Facultad Cs. Médicas
Biblioteca
GMD
TDM 2502

FCM Facultad de Ciencias Médicas · UNR

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TESIS DOCTORAL

"REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ABC INTESTINALES Y DE SU FUNCIÓN DE BARRERA BIOQUÍMICA EN UN MODELO DE OBESIDAD. IMPLICANCIA TÓXICO-FARMACOLÓGICA"

Md. María Manuela Barranco

Directora: Dra. Fabiana García

Co-directora: Dra. Silvina Stella Maris Villanueva

Laboratorio de Fisiología Metabólica,

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Rosario, Argentina, 2023

Esta tesis doctoral se llevó a cabo gracias a

Beca interna doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por 60 meses a partir del 1 de abril de 2017. Resolución Nº 004552/16

Al Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET-UNR)

Al Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Al Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario

Agradecimientos

A Felipe Zecchinati, mi gran maestro

A Virginia Perdomo, por enseñarmente amablemente el mundo de la biología molecular

A Matilde Imhoff, por el apoyo y paciencia inconmensurable

A Martín Habib, Nicolás Sigal, María Sylvestre Begnis, Greta Massuh, Bianca Di Carlo, Maciel Singh y Franco Gioberti, que sin ellos esta tesis nunca se hubiese podido realizar

ÍNDICE

DIVULGACIÓN……9

RESUMEN……12

ABREVIATURAS……14

LENGUAJE ESPECIAL……16

NOMENCLATURA PARA LAS SIGNIFICANCIAS ESTADÍSTICAS……17

1. CAPÍTULO UNO: Presentación general. Hipótesis de trabajo……18

1.1. Introducción……18

1.1.1. Intestino delgado. Anatomía y generalidades……18

1.1.2. Barrera intestinal……21

1.1.3. Barrera bioquímica intestinal. Eliminación de xenobióticos ……22

1.1.4. Transportadores ABC……24

1.1.5. Proteína asociada a resistencia a multidrogas 2……26

1.1.5.1. Características generales……26

1.1.5.2. Estructura, localización, sustratos y función……26

1.1.5.3. Implicancia en la biodisponibilidad de fármacos……28

1.1.5.4. Regulación de la expresión y actividad de Mrp2……28

1.1.6. P-Glicoproteína……29

1.1.6.1. Características generales……29

1.1.6.2. Estructura, localización, sustratos y función……29

1.1.6.3. Implicancia en la biodisponibilidad de fármacos……31

1.1.6.4. Regulación de la expresión y actividad de P-gp……32

1.2. Hipótesis……33

1.3. Objetivo general……33

2. CAPÍTULO DOS: Regulación negativa de Mrp2 y P-gp intestinales en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta alta en grasa.

2.1. Introducción……34

2.1.1. Obesidad……34

2.1.1.1. Características generales y epidemiología……34

2.1.1.2. Tratamiento de la obesidad y alteraciones metabólicas asociadas……37

2.1.1.3. Modelos animales de obesidad……38
2.2. Objetivos específicos……40
2.3. Materiales y métodos……41
2.3.1. Reactivos……41
2.3.2. Animales y tratamientos……41
2.3.3. Tratamiento dietético……42
2.3.4. Eutanasia……42
2.3.5. Procedimiento quirúrgico……43
2.3.6. Estudios bioquímicos……44
2.3.6.1. Determinaciones plasmáticas……44
2.3.6.2. Prueba de tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa……44
2.3.6.3. Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina……44
2.3.7. Estudios histológicos por microscopía óptica……45
2.3.7.1. Estudio histológico del tejido adiposo……45
2.3.7.2. Estudio histológico intestinal……45
2.3.8. Aislamiento de ARN total……45
2.3.8.1. Extracción del ARN……45
2.3.8.2. Evaluación de la integridad de los ARNs por electroforesis en gel de agarosa……46
2.3.8.3. Determinación de la concentración y pureza de los ARNs……46
2.3.9. Retrotranscripción……46
2.3.10. Estudios de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real……47
2.3.11. Evaluación de la actividad de Mrp2 ……48
2.3.12. Evaluación de la actividad de P-gp……50
2.3.13. Estudio de permeabilidad paracelular en sacos intestinales no evertidos……51
2.3.14. Detección de peroxidación lipídica……52
2.3.15. Medición de glutatión total y oxidado……52
2.3.16. Actividad de enzimas antioxidantes……53
2.3.16.1. Determinación de la actividad superóxido dismutasa……53
2.3.16.2. Determinación de la actividad catalasa……54
2.4. Análisis estadístico……54
2.5. Resultados……55

2.5.1. Verificación del metabolismo glucémico basal en ratones C57BL/6……..55
2.5.2. Efecto de la dieta alta en grasa en los parámetros morfológicos y en el consumo de bebida/ alimento……..55
2.5.3. Efecto de la dieta alta en grasa en los parámetros bioquímicos.……..57
2.5.4. Efecto de la dieta alta en grasa en las características histológicas ……..57
2.5.5. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de Mrp2 intestinal en ratones C57BL/6……60
2.5.6. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de P-gp intestinal en ratones C57BL/6……61
2.5.7. Efecto de la dieta alta en grasa en la permeabilidad paracelular intestinal……63
2.5.8. Efecto de la dieta alta en grasa en el balance redox y las defensas antioxidantes ……63
2.5.9. Efecto de la dieta alta en grasa en el nivel de las citoquinas proinflamatorias intestinales……64
2.6. Discusión y conclusiones parciales……66

3. CAPÍTULOS TRES: Rol de la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α en la regulación de los transportadores Mrp2 y P-gp intestinales en ratones alimentados con dieta alta en grasa

3.1. Introducción……71
3.1.1. Obesidad e inflamación……71
3.1.2. Obesidad y barrera intestinal……73
3.1.3. Factor de necrosis tumoral-α……74
3.1.4. Modelo de ratón *knockout* para el receptor 1 de TNF-α……77
3.2. Objetivo específico……78
3.3. Materiales y métodos……79
3.3.1. Reactivos……79
3.3.2. Animales y tratamientos……79
3.3.3. Tratamiento dietético……80
3.3.4. Eutanasia……80
3.3.5. Procedimiento quirúrgico……80
3.3.6. Estudios bioquímicos……80
3.3.6.1. Determinaciones plasmáticas……80

3.3.6.2. Prueba de tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa……..80
3.3.6.3. Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina……..80
3.3.7. Estudios histológicos de tejido adiposo……..81
3.3.8. Estudios de Inmuhistoquímica……81
3.3.9. Obtención de membranas de ribetes en cepillo (BBM)……..81
3.3.10. Estudios de *Western blot*……..82
3.3.11. Aislamiento de ARN total……..83
3.3.11.1. Extracción del ARN……83
3.3.11.2. Evaluación de la integridad de los ARNs por electroforesis en gel de agarosa……..83
3.3.11.3. Determinación de la concentración y pureza de los ARNs……83
3.3.12. Retrotranscripción……..83
3.3.13. Estudios de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real……83
3.3.14. Evaluación de la actividad de Mrp2 ……..84
3.3.15. Evaluación de la actividad de P-gp ……..84
3.3.16. Medición de los niveles tisulares de TNF-α……84
3.4. Análisis estadístico……..85
3.5. Resultados……86
3.5.1. Verificación del metabolismo glucémico basal en ratones C57BL/6 y R1KO……..86
3.5.2. Efecto de la dieta alta en grasa en los parámetros fisiológicos y bioquímicos en ratones C57BL/6 y R1KO: establecimiento del modelo de obesidad ……86
3.5.3. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de Mrp2 intestinal en ratones C57BL/6 y R1KO……88
3.5.4. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de P-gp intestinal en ratones C57BL/6 y R1KO……89
3.5.5. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión intestinal de TNF-α……91
3.6. Discusión y conclusión parcial……93

4. CAPÍTULO CUATRO: Efecto de la disminución de la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales en la administración de quimioterapia metronómica en un modelo de adenocarcinoma de mama murino

4.1. Introducción……97

4.1.1. Obesidad y cáncer……..97
4.1.2. Terapias contra el cáncer……..99
4.1.3. Transportadores ABC y cáncer……..101
4.1.4. Modelo animal para el estudio del cáncer: ratón CBi……..102
4.2. Objetivo específico……..104
4.3. Materiales y métodos……105
4.3.1. Reactivos……..105
4.3.2. Animales y tratamientos……105
4.3.3. Eutanasia……107
4.3.4. Procedimiento quirúrgico……107
4.3.5. Estudios bioquímicos……..107
4.3.5.1. Determinaciones plasmáticas……..107
4.3.5.2. Prueba de tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa……107
4.3.5.3. Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina……..108
4.3.6. Análisis histológicos de tejido adiposo……108
4.3.7. Aislamiento de ARN total……108
4.3.7.1. Extracción del ARN……108
4.3.7.2. Evaluación de la integridad de los ARNs por electroforesis en gel de agarosa……108
4.3.7.3. Determinación de la concentración y pureza de los ARNs……108
4.3.8. Retrotranscripción……108
4.3.9. Estudios de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real……108
4.3.10. Evaluación de la actividad de Mrp2……109
4.3.11. Evaluación de la actividad de P-gp ……109
4.4. Análisis estadístico……109
4.5. Resultados……110
4.5.1. Características generales de los ratones CBi machos……110
4.5.2. Efecto de la dieta alta en grasas en los parámetros fisiológicos y bioquímicos en ratones CBi: establecimiento del modelo de obesidad ……111
4.5.3. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad intestinal de Mrp2 y P-gp en ratones CBi……113

4.5.4. Efecto de la dieta alta en grasa en la evolución tumoral y respuesta a la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida……115
4.5.5. Variación del peso corporal desde el inicio de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida ……116
4.5.6. Variación en el recuento de glóbulos blancos luego de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida……118
4.5.7. Parámetros morfológicos y bioquímicos luego de 20 semanas de dieta y quimioterapia metronómica ……119
4.5.8. Actividad de Mrp2 y P-gp intestinales luego de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida……120
4.6. Discusión y conclusiones parciales……121
CONCLUSIÓN GENERAL……124
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……126

DIVULGACIÓN

Los resultados presentados en este trabajo fueron dados a conocer en una publicación y en doce reuniones científicas:

Publicaciones

"Downregulation of intestinal multidrug resistance transporter 1 in obese mice: Effect on its barrier function and role of TNF-α receptor 1 signaling." **Barranco MM**, Perdomo VG, Zecchinati F, Manarin R, Massuh G, Sigal N, Vignaduzzo S, Mottino AD, Villanueva SSM, García F. Nutrition, 2023, 111, 112050. https://doi.org/10.1016/j.nut.2023.112050.

"Toxic effect of cyclophosphamide metronomic chemotherapy in obese mice bearing a mammary adenocarcinoma: implication of intestinal ABC transporters". **Barranco MM**, Habib MJ, Zecchinati F, Perdomo VG, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, Villanueva SSM, Mainetti LE, García F. (*en preparación).*

Reuniones Científicas

- Downregulation of intestinal multidrug resistance protein 2 in obese mice is regulated independently of cytokines profile**. Barranco MM**, Perdomo VG, Zecchinati F, Manarin R, Massuh G, Sigal N, Vignaduzzo S, Mottino AD, Villanueva SSM, García F. Reunión Anual de Sociedades de Biociencias SAIC-SAFIS-SAI. Noviembre 2022. Revista Medicina 82 (5), 2022.

- Role of TNF-α receptor 1 signaling on downregulation of intestinal P-glycoprotein by high-fat diet in mice**. Barranco MM**, Perdomo VG, Zecchinati F, Manarin R, Massuh G, Sigal N, Vignaduzzo S, Mottino AD, Villanueva SSM, García F. Reunión anual de la Sociedad de Fisiología-SAFIS y la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas-ALACF. Octubre 2021.

- Altered therapeutic response to metronomic chemotherapy in a metabolic syndrome model of mice bearing a mammary adenocarcinoma: implication of intestinal ABC transporters. **Barranco MM**, Habib M, Di Carlo B, Sigal N, Sylvestre Begnis M, Zecchinati F, Del Giúdice A, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, Villanueva SSM, García F, Mainetti, LE. Asociación Americana para la Investigación del Cáncer. Abstract nr 1125; AACR's Journals; 2021.

- Eficacia de la quimioterapia metronómica con metformina y ciclofosfamida en un modelo de adenocarcinoma de mama murino triple negativo en ratones sometidos a una dieta rica en grasas. Lanzillotta M, **Barranco MM**, Habib MJ, Sylvestre Begnis M, Massuh G, Sigal N, Del Giúdice A, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, García F, Mainetti LE. XXI Congreso y XXXIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre 2019.

- Development of a new murine model of metabolic syndrome after feeding with high-fat diet in female CBi mice. **Barranco MM**, Sylvestre Begnis M, Habib MJ, Lanzilotta M, Del Giúdice A, Rico MJ, Scharovsky OG, García F, Mainetti LE, Rozados VR. Reunión Anual de Sociedades de Biociencias SAIC-SAFE-SAB-SAP. Noviembre 2019. Revista Medicina 79 (4), 2019.

- Activity of intestinal efflux pumps in M-406 mammary adenocarcinoma bearing mice with Metabolic Syndrome (MS) treated with cyclophosphamide (Cy) Metronomic Chemotherapy (MC). **Barranco MM**, Habib M, Di Carlo B, Sigal N, Sylvestre Begnis M, Zecchinati F, Del Giudice A, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, Villanueva SSM, García F, Mainetti LE. Reunión Anual de Sociedades de Biociencias SAIC-SAFE-SAB-SAP. Noviembre 2019. Revista Medicina 79 (4), 2019.

- Efecto de la quimioterapia metrónomica en ratones con síndrome metabólico portadores de un adenocarcinoma mamario. Habib MJ, **Barranco MM**, Di Carlo B, Sigal N, Sylvestre Begnis M, Zecchinati F, Del Giúdice A, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, Villanueva SSM, Mainetti LE, García F. XIII Jornada de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Rosario. Octubre 2019.

- Efecto de la quimioterapia metrónomica en ratones con síndrome metabólico portadores de un adenocarcinoma mamario. Habib MJ, **Barranco MM**, Di Carlo B, Sigal N, Sylvestre Begnis M, Zecchinati F, Del Giúdice A, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, Villanueva SSM, Mainetti LE, García F. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre 2018. BIOCELL 43 (2), A38, 2019.

- Evaluación histológica y bioquímica en un modelo murino de síndrome metabólico. Di Carlo B, **Barranco MM**, Sigal N, Habib MJ, Sylvestre Begnis M, Zecchinati F, Villanueva SSM, Perdomo V, García F. XX Congreso y XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Noviembre 2018. BIOCELL 43 (2), A38, 2019.

- Reduction of intestinal Mrp2 and P-gp activities in a high fat diet model. **Barranco MM**, Sigal N, Zecchinati F, Sylvestre Begnis M, Di Carlo B, Habib MJ, Arana M, Vignaduzzo S, Perdomo V, Villanueva SSM, García F. LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Noviembre 2018. Revista Medicina 78 (3) 255, 2018.

- Metabolic syndrome: development of a new murine model. **Barranco MM**, Habib MJ, Di Carlo B, Sigal N, Sylvestre Begnis M, Zecchinati F, Del Giúdice A, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, Villanueva SSM, Mainetti LE, García F. LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Noviembre 2018. Revista Medicina 78 (3) 430, 2018.

- Evaluación del efecto de la presencia de un tumor mamario en animales sometidos a una dieta rica en grasas. Chiaraluce FL, **Barranco MM**, Zecchinati F, Cilenzo AA, Rozados VR, Rico MJ, Villanueva SSM, Scharovsky OG, Mainetti LE, García F. XIX Congreso y XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Diciembre 2017. BIOCELL 42 (4), A19, 2018.

RESUMEN

La proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (Mrp2) y la P-glicoproteína (P-gp) son bombas de eflujo localizadas en la membrana apical de los enterocitos, Mrp2 está predominantemente en yeyuno y P-gp en íleon; y junto con las enzimas metabolizadoras de fase I y II, constituyen la barrera bioquímica intestinal al disminuir la absorción de xenobióticos y fármacos incorporados oralmente, limitando su biodisponibilidad. La expresión y/o actividad de Mrp2 y P-gp puede alterarse en patologías inflamatorias, como en el síndrome metabólico (SM). La obesidad es uno de los determinantes del SM y de la generación de inflamación crónica sistémica. El objetivo de esta tesis fue evaluar la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales, en un modelo murino de obesidad e indagar en los mecanismos regulatorios involucrados y las implicancias tóxico-farmacológicas de un sustrato.

Primeramente, se evaluó la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales y el perfil inflamatorio localmente desarrollado en ratones macho adultos C57BL/6; que se dividieron en grupo control (C57-C) alimentado con dieta estándar y grupo HFD (*high fat diet*, C57-HFD) alimentado con dieta estándar enriquecida con 40% de grasa bovina, por 16 semanas. Al finalizar, C57-HFD incrementó el peso corporal, el índice adiposo, los niveles de glucemia, colesterolemia, trigliceridemia y presentó insulinorresistencia respecto a C57-C. La obesidad inducida por la dieta disminuyó la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp y aumentó la expresión de TNF-α, IL-1β e IL-6 intestinales.

Posteriormente se estudió la influencia de la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α (TNFR1, asociado a genes proinflamatorios) en la disminución de Mrp2 y P-gp, utilizando ratones *knockout* para este receptor; que se dividieron en R1KO-C y R1KO-HFD (40% de grasa). Luego de 16 semanas, R1KO-HFD aumentó su peso corporal, el tejido adiposo epididimal, los niveles de colesterolemia y trigliceridemia respecto a R1KO-C. No se hallaron diferencias en las glucemias o insulinorresistencia en R1KO-HFD respecto de R1KO-C. Sin embargo, los transportadores mostraron diferente comportamiento, Mrp2 disminuyó en R1-HFD respecto a R1KO-C. Contrariamente, en R1KO-HFD la expresión y actividad intestinal de P-gp fue similar a R1KO-C. Esto implicaría una probable regulación de P-gp por la vía de señalización de TNFR1.

Finalmente, se evaluó la implicancia tóxico-farmacológica asociada a la disminución de Mrp2 y P-gp intestinales en ratones en condiciones de obesidad portadores de un adenocarcinoma mamario sometidos a quimioterapia metronómica (QTM) con ciclofosfamida (Cy). Se utilizaron ratones CBi macho adulto, que se dividieron en CBi-C o CBi-HFD (40% de grasa). A las 16 semanas de dieta, se

les inoculó el tumor e inició la QTM con Cy (30 mg/kg/día) en el agua de bebida. Los ratones CBi-HFD+Cy presentaron leucopenia y descenso del peso corporal en más del 20%. Además la QTM fue menos efectiva en CBi-HFD.

Conclusión, el modelo de obesidad generado por HFD disminuye la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales. La respuesta inflamatoria mediada por TNF-α/TNFR1 sería parcialmente responsable de las alteraciones de P-gp. La alteración de la barrera bioquímica intestinal producida por la dieta alta en grasa generaría toxicidad farmacológica.

ABREVIATURAS: en orden alfabético

ABC: proteína de tipo casete de unión al ATP *(*del inglés *ATP Bindig Cassette)*

ADN: ácido desoxiribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ASK-1: quinasa 1 reguladora de señal de apoptosis-1 (del inglés *apoptosis signal-regulating kinase)*

ATP: adenosina trifosfato *(*del inglés *AdnosinTriPhosphate)*

BSA: albúmina sérica bovina (del inglés *Bovine Serum Albumin*)

CAT: catalasa

CDNB: 1-cloro-2,4-dinitrobenceno *(*del inglés *1-Chloro-2,4-dinitrobenzene)*

Cel: célula

Cy: ciclofosfamida

CYP: citocromo P450

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DEPC: pirocarbonato de dietilo *(*del inglés *Diethyl pyrocarbonate)*

DIO: obesidad inducida por dieta *(*del inglés *Diet induced obesity)*

DMT2: diabetes mellitus tipo 2

DNP-SG: dinitrofenil-S-glutatión *(*del inglés *2,4-dinitrophenyl-S-glutathione)*

DTNB: 5,5'-ditio-bis-[ácido 2-nitrobenzoico] (del inglés *5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid*)

DTT: ditiotreitol

FADD: proteína FAS asociada al dominio de muerte (del inglés *FAS associated death domain protein*)

FICT: isotiocianato de fluoresceína-dextrano (del inglés *Fluorescein isothiocyanate–Dextran*)

GALT: tejido linfoide asociado al intestino (del inglés *Gut-associated lymphoid tissue)*

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GSH: glutatión reducido

GSSH: glutatión oxidado

HE: hematoxilina-eosina

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (del inglés *human epidermal growth factor receptor 2)*

HFD: Dieta alta en grasa (del inglés *High Fat Diet)*

HPLC: cromatografía líquida de alta performance (del inglés *high performance liquid chromatography*)

IKK: complejo de quinasas IκBα (del inglés *IκBα kinase*)

IL: Interleuquina

IMC: Índice de Masa Corporal

LPS: lipopolisacárido

MAP3K: proteína quinasa quinasa quinasa 3 activada por mitógenos (del inglés *mitogen activated protein kinase kinase kinase*)

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés *mitogen activated protein kinase*)

MDR resistencia a múltiples fármacos (del inglés *multidrug resistance*)

Mrp2: Proteína de Resistencia a Multidrogas 2 *(*del inglés *Multidrug Resistance Protein-2)*

mTOR: proteína diana de rapamicina en células de mamífero (del inglés*, mammalian Target of Rapamycin*).

NBD: dominio de unión a nucleótido (del inglés *nucleotide-binding domain*)

NBT nitroazul de tetrazolio azul (del inglés *Nitro Blue Tretazolium*):

ND: no detectable

NEMO: modulador esencial de NF-κB (del inglés *NF-kB essential modulator)*.

NF-κB: factor nuclear-kappa B (del inglés *nuclear factor kappa B*)

ns: no significativo

OMS: Organización Mundial de la Salud

p.c.: peso corporal

PBS: *buffer* fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

P-gp: P-glicoproteína

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés *PhenylMethylSulfonyl Fluoride):*

PTIG: Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a Glucosa

PTII: Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a Insulina

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés quantitative *Polymerase Chain Reaction)*

QTM: Quimioterapia Metronómica

RIP-1: proteína-1 de interacción con el receptor (del inglés *receptor interacting protein-1*),

ROS: especies reactivas del oxígeno (del inglés *reactive oxygen species*)

rpm: revoluciones por minuto

s.c.: subcutáneo

SM: Síndrome Metabólico

SOD: superóxido dismutasa

SODD: proteína silenciadora del dominio de muerte (del inglés *silencer of death domain*)

SSA: ácido sulfosalicílico (del inglés *5-sulfosalicylic acid*)

TAK1: quinasa activada por el factor de crecimiento transformante beta (del *inglés transforming growth factor beta-activated kinase 1)*

TBARS: sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (del inglés *ThioBarbituric Acid Reactive Substances)*

TBD: dominio de unión transmembrana (del inglés *transmembrane-binding domain)*

TNBC: cáncer de mama triple negativo (del inglés *triple negative breast cáncer)*

TNFR1: receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral (del inglés *Tumor Necrosis Factor receptor 1)*

TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral-α (del inglés *Tumor Necrosis Factor)*

TRADD: proteína asociada al dominio de muerte de TNFR1 (del inglés *TNFR1- asociated death domain*)

TRAF2: factor 2 asociado a TNFR1 (del inglés *TNFR1 associated factor 2*)

UGT: uridina difosfato-glucuronosil transferasa

UI: unidades internacionales

V: volumen

LENGUAJE ESPECIAL: en orden alfabético

Ad libitum: a gusto, a voluntad.

Buffer: solución amortiguadora o reguladora del pH de una disolución frente a la adición de cantidades pequeñas de ácidos o bases fuertes.

In vitro: técnica para realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

Knockout: organismo que ha sido genéticamente diseñado para carecer de uno o más genes específicos.

Stock: formulación concentrada de una solución.

Wild type: forma más común de un individuo que predomina en la población. En genética se considera como la versión "normal" de un organismo.

NOMENCLATURA PARA LAS SIGNIFICANCIAS ESTADÍSTICAS

a: significativamente diferente de C57-C, P<0,05

b: significativamente diferente de C57-C, P<0,01

c: significativamente diferente de C57-C, P<0,001

d: significativamente diferente de C57-C, P<0,0001

e: significativamente diferente de R1KO-C, P<0,05

f: significativamente diferente de R1KO-C, P<0,01

g: significativamente diferente de R1KO-C, P<0,001

h: significativamente diferente de R1KO-C, P<0,0001

i: significativamente diferente de CBi-C, P<0,05

j: significativamente diferente de CBi-C, P<0,01

k: significativamente diferente de CBi-C, P<0,001

l: significativamente diferente de CBi-C, P<0,0001

m: significativamente diferente de R1KO-HFD, P<0,05

n: significativamente diferente de C57-HFD, P<0,05

ñ: significativamente diferente de CBi-C+Cy, P<0,05

o: significativamente diferente de CBi-C+Cy, P<0,01

CAPÍTULO 1: presentación general. Hipótesis

1.1 Introducción

1.1.1 Intestino delgado. Anatomía y generalidades

El intestino delgado forma parte del tracto gastrointestinal que junto con los órganos digestivos accesorios integran al aparato digestivo (Fig. 1.1). Funcionalmente . Para cumplir con su función es necesario ingerir alimentos, transportarlos en dirección cefálico-caudal, someterlos a digestión mecánica y química y absorber los productos de degradación. Los productos alimenticios no digeridos o no absorbibles son eliminados con las heces, en el proceso de defecación (Guyton y Hall, 2011).

El tracto gastrointestinal comprende seis segmentos: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado con sus tres porciones, duodeno, yeyuno e íleon y el intestino grueso con sus cuatro porciones, ciego, colon, recto y ano (Fig. 1.1).

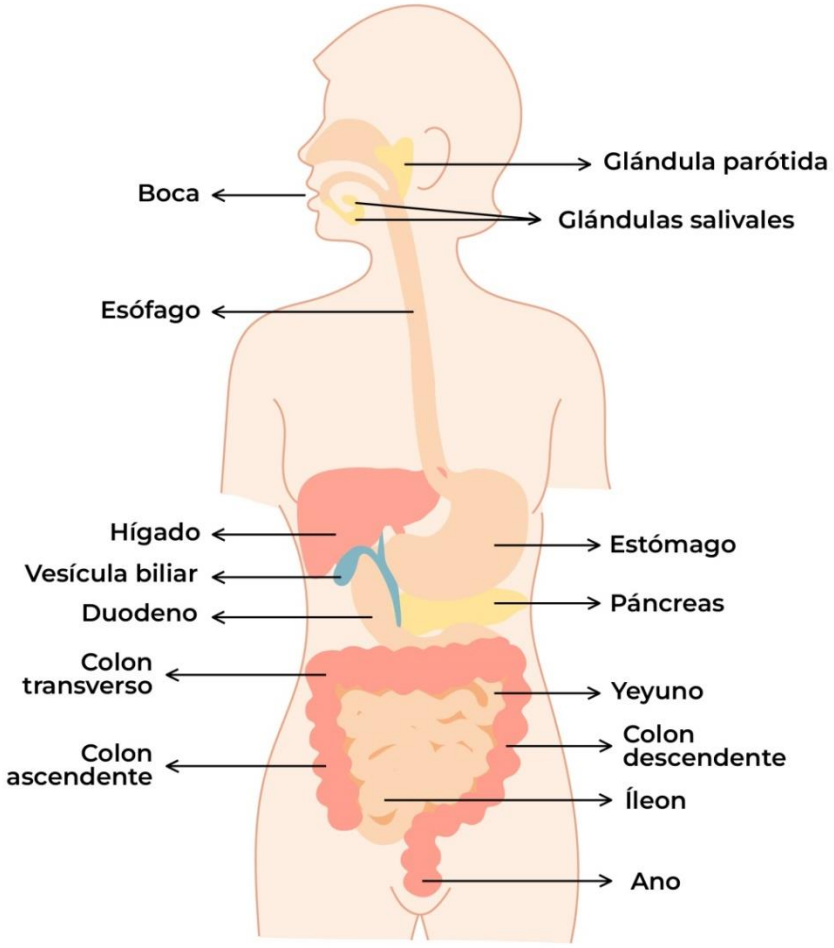


Figura 1.1. Esquema del aparato digestivo.

La pared del tracto gastrointestinal varía a lo largo de su longitud, sin embargo algunos aspectos estructurales son comunes a todos los segmentos, especialmente en las porciones comprendidas entre el esófago y el ano. Presenta una pared continua compuesta por 4 capas, desde la superficie a la profundidad son: la túnica mucosa, la túnica submucosa, la túnica muscular y la túnica serosa (Fig. 1.2).

La túnica mucosa, está compuesta por un revestimiento epitelial cilíndrico simple, una capa subyacente de tejido conectivo laxo, denominada lámina propia y una delgada capa muscular lisa, denominada lámina muscular de la mucosa.

La túnica submucosa es una capa de tejido conectivo laxo ubicada por debajo de la túnica mucosa, que presenta gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos.

La túnica muscular es una capa gruesa de músculo liso, que rodea la submucosa en casi todo el tubo digestivo, excepto en ciertas partes del esófago, donde hay músculo estriado esquelético. En su mayoría, se dispone en dos capas, la capa interna de fibras circulares y la capa externa de fibras longitudinales.

La túnica serosa está compuesta por una capa delgada de tejido conectivo laxo, que se dispone desde la porción inferior del esófago hasta el inicio del recto. La faringe, la mayor parte del esófago y el recto carecen de serosa, en su lugar están rodeados por una capa de tejido conectivo denominada adventicia.

En el **intestino delgado** continúan los procesos de digestión química y transporte además es el principal sitio de absorción de nutrientes, por ello su extensa longitud, de 5 a 8 metros, desde su inicio en el píloro gástrico hasta su terminación en el ciego. Macroscópicamente, se divide en tres porciones:

- El **duodeno** constituye los primeros 25-35 cm del intestino delgado, comienza en la válvula pilórica, forma un arco alrededor de la cabeza del páncreas y termina en el ángulo o flexura duodenoyeyunal. En él desembocan el cónducto colédoco y el conducto pancreático principal (conducto de Wirsung), formando la ampolla hepatopancreática (ampolla de Vater).
- El **yeyuno** comienza en el cuadrante superior izquierdo del abdomen ubicándose básicamente dentro de la región umbilical, presenta una extensión de 1 a 2,5 metros. En este segmento se lleva a cabo la mayor parte de la digestión y absorción, motivo por el cual esta región está altamente irrigada y posee numerosos y grandes pliegues.

- El **íleon** ocupa principalmente la región hipogástrica y parte de la cavidad pélvica, presenta una extensión de 1,6 a 3,5 metros. Está menos irrigado y sus pliegues son más pequeños y en menor cantidad.

El contenido gástrico o quimo, proveniente del estómago, ingresa en el duodeno, donde junto con las enzimas pancreáticas y la secreción biliar hepática, continúa el proceso de digestión química. A lo largo de la pared del intestino delgado hay enzimas (disacaridasas, dipeptidasas, entre otras) que contribuyen con el proceso digestivo completando la degradación de los carbohidratos y proteínas en monosacáridos y aminoácidos respectivamente, que posteriormente se absorben.

La capacidad de la túnica mucosa intestinal de absorber los componentes degradados se ve favorecida por distintas especializaciones que aumentan notablemente la superficie de contacto luminal:

- Los pliegues circulares o válvulas de Kerckring, compuestos por la túnica mucosa y submucosa; son estructuras continuas de hasta 1 cm de altura, especialmente desarrolladas en el yeyuno, faltan en los primeros 4-5 cm del duodeno y desaparecen en forma gradual en el íleon. Aumentan la superficie de la túnica mucosa unas 3 veces.
- Las vellosidades intestinales, evaginaciones digitiformes de la túnica mucosa de 1mm, compuestas por un núcleo de tejido conectivo laxo que pertenece a la lámina propia, recubierta por epitelio superficial. Aumentan la superficie de la túnica mucosa unas 10 veces.
- Las criptas de Lieberkühn, glándulas tubulares simples de unos 400 µm de profundidad entre las vellosidades, extendiéndose a través de casi toda la lámina propia hasta la túnica muscular.
- El borde en cepillo del enterocito compuesto de microvellosidades paralelas muy juntas, de 1 µm de largo y 0,1 µm de espesor que aumentan la superficie de la membrana mucosa del enterocito unas 20 veces

El epitelio de la túnica mucosa está compuesto de seis tipos de células: células absortivas, células caliciformes o *Globet*, células de Paneth, células enteroendócrinas, células madres pluripotenciales y células M (Fig. 1.2).

Las células absortivas o enterocitos, son células cilíndricas altas, con núcleo de localización basal, que en su superficie libre o apical, presentan el borde en cepillo. Su plasmalema está recubierto por glucocáliz compuesto por una capa gruesa de filamentos que en el extremo de la microvellosidad forma una cubierta superficial compacta. El citoplasma contiene numerosas

mitocondrias y un retículo endoplasmático liso bastante desarrollado. La superficie celular lateral forma complejos de contacto yuxtaluminales o *zonula occludens,* que son sitios de unión estrecha, que limitan el transporte paracelular (Geneser, 2007; Ruiz Liard y col. 2007).

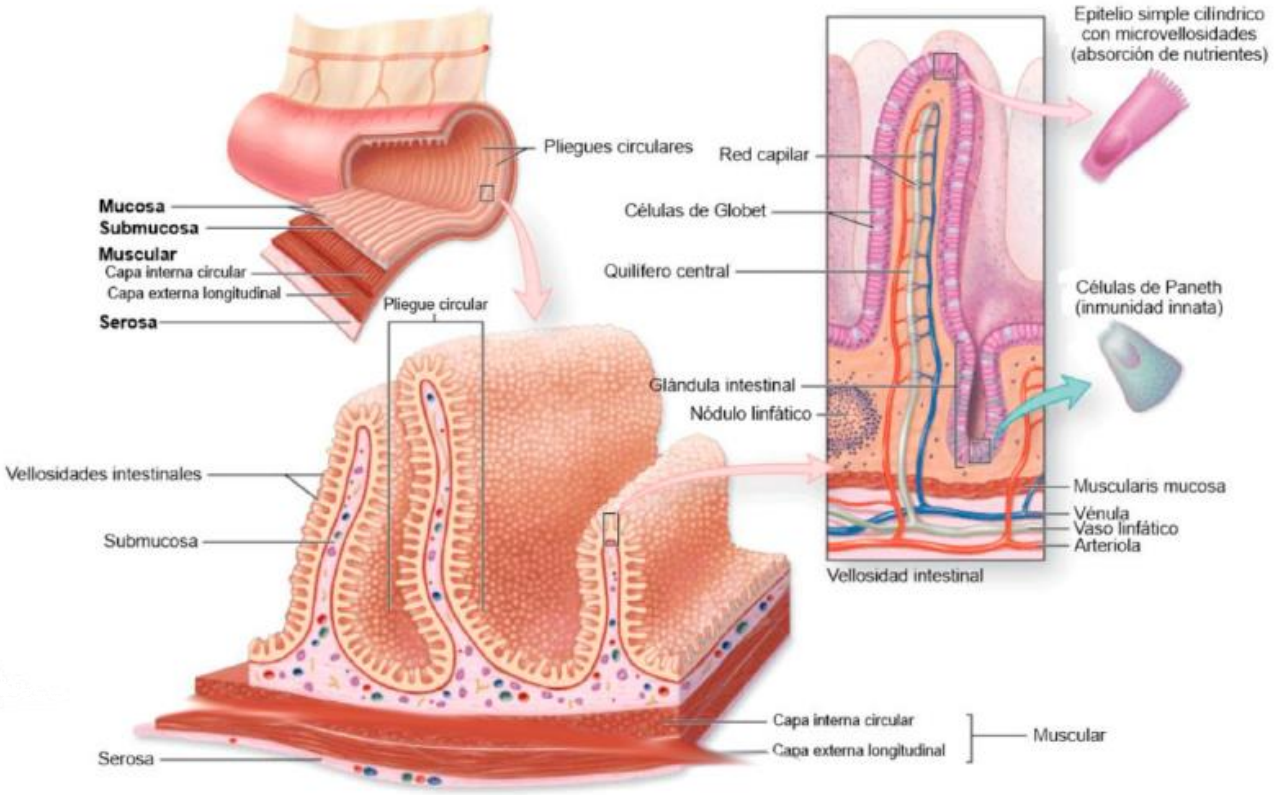


Figura 1.2. Histología del intestino delgado. Extraído de Junqueira y Mescher*, Basic Histology, Text & Atlas*, 16ª edición, editorial McGraw-Hill Education.

1.1.2. Barrera intestinal

El aparato digestivo es una de las puertas de entrada de sustancias ajenas a nuestro organismo, por ello presenta una barrera para proteger al huésped de las toxinas, antígenos alimentarios, bacterias y otras sustancias potencialmente peligrosas. La barrera intestinal es polifacética y comprende estrategias, físicas como bioquímicas, entre ellas la renovación constante de su epitelio, el sistema inmunitario de la mucosa y la microbiota intestinal (Rohr y col. 2020; Di Tommaso y col. 2021).

El sistema inmunitario de la mucosa, o tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés *gut-associated lymphoid tissue*), consiste en diferentes entidades de tejidos linfoides organizados que incluyen las placas de Peyer, folículos linfoides aislados y los ganglios linfáticos mesentéricos (Villanueva y col. 2020).

La barrera física intestinal está formada por el epitelio y la capa de moco intestinal. El epitelio intestinal es impermeable a los solutos hidrófilos, por ello las moléculas y nutrientes solo pueden atravesarlo a través de transportadores específicos. Existen dos vías principales: la transcelular, que incluye poros acuosos y transportadores activos y la vía paracelular, regulada por las uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones gap. La capa de moco, está compuesta principalmente por agua y las proteínas MUC2 y MUCA5C, producidas por las células caliciformes (González-Quilen y col. 2020; Muehler y col. 2020; Yu y col. 2019).

La barrera bioquímica intestinal, en la membrana apical del enterocito, está formada por los transportadores de tipo casete de unión a ATP (ABC, del inglés *ATP binding casette*), por las enzimas de metabolización de fase I y las enzimas de conjugación de fase II (Boron y Boulpaep, 2017, Zecchinati y col. 2021).

1.1.3. Barrera bioquímica intestinal. Eliminación de xenobióticos

La barrera bioquímica intestinal tiene como función impedir la entrada de sustancias potencialmente tóxicas o xenobióticos.

Los xenobióticos son compuestos extraños para el organismo, como fármacos, aditivos alimenticios, contaminantes ambientales, carcinógenos químicos, insecticidas, entre otros; que pueden producir una gran variedad de efectos biológicos, desde respuestas terapéuticas, toxicidad, reacciones inmunológicas, inclusive cáncer.

Cuando uno de estos compuestos ingresa por el aparato digestivo, el intestino delgado es el órgano encargado de su metabolismo y detoxificación inicial, es por ello que los enterocitos los metabolizan mediante reacciones de biotransformación que, por lo general, se realizan en tres fases (Dietrich y col. 2003).

Las reacciones de la fase I son reacciones de hidroxilación, desalquilación y deshalogenación catalizadas en gran parte por citocromos P-450, que tienen como fin generar un compuesto más polar.

En las reacciones de la fase II, se conjugan los metabolitos generados en la fase I para producir compuestos más hidrofílicos y favorecer su pasaje a la sangre o su excreción a la luz intestinal.

Los tres tipos principales de las reacciones de conjugación son:

1. Conjugación con ácido glucurónico a través de la uridina difosfato-glucuronosil transferasa.
2. Conjugación con grupo sulfo a través de sulfotransferasas.

3. Conjugación con glutatión. a través de la glutation-S-transferasa.

La participación de estos múltiples sistemas enzimáticos facilita la rápida eliminación de sustancias tóxicas y proporciona vías alternativas de detoxificación.

En la fase III participan bombas de eflujo pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC localizadas en la membrana apical del enterocito, involucradas en la excreción de moléculas hacia la luz intestinal para su posterior eliminación (Fig. 1.3) (Boron y Boulpaep, 2017; Estudante y col. 2013).

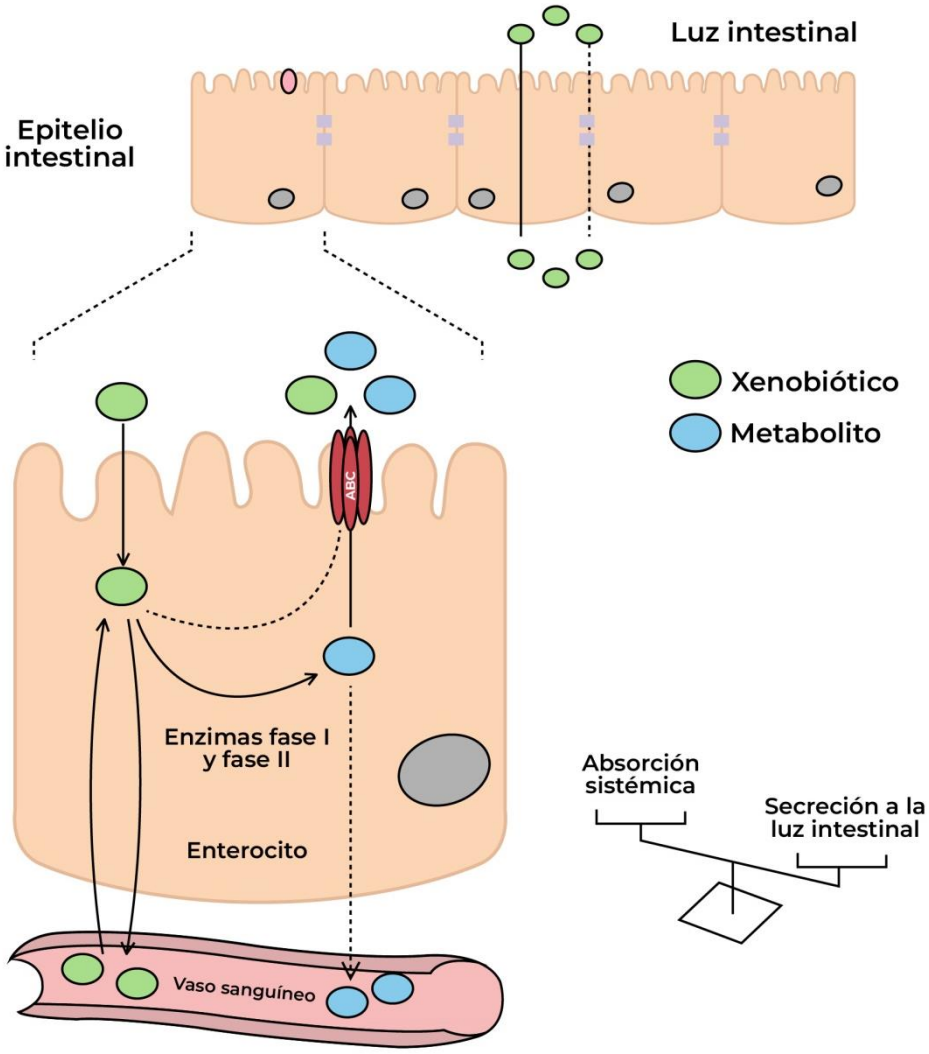


Figura 1.3. Esquema de la eliminación intestinal de xenobióticos. Una vez dentro del tubo digestivo los xenobióticos (círculos verdes) dependiendo de su tamaño e hidrofobicidad pueden ingresar a la circulación sistémica por la vía paracelular o transcelular. La vía transcelular implica el ingreso de los xenobióticos al enterocito por difusión simple o facilitada, una vez dentro de la célula, pueden atravesar la membrana basolateral directamente para incorporarse a la circulación sistémica, o metabolizarse por enzimas de fase I y II. Los productos generados por acción de estas enzimas (círculos celestes), son secretados hacia la luz intestinal por los transportadores ABC. En síntesis estos trasportadores cumplen un rol fundamental en el balance entre la absorción y excreción de los xenobióticos.

