación conjunta Pediatría Primaria Especializada. 2014 ISBN 978-84-695-3798-5. Obtenido de: [https://www.ampap.es/wp-content/uploads/2014/05/Info\\_intolerancia\\_fructosaysorbitol\\_2014.pdf](https://www.ampap.es/wp-content/uploads/2014/05/Info_intolerancia_fructosaysorbitol_2014.pdf)
5. Bantle, J., Swanson, J., Thomas, W. y Laine, D. (1992). Metabolic effects of dietary fructose in diabetic subjects. *Diabetes Care*. 15(11):1468-76. doi: 10.2337/diacare.15.11.1468.
6. Bellido, J. y Herrera, E. (1978). Effects of glucose on the metabolism of fructose and glycerol by isolated adipocytes from rat. *Rev Esp Fisiol*. 1978 Dec;34(4):437-41.
7. Bray, G., Nielsen, S. y Popkin, B. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004 Apr;79(4):537-43. doi: 10.1093/ajcn/79.4.537. Erratum in: *Am J Clin Nutr*. 2004 Oct;80(4):1090.
8. Burcelin, R., Printz, R., Kande, J., Assan, R., Granner, D. y Girard, J. (1993). Regulation of glucose transporter and hexokinase II expression in tissues of diabetic rats. *Am J Physiol*. 265(3 Pt 1):E392-401. doi: 10.1152/ajpendo.1993.265.3.E392.
9. Bursac, B., Vasiljevic, A., Nestorovic, N., Veličković, N., Vojnović, D., Matić, G. y Djordjevic, A. (2014). High-fructose diet leads to visceral adiposity and hypothalamic leptin resistance in male rats - do glucocorticoids play a role? *J Nutr Biochem*. 25(4):446-55. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.12.005.
10. Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J. y Wittwer, C. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
11. Carayannopoulos, M., Chi, M., Cui, Y., Pingsterhaus, J., McKnight, R., Mueckler, M., Devaskar, S. y Moley, K. (2000). GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(13):7313-8. doi: 10.1073/pnas.97.13.7313.
12. Chadt, A. y Al-Hasani, H. (2020). Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch*. 472(9):1273-1298. doi: 10.1007/s00424-020-02417-x.
13. de Moura, R., Ribeiro, C., de Oliveira, J., Stevanato, E. y de Mello, M. (2009). Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr*. 101(8):1178-84. doi: 10.1017/S0007114508066774.

14. DeBosch, B., Chen, Z., Finck, B., Chi, M. y Moley, K. (2013). Glucose transporter-8 (GLUT8) mediates glucose intolerance and dyslipidemia in high-fructose diet-fed male mice. *Mol Endocrinol.* 27(11):1887-96. doi: 10.1210/me.2013-1137.
15. DeBosch, B., Chen, Z., Saben, J., Finck, B. y Moley, K. (2014). Glucose transporter 8 (GLUT8) mediates fructose-induced de novo lipogenesis and macrosteatosis. *J Biol Chem.* 289(16):10989-10998. doi: 10.1074/jbc.M113.527002.
16. DeBosch, B., Chi, M. y Moley, K. (2012). Glucose transporter 8 (GLUT8) regulates enterocyte fructose transport and global mammalian fructose utilization. *Endocrinology.* 153(9):4181-91. doi: 10.1210/en.2012-1541.
17. Del Pozo Iribarren, R., Mardones, L., Villagrán, M., Muñoz, K., Troncoso, L., Mellado, M. y Muñoz M. (2023). Effect of various dietary fructose concentrations on the gallstone formation process in mice. *Nutr Hosp. English.* doi: 10.20960/nh.04610.
18. Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud de Chile, (2017). Encuesta de Salud 2016-2017.
19. Dobner, J., Röss, C., Rufinatscha, K., Salzmann, K., Salvenmoser, W., Folie, S., Wieser, V., Moser, P., Weiss, G., Goebel, G., Tilg, H. y Kaser, S. (2017). Fat-enriched rather than high-fructose diets promote whitening of adipose tissue in a sex-dependent manner. *J Nutr Biochem.* 49:22-29. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.07.009.
20. Du, L. y Heaney, A. (2012). Regulation of adipose differentiation by fructose and Glut5. *Mol Endocrinol.* 26(10):1773-82. doi: 10.1210/me.2012-1122.
21. Farias, D., Oliveira, J., Pereira, C., Broseguini, G. Mill, J., Perim, M. (2020). High fructose intake and the route towards cardiometabolic diseases. *Life Sci* 15;259:118235. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118235.
22. Fernández-Vermejo, R., Moya-Osoria, J., Fuentes-López, E. y Galgani, J., (2020). Metabolic health and its association with lifestyle habits according to nutritional status in Chile: A cross-sectional study from the National Health Survey 2016-2017. *PLOS ONE* 15(7): e0236451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236451>.
23. Flessner, L. y Moley, K. (2009). Similar [DE]XXXL[LI] motifs differentially target GLUT8 and GLUT12 in Chinese hamster ovary cells. *Traffic.* 2009 Mar;10(3):324-33. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00866.x.
24. Foreman, B. y Schmitt, M. (1973). The reproductive tract of the male spiny mouse (*Acomys cahirinus*) and coagulation studies with other species. *J Reprod Fertil.* 1979 Sep;57(1):183-8. doi: 10.1530/jrf.0.0570183.
25. Fowler, S., Williams, K., Resendez, R., Hunt, K., Hazuda, H. y Stern, M. (2008). Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity (Silver Spring).* 16(8):1894-900. doi: 10.1038/oby.2008.284.
26. Francey, C., Cros, J., Rosset, R., Crézé, C., Rey, V., Stefanoni, N., Schneiter, P., Tappy, L. y Seyssel, K. (2019). The extra-splanchnic fructose escape after ingestion of a fructose-glucose drink: An exploratory study in healthy humans using a dual fructose isotope method. *Clin Nutr ESPEN.* 125-132. doi: 10.1016/j.clnesp.2018.11.008.