1.1.4. Transportadores ABC

Los transportadores ABC son un grupo de proteínas transportadoras de membrana. Conforman una de las mayores y mejor caracterizada superfamilia de proteínas. Se encuentran presentes en bacterias, hongos, plantas y animales y están involucrados en una gran variedad de procesos fisiológicos. En humanos, existen 48 genes que los codifican y se dividen en 7 subfamilias según las similitudes en su secuencia (ABCA-ABCG) (Tabla 1.1). (Estudante y col. 2013).

Estas proteínas funcionan como transportadores activos primarios dependientes de la hidrólisis de ATP para la translocación de sus sustratos en contra de su gradiente. En general, presentan una estructura de cuatro dominios integrada por dos dominios citoplasmáticos de unión a nucleótidos (NBD, del inglés *nucleotide-binding domain*) que unen e hidrolizan ATP y dos dominios transmembrana (TMD, del inglés *transmembrane-binding domain*) que reconocen y transportan a sus sustratos (Chen y col. 2016). Mientras la estructura y la función de los NBD son similares en todas las familias, los TMD son muy heterogéneos, esto permite a los transportadores reconocer diversos sustratos (Fig. 1.4) (Robey y col. 2018). Algunas de estas proteínas son hemitransportadores con un solo TMD y un NBD que deben dimerizarse para ser funcionales, mientras que otras contienen dominios adicionales que regulan su actividad.

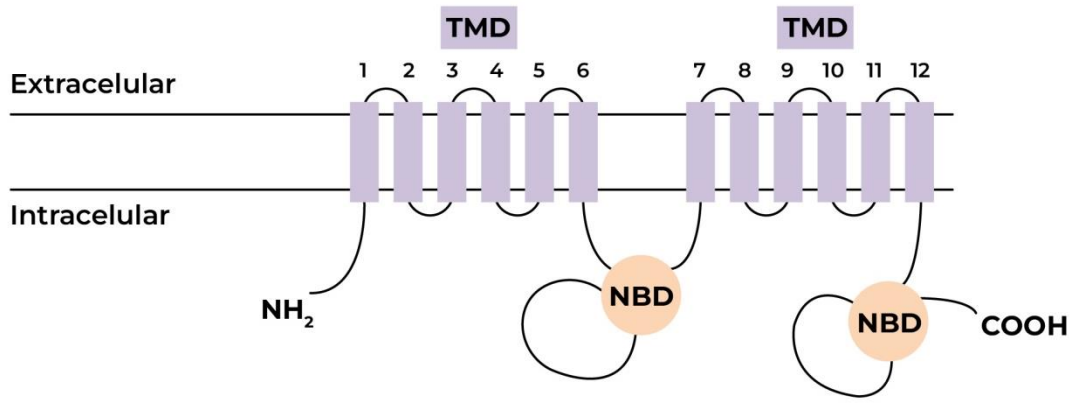


Figura 1.4. Estructura básica de un transportador ABC. TMD: dominios transmembrana. NBD: dominios de unión a nucleótidos.

Estos transportadores se expresan en la membrana apical de enterocitos, hepatocitos, túbulos renales, placenta, gónadas, cerebro, pulmón y tumores; donde ejercen un papel crítico en la limitación de la absorción y acumulación de sustancias potencialmente tóxicas y confieren resistencia a una gama diversa de fármacos. Asimismo, se han identificado alteraciones genéticas

en aproximadamente la mitad de los transportadores ABC, en sujetos con una amplia gama de enfermedades (Tabla 1.1) (Vauthier y col. 2017).

Subfamilia	Nombre	Nombre alternativo	Sustratos	Principales ubicaciones	Enfermedad asociada
A	ABCA1	CERP	Colesterol, fosfolípidos	Tejido adiposo, corazón, células endoteliales, hígado	Enfermedad de Tánger
	ABCA3	LMB 180	Colesterol, fosfolípidos, esfingolípidos	Pulmón	Enfermedad pulmonar intersticial
	ABCA4	ABCR	Derivados de retinoides	Ojo	Enfermedad de Stargardt
	ABCA12		Lípidos (ceramidas)	Piel	Ictiosis congénitas autosómicas recesivas (eritrodermia ictiosiforme congénita, Síndrome de Arlequín e ictiosis lamelar)
B	ABCB1	MDR1/P-gp	Xenobióticos	Tumores, intestino	
	ABCB4	MDR3	Fosfaditil-colina	Hígado Tumores	Colestasis intrahepática familiar progresiva
	ABCB11	BSEP	Sales biliares	Hígado	Enfermedades biliares hereditarias
C	ABCC1	MRP1/ MOAT-B	Aniones orgánicos, derivados conjugados del ácido araquidónico	Cerebro, testículo, tumores	
	ABCC2	MRP2	Sales biliares, xenobióticos	Intestino, hígado, riñón	Enfermedad de Dubin-Johnson
	ABCC4	MRP4/ MOAT-E	9-(2-fosfonil-metoxietil) adenina	Próstata, hígado, riñón	
	ABCC6	MRP6	Conjugado de Leucotrieno y S-(2,4-dinitrofenil)glutatión	Hígado, Riñón, piel	Pseudoxantoma elástico
	ABCC7	CFTR	Aniones bicarbonato y cloro	Epitelios Pulmón	Fibrosis quística
	ABCC8	SUR I	Potasio	Páncreas	Hiperinsulinismo congénito, diabetes mellitus neonatal, diabetes tipo MODY
D	ABCD2	ALDP	Ácidos grasos de cadena larga	Peroxisomas	Síndrome de Zellweger
G	ABCG2	BCRP	Xenobióticos, uratos	Tumores, intestino, placenta	Hiperuricemia, gota

Tabla 1.1. Principales características de las subfamilias de transportadores ABC (Vauthier y col. 2017).

Particularmente, a nivel intestinal los dos transportadores más importantes son la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (Mrp2, del inglés *Multidrug resistance-associated protein 2*) y la P-glicoproteína (P-gp, del inglés *P-glycoprotein*).

1.1.5. Proteína asociada a resistencia a multidrogas 2

1.1.5.1. Características generales

Como se mencionara anteriormente, la proteína asociada a resistencia a multidrogas 2 (Mrp2) es un miembro de la familia de bombas de eflujo de tipo casete de unión a ATP, implicada en el transporte activo primario de sustratos a través de las membranas biológicas, un proceso esencial para la fisiología celular y de gran relevancia en la protección del organismo frente a metabolitos tóxicos.

En 1985, Jansen y col. describieron una cepa de ratas defectuosas para el transporte hepático de aniones que presentaban hiperbilirrubinemia. El fenotipo mutante era hereditario y se asemejaba al síndrome Dubin-Johnson humano caracterizado décadas antes (Dubin y Johnson, 1954). En 1990, Ishikawa y col. relacionaron este transporte con un mecanismo dependiente de ATP y demostraron su capacidad para bombear conjugados de glutatión. Finalmente, se determinó el gen codificador, denominado MRPc, ya que representaba la isoforma canalicular de la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos hepática descrita previamente como Mrp1 (Büchler y col. 1996). El mismo grupo informó que esa misma proteína coincidía con el sistema de transporte ausente en el síndrome de Dubin-Johnson (Kartenbeck y col. 1996). Poco después, la proteína pasó a denominarse Mrp2 para denotar una diferencia con otros transportadores pertenecientes a esta familia (Keppler y König, 1997).

1.1.5.2. Estructura, localización, sustratos y función

Mrp2, es el segundo miembro de la subfamilia ABCC (ABCC2), se caracteriza estructuralmente por presentar dos TMD de seis hélices α cada uno, unidos en el lado citosólico a dos dominios NBD y un TMD adicional de 5 hélices α en la región N-terminal de la proteína (Fig 1.5) (Tocchetti y col. 2016).

En cuanto a su localización, Mrp2 se expresa en la membrana apical de células polarizadas como hepatocitos, enterocitos y células tubulares renales (Jedlitschky y col. 2006; Payen y col. 2002; Fardel y col. 2005). En el intestino, se localiza principalmente en el duodeno y yeyuno proximal disminuyendo hacia la parte distal e íleon, y su expresión es máxima en la punta de las

vellosidades (borde en cepillo), disminuyendo hacia la cripta, un patrón de distribución similar al de las enzimas de metabolismo de fase II (Tocchetti y col. 2016; Villanueva y col. 2012).

La especificidad de los sustratos de Mrp2 es amplia, incluyendo principalmente moléculas lipofílicas conjugadas con ácido glucurónico, glutatión y sulfato, y compuestos anfipáticos no cargados, como colorantes fluorescentes y arsénico. Del mismo modo, varios compuestos endógenos como leucotrienos, prostaglandinas, hepoxilinas, sales biliares, bilirrubina, estradiol y fármacos son transportados por Mrp2 (Tabla 1.2) (Fardel y col. 2005).

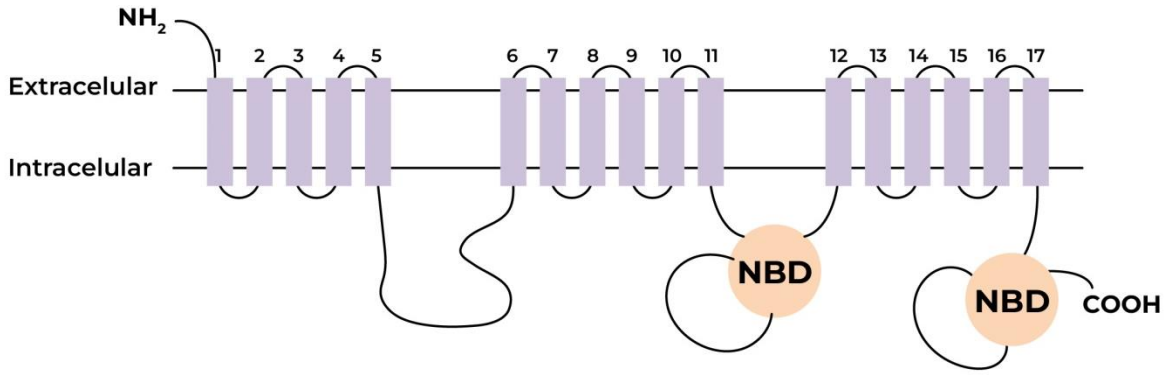


Figura 1.5. Estructura de Mrp2. Presenta dos dominios transmembrana de 6 hélices α, un dominio transmembrana adicional de 5 hélices α en el extremo N-terminal y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD).

Uso terapéutico	Fármaco
Oncológicos	Ciclofosfamida, cisplatino, doxorrubicina, epirrubicina, etopósido, metotrexato vinblastina, tamoxifeno
Antibióticos	Ampicilina, azitromicina, ceftriaxona, grepafloxacina, rifampicina
Antirretrovirales	Adevovir, cidofovir, darunavir, indinavir, lopinavir, saquinavir, ritonavir
Antihipertensivos	Valsartán, olmesartán, temocaprilato

Tabla 1.2. Principales fármacos sustrato de Mrp2. (Estudante y col. 2013; de Chen y col. 2015).

Como se ha expresado, la función de Mrp2 intestinal es el transporte de sus sustratos desde el citosol hacia la luz intestinal, para su posterior eliminación. Esta acción es secuencial y coordinada con enzimas de conjugación de fase II, constituyendo un componente esencial de la barrera bioquímica intestinal, al evitar la absorción de xenobióticos a través del tracto gastrointestinal (Mottino y col. 2000). De acuerdo a esto, Mrp2 juega un papel importante en la detoxificación del organismo. Asimismo, como se mencionó, muchos fármacos son sustratos de Mrp2 (Tabla 1.2) y

por consiguiente, su influencia en la biodisponibilidad de los mismos es un aspecto importante a considerar en la terapéutica médica.

1.1.5.3. Implicancia en la biodisponibilidad de fármacos

La administración de fármacos por vía oral es el método más conveniente y comúnmente utilizado en farmacoterapia. La biodisponibilidad de estos fármacos depende de la absorción intestinal siendo la barrera intestinal (física y bioquímica) la primera limitante (Murakami, 2017). Más aún, la excreción intestinal es la ruta principal de eliminación de muchos fármacos y sus metabolitos cuando se incorporan por vía oral (Doherty y Pang, 1997). Distintas revisiones señalan el rol fundamental de Mrp2 en la disposición de fármacos y sus metabolitos y por ende, su relevancia clínica, dado que variaciones en su expresión y/o función conducen a alteraciones en la eficacia y seguridad (efectos adversos) de los mismos (Payen y col. 2002; Fardel y col. 2005). A la vez, se demostró que Mrp2 junto a enzimas de fase I y II, causan resistencia a fármacos, obligando a rever su esquema de dosificación. Un ejemplo de esta situación es la resistencia a metotrexato, fármaco utilizado en el tratamiento de la leucemia aguda infantil y en la artritis reumatoidea. Esta resistencia se produce a través de varios mecanismos, incluyendo la sobreexpresión de Mrp2 y otros miembros de la familia MRPs (Hooijberg y col. 2003; Chen y col. 2003; Breedveld y col. 2004; Hulot y col. 2005). Del mismo modo, Mrp2 confiere resistencia a cisplatino, un fármaco utilizado en la quimioterapia de varios tipos de cáncer (Cui y col. 1999). Conforme a esto, diversos trabajos demostraron que células provenientes de carcinomas resistentes al cisplatino exhibieron una sobreexpresión de Mrp2 tanto a nivel proteína como ARNm (Taniguchi y col. 1996; Kool y col. 1997; Liedert y col. 2003; Materna y col. 2005).

1.1.5.4. Regulación de la expresión y actividad de Mrp2

La expresión de Mrp2 puede ser modulada a nivel transcripcional y postranscripcional. La regulación transcripcional de Mrp2 suele estar mediada por receptores nucleares activados por xenobióticos, seguidos de la unión a elementos de respuesta en el promotor de Mrp2. Esto, a su vez, da lugar a un aumento de la síntesis del ARNm de Mrp2 que se traduce en mayores niveles de la proteína Mrp2 en la membrana plasmática, y en última instancia da lugar a una mayor actividad de Mrp2 (Tocchetti y col. 2016).

La expresión de la proteína Mrp2 también puede regularse en ausencia de cambios en la tasa de transcripción. La regulación postranscripcional consiste en la alteración de los niveles del ARNm en

respuesta a cambios en la estabilidad, el procesamiento o la exportación del mismo, que puede dar lugar a una disociación entre los niveles del mensajero y la proteína. También pueden producirse cambios en la actividad de Mrp2 no asociados a cambios en la expresión de la proteína. Un ejemplo es la regulación a corto plazo que implica modificaciones en la localización de Mrp2 como consecuencia del intercambio dinámico entre la membrana apical y un compartimento subapical (Dominguez y col. 2021).

Por otra parte, es interesante mencionar que la función de transporte de Mrp2 se ve afectada en varias enfermedades intestinales en humanos, en particular en aquellas que incluyen inflamación local o sistémica como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Alteraciones similares se encontraron en modelos experimentales en ratas que presentaban inflamación y estrés oxidativo como los generados por la administración de lipopolisacárido o Indometacina (Arana y col. 2017).

1.1.6. P-Glicoproteína

1.1.6.1. Características generales

La P-glicoproteína, es un transportador de membrana de tipo casete de unión a ATP que actúa como bomba de eflujo de fármacos. Esta proteína se caracterizó inicialmente por estar sobreexpresada en células tumorales que mostraban resistencia a una amplia variedad de fármacos anticancerosos no relacionados estructuralmente. En 1950, Burchenal y col. fueron los primeros en notificar un caso de resistencia al fármaco ácido 4-amino-N10-metil-pteroilglutámico en un modelo murino de leucemia. Años más tarde, otros dos grupos también observaron un tipo similar de resistencia al antibiótico actinomicina D en células HeLa y células de ovario de hámster chino (CHO). Así surgió el concepto de resistencia a múltiples fármacos (MDR, del inglés *multidrug resistance*) que se dilucidó más tarde cuando se halló resistencia cruzada a daunomicina y alcaloides de vinca en células de carcinoma ascítico de Ehrlich. Posteriormente, estudios de etiquetado de superficie en células CHO dieron lugar al descubrimiento de una bomba de eflujo en la membrana celular, a la cual se le otorgó el nombre de P-gp, o glicoproteína de permeabilidad, por su capacidad de alterar la velocidad de permeación del fármaco (Ahmed Juvale y col. 2022).

1.1.6.2 Estructura, localización, sustratos y función

P-gp, pertenece a la subfamlia ABCB (ABCB1), codificado en humanos por el gen *Mdr1* y en los roedores por dos isoformas, *Mdr1a* y *Mdr1b*. Es una proteína conformada por una única cadena polipeptídica integrada por dos TMD de 6 hélices α cada uno y dos NBD (Fig 1.6).

P-gp se expresa en la superficie apical de las células epiteliales del intestino delgado, colon, riñón, en los canalículos biliares del hígado, la barrera hematoencefálica, glándula suprarrenal, pulmón, piel, placenta, ojo y en tumores (Jouan y col. 2016). De este modo, P-gp desempeña un papel notable en la absorción intestinal, la distribución cerebral y la secreción hepatobiliar y/o renal de varios fármacos, por ello puede considerarse un actor clave de la farmacocinética de estos compuestos (Jouan y col. 2016).

En particular, en el intestino, P-gp se encuentra en la membrana apical de los enterocitos predominantemente a nivel del íleon (Zimmermann y col. 2005; Estudante y col. 2013).

Los sustratos de P-gp comprenden varios tipos y tamaños de compuestos lipofílicos básicos que en su mayoría contienen nitrógeno y pueden formar varios enlaces de hidrógeno., incluidos productos naturales, esteroides, péptidos lineales y cíclicos, colorantes fluorescentes y numerosos fármacos comúnmente utilizados (Tabla 1.3) (Abel y col. 2019; Ahmed Juvale y col. 2022).

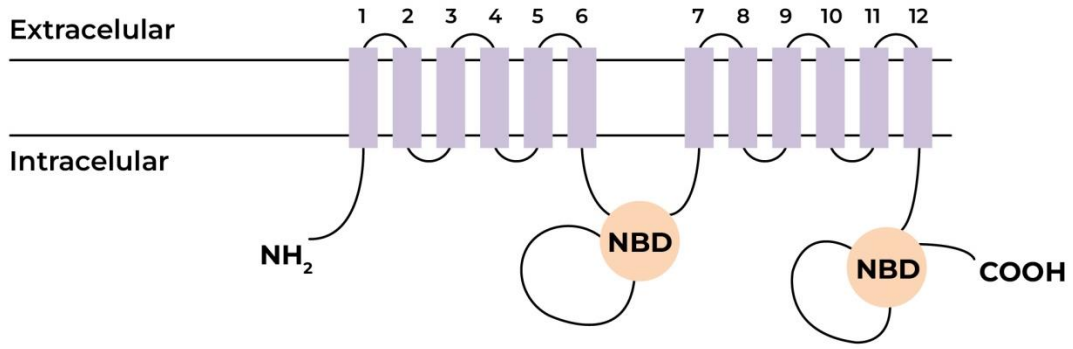


Figura 1.6. Estructura de P-gp. Presenta dos dominios transmembrana de 6 hélices α, y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD).

Uso terapéutico	Fármaco
Oncológicos	Doxorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato; vinblastina, vincristina, vindesina, tamoxifeno, paclitaxel, cisplatino, irinotecan
Antibióticos	Rifampicina, claritromicina , ceftriaxona, doxiciclina, eritomicina, levofloxacina, ketoconazol, tetraciclina
Antiarrítmicos	Digoxina, amiodarona, propafenona
Bloqueantes de canales cálcicos	Verapamilio, diltiazem , nifedipina
Antilipidémico	Rosuvastatina, sinvastatina
Analgésicos	Morfina, fentanilo
Antidiabéticos	Metformina, glibenclamida
Antiepilépticos	Fenitoina, fenobarbital
Antihistmínicos	Cimetidina, ranitidina
Inmunosupresores	Ciclosporina, tacrolimus

Tabla 1.3. Principales fármacos sustrato de P-gp. (Abel y col. 2019; Ahmed Juvale y col. 2022).

1.1.6.3. Implicancia en la biodisponibilidad de fármacos

Como se describió anteriormente, P-gp fue una de los primeros trasportadores asociados a la resistencia terapéutica, a partir de estudios con líneas celulares epiteliales de intestino (Caco-2, HT29 y T84), se confirmó que P-gp limita la absorción de múltiples fármacos, por ejemplo del agente anti-cancerígeno, vinblastina (Hunter y col. 1993; Samuels y col 1997).

Además la actividad de P-gp puede ser inhibida por una amplia gama de fármacos, que puede dar lugar a interacciones farmacológicas alterando la respuesta terapéutica. Gurley y col. (2008) describieron que la inhibición de P-gp por rifampicina o la hierba San Juan disminuye la absorción y biodisponibilidad de digoxina. En este sentido, comprender la interacción de estos compuestos con P-gp es importante para el diseño de fármacos, más aun, las directrices de la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, para el diseño de fármacos recomiendan que los nuevos fármacos sean testeados *in vitro* para determinar si son potenciales sustratos de P-gp (Abel y col. 2019).

1.1.6.4. Regulación de la expresión y actividad de P-gp

La expresión y/o actividad de P-gp puede estar regulada no solo por fármacos, nutrientes y hormonas sino también bajo ciertos procesos patológicos. (Perdomo y col. 2013; Sawamoto y col. 2014; Rocha-Pereira y col. 2019). Esta regulación puede ser a nivel transcripcional, postranscripcional o postranslacional (Chai y col. 2022).

La regulación transcripcional de P-gp, es mediada por la activación de ciertos factores de transcripción como son el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, Sp3, factor de células T, factor potenciador linfoide y receptores nucleares como el receptor X de pregnano, receptor X hepático, receptor activado por proliferador peroxisomal y el receptor de antígeno quimérico (Chai y col. 2022).

La regulación postranscripcional consiste en la unión de micro-ARNs (miR-451, miR-331-5p, miR-298, miR-145, miR-27a, entre otros) a la región 30 no traducida del ARNm de ABCB1, que resulta en la supresión de la expresión de la proteína a través de la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción (Ahmed Juvale y col. 2022).

Por otro lado, la adición o eliminación de grupos modificadores a una proteína luego de su biosíntesis, aumenta la complejidad y diversidad de su expresión y función aparte de lo codificado por el genoma. Las modificaciones postraduccionales de P-gp incluyen la fosforilación, glicosilación y ubiquitinación, que se ha demostrado que afectan a la estabilidad y actividad de la proteína (Chai y col. 2022).

1.2. Hipótesis

Condiciones de obesidad generadas por una dieta alta en grasa en ratones induce un estado inflamatorio crónico sistémico que regula negativamente la expresión de los transportadores de eflujo intestinal, Mrp2 y P-gp, a nivel transcripcional y/o postranscripcional. Esto se traduce en una alteración de la actividad de barrera bioquímica intestinal y consecuentemente, en una disminución en la prevención de toxicidad por ciclofosfamida en un modelo de adenocarcinoma mamario murino.

1.3. Objetivo general

Evaluar la expresión y actividad de los transportadores intestinales Mrp2 y P-gp, en un modelo de obesidad inducida por la dieta e indagar en los potenciales mecanismos regulatorios, así como la implicancia fármaco-toxicológica de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida, en un modelo de adenocarcinoma mamario murino.

CAPÍTULO DOS: Regulación negativa de Mrp2 y P-gp intestinales en ratones machos C57BL/6 alimentados con dieta alta en grasa

2.1. Introducción

2.1.1. Obesidad

2.1.1.1. Características generales y epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de grasa que implica un riesgo para la salud; para su diagnóstico, se utiliza el índice de masa corporal (IMC); valor que se obtiene de dividir el peso corporal del individuo (en kilogramos) por el cuadrado de su talla (en metros). Un IMC mayor o igual a 25 kg/m^2 es criterio de sobrepeso y mayor o igual a 30 kg/m^2 se considera obesidad (OMS 2000; Guh y col. 2009; Apovian, 2016).

La obesidad es una enfermedad endocrino-metabólica, crónica, heterogénea, multifactorial, caracterizada por un aumento de la grasa corporal cuya distribución y magnitud condicionan la salud del individuo; puede asociarse a complicaciones graves, que disminuyen la expectativa de vida, y demandan un enfoque multidisciplinario para su diagnóstico y tratamiento, aumentando así los costos sanitarios de la salud pública.

Desde 1970 la obesidad se triplicó en el mundo (Fig. 2.1). En 2016, más de 1900 millones de adultos, presentaban sobrepeso (39% de la población adulta mundial), de los cuales 650 millones eran obesos. Además, 41 millones de niños menores de 5 años y 340 millones de niños y adolescentes de 5 a 19 años tenían sobrepeso u obesidad (Wu y Ballantyne, 2020). Del mismo modo, ese año, Argentina ocupaba, el tercer puesto en prevalencia de obesidad en adultos para países de América Latina y el Caribe (Tabla 2.1) y preocupantemente el primero en sobrepeso infantil (Tabla 2.2) (Gregg y Shaw 2017; FAO, FIDA, OPS, PMA y UNICEF, 2023).

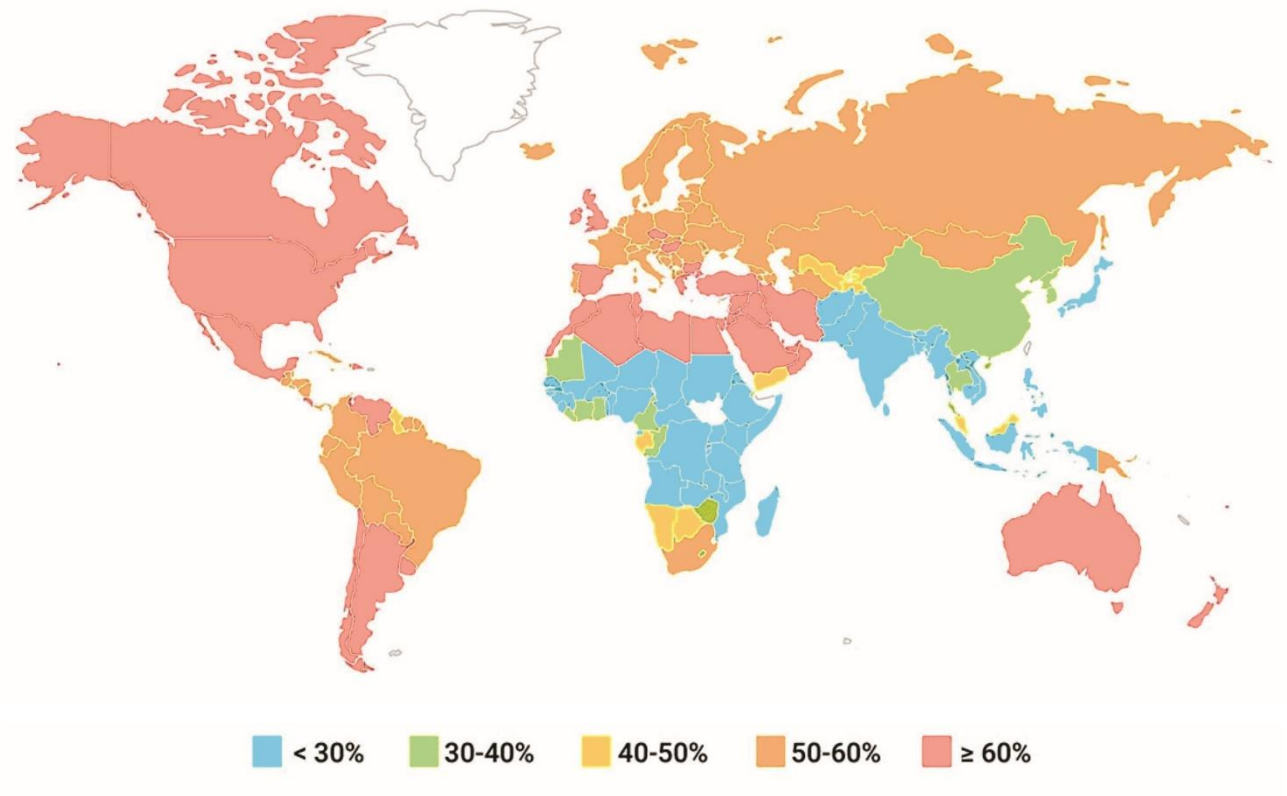


Figura 2.1. Prevalencia de sobrepeso en adultos de ambos sexos en el mundo. Se ilustra el porcentaje de individuos mayores de 20 años con un IMC mayor o igual a 25 kg/m^2. Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2016.

Región/país	**2000**	**2005**	**2010**	**2013**	**2014**	**2015**	**2016**
Mundo	8,7	9,9	11,2	12,1	12,5,	12,8	13,1
América latina y Caribe	16,6	18,9	21,2	22,7	23,2	23,7	24,7
Sudamérica	15,8	18,0	20,2	21,6	22,1	22,5	23,0
1° Bahamas	23,9	26,2	28,5,	30	30,5	31	31,6
2° México	20,8	23,3	25,8	27,3	27,8	28,3	28,9
3° Argentina	**20,7**	**23,0**	**25,3**	**26,8**	**27,3**	**27,8**	**28,3**

Tabla 2.1. Prevalencia de obesidad en adultos para países de América Latina y el Caribe (expresado en porcentaje). Extraído de "Panorama regional de la seguridad alimentaria y nutricional - América Latina y el Caribe 2022: hacia una mejor asequibilidad de las dietas saludables". FAO, FIDA, OPS, PMA y UNICEF, 2023.

Región/país	2000	2005	2010	2013	2014	2015	2016
Mundo	5,4	5,7	5,6	5,6	5,7	5,7	5,7
América latina y Caribe	6,8	7,1	7,2	7,4	7,4	7,5	7,5
Sudamérica	7,0	7,3	7,6	7,9	8,1	8,1	8,2
1° Argentina	**11,6**	**12,1**	**12,3**	**12,5**	**12,8**	**12,9**	**12,9**
2° Paraguay	7,2	8,3	9,6	10,9	11,6	11,8	12,0
3° Barbados	7,8	9,1	10,4	11,2	11,4	11,4	11,4

Tabla 2.2. Prevalencia de sobrepeso entre niños y niñas de 5 años para países de América Latina y el Caribe (expresado en porcentaje). Extraído de "Panorama regional de la seguridad alimentaria y nutricional - América Latina y el Caribe 2022: hacia una mejor asequibilidad de las dietas saludables". FAO, FIDA, OPS, PMA y UNICEF, 2023.

En nuestro país, según la 4ta Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (2018), que integra el Sistema de Vigilancia de Enfermedades No transmisibles y el Sistema Integrado de Encuestas de Hogares, del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, el 66,1% de la población adulta presentó exceso de peso, el 32,4% obesidad y el 33,7% sobrepeso, calculados a través del IMC, cifras que aumentaron alarmantemente desde 2005, cuando el 14,6% de los adultos presentaban obesidad.

Se estima que cada año fallecen alrededor de 3,4 millones de personas adultas en el mundo como consecuencia del exceso de peso y la obesidad. Principalmente debido a su asociación con enfermedades relacionadas a una mayor mortalidad, como diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2), enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, enfermedad renal crónica, hiperlipidemia, hipertensión arterial, enfermedad del hígado graso no alcohólico, cáncer, problemas respiratorios, apnea obstructiva del sueño, osteoartritis y depresión (Guh y col. 2009; Sánchez Gómez y col. 2020).

La obesidad primaria se origina por un desequilibrio entre el aporte energético y el gasto calórico, cuyo excedente se almacena en el tejido adiposo. Múltiples causas están implicadas en su desarrollo y progresión como factores genéticos, ambientales, conductuales, económicos y sociales, estableciéndose una asociación directa entre un mayor consumo de alimentos y bebidas hipercalóricas, especialmente las que presentan alto contenido de grasas y/o azúcares simples ligado por otra parte a un estilo de vida sedentario (Lin y Li, 2021). Desde el punto de vista fisiopatológico, se caracteriza como una enfermedad inflamatoria crónica sistémica producto de la hipertrofia del tejido adiposo, que además genera estrés oxidativo por aumento de los sustratos energéticos mitocondriales. La liberación sistémica de citoquinas inflamatorias derivadas del tejido adiposo, principalmente el factor de necrosis tumoral α (TNF-α, del inglés *tumor necrosis factor*),

interleuquina 1β (IL-1β), interleuquina 6 (IL-6) y el estrés oxidativo pueden ocasionar desregulación de la acción de la insulina, del metabolismo de la glucosa y lípidos, generando estados de resistencia a la insulina (Catta-Preta y col 2012; Alcala y col. 2017; Meldrum y col 2017; Freitas-Carvalho y col. 2019). La inflamación y la resistencia a la insulina pueden exacerbarse mutuamente a través de los efectos autócrinos de las citoquinas en la señalización y metabolismo de la insulina en los adipocitos y por los efectos endocrinos de las adipoquinas (proteínas inflamatorias secretadas por el tejido adiposo) en la sensibilidad a la insulina en otros tejidos, en particular en músculo esquelético e hígado. En consecuencia, se acelera la transferencia de ácidos grasos del tejido adiposo al músculo esquelético, páncreas e hígado, que provoca una deposición ectópica de grasa y resistencia a la insulina en estos tejidos, los cuales desempeñan un papel fundamental en la resistencia sistémica a la insulina, hiperglucemia, dislipidemia y el desarrollo de hipertensión arterial (Hotamisligil, 2006; Goossens, 2008; Wu y Ballantyne, 2020). En conjunto estas alteraciones son criterio diagnóstico del Síndrome Metabólico (SM), enfermedad que se asocia a una mayor morbimortalidad por causas cardiovasculares y al desarrollo de DMT2 (Grundy y col. 2004; Engin, 2017).

Por otro lado, existen causas de obesidad secundaria a procesos patológicos como síndromes genéticos (síndrome de Prader Willi, síndrome de Laurence-Moon-Bieldt, entre otros), alteraciones neuroendocrinas (síndrome de ovario poliquístico, hipotiroidismo, síndrome de Cushing) e inducida por fármacos (glucorticoides, anticonceptivos orales, sulfonilureas, entre otros), pero su prevalencia es baja y presentan otro enfoque para su diagnóstico y tratamiento (Kiess y col. 2001; MSAL, 2018)

2.1.1.2. Tratamiento de la obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas

El tratamiento de la obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas implica un abordaje integral con perspectiva multidisciplinaria, con estrategias individuales para los pacientes evaluando preferencias personales, edad, sexo, comorbilidades, contexto social y económico. Generalmente consiste en modificaciones dietéticas, adquisición de hábitos saludables, ejercicio físico, apoyo psicológico, tratamiento farmacológico y en algunos casos, tratamiento quirúrgico (cirugía bariátrica) (Lin y Li, 2021; MSAL, 2018).

El objetivo primario es la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular y la prevención del desarrollo de DMT2. Cuando el riesgo absoluto es suficientemente elevado y persistente a pesar de la modificación del estilo de vida y del plan alimentario, es necesario utilizar fármacos dirigidos

a modificar los factores de riesgo. Actualmente no existen objetivos terapéuticos aceptados para el tratamiento en conjunto de todas las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad, sin embargo se diagnostican para cada afección en particular, esto implica el uso de numerosos medicamentos en estos pacientes (Tabla 2.3)(ALAD, 2010; MSAL,2013; MSAL, 2018).

Patología	**Fármacos**
Obesidad	Orlistat (inhibidor selectivo de lipasas gástricas y pancreáticas)
Hipetrigliceridemia Dislipidemia	Fibratos Estatinas
Hiperglucemia Resistencia a la insulina	Metformina (hipoglucemiante oral)
Diabetes Mellitus	Hipoglucemiantes orales Insulina Análogos de insulina Incretinas
Hipertensión arterial	Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) Antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA)

Tabla 2.3. Principales fármacos utilizados en el tratamiento de la obesidad y sus patologías asociadas.

2.1.1.3. Modelos animales de obesidad

Los modelos animales de obesidad se pueden dividir en aquellos que se basan en mutaciones o manipulaciones de genes individuales y los que utilizan animales genéticamente intactos expuestos a entornos obesogénicos a través de diferentes tipos de dietas. (Lutz y Woods, 2012; Kristiansen y col. 2016)

Los modelos genéticos más utilizados son aquellos relacionados con mutaciones monogénicas que involucran la vía de la leptina, como son el ratón ob/ob (deficiente en leptina), el ratón db/db (deficiente en el receptor de leptina) y la rata Zucker (deficiente en el receptor de leptina), entre otros. Principalmente, estos modelos se utilizan para estudiar dianas moleculares del mecanismo de regulación de la ingesta y para el desarrollo de terapias farmacológicas específicas (Lutz y Woods, 2012).

En cambio, los modelos de obesidad inducidos por la dieta (DIO, del inglés*: Diet-Induced Obesit*y) se utilizan para estudiar las causas poligénicas de la obesidad, su interacción con la ingesta excesiva de calorías, su relación con la resistencia a la insulina así como las patologías asociadas y comorbilidades SM y DMT2. Es por ello, que estos modelos reproducen con mayor fiabilidad el

proceso de desarrollo y fenotipo de la obesidad en humanos que los modelos genéticos (Preguiça y col. 2020; Moura e Dias y col. 2021). En su utilización, se emplean alimentos enriquecidos en grasas, carbohidratos o sodio. Aunque el modelo DIO abarca gran parte de la patogénesis de la obesidad humana, hay distintos factores que considerar para una correcta implementación, entre ellos la especie y cepa del animal, el sexo, edad, tipo de dieta y duración del tratamiento. Por ejemplo, dentro de las cepas de ratón se observan diferencias en la susceptibilidad a la obesidad inducida por dieta y la resistencia a la insulina, con cepas sensibles como los ratones C57BL/6 y resistentes como BALB/c (Montgomery y col. 2013).

Los modelos animales murinos, presentan, al igual que los humanos, una asociación directa entre la ingesta de grasas y el aumento de peso; por ello la administración de una dieta alta en grasa (HFD, del inglés *High Fat Diet*) es comúnmente utilizada para la generación de obesidad en roedores asociada a resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia, inflamación y estrés oxidativo en diferentes tejidos (Hariri y Thibault, 2010; Ecker y col. 2019; Bader y col. 2020). Se ha reportado la inducción de obesidad en ratones C57BL/6 mediante dietas con diferentes porcentajes y fuentes de grasas, una de las más utilizadas consiste en enriquecer el alimento estándar con 40% de grasa (Buettner y col. 2007; Speakman, 2019).

Los mecanismos moleculares subyacentes en las dietas altas en grasa que desarrollan alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad aún no están totalmente esclarecidos. No obstante, el mayor aporte calórico de las mismas y la consiguiente mayor ingesta de energía total reducen de manera rápida y específica las acciones centrales de la insulina y la leptina, generando un estado de resistencia a la insulina, vínculo común en las alteraciones metabólicas de la obesidad (Woods y col. 2004; Hariri y Thibault, 2010; Gallagher y col. 2011; Clegg y col. 2011).

Asimismo, el modo de evaluar los criterios de obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas en animales deben ser adaptados respecto a los aplicados en seres humanos. Su determinación se basa fundamentalmente en parámetros morfológicos como el aumento de peso corporal y el contenido de tejido adiposo corporal, y el estudio de distintos parámetros bioquímicos en los animales alimentados con HFD, en comparación con los animales control que consumen dietas estándar o bajas en grasa (Hariri y Thibault, 2010).

2.2. Objetivos específicos

-Evaluar la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales en un modelo de obesidad, en ratones macho adultos C57BL/6 generado por la administración de una dieta alta en grasa.

-Estudiar en este modelo la expresión a nivel del ARN mensajero de las citoquinas proinflamatorias IL-1β, IL-6 y TNF-α en tejido intestinal.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Reactivos

1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), Rodamina 123, ditiotreitol (DTT), ácido tiobarbitúrico, albúmina sérica bovina, azul nitro-tetrazolio (NBT), ácido 5,5'-ditiobis-2-benzoico (DTNB), isotiocianato de fluoresceína-dextrano (FD-4) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). Los restantes químicos y reactivos utilizados fueron de calidad analítica con alto grado de pureza.

2.3.2. Animales y tratamientos

Ratones machos C57BL/6 de 5 semanas de edad (17-22 g de peso corporal) fueron adquiridos del Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos (CIPReB), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Se utilizaron 20 animales por vuelta experimental, los cuales fueron agrupados en número de cinco por jaula, se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (23 ± 2°C) con un ciclo fijo de luz-oscuridad de 12 horas (07:00-19:00) y recibieron de bebida agua *ad libitum* durante todo el experimento.

Los ratones fueron divididos en dos grupos experimentales según los tratamientos dietéticos, el grupo Control (C57-C, n: 10), recibió dieta comercial estándar y el grupo HFD (C57-HFD, n: 10), recibió dieta comercial estándar enriquecida con 40% de grasa bovina, durante 16 semanas para inducir las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad (Collins y col. 2004, Petro y col. 2004, Andrikopoulos y col. 2005, Lambertucci y col. 2018). Antes de iniciar el tratamiento dietético, todos los animales fueron sometidos a una Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa (PTIG) con el fin de confirmar su normal metabolismo glucémico (Londero y col. 2017).

Durante el experimento, se registraron el peso corporal y el consumo de alimento (kcal/animal) y bebida (ml/animal) semanalmente. El peso corporal se expresa en porcentaje respecto al peso al comienzo del tratamiento (peso final x 100/peso inicial). En la semana 15 de dieta, se comprobó el estado de resistencia a la insulina a través de la Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina (PTII) (Zecchinati y col. 2019) (Fig. 2.2). Todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con el Reglamento para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Expediente 6109/012 Resolución CE 267/02) y fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso Animal de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

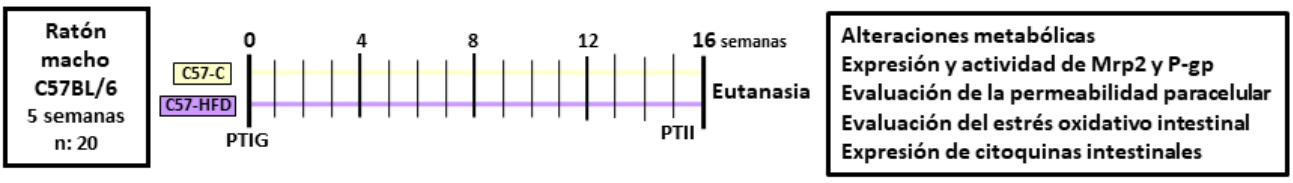


Figura 2.2. Representación esquemática del diseño experimental. Los animales recibieron dieta estándar (C57-C) o dieta alta en grasa (C57-HFD), durante 16 semanas. Al inicio del experimento (semana 0) se realizó la prueba de tolerancia intraperitoneal a glucosa (PTIG) y en la semana 15 la prueba de tolerancia intraperitoneal a insulina (PTII). Luego de 16 semanas de dieta, se realizó la eutanasia y se obtuvieron las muestras necesarias para los futuros experimentos.

2.3.3. Tratamiento dietético

El alimento del grupo control fue provisto por la Facultad de Ciencias Médicas; durante las 16 semanas se utilizó la marca comercial, GEPSA (GEPSA grupo Pilar SA, Córdoba, Argentina).

La dieta alta en grasa se preparó enriqueciendo el alimento comercial con 40% de grasa proveniente de primer jugo bovino marca FATY (Quickfood SA, Santa Fe, Argentina), (Lambertucci y col. 2018). En la tabla 2.4 se observa el análisis bromatológico, el alimento HFD, presentó menores proporciones de proteínas y de carbohidratos sin embargo el contenido proteico cumple con los requisitos mínimos para roedores macho adulto de acuerdo con las recomendaciones nutricionales (Reeves, 1997).

Composición química	Dieta comercial (g / 100g)	Dieta alta en grasa (g / 100g)
Humedad	7,9	4,4
Materia grasa	2,5	41,0
Proteína	24,3	14,5
Cenizas	7,9	3,2
Fibra dietética	17,0	15,3
Carbohidratos	40,4	21,6

Tabla 2.4. Composición química de la dieta comercial y la dieta alta en grasa.

2.3.4. Eutanasia

Al cumplir las 16 semanas de tratamiento dietético, los animales fueron ayunados por 12 horas, luego se los anestesió con una inyección intraperitoneal de ketamina (200 mg/kg) y midazolam (5 mg/kg). El sacrificio fue realizado por exanguinación por punción cardíaca. Las muestras de sangre

obtenidas se colocaron en tubos heparinizados, para la posterior determinación de parámetros bioquímicos (Fig 2.2).

2.3.5. Procedimiento quirúrgico

Luego del sacrificio del animal, se realizó una incisión abdominal vertical siguiendo la línea media desde pubis hasta esternón, los colgajos de piel fueron rebatidos hacia los laterales y se expuso la cavidad peritoneal. Cuidadosamente se realizó un corte en el peritoneo, para exponer las vísceras abdominales.

Para la recolección de las muestras de tejidos, en primer lugar se extrajo todo el intestino delgado desde su inserción proximal con el estómago hasta la distal con el ciego, longitud aproximada 30-35 cm. Suavemente se desprendió el mesenterio, y se desplegó el intestino delgado sobre una superficie plana y fría, para ser dividido en sus 3 segmentos anatómicos; para ello se utilizó el siguiente criterio: los primeros 4 cm desde el comienzo de la válvula pilórica correspondieron al duodeno, la siguiente porción que continua distalmente se la consideró como yeyuno y los últimos 10 cm hasta la inserción con el ciego correspondieron al íleon (Inagaki y col 2005). Los segmentos correspondientes a yeyuno e íleon se lavaron cuidadosamente con solución fisiológica fría y se secaron con papel de filtro. Luego, se realizaron cortes transversales al eje principal del intestino para obtener porciones cilíndricas de 1 cm de largo de yeyuno e íleon. Estas porciones se colocaron individualmente en solución *buffer* de formalina para la posterior realización de estudios histológicos y en nitrógeno líquido en una primera instancia, para luego mantenerse a -70°C hasta el posterior aislamiento de ARN para estudios de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, del inglés *quantitative polymerase chain reaction*). Para los estudios de actividad de Mrp2 y P-gp y de permeabilidad paracelular, se utilizaron segmentos cilíndricos de 4 cm longitud de yeyuno y de íleon. Para la evaluación del estrés oxidativo, parte del yeyuno y del íleon fueron inmediatamente abiertos longitudinalmente en una placa de vidrio fría y se obtuvo la capa mucosa por raspado con un portaobjetos. Luego, se la pesó y homogeneizó en solución fisiológica fría para la determinación de glutatión, peroxidación lipídica y la actividad de enzimas antioxidantes.

Para la evaluación del tejido adiposo abdominal se recolectaron los panículos adiposos epididimales, derecho e izquierdo, la grasa asociada al mesenterio y la retropritoneal. Los panículos adiposos se pesaron y luego se colocaron en solución *buffer* de formalina para futuras tinciones histológicas El peso de cada una de las grasas se expresa como porcentaje del peso

corporal al final del tratamiento (peso de la grasa x 100/peso corporal final). El índice de grasa corporal se calculó utilizando la siguiente fórmula: (Pesos grasas epididimal + mesentérica + retroperitoneal/peso corporal final) x 100 (Silva y col. 2020).

2.3.6. Estudios bioquímicos

2.3.6.1. Determinaciones plasmáticas

Los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma se determinaron espectrofotométricamente usando kits comerciales según las recomendaciones del fabricante (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina).

La concentración de proteína plasmática total se determinó espectrofotométricamente utilizando albúmina de suero bovino como testigo a través de la técnica de Lowry (Lowry y col. 1951).

2.3.6.2. Prueba de tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa

Para confirmar la regulación normal de la glucemia antes de iniciar la etapa de experimentación, los ratones fueron sometidos a una prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa (PTIG). Para ello, todos los animales fueron ayunados por 12 horas y luego se les realizó un delicado corte en el extremo distal de la cola. En las gotas de sangre emitidas se evaluó la glucemia basal (tiempo 0 min) por glucómetro comercial; inmediatamente después, se les inyectó un bolo de glucosa (2 g/kg p.c., en solución fisiológica) por vía intraperitoneal. La glucemia se midió en las gotas de sangre emitida por la vena de cola, a los 30, 60 y 120 minutos luego de la inyección (Zecchinati y col. 2019).

2.3.6.3. Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina

Para evaluar la resistencia a la insulina, se realizó una prueba de tolerancia intraperitoneal a la insulina (PTII). Para la PTII, 5 días antes del sacrificio, los ratones fueron ayunados durante 6 horas, luego se realizó un delicado corte en el extremo distal de la cola y se evaluó la glucemia por glucómetro comercial en las gotas de sangre emitidas (glucemia basal, 0 min). Posteriormente, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 0,75 UI/kg p.c. de insulina recombinante humana (Denver Farma SA, Buenos Aires, Argentina) y se midió la glucemia a distintos tiempos 30, 60 y 120 min en las gotas de sangre de la cola (Londero y col. 2017; Zecchinati y col. 2019). Para el análisis de la PTII se utilizaron las siguientes fórmulas (Falcato Vecina y col. 2014; Marinho y col. 2014):

1° Se calculó la diferencia de glucemia para cada animal

Δ Glucemia= Valor de la Glucemia basal – Menor valor de glucemia de la prueba

2° Se calculó el porcentaje que representa esa diferencia de la glucemia basal

Δ PTII = (Δ Glucemia x 100) / Glucemia basal

2.3.7. Estudios histológicos por microscopía óptica

2.3.7.1. Estudio histológico del tejido adiposo

Los panículos adiposos epididimales fijados en solución *buffer* de formalina al 4%, se incluyeron en parafina, luego se seccionaron, tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y visualizaron mediante microscopía óptica con objetivo 40X. La cuantificación histológica de los adipocitos se realizó utilizando el programa Image J 1.50i (National Institutes of Health, Maryland, Estados Unidos). Se midió el tamaño de los adipocitos en al menos 60 células por ratón y se evaluó el número de coronas de macrófagos por campo óptico (Catta-Preta y col. 2012; Ohkura y col. 2019).

2.3.7.2 Estudio histológico intestinal

Las porciones cilíndricas de 1 cm de longitud de yeyuno fijadas en solución *buffer* de formalina al 4%, se incluyeron en parafina, luego se seccionaron transversalmente y tiñeron con HE. Los preparados se visualizaron mediante microscopía óptica con objetivos 10X y 40X, luego se analizaron con el programa Image J 1.50i; se midieron la longitud y ancho de las vellosidades, la longitud de las criptas y se cuantificó el número de células caliciformes ubicadas en las vellosidades y en las criptas, en al menos 10 campos ópticos por ratón (Benoit y col. 2015; Evangelista-Silva y col. 2021).

2.3.8. Aislamiento de ARN total

2.3.8.1. Extracción del ARN

La extracción de ARN de yeyuno e íleon se realizó utilizando el reactivo TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) con materiales libres de ARNasas.

Inmediatamente después de ser descongelados se sumergieron 10 mg de tejido en 1 ml de TRI Reagent y se homogeneizaron utilizando un émbolo y una camisa de vidrio como recipiente. Los homogenados obtenidos se incubaron 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12000 g a 4°C durante 10 min para favorecer la disociación de los complejos de nucleoproteínas.

Para el aislamiento del ARN, se agregó 200 µl de cloroformo frío al homogenado, se mezcló por inversión durante 15 seg a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 15 min.
La fase acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo y se precipitó el ARN mediante el agregado de 500 µl de isopropanol frío, luego se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12000 g a 4°C durante 10 min y como resultado se obtuvo un precipitado blanquecino conteniendo el ARN. El precipitado se lavó dos veces con etanol 75%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió con 40 µl de Agua MiliQ.

2.3.8.2. Evaluación de la integridad de los ARNs por electroforesis en gel de agarosa

La integridad del ARN obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se preparó un gel de agarosa al 1,5 % P/V en *buffer* TAE 1X (Tris-Acetato 2 M, EDTA 50 mM, pH=8,00) con el agregado de SYBR-SAFE (Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). Las muestras de ARN se prepararon en una proporción 4:1 en *buffer* de siembra (Azul de bromofenol 0,25% P/V, Xilenecyanol 0,25% P/V y glicerol 30% V/V).
Una vez sembradas las muestras, el gel se corrió en TAE 1X a voltaje constante (100V) durante 15 min. Las bandas correspondientes a los ARNs aislados se visualizaron por fluorescencia en un transiluminador de luz ultravioleta. Se debería observar una corrida correcta de las muestras, sin degradación del ARN y con una relación de las bandas de ARN ribosomal 28S/18S de aproximadamente 2.

2.3.8.3. Determinación de la concentración y pureza de los ARNs

La concentración y pureza del ARN obtenido se determinó espectrofotométricamente. Se prepararon diluciones (1/100 en agua tratada con dietilpirocarbonato, DEPC) de las muestras de ARN puro y se midió la absorbancia a λ=260 y 280 nm. Para medir la concentración del ARN, se consideró que a una muestra de 40 µg/ml de ARN le corresponde una unidad de absorbancia a λ=260 nm. En cuanto a la calidad del ARN, se evaluó a través de la relación Abs260/Abs280 (una relación entre 1,7 y 2,1 indica pureza de la preparación respecto de contaminantes proteicos).

2.3.9. Retrotranscripción

La síntesis de ADNc a partir del ARN total se llevó a cabo utilizando la enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (Promega, Winsconsin, Estados Unidos). Se prepararon soluciones de 0,2 µg/µl a partir de las preparaciones de ARN total en agua-DEPC, y se utilizaron 5 µl de esta solución para

realizar la retrotranscripción (1 µg de ARN total). En una primera etapa se mezclaron 5 µl de la solución de ARN (0,2 µg/µl), 1 µl de *Random Primers* (50 ng/µl) (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos), 1 µl de mezcla de dNTPs (10 mM) y se completó con agua-DEPC hasta un volumen de 10 µl. Cada mezcla de reacción se incubó durante 5 min a 65°C y a continuación en hielo durante al menos 1 min. Luego para iniciar la retrotranscripción se adicionó a cada tubo la mezcla de reacción conteniendo 4 µl de 5X *First Strand Buffer* (Invitrogen, Massachusetts, Estados Unidos), 1 µl de 0,1 M de DTT, 1 µl de inhibidor de ARNasa y 100 U/µl de la enzima M-MLV *Reverse Transcriptase*. El proceso se llevó a cabo utilizando un termociclador Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Überlingen, BW, Alemania) con una etapa inicial de 5 min a 25°C, seguido de una incubación de 60 min a 50°C y una etapa final de 15 min a 70°C, para inactivar la enzima. Los ADNc obtenidos en las reacciones de amplificación se diluyeron 10 veces en agua-DEPC y posteriormente fueron almacenados a -20°C hasta ser utilizados en la técnica de qPCR en tiempo real.

2.3.10. Estudios de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

La cuantificación relativa de los niveles de expresión de los genes de Mrp2, Mdr-1 y las interleuquinas se realizó a través de qPCR en tiempo real, en el termociclador StepOne (Applied Biosystem, California, Estados Unidos) utilizando *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) y oligonucleótidos específicos (Tabla 2.5) (Crib y col. 2017; Yan y col. 2021, Lee y col. 2021).

Los resultados de la expresión de los genes se normalizaron respecto a la expresión del gen constitutivo de referencia gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (Lambertucci y col. 2018). La cuantificación de la expresión de los genes estudiados se llevó a cabo según el método

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y col. 2001). En todas las muestras, la cuantificación de los ADNc blanco se normalizó con ARNr 18S (ΔCt = Ct blanco - Ct ARNr 18S) y los posibles cambios en la expresión de cada ADNc blanco en el grupo tratado fueron normalizados respecto de esa misma relación para el grupo control (ΔΔCt = ΔCt tratado - ΔCt control). El cambio expresado en número de veces se obtuvo elevando 2 a la potencia -ΔΔCt ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Finalmente, los resultados obtenidos se expresaron como % referidos al control.

La especificidad de cada reacción se verificó con una curva de fusión entre 55°C y 95°C con medida de fluorescencia continua (Crib y col. 2017).

Gen	Descripción del gen	Secuencia de oligonucleótidos
IL-6	Interleuquina- 6	Directo: 5´-CTTCCATCCAGTTGCCTTCTTG-3´
		Reverso: 5´-TGGGAGTGGAATCCTCTGTGAAGT-3´
IL-1β	Interleuquina- 1β	Directo: 5´-TTGACGGACCCCAAAAGATG-3´
		Reverso: 5´-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3´
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α	Directo: 5´-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3´
		Reverso: 5´-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3´
Mrp2	Abcc2	Directo: 5´-TTCCTGCCTGTTCTTCGTCT-3´
		Reverso: 5´-CGTGTGTTGAGTCGCTTGAT-3´
Mdr-1	Mdr1a	Directo: 5´-AAAGGCTCTACGACCCCCTA-3´
		Reverso: 5´-CCTGACTCACCACACCAATG-3´
	Mdr1b	Directo: 5´-TTGGTGGCACAACAACTCAT-3´
		Reverso: 5´-GGCTTTCGCATAGTCAGGAG-3´
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Directo: 5´-CACAATTTCCATCCCAGACC-3´
		Reverso: 5´-GTGGGTGCAGCGAACTTTAT-3´

Tabla 2.5. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión del ARNm.

2.3.11. Evaluación de la actividad de Mrp2

La actividad de Mrp2 se determinó en sacos intestinales aislados y evertidos, a partir de yeyuno. Para ello, el segmento intestinal fue evertido quedando el compartimiento seroso hacia el interior del saco y el mucoso expuesto al medio de incubación.

Todo el procedimiento de armado de los sacos se realizó sobre una placa de vidrio en frío. Como sustrato de Mrp2 se utilizó un compuesto exógeno, el 1-cloro-2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB), que es metabolizado en el interior de los enterocitos y se convierte en 2,4-dinitrofenil-S-glutation (DNP-SG), sustrato modelo típico de Mrp2. La formación de DNP-SG es muy eficiente y está catalizada por el sistema enzimático de la enzima GST. Este compuesto, una vez formado, es excretado desde las células en forma ATP-dependiente, a través de Mrp2. Los sacos intestinales evertidos se llenaron con *buffer* Krebs-Henseleit (NaCl 118 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 1 mM, $NaHCO_3$ 24 mM, $MgSO_4.7H_2O$ 1,2 mM, MgCl 1,6 mM, glucosa 40 mM, pH=7,40), previamente burbujeado con gas carbógeno (95% de O_2 y 5% de CO_2) (compartimiento seroso). Posteriormente se incubaron en 5 ml del mismo *buffer* conteniendo 200 µM de CDNB (compartimiento mucoso) durante 30 min y se recolectaron 120 µl del compartimiento mucoso una vez finalizada la incubación. El compartimiento mucoso se burbujeó continuamente con gas carbógeno durante

todo el experimento (Fig 2.3). Después de la incubación, los sacos se escurrieron con papel de filtro, se pesaron y midieron, con el fin de relativizar la concentración del sustrato al tamaño de cada saquito. Finalmente, las muestras se trataron con $HClO_4$ 70% V/V (5 µl por ml de muestra) y luego se centrifugaron a 3500 g durante 5 min. El contenido de DNP-SG se determinó en los sobrenadantes utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta performance (HPLC, del inglés *high performance liquid chromatography*) marca Waters, modelo M-600 (Waters, Massachusetts, Estados Unidos), equipado con una columna Luna 5 µ C18 (2) 100 Å 250 x 4.60 nm (Phenomenex, California, Estados Unidos). La elusión fue llevada a cabo de modo isocrático usando una fase móvil de acetonitrilo: 0.01% H_3PO_4 (1:3 V/V) y a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min. El metabolito DNP-SG fue detectado a 365 nm y cuantificado por la altura del pico, previa identificación con la utilización de testigos externos, según describió Mottino y col. (2001). Los resultados se expresan en % de C57-C.

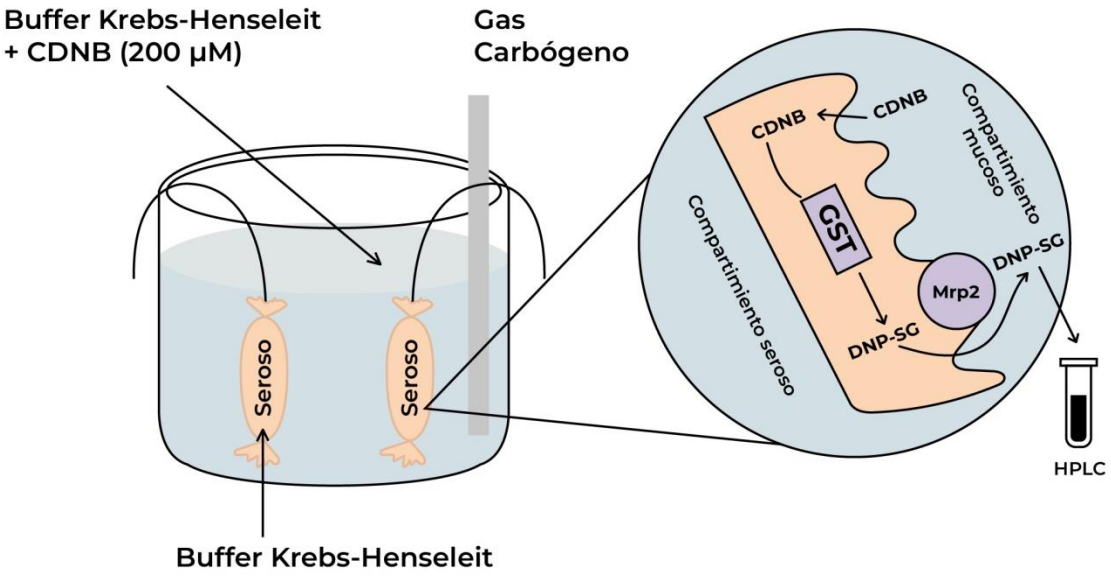


Figura 2.3. Estudios de la actividad de Mrp2 utilizando sacos intestinales evertidos. Los sacos se incubaron en viales de vidrio conteniendo 5 ml de *buffer* Krebs-Henseleit con el agregado de CDNB 200 µM (compartimiento mucoso). El sustrato de Mrp2, DNP-SG se cuantificó en muestras de este mismo compartimiento a los 0 y 30 min.

2.3.12. Evaluación de la actividad de P-gp

Para la evaluación de la actividad de P-gp, se utilizó íleon, que fue cuidadosamente lavado con solución fisiológica y evertido, quedando el compartimento mucoso hacia el exterior. Se llenó el compartimento seroso (interior del saquito) con 20 µM del sustrato fluorescente de P-gp, Rodamina 123, diluido en *buffer* Krebs-Henseleit. Se incubaron dos saquitos de 4 cm por animal individualmente durante 30 min en viales con 5 ml de *buffer* Krebs-Henseleit conectado a un sistema de burbujeo de gas carbógeno. La Rodamina 123 difunde transepitelialmente desde el compartimento seroso hacia la membrana apical del compartimento mucoso, donde es eliminada hacia el exterior del saquito por P-gp. Se recolectaron 120 µl de muestra del compartimento mucoso al principio y al final de la incubación y se analizó la intensidad de fluorescencia (λex=485, λem=535) (Fig. 2.4). Después de la incubación, los sacos se escurrieron con papel de filtro, se pesaron y midieron, con el fin de relativizar la concentración del sustrato al tamaño de cada saquito. Los resultados se expresan en % de C57-C.

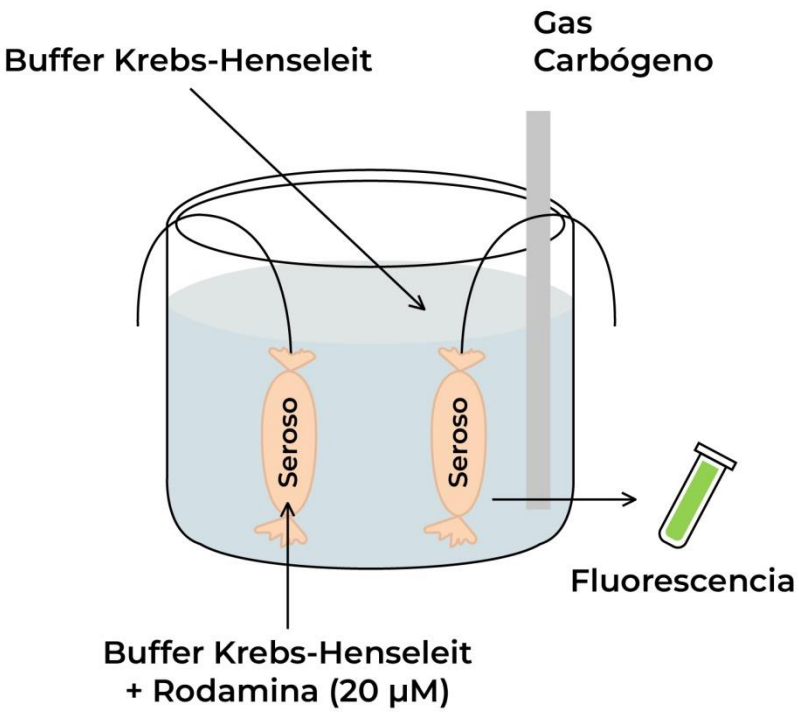


Figura 2.4. Estudios de la actividad de P-gp utilizando sacos intestinales evertidos. Los sacos se incubaron en viales de vidrio conteniendo 5 ml de *buffer* Krebs-Henseleit (compartimiento mucoso). El interior del saco se llenó (compartimiento seroso) con *buffer* Krebs-Henseleit con el agregado de Rodamina (20 µM). Se evaluó la intensidad de la fluorescencia en muestras del compartimento mucoso a los 0 y 30 min.

2.3.13. Estudio de permeabilidad paracelular en sacos intestinales no evertidos

La permeabilidad paracelular fue evaluada a partir de la velocidad de permeación de la sonda de isotiocianato de fluoresceína-dextrano (FICT, del inglés *Fluorescein isothiocyanate–dextran*), macromolécula no permeable (Keely y col. 2005). El compartimiento mucoso de los sacos no evertidos fue llenado con *buffer* Krebs-Henseleit conteniendo FICT 1 mg/ml (Keely y col. 2005) y fueron incubados en 7 ml del mismo *buffer* (compartimiento seroso) por 30 min a 37°C. El compartimiento seroso fue burbujeado continuamente con gas carbógeno. Alícuotas del compartimiento seroso fueron tomadas a tiempos 0 y 30 min. Posteriormente, los sacos fueron secados, pesados y medidos longitudinal y transversalmente (Fig. 2.5). La intensidad de la fluorescencia de las muestras con FICT se determinó a λexc=485 y λemi=535, usando un lector de microplacas (BeckmanCoulter DTX 880 Multimode Detector, California, Estados Unidos). La permeabilidad aparente (Papp, cm.s−1) de la sonda FICT a través de la pared intestinal, se calculó mediante la siguiente ecuación (Keely y col. 2005):

$$Papp = 1/CiA \times dQ/dt$$

Donde dQ/dt es la velocidad de transporte de FICT (mol/s), Ci es la concentración inicial del FICT en el compartimiento mucoso (mol/ml) y A es la superficie del saco (cm^2).

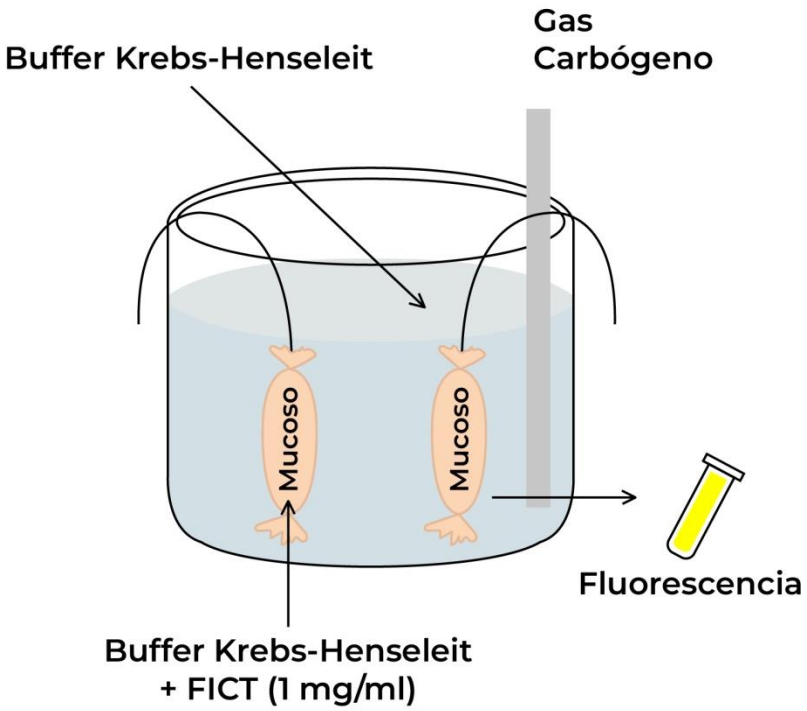


Figura 2.5. Estudios de la permeabilidad paracelular utilizando sacos intestinales no evertidos. Los sacos se incubaron en viales conteniendo 5 ml de *buffer* Krebs-Henseleit (compartimiento seroso). El interior del saco se llenó con *buffer*

Krebs-Henseleit + FICT (compartimiento mucoso). Se evaluó la intensidad de la fluorescencia en muestras del compartimento seroso a los 0 y 30 min.

2.3.14. Detección de peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se estimó midiendo la producción de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizando el procedimiento de Ohkawa, Ohishi y Yagi (1979). Los homogenados intestinales se mezclaron con SDS 8,1%, ácido acético 20% y ácido tiobarbitúrico 0,7%. Luego se calentaron las mezclas a 95°C durante 1 hora y se enfriaron a temperatura ambiente. Finalmente, se les agregó ácido tricloroacético al 10% y se centrifugaron a 3000 g durante 10 min. Al sobrenadante obtenido se le midió la absorbancia a 532 nm frente a un blanco que consiste en la mezcla de reacción sin el agregado de homogenado intestinal, pero sometido al mismo procedimiento. Los resultados se expresan en % de C57-C.

2.3.15. Medición de glutatión total y oxidado

Para la determinación del contenido de glutatión total (reducido: GSH + oxidado: GSSG) en muestras de yeyuno, se utilizó el método de Tietze, con las modificaciones introducidas por Griffith (1980). Así, el glutatión es sometido a un procedimiento enzimático cíclico por el cual es secuencialmente oxidado por el 5,5'-ditio-bis-[ácido 2-nitrobenzoico] (DTNB, del inglés *5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid*) y reducido por el NADPH en presencia de la enzima glutatión reductasa. La velocidad de formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico a partir de DTNB es monitoreado a 412 nm durante 90 seg, siendo la aparición del mismo una medida proporcional a la cantidad de glutatión total presente en la muestra. Para ello, se mezclaron dos volúmenes (200 µl) del homogenado de yeyuno con un volumen de ácido sulfosalicílico (SSA, del inglés 5-sulfosalicylic acid) (100 µl) al 10%, para desproteinizar las muestras. Luego de una agitación vigorosa, se centrifugaron las muestras a 10000 g durante 5 min, 2 µl del sobrenadante fueron incorporados al medio de reacción conteniendo: *buffer* fosfato K_3PO_4 0,125 M (pH=7,50), DTNB 6 mM y NADPH 0,3 mM. Luego de templar la muestra a 37°C durante 2 min, se la colocó en una cubeta de plástico e inició la reacción con el agregado de la enzima glutatión reductasa (10 U/ml en medio de reacción). Se monitoreó el aumento de la absorbancia espectrofotométricamente a 412 nm durante 90 seg.

Para medir selectivamente la especie GSSG, se utilizó la técnica basada en el enmascaramiento químico (derivatización) del GSH por la 2-vinilpiridina, que permite que sólo el GSSG entre en el ciclo redox mencionado anteriormente y pueda ser medido. A 100 µl del sobrenadante, se le

agregaron 3 µl de 2-vinilpiridina. Luego se agregaron 15 µl de trietanolamina por cada 100 µl de SSA 10% agregado, y se incubaron durante 1 hora a 30°C, homogeneizando con vortex durante 1 min al inicio de la incubación y luego durante 15 seg cada 10 min. Posteriormente se continuó con el mismo protocolo descripto para la cuantificación de GSH total. Los datos obtenidos de la medición de absorbancia a 412 nm, fueron procesados de manera de calcular el contenido de las especies de glutatión como nmoles/g de tejido para finalmente expresarlos en % del control. Los valores de GSH se determinaron a partir de las concentraciones de glutatión total y GSSG y el índice de estrés oxidativo se calculó a partir de la relación GSH/GSSG.

2.3.16. Actividad de las enzimas antioxidantes

En todos los casos, la actividad enzimática se expresa y grafica en % de C57-C.

2.3.16.1. Determinación de la actividad superóxido dismutasa

Las mediciones de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se basaron en los ensayos descriptos por Beautchamp y Fridovich (1971), con modificaciones de Donahue y col (1997), que miden la inhibición de la reducción fotoquímica del azul nitro-tetrazolio (NBT, del inglés *nitroblue tetrazolium*) por acción de la SOD. Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% V/V y de apilamiento al 4% V/V, que fueron pre-corridos 1 hora en *buffer* de pre-corrida (2,3% P/V Tris, 0,04% P/V EDTA, pH =8,8) a 20 mA/gel a 4°C, para eliminar residuos y productos incompletos de polimerización que inactivan la proteína nativa. Luego se guardaron en heladera a 4°C durante toda la noche (Weydert y Cullen, 2010). Al día siguiente, los homogenados se resuspendieron en *buffer* de siembra en condiciones nativas (Tris/HCl 1 M pH=6,80, azul de bromofenol 0,005% P/V, glicerol 10% P/V) para sembrar 50 µg de proteína por calle. Los geles se corrieron en condiciones nativas en *buffer* de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, pH=6,8) a una temperatura de 4°C, con una corriente de 20 mA/gel hasta la salida del frente de corrida. Luego, los geles fueron desmontados y estabilizados en *buffer* de equilibrio (K_3PO_4 50mM, EDTA 1mM, pH=7,80) durante 30 min con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación se incubaron en *buffer* de incubación (*buffer* de equilibrio, NBT 0,24 mM; riboflavina 33,2 µM, TEMED 0,2 %) durante 30 min con agitación suave y en oscuridad. La actividad se reveló por exposición a la luz como bandas claras sobre un fondo azul. Las bandas obtenidas se cuantificaron utilizando el programa Image J 1.50i (National Institutes of Health, Maryland, Estados Unidos).

2.3.16.2. Determinación de la actividad catalasa

Se utilizó el método descrito previamente por Carrillo y col. (1994), basado en el seguimiento espectrofotométrico de la desaparición de H_2O_2 como consecuencia de la acción de la enzima catalasa (CAT) (obteniéndose O_2 y H_2O). Para ello, se utilizaron 10 µl del sobrenadante del homogenado y 990 µl del *buffer* de reacción (K_3PO_4 0,05 M; H_2O_2 0,02M, pH=7,00) a 37°C. Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en cubeta de cuarzo a 240 nm durante 90 seg a 37°C, el mismo día del experimento. Se utilizó la pendiente de los primeros 45 seg para el cálculo de la actividad.

2.4. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± error estándar (EE). La comparación estadística de los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales se llevó a cabo mediante pruebas paramétricas (*t de student)* y no paramétricas (prueba de *Mann-Whitney*). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a partir de un valor de $P < 0,05$. Todos los análisis se realizaron con GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos). Todos los resultados se reprodujeron en al menos tres experimentos independientes.

2.5. Resultados

2.5.1. Verificación del metabolismo glucémico basal en ratones C57BL/6

Antes de iniciar el tratamiento dietético se realizó una prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa, a todos los animales, para confirmar su metabolismo glucémico normal. A los 30 min de la inyección de glucosa, los ratones presentaron el nivel de glucemia más alto (media ± EE: 200,80 ± 9,10 mg/dl), el cual fue descendiendo progresivamente a lo largo de la prueba, retornando a sus valores basales de concentración de glucosa plasmática (89,62 ± 2,34 mg/dl) a los 120 min post inyección, demostrando una regulación glucémica fisiológica a la sobrecarga de glucosa (Fig. 2.6).

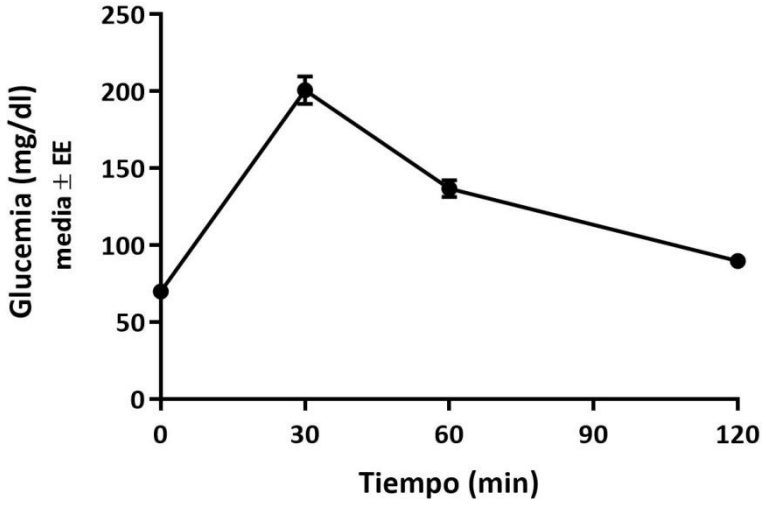


Figura 2.6. Prueba de Tolerancia intraperitoneal a la Glucosa, se grafica la evolución temporal de la glucemia (mg/dl) luego de la inyección intraperitoneal de glucosa. Datos expresados como media ± EE.

2.5.2. Efecto de la dieta alta en grasa en los parámetros morfológicos y en el consumo de bebida/ alimentos

Después de 16 semanas, los animales que recibieron dieta alta en grasa, incorporaron menor cantidad de agua y de alimento respecto del grupo control. Debido a las características nutricionales del alimento HFD, los ratones C57-HFD consumieron más calorías respecto aquellos que recibieron dieta comercial (Tabla 2.6). El exceso calórico, se reflejó en la composición corporal, los animales del grupo HFD presentaron mayor peso corporal que los ratones C57-C, el cual fue estadísticamente diferente a partir de la cuarta semana de tratamiento (Fig. 2.7). Consecuentemente, los animales del grupo HFD aumentaron su índice graso, con un incremento de la cantidad de grasa epididimal, mesentérica y retroperitoneal con respecto a los animales del grupo control (Tabla 2.6).

Parámetros	C57-C	C57-HFD
Ingesta de bebida (ml/animal)	454,4 ± 34,14	352,6 ± 17,93[a]
Ingesta de alimento (gramos totales /animal)	384,6 ± 18,56	315,5 ± 11.39[b]
Calorías consumidas (kcal totales/animal)	1293 ± 42,924	1760 ± 43,45[d]
Ganancia de peso (g)	8,7 ± 0,52	14,63 ± 0,94[d]
Ganancia de peso porcentual	41,55 ± 2,47	63,84 ±3,66[d]
Índice graso corporal (%)	4,13 ± 0,31	8,61 ± 0,51 [d]
Grasa epididimal (%)	1,09 ± 0,18	2,77 ± 0,15[d]
Grasa mesentérica (%)	1,12 ± 0,11	2,35 ± 0,29[b]
Grasa retroperitoneal (%)	0,96 ± 0,08	2,37 ± 0,19[d]

Tabla 2.6. Parámetros morfométricos y consumo de bebida/ alimentos después del tratamiento dietético en ratones C57BL/6. Datos expresados como media ± EE. [a], [b] y [d], significativamente diferente de C57-C, P<0,05, P<0,01 y P<0,0001 respectivamente, según las pruebas *t-student* o *Mann-Whitney.*

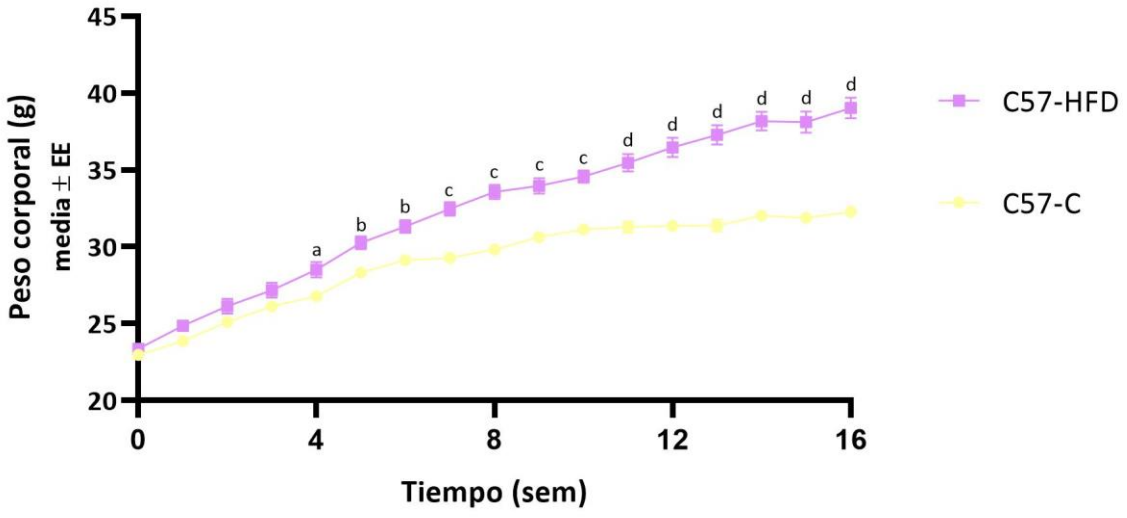


Figura 2.7. Evolución temporal del peso corporal de los ratones C57BL/6 durante 16 semanas de tratamiento con HFD. A partir de la 4ª semana, el peso corporal de C57-HFD fue estadísticamente diferente respecto de C57-C. Datos expresados como media ± EE. [a], [b], [c] y [d], significativamente diferente de C57-C, P<0,05, P<0,01, P<0,001 y P<0,0001 respectivamente, según la prueba *t-student.*

2.5.3. Efecto de la dieta alta en grasa en los parámetros bioquímicos

Al final del tratamiento dietético, los ratones HFD presentaron mayores niveles de glucemia plasmática que los controles y una menor respuesta a la insulina durante la PTII, indicativo del estado de resistencia a la insulina. Los animales del grupo control no presentaron resistencia a la insulina y su glucemia se mantuvo en valores normales durante las 16 semanas del experimento. Con respecto al metabolismo de los lípidos, los animales tratados con dieta alta en grasa, presentaron un aumento significativo en los valores de triglicéridos y colesterol total plasmático con respecto a C57-C, al finalizar las 16 semanas (Tabla 2.7).

No se hallaron diferencias en la concentración de proteínas plasmáticas entre los grupos experimentales (Tabla 2.7).

Parámetros	**C57-C**	**C57-HFD**
PTII (%)	34,38 ± 12,71	19,12 ± 9,86[a]
Glucemia (mg/dl)	73,90 ± 6,10	130,6 ± 8,57[c]
Colesterolemia (mg/dl)	89,14 ± 12,91	199,40 ± 25,15[d]
Trigliceridemia (mg/dl)	71,78 ± 26,58	121,30 ± 21,10[c]
Proteinemia (mg/dl)	50,19 ± 1,81	47,95 ± 2,24

Tabla 2.7. Parámetros bioquímicos después de 16 semanas de tratamiento dietético. El resultado de la PTII se muestra como porcentaje del aclaramiento máximo de glucosa después de la inyección de insulina. Datos expresados como media ± EE. [a], [c] y [d], significativamente diferente de C57-C, P<0,05, P<0,001 y P<0,0001 respectivamente, según las pruebas *t-student* o *Mann-Whitney.*

2.5.4. Efecto de la dieta alta en grasa en las características histológicas

Como parte de la caracterización del modelo de obesidad inducido por la dieta, se evaluaron las alteraciones histológicas producidas por la dieta alta en grasa en preparados teñidos con hematoxilina-eosina del tejido adiposo epididimal e intestino delgado.

La dieta alta en grasa generó aumento en la cantidad del tejido adiposo epididimal, además ocasionó modificaciones a nivel celular. Los adipocitos de los animales HFD presentaron un aumento significativo de su diámetro en comparación con los controles (Fig. 2.8 b). Además, en el grupo HFD se observaron coronas de macrófagos alrededor de las células adiposas, que es un signo indicativo de infiltración inflamatoria, fenómeno que no se encontró en los preparados histológicos de los animales controles (Fig. 2.8 a).