27. Furuhashi, M., Ura, N., Takizawa, H., Yoshida, D., Moniwa, N., Murakami, H., Higashiura, K., Shimamoto, K. (2004). Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity. *J Hypertens.* 22(10):1977-82. doi: 10.1097/00004872-200410000-00021
28. Gil-Iturbe, E., Arbones-Mainar, J., Moreno-Aliaga, M. y Lostao, M. (2019). GLUT12 and adipose tissue: Expression, regulation and its relation with obesity in mice. *Acta Physiol (Oxf).* 226(4):e13283. doi: 10.1111/apha.13283.
29. Gil-Iturbe, E., Félix-Soriano, E., Sáinz, N., Idoate-Bayón, A., Castilla-Madrigal, R., Moreno-Aliaga, M. y Lostao, M.(2020). Correction: Effect of aging and obesity on GLUT12 expression in small intestine, adipose tissue, muscle, and kidney and its regulation by docosahexaenoic acid and exercise in mice. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2021 Jul;46(7):846-847. doi: 10.1139/apnm-2021-0402. Epub 2021 Jun 25. Erratum for: *Appl Physiol Nutr Metab.* 45(9):957-967.
30. Gorovits, N., Cui, L., Busik, J., Ranalletta, M., Hauguel de-Mouzon, S. y Charron, M. (2003). Regulation of hepatic GLUT8 expression in normal and diabetic models. *Endocrinology.* 144(5):1703-11. doi: 10.1210/en.2002-220968.
31. Gouyon, F., Onesto, C., Dalet, C., Pages, G., Leturque, A., y Brot-Laroche, E. (2003). Fructose modulates GLUT5 mRNA stability in differentiated Caco-2 cells: role of cAMP-signalling pathway and PABP (polyadenylated-binding protein)-interacting protein (Paip) 2. *Biochem J.* 2003 Oct 1; 375(Pt 1): 167–174. doi: 10.1042/BJ20030661
32. Hernández-Díazcouder, A., Romero-Nava, R., Carbó, R., Sánchez-Lozada, L. y Sánchez-Muñoz, F. (2019). High Fructose Intake and Adipogenesis. *Int J Mol Sci.* 20(11):2787. doi: 10.3390/ijms20112787.
33. Horwitz, A., y Birk, R. (2023). Adipose Tissue Hyperplasia and Hypertrophy in Common and Syndromic Obesity—The Case of BBS Obesity. *Nutrients* 15, no. 15: 3445. <https://doi.org/10.3390/nu15153445>.
34. Imamura, F., O'Connor, L., Ye, Z., Mursu, J., Hayashino, Y., Bhupathiraju, S. y Forouhi, N. (2015). Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *BMJ.* 2015 Jul 21;351:h3576. doi: 10.1136/bmj.h3576.
35. Jiang, Ch., Jen, W., Tsao, Ch., Chang, L., Chen, Ch. y Lee, YC. (2020). Glucose transporter 10 modulates adipogenesis via an ascorbic acid-mediated pathway to protect mice against diet-induced metabolic dysregulation. *PLoS Genet* 16(5): e1008823. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008823>
36. Kim, J., Kim O., Yoon H., Park ., You Y., Kim K., Lee Y., Choi K., Lee J. y Jun W. (2016). Anti-obesity effect of extract from fermented *Curcuma longa* L. through regulation of adipogenesis and lipolysis pathway in high-fat diet-induced obese rats. *Food Nutr Res.* 2016; 60: 10.3402/fnr.v60.30428. doi: 10.3402/fnr.v60.30428.
37. Kovačević, S., Brkljačić, J., Vojnović Milutinović, D., Gligorovska, L., Bursać, B., Elaković, I., Djordjevic, A. (2021) Fructose Induces Visceral Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance