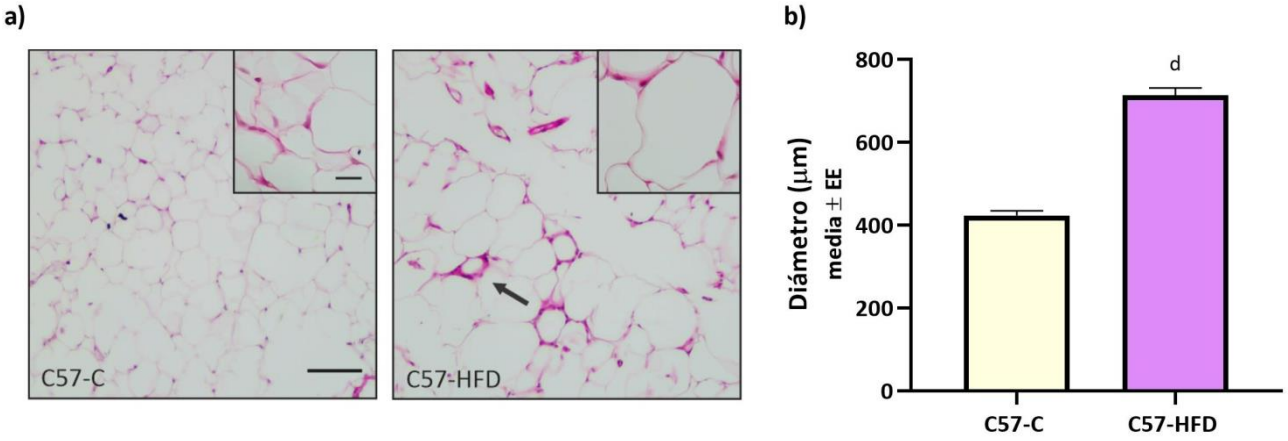


Figura 2.8. Cambios histológicos en el tejido adiposo. a) Imágenes del tejido adiposo del grupo control (izquierda) y del grupo HFD (derecha) teñidos con HE. Las imágenes se muestran con un aumento de 10X (la barra indica 100 µm), las zonas seleccionadas en los recuadros se muestran con un aumento de 40X (la barra indica 50 µm). Una estructura representativa en forma de corona de macrófagos está marcada con una flecha. b) Diámetro de los adipocitos, media ± EE: C57-C 422,90 ± 11,29 µm vs. C57-HFD 712,90 ± 18,09 µm. [d], significativamente diferente de C57-C, P<0,0001, según la prueba *t-student*.

En el intestino delgado, se evaluó el efecto de la dieta alta en grasa en la capa mucosa (Fig. 2.9 a). Se observa en los ratones HFD un aplanamiento de las vellosidades intestinales, las cuales disminuyeron en altura y aumentaron en ancho al compararlas con C57-C (Fig. 2.9 b, c). También se observó disminución en la longitud de las criptas en C57-HFD. (Fig. 2.9 d). De igual modo, se evaluó el número de células caliciformes presentes en las vellosidades y en las criptas; los ratones HFD presentaron un recuento mayor del número de células caliciformes por vellosidad y por cripta que los controles (Fig. 2.9 e, f).

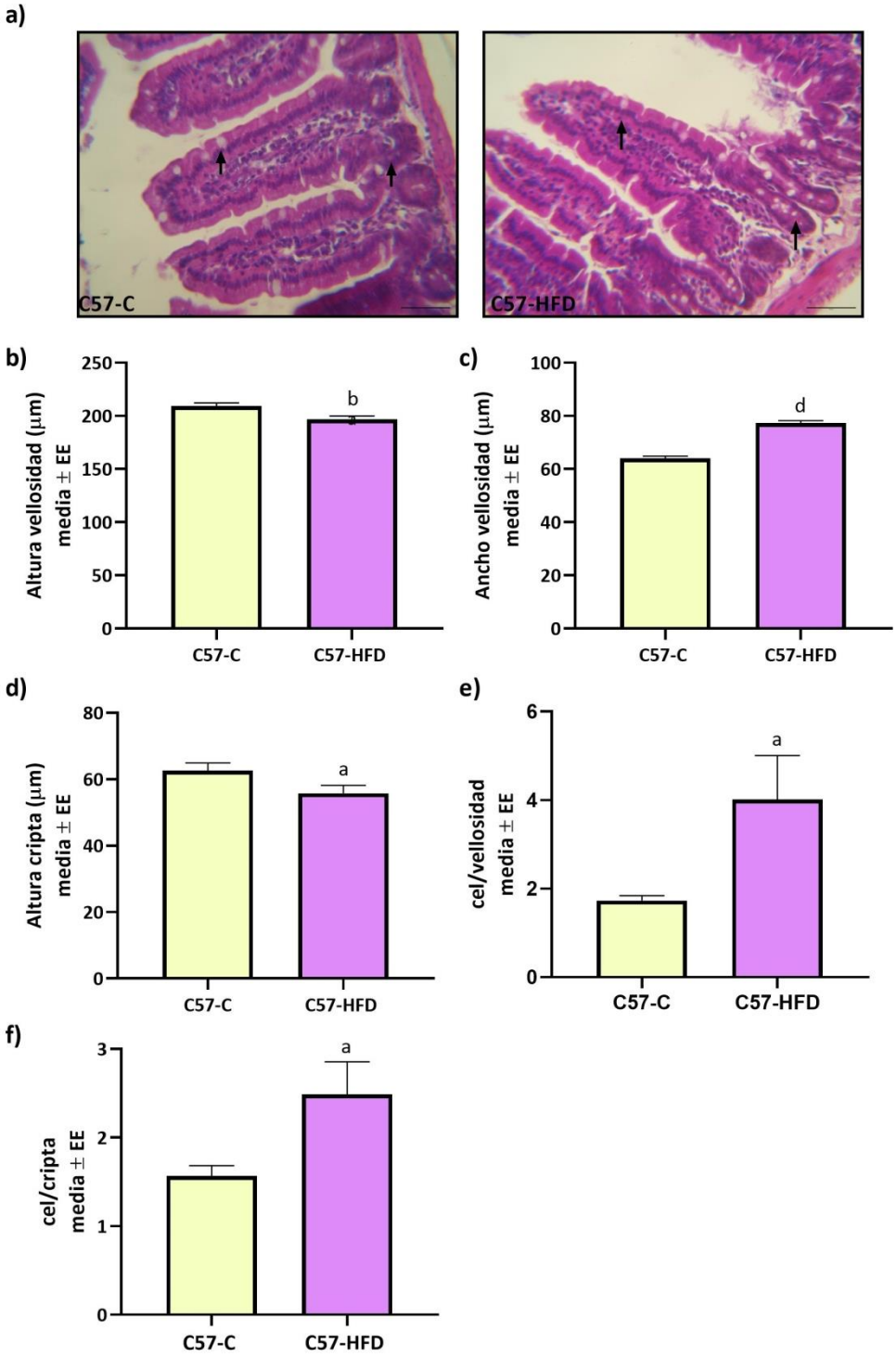


Figura 2.9. Cambios histológicos en el intestino delgado. a) Imágenes de yeyuno del grupo control (izquierda) y del grupo HFD (derecha) teñidos con HE. Las imágenes se muestran con un aumento de 40X (la barra indica 50 µm) Las flechas negras indican las células caliciformes. b) Altura de la vellosidad, C57-C 209,3 ± 2,79 µm vs. C57-HFD 196,7 ± 3,13 µm. c) Ancho vellosidad, C57-C 64,07 ± 0,79 µm vs. C57-HFD 77,4 ± 0,8 µm. d) Altura de la cripta, C57-C 62,58 ± 2,28 µm vs. C57-HFD 55,75 ± 2,44 µm. e) Recuento del número de células caliciformes en las vellosidades, C57-C 1,73 ± 0,11 cel/vellosidad vs. C57-HFD 4,02 ± 0,99 cel/vellosidad. f) Recuento del número de células caliciformes en las criptas, C57-C 1,59 ± 0,11 cel/cripta vs. C57-HFD 2,48 ± 0,36 cel/cripta. Datos expresados como media ± EE. [a], [b] y [d], significativamente diferente de C57-C, P<0,05, P<0,01 y P<0,0001 respectivamente, según la prueba *t-student.*

2.5.5. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de Mrp2 intestinal en ratones C57BL/6

La expresión del ARN mensajero del gen *Abcc2* que codifica la proteína Mrp2 en roedores fue evaluada en muestras de yeyuno e íleon por qPCR en tiempo real. Sus niveles se hallaron significativamente disminuidos en los ratones HFD, a nivel del yeyuno (-42%; P<0,05) y del íleon (-34%; P<0,05), en comparación con los animales controles (Fig. 2.10 a, b).

Con el fin de comprobar el impacto funcional de la disminución de la expresión del ARN mensajero de Mrp2, se evaluó la secreción de su sustrato DNP-SG, utilizando el modelo de sacos intestinales evertidos, en muestras de yeyuno, que es el sitio de máxima expresión de Mrp2 a nivel intestinal. La Figura 2.10 c muestra que, en el período de 30 minutos, la cantidad de DNP-SG acumulado en el compartimiento mucoso de los ratones HFD, disminuyó significativamente (-53%, P<0,01) con respecto a los controles.

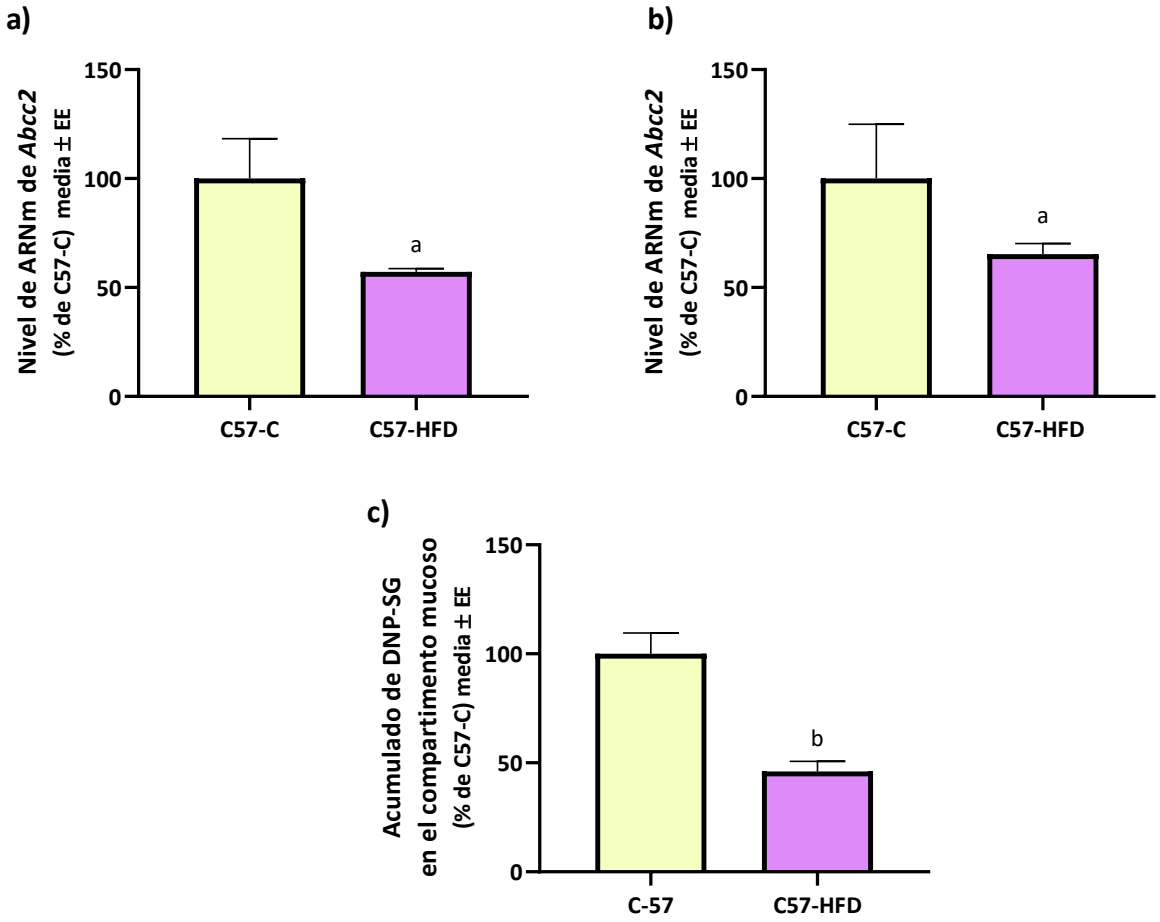


Figura 2.10. Efectos de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de Mrp2. a) Expresión de ARNm de A*bcc2* en yeyuno. b) Expresión de ARNm de *Abcc2* en íleon. c) Evaluación de la actividad de Mrp2 en sacos evertidos de yeyuno proximal usando 2,4-dinitroclorobenceno (CDNB) como sustrato. Se gráfica la cantidad de DNP-SG acumulada a los 30 minutos en el compartimento mucoso. Datos expresados como media ± EE. [a] y [b], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,01 respectivamente, según la prueba de *Mann-Whitney.*

2.5.6. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de P-gp intestinal en ratones C57BL/6

La expresión del ARN mensajero de los genes *Mdr1a* y *Mdr1b* que codifican la proteína P-gp en roedores fue evaluada en muestras de yeyuno e íleon por qPCR en tiempo real. Los niveles de *Mdr1a* se hallaron significativamente disminuidos en los ratones HFD, a nivel de yeyuno (-39%; $P<0,05$) y de íleon (-73%; $P<0,01$), en comparación con los animales controles (Fig. 2.11 a, b). Asimismo, los niveles de *Mdr1b* se hallaron significativamente disminuidos en el grupo C57-HFD, a nivel de yeyuno (-80%; $P<0,01$) e íleon (-65%; $P<0,05$), en comparación con C57-C (Fig. 2.10 c, d).

Con el fin de comprobar el impacto funcional de la disminución de la expresión del ARN mensajero de P-gp, se evaluó la secreción de su sustrato Rodamina 123, utilizando el modelo de sacos intestinales evertidos, en muestras de íleon, sitio de máxima expresión de P-gp a nivel intestinal. La Figura 2.11 e muestra que, en un período de 30 minutos, la cantidad de Rodamina 123, acumulada en el compartimiento mucoso de los ratones HFD, disminuyó significativamente (-47% $P<0,05$) con respecto a los controles.

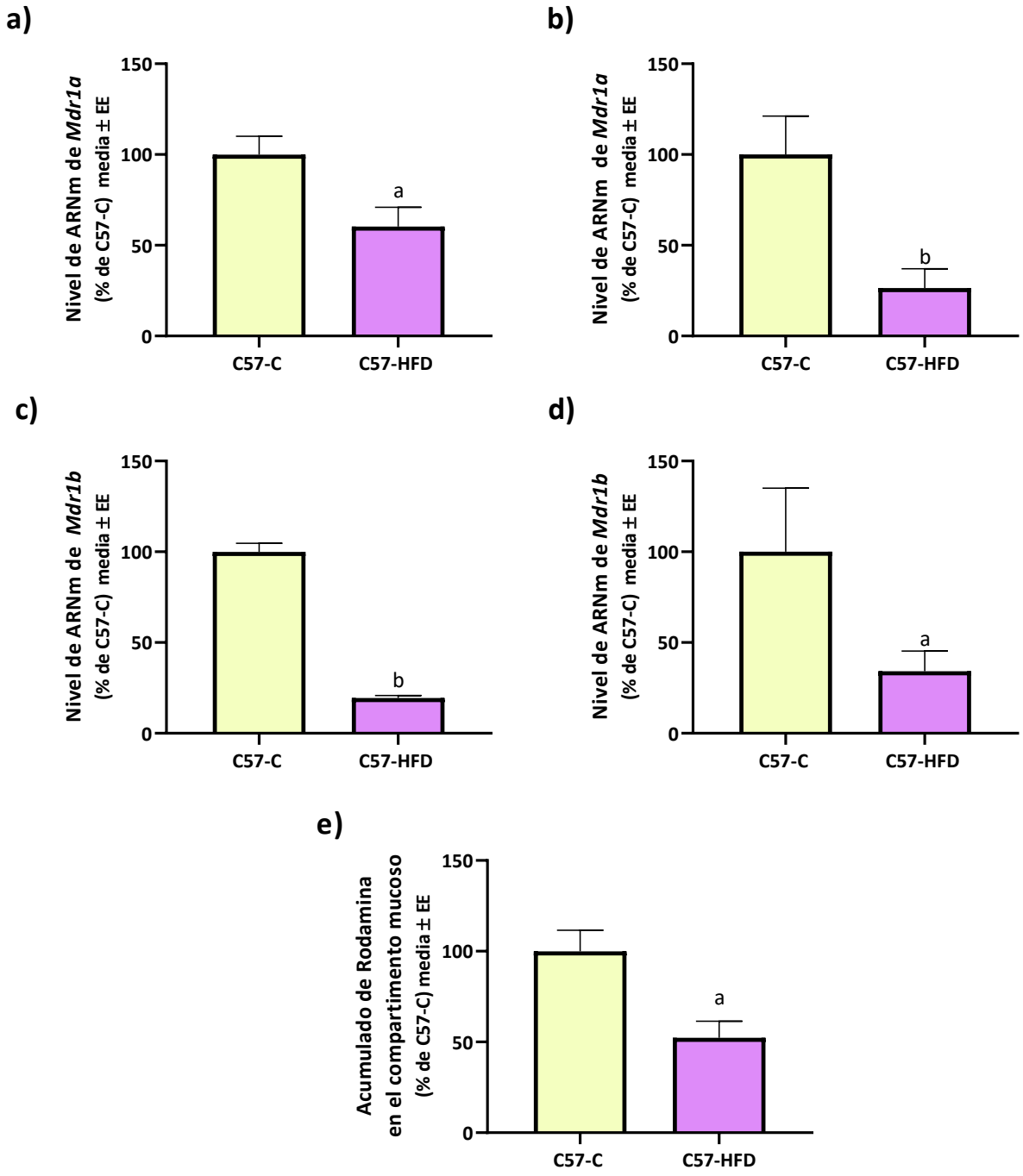


Figura 2.11. Efectos de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de P-gp. a) Expresión de ARNm de *Mdr1a* en yeyuno. b) Expresión de ARNm de *Mdr1a* en íleon. c) Expresión de ARNm de *Mdr1b* en yeyuno. d) Expresión de ARNm de *Mdr1b* en íleon. e) Evaluación de la actividad de P-gp en sacos evertidos de íleon usando Rodamina como sustrato. Se gráfica la cantidad de Rodamina 123 acumulada a los 30 minutos en el compartimento mucoso. Datos expresados como media ± EE. [a] y [b], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,01 respectivamente, según la prueba de *Mann-Whitney.*

2.5.7. Efecto de la dieta alta en grasa en la permeabilidad paracelular intestinal

Por otro lado, estudiamos los efectos de la dieta alta en grasa en el transporte paracelular intestinal, para ello utilizamos el ensayo de permeación de la macromolécula FD-4 en sacos intestinales no evertidos de yeyuno. Al finalizar la incubación con FITC-DEXTRAN, la concentración de FD-4 en el compartimento seroso del grupo C57-HFD fue significativamente mayor (+138%; P<0,01) que en el grupo C57-C (Fig. 2.12 b), diferencia que fue estadísticamente significativa a partir de los 30 minutos del ensayo (Fig. 2.12 a).

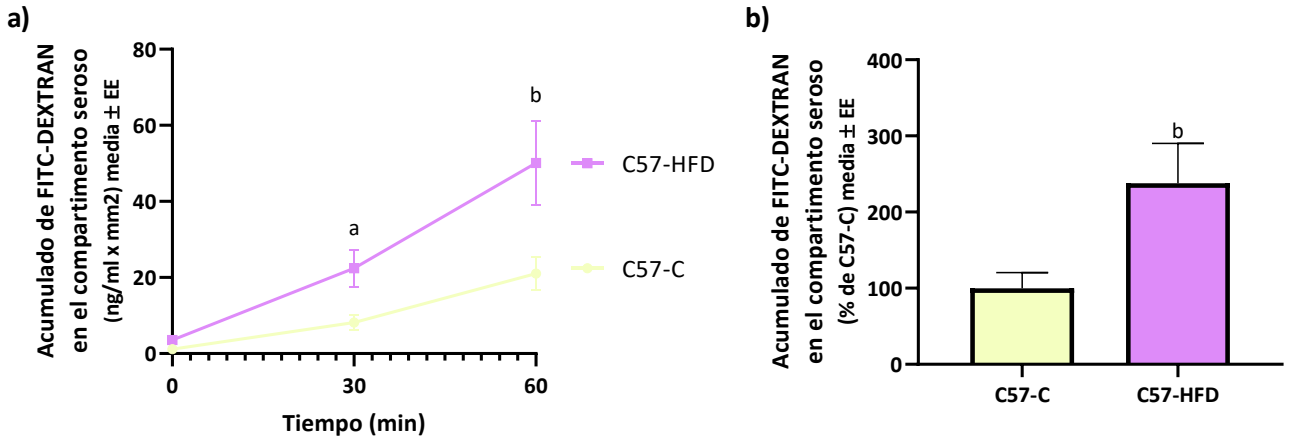


Figura 2.12. Efecto de la dieta alta en grasa en la permeabilidad paracelular intestinal. a) Evolución temporal de la concentración FITC-DEXTRAN en el compartimento seroso durante los 120 minutos del ensayo, relativizada al área del saquito (ng/ml x mm^2). b) Acumulado final de FITC-DEXTRAN en el compartimento seroso. Datos expresados como media ± EE. [a] y [b], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,01 respectivamente, según las pruebas *t-student* y *Mann-Whitney.*

2.5.8. Efecto de la dieta alta en grasa en el balance redox y las defensas antioxidantes

En la Figura 2.13 se presenta el efecto de la dieta alta en grasa en el equilibrio redox intestinal, evaluado mediante la relación GSH/GSSG y los niveles de TBARS. La relación GSH/GSSG disminuyó significativamente en el grupo C57-HFD (- 42%, P<0,05) en comparación con los ratones controles Además, en C57-HFD, aumentaron significativamente los niveles de peroxidación lipídica en el tejido intestinal (+67%, P<0,05) (Fig. 2.13 a y b). Respecto a las defensas antioxidantes, se observó una disminución de la actividad de la enzima SOD en los animales C57-HFD (-19%, P<0,05) comparado a los controles (Fig. 2.13 c), mientras que la actividad de la enzima CAT aumentó (+91% P<0,05) (Fig. 2.13 d). En conjunto, estos resultados demuestran una inducción del estrés oxidativo en el tejido intestinal.

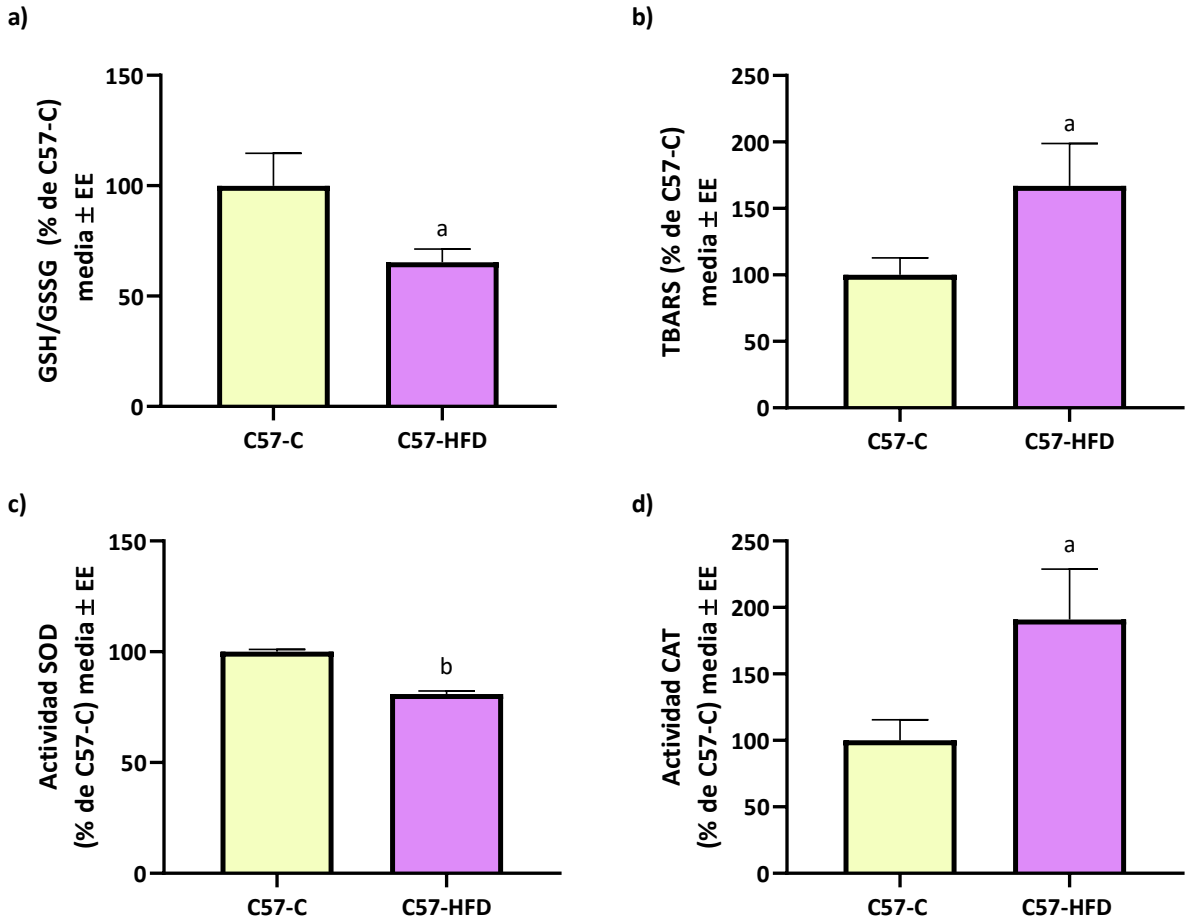


Figura 2.13. Efecto de la dieta alta en grasa sobre el equilibrio redox y las defensas antioxidantes. a) Relación GSH/GSSG. b) Detección de peroxidación lipídica por el método TBARS. c) Actividad superóxido dismutasa (SOD). d) Actividad catalasa (CAT). Estos parámetros fueron determinados en homogenados de yeyuno proximal. Datos expresados como media ± EE. [a] y [b], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,01 respectivamente, según la prueba de *Mann-Whitney.*

2.5.8. Efecto de la dieta alta en grasa en el nivel de las citoquinas proinflamatorias intestinales

Como se describió anteriormente, la obesidad inducida por una dieta alta en grasa genera cambios sistémicos caracterizados por un estado inflamatorio crónico. En nuestro modelo experimental evaluamos los niveles de ARN mensajero de las principales citoquinas proinflamatorias del intestino delgado.

A nivel del yeyuno la expresión de TNF-α se halló aumentada (+47%,), así como las interleuquinas, IL-1β (+51%) e IL-6 (+158%) en los ratones alimentados con dieta alta en grasa (Fig. 2.14 a, c y d).

Para comprobar si la respuesta inflamatoria fue inducida en toda la extensión del intestino delgado, evaluamos la expresión de la citoquinas en muestras de íleon, las cuáles igualmente se

encontraban significativamente aumentadas en los animales HFD, TNF-α (+148%, P<0,05), IL-1β (+870,) e IL-6 (+1359%) (Fig. 2.14 b, d y e) respecto del control.

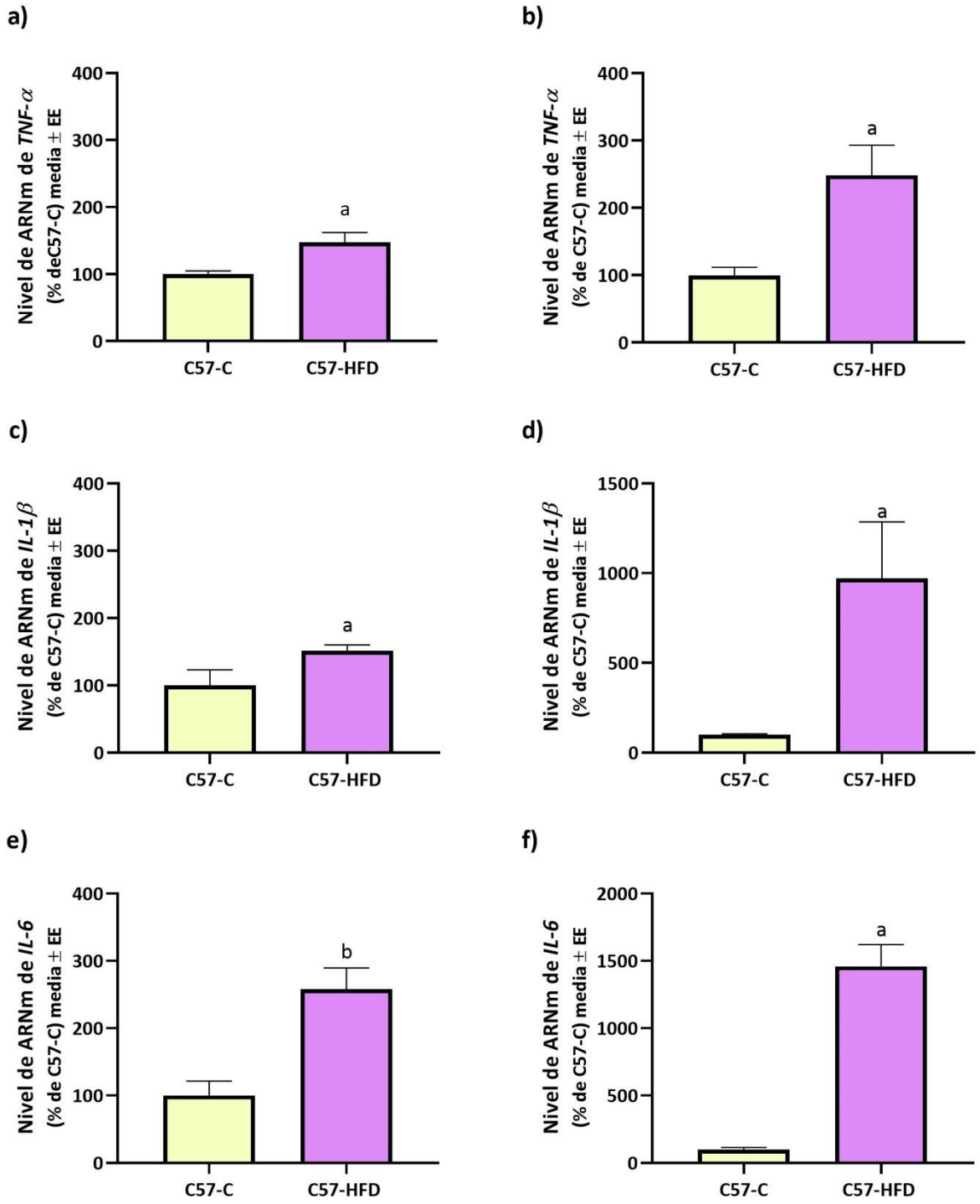


Figura 2.14. Evaluación de la expresión a nivel de mensajero de citoquinas proinflamatorias. a) Expresión de ARNm de *TNF-α* en yeyuno. b) Expresión de ARNm de *TNF-α* en íleon. c) Expresión de ARNm de *IL-1β* en yeyuno. d) Expresión de ARNm de *IL-1β* en íleon. d) Expresión de ARNm de *IL-6* en yeyuno. e) Expresión de ARNm de *IL*-6 en íleon. Datos expresados como media ± EE. [a] y [b], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,01 respectivamente, según la prueba de *Mann-Whitney.*

2.6. Discusión y conclusiones parciales

La obesidad es una enfermedad multifactorial compleja que se define por una hipertrofia del tejido adiposo y está vinculada a un mayor riesgo de padecer enfermedades no transmisibles (ENT), como enfermedades cardiovasculares, cáncer, DMT2 y enfermedades respiratorias crónicas, responsables de alrededor del 80% de las muertes de adultos en la sociedad occidental (OMS 2020, 2022).

La población occidental desarrolla mayormente un estilo de vida sedentario con aumento en el consumo de dietas calóricas llamadas "*Western diet*" que incluyen alimentos ultraprocesados con alto contenido en ácidos grasos saturados y monosacáridos, bebidas azucaradas, e insuficiente consumo de fibras, vitaminas y minerales (Lin y Li, 2021; Christ y col. 2019). Esta dieta alta en calorías, ocasiona en el individuo un estado de inflamación crónica que se asocia a diferentes trastornos endocrino-metabólicos y a una mayor morbimortalidad (Hotamisligil, 2006; Ahmad y col. 2017; Christ y col. 2019).

Durante años se han desarrollado múltiples modelos animales de obesidad que permitieron el estudio de diferentes características de esta patología, pero los modelos de obesidad inducidos por la dieta, especialmente los enriquecidos en grasa saturada, son los que mejor mimetizan la características fisiopatológicas del desarrollo de la enfermedad humana (Lutz y Woods, 2012; Catta-Preta y col. 2011). Es por ello, que se utilizó como modelo de obesidad, en este trabajo de tesis, ratones macho jóvenes alimentados con una dieta con 40% de grasa por un período de 16 semanas (Lambertucci y col 2018, Speakman, 2019).

Luego de la dieta, los ratones C57-HFD, presentaron mayor peso corporal que los ratones controles y mayor índice graso, determinado por el aumento de los panículos adiposos mesentéricos, epididimales y retroperitoneales (Silva y col. 2020). Estos panículos representan, en los ratones, los depósitos de grasa visceral o central, asociada a un mayor riesgo de desarrollar DMT2, enfermedades cardiovasculares e hiperlipidemia, patologías que aumentan la morbimortalidad de la obesidad (Collins y col. 2004; Catta-Preta y col. 2011). Además, la hipertrofia del tejido adiposo se confirmó microscópicamente, observándose un mayor diámetro de los adipocitos.

Aunque a partir de la cuarta semana de tratamiento se observó un aumento significativo del peso corporal en los ratones HFD, la alimentación alta en grasa se prolongó hasta la semana 16 con el fin de generar las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad (Collins y col. 2004). Al finalizar el tratamiento, los animales HFD presentaron aumento de los niveles de glucemia, trigliceridemia

y colesterolemia, respecto a los animales alimentados con dieta estándar. Dentro de las alteraciones metabólicas principales que ocasionan la obesidad se encuentra la resistencia a la insulina. Existen distintos métodos para evaluar la resistencia a la insulina en modelos animales *in vivo*, que varían en complejidad, entre ellos el modelo de homeostasis para evaluar resistencia insulina (HOMA-IR), el índice cuantitativo de comprobación de la sensibilidad a la insulina (QUICKI), la prueba de tolerancia a la insulina y el *clamp* hiperinsulinémico-euglucémico (Benedé-Ubieto y col.2020). La PTII es una herramienta que evalúa directamente el efecto de la insulina sobre la glucemia y como consecuencia de su practicidad metodológica se ha convertido en el método más utilizado para el diagnóstico de resistencia a insulina en roedores (Bowe y col. 2014). Los animales C57-HFD, presentaron un menor descenso porcentual de la glucemia que los controles en la PTII, demostrando su resistencia periférica a la insulina.

Además, la obesidad y la resistencia a insulina están asociadas al desarrollo de hipertensión arterial, que en conjunto son criterio diagnóstico para el síndrome metabólico. Aunque en este trabajo no se evaluó la presión arterial, se ha reportado previamente en un modelo similar de dieta alta en grasa, que luego de 16 semanas, los ratones C57BL/6 presentan aumento de la presión arterial sistólica y diastólica (Della Vedova y col. 2016).

La obesidad es una enfermedad sistémica que afecta a múltiples órganos, entre ellos el tubo digestivo, alterando su función de barrera contra agente externos (Benoit y col. 2015; Ahmad y col. 2017). Como el órgano de estudio de esta tesis doctoral es el intestino delgado, se evaluó el efecto de la dieta alta en grasa en la estructura histológica de la capa mucosa de yeyuno. En concordancia con otros trabajos (Ahmad y col. 2017, Evangelista-Silva y col. 2021) se observó un aplanamiento de las vellosidades intestinales, producto de la disminución de su longitud y aumento del ancho, fenómeno que, además, sucede en otras patologías inflamatorias como la Enfermedad Celíaca (Gujral y col. 2012; Villanaci y col 2020) y en enteropatías crónicas que se manifiestan clínicamente con síndrome malabsortivo (giardasis, tuberculosis, enfermedad de Crohn, entre otras) (Schiepatti y col.2021).

Como se explicó anteriormente, el aparato digestivo es una de las puertas de entrada hacia al interior del organismo, es por ello que el intestino delgado tiene además la función de proteger contra los agentes externos, conformando la barrera física más grande del organismo, parte de esta función se realiza por la producción de moco y especialmente, por la presencia de las uniones estrechas entre las células que limita el transporte paracelular a través del epitelio intestinal (Di Tommaso y col. 2021). La capa mucosa intestinal presenta células caliciformes productoras de

moco. La dieta alta en grasa generó un aumento de la cantidad de estas células tanto en las vellosidades como en las criptas, que implicaría un aumento en la producción de moco. Esta alteración puede considerarse un mecanismo de protección del epitelio intestinal al daño directo de la grasa o a la inflamación generada por la misma (Benoit y col. 2015).

Asimismo, mediante el ensayo de permeabilidad con la sonda FD-4, se corroboró que la dieta alta en grasa altera las uniones estrechas entre sus células, dado que los ratones del grupo HFD, mostraron un aumento significativo de la permeabilidad paracelular. Esta alteración fue descripta previamente y puede deberse al efecto que tiene el alimento HFD en el conjunto de proteínas que integran las uniones estrechas, al disminuir la expresión de claudina, ocludina y zonula occludens-1 (Ahmad y col. 2017; Chang y col. 2018).

En forma notable, debido a las alteraciones metabólicas y enfermedades asociadas a la obesidad, los pacientes obesos suelen ingerir múltiples fármacos por períodos prologados de tiempo, por ello es importante que los mecanismos metabolizadores y detoxificantes del intestino funcionen correctamente para evitar alteraciones en su farmacocinética y farmacodinamia (Cheng y col 2008). Hanley y col. (2010) describieron diferentes mecanismos que influyen en la biodisponibilidad de fármacos en pacientes obesos, pero actualmente es escasa e inconclusa la información disponible sobre el rol de la barrera bioquímica intestinal en la obesidad (Murakami y col. 2020). De acuerdo a esto, como objetivo de este capítulo de la tesis, se estudió el efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de los trasportadores ABC apicales, Mrp2 y P-gp, componentes claves de la barrera bioquímica intestinal. Como antecedentes previos, se ha reportado la disminución de la expresión y actividad de estos trasportadores intestinales en modelos de síndrome metabólico en ratas inducido por la administración de fructosa en el agua de bebida (Novak y col. 215, Londero y col. 2017; Zecchinati y col 2019) y de diabetes inducida por estreptozotocina (Nawa y col. 2010). En concordancia, nuestros resultados, demuestran que la dieta alta en grasa por 16 semanas a ratones macho C57BL/6 disminuye la expresión del transcripto de las proteínas Mrp2 y P-gp intestinales y sus actividad de transporte, dichas alteraciones serían consecuencia, al menos en parte, de una regulación a nivel transcripcional. Cabe destacar la importancia fisiológica que presenta la evaluación de la actividad de Mrp2 y P-gp a través de la técnica de saquitos evertidos, al comprobar la función transportadora de estas proteínas y el rol de la barrera bioquímica al limitar la absorción intestinal. La disminución de la actividad de Mrp2, y P-gp por la dieta alta en grasa, podría generar cambios en la biodisponibilidad de fármacos como observaron Sugioka y col. (2009) al administrar nelfinavir a ratas obesas y

Sawamoto y col. (2014) en la mantención de la concentración plasmática de tacrolimus en ratas Zucker.

Similarmente, Lu y col. (2019) evaluaron la expresión de ARNm de Mrp2 y P-gp en intestino de ratones C57BL/6 macho alimentados con una dieta HFD compuesta por dieta control más el agregado de 10% de manteca de cerdo, 20% de sacarosa, 1,5% de colesterol, 1% de ácido biliar y 1% de yema de huevo en polvo, por 4, 12 y 24 semanas. Observaron que a las 4 semanas de HFD disminuyó la expresión de Mrp2 y Mdr1b y no se modificó la de Mdr1a; a las 12 semanas aumentó la expresión de Mrp2 y Mdr1a y disminuyó la de Mdr1b y a las 24 semanas disminuyó Mrp2 y Mdr1b. Interesantemente, la fluctuación en la expresión de los transportadores denotan la importancia del contenido de grasa de la dieta utilizada y la duración del período de administración de la misma.

La mayoría de los trabajos que estudian obesidad y el daño que ocasiona en el organismo, concuerdan que hay dos mecanismos por los cuales ejerce su efecto deletéreo, ellos son la inflamación crónica y el estrés oxidativo (Hotamisligil, 2006).

El estrés oxidativo representa un desbalance del equilibrio redox causado por el aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), que inducen daño oxidativo en lípidos y proteínas, y alteraciones del sistema de las defensas antioxidantes de organismo. Las ROS son neutralizadas por las enzimas relacionadas con el sistema del glutatión, superóxido dismutasa, y los convierten en compuestos estables. El estrés oxidativo desempeña un papel importante en el desarrollo y progresión de las alteraciones metabólicas producto del consumo de dietas alta en grasa como la esteatosis hepática y su progresión a hígado graso no alcohólico (Freitas Carvalho y col. 2019).

Como era de esperar en este modelo de obesidad inducida por dieta se halló un aumento de la peroxidación lipídica, indicando daño oxidativo en los lípidos que componen el enterocito. También corroborado por la menor relación entre GSH/GSSG. Las enzimas antioxidantes también se modificaron por el tratamiento HFD. Interesantemente en sentidos opuestos, la actividad catalasa aumentó mientras la actividad SOD disminuyó en los ratones HFD.

Los resultados de la evaluación de las enzimas antioxidantes, nos permite interpretar que el estrés oxidativo es una variable muy fluctuante en estos modelos de obesidad, y que su interpretación depende del momento en que se analizan las muestras, el tipo de tejido estudiado y el tipo de dieta administrada (Della Vedova y col. 2016, Funes y col. 2019).

Por consiguiente, en este trabajo de tesis se propone como mediador principal de las alteraciones en los transportadores ABC intestinales, al estado inflamatorio crónico sistémico generado en la obesidad. En este sentido existen múltiples trabajos reportados con modelos similares de inducción de obesidad por HFD que observan aumento de citoquinas proinflamatorias, TNF-α, IL-1β e Il-6, en el plasma de los ratones obesos (Catta-Preta y col. 2011; Benoit y col. 2015). Diversos autores (Hotamisligil, 2006; Goossens, 2007; Chan y col. 2018; Kawai y col. 2021) proponen a la hipertrofia del tejido adiposo como el origen del estado inflamatorio crónico a través del reclutamiento de células inmunes y la producción de citoquinas y adipoquinas, confirmado en nuestro modelo experimental mediante la observación de las coronas de macrófagos alrededor de los adipocitos.

En este trabajo, se evaluaron además las principales citoquinas proinflamatorias *in situ* en muestras de yeyuno e íleon, como una estimación del rol clave de las mismas en la alteración de la barrera bioquímica intestinal. De acuerdo a lo esperado, los niveles de los transcriptos de TNF-α, IL-1β e IL-6 se hallaron aumentados en los ratones HFD.

Como conclusión de este capítulo, la obesidad generada por una dieta alta en grasa modifica la barrera física y bioquímica intestinal. En particular, la barrera bioquímica encargada de la eliminación de xenobióticos potencialmente dañinos, se altera como consecuencia de la disminución de la expresión del transcripto y la actividad de los transportadores Mrp2 y P-gp. Esta regulación negativa de Mrp2 y P-gp intestinales se deberían principalmente a la inducción de un estado proinflamatorio *in situ* en el epitelio por la administración de la dieta alta en grasa.

<u>CAPÍTULOS TRES:</u> Rol de la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α en la regulación de los transportadores Mrp2 y P-gp intestinales en ratones alimentados con dieta alta en grasa

3.1. Introducción

3.1.1. Obesidad e inflamación

La obesidad es una enfermedad multifactorial, que presenta alteraciones metabólicas, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, inmunitaria e inflamación crónica sistémica. Basados en estudios de investigación básica y clínica se estableció que la inflamación de bajo grado del tejido adiposo es un factor clave en la fisiopatogenia de las disfunciones metabólicas asociadas a la obesidad (Hotamisligil 2006; Kawai y col. 2021).

El tejido adiposo se clasifica por su morfología y función en tres subtipos, blanco, marrón o pardo y beige (Sakers y col. 2022). A su vez, el tejido adiposo blanco (TAB) puede dividirse según su localización, en tejido adiposo subcutáneo (TAS) ubicado bajo la piel y tejido adiposo visceral (TAV), situado intrabdominalmente, adyacente a los órganos internos (Wu y Ballantyne 2020; Reyes-Farias y col. 2021). Aproximadamente, un tercio de las células del tejido adiposo son adipocitos, el resto del tejido está formado por fibroblastos, macrófagos, células estromales y preadipocitos (Zorena y col 2020; Kawai y col. 2021). El TAB, además de ser la principal reserva energética del organismo, tiene funciones endócrinas al producir y secretar adipoquinas, como leptina, resistina, adiponectina, citoquinas, inhibidor del activador de plasminógeno-1, angiotensinógeno y enzimas que regulan la actividad de las hormonas esteroideas (Ahima y Lazar 2008; Ouchi y col. 2011).

Específicamente, la leptina es un polipéptido que actúa a nivel hipotalámico promoviendo una reducción de la ingesta energética a través de una señal de saciedad y estimulando la termogénesis. Además, tiene un rol proinflamatorio, al activar monocitos, macrófagos y linfocitos *natural killer* (linfocito NK), regulando su proliferación, quimiotaxis y fagocitosis. Asimismo estimula la secreción de TNF-α e IL-6 y la liberación de radicales de oxígeno por neutrófilos (Ahima y Lazar 2008; Ouchi y col. 2011; Zorena y col. 2020; Dhawam y Sharma 2020).

La adiponectina, es una glicoproteína que regula la homeostasis energética del organismo y aumenta la sensibilidad a la insulina, al estimular la oxidación de ácidos grasos y captación de glucosa en el músculo esquelético; inhibir la gluconeogénesis y lipogénesis en el hígado y estimular el depósito graso y captación de glucosa en el tejido adiposo. Además, tiene un rol antiinflamatorio al inhibir la adhesión de monocitos a células endoteliales, disminuir la producción

de moléculas de adhesión y suprimir la actividad de TNF-α. (Ahima y Lazar 2008, Ouchi y col. 2011; Fang y Judd 2018; Zorena y col. 2020).

En presencia de un balance energético positivo, resultado de la ingesta de una dieta obesogénica (especialmente en ácidos grasos saturados de cadena larga), el tejido adiposo incrementa sus depósitos grasos y consecuentemente el tamaño de los adipocitos. Por su escasa irrigación, la hipertrofia del tejido adiposo comprime los vasos sanguíneos, generando un estado de hipoxia que puede ocasionar apoptosis y pequeños focos de necrosis. Estos trastornos conllevan a disfunciones metabólicas en el adipocito; por un lado se activan vías metabólicas lipolíticas, que liberan al torrente sanguíneo gran cantidad ácidos grasos libres, que se depositan en el hígado, páncreas, y músculo estriado esquelético. Por otro lado, se altera la normal producción de las adipoquinas, aumentando la secreción de leptina y disminuyendo la producción de adiponectina (Fig. 3.1.). Estas alteraciones gatillan una respuesta inmune en el tejido adiposo (Hotamisligil 2006). Los macrófagos residentes en el tejido adiposo responden transformando su perfil inmunológico, de tipo 2 (tolerogénico, asociado a la producción de mediadores antiinflamatorios como IL-10, IL-4, IL-13, TGF-β) a un perfil de tipo 1 (inflamatorio, asociado a la producción de mediadores como TNF-α, IL-1β e IL-6, IL-12) (Fig. 3.1.). El perfil tipo 1 favorece el reclutamiento de células inmunes circulantes (linfocitos, mastocitos, neutrófilos, eosinófilos, entre otras), libera a la circulación quimioatractantes y citoquinas proinflamatorias y genera especies reactivas de oxígeno como óxido nítrico a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Lumeng y col. 2007; Wu y Ballantyne 2020; Daryabor y col. 2020; Kawai y col. 2021).

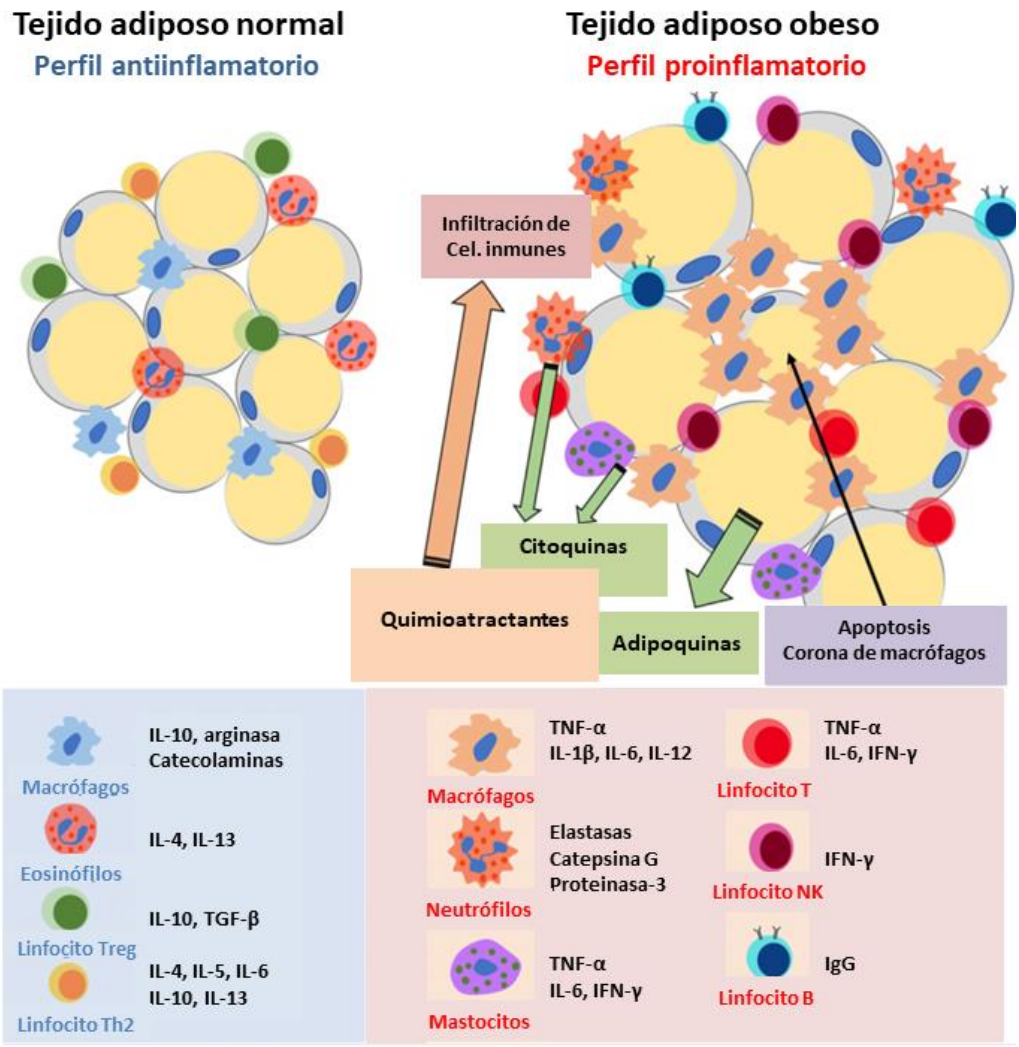


Figura 3.1. Representación gráfica del tejido adiposo obeso. Adaptado de Kawai y col. 2021. La hipertrofia del tejido adiposo, determina cambios fenotípicos en los adipocitos y en las células inmunes residentes que detienen la secreción de citoquinas antiinflamatorias protectoras para iniciar la secreción de adipoquinas y citoquinas inflamatorias, tanto a nivel local como sistémico, que inducen resistencia periférica a la insulina. La reacción inflamatoria se mantiene por quimioatractantes producidos por los adipocitos.

3.1.2. Obesidad y barrera intestinal

Conforme a los resultados del capítulo 2, la obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas modifican diferentes elementos del epitelio intestinal, alterando su función de barrera física y química contra el medio externo.

Se ha demostrado que la dieta alta en grasa induce aumento de la permeabilidad intestinal mediante alteraciones en las proteínas que integran las uniones estrechas entre enterocitos adyacentes y en la dirección del remodelado tisular (Ahmad y col. 2017; Chan y col. 2018; Rohr y

col. 2020), además modifica la producción y la calidad del moco por las células caliciformes (Benoit y col. 2015; Rohr y col. 2020).

Por otra parte, un gran número de estudios científicos demostraron que la alimentación con dieta alta en grasa se asocia a alteraciones de la microbiota intestinal, disbiosis y aumento de microorganismos productores de lipopolisacárido (LPS) El LPS puede traslocarse, desde la luz intestinal hacia la circulación sistémica, favorecido por el aumento de la permeabilidad intestinal ocasionando endotoxemia metabólica (Wu y col. 2020). Esta endotoxemia puede contribuir a la inflamación del tejido adiposo al inducir la secreción de citoquinas y adipoquinas proinflamatorias por los adipocitos y macrófagos residentes (Benoit y col. 2015; Zinocker y Lindseth 2018; Di Tomasso y col. 2021).

Adicionalmente, las dietas occidentales altas en grasas, carbohidratos y bajas en fibras, se asocian al desarrollo de enteropatías como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), el síndrome de intestino irritable, enfermedad celíaca, entre otras. (Drouet y col 2012; Hou y col. 2013; Rohr y col. 2020). En efecto, se corroboró una asociación positiva entre la obesidad y el riesgo de desarrollar enfermedad inflamatoria intestinal como la enfermedad de Crohn; a su vez en 2017, el 15 a 40% de los adultos con EII eran obesos y el 20 al 40% presentaban sobrepeso (Singh y col. 2017; Johnson y Loftus 2021). También, el consumo elevado de grasas en la dieta aumenta el número y la intensidad de los síntomas de la enfermedad, presumiblemente debido a una mayor permeabilidad de la mucosa a microorganismos o a antígenos alimentarios (Hou y col. 2013).

3.1.3. Factor de Necrosis Tumoral-α

El Factor de Necrosis Tumoral-α (TNF-α) es la citoquina inflamatoria prototípica descubierta inicialmente como mediador de la caquexia por cáncer. Es producido por macrófagos, linfocitos T, células endoteliales y adipocitos, entre otros tipos de células (Pamir y col.2009).

Se sintetiza como una proteína transmembrana de 26 kDa que posteriormente es degradada por una metaloproteinasa liberándose a la circulación la molécula soluble TNF-α de 17 kDa (Kriegler y col. 1988). TNF-α es reconocida como una citoquina reguladora multifuncional, implicada en: inflamación, metabolismo, supervivencia y apoptosis celular, citotoxicidad, homeostasis de los tejidos e inducción de la producción de otras citoquinas tales como IL-1β e IL-6 (Aggarwal 2003; Wandrer y col. 2020).

Asimismo, fue la primera citoquina proinflamatoria descripta en el tejido adiposo, que vincula la obesidad con la resistencia a la insulina (Hotamisligil y col. 1993) Se ha reportado aumento de la

expresión de TNF-α en ratones y en humanos obesos (Hotamisligil y col. 1995) y su neutralización en estudios en roedores corrigió la sensibilidad a la insulina (Hotamisligil y col. 1993). TNF-α disminuye la sensibilidad a la insulina, mediante la fosforilación de proteínas implicadas en la transducción de la señal de la insulina, como el sustrato-1 del receptor de insulina, también por la disminución de la transcripción del ARNm del receptor de insulina y la estimulación de su degradación mediada por proteosomas así como su inactivación mediada por fosfatasas (Liang y col. 2008; Ouchi y col. 2011).

Por otro lado, TNF-α desempeña un papel central en muchas enfermedades asociadas a la disfunción de la barrera epitelial intestinal, incluida la enfermedad inflamatoria intestinal, la isquemia intestinal y la enfermedad de injerto contra huésped (Feng y Teitelbaum 2013).

La transducción de la señal de TNF-α está mediada por dos receptores transmembrana, TNFR1 (*Tnfrsf1a*, p55) y TNFR2 (*Tnfrsf1b*, p75). La expresión de TNFR1 se halla en la mayoría de las células nucleadas, mientras la expresión de TNFR2 se encuentra restringida a las células inmunitarias, las células endoteliales y neuronas (Wandrer y col. 2020; Müller y col. 2022).

TNFR1 se activa preferentemente por la unión de la citoquina soluble, aunque también lo puede hacer por la unida a la membrana. La unión de TNF-α a TNFR1 desencadena una serie de acontecimientos intracelulares que finalmente dan lugar a la activación de importantes factores de transcripción, responsables de la expresión de genes inducibles involucrados en el crecimiento y muerte celular, el desarrollo tumoral, la respuesta inmunitaria, inflamatoria y al estrés (Chen y Goeddel 2002).

La cascada proinflamatoria comienza por la unión de TNF-α al dominio extracelular de TNFR1. Esta unión disocia el dominio de muerte intracelular de la proteína que bloquea su señalización intracelular, llamada proteína silenciadora del dominio de muerte (SODD, del inglés *silencer of death domain*). Una vez liberado el dominio de muerte, se acopla una proteína adaptadora TRADD (del inglés *TNFR1- asociated death domain*) que recluta proteínas adicionales, como la proteína-1 de interacción con el receptor (RIP-1, del inglés *receptor interacting protein-1*), la proteína FAS (FADD, del inglés *FAS associated death domain protein*) y el factor 2 asociado a TNFR1 (TRAF2, del inglés *TNFR1 associated factor 2*). Estas proteínas adaptadoras intervienen en la activación de vías de señalización intracelular (Chen y Goeddel 2002; Bluml y col. 2012).

El reclutamiento por RIP-1 de la proteína quinasa quinasa quinasa 3 activada por mitógenos (MAP3K, del inglés *mitogen activated protein kinase kinase kinase*) y de la quinasa activada por el factor de crecimiento transformante beta (TAK1, del *inglés transforming growth factor beta-*

activated kinase 1) activan el complejo de quinasas IκBα (IKK; del inglés *IκBα kinase*) y el modulador esencial del factor nuclear-kappa B (NEMO, del inglés *nuclear factor-kappa-B essential modulator)*. A continuación, el complejo IKK se fosforila, determinando su posterior ubiquitinación y degradación. Esto permite la liberación del dímero del factor nuclear-kappa B (NF-κB, del inglés, *nuclear factor kappa B*) que se transloca al núcleo e induce la transcripción génica. NF-κB es el mediador central de los efectos proinflamatorios de TNF-α, La inducción del receptor TNFR1 estimula la denominada vía clásica de activación de NF-κB y sus genes diana incluyen citoquinas, quimioquinas, receptores que regulan la adhesión y migración de las células, así como la angiogénesis. Además, TNFR1 activa la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) a través de la activación de la quinasa 1 reguladora de señal de apoptosis-1 (ASK-1, del inglés *apoptosis signal-regulating kinase*) y de la MAP3K (Fig. 3.2) (Bluml y col. 2012; Holbrook y col. 2019).

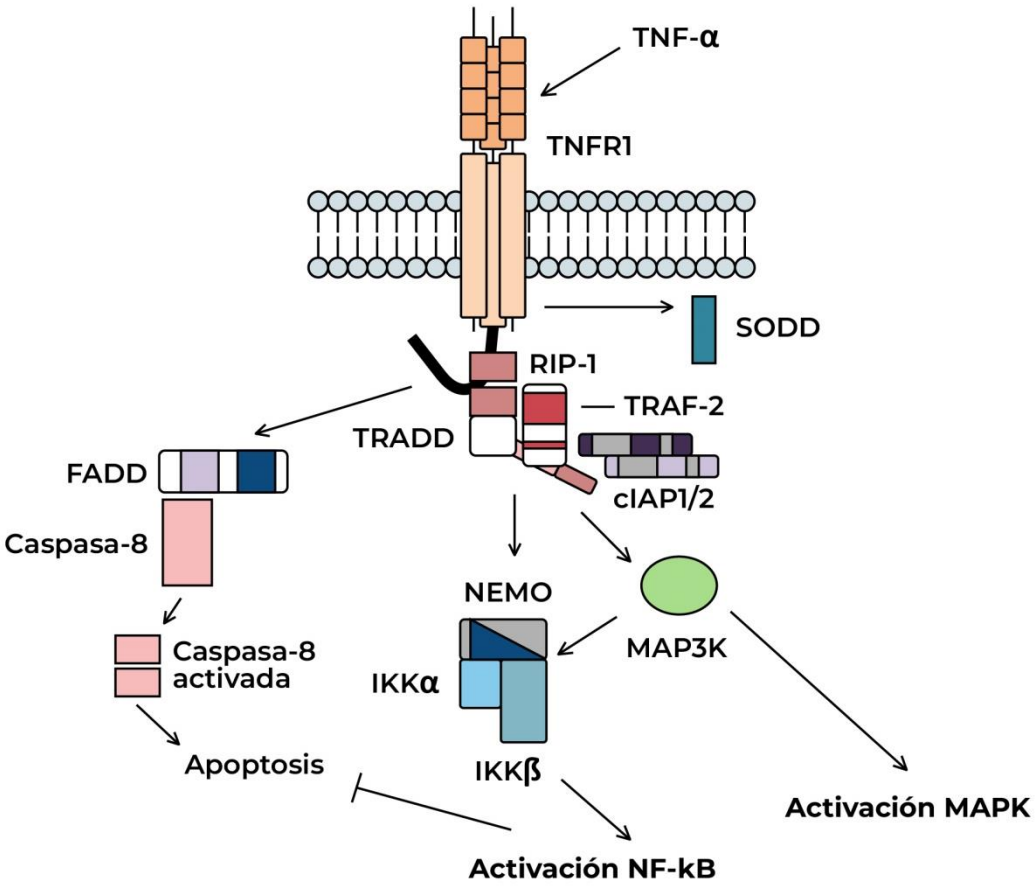


Figura 3.2. **Vía de transducción de señales del TNFR1**. La unión de TNF-α con su receptor R1 da lugar a la liberación de SODD y la formación de un complejo proteína-receptor que incluye las proteínas adaptadoras TRADD, TRAF2, RIP y FADD. Estas proteínas adaptadoras reclutan a su vez otras enzimas específicas que activan e inician los acontecimientos que conducen a la apoptosis, la activación de NF-κB y MAPK.

3.1.4. Modelo de ratón *knockout* para el receptor 1 de TNF-α

Con el fin de caracterizar *in vivo* las funciones fisiológicas de los receptores TNFR1 y TNFR2, tanto las vías de señalización intracelular como las moléculas capaces de modular la actividad de TNF-α, Peschon y col. (1998) generaron y estudiaron roedores que carecían de TNFR1 y/o TNFR2 o de ambos. Para la mutación del gen *Tnfrsf1a*, se utilizó un casete de resistencia a PGK-neomicina (PGK, del inglés *phosphoglycerate kinase promoter*) que sustituyó 4kb de secuencia, incluyendo los exones 2 a 5 (aminoácidos 30 - 184). En el caso de la mutación *Tnfrsf1b*, un casete de resistencia a PGK-neomicina sustituyó 1kb de secuencia que codifica los aminoácidos 3 - 26.

A su vez, Peschon y col., establecieron que los ratones deficientes tanto en TNFR1 y/o TNFR2 son físicamente normales e iguales fenotípicamente a los ratones C57BL/6, cepa que utilizaron para generar los mutantes. Indicando que tanto los receptores, como TNF-α, no serían necesarios para el desarrollo normal del ratón y la homeostasis en condiciones basales. Sin embargo, observaron déficits selectivos en las respuestas inflamatorias y de defensa del huésped en ratones que presentaban estas mutaciones. Por ejemplo, los ratones que carecían de TNFR1 o de TNF-α presentaban defectos en los folículos de las células B primarias y en las redes de las células dendríticas foliculares.

Desde el desarrollo de estos ratones mutantes, se ha demostrado con la utilización de antagonistas o agonistas específicos de estos receptores, que la mayoría de las respuestas inflamatorias atribuidas clásicamente a TNF-α están mediadas por TNFR1. Por ejemplo, los estudios realizados con ratones deficientes en el receptor TNFR1 revelan que su papel es fundamental en la citotoxicidad inducida por LPS, la artritis inducida por colágeno y la infección por *Listeria monocytogenes* (Pendey y col. 2003).

Actualmente, los ratones TNFR1 *knockout* se utilizan para dilucidar el rol de la vía de señalización de este receptor y de TNF-α en patologías inflamatorias crónicas, como son la obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas (Liang y col. 2008; Pamir y col. 2009; Bhering Martins y col. 2018), y en los estudios de hígado graso no alcohólico (Lambertucci y col. 2018).

3.2. Objetivo específico

Evaluar en el modelo de ratón knock-out (TNFR1-KO) el rol de la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α en las alteraciones de la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales generadas en condiciones de obesidad.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Reactivos

PSC833 se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, Estados Unidos). 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), Rodamina 123, leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pepstatina A, ditiotreitol (DTT), diaminobencidina (DAB) y albúmina sérica bovina (BSA) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos). Los restantes químicos y reactivos utilizados fueron de calidad analítica con alto grado de pureza.

3.3.2. Animales y tratamientos

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 y *knockout* C57BL/6-Tnfrsf1atm1Imx/J (R1KO) (17-22 g de peso corporal, 5 semanas de edad) gentilmente cedidos por la Dra. Silvia Di Genaro, los cuales fueron originalmente obtenidos del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, Maine, Estados Unidos). Los animales recibieron de bebida agua *ad libitum* y dieta comercial estándar, grupos C57-C y R1KO-C (n: 10 por grupo) o dieta comercial estándar enriquecida con 40% de grasa bovina, grupos C57-HFD y R1KO-HFD (n: 10 por grupo), durante 16 semanas. (Collins y col. 2004; Petro y col. 2004; Andrikopoulos y col. 2005; Lambertucci y col. 2018) (Fig. 3.2).

Antes de iniciar el tratamiento dietético, todos los animales fueron sometidos a una prueba de tolerancia intraperitoneal a la glucosa, con el fin de confirmar su metabolismo glucémico basal normal (Londero y col. 2016) (Fig. 3.3).

Durante el experimento, se registraron el peso corporal (g) y el consumo de alimento (kcal/animal) semanalmente. El peso corporal se expresa en porcentaje respecto al peso al comienzo del tratamiento (peso final x 100/peso inicial). En la 15ª semana de dieta, se evaluó la resistencia a insulina a través de la prueba de tolerancia intraperitoneal a la insulina (Fig. 3.2) (Zecchinati y col. 2019). Todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con el Reglamento para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Expediente 6109/012 Resolución CE 267/02) y fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso Animal de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

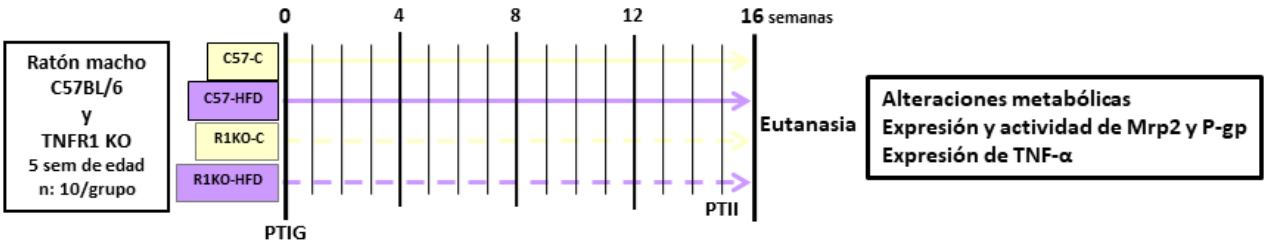


Figura 3.3. Representación esquemática del diseño experimental. Los animales recibieron dieta comercial estándar (grupos C57-C y R1KO-C) o una dieta comercial estándar enriquecida con un 40% de grasas (grupos C57-HFD y R1KO-HFD), durante 16 semanas. Al inicio del experimento todos los animales fueron sometidos a una prueba de tolerancia intraperitoneal a glucosa (PTIG) y en la semana 15 de tratamiento a una prueba de tolerancia intraperitoneal a insulina (PTII). Luego de 16 semanas de dieta los animales fueron sacrificados y se recolectaron muestras de plasma, intestino delgado y tejido adiposo.

3.3.3 Tratamiento dietético

Ver sección 2.3.3.

3.3.4. Eutanasia

Ver sección 2.3.4.

3.3.5. Procedimiento quirúrgico

Ver sección 2.3.5.

Segmentos cilíndricos de íleon se colocaron individualmente en solución *buffer* de formalina para la posterior realización de estudios inmunohistoquímicos. Otra porción de íleon se abrió longitudinalmente y por raspado con un portaobjeto, se obtuvo la capa mucosa, la cual se pesó y homogeneizó para la medición de los niveles tisulares de TNF-α y para la preparación de membranas de ribete en cepillo (BBM, del inglés *brush border membrane*).

3.3.6. Estudios bioquímicos

3.3.6.1. Determinaciones plasmáticas

Ver sección 2.3.6.1

3.3.6.2. Prueba de tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa

Ver sección 2.3.6.2

3.3.6.3. Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina

Ver sección 2.3.6.3

3.3.7. Estudios histológicos de tejido adiposo

Ver sección 2.3.7.1

3.3.8. Estudios de Inmunohistoquímica

Para la inmunodetección *in situ* de la proteína P-gp, los segmentos de íleon fijados en formaldehído al 10% se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se embebieron en parafina. Luego, se cortaron secciones de tejido de 4 µm de grosor con un micrótomo. Tras la desparafinación en xileno y la rehidratación mediante etanol graduado, se permeabilizaron las membranas celulares con Tritón 0,2% en *buffe*r fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) durante 10 min a temperatura ambiente y luego se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con H_2O_2 al 3% durante 10 min. A continuación, se realizó la recuperación antigénica, colocando los cortes en *buffer* citrato 0,01 M (pH=6,0) a 80°C durante 15 min, luego se enfriaron a temperatura ambiente y se bloquearon los sitios de unión inespecífica a proteínas con albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) al 3% durante 30 min. A continuación, las secciones de tejido se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (Mdr-1 (D-11): sc-55510, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos). Se utilizó el sistema de detección CytoScan HRP (Cell Marque, Sigma Aldrich, California, Estados Unidos); se aplicó el anticuerpo secundario polivalente biotinilado y las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió la proteína marcadora estreptavidina HRP y se incubó durante 30 min. La inmunorreactividad de P-gp se visualizó con tinción de 3,3' diaminobencidina (DAB, Sigma Aldrich, California, Estados Unidos), según las instrucciones del proveedor. Finalmente, las secciones se contra tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron en xileno y se tomaron fotografías con microscopio Nikon Eclipse CI-L (Nikon Corporation, Tokio, Japón) (Mottino y col. 2000; Guo y col. 2013).

3.3.9. Obtención de membranas de ribete en cepillo (BBM)

Una vez obtenida la mucosa intestinal por raspado, se homogeneizaron 100 mg de la misma en 2 ml de *buffer* A frío (manitol 50 mM, Tris/HCl 2 mM, pH=7,10) suplementado con inhibidores de proteasas (leupeptina 25 mg/ml; PMSF 40 mg/ml y pepstatina A 0,5 mg/ml) (Mottino y col. 2000). La homogeneización se realizó con un émbolo de teflón estándar y camisa de vidrio (20 golpes a 2000 rpm). Posteriormente se utilizó el método de precipitación por catión divalente (Kessler y col. 1978), con las modificaciones de Mottino y col. (2000), que consisten en adicionar a los

homogenados 20 µl de $CaCl_2$ 1 M e incubarlos durante 15 min en hielo, mezclando por inversión cada 5 min. Luego, se centrifugaron a 3000 g durante 15 min a 4°C, y los sobrenadantes se centrifugaron a 27000 g durante 40 min a 4°C. Finalmente, los pellet enriquecidos en BBM se resuspendieron en 50-60 µl de *buffe*r B (manitol 300 mM, HEPES 10 mM, Tris 10 mM, pH=7,50) suplementado con inhibidores de proteasas. Posteriormente se midió la concentración de proteínas de la fracción BBM (Bradford 1976) e inmediatamente se utilizó para estudios de *Western blot.*

3.3.10. Estudios de *Western blot*

Las alícuotas de BBM se mantuvieron en hielo y se utilizaron el mismo día en los estudios de *Western blot*. Los niveles proteicos de P-gp y β-actina se detectaron en BBM. Como primer paso, se realizó la separación electroforética de las proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*), a una concentración del 8% (Laemmli 1970). Las muestras a sembrar se prepararon en un *buffe*r de siembra conteniendo Tris/HCl 1 M pH=6,80, SDS 10% P/V, azul de bromofenol 0,005% P/V, glicerol 10% P/V y DTT 10% V/V. Los volúmenes de muestra sembrados correspondieron a 10 µg de proteínas totales. Los geles se corrieron en *buffer* Laemmli (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,1% P/V, pH=6,8) en el equipo Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad, California, Estados Unidos) en condiciones de voltaje constante: 110 V durante los primeros 15 min y 150 V hasta completar la corrida. Una vez finalizada la corrida, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Amersham Biosciences, California, Estados Unidos) en *buffe*r de transferencia (Tris 20 mM, glicina 150 mM, SDS 0,03% P/V, metanol 20% V/V, pH=8,3) durante 70 min a 4°C e intensidad de corriente constante: 0,36 A. Para tal fin se utilizó el equipo MiniTrans-Blot Cell (Bio-Rad, California, Estados Unidos). Una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon durante 1 hora en *buffer* de bloqueo (BSA 3% P/V, Tween 20 0,3% V/V en PBS) y luego se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. A continuación, se lavaron con *buffer* de lavado (Tween 20 0,3% V/V en PBS) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas utilizando un kit de quimioluminiscencia (Pierce ECL Western Blotting Substrate, ThermoScientific, Illinois, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante y cuantificadas utilizando el programa ImageJ (NIH, Bethesda, Estados Unidos). La proteína β-actina fue utilizada como control de carga. La uniformidad de carga y el control de la transferencia

fueron chequeados a través de tinción con Ponceau S. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes: anti-P-gp: sc-8313 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos) y anti-β-actina: AC-74 (1:5000) (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanito (1:5000) y anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito (1:5000), ambos de ThermoScientific (Illinois, Estados Unidos). Los resultados se expresan en % de C57-C.

3.3.11. Aislamiento de ARN total

3.3.11.1. Extracción del ARN

Ver sección 2.3.8.1

3.3.11.2. Evaluación de la integridad de los ARNs por electroforesis en gel de agarosa

Ver sección 2.3.8.2

3.3.11.3. Determinación de la concentración y pureza de los ARNs

Ver sección 2.3.8.3

3.3.12. Retrotranscripción

Ver sección 2.3.9

3.3.13. Estudios de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Ver sección 2.3.10

Las reacciones de qPCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 3.1) (Crib y col. 2017, Yan y col. 2021; Lee y col. 2021).

Los resultados de la expresión de los genes se normalizaron a los niveles de GAPDH (Lambertucci y col. 2018). Los resultados se analizaron como cuantificación relativa a través del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se expresan en % de C57-C (Livak y col. 2001).

Gen	Descripción del gen	Secuencia de oligonucleótidos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α	Directo: 5´-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3´
		Reverso: 5´-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3´
Mrp2	Abcc2	Directo: 5´-TTCCTGCCTGTTCTTCGTCT-3´
		Reverso: 5´-CGTGTGTTGAGTCGCTTGAT-3´
Mdr-1	Mdr1a	Directo: 5´-AAAGGCTCTACGACCCCCTA-3´
		Reverso: 5´-CCTGACTCACCACACCAATG-3´
	Mdr1b	Directo: 5´-TTGGTGGCACAACAACTCAT-3´
		Reverso: 5´-GGCTTTCGCATAGTCAGGAG-3´
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Directo: 5´-CACAATTTCCATCCCAGACC-3´
		Reverso: 5´-GTGGGTGCAGCGAACTTTAT-3´

Tabla 3.1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión del ARNm.

3.3.14. Evaluación de la actividad de Mrp2

Ver sección 2.3.11

Los resultados se expresan en % de C57-C.

3.3.15. Evaluación de la actividad de P-gp

Ver sección 2.3.12

Los saquitos se incubaron en viales con *buffer* Krebs-Henseleit con o sin la adición del inhibidor de P-gp, PSC833, (10 µM) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Estados Unidos).

Los resultados se expresan en % de C57-C.

3.3.16 Medición de los niveles tisulares de TNF-α

Los homogenados de intestino se sonicaron con un ultrasonificador (Sonics Vibra-cell VCX 130 Newtown, Estados Unidos) mediante cuatro ciclos (20 s de sonicación y 40 s de pausa en hielo). El sonicado se centrifugó a 15000 g, durante 10 min a 4°C y los sobrenadantes se sometieron inmediatamente a la medición de TNF-α mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA, (del inglés, *Enzyme-Linked immunosorbent Assay*) según el protocolo proporcionado por el fabricante (BD opEIA, mouse TNF mono/mono ELISA set, BD Biosciences, San Diego, California, Estados Unidos) (Londero y col. 2017). Los resultados se expresan en % de C57-C.

3.4. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media ± error estándar (EE). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente según el tipo de variable en cuestión. Para la comparación de variables paramétricas se utilizó el análisis de la variancia (ANOVA) seguido de la prueba de *Tukey*. En el caso de variables no paramétricas se utilizaron las pruebas de *Kruskal Wallis* seguido de la prueba de *Dunn*). Para el análisis estadístico de los datos de utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos). Se consideraron significativas las diferencias cuando $P<0,05$.

3.5. Resultados

3.5.1. Verificación del metabolismo glucémico basal en ratones C57BL/6 y R1KO

Antes de iniciar el tratamiento dietético con HFD los ratones de ambas cepas, C57BL/6 y R1KO, fueron sometidos a una PTIG para confirmar normalidad en la regulación del metabolismo de la glucosa. La máxima concentración plasmática de glucosa se determinó 30 minutos después de su inyección, con valores de (media ± EE) 229,80 ± 24,74 mg/dl para la cepa C57BL/6 y de 258,40 ± 8,25 mg/dl para los ratones R1KO mostrando luego un descenso progresivo de la glucemia hasta concentraciones de 102,90 ± 10,33 mg/dl y 113,30 ± 5,88 mg/dl, respectivamente, al finalizar la prueba (Fig. 3.4 a). No se registraron diferencias significativas en las áreas bajo la curva entre ambas cepas de ratones (Fig. 3.4 b).

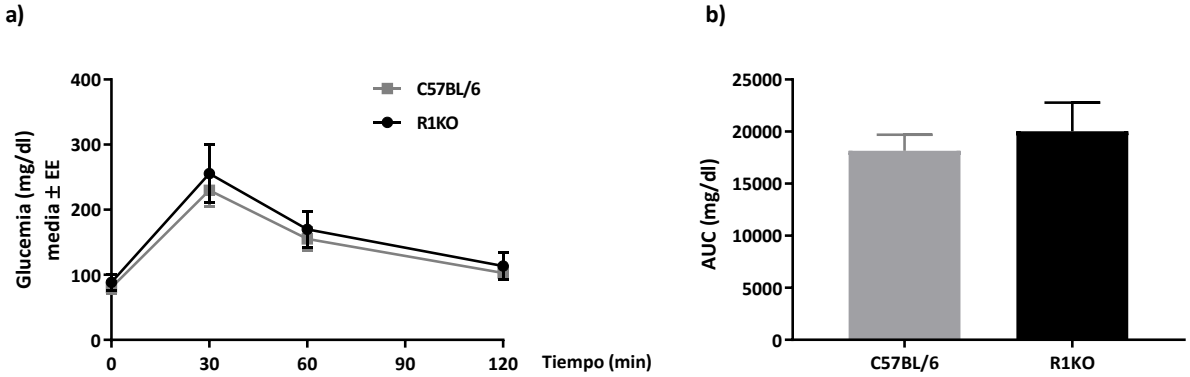


Figura 3.4. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. a) El gráfico representa la respuesta glucémica a la sobrecarga de glucosa en los 120 min posteriores a la inyección. b) Área bajo la curva. Datos expresados como media ± EE para 10 ratones en cada grupo experimental.

3.5.2. Efecto de la dieta alta en grasa sobre los parámetros fisiológicos y bioquímicos en ratones C57BL/6 y R1KO: establecimiento del modelo de obesidad

Como puede verse en la Tabla 3.2 al finalizar el tratamiento con HFD, las calorías consumidas por los ratones R1KO fueron similares a la contraparte *wild-type* C57-C. Ambos grupos alimentados con dieta alta en grasa consumieron más calorías (C57-HFD: +36%; R1KO-HFD: +38%) que sus respectivos grupos control. En consecuencia, los grupos HFD aumentaron significativamente su peso corporal (C57-HFD: +54%; R1KO-HFD: +45%) luego de 16 semanas de dieta, en comparación con sus respectivos grupos controles. A su vez, no se encontraron diferencias en este parámetro entre las cepas *knockout* y *wild-type*.

En ambas cepas de ratones, la dieta alta en grasa generó hipertrofia del tejido adiposo, demostrada por un aumento significativo del peso de los panículos adiposos epididimarios (C57-

HFD: +154%; R1KO-HFD: +158%). Del mismo modo no se encontraron diferencias en el peso de la grasa epididimal entre las cepas R1KO y C57BL/6.

Como fue mencionado en la sección 2.5.3, luego de 16 semanas de tratamiento con HFD la cepa C57BL/6 mostró un aumento de la glucemia y un estado de resistencia a la insulina, así como mayores niveles de trigliceridemia y colesterolemia en comparación con los animales control. En contraste con lo observado para los animales *wild-type* y en línea con estudios previos (Bhering Martins y col. 2018), los ratones R1KO-HFD no mostraron niveles elevados de glucemia o resistencia a la insulina evaluada a través de la PTII. En cuanto al metabolismo lipídico, los ratones R1KO-HFD mostraron mayores niveles de trigliceridemia y colesterolemia que sus respectivos controles (Tabla 3.2).

Parámetros	**C57-C**	**C57-HFD**	**R1KO-C**	**R1KO-HFD**
Consumo de calorías (kcal totales/animal)	1293 ± 42,92	1760 ± 43,45^{dg}	1396 ± 76,65	1821 ± 20,54 ^{dg}
Ganancia de peso porcentual	41,55 ± 2,47	63,84 ± 3,66^{dh}	43,46 ±3,56	62,86 ±2,36^{dh}
Grasa epididimal (%)	1,09 ± 0,18	2,77 ± 0,15^{dh}	0,96 ± 0,09	2,48 ± 0,20^{dh}
PTII (%)	34,38 ± 12,71	19,12 ± 9,86^{aem}	37,33 ± 6,41	34,76 ±17,55
Glucemia (mg/dl)	73,90 ± 6,10	98,10 ± 13,03 ^{aem}	76,20 ± 4,15	71,25 ± 8,24
Colesterolemia(mg/dl)	89,14 ± 12,91	199,40 ± 25,15 ^{dhm}	89,58 ± 7,84	119,60 ± 7,97^{ae}
Trigliceridemia (mg/dl)	71,78 ± 26,58	121,30 ± 21,14^{cg}	74,16 ± 14,80	118,50 ± 13,55 ^{cg}

Tabla 3.2. Parámetros bioquímicos y morfológicos después de 16 semanas de dieta. La grasa epididimal se expresa como porcentaje del peso corporal. El resultado de la PTII se muestra como porcentaje del aclaramiento máximo de glucosa después de la inyección de insulina. Datos expresados como media ± EE, (n: 10 ratones/grupo). ^{a}, ^{c} y ^{d}, significativamente diferente de C57-C, P<0,05, P<0,001 y P<0,0001 respectivamente; ^{e}, ^{g} y ^{h}, significativamente diferente de R1KO-C, P<0,05, P<0,001 y P<0,0001 respectivamente; ^{m}, significativamente diferente de R1KO-HFD, P<0,05; según las pruebas de ANOVA y *Tukey o Kruskal Wallis* y *Dunn.*

Posteriormente se examinaron preparados histológicos de tejido adiposo epididimal de los ratones C57BL/6 y R1KO. Como era de esperar e independientemente de la cepa, los ratones alimentados con HFD aumentaron significativamente el tamaño de los adipocitos con respecto a sus controles (C57-HFD: +72%; R1KO-HFD: +66%). Sin embargo, los animales R1KO presentaron un tamaño

menor (R1KO-C: 357 ± 7, 59; R1KO-HFD: 593 ± 9,62 µm) que los ratones C57BL/6 (C57-C: 417,2 ± 10,5 C57-HFD: 716 ± 15,8 µm) (Fig. 3.5 b). Los ratones *wild-type* alimentados con HFD mostraron infiltración con macrófagos, visualizada como estructuras en forma de corona alrededor de los adipocitos que no se observaron en los ratones R1KO-HFD (Fig. 3.5 a).

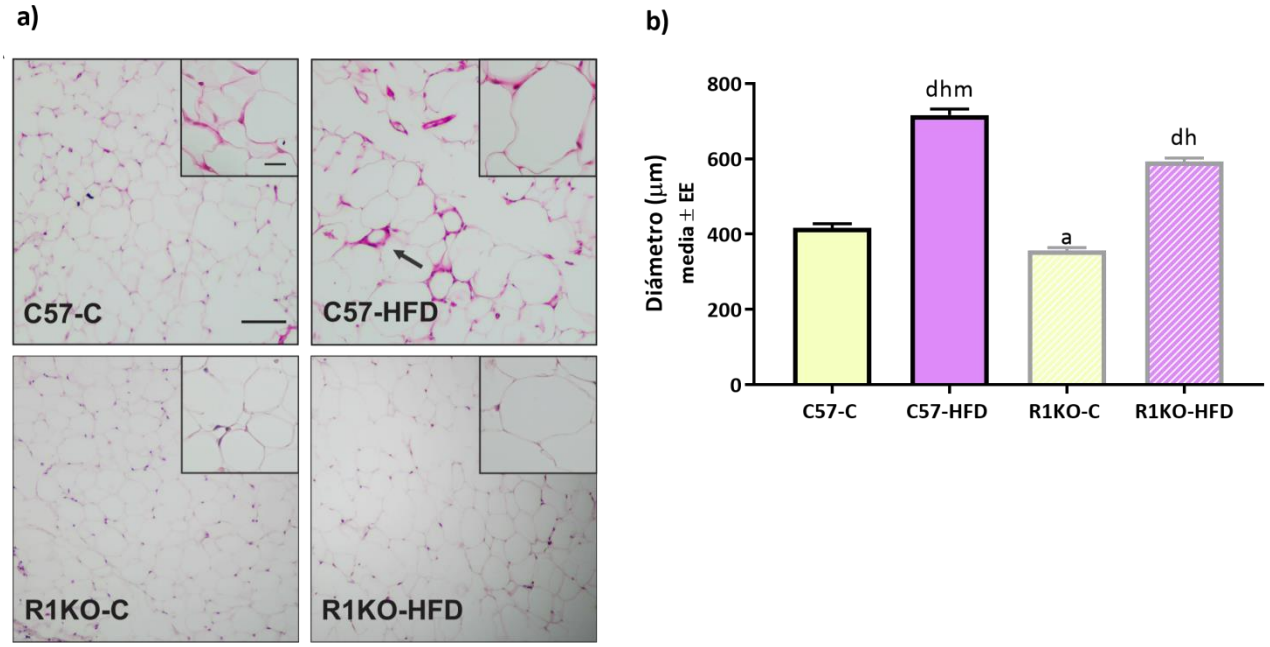


Figura 3.5. Análisis histológico del tejido adiposo teñido con HE de ratones C57BL/6 y R1KO. a) Las imágenes se muestran con un aumento de 10X (la barra indica 100 µm), las zonas seleccionadas en los recuadros se muestran con un aumento de 40X (la barra indica 50 µm). La flecha indica una estructura representativa en forma de corona de macrófagos. b) Diámetro de los adipocitos. Datos expresados como media ± EE, (n: 10 ratones/grupo). [a] y [d], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,0001 respectivamente; [h], significativamente diferente de R1KO-C, P<0,0001; [m], significativamente diferente de R1KO-HFD, P<0,05; según las pruebas de ANOVA y *Tukey*.