- Even Without Development of Obesity in Adult Female but Not in Male Rats. *Front Nutr.* 11;8:749328. doi: 10.3389/fnut.2021.749328.
38. Le, M., Frye, R., Rivard, C., Cheng, J. y McFann, K. Segal MS, Johnson RJ, Johnson JA. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects. *Metabolism.* 2012 May;61(5):641-51. doi: 10.1016/j.metabol.2011.09.013.
  39. Lee, H., Kim, E., Shin, E., Shon, J., Sun, H., Kim, J., Jung, J., Lee, H., Pinanga, Y., Song, D., Liu, K. y Lee, J.(2022). Crosstalk between TM4SF5 and GLUT8 regulates fructose metabolism in hepatic steatosis. *Mol Metab.* 58:101451. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101451.
  40. Legeza, B., Balázs, Z. y Odermatt, A (2014). Fructose promotes the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and accelerates lipid metabolism. *FEBS Lett.* 588(3):490-6. doi: 10.1016/j.febslet.2013.12.014.
  41. Legeza, B., Marcolongo, P., Gamberucci, A., Varga, V., Bánhegyi, G., Benedetti, A. y Odermatt, A. (2017). Fructose, Glucocorticoids and Adipose Tissue: Implications for the Metabolic Syndrome. *Nutrients.* 2017 Apr 26;9(5):426. doi: 10.3390/nu9050426.
  42. Limesand, S., Regnault, T. y Hay, W Jr. (2004). Characterization of glucose transporter 8 (GLUT8) in the ovine placenta of normal and growth restricted fetuses. *Placenta.* 25(1):70-7. doi: 10.1016/j.placenta.2003.08.012.
  43. Lin, W., Chan, T., Huang, H., Lee, C., Tsai, S., Wu, P., Yang, Y., Wang, T. y Lee, C.. (2016). Fructose-Rich Beverage Intake and Central Adiposity, Uric Acid, and Pediatric Insulin Resistance. *J Pediatr.* 171:90-6.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2015.12.061.
  44. Lisinski I, Schürmann A, Joost HG, Cushman SW, Al-Hasani H. Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem J.* 2001 Sep 1;358(Pt 2):517-22. doi: 10.1042/0264-6021:3580517.
  45. Litherland, G., Hajduch, E., Gould, G. y Hundal, H. (2004). Fructose transport and metabolism in adipose tissue of Zucker rats: diminished GLUT5 activity during obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem.* 261(1-2):23-33. doi: 10.1023/b:mcbi.0000028734.77867.d2.
  46. Lizák, B., Szarka, A., Kim, Y., Choi, K., Németh, C., Marcolongo, P., Benedetti, A., Bánhegyi, G., Margittai, É. (2019). Glucose Transport and Transporters in the Endomembranes. *Int J Mol Sci.* 20(23):5898. doi: 10.3390/ijms20235898.
  47. Lustig R Schmidt L, Brindis C. (2012). The toxic truth about sugar. *Nature* 482: 29
  48. Ma, J., McKeown, N., Hwang, S., Hoffmann, U., Jacques, P. y Fox, C.(2016). Sugar-Sweetened Beverage Consumption Is Associated With Change of Visceral Adipose Tissue Over 6 Years of Follow-Up. *Circulation.*133(4):370-7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018704.
  49. Malik, V., Popkin, B., Bray, G., Després, J., Willett, W. y Hu, F. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 33(11):2477-83. doi: 10.2337/dc10-1079.

50. Mardones, L., Muñoz, K. y Villagrán, M. (2021). Cell-specific expression of functional glucose transporter 8 in mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 567:125-130. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.06.037
51. Martin, S., Blaha, M., Elshazly, M., Toth, P., Kwiterovich, P., Blumenthal, R. y Jones, S. (2013). Comparison of a Novel Method vs the Friedewald Equation for Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels From the Standard Lipid Profile. *JAMA*. 2013 Nov 20; 310(19): 2061–2068. doi: 10.1001/jama.2013.280532.
52. Ministerio de Salud de Chile. Encuesta Nacional de Salud, 2016-2017 (ENS 2016-2017). [https://redsaud.ssmso.cl/wp-content/uploads/2018/02/2-Resultados-ENS\\_MINSAL\\_31\\_01\\_2018-ilovepdf-compressed.pdf](https://redsaud.ssmso.cl/wp-content/uploads/2018/02/2-Resultados-ENS_MINSAL_31_01_2018-ilovepdf-compressed.pdf)
53. Montgomery, M. K., Hallahan, N. L., Brown, S. H., Liu, M., Mitchell, T. W., Cooney, G. J., & Turner, N. (2013). Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*, 56(5), 1129–1139. doi:10.1007/s00125-013-2846-8
54. Moreno, M. (2010). Circunferencia de cintura: una medición importante y útil del riesgo cardiometabólico. *Rev Chil Cardiol* 2010; 29: 85-87. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-85602010000100008>.
55. Nishikawa, S., Yasoshima, A., Doi, K., Nakayama, H., & Uetsuka, K. (2007). Involvement of Sex, Strain and Age Factors in High Fat Diet-Induced Obesity in C57BL/6J and BALB/cA Mice. *Experimental Animals*, 56(4), 263–272. doi:10.1538/expanim.56.263
56. Novelle, M., Bravo, S., Deshons, M., Iglesias, C., García-Vence, M., Annells, R., da Silva Lima, N., Nogueiras, R., Fernández-Rojo, M., Diéguez, C. y Romero-Picó, A. (2021). Impact of liver-specific GLUT8 silencing on fructose-induced inflammation and omega oxidation. *iScience*. 24(2):102071. doi: 10.1016/j.isci.2021.102071.
57. Organización Mundial de la Salud. (2021). Obesidad y sobrepeso. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
58. Ozkan, H. y Yakan, A. (2019). Dietary high calories from sunflower oil, sucrose and fructose sources alters lipogenic genes expression levels in liver and skeletal muscle in rats. *Ann Hepatol* 18(5):715-724. doi: 10.1016/j.aohep.2019.03.013.
59. Pariente, R., Deib-Morgan, K., García de Diego, O., García-Velasco, P., Sgaramella, G. Y García-González, I. (2017). Exactitud y concordancia entre glucómetros: un estudio en condiciones habituales de práctica clínica [Accuracy and reliability between glucose meters: A study under normal clinical practice conditions]. *Semergen*. 43(1):20-27. Spanish. doi: 10.1016/j.semern.2016.01.011.
60. Pérez-Campos, L., Mayoral, G.,Perez-Campos, E.,Hernández, T.,Pina, S., Rodal, F.,Cabrera, H., Matinez, M., Pérez, A., Alpuche, J., Zenteno, E., Martínez, H., Martínez, R., Hernández, J. Pérez-Campos. (2020). Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *Indian J Med Res* 151, January 2020, pp 11-21. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_1768\_17.