3.5.3. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de Mrp2 intestinal en ratones C57BL/6 y R1KO

La expresión del ARNm del gen *Abcc2* fue evaluada en muestras de yeyuno, sitio de máxima expresión intestinal. Como se describió anteriormente en la sección 2.5.5, la expresión del ARNm de Mrp2 del grupo C57-HFD se halló disminuida (-42%; P<0,05) respecto al grupo control. De forma notable, los niveles del ARNm de Mrp2 del grupo R1KO-HFD también disminuyeron (-49%, P<0,05) al comparar con C57-C. No se observaron diferencias en la expresión de *Abcc2* entre los grupos controles de ambas cepas (Fig. 3.6 a). En correlación con la disminución del ARNm, la actividad de transporte de Mrp2 fue menor en los ratones R1KO-HFD (-54%, P<0,01) en

comparación con C57-C. Del mismo modo, como se observó con los niveles del mensajero, no se encontraron diferencias en la actividad de Mrp2 entre los grupos controles de ambas cepas (Fig. 3.6 b).

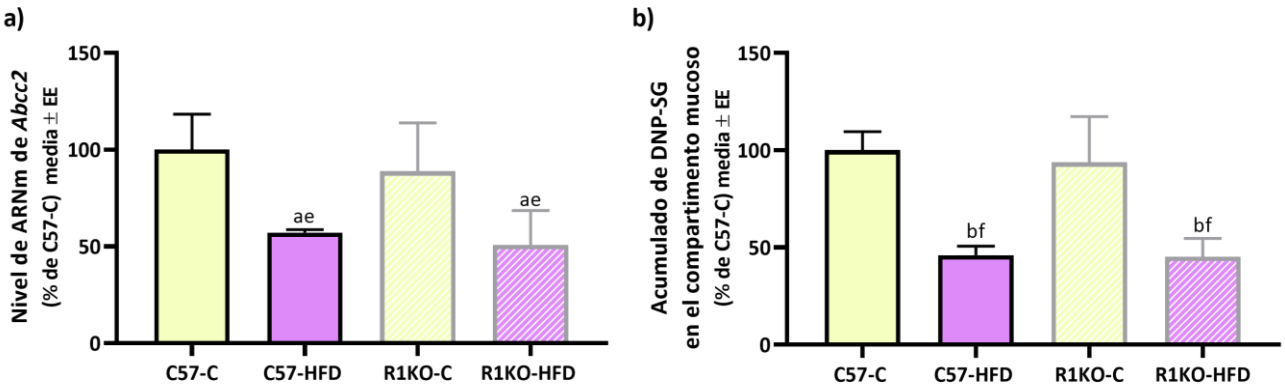


Figura 3.6. Efectos de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de Mrp2. a) Expresión de ARNm de *Abcc2* en yeyuno. b) Evaluación de la actividad de Mrp2 en sacos evertidos de yeyuno utilizando CDNB como sustrato. La gráfica representa la cantidad de DNP-SG acumulada después de 30 min en el compartimento mucoso. Datos expresados como media, ± EE, (n: 10 ratones/grupo). [a] y [b], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,01; [e] y [f], significativamente diferente de R1KO-C, P<0,05 y P<0,01 respectivamente; según las pruebas de *Kruskal Wallis* y *Dunn.*

3.5.4. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de P-gp intestinal en ratones C57BL/6 y R1KO

Como se describió en la sección 2.5.6, la dieta alta en grasa disminuyó 62% la expresión del ARNm *Mdr1a* y 66% *Mdr1b* en el íleon de los ratones C57-HFD (Fig. 3.7 a, b), sugiriendo participación de un mecanismo transcripcional, en la regulación de este transportador. Interesantemente, la dieta alta en grasa no modificó la expresión del ARNm *Mdr1a* o *Mdr1b* en el íleon de los ratones R1KO (Fig. 3.7 a, b).

Conforme a los cambios observados en la expresión del ARNm *Mdr1a* y *Mdr1b*, la actividad del transportador P-gp, se encontró disminuida en los ratones C57-HFD (-55%), determinada a través de una menor cantidad de Rodamina acumulada en el compartimento mucoso de los sacos intestinales respecto a C57-C (Fig. 3.7 c). Significativamente, la actividad de P-gp no se alteró en los ratones R1KO después de 16 semanas de alimentación HFD, en concordancia con los niveles obtenidos de sus ARNm (Fig. 3.7 c).

Para confirmar la participación del transportador P-gp, se incubaron saquitos de íleon de animales C57BL/6 con el agregado del inhibidor específico de P-gp, PSC833, en el *buffe*r de incubación. En la

Figura 3.7 d se muestra que cuando los sacos intestinales evertidos se incubaron con PSC833, inhibidor de P-gp, la acumulación de Rodamina se redujo en ambos grupos. Estos resultados confirman la participación de P-gp en las diferentes actividades detectadas entre el grupo HFD y el grupo control.

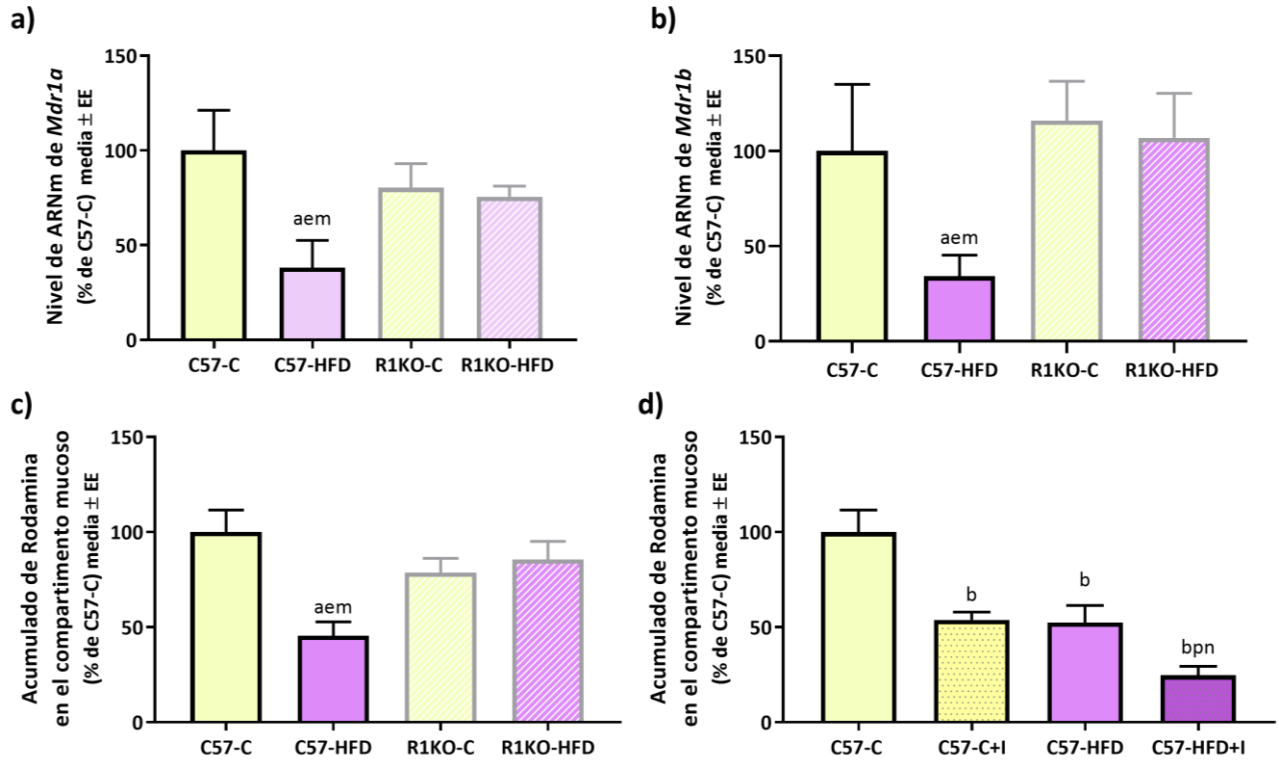


Figura 3.7. Efecto del tratamiento HFD sobre la expresión y actividad de P-gp intestinal en ratones C57BL/6 y R1KO. a) Niveles de ARNm *Mdr1a* en íleon. b) Niveles de ARNm *Mdr1b* en íleon. c) Actividad de P-gp en sacos evertidos utilizando Rodamina como sustrato. El gráfico muestra la acumulación de Rodamina después de 30 min. d) Actividad de P-gp en ratones C57BL/6 con el agregado del inhibidor de P-gp, PSC833, (C57-C+I y C57-HFD+I) o sin inhibidor (C57-C y C57-HFD). Datos expresados como media ± EE, (n: 10 ratones/grupo). [a] y [b], significativamente diferente de C57-C, P<0,05 y P<0,01 respectivamente; [e], significativamente diferente de R1KO-C, P<0,05; [m], significativamente diferente de R1KO-HFD, P<0,05; [n], significativamente diferente de C57-HFD, P<0,05; [p], significativamente diferente de C57-C+I, P<0,05; según las pruebas de *Kruskal Wallis* y *Dunn.*

Con el fin de determinar si el cambio observado en la actividad de P-gp, implica a su vez una regulación postranscripcional, se decidió evaluar la expresión proteica de este transportador en el íleon, sitio de máxima expresión intestinal. En los ratones C57BL/6, HFD provocó una disminución del 71% en la expresión de la proteína P-gp (Fig. 3.8 a). Si bien no se realizó un análisis cuantitativo de las imágenes inmunohistoquímicas, se observó una tinción más débil de P-gp en la superficie de las microvellosidades intestinales en los ratones C57-HFD en comparación con los controles (Fig.

3.8 b). Este patrón se observó de forma consistente en todas las imágenes analizadas y se correlaciona con los niveles de expresión proteica.

Interesantemente, la dieta alta en grasa no modificó los niveles proteicos de P-gp así como tampoco su expresión en la superficie de las microvellosidades detectada *in situ* en el íleon de ratones R1KO-HFD (Fig. 3.8 a, b).

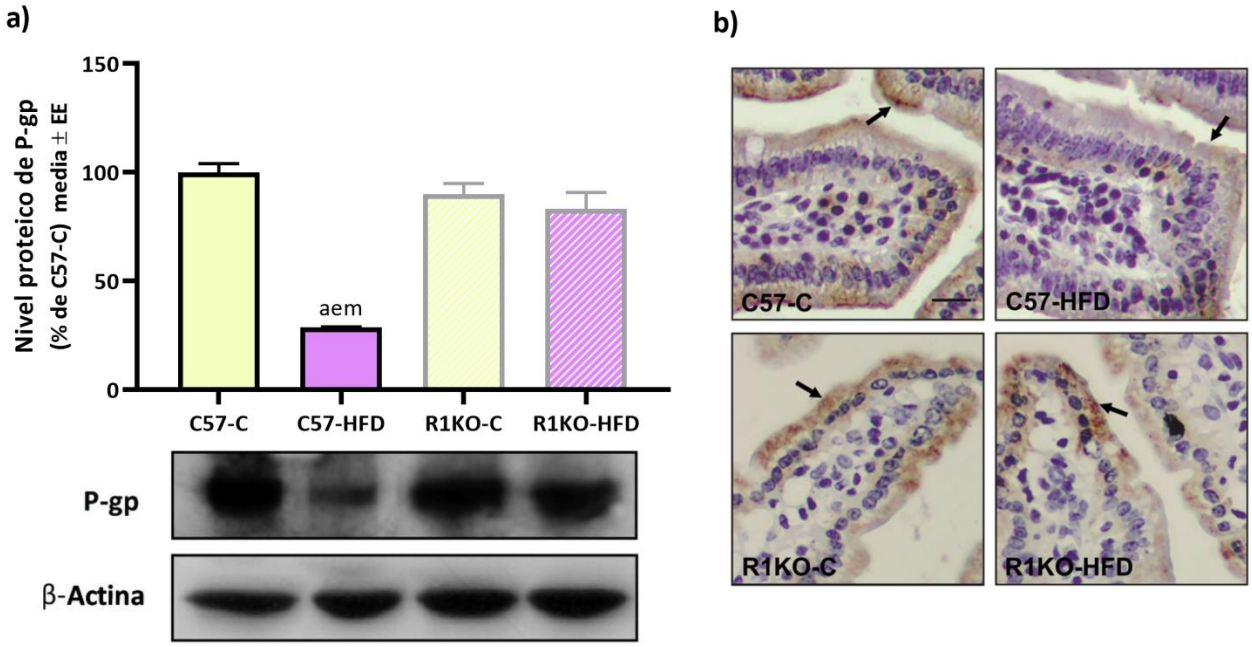


Figura 3.8. Efecto del tratamiento HFD sobre la expresión de P-gp intestinal en ratones C57BL/6 y R1KO. a) Niveles proteicos de P-gp. b) Imágenes representativas de la expresión de P-gp detectada *in situ*. Se observa inmunotinción positiva en C57-C, R1KO-C y R1KO-HFD, mientras que en C57-HFD se detecta una señal más débil (flechas negras). La barra indica 10 µm. Datos expresados como media ± EE, (n: 10 ratones/grupo). [a], significativamente diferente de C57-C, P<0,05; [e], significativamente diferente de R1KO-C, P<0,05; [m], significativamente diferente de R1KO-HFD, P<0,05; según las pruebas de *Kruskal Wallis* y *Dunn.*

3.5.5. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión intestinal de TNF-α

A continuación, se determinaron los niveles de expresión proteica de TNF-α en la misma región intestinal utilizada en los estudios de P-gp. En el grupo C57-HFD se observó un aumento significativo de la expresión de TNF-α (+65%, P<0,05) en comparación con C57-C. Contrariamente, los ratones R1KO-C mostraron una supresión prácticamente completa de los niveles de esta citoquina, en comparación con los ratones C57BL/6 alimentados con dieta estándar. En el tejido

intestinal de animales R1KO-HFD se detectaron niveles de TNF-α (42,37 ± 9,69 %); sin embargo, su expresión fue inferior a la hallada en ambos grupos de animales C57BL/6 (Fig. 3.9 a).

Conjuntamente, se determinaron los niveles de ARNm de TNF-α en el íleon de los ratones C57BL/6 y TNFR1 KO. El grupo C57-HFD mostró un aumento significativo de esta citoquina proinflamatoria (+148%, P<0,05) en comparación con su grupo control. Por el contrario, la expresión de ARNm de TNF-α se encontró por debajo del nivel de detección del ensayo en los homogenados de íleon de los ratones R1KO, independientemente de la dieta que recibieron (Fig. 3.9 b).

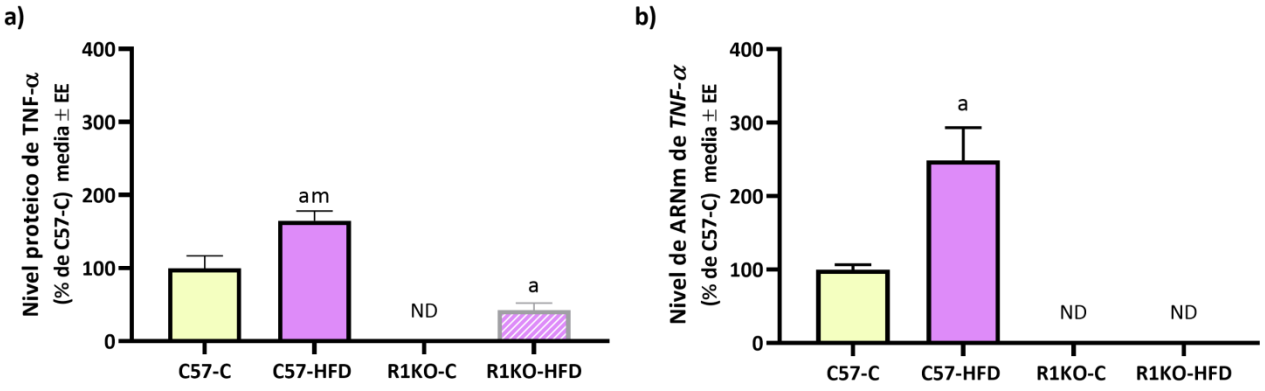


Figura 3.9. Efecto del tratamiento HFD sobre la expresión intestinal de TNF-α en ratones C57BL/6 y R1KO. a) Niveles proteicos de TNF-α. b) Nivel de ARNm de *TNF-α*. Datos expresados como media ± EE, (n: 10 ratones/grupo). [a], significativamente diferente de C57-C, P<0,05; [m], significativamente diferente de R1KO-HFD, según las pruebas de *Kruskal Wallis* y *Dunn*. ND: no detectable.

3.6. Discusión y conclusión parcial

La obesidad genera un estado inflamatorio sistémico con aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias (Hotamisligil 2017). TNF-α es uno de los principales mediadores de este estado patológico y muchos autores lo vinculan directamente con las alteraciones metabólicas que ocasiona la obesidad (Hotamisligil 1999; Liang y col. 2008, Pamir y col. 2009; Bhering Martins y col. 2018, Lambertucci y col. 2018). Esta citoquina ejerce sus efectos sistémicos al unirse de forma irreversible a su receptor TNFR1, presente en la mayoría de las células, y activar factores de trascripción implicados en el desarrollo de inflamación, apoptosis y supervivencia celular (Chen y col. 2002; Holbrook y col. 2019).

Considerando la evidencia bibliográfica previa y los resultados presentados en el apartado anterior, en este capítulo se indagó en el rol que ejerce la vía TNF-α/TNFR1 en las alteraciones de los trasportadores ABC intestinales observadas en ratones C57BL/6 alimentados con dieta alta en grasa. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron ratones macho adulto C57BL/6 y *knockout* para el receptor TNFR1, que presentaron similares aspectos morfológicos y bioquímicos antes de iniciar el tratamiento dietético.

Luego de 16 semanas de dieta alta en grasa, la evolución del peso corporal, de los panículos adiposos y los valores obtenidos de las pruebas bioquímicas indican que la interrupción de la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α, no estaría implicada en el desarrollo de la obesidad y dislipidemia en este modelo, pero si en la generación de resistencia a la insulina e hiperglucemia (Liang y col. 2008; Ouchi y col. 2011). Estos resultados concuerdan en parte con el trabajo de Bhering Martins y col. (2018) donde demuestran que la ablación de TNFR1 en ratones con una dieta alta en carbohidratos durante 16 semanas mejoró la sensibilidad a la insulina y evitó un incremento adicional de la masa grasa. En efecto, Matos Ferreira y col. (2014) demostraron que se estimulan diferentes vías metabólicas e inflamatorias según la dieta se encuentre enriquecida en grasa o en carbohidratos refinados.

Como era de esperar, en los ratones *knockout,* la interrupción de la señalización de TNFR1, determinó ausencia de coronas de macrófagos alrededor de los adipocitos, signo típico de la inflamación por obesidad (Cawthorn y Sethi. 2008). Esta disminución en el reclutamiento de macrófagos del tejido adiposo, podría estar implicada en una menor inducción de la secreción de TNF-α (Ouchi y col. 2011, Lee y Lee 2014).

En particular, el objetivo de este capítulo era conocer la importancia biológica de la supresión de TNFR1 en la expresión y la actividad de Mrp2 y P-gp intestinal en el contexto de obesidad. Con

respecto a Mrp2, la interrupción de la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α, no determinó cambios en su expresión y actividad. Los ratones C57BL/6 y los R1KO, presentaron una disminución similar en la expresión y actividad de esta bomba de eflujo luego de la dieta alta en grasa. Según lo reportado en la bibliografía, hay múltiples estudios de expresión de Mrp2 en diferentes modelos de enfermedad inflamatoria, que presentan discrepancia en los resultados, precisando que la regulación de Mrp2 es compleja, multifactorial y no solo estaría afectada por la vía TNF-α/TNFR1 (Englund y col. 2007; Andersen y col. 2015; Tocchetti y col. 2016; Drozdzik y col 2020).

Interesantemente, los ratones R1KO alimentados con dieta alta en grasa no modificaron la expresión proteica de los transcriptos de P-gp, como tampoco su actividad de transporte; demostrando así la participación de la vía de señalización de TNF-α/TNFR1 en la regulación de este transportador. Adicionalmente, la participación exclusiva de P-gp en el transporte de Rodamina se confirmó mediante la inhibición con PSC833. En este sentido, y en consonancia con nuestros resultados, un estudio anterior demostró un efecto directo de TNF-α, en la línea celular intestinal Caco-2, que resultó en la disminución de la expresión de *Mdr1* a nivel de ARNm, así como en la función de eflujo de P-gp (Belliard y col. 2004). En la misma línea, un estudio de células de carcinoma colorrectal demostró que TNFR1 es esencial para reducir la señalización NF-κB que conduce a la regulación negativa de ABCB1 tras un tratamiento prolongado con TNF-α (Walther y col. 2015). En relación con esto, Milanesi y col. (2019) comprobaron el aumento de la expresión de *Mdr1* en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal al tratarlos con anticuerpos anti-TNF. También hay reportados varios estudios en la barrera hemato-encefálica que vinculan la regulación de P-gp a TNF-α (Theron y col. 2003; Miller y col 2008; Poller y col 2010; Iqbal y col. 2012).

Con respecto a la evaluación particular de la citoquina TNF-α, no se detectó su ARNm en el tejido intestinal de ratones *knockout*; además, los niveles proteicos fueron menores en los ratones R1KO-HFD con respecto a los ratones C57-HFD. En este sentido y de acuerdo con estos resultados, un estudio informó que los ratones alimentados con una dieta alta en carbohidratos con TNFR1 ablacionado, presentaban una menor concentración de citoquinas proinflamatorias, incluido TNF-α, en tejido adiposo (Bhering Martins y col. 2018). Los niveles proteicos detectados en los ratones R1KO-HFD en el tejido intestinal, podrían justificarse por la infiltración de células inflamatorias circulantes, ante la inactivación de la vía de señalización de TNFR1. De hecho, TNFR1 parece ser el

receptor prevalente en el tejido intestinal en diferentes especies, incluidos los ratones (Williams y col. 2013).

Colectivamente, está claro que la vía TNF-α-/TNFR1 está involucrada en la regulación negativa de P-gp en los intestinos de los animales *wild-type* sometidos a una dieta alta en grasa. La ausencia de un entorno proinflamatorio en el tejido adiposo en respuesta a la desactivación de TNFR1, como se muestra en la Figura 3.5 para los animales *knockout,* es consistente con el concepto que la vía TNF-α/TNFR1 está inactiva en estos animales (Bhering Martins y col. 2018).

Finalmente, considerando que en condiciones de obesidad se liberan otras citoquinas proinflamatorias, en pacientes o en modelos animales, como el de esta tesis, no podemos descartar que puedan contribuir, junto con TNF-α, en la regulación de P-gp y en la consiguiente alteración de la función transcelular de barrera bioquímica intestinal. Sin embargo son necesarios más estudios para aclarar esta cuestión. En conclusión, la respuesta inflamatoria mediada por TNF-α/TNFR1 es, al menos en parte, responsable de la reducción de la expresión y la actividad de transporte de P-gp intestinal y no estaría implicada directamente en la regulación de Mrp2.

En los capítulos 2 y 3 se presentó el efecto que tiene la dieta alta en grasa en la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales. Primeramente, se corroboró la hipótesis de la regulación negativa de los transportadores ABC intestinales en el contexto de obesidad y luego se realizó un abordaje orientado a dilucidar un posible mecanismo implicado en tal disminución, vinculado a la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α.

En el capítulo 4, que se desarrolla a continuación, se aborda la aplicabilidad del efecto deletéreo de la barrera bioquímica intestinal por la obesidad. Se estudian las consecuencias que implicarían las alteraciones en Mrp2 y P-gp intestinal en la terapéutica farmacológica de una patología frecuente y asociada a la obesidad como es el cáncer.

<u>CAPÍTULO CUATRO:</u> Efecto de la disminución de la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales en la administración de quimioterapia metronómica en un modelo de adenocarcinoma de mama murino

4.1. Introducción

4.1.1. Obesidad y cáncer

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples patologías, entre ellas, el cáncer. Una profusa cantidad de estudios publicados han demostrado que los individuos con obesidad y alteraciones metabólicas asociadas como diabetes, tienen una mayor susceptibilidad y mortalidad a diferentes tipos de cáncer por ejemplo esófago, colorectal, vesícula biliar, páncreas, hígado, ovario, próstata, endometrio y mama (Renehan y col. 2010, Arnold y col. 2016; Kim y Scherer 2021).

La obesidad conduce a desórdenes metabólicos, como resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia, alteraciones en la producción y biodisponibilidad de hormonas esteroideas e inflamación crónica sistémica de bajo grado. Estos efectos fisiopatológicos se han asociado con el desarrollo y progresión tumoral (Godsland, 2010; Iyengar y col. 2016).

Subsecuentemente a la hipertrofia del tejido adiposo se induce la producción de IL-1β, IL-6, TNF-α, resistina, leptina, proteína quimioatrayente de monocitos 1, entre otros, y disminuye la producción de adiponectina. Todos ellos cumplen un rol fundamental en la génesis tumoral al participar en vías señalización que regulan la expresión génica y mitogénica (Vona-Davis y col. 2008; Godsland, 2010; Iyengar y col. 2016). El estado inflamatorio crónico de la obesidad, a través de la activación de la vía NF-κB, promueve los procesos carcinogénicos, estimula el crecimiento de las células tumorales y facilita la inestabilidad de su genoma, favoreciendo la progresión y diseminación del tumor (Iyengar y col. 2016).

La leptina, es considerada un factor pro-oncogénico, al ejercer efectos estimulantes sobre la proliferación y la invasión de las células tumorales, favorecer la angiogénesis, mediante la inducción de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular e inducir el complejo enzimático aromatasa del tejido adiposo, aumentando la producción de estradiol, hormona asociada a tumores estrógenos dependientes (Vona-Davis y col. 2008, Godsland, 2010). Más aún, las bajas concentraciones sanguíneas de adiponectina en la obesidad, se han asociado con una alta incidencia y mayor morbimortalidad de cáncer. Efectivamente, adiponectina activa la vía del receptor activado por proliferador peroxisomal-γ, que induce la transcripción de genes implicados

en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Arcidiacono y col. 2012, Parida y col. 2019).

Metabólicamente, la obesidad se asocia con hiperinsulinemia; la insulina es un factor pro-oncogénico que induce múltiples cascadas de señalización celular, como la vía MAPK y las vías que regulan la proteína mTOR (del inglés, *mammalian Target of Rapamycin*). Altos niveles de insulina en plasma estimulan la proliferación, crecimiento y supervivencia celular e inhiben la apoptosis a su vez se favorece la movilidad celular y los fenómenos mitogénicos. Igualmente, la insulina reduce los niveles de la proteína fijadora de esteroides sexuales, aumentado la biodisponibilidad de estrógenos, incrementando por lo tanto el riesgo de desarrollar un cáncer de mama hormono-dependiente (Arcidiacono y col. 2012; Kim y Scherer, 2021; Zhang y col.2021).

Por otra parte, la hipertrofia del tejido adiposo genera especies reactivas de oxígeno, capaces de dañar el ADN, que contribuyen a la mutagénesis y carcinogénesis (Arcidiacono y col. 2012).

Debido al alarmante crecimiento de la incidencia de obesidad en el mundo, es cada vez más frecuente encontrar pacientes obesos con cáncer. Según estimaciones realizadas en el año 2012, el 6,8% (7.600 casos) de los pacientes con cáncer de nuestro país se atribuyeron al factor obesidad, posicionando a Argentina en el nivel más alto de este indicador a nivel mundial (Fig. 4.1).

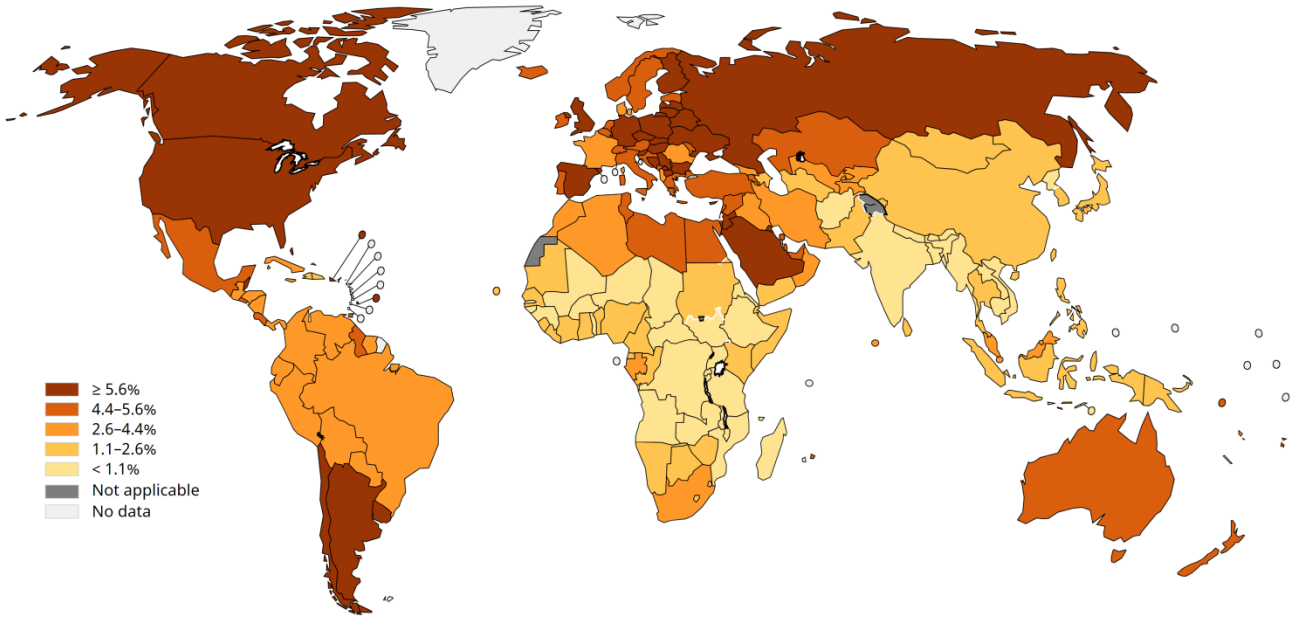


Figura 4.1. Proporción de casos de cáncer atribuibles a obesidad por país en 2012. Extraído del Observatorio Global del Cáncer (Globocan), de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer.

La relación entre obesidad y cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada (Godsland, 2010; Arcidiacono y col. 2012; Chen y col. 2016; Steck y Murphy 2020). Particularmente, distintos trabajos han reportado la asociación entre obesidad y sus alteraciones metabólicas con el desarrollo de cáncer de mama triple negativo (TNBC, del inglés *triple negative breast cancer*), un subtipo de tumor de mama que se caracteriza por la ausencia de receptores de estrógenos, progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, del inglés *human epidermal growth factor receptor* 2). Adicionalmente TNBC es un tumor extremadamente maligno y metastásico, que se presenta principalmente en mujeres jóvenes, para el cual las alternativas terapéuticas son limitadas (Vona-Davis y col. 2008; Maiti y col. 2010; Davis y Kaklamani 2012; Ecker y col. 2019). Asimismo, se reportó que mujeres portadoras de TNBC que presentan obesidad con alteraciones metabólicas asociadas, tienen peor pronóstico, dado por un mayor crecimiento tumoral e incidencia de metástasis, así como aumento del riesgo de recurrencia en sitios distantes (Vona-Davis y col. 2008; Dietze y col. 2018).

Actualmente, el cáncer de mama femenino es el que presenta la mayor incidencia mundial, sin distinción de sexo, además de ser la primera causa de muerte por cáncer entre las mujeres de países occidentales (Sung y col. 2021); en consecuencia profundizar en cómo la obesidad impacta en esta enfermedad y su tratamiento significan importantes avances para la salud pública.

4.1.2. Terapias contra el cáncer

Actualmente, existen múltiples terapias contra el cáncer que se aplican solas o combinadas para aumentar su efectividad (Lissoni y col. 2009). En términos generales, el tratamiento se clasifica en dos grandes grupos, estrategias de control local, dirigidas a células tumorales en un área determinada del cuerpo sin afectar al resto, incluyen cirugía y radioterapia y las estrategias de control sistémico, en las que se administran medicamentos por vía oral o endovenosa; como quimioterapia, hormonoterapia e inmunoterapia (Moo y col. 2018; Nandini y col. 2021; Wu y col. 2021).

La quimioterapia fue introducida hace más de medio siglo para el tratamiento de varios tipos de cánceres avanzados o metastásicos. La misma consiste en el uso de fármacos en dosis altas, cercanas a la dosis máxima tolerada por el organismo, en ciclos repetidos, a intervalos de tiempo definidos, determinados principalmente por el período necesario para la recuperación del paciente de los efectos adversos y tóxicos (Hanahan y col. 2000a, 2000b). Entre ellos frecuentemente se describen náuseas, vómitos, alopecia, inmunodepresión, cambios en la

respuesta sexual y reproductiva, alteraciones de la memoria, depresión, debilidad muscular, fatiga y cardiomiopatías (Crouch y col. 2017). Sin embargo, los períodos de descanso pueden favorecer el crecimiento de las variantes celulares resistentes a la quimioterapia, generando resistencia al tratamiento y la posibilidad de recidivas.

Como alternativa a la quimioterapia convencional, hace ya dos décadas, surgió la quimioterapia metronómica (QTM) (Hanahan y col. 2000b). Estrategia que se caracteriza por la administración continua, a intervalos regulares de tiempo, de fármacos quimioterapéuticos en dosis significativamente menores a la dosis máxima tolerada, sin periodos prolongados de descanso. (Kerbel y col. 2002; Malik y col. 2014; Perroud y col. 2016). Desde su implementación, se publicaron importantes avances científicos en modelos de cáncer en animales, describiendo su utilidad como tratamiento utilizando un fármaco quimioterápico o combinaciones (Mainetti y col. 2011, 2013; Rico y col. 2017; Rozados y col. 2004, 2010). Actualmente, se la considera como una alternativa válida en pacientes que recibieron varios ciclos de quimioterapia convencional y destacadamente se la ha utilizado para el tratamiento del cáncer pediátrico en países de bajos y medianos ingresos (Kerbel y col. 2002; Bottini y col. 2006; Soriano y col. 2009; Dellapasqua y col. 2011; Nasr y col. 2015; Perroud y col. 2013, 2016; Petry y col. 2015; Cancello y col. 2015; Scharovsky y col. 2020).

Aunque muchos medicamentos de quimioterapia se administran por vía parenteral, también hay medicamentos de quimioterapia por vía oral. Entre las características más importantes de los fármacos quimioterápicos orales se mencionan principalmente su eficacia, un perfil farmacocinético predecible, buena tolerabilidad así como un perfil de interacciones farmacológicas bien caracterizado. Siempre que la eficacia y tolerabilidad no se encuentren comprometidas, la quimioterapia oral puede ser atractiva para los pacientes por las ventajas que conlleva en cuanto a la comodidad, menor asistencia del paciente al hospital para recibir el tratamiento, reduciendo el impacto que tiene la quimioterapia en las actividades diarias (Findlay y col. 2008).

Dentro de los fármacos utilizados en QTM, se halla la ciclofosfamida (Cy). Este fármaco se utiliza comúnmente en la quimioterapia convencional en dosis altas, y es uno de los primeros y más estudiados en la QTM en dosis bajas, administrados vía oral o endovenosa como monoterapia o en combinación con otros fármacos, tanto en modelos experimentales como en protocolos clínicos (Kerbel y col. 2002; Soriano y col. 2009; Rozados y col. 2004, 2010; Dellapasqua y col. 2011; Mainetti y col. 2011, 2013, 2020; Perroud y col. 2013, 2016; Rico y col. 2014; Nasr y col. 2015). Cy

es un agente alquilante, utilizado para el tratamiento de diferentes tipos de tumores (mama, linfomas, cánceres de ovario, tumores sólidos en niños y leucemia linfocítica crónica) así como de enfermedades autoinmunes (granulomatosis de Wegener, artritis reumatoidea y síndrome nefrótico) (Crouch y col. 2017). La ciclofosfamida es un profármaco que es activado por el sistema microsomal hepático, específicamente por citocromo P450 2B (CYP2B), convirtiendo la ciclofosfamida en aldofosfamida y 4-hidroxiciclofosfamida. A su vez, la 4-hidroxiciclofosfamida puede oxidarse adicionalmente en el hígado o en el tejido tumoral para producir los metabolitos inactivos carboxifosfamida y 4-cetociclofosfamida. Los metabolitos activos, 4-hidroxiciclofosfamida y aldofosfamida, se transportan en la circulación a las células tumorales, allí la aldofosfamida se segmenta espontáneamente en fosforamida y acroleína. La fosforamida es la que ejerce los efectos antitumorales.

La ciclofosfamida y sus metabolitos activos son sustratos de P-gp, en consecuencia cambios en los niveles de expresión de este transportador alteran los efectos terapéuticos y adversos de la quimioterapia con Cy (Patutina y col. 2012; Brabooy y col. 2013; Dimeloe y col. 2014).

4.1.3. Transportadores ABC y cáncer

La relación entre los trasportadores ABC y cáncer ha sido ampliamente investigada y establecida tanto en estudios de sobreexpresión, examinando la resistencia a quimioterapia, como en casos de disminución de su actividad trasportadora, ocasionando toxicidad (Chan y col. 2004; Chen y col. 2015; Durmus y col. 2015; Robey y col. 2018).

Una de las principales dificultades para suprimir el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas es la resistencia a múltiples fármacos (MDR). La resistencia de las células cancerosas a varios tipos de fármacos puede tener un origen intrínseco o adquirido. La resistencia adquirida se induce tras la administración de quimioterapia, mientras la resistencia intrínseca está presente antes de la aplicación del fármaco en las células cancerosas. Varios mecanismos en las células cancerosas pueden conducir a MDR. Uno de los más importantes es la sobreexpresión de los transportadores ABC en las células cancerosas, conduciendo a un aumento del eflujo del fármaco, disminuyendo así las concentraciones intracelulares, que resultan insuficientes para eliminar una célula cancerosa. Cuando los transportadores están sobreexpresados, también se afecta el eflujo de otros agentes quimioterápicos, por lo tanto, la célula cancerosa es resistente al tratamiento en general (Tinoush y col. 2020).

Por otro lado, la toxicidad producida por la quimioterapia es una de las principales causas de deficiencias en el tratamiento. Los efectos adversos conducen a una reducción de la dosis o discontinuar con los ciclos de quimioterapia, repercutiendo negativamente en los resultados terapéuticos, incrementando la hospitalización del paciente y afectado su calidad de vida (Tao y col. 2020; Stage y col 2021; Akbarali y col. 2022). En mujeres premenopaúsicas la toxicidad inducida por la quimioterapia es una de las principales causas de insuficiencia ovárica, que predispone a un inicio temprano de los riesgos asociados a la menopausia, como una pérdida ósea acelerada, aumento del riesgo cardiovascular, disfunción sexual e infertilidad, afectando gravemente la calidad de vida de estas pacientes después de sobrevivir al cáncer. Brabooy y col. (2013) demostraron que la actividad de P-gp en los folículos ováricos es esencial para prevenir la toxicidad por la quimioterapia y para mantener la viabilidad de los ovocitos. También se mostró, en situaciones de disminución de la actividad de P-gp y Mrp1, el desarrollo de cardiotoxicidad por doxurrubicina y antraciclinas, dos quimioterápicos comúnmente utilizados en los tratamientos (Uddin y col. 2021).

4.1.4. Modelo animal para el estudio de cáncer de mama: ratón CBi

En la década de 1970 en el Centro de Biología del Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario (hoy Instituto de Genética Experimental), con el fin de establecer características de herencia genotípicas y fenotípicas en *Mus musculus,* se desarrolló la cepa de ratón CBi y 4 líneas variantes en peso y tamaño corporal, mediante cruzamientos en los que participaron animales de las cepas BALB, Rockland, Swiss y NIH. Estos ratones se obtuvieron en experimentos de selección divergente por conformación corporal con distintas combinaciones alélicas, debido a los efectos conjuntos de la cría selectiva por más de 100 generaciones, la respuesta correlacionada a la selección, los efectos no direccionales de la endocría, la deriva génica, y la aparición de nuevas mutaciones. El genotipo singular atribuido a cada línea fue corroborado por estudios morfométricos de la hemi-mandíbula y el fémur. Por ello, las líneas obtenidas constituyen un modelo murino atractivo para el estudio de rasgos genéticos complejos tales como crecimiento, desarrollo y composición corporal, propiedades contráctiles del músculo, resistencia a las parasitosis, susceptibilidad a la carcinogénesis espontánea así como la influencia del hospedero en el crecimiento de un tumor transplantable. A partir de estos estudios, se determinó que los tumores crecen en forma exponencial hasta producir la muerte del portador en el 100% de los ratones CBi desafiados (100% de susceptibilidad y letalidad) convirtiendo al

ratón CBi en un excelente modelo para el estudio del desarrollo y progresión del cáncer (Di Masso y col. 1991; Hinrchsen y Di Masso 2010).

4.2. Objetivo específico

Estudiar la influencia de la alteración de Mrp2 y P-gp intestinales en el efecto terapéutico de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida y su implicancia toxicológica, en ratones de la línea CBi, portadores de un adenocarcinoma mamario, en condiciones de obesidad.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Reactivos

Ver sección 2.3.1

Ciclofosfamida fue obtenida de Filaxis SA (Buenos Aires, Argentina).

4.3.2. Animales y tratamiento

Se utilizaron 60 ratones CBi macho, de 5 semanas de edad (24-29 g de peso corporal), obtenidos del Instituto de Genética Experimental (IGE), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Los ratones utilizados se agruparon en 5 animales por jaula, recibieron agua de bebida *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones controladas (23 ± 2°C) con un ciclo fijo de luz-oscuridad de 12 h (07: 00-19: 00).

Antes del comienzo del tratamiento dietético, los animales fueron evaluados una semana para conocer sus comportamientos alimenticios, respecto al consumo de agua y alimento. Además fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y se midieron sus parámetros bioquímicos basales.