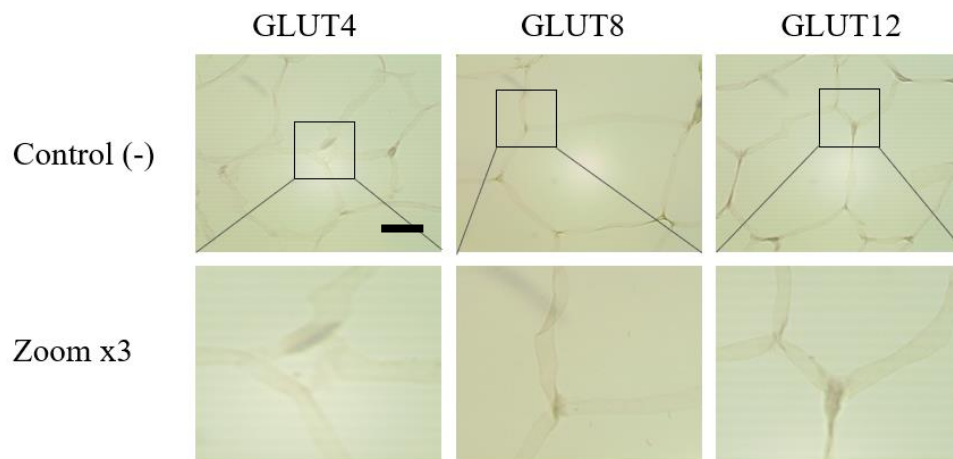
61. Petermann, F., Leiva, A., Martínez, M., Salas, C., Garrido-Méndez, A. y Celis-Morales, C. (2017). Consumo de bebidas azucaradas ayer y hoy: ¿Cuál es el escenario para la población chilena?. *Rev. chil. nutr.*44(4): 400-401. <http://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000400400>
62. Pinto, A., Carayannopoulos, M., Hoehn, A., Dowd, L. y Moley, K. (2002). Glucose transporter 8 expression and translocation are critical for murine blastocyst survival. *Biol Reprod.* 66(6):1729-33. doi: 10.1095/biolreprod66.6.1729.
63. Polyzos, S., Kountouras, J. y Mantzoros, C. (2019). Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: *Metabolism.*92:82-97. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.014.
64. Pujol-Giménez, J., Barrenetxe, J., González-Muniesa, P. y Lostao, M. (2013). The facilitative glucose transporter GLUT12: what do we know and what would we like to know? *J Physiol Biochem.* 69(2):325-33. doi: 10.1007/s13105-012-0213-8.
65. Reed, D., Bachmanov, A., Tordoff, M. (2007). Forty mouse strain survey of body composition. *Physiol Behav.* 91(5):593-600. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.026.
66. Reid, C., Kim, T., Berkovic, S. y Petrou, S. (2010). Low blood glucose precipitates spike-and-wave activity in genetically predisposed animals. *Epilepsia*, 52(1):115–120, 2011doi: 10.1111/j.1528-1167.2010.02911.x
67. Richard, A., White, U., Elks, C., Stephens, J. (2020). *Adipose Tissue: Physiology to Metabolic Dysfunction.* editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555602/>
68. Rubio, W., Cortopassi, M., Ramachandran, D., Walker, S., Balough, E., Wang, J., Banks y A. (2023). Not so fast: Paradoxically increased variability in the glucose tolerance test due to food withdrawal in continuous glucose-monitored mice. *Mol Metab.* 77:101795. doi: 10.1016/j.molmet.2023.101795.
69. Sankar, R., Thamocharan, S., Shin, D., Moley, K. y Devaskar, S. (2002). Insulin-responsive glucose transporters-GLUT8 and GLUT4 are expressed in the developing mammalian brain. *Brain Res Mol Brain Res* 107(2):157-65. doi: 10.1016/s0169-328x(02)00487-4.
70. Scheepers, A., Doege, H., Joost, H. y Schürmann, A. (2001). Mouse GLUT8: genomic organization and regulation of expression in 3T3-L1 adipocytes by glucose. *Biochem Biophys Res Commun.* 288(4):969-74. doi: 10.1006/bbrc.2001.5866.
71. Schiffer, M., Susztak, K., Ranalletta, M., Raff, A., Böttinger, E. y Charron M. (2005). Localization of the GLUT8 glucose transporter in murine kidney and regulation in vivo in nondiabetic and diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol.* 289(1):F186-93. doi: 10.1152/ajprenal.00234.2004.
72. Schleis TG. (2007). Interference of maltose, icodextrin, galactose, or xylose with some blood glucose monitoring systems. *Pharmacotherapy.* 27(9):1313-21. doi: 10.1592/phco.27.9.1313.
73. Schmidt, S., Joost, H. y Schürmann, A. (2009). GLUT8, the enigmatic intracellular hexose transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296(4):E614-8. doi: 10.1152/ajpendo.91019.2008.
74. Singh, S., Sharma, A., Guru, B., Ahmad, S., Gulzar, F., Kumar, P., Ahmad, I. y Tamrakar, A. (2022) Fructose-mediated NLRP3 activation induces inflammation and lipogenesis in adipose tissue. *J Nutr Biochem.* 107:109080. doi: 10.1016/j.jnutbio.2022.109080.

75. Stanhope, K., Schwarz, J., Keim, N., Griffen, S., Bremer, A., Graham, J., Hatcher, B., Cox, C., Dyachenko, A., Zhang, W., McGahan, J., Seibert, A., Krauss, R., Chiu, S., Schaefer, E., Ai, M., Otokozawa, S., Nakajima, K., Nakano, T., Beysen, C., Hellerstein, M., Berglund, L., Havel, P. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* (5):1322-34. doi: 10.1172/JCI37385
76. Sugimoto, K., Hosotani, T., Kawasaki, T., Nakagawa, K., Hayashi, S., Nakano, Y., Inui, H. y Yamanouchi, T. (2010). Eucalyptus leaf extract suppresses the postprandial elevation of portal, cardiac and peripheral fructose concentrations after sucrose ingestion in rats. *J Clin Biochem Nutr.*;46(3):205-11. doi: 10.3164/jcfn.09-93.
77. Taskinen, M., Söderlund, S., Bogl, L., Hakkarainen, A., Matikainen, N., Pietiläinen, K., Räsänen, S., Lundbom, N., Björnson, E., Eliasson, B., Mancina, R., Romeo, S., Alméras, N., Pepa, G., Vetrani, C., Prinster, A., Annuzzi, G., Rivellese, A., Després, J. y Borén, J. (2017). Adverse effects of fructose on cardiometabolic risk factors and hepatic lipid metabolism in subjects with abdominal obesity. *J Intern Med.* 282(2):187-201. doi: 10.1111/joim.12632.
78. Torres, C. (2023). Tesis de magister: efectos antiadipogénicos, antidiabéticos y antioxidantes de compuestos bioactivos del cochayuyo (*Durvillaea antarctica*). Repositorio UCSC.
79. Uldry, M., Thorens, B. 2004. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* 2004 Feb;447(5):480-9. doi: 10.1007/s00424-003-1085-0.
80. Varma, V., Boros, L., Nolen, G., Chang, C., Wabitsch, M., Beger, R. y Kaput, J. (2015). Fructose Alters Intermediary Metabolism of Glucose in Human Adipocytes and Diverts Glucose to Serine Oxidation in the One-Carbon Cycle Energy Producing Pathway. *Metabolites.* 5(2):364-85. doi: 10.3390/metabo5020364.
81. Vilà, L., Roglans, N., Perna, V., Sánchez, R., Vázquez-Carrera, M., Alegret, M., Laguna, J. (2011). Liver AMP/ATP ratio and fructokinase expression are related to gender differences in AMPK activity and glucose intolerance in rats ingesting liquid fructose. *J Nutr Biochem.* 22(8):741-51. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.06.005.
82. Vogel, C., y Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics,* 13(4), 227–232. doi:10.1038/nrg3185
83. Widmer, M., Uldry, M. y Thorens, B. (2005). GLUT8 subcellular localization and absence of translocation to the plasma membrane in PC12 cells and hippocampal neurons. *Endocrinology.* 146(11):4727-36. doi: 10.1210/en.2005-0668
84. Wood, I., Hunter, L. y Trayhurn, P. (2003). Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 308(1):43-9. doi: 10.1016/s0006-291x(03)01322-6.
85. Wood, I., Wang, B., Lorente-Cebrián, S. y Trayhurn, P. (2007). Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 361(2):468-73. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.032.

86. Xiao, C. y Cant, J. (2005). Relationship between glucose transport and metabolism in isolated bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 88(8):2794-805. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72959-3.
87. Zago, L., Zugasti, B., Zuleta, A., Presner, N., Lobbe, V. y De La Plaza, M. (2017).critical analysis of fructose consumption part one. The fructose on nutrition. *Metabolic aspects. Actual. nutr ;* 18(1): 26-36.
88. Zhang, D., Jiao, R. y Kong, L.(2017). High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients.* 9(4):335. doi: 10.3390/nu9040335.
89. Zurita-Corvalan, N., Nanjari, R., Fernández-Cueto, N., Cid-Arnes, MP., Huber-Pérez, T., Solis-Urra, P. y Cristi-Montero, C. (2019). Efecto de la implementación de la "Ley Súper 8" sobre la composición corporal de escolares durante las vacaciones de Fiestas Patrias en Chile. Estudio longitudinal-ecológico. *Nutr. Hosp.* vol.35 no.4 Madrid jul./ago. 2018 Epub 18-Nov-2019. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.1535>

## 9. Anexos.

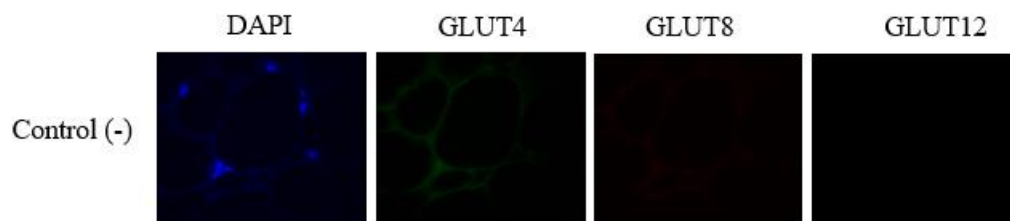
### 9.1. Anexo 1



**Figura S1 Controles (-) de la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TABE de ratones BALB/c:**

Inmunotinción en ausencia del anticuerpo primario, utilizando anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, revelado con diaminobenzidina y contra-tinción nuclear con Hematoxilina de Harris. Se incluye una magnificación 3x para cada caso. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . Control (-): control negativo. GLUT: transportador facilitativo de glucosa.