Al inicio de la dieta, los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos, grupo control (CBi-C, n: 30) alimentados con dieta comercial estándar y grupo HFD (CBi-HFD, n: 30) alimentados con una dieta comercial estándar enriquecida con 40% de grasa, durante 16 semanas para inducir las alteraciones metabólicas asociadas a la obesidad (Collins y col 2004; Petro y col. 2004; Andrikopoulos y col. 2005). El aumento de peso corporal, el consumo de alimento y de agua de bebida se midieron semanalmente. En la semana 15 se comprobó la resistencia a insulina a través de la prueba de tolerancia intraperitoneal a la insulina (Zecchinati y col. 2019). A las 16 semanas de tratamiento dietético 20 animales (10 controles y 10 HFD) fueron sacrificados, se recolectaron muestras de plasma, intestino delgado y tejido adiposo, para analizar las alteraciones metabólicas producidas por la dieta alta en grasa y evaluar la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp intestinales (Fig. 4.2).

Luego se inició la segunda etapa de este experimento, los animales se inocularon vía subcutánea (s.c.) con el tumor M-406. M-406 es un adenocarcinoma mamario semi diferenciado tipo B de acuerdo a la clasificación de Squartini, triple negativo, obtenido por replicación de un tumor surgido espontáneamente en una hembra CBi (1996). El tumor es mantenido *in vivo* a través de pasajes seriados intraperitoneales en ratones singénicos, con una incidencia del 100 % (Del Giúdice y col. 2020).

Después de una semana, cuando el tumor fue palpable, los grupos de ratones fueron subdivididos, según recibieran quimioterapia metronómica con ciclofosfamida en el agua de bebida a dosis de 30 mg/kg p.c./día (CBi-C+Cy, n: 10; CBi-HFD+Cy n: 10) o vehículo en el agua de bebida (CBi-C, n: 10; CBi-HFD n: 10)

Para el preparado de la dosis de ciclofosfamida se partió de una solución *stock* 20 mg/ml diluida en agua destilada estéril. Luego se diluyó en el agua de bebida hasta alcanzar una concentración 0,0996 mg/ml, que corresponde a una dosis diaria de 30 mg/kg de peso por animal (Mainetti y col. 2020).

Luego de la inoculación del tumor, diariamente se evaluó el peso corporal, el volumen tumoral, el consumo de alimento y agua. La dosis metronómica de Cy se ajustó diariamente según el agua consumida por cada grupo. Para determinar el volumen tumoral (V) se utilizó la siguiente fórmula $V=0,4 \times a \times b^2$, donde a es el diámetro mayor y b el diámetro menor del tumor, medidos a través de un calibre Vernier. El crecimiento del volumen tumoral se ajustó a una curva de crecimiento exponencial para los animales de todos los grupos, que permitió calcular el tiempo de duplicación tumoral, variable inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento del tumor. En todos los casos, se graficó la curva de ajuste exponencial correspondiente a un experimento representativo. El porcentaje de inhibición tumoral se calculó a partir de las diferencias entre las áreas bajo la curva del tiempo de duplicación tumoral. A las 4 semanas de la inoculación, cuando el primer ratón alcanzó el máximo volumen tumoral éticamente permitido, todos los animales fueron sacrificados por exanguinación. La sangre recolectada se utilizó para el recuento de glóbulos blancos y para evaluar los parámetros bioquímicos. Además, se evaluó la actividad de Mrp2 y P-gp intestinales (Fig. 4.2).

Todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con el Reglamento para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Expediente 6109/012 Resolución CE 267/02) y fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso Animal de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

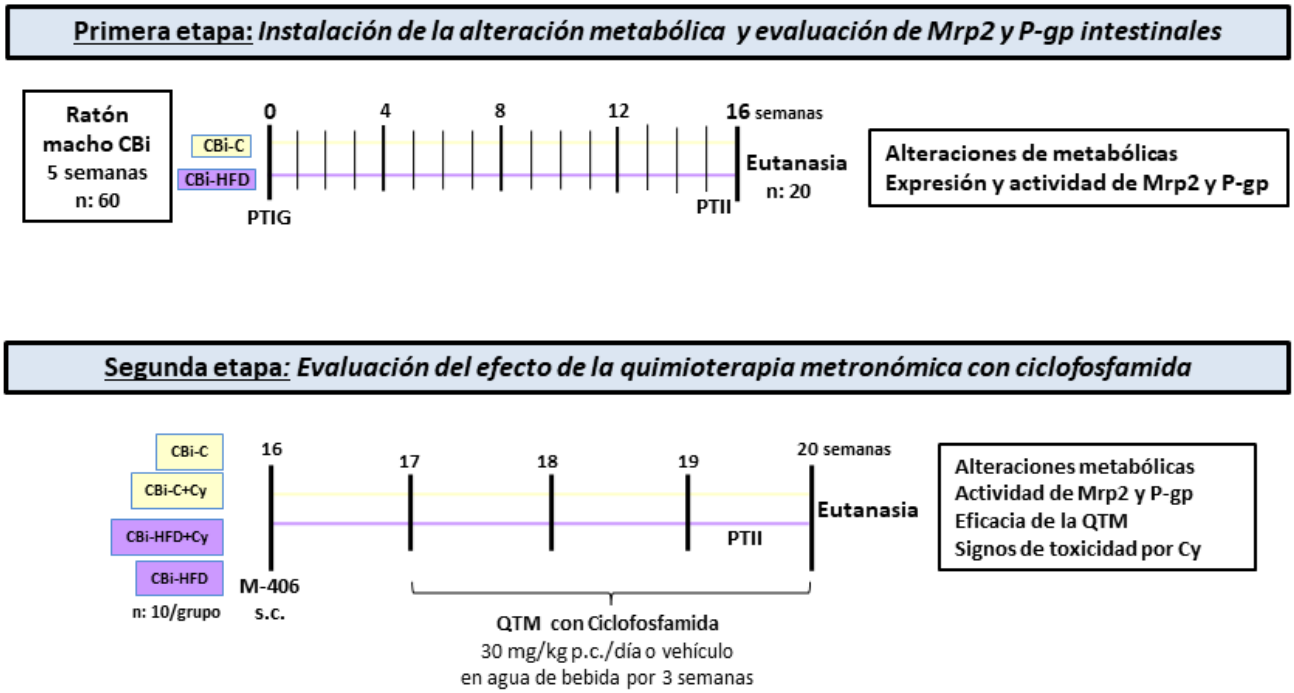


Figura 4.2. Representación esquemática del diseño experimental. Primera etapa Los animales recibieron dieta estándar (CBi-C, n: 30) o HFD (CBi-HFD, n: 30), durante 16 semanas. Al inicio del experimento todos los animales fueron sometidos a una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (PTIG) y en la semana 15 a una prueba de tolerancia intraperitoneal a la insulina (PTII). Luego de 16 semanas de dieta, 10 animales controles y 10 HFD fueron sacrificados y se recolectaron muestras de plasma, intestino delgado y tejido adiposo. Segunda etapa: a los animales se les inoculó vía subcutánea (s.c) el tumor M-406, cuando el tumor fue palpable se dividieron en 4 grupos (CBi-C, CBi-C+Cy 30mg/kg p.c./día, CBi-HFD, CBi-HFD+Cy 30mg/kg p.c./día) y se comenzó con la QTM. Luego de 3 semanas de QTM todos los animales fueron sacrificados y se recolectaron muestras de plasma, intestino delgado y tejido adiposo.

4.3.3. Eutanasia

Ver sección 2.3.4

4.3.4. Procedimiento quirúrgico

Ver sección 2.3.5

4.3.5. Estudios bioquímicos

4.3.5.1. Determinaciones plasmáticas

Ver sección 2.3.6.1

4.3.5.2. Prueba de tolerancia Intraperitoneal a la Glucosa

Ver sección 2.3.6.2

4.3.5.3. Prueba de Tolerancia Intraperitoneal a la Insulina

Ver sección 2.3.6.3

4.3.6. Estudios histológicos de tejido adiposo

Ver sección 2.3.7.1

4.3.7. Aislamiento de ARN total

4.3.7.1. Extracción del ARN

Ver sección 2.3.11.1

4.3.7.2. Evaluación de la integridad de los ARNs por electroforesis en gel de agarosa

Ver sección 2.3.11.2

4.3.7.3. Determinación de la concentración y pureza de los ARNs

Ver sección 2.3.11.3

4.3.8. Retrotranscripción

Ver sección 2.3.12

4.3.9. Estudios de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real

Ver sección 2.3.10

Las reacciones de qPCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 4.1) (Crib y col. 2017; Yan y col. 2021; Lee y col; 2021).

Los resultados de la expresión de los genes se normalizaron a los niveles de GAPDH (Lambertucci y col. 2018). Los resultados se analizaron como cuantificación relativa a través del método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se expresan en % de CBi-C (Livak y col. 2001).

Gen	Descripción del gen	Secuencia de oligonucleótidos
Mrp2	Abcc2	Directo:5´-TTCCTGCCTGTTCTTCGTCT-3´
		Reverso: 5´-CGTGTGTTGAGTCGCTTGAT-3´
Mdr-1	Mdr1a	Directo: 5´-AAAGGCTCTACGACCCCCTA-3´
		Reverso: 5´-CCTGACTCACCACACCAATG-3´
	Mdr1b	Reverso: 5´-TTGGTGGCACAACAACTCAT-3´
		Reverso: 5´-GGCTTTCGCATAGTCAGGAG-3´
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Directo:5´-CACAATTTCCATCCCAGACC-3´
		Reverso: 5´-GTGGGTGCAGCGAACTTTAT-3´

Tabla 4.1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de la expresión del ARNm

4.3.10. Evaluación de la actividad de Mrp2

Ver sección 2.3.14

Los resultados se expresan en % de CBi-C.

4.3.11. Evaluación de la actividad de P-gp

Ver sección 2.3.15

Los resultados se expresan en % de CBi-C.

4.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente según el tipo de variable en cuestión. Para la comparación de variables paramétricas se utilizó la prueba *t-Student* y el análisis de la variancia (ANOVA) seguido de la prueba de *Tukey,* de acuerdo al número de grupos experimentales evaluados (dos grupos experimentales o más de dos, respectivamente). En el caso de variables no paramétricas se utilizaron las pruebas *de Mann-Whitney* y *Kruskal Wallis* seguido de la prueba de *Dunn* según el número de grupos experimentales analizados (dos grupos experimentales o más de dos, respectivamente). Para el análisis estadístico de los datos de utilizó el programa GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, Estados Unidos). Se consideraron significativas las diferencias cuando $P<0,05$.

4.5. Resultados

4.5.1. Características generales de los ratones CBi machos

Antes del inicio del tratamiento dietético, animales CBi machos de 5 semanas de edad fueron estudiados con el fin de establecer sus parámetros fisiológicos basales. Se evaluó el consumo diario de alimento y agua, el peso corporal y los parámetros bioquímicos glucemia, trigliceridemia y colesterolemia. Los resultados se muestran en la tabla 4.2.

Con el fin de confirmar que los ratones CBi presentan una regulación de la glucemia sin alteraciones, se les realizó una PTIG a las 5 semanas de edad. Los resultados obtenidos demostraron que todos los animales estudiados retornaron a su valor de glucemia basal luego de 120 min post inyección de glucosa, indicando normalidad en su respuesta (Fig. 4.3).

Ingesta de alimento (g/día/animal)	4,59 ± 0,30
Ingesta de agua (ml/día/animal)	5,87 ± 0,89
Peso (g)	27,16 ± 3,01
Glucemia (mg/dl)	77,26 ± 20,17
Colesterolemia (mg/dl)	130,10 ± 12,95
Trigliceridemia (mg/dl)	58,54 ± 9,56

Tabla 4.2. Características generales de los ratones CBi machos a las 5 semanas de edad. Datos expresados como media ± EE.

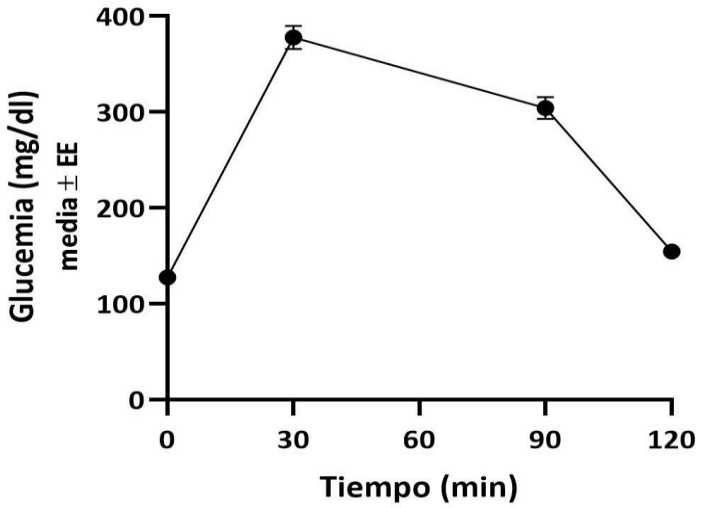


Figura 4.3. Prueba de Tolerancia intraperitoneal a la Glucosa, se grafica la evolución temporal de la glucemia luego de la inyección intraperitoneal de la inyección de glucosa. Datos expresados como media ± EE.

4.5.2. Efecto de la dieta alta en grasas en los parámetros fisiológicos y bioquímicos en ratones CBi: establecimiento del modelo de obesidad

Durante las 16 semanas de tratamiento dietético, los ratones CBi alimentados con dieta estándar y con dieta alta en grasa, consumieron la misma cantidad de alimento. Como el alimento HFD, presenta un mayor valor calórico, la ingesta de calorías se vio significativamente aumentada en los animales CBi-HFD con respecto a sus controles. El consumo de agua disminuyó en los animales CBi alimentados con dieta alta en grasa (Tabla 4.3).

Al finalizar el tratamiento dietético, los animales CBi que fueron alimentados con dieta alta en grasa, presentaron un aumento significativo del peso corporal, estadísticamente diferente del grupo control a partir de la 8va semana de dieta (Fig. 4.4); en correspondencia se incrementaron sus depósitos grasos intraabdominales, tanto a nivel del tejido adiposo epididimal como en el retroperitoneal (Tabla 4.3).

Parámetros	**CBi-C**	**CBi-HFD**
Ingesta de alimentos (g/ día/animal)	5,50 ±0,44	5,08 ± 0,57
Consumo de calorías (kcal total/animal)	1755 ± 100,3	3271 ± 497,7^{l}
Ingesta de agua (ml/día/animal)	9,39 ± 0,63	5,59 ± 0,71^{k}
Ganancia de peso corporal (%)	53,98 ± 2,13	97,26 ± 31,8^{k}
Grasa epididimal (%)	2,01 ± 0,54	6,39 ± 0,67^{l}
Grasa retroperitoneal (%)	0,39 ± 0,24	1,16 ± 0,23^{i}

Tabla 4.3. Características del consumo y morfológicos luego de 16 semanas de alimentación HFD. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo). ^{i}, ^{k} y ^{l}, significativamente diferente de CBi-C, P<0,05, P<0,001 y P<0,0001 respectivamente, según la prueba *t-student.* o prueba de *Mann-Whitney.*

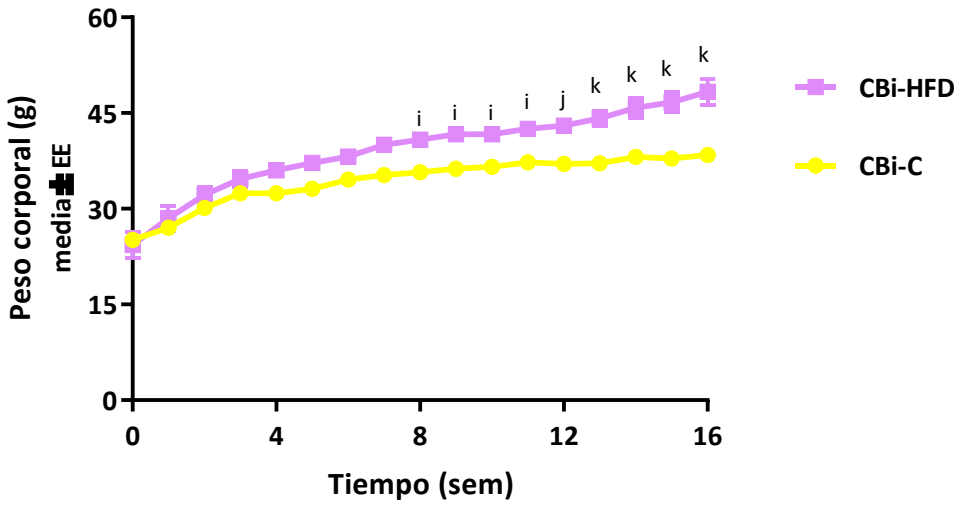


Figura 4.4. Evolución temporal del peso de los ratones CBi durante 16 semanas de alimentación con HFD. A partir de la octava semana, el peso corporal del grupo CBi-HFD fue mayor que el grupo CBi-C. Datos expresados como media ± EE (n: 30 para cada grupo). ^{i}, ^{j} y ^{k}, significativamente diferente de CBi-C, P<0,05, P<0,01 y P<0,001 respectivamente, según la prueba *t-student.*

Al final del tratamiento dietético, los ratones CBi-HFD presentaron las alteraciones metabólicas típicas generadas por una dieta alta en grasa durante 16 semanas. Los animales del grupo CBi-HFD, presentaron mayores niveles de glucemia plasmática y resistencia a la insulina confirmada por un menor descenso porcentual de la glucemia durante la prueba de tolerancia intraperitoneal a la insulina. Los ratones controles no presentaron resistencia a la insulina y su glucemia se mantuvo dentro de los valores normales durante todo el experimento. Con respecto al metabolismo de los lípidos, los animales CBi del grupo HFD presentaron aumentos significativos en triglicéridos y colesterol total plasmáticos con respecto a sus respectivos controles (Tabla 4.4).

Parámetros	**CBi-C**	**CBi-HFD**
PTII (%)	34,61 ± 4,12	22,06 ± 2,67^{i}
Glucemia (mg/dl)	89 ± 4,39	138,6 ± 3,79^{l}
Colesterolemia (mg/dl)	115,3 ± 11,83	165 ± 15,44^{i}
Trigliceridemia(mg/dl)	52,22 ± 4,76	81,89 ± 8,53^{k}

Tabla 4.4. Parámetros bioquímicos en ratones CBi después del tratamiento dietético. PTII, resultado mostrado como porcentaje de aclaramiento máximo de glucosa. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo). ^{i}, ^{k} y ^{l}, significativamente diferente de CBi-C, P<0,05, P<0,001 y P<0,0001 respectivamente, según las pruebas *t-student* o *Mann-Whitney.*

Además, se evaluaron las características histológicas del tejido adiposo visceral. Los adipocitos de los animales CBi-HFD presentaron un aumento significativo de su diámetro en comparación con los controles (Fig.4.5 b). Asimismo se hallaron coronas de macrófagos alrededor de las células adiposas, indicativo de infiltración inflamatoria, ausentes en los preparados histológicos de los animales controles (Fig. 4.5 a).

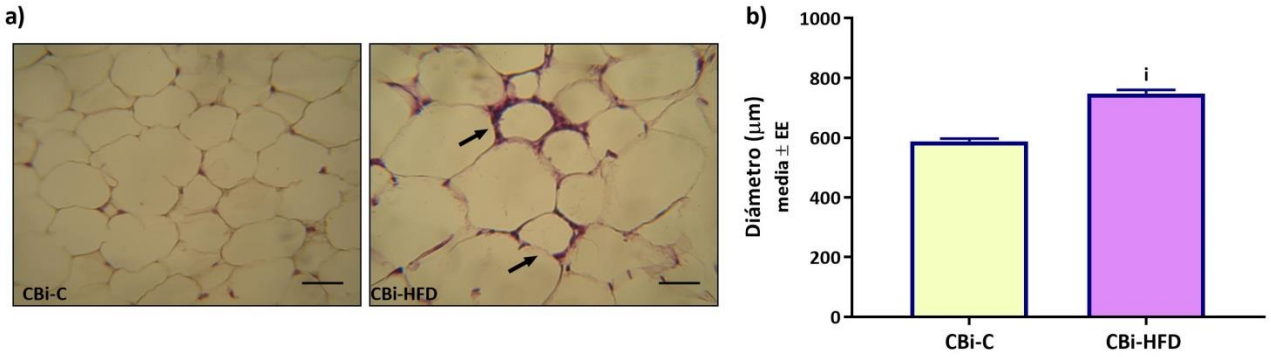


Figura 4.5. Cambios histológicos en tejido adiposo. a) Imágenes de tejido adiposo del grupo control (izquierda) y del grupo HFD (derecha) teñidos con HE. Las imágenes se muestran con un aumento de 40X (la barra indica 50 µm). Una estructura representativa en forma de corona de macrófagos está marcada con una flecha. b) Diámetro de los adipocitos, media ± EE (n: 10 para cada grupo): CBi-C 573 ± 10,02 µm vs. CBi-HFD 746,50 ± 12,60 µm. ^{i}, significativamente diferente de CBi-C, P<0,0001, según la prueba *t-student*.

4.5.3. Efecto de la dieta alta en grasa en la expresión y actividad intestinal de Mrp2 y P-gp en ratones CBi

Se evaluó la expresión de los ARNm *Abcc2, Mdr-1a* y *Mdr-1b* en muestras de yeyuno e íleon, respectivamente, en ratones CBi luego de 16 semanas de tratamiento dietético. La administración de HFD provocó una disminución (-53%, P<0,05) en la expresión del ARNm de *Abcc2* respecto a los controles (Fig. 4.6 a). La expresión del ARNm de ambas isoformas que codifican *Mdr-1* también se encontró disminuida en los ratones alimentados con HFD. Los niveles de *Mdr1a* y *Mdr1b* presentaron una reducción (-42%, P<0,05 y -59%, P<0,05, respectivamente) en comparación con el grupo Control (Fig. 4.6 c, d). La actividad de los transportadores ABC intestinales, evaluadas por la técnica de saquitos evertidos, se encontró significativamente disminuida en los animales que recibieron dieta alta en grasa por 16 semanas.

La actividad de Mrp2 evaluada en muestras de yeyuno, disminuyó (-63%, P<0,05) en los ratones CBi-HFD en comparación con la del grupo control (Fig. 4.6 b). Asimismo, la actividad de P-gp evaluada en muestras de íleon, disminuyó (-45% P<0,05) en los ratones HFD (Fig. 4.6 e) en comparación con la del grupo control.

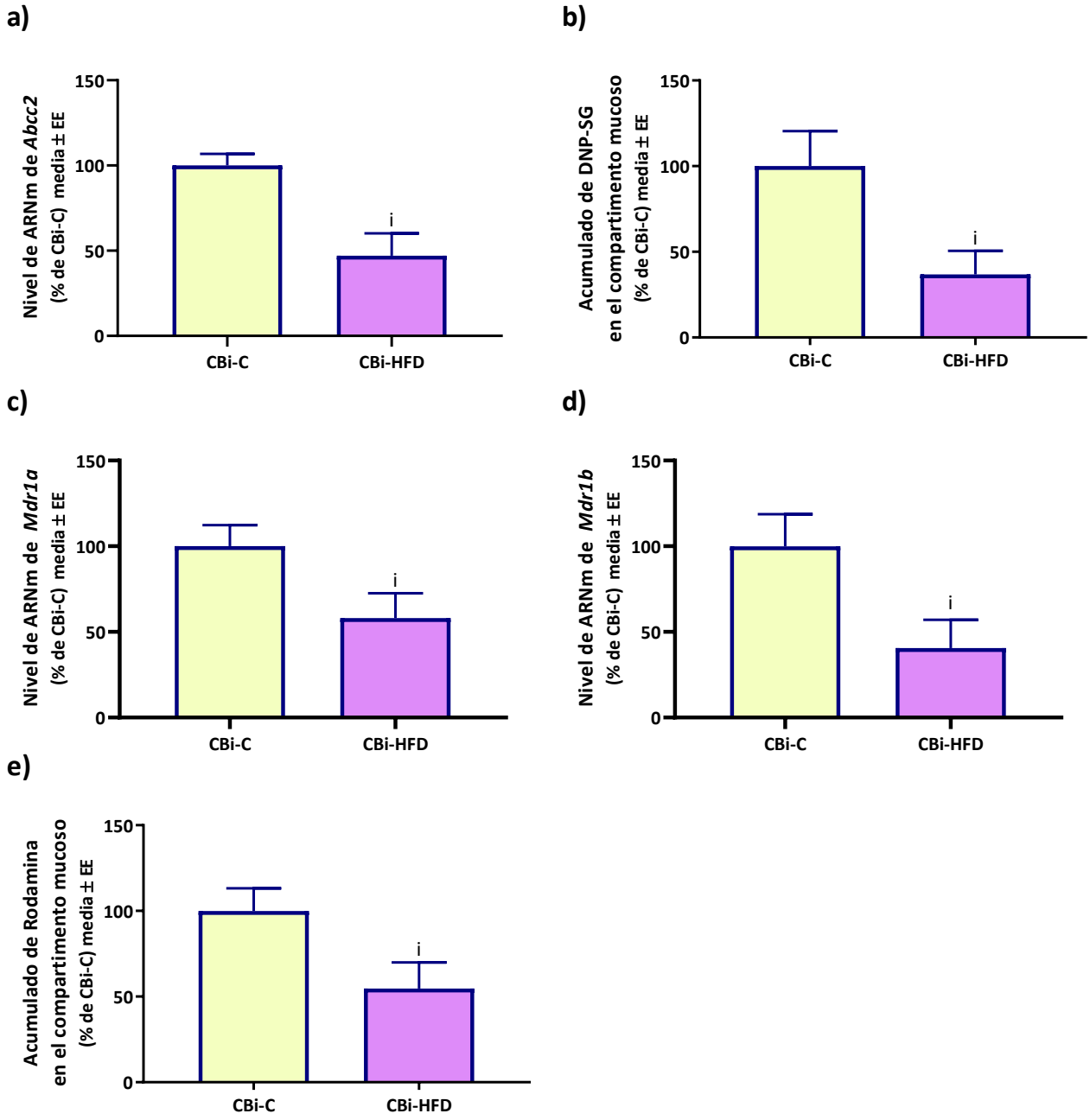


Figura 4.6. Evaluación de la expresión y actividad intestinal de Mrp2 y P-gp. a) Expresión de *Abcc2* en yeyuno. b) Actividad de Mrp2 usando CDNB como sustrato. Se gráfica la cantidad de DNP-SG acumulada a los 30 min en el compartimento mucoso. d) Expresión de *Mdr1*a en íleon d) Expresión de *Mdr1*b en íleon. e) Actividad de P-gp en íleon usando Rodamina como sustrato. Se grafica el acumulado de Rodamina a los 30 min en el compartimento mucoso. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo). [i], significativamente diferente de CBi-C, P<0,05, según la prueba de *Mann-Whitney*.

4.5.4. Efecto de la dieta alta en grasa en la evolución tumoral y respuesta a la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida

Al analizar el crecimiento del volumen tumoral a largo de las 4 semanas de esta segunda etapa del experimento, no se halló diferencia estadística entre los volúmenes de los grupos CBi-C y CBi-HFD (P=ns) (Fig. 4.7 a, b).

Respecto a la respuesta a la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida, se puede observar que ejerció su efecto terapéutico tanto en los animales alimentados con una dieta estándar comercial, como en los alimentados con una dieta alta en grasa, visualizado en la Figura 4.7 a y b, con una línea discontinua. Sin embargo, al analizar la eficacia de la quimioterapia a través del porcentaje de inhibición tumoral, se observó una menor eficacia terapéutica en los animales CBi alimentados con dieta alta en grasa (media ± EE) 81,62 ±3,68 %, con respecto a los animales CBi controles, 90,12 ± 1,86 %, P<0,05 (Fig. 4.8).

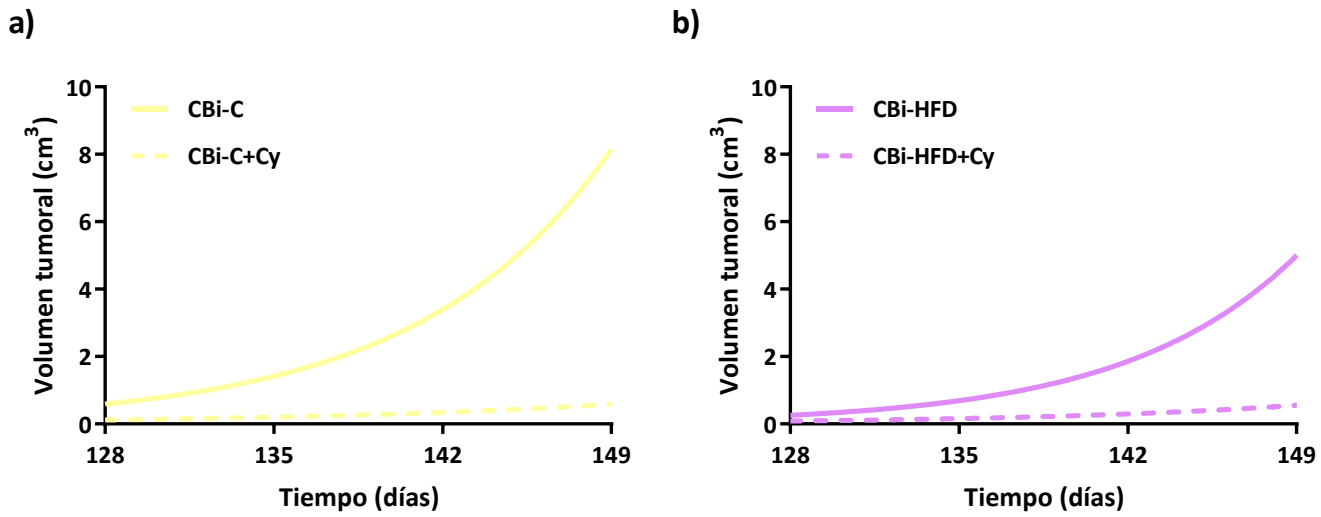


Figura 4.7. Evolución temporal del volumen tumoral**.** a) grupos controles. b) grupos HFD. Línea entrecortada representa grupos tratados con ciclofosfamida, línea continua grupos sin ciclofosfamida**.** Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo)..

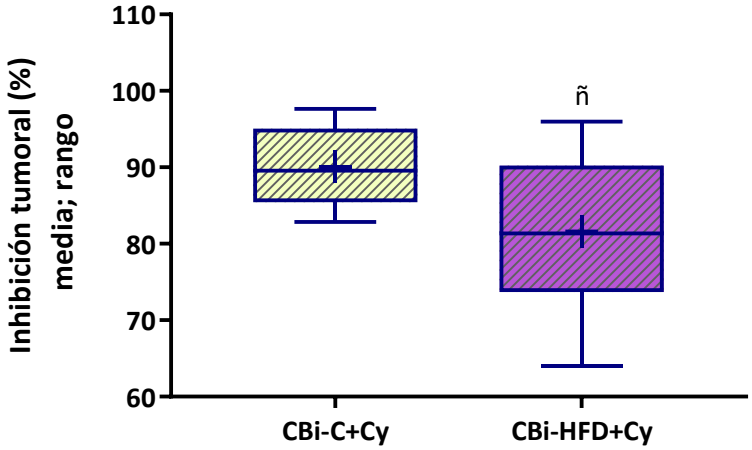


Figura 4.8. Respuesta a quimioterapia metronómica con ciclofosfamida, evaluada a través del porcentaje de inhibición tumoral. [ñ], significativamente diferente de CBi-C+Cy, P<0,05, según la prueba de *Mann-Whitney.*

4.5.5. Variación del peso corporal desde el inicio de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida

Desde el inicio de la quimioterapia metronómica, con ciclofosfamida a la dosis de 30 mg/kg/día en el agua de bebida, se controló diariamente el peso corporal como parámetro físico de toxicidad por el fármaco. Al finalizar el experimento, los animales del grupo CBi-C aumentaron su peso en 26,2 ± 3,64% desde la inoculación debido al desarrollo de la masa tumoral, peso corporal antes de la QTM (media ± EE) 38,78 ± 0,83 g, peso al finalizar el experimento 48,89 ± 1,64 g. En cambio, el grupo CBi-C+Cy mantuvo su peso durante las cuatro semanas de desafío tumoral, el peso corporal antes de la QTM fue 44,5 ± 1,18 g, y al finalizar el experimento 42,7 ± 0,63 g, debido al menor volumen tumoral alcanzado en respuesta a la ciclofosfamida (Fig. 4.9 a).

Sin embargo los resultados obtenidos para los animales del grupo HFD fueron diferentes. Los ratones CBi-HFD, que no recibieron ciclofosfamida aumentaron su peso en 2,6 ± 1,53 %. Los ratones HFD que recibieron ciclofosfamida en el agua de bebida, pesaban al día 128 de dieta alta en grasas 49,5 ± 1,86 g, no obstante desde el primer día de la quimioterapia metronómica comenzaron a descender su peso y alcanzaron una disminución total de 21,22 ± 1,93 % en el día 148 de dieta, 40,33 ± 1,76 g (Fig. 4.9 b). Esta disminución de peso corporal, en más de 20 %, desde el inicio de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida es considerado un signo de toxicidad por el fármaco.

Para confirmar que el descenso de peso esté relacionado con el consumo de ciclofosfamida y no por un síndrome paraneoplásico provocado por el tumor y/o algún otro factor, se repitió el experimento, esta vez sin el desafío tumoral. A Los ratones CBi se los alimentó por 16 semanas con

dieta alta en grasa y agua *ad libitum*, en la semana 17 se les administró ciclofosfamida en el agua de bebida por 3 semanas y se evaluó diariamente el peso. Los animales del grupo control que recibieron Cy mantuvieron su peso durante la administración y no hubo diferencias estadísticas con el peso del grupo CBi-C. Peso corporal antes de la QTM: CBi-C 43,4 ± 0,75 g, CBi-C+Cy 43 ± 0,47 g; el peso al finalizar el experimento: CBi-C 44,2 ± 0,95 g, CBi-C+Cy 42 ± 0,41 g. (Fig. 4.10 a).

El grupo CBi-HFD+Cy pesaba al día 128 de dieta 49,29 ± 2,01 g; al día 148 luego del tratamiento con quimioterapia metronómica, el peso descendió a 40,43 ± 2,35 g; una disminución del 20,18 %. Como se observa en la figura 4.10 b, el descenso de peso comenzó desde el inicio de quimioterapia metronómica con ciclofosfamida en el agua de bebida, confirmando toxicidad del tratamiento.

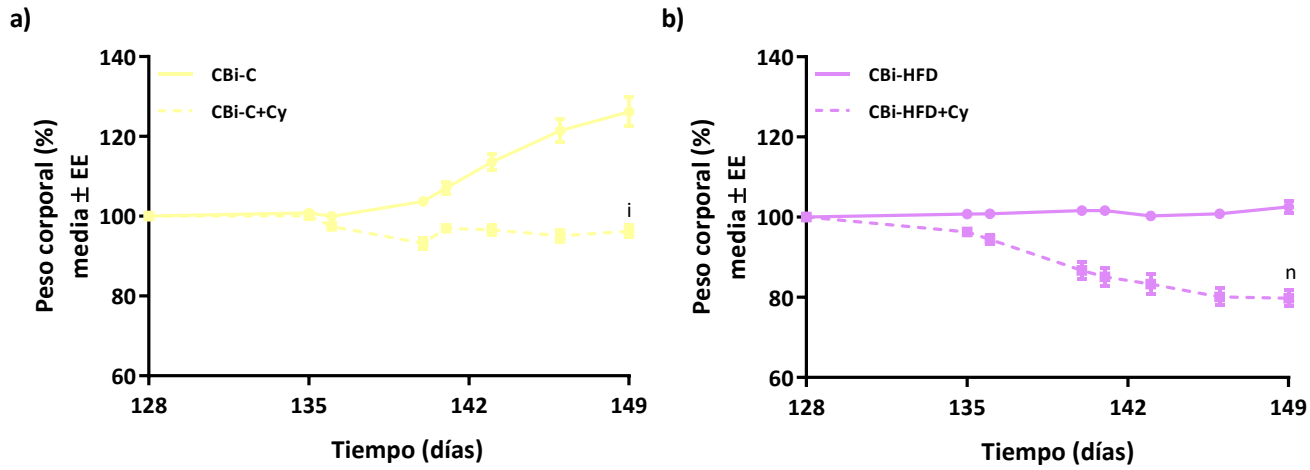


Figura 4.9. Evolución temporal del peso corporal desde el inicio de la QTM (día 128) hasta el sacrificio (día 149 desde el inicio de la dieta)**.** a) Grupos alimentados con dieta control, línea continua sin tratamiento QTM, línea entrecortada con tratamiento QTM. b) Grupos HFD, línea continua sin tratamiento QTM, línea entrecortada con tratamiento QTM. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo), en porcentaje tomando como 100 % el peso corporal antes de la inoculación del tumor. [i], significativamente diferente de CBi-C, P<0,05; [n], significativamente diferente de CBi-HFD, P<0,05, según la prueba de *Mann-Whitney.*

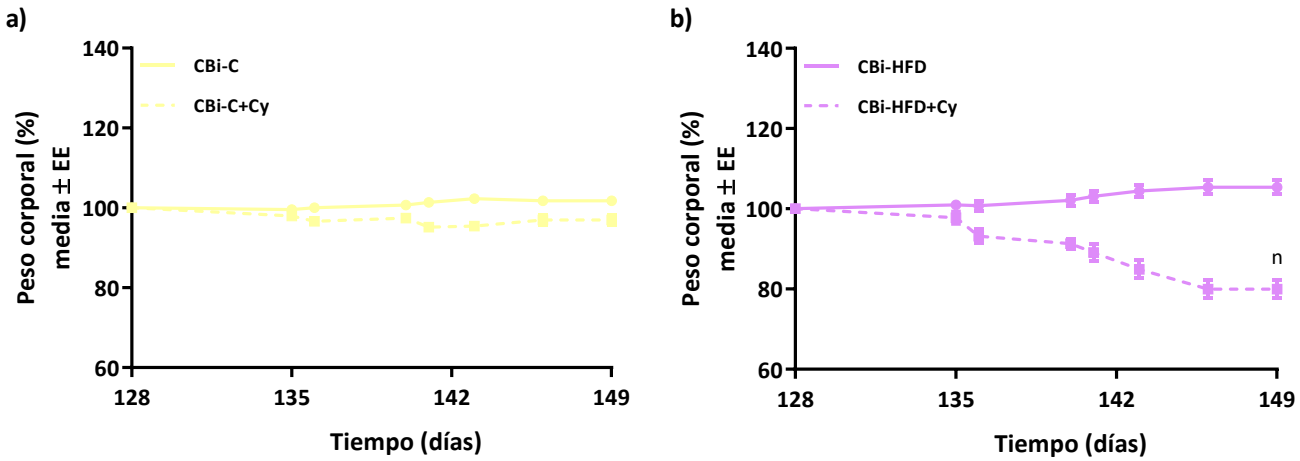


Figura 4.10. Evolución temporal del peso corporal desde el inicio de la QTM hasta el sacrificio en animales sin inoculación tumoral**.** a) Grupos alimentados con dieta control, línea continua sin tratamiento QTM, línea entrecortada con tratamiento QTM. b) Grupos HFD, línea continua sin tratamiento QTM, línea entrecortada con tratamiento QTM. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo), en porcentaje tomando como 100 % el peso corporal al día 128. [i], significativamente diferente de CBi-C, P<0,05; [n], significativamente diferente de CBi-HFD, P<0,05, según la prueba de *Mann-Whitney*.

4.5.6. Variación en el recuento de glóbulos blancos luego de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida

Al finalizar el tratamiento de QTM con ciclofosfamida se evaluó el recuento de glóbulos blancos sanguíneos como parámetro de toxicidad bioquímica por el fármaco. Los grupos sin tratamiento QTM, CBi-C y CBi-HFD, presentaron recuentos de glóbulos blancos normales; CBi-C (media ± EE) 2443 ± 187,9/mm^3, CBi-HFD 3670 ±722,1/mm^3. El grupo control tratado con ciclofosfamida, presentó un valor normal de leucocitos para roedores, 2625 ± 235/mm^3. El grupo HFD tratado con ciclofosfamida por 3 semanas, presentó leucopenia, el recuento de glóbulos blancos fue menor a la cantidad normal para los ratones CBi, 992 ± 76,71/mm^3 (Fig. 4.11), evidenciando signos de toxicidad.

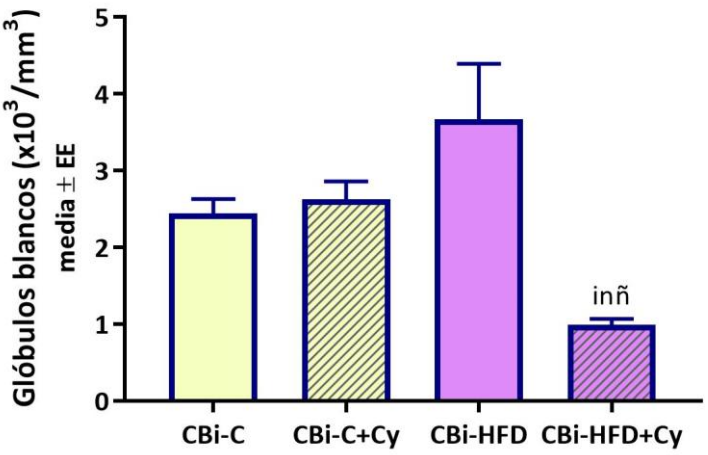


Figura 4.11. Recuento de glóbulos blancos. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo). [i], significativamente diferente de CBi-C; P<0,05; [n], significativamente diferente de CBi-HFD, P<0,05; [ñ], significativamente diferente de CBi-C+Cy, P<0,05, según las pruebas de ANOVA y *Tukey.*

4.5.7. Parámetros morfológicos y bioquímicos luego de 20 semanas de dieta y quimioterapia metronómica

Luego del desafío tumoral y del tratamiento quimioterápico, a las 20 semanas de iniciado el experimento, los animales del grupo HFD, mantuvieron todas las alteraciones metabólicas generadas por la dieta alta en grasa, presentaban altos niveles de glucemia, colesterolemia, trigliceridemia y aumento del peso del tejido adiposo epididimal. Entre los grupos CBi-HFD y CBi-HFD+Cy, no se hallaron diferencias significativas, indicando que tanto el tumor como la ciclofosfamida no modificaron los parámetros de obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas (Tabla 4.4).