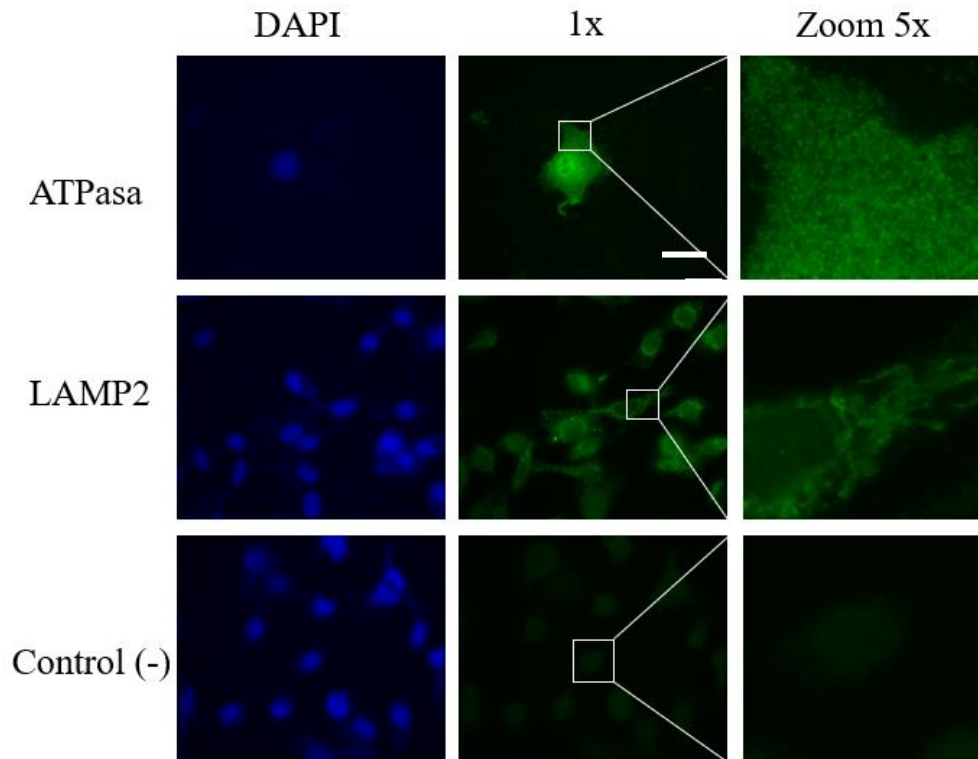
## 9.2 Anexo 2.



**Figura S2. Controles negativos de la expresión de GLUT4, GLUT8 y GLUT12 en TBE de ratones BALB/c**

: Se presenta inmunotinción utilizando anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 para GLUT4 y GLUT12, y Alexa 594 GLUT8 con contra-tinción nuclear con DAPI. Control (-) corresponde a TBE en ausencia de anticuerpo primario de GLUT4, GLUT8 y GLUT12, respectivamente. Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol, control (+): control positivo. Control (-): control negativo. GLUT: transportador facilitativo de glucosa.

### 9.3 Anexo 3



**Figura S3. Controles positivos y negativos de ATPasa Na<sup>+</sup>/k<sup>+</sup> Alpha 1, LAMP2, en células epiteliales de útero humano (HeLa).**

Se presenta inmunotinción utilizando anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 para ATPasa Na<sup>+</sup>/k<sup>+</sup> Alpha 1, LAMP2, con contratinción nuclear con DAPI. Los controles (+) corresponden a células epiteliales de útero humano (HeLa). Las imágenes son representativas de cada grupo. La barra representa 50  $\mu$ m. Se incluye una magnificación de 5x en cada caso. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol; control (+): control positivo; control (-): control negativo.

## Prolab® RMH 3000

### DESCRIPTION

Prolab® RMH 3000 is a 22% protein diet formulated for rats, mice and hamsters in a laboratory setting. This diet is a complete life cycle diet formulated using managed formulation, delivering Constant Nutrition®. This is paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies.

### Features and Benefits

- **Managed Formulation delivers Constant Nutrition®**
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Supports optimum growth and efficient reproduction performance of rats, mice and hamsters
- Utilizes a variety of energy sources to deliver nutrition at an economical cost

Product Forms Available	Catalog #
• Oval pellet, 3/8" x 5/8" x 1", 50 lb	0001495
• Oval pellet, 3/8" x 5/8" x 1", 25 lb	** 0006775
• Meal (ground pellets), 50 lb	** 0005594
• Extruded particle, 15 kg	** 0052583
Irradiated Versions Available	Catalog #
• 5P75 Prolab® IsoPro® RMH 3000, Pelleted, Vacuum Packaged 5 lb, 6 per box (30 lb box)	0006972
• 5P75 Prolab® IsoPro® RMH 3000 Meal (ground pellets), Vacuum Packaged 5 lb, 6 per box (30 lb box)	0036665
• 5P76 Prolab® IsoPro® RMH 3000, 30 lb	3005737-220
• 5P76 Prolab® IsoPro® RMH 3000, Extruded, 20 lb	** 3005984-712
Autoclavable Versions Available	Catalog #
• 5FN4 Prolab® RMH 3500, Pelleted, 25 lb	0006778

\*\* For ordering, contact [info@LabDiet.com](mailto:info@LabDiet.com)

### GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	22.00%
Crude fat not less than	5.00%
Crude fiber not more than	5.00%
Moisture not more than	12.00%
Ash not more than	8.00%

### INGREDIENTS

Ground Wheat, Dehulled Soybean Meal, Wheat Middlings, Ground Corn, Fish Meal, Porcine Animal Fat Preserved with BHA and Citric Acid, Dehydrated Alfalfa Meal, Calcium Carbonate, Brewers Dried Yeast, Soybean Oil, Dicalcium Phosphate, Salt, DL-Methionine, L-Lysine, Choline Chloride, Menadione Dimethylpyrimidinol Bisulfite (Vitamin K), Ferrous Sulfate, Magnesium Oxide, Pyridoxine Hydrochloride, Cholecalciferol (Vitamin D3), Vitamin A Acetate, DL-Alpha-Tocopheryl Acetate (Vitamin E), Vitamin B12 Supplement, Riboflavin Supplement, Zinc Oxide, Manganous Oxide, Ferrous Carbonate, Thiamine Mononitrate, Copper Sulfate, Calcium Pantothenate, Folic Acid, Nicotinic Acid, Zinc Sulfate, Calcium Iodate, Cobalt Carbonate, Biotin, Sodium Selenite.

### FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.

**Rat:** All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

**Mouse:** Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

**Hamster:** Adults will eat up to 14 grams per day.

For information regarding shelf life please visit [www.labdiet.com](http://www.labdiet.com).

09/27/22 RHI-W 9

## 5P00

### CHEMICAL COMPOSITION<sup>1</sup>

<b>Nutrients<sup>2</sup></b>	Iron, ppm	360
<b>Protein, %</b>	Zinc, ppm	110
Arginine, %	Manganese, ppm	100
Cystine, %	Copper, ppm	14
Glycine, %	Cobalt, ppm	0.41
Histidine, %	Iodine, ppm	0.99
Isoleucine, %	Chromium (added), ppm	0.01
Leucine, %	Selenium, ppm	0.41
Lysine, %		
Methionine, %		
Phenylalanine, %		
Tyrosine, %		
Threonine, %		
Tryptophan, %		
Valine, %		
Serine, %		
Aspartic Acid, %		
Glutamic Acid, %		
Alanine, %		
Proline, %		
Taurine, %		
<b>Fat (ether extract), %</b>		
<b>Fat (acid hydrolysis), %</b>		
Cholesterol, ppm		
Linoleic Acid, %		
Linolenic Acid, %		
Arachidonic Acid, %		
Omega-3 Fatty Acids, %		
Total Saturated Fatty Acids, %		
Total Monounsaturated Fatty Acids, %		
<b>Fiber (Crude), %</b>		
Neutral Detergent Fiber <sup>3</sup> , %		
Acid Detergent Fiber <sup>4</sup> , %		
<b>Nitrogen-Free Extract (by difference), %</b>		
Starch, %		
Sucrose, %		
<b>Total Digestible Nutrients, %</b>		
<b>Gross Energy, kcal/gm</b>		
<b>Physiological Fuel Value<sup>5</sup>, kcal/gm</b>		
<b>Metabolizable Energy, kcal/gm</b>		
<b>Minerals</b>		
Ash, %		
Calcium, %		
Phosphorus, %		
Phosphorus (non-phytate), %		
Potassium, %		
Magnesium, %		
Sulfur, %		
Sodium, %		
Chloride, %		
Fluorine, ppm		

### Vitamins

Carotene, ppm	1.2
Vitamin K, ppm	1.9
Thiamin, ppm	9.7
Riboflavin, ppm	14
Niacin, ppm	.60
Pantothenic Acid, ppm	.13
Choline, ppm	1730
Folic Acid, ppm	1.2
Pyridoxine, ppm	8.3
Biotin, ppm	0.40
B <sub>12</sub> , mcg/kg	.77
Vitamin A, IU/gm	.18
Vitamin D, (added), IU/gm	2.5
Vitamin E, IU/kg	.75
Ascorbic Acid, mg/gm	0.0

### Calories provided by:

Protein, %	26.126
Fat (ether extract), %	14.377
Carbohydrates, %	59.497

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.

2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.

3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.

4. ADF = approximately cellulose and lignin.

5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.

**NOTE: When assayed, actual levels may vary from calculated values.**

**LabDiet**  
www.labdiet.com