Parámetros	CBi-C	CBi-C+Cy	CBi-HFD	CBi-HFD+Cy
Glucemia (mg/dl)	116,30 ± 0,82	106,30 ± 3,45	124,40 ± 4,06^{iñ}	135,20 ± 4,94^{iñ}
Colesterolemia (mg/dl)	109,60 ± 4,06	116,70 ± 5,56	123,70 ± 5,25^{jo}	135,80 ± 2,66^{jo}
Trigliceridemia (mg/dl)	127,40 ± 3,13	124,90 ± 5,50	149,9 ± 9,37^{iñ}	154,80 ± 3,40^{iñ}
Grasa epididimal (%)	1,11 ± 0,14	1,19 ± 0,18	4,80 ± 0.,80^{jo}	4,44 ± 0,34^{jo}

Tabla 4.5. Parámetros bioquímicos y morfológicos en ratones CBi después del tratamiento quimioterápico. Grasa epididimal expresada como porcentaje del peso corporal total. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo). [i] y [J] significativamente diferente de CBi-C; P<0,05 y P<0,01, respectivamente; [ñ] y [o], significativamente diferente de CBi-C+Cy; P<0,05 y P<0,01, respectivamente, según las pruebas de ANOVA y *Tukey o Kruskal Wallis* y *Dunn.*

4.5.8. Actividad de Mrp2 y P-gp intestinales luego de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida

Luego de la administración de la quimioterapia metronómica con ciclofosfamida por 3 semanas, se re-evaluó la actividad intestinal de los transportadores Mrp2 y P-gp en los ratones CBi.

La actividad de Mrp2 en los ratones controles no se modificó por el tratamiento con ciclofosfamida. Con respecto, a los animales alimentados con dieta alta en grasa, la actividad de Mrp2 permaneció significativamente disminuida luego de las 3 semanas de QTM, para el grupo CBi-HFD (-54%, P<0,05) como para CBi-HFD+Cy (-59%, P<0,05), con respecto al grupo CBi-C (Fig. 4.12 a).

En relación a la actividad intestinal de P-gp luego de la QTM, los ratones CBi controles que recibieron ciclofosfamida no presentaron modificaciones en su actividad con respecto a los que recibieron ciclofosfamida. En los animales alimentados con dieta alta en grasa, la actividad de P-gp se mantuvo significativamente disminuida luego de las 3 semanas de QTM, CBi-HFD (-34%, P<0,05) y CBi-HFD+Cy (-32%, P<0,05) con respecto al grupo CBi-C (Fig. 4.12 b).

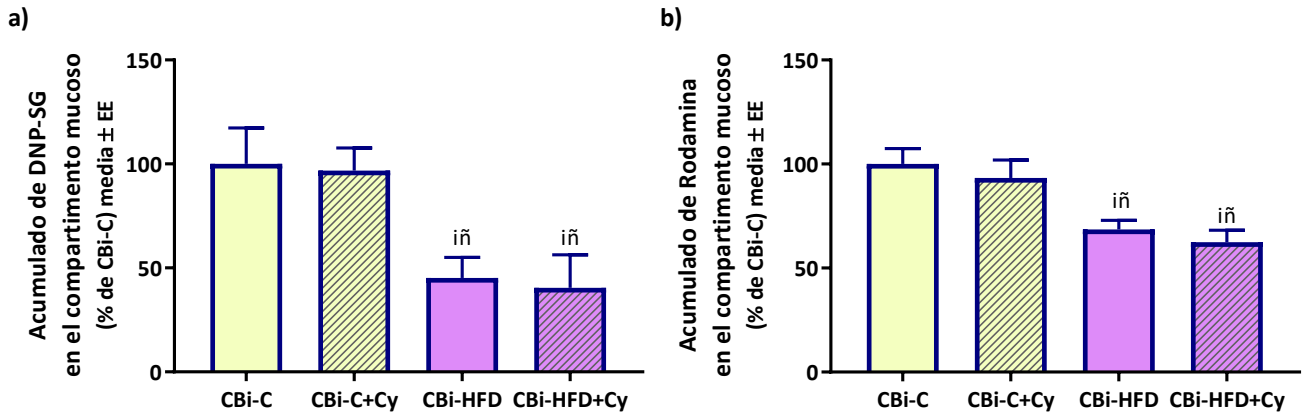


Figura 4.12. Evaluación de la actividad de los transportadores ABC intestinales. a) Actividad de Mrp2 usando CDNB como sustrato. Se grafica la cantidad de DNP-SG acumulada a los 30 min en el compartimento mucoso. b) Actividad de P-gp en íleon usando Rodamina como sustrato. Se grafica el acumulado a los 30 min en el compartimento mucoso. Datos expresados como media ± EE (n: 10 para cada grupo). ^{i}, significativamente diferente de CBi-C; P<0,05; ^{ñ}, significativamente diferente de CBi-C+Cy; P<0,05, según las pruebas de *Kruskal Wallis* y de *Dunn.*

4.6. Discusión y conclusiones parciales

La obesidad predispone al desarrollo de diferentes tipos de cáncer, como el de mama, debido principalmente a la generación de un estado de inflamación sistémico, producción anormal de adipoquinas y hormonas, resistencia a insulina e hiperisulinemia. En consideración, las mujeres obesas con cáncer de mama, tienen peor pronóstico, mayor probabilidad de metástasis y de recidivas (Dietze y col. 2018; Boese y Kang, 2020; Berger e Iyengar, 2021).

Para planificar una terapia hay que considerar el estado de salud inicial de los pacientes obesos con cáncer en virtud del efecto deletéreo del tratamiento oncológico. Los efectos adversos y tóxicos de la quimioterapia son unas de las principales razones de fracaso terapéutico en los pacientes con cáncer, consecuentemente ocasionando una peor calidad de vida y una mayor morbi-mortalidad (Lowenthal y Eaton, 1996; Azim y col. 2011; Long y Suresh, 2020). Existen múltiples estudios que asocian la toxicidad inducida por la quimioterapia a alteraciones en los mecanismos metabolizadores, especialmente a polimorfismos en los sistemas enzimáticos, en particular vinculados al metabolismo hepático (Tao y col. 2020; Akbarali y col. 2022). No obstante, como se describió en el capítulo 1, la barrera bioquímica intestinal es el primer sitio de interacción de los fármacos ingeridos por la vía oral con nuestro organismo, por lo tanto su absorción y biodisponibilidad dependen en primer lugar del funcionamiento correcto de esta barrera.

En este capítulo de la tesis, se evaluó si la alteración en la barrera bioquímica intestinal producida por una dieta alta en grasa modifica la eficacia y/o efectos adversos de un fármaco de uso común en la terapéutica de los pacientes oncológicos. Es por ello, que en colaboración con el grupo de oncología del Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, se utilizó el modelo de quimioterapia metronómica con ciclofosfamida para el tratamiento de un adenocarcinoma de mama triple negativo. Como se mencionara, la QTM presenta la particularidad de producir efectos secundarios menos graves y escasa o nula toxicidad que la quimioterapia estándar (Scharovsky y col. 2020). Notablemente, los estudios experimentales que avalan dicha aseveración se realizaron en roedores adultos jóvenes y sin ninguna patología de base (Mainetti y col. 2011, 2013; Rico y col. 2017; Rozados y col. 2004, 2010).

Para llevar a cabo el objetivo de este capítulo, primeramente se debió establecer el modelo de obesidad inducida por la dieta en los ratones CBi y reproducir las alteraciones metabólicas observadas en la línea C57BL/6. Luego de 16 semanas de dieta alta en grasa, se confirmó el conjunto de parámetros morfológicos y bioquímicos que caracterizan a este modelo de obesidad (Speakman, 2019). Los ratones CBi-HFD presentaron aumento del peso corporal, aumento de la

masa adiposa, incremento de sus niveles de glucemia, colesterolemia y trigliceridemia, así como resistencia a la insulina en comparación con sus controles. Además, presentaron aumento del diámetro de los adipocitos y coronas de macrófagos alrededor de los mismos, indicando inflamación del tejido adiposo (Ohkura y col. 2019). Cabe destacar que la obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas, se mantuvieron durante la segunda etapa de experimentación.

Una vez establecido el modelo de obesidad con sus alteraciones metabólicas asociadas, se evaluó si el efecto de la dieta alta en grasa en los transportadores Mrp2 y P-gp intestinales observado en los ratones C57BL/6, se reproducía en los ratones CBi. Los resultados confirmaron que la dieta alta en grasa disminuyó la expresión y actividad de Mrp2 y P-gp, evaluados en yeyuno e íleon respectivamente, en los ratones CBi-HFD.

A continuación, en una segunda etapa, se procedió a la inoculación del tumor M-406, luego de una semana, cuando fue palpable, se comenzó el tratamiento de QTM con ciclofosfamida diluida en el agua de bebida (Del Giúdice y col. 2020; Rico y col. 2017).

Interesantemente, los ratones HFD no presentaron un volumen tumoral mayor que los controles. Aunque hay trabajos reportando aumento del tamaño tumoral en los ratones HFD (Bousquenaud y col. 2018, Huang y col. 2021), esas mediciones se realizaron evaluando el peso o el diámetro en cortes histológicos una vez extirpado el tumor. Dadas las características del tumor M-406, y su sitio de inoculación, en este trabajo de tesis se evaluó el volumen tumoral por mediciones externas utilizando un calibre. De igual modo, Velazquez y col (2021), no hallaron diferencias entre los animales controles y los tratados con dietas altas en grasa animal o vegetal.

Si bien hay otros parámetros que se estudian en relación con la evolución tumoral, como número de metástasis o ensayos de supervivencia, no fueron evaluados en este trabajo, dado que excedían el objetivo principal de esta tesis.

No obstante los tumores no presentaron diferencias estadísticas en su tamaño entre las dietas; el porcentaje de inhibición tumoral disminuyó en los ratones alimentados con dieta alta en grasa. Esta diferencia en la respuesta terapéutica a ciclofosfamida, podría explicarse por una menor penetración del fármaco en el tumor; probablemente por las modificaciones que genera la obesidad en el microambiente tumoral, como alteraciones en la angiogénesis tumoral, inflamación de los adipocitos que circundan el tumor y disminución en la respuesta inmune antitumoral (Scully y col. 2016; Hillers y col. 2018; Mainetti y col. 2020).

Además de evaluar los efectos terapéuticos de ciclofosfamida, en este capítulo se analizó si la regulación negativa de la barrera bioquímica intestinal por la obesidad, predispone a toxicidad, utilizando un esquema de administración seguro y no tóxico, como es la QTM (Mainetti y col. 2011, 2013; Rico y col. 2017).

Efectivamente, la QTM con ciclofosfamida generó signos de toxicidad farmacológica en los ratones HFD, fenómeno que no fue observado en los ratones controles. Desde el inicio de la administración de ciclofosfamida en el agua de bebida, los ratones CBi-HFD+Cy disminuyeron su peso corporal, resultando en una disminución global del 20% al momento del sacrificio, esto constituye un parámetro de toxicidad en modelos animales (Talbot y col. 2019). Para constatar que la disminución del peso corporal se debió exclusivamente a la QTM con Cy y no a los efectos caquéxicos asociado al tumor (Argilés y col. 2014; Talbert y col. 2019), se repitió el experimento, sin la inoculación del tumor M-406. Por 20 semanas consecutivas, a los ratones CBi se los trató con las dietas control o alta en grasa y a partir de la semana 17 de tratamiento dietético se les administró Cy en el agua de bebida. En los ratones CBi-HFD, se observó, nuevamente, una disminución del peso corporal desde el inicio del tratamiento con Cy (Fig. 4.10), confirmando que esta alteración se debe al consumo de ciclofosfamida. Asimismo, se observó toxicidad hematológica en los ratones obesos con QTM, donde el grupo CBi-HFD+Cy presentó leucopenia, no hallada en los otros grupos.

De acuerdo a los parámetros evaluados, la toxicidad farmacológica por ciclofosfamida observada, podría ser explicada principalmente por la disminución de los transportadores ABC intestinales, especialmente de P-gp, ya que se ha demostrado que Cy es un sustrato de este transportador (Patutina y col. 2012; Brabooy y col. 2013; Dimeloe y col. 2014).

En conclusión el desarrollo de obesidad y sus alteraciones metabólicas asociadas en ratones CBi altera las actividades intestinales de Mrp2 y P-gp, que provoca diferencias en la absorción de Cy y conduce a toxicidad. Además, el tratamiento quimioterápico metronómico con dosis bajas de Cy tiene menor eficacia antitumoral en los animales obesos. En consecuencia, los cambios relacionados las comorbilidades de la obesidad instan a reconsiderar los esquemas terapéuticos del tratamiento del cáncer.

CONCLUSIÓN GENERAL

En esta tesis doctoral se corroboró a la obesidad con sus alteraciones metabólicas asociadas, como una enfermedad que perjudica múltiples órganos, caracterizada fisiopatológicamente por un estado inflamatorio crónico sistémico. Entre los órganos afectados se halla el intestino delgado, que integra el aparato digestivo, constituyendo por consiguiente una puerta de entrada hacia el interior de nuestro organismo, permitiendo la ingesta de alimentos y agua. Asimismo, es un medio importante para la administración de fármacos.

En relación a su función absortiva, el intestino delgado se encuentra continuamente expuesto a xenobióticos que ingresan por vía oral, por ello presenta diferentes componentes que conforman la barrera intestinal, limitando su absorción y el potencial daño del epitelio intestinal.

Específicamente esta tesis doctoral se basó en el estudio de dos bombas de eflujo que integran la barrera bioquímica intestinal, Mrp2 y P-gp y su regulación en condiciones de obesidad generada por administración de una dieta alta en grasa a ratones. En este modelo de obesidad inducida por la dieta, se demostró la regulación negativa de Mrp2 y P-gp intestinal, al disminuir su expresión y actividad trasportadora.

De igual modo, se comprobó que estos transportadores intestinales, aunque funcionalmente cumplen el mismo rol, presentan mecanismos regulatorios diferentes, encontrándose la vía de señalización del receptor 1 de TNF-α, implicada en la regulación de P-gp pero no sería determinante para el transportador Mrp2.

Estos hallazgos evidencian la susceptibilidad que presenta el intestino delgado frente a una dieta alta en grasa, característica de la sociedad occidental, especialmente en aquellos países donde la obesidad es una epidemia.

Los pacientes obesos suelen presentar múltiples comorbilidades que requieren la administración de numerosos medicamentos para su control, la mayoría de ellos, de administración oral. Enfatizando la importancia de la barrera bioquímica intestinal como primer sitio de metabolización y excreción de muchos de estos fármacos. Es por ello, que cualquier alteración en estos transportadores intestinales implica modificaciones en la biodisponibilidad de sus sustratos farmacológicos. En este caso, la disminución de los transportadores por la dieta alta en grasa, se evaluó en el contexto del tratamiento del cáncer. Efectivamente allí se observaron efectos tóxicos generados por el tratamiento de quimioterapia metronómica con ciclofosfamida, que empeoró la calidad de vida de los animales de experimentación. En resumen, estas observaciones muestran, que en este modelo de obesidad se registraron indicadores de toxicidad, que podrían estar

relacionados con las modificaciones de la barrera bioquímica intestinal, alteración que debería tenerse en cuenta al momento del diseño y administración de un tratamiento farmacológico por vía oral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel B, Tosh DK, Durell SR, Murakami M, Vahedi S, Jacobson KA, Ambudkar SV. Evidence for the interaction of A3 adenosine receptor agonists at the Drug-Binding Site(s) of human P-glycoprotein (ABCB1). Mol Pharmacol 2019; 96:180–92.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3:745–56.

Ahima RS, Lazar MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. Mol Endocrinol. 2008; 22:1023-31. https://doi.org/10.1210/me.2007-052.

Ahmad R, Rah B, Bastola D, Dhawan P, Singh AB. Obesity-induces Organ and Tissue Specific Tight Junction Restructuring and Barrier Deregulation by Claudin Switching. Sci Rep. 2017; 7:5125. https://doi.org/10.1038/s41598-017-04989-8.

Ahmed Juvale II, Abdul Hamid AA, Abd Halim KB, Che Has AT. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease. Heliyon. 2022; 8:e09777. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09777.

Akbarali HI, Muchhala KH, Jessup DK, Cheatham S. Chemotherapy induced gastrointestinal toxicities. Adv Cancer Res. 2022; 155:131-66. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2022.02.00.

Alcala M, Calderon-Dominguez M, Serra D, Herrero L, Ramos MP, Viana M. Short-term vitamin E treatment impairs reactive oxygen species signaling required for adipose tissue expansion, resulting in fatty liver and insulin resistance in obese mice. PLoS One. 2017; 12:e0186579. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186579.

Andersen V, Svenningsen K, Knudsen LA, Hansen AK, Holmskov U, Stensballe A, Vogel U. Novel understanding of ABC transporters ABCB1/MDR/P-glycoprotein, ABCC2/MRP2, and ABCG2/BCRP in colorectal pathophysiology. World J Gastroenterol. 2015; 21:11862-76. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i41.11862.

Andrikopoulos S, Massa CM, Aston-Mourney K, Funkat A, Fam BC, Hull RL, Kahn SE, Proietto J. Differential effect of inbred mouse strain (C57BL / 6, DBA / 2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high-fat diet .J Endocrinol. 2005; 187: 45-5. https://doi.org/10.1677/joe.1.06333.

Apovian CM. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. Am J Manag Care 2016; 22:176-85.

Arana MR, Tochetti GN, Zecchinati F, Londero AS, Dominguez C, Perdomo V, Rigalli JP, Villanueva SSM, Mottino AD. Glucagon-like peptide 2 prevents down-regulation of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 and P-glycoprotein in endotoxemic rats. Toxicology 2017; 39:22–31.

Arcidiacono B, Iiritano S, Nocera A, Possidente K, Nevolo MT, Ventura V, Foti D, Chiefari E, Brunetti A. Insulin resistance and cancer risk: an overview of the pathogenetic mechanisms. Exp Diabetes Res. 2012; 2012:789174. https://doi.org/10.1155/2012/789174.

Argilés JM, Busquets S, Stemmler B, López-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. Nat Rev Cancer. 2014; 14:754-62. https://doi.org/10.1038/nrc3829.

Arnold M, Leitzmann M, Freislingc H, Braya F, Isabelle Romieud I, Renehane A, Soerjomataram I. Obesity and cancer: An update of the global impact. Cancer Epidemiology 2016; 41: 8–15.

Asociación Latinoamericana de diabetes (ALAD). Epidemiología, diagnóstico, control, prevención y trtamiento del síndrome metabólico en adultos. 2010; 18.

Azim HA Jr, de Azambuja E, Colozza M, Bines J, Piccart MJ. Long-term toxic effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer. Ann Oncol. 2011; 22:1939-47. https://doi.org/10.1093/annonc/mdq683.

Bader J, Carson M, Enos R, Velazquez K, Sougiannis A, Singh U, Becker W, Nagarkatti M, Fan D, Murphy A. High-fat diet-fed ovariectomized mice are susceptible to accelerated subcutaneous tumor growth potentially through adipose tissue inflammation, local insulin-like growth factor release, and tumor associated macrophages. Oncotarget. 2020; 11:4554-4569. https://doi.org/10.18632/oncotarget.27832.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and anassay applicable to acrylamide gels. Anal Biochem 1971; 44: 276–87.

Belliard AM, Lacour B, Farinotti R, Leroy C. Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells. J Pharm Sci. 2004; 93:1524-36. https://doi.org/10.1002/jps.20072.

Benedé-Ubieto R, Estévez-Vázquez O, Ramadori P, Cubero FJ, Nevzorova YA. Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. Diabetes Metab Syndr Obes. 2020; 13:439-50. https://doi.org/10.2147/DMSO.S234665

Benoit B, Laugerette F, Plaisancié P, Géloën A, Bodennec J, Estienne M, Pineau G, Bernalier-Donadille A, Vidal H, Michalski MC. Increasing fat content from 20 to 45 wt% in a complex diet induces lower endotoxemia in parallel with an increased number of intestinal goblet cells in mice. Nutr Res 2015; 35:346-56. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.01.005.

Berger ER, Iyengar NM. Obesity and Energy Balance Considerations in Triple-Negative Breast Cancer. Cancer J. 2021; 27:17-24: https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000502.

Bhering Martins L, Chaves de Oliveira M, Menezes-Garcia Z, Fernandes D. Paradoxical role of tumor necrosis factor on metabolic dysfunction and adipose tissue expansion in mice. Nutrition 2018; 50:1-7. https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.07.006.

Blüml S, Scheinecker C, Smolen JS, Redlich K. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. Int Immunol. 2012;24:275-81. https://doi.org/ 0.1093/intimm/dxs047.

Boese AC, Kang S. Tumor Progression of Breast Cancer during Hyperinsulinemic Obesity. Trends Mol Med. 2020; 26:354-56. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.01.014

Boron W, Boulpaep E. Medical Physiology. Elsevier España, 2017.

Bottini A, Generali D, Brizzi MP, Fox SB, Bersiga A, Bonardi S, Allevi G, Aguggini S, Bodini G, Milani M, Dionisio R, Bernardi C, Montruccoli A, Bruzzi P, Harris AL, Dogliotti L, Berruti A. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients. J Clin Oncol. 2006; 24:3623-8. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.5773.

Bousquenaud M, Fico F, Solinas G, Rüegg C, Santamaria-Martínez A. Obesity promotes the expansion of metastasis-initiating cells in breast cancer. Breast Cancer Res. 2018; 20:104. https://doi.org/ 10.1186/s13058-018-1029-4

Bowe JE, Franklin ZJ, Hauge-Evans AC, King AJ, Persaud SJ, Jones PM. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. J Endocrinol. 2014; 222:G13-25. https://doi.org/10.1530/JOE-14-0182.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72, 248-54.

Brayboy LM, Oulhen N, Witmyer J, Robins J, Carson S, Wessel GM. Multidrug-resistant transport activity protects oocytes from chemotherapeutic agents and changes during oocyte maturation. Fertil Steril. 2013; 100:1428-35. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.07.002.

Breedveld P, Zelcer N, Pluim D, Sönmezer O, Tibben MM, Beijnen JH, Schinkel AH, van Tellingen O, Borst P, Schellens JH. Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. Cancer Res. 2004; 64:5804-11. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-4062.

Büchler M, König J, Brom, M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. J. Biol. Chem. 1996; 271: 15091–98. http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.25.15091.

Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity 2007, 15: 798–808. https://doi.org/10.1038/oby.2007.608.

Burchenal JH, Robinson E, Kushida MN. The induction of resistance to 4-amino-N10-methylpteroylglutamic acid in a strain of transmitted mouse leukemia. Science. 1950; 111:116. https://doi.org/10.1126/science.111.2875.116.

Cancello G, Bagnardi V, Sangalli C, Montagna E, Dellapasqua S, Sporchia A, Iorfida M, Viale G, Barberis M, Veronesi P, Luini A, Intra M, Goldhirsch A, Colleoni M. Phase II Study With Epirubicin, Cisplatin, and Infusional Fluorouracil Followed by Weekly Paclitaxel With Metronomic Cyclophosphamide as a Preoperative Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. Clin Breast Cancer. 2015; 15:259-65. https://doi.org/10.1016/j.clbc.2015.03.002.

Carrillo MC, Kitani K, Kanai S, Sato Y, Miyasaka K, Ivy GO. (−)deprenyl increases activities of superoxide dismutase and catalase in certain brain regions in old male mice. Life Sci 1994; 54:975–81.

Catta-Preta M, Anjos Martins M, Marlowe Cunha Brunini T, Mendes-Ribeiro AC, Mandarim-de-Lacerda CA, Barbosa Aguila M. Modulation of cytokines, resistin, and distribution of adipose tissue in C57BL/6 mice by different high-fat diets. Nutrition 2012; 28: 212–19.

Cawthorn WP, Sethi JK. TNF-alpha and adipocyte biology. FEBS Lett. 2008; 582:117-31. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.051.

Chai AB, Callaghan R, Gelissen IC. Regulation of P-Glycoprotein in the Brain. Int J Mol Sci. 2022; 23:14667. https://doi.org/10.3390/ijms232314667.

Chan LSM, Lowes S, Hirts Barry. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux. Proteins limiting drug absorption and bioavailability. European Journal of Pharmaceutical Sciences 2004; 21:25–51.

Chang CJ, Lu CC, Lin CS, Martel J, Ko YF, Ojcius DM, Wu TR, Tsai YH, Yeh TS, Lu JJ, Lai HC, Young JD. Antrodia cinnamomea reduces obesity and modulates the gut microbiota in high-fat diet-fed mice. Int J Obes (Lond). 2018; 42:231-243. https://doi.org/10.1038/ijo.2017.149.

Chen C, Scott D, Hanson E, Franco J, Berryman E, Volberg M, Liu X. Impact of Mrp2 on the biliary excretion and intestinal absorption of furosemide, probenecid, and methotrexate using Eisai hyperbilirubinemic rats. Pharm Res. 2003; 20:31-7. http://dx.doi.org/10.1023/a:1022238506509

Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. Science. 2002; 296:1634-5. https://doi.org/10.1126/science.1071924

Chen Y, Wen YY, Li ZR, Luo DL, Zhang XH. The molecular mechanisms between metabolic syndrome and breast cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2016; 471:391-5. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.03

Chen Z, Tianlu T, Zhang L, Deng M, Huang C, Hu T, Jiang L, Li J. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. Cancer Letters 2015; 370: 153-64. http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010.

Cheng Q, Aleksunes LM, Manautou JE, Cherrington NJ, Scheffer GL, Yamasaki H, Slitt AL. Drug-metabolizing enzyme and transporter expression in a mouse model of diabetes and obesity. Mol Pharm. 2008; 5:77-91. https://doi.org/10.1021/mp700114j.

Christ A, Lauterbach M, Latz E. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. Immunity. 2019; 5:794-811. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.020.

Clegg D J, Gotoh K, Kemp C, Wortman MD, Benoit SC, Brown LM, D'Alessio D, Tso P, Seeley RJ, Woods SC. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. Physiol. Behav. 2011; 103, 10–6.

Collins S, Martin TL, Surwit RS, Robidoux J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. Physiol Behav. 2004; 81:243-8. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.006.

Cribb P, Perdomo V, Alonso VL, Manarin R, Barios-Payán J, Marquina-Castillo B, Tavernelli L, Hernandez-Pando R. Trypanosoma cruzi High Mobility Group B (TcHMGB) can act as aninflammatory mediator onmammaliancells.PloSNeglTropDis 2017; 11 e0005350.https://doi.org/101371.

Crouch ML, Knowels G, Stuppard R, Ericson NG, Bielas JH, Marcinek DJ, Syrjala KL. Cyclophosphamide leads to persistent deficits in physical performance and in vivo mitochondria function in a mouse model of chemotherapy late effects. PLoS One. 2017; 12:e0181086. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181086.

Cui Y, König J, Buchholz JK, Spring H, Leier I, Keppler D. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. Mol Pharmacol. 1999; 55:929-37.

Daryabor G, Kabelitz D, Kalantardoi K. An update on immune dysregulation in obesity-related insulin resistance. Scand J Immunol. 2019; 89:e12747. https://doi.org/10.1111/sji.12747.

Davis AA, Kaklamani VG. Metabolic syndrome and triple-negative breast cancer: a new paradigm. Int J Breast Cancer. 2012; 2012:809291. https://doi.org/10.1155/2012/809291.

Del Giúdice A, Pagura L, Capitani MC, Mainetti LE, Scharovsky OG, Di Masso RJ, Rico MJ, Rozados VR. Nonclassical roles for IFN-γ and IL-10 in a murine model of immunoedition. Future Sci. OA 2020. 10.2144/fsoa-2019-0108.

Della Vedova MC, Muñoz MD, Santillan LD, Plateo-Pignatari MG, Germanó MJ, Rinaldi Tosi ME, Garcia S, Gomez NN, Fornes MW, Gomez Mejiba SE, Ramirez DC. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity Resembling Most Features of Human Metabolic Syndrome. Nutr Metab Insights. 2016; 9:93-102. https://doi.org/10.4137/NMI.S32907.

Dellapasqua S, Mazza M, Rosa D, Ghisini R, Scarano E, Torrisi R, Maisonneuve P, Viale G, Cassano E, Veronesi P, Luini A, Goldhirsch A, Colleoni M. Pegylated liposomal doxorubicin in combination with low-

dose metronomic cyclophosphamide as preoperative treatment for patients with locally advanced breast cancer. Breast. 2011; 20:319-23. https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.02.014.

Dhawan D, Sharma S. Abdominal Obesity, Adipokines and Non-communicable Diseases. J Steroid Biochem Mol Biol. 2020; 203:105737. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105737.

Di Masso R, Abdala S, Sanchez S, Font M. Respuesta a la selección divergente por conformación corporal en el ratón. Mendeliana 1991; 9:79–92.

Di Tommaso N, Gasbarrini A, Ponziani FR. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. Int. J. Environ. Res. Public Health 2021; 18, 12836. https://doi.org /10.3390/ijerph182312836.

Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RPJ. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. Gut 2003; 52:1788–95.

Dietze EC, Chavez TA, Seewaldt VL. Obesity and Triple-Negative Breast Cancer: Disparities, Controversies, and Biology. Am J Pathol. 2018; 188:280-90. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.09.018

Dimeloe S, Frick C, Fischer M, Gubser PM, Razik L, Bantug GR, Ravon M, Langenkamp A, Hess C. Human regulatory T cells lack the cyclophosphamide-extruding transporter ABCB1 and are more susceptible to cyclophosphamide-induced apoptosis. Eur J Immunol. 2014; 44:3614-20. https://doi.org/10.1002/eji.201444879.

Doherty MM, Pang KS. First-pass effect: significance of the intestine for absorption and metabolism. Drug Chem Toxicol. 1997; 20:329-44. https://doi.org/10.3109/01480549709003891.

Domínguez CJ, Tocchetti GN, Rigalli JP, Mottino AD. Acute regulation of apical ABC transporters in the gut. Potential influence on drug bioavailability. Pharmacol Res. 2021; 163:105251. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105251.

Donahue JL, Okpodu CM, Cramer CL, Grabau EA, Alscher RG.. Responses of antioxidants to Paraquat in pea leaves (relationships to resistance). Plant Physiol. 1997; 113:249–57.

Drouet M, Dubuquoy L, Desreumaux P, Bertin B. Visceral fat and gut inflammation. Nutrition. 2012; 28:113-7. https://doi.org/10.1016/j.nut.2011.09.009.

Drozdzik M, Szelag-Pieniek S, Post M, Zeair S, Wrzesinski M, Kurzawski M, Prieto J, Oswald S. Protein Abundance of Hepatic Drug Transporters in Patients With Different Forms of Liver Damage. Clin Pharmacol Ther. 2020; 107:1138-48. https://doi.org/10.1002/cpt.1717.

Dubin IN, Johnson FB. 1954. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. Medicine (Baltimore) 1954; 33: 155–97.

Durmus S, Hendrikx JJ, Schinkel AH. Apical ABC transporters and cancer chemotherapeutic drug disposition. Adv Cancer Res. 2015;125:1-41. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2014.10.001

Ecker B.L, Lee JY, Sterner, CJ, Solomon, AC, Pant DK, Shen F, Peraza J., Vaught L, Mahendra S, Belka GK, Pan, TC, Schmitz KH, Chodosh LA. Impact of obesity on breast cancer recurrence and minimal residual disease. Breast Cancer Research 2019, 21. https://doi.org/10.1186/s13058-018-1087-7.

Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. Adv Exp Med Biol. 2017; 960:1-17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_1.

Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A, Rönnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). Inflamm Bowel Dis. 2007; 13:291-7. https://doi.org/10.1002/ibd.20030.

Estudante M, Morais J, Soveral G, Benet L Intestinal drug transporters: an overview. AdvDrugDelivRev 2013; 65:1340–56.

Evangelista-Silva PH, Pereira Prates R, Santos Moreira Leite J, Gomes Moreno L, Goulart-Silva F, Esteves EA. Intestinal GLUT5 and FAT/CD36 transporters and blood glucose are reduced by a carotenoid/MUFA-rich oil in high-fat fed mice. Life Sci 2021; 279:119672. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119672.

Falcato Vecina J, Gabarra Oliveira A, Gomes Araujo T, Baggio SR, Okuda Torello C, Abdalla Saad MJ, Souza Queiroz ML. Chlorella modulates insulin signaling pathway and prevents high-fat diet-induced insulin resistance in mice. Life Sciences 2014; 95: 45–52. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.020.

Fang H, Judd RL. Adiponectin regulation and function. Compr Physiol. 2018; 8:1031-63. https://doi.org/10.1002/cphy.c170046.

Fardel O, Jigorel E, Le Vee M, Payen L. Physiological, pharmacological and clinical features of the multidrug resistance protein 2. Biomed Pharmacother. 2005; 59:104-14. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.01.005.

Feng Y, Teitelbaum DH. Tumour necrosis factor--induced loss of intestinal barrier function requires TNFR1 and TNFR2 signalling in a mouse model of total parenteral nutrition. J Physiol. 2013; 1:3709-23. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.253518.

Findlay M, von Minckwitz G, Wardley A. Effective oral chemotherapy for breast cancer: pillars of strength. Ann Oncol. 2008; 19:212-22. https://doi.org/10.1093/annonc/mdm285.

Freitas Carvalho MM, Lage NN, de Souza Paulino AH, Pereira RR, de Almeida LT, da Silva TF, de Brito Magalhães CL, de Lima WG, Silva ME, Pedrosa ML, da Costa Guerra JF. Effects of açai on oxidative stress, ER stress, and inflammation-related parameters in mice with high fat diet-fed induced NAFLD. Sci Rep. 2019; 9:8107. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44563-y.

Funes A, Saez Lancellotti TE, Santillan LD, Della Vedova MC, Monclus MA, Cabrillana ME, Gomez Mejiba SE, Ramirez DC, Fornes MW. A chronic high-fat diet causes sperm head alterations in C57BL/6J mice. Heliyon. 2019; 5:e02868. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e0286.

Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. The metabolic syndrome--from insulin resistance to obesity and diabetes. Med Clin North Am. 2011; 95:855-73. https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.06.001.

Geneser F. Histología. Sobre bases biomoleculares. Editorial Panamericana, Argentina, 3ra edición, 2007.

Godsland IF. Insulin resistance and hyperinsulinaemia in the development and progression of cancer. Clin Sci (Lond). 2009; 118:315-32. https://doi.org 10.1042/CS2009039.

González-Quilen C, Rodríguez-Gallego E, Beltrán-Debón R, Pinent M, Ardévol A, Blay MT, Terra X. Health-promoting properties of proanthocyanidins for intestinal dysfunction. Nutrients 2020, 12, 130; https://doi.org/10.3390/nu12010130.

Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. Physiol Behav. 2008; 94:206-18. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.10.010.

Gregg EW, Shaw JE. Global Health Effects of Overweight and Obesity. N Engl J Med. 2017; 377:80-81. https://doi.org/10.1056/NEJMe1706095.

Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine.Anal Biochem 1980; 106:207–12.

Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Circulation. 2004; 109:433-8. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6.

Guh DP, Zhang W, Birmingham CL, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH.The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. BMC Public Health 2009; 9:88.

Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. World J Gastroenterol. 2012; 18:6036-59. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i42.6036.

Guo M, Bughio S, Sun Y, Zhang Y, Dong L, Dai X, Wang L. Age-Related P glycoprotein expression in the intestine and affecting the pharmacokinetics of orally administered enrofloxacin in broilers. PLoS ONE 2013; 8: e74150. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074150.

Gurley BJ, Swain A, Williams DK, Barone G, Battu SK. Gauging the clinical significance of P-glycoprotein-mediated herb-drug interactions: comparative effects of St. John's wort, Echinacea, clarithromycin, and rifampin on digoxin pharmacokinetics. Mol Nutr Food Res. 2008; 52:772-9.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica. Editorial Elsevier Inc ,España. 12edición, 2011.

Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Chemotherapeutic drugs, long the mainstay of cancer treatment, cause DNA damage and disrupt DNA repli-cation in proliferating cells. http://cancertrials.nci. 2000

Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. The Journal of Clinical Investigation 2000, 105:1045–47.

Hanley MJ, Abernethy DR, Greenblatt DJ. Effect of obesity on the pharmacokinetics of drugs in humans. Clin Pharmacokinet. 2010; 49:71-87. http://doi.org/10.2165/11318100-000000000-00000.

Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. Nutr Res Rev. 2010; 23:270-99. https://doi.org/10.1017/S0954422410000168.

Hillers LE, D'Amato JV, Chamberlin T, Paderta G, Arendt LM. Obesity-Activated Adipose-Derived Stromal Cells Promote Breast Cancer Growth and Invasion. Neoplasia. 2018; 20:1161-74. https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.09.004.

Hinrichsen LI, Di Masso R.J. Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. BAG - Journal of Basic and Applied Genetics, 2010; 21(2).

Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. F1000Res. 2019;8:F1000 Faculty Rev-111. https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1

Hooijberg JH, Peters GJ, Assaraf YG, Kathmann I, Priest DG, Bunni MA, Veerman AJ, Scheffer GL, Kaspers GJ, Jansen G. The role of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2 and MRP3 in cellular folate homeostasis. Biochem Pharmacol. 2003; 65:765-71. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01615-5.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest. 1995; 95:2409-15.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993; 259:87-91.

Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. Nature 2006; 444:860–67.

Hou JK, Abraham B, El-Serag H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. Am J Gastroenterol 2011; 106:563–73.

Huang M, Liu H, Zhu L, Li X, Li J, Yang S, Liu D, Song X, Yokota H, Zhang P. Mechanical loading attenuates breast cancer-associated bone metastasis in obese mice by regulating the bone marrow microenvironment. J Cell Physiol. 2021; 236:6391-6406. https://doi.org/10.1002/jcp.30314.

Hulot JS, Villard E, Maguy A, Morel V, Mir L, Tostivint I, William-Faltaos D, Fernandez C, Hatem S, Deray G, Komajda M, Leblond V, Lechat P. A mutation in the drug transporter gene ABCC2 associated with impaired methotrexate elimination. Pharmacogenet Genomics. 2005; 15:277-85. https://doi.org/10.1097/01213011-200505000-00002

Hunter J, Hirst BH, Simmons NL. Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. Pharm Res. 1993;10:743-9. https://doi.org/ 10.1023/a: 1018972102702.

Hunter J, Jepson MA, Tsuruo T, Simmons NL, Hirst BH. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. J Biol Chem. 1993; 268:14991-7

Inagaki E, Natori Y, Ohgishi Y, Hayashi H, Suzuki Y. Segmental difference of mucosal damage along the length of a mouse small intestine in an Ussing chamber. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2005; 51:406-12. https://doi.org/10.3177/jnsv.51.406.

Iqbal M, Ho HL, Petropoulos S, Moisiadis VG, Gibb W, Matthews SG. Pro-inflammatory cytokine regulation of P-glycoprotein in the developing blood-brain barrier. PLoS One. 2012; 7:e43022. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043022

Ishikawa T, Müller M, Klünemann C, Schaub T, Keppler D. ATP-dependent primary across liver canalicular active transport membrane of cysteinyl leukotrienes. J. Biol. Chem. 1990; 265: 19279–86

Iyengar NM, Gucalp A, Dannenberg AJ, Hudis CA. Obesity and Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation. J Clin Oncol. 2016; 34:4270-76. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.4283.

Jansen PL, Peters WH, Lamers WH. Hereditary chronic conjugated hyperbilirubinemia in mutant rats caused by defective hepatic anion transport. Hepatology 1985, 5:573–579. http://dx.doi.org/10.1002/hep.1840050408.

Jedlitschky G, Hoffmann U, Kroemer HK. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006; 2:351-66. https://doi.org/10.1517/17425255.2.3.351.

Johnson AM, Loftus EV. Obesity in inflammatory bowel disease: A review of its role in the pathogenesis, natural history, and treatment of IBD. Saudi J Gastroenterol. 2021; 27:183-90. https://doi.org/10.4103/sjg.sjg_30_21.

Jouan E, Vée ML, Mayati A, Denizot C, Parmentier Y, Fardel O. Evaluation of P-Glycoprotein inhibitory potential using a Rhodamine 123 accumulation assay. Pharmaceutics 2016; 8, 12; https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8020012.

Junqueira LC, Mescher AL, Basic Histology, Text & Atlas , editorial McGraw-Hill, Education Estados Unidos, 16ª edición, 2021.
Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin–Johnson syndrome. Hepatology 1996; 23: 1061–66. http://dx.doi.org/10.1053/jhep.1996.v23.pm0008621134.

Kawai T, Autieri MV, Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. Am J Physiol Cell Physiol. 2021; 320:C375-C391. http://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020.

Keely S, Rullay A, Wilson C, Carmichael A, Carrington S, Corfield A, Haddleton DM, Brayden DJ. In vitro and ex vivo intestinal tissue models to measure mucoadhesion of poly (methacrylate) and N-trimethylated Chitosan Polymers. Pharm Res. 2005; 22:38-49.

Keppler D, König J. Hepatic canalicular membrane 5: expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. FASEB J. 1997; 11: 509–16.

Kerbel RS, Klement G, Pritchard KI, Kamen B. Continuous low-dose anti-angiogenic/ metronomic chemotherapy: from the research laboratory into the oncology clinic. Ann Oncol. 2002; 13:12-5. https://doi.org/10.1093/annonc/mdf093.

Kessler M, Acuto O, Storelli C, Murer H, Müller M, Semenza G. A modified procedure for the rapid preparation of efficiently transporting vesicles from small intestinal brush border membranes.Their use in investigating some properties of dglucose and choline transport systems.Biochim Biophys Acta 1978; 506, 136-54.

Kiess W, Galler A, Reich A, Müller G, Kapellen T, Deutscher J, Raile K, Kratzsch J. Clinical aspects of obesity in childhood and adolescence. Obes Rev. 2001; 2:29-36. https://doi.org/10.1046/j.1467-789x.2001.00017.x.

Kim DS, Scherer PE. Obesity, Diabetes, and Increased Cancer Progression. Diabetes Metab J. 2021; 45:799-812. https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0077.

Kim DS, Scherer PE. Obesity, diabetes, and increased cancer progression. Diabetes Metab J 2021; 45:799-812. https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0077.

Kool M, de Haas M, Scheffer GL, Scheper RJ, van Eijk MJ, Juijn JA, Baas F, Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. Cancer Res. 1997;57:3537-47.

Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. Cell. 1988; 53:45-53. https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90486-2.

Kristiansen MN, Veidal SS, Rigbolt KT, Tølbøl KS, Roth JD, Jelsing J, Vrang N, Feigh M. Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. World J Hepatol. 2016;8:673-84. https://doi.org 10.4254/wjh.v8.i16.673.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head ofbacteriophage T4.Nature 1970; 227, 680-85.

Lambertucci F, Arboatti A, Sedlmeier MG, Motiño O, Alvarez ML, Ceballos MP, Villar SR, Roggero E, Monti JA, Pisani G, Quiroga AD, Martín-Sanz P, Carnovale CE, Francés DE, Ronco MT. Disruption of tumor necrosis factor alpha receptor 1 signaling accelerates NAFLD progression in mice upon a high-fat diet. J NutrBiochem.2018; 58:17-27. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.013.

Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. Biochim Biophys Acta. 2014; 1842:446-62. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.017.

Lee JY, Mori C, Tokumoto M, Satoh M. Time-dependent changes in the gene expression levels in the mouse kidney by long-term exposure to cadmium. BPB Reports 2021; 4:69-73. https://doi.org/10.1248/bpbreports.4.2_69

Liang H, Yin B, Zhang H, Zhang S, Zeng Q, Wang J, Jiang X, Yuan L, Wang CY, Li Z. Blockade of tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1-mediated TNF-alpha signaling protected Wistar rats from diet-induced obesity and insulin resistance Endocrinology. 2008; 149:2943-51. https://doi.org/10.1210/en.2007-0978.

Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J, Lage H. Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. J Invest Dermatol. 2003; 12:172-6. https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12313.x.

Lin X, Li H.Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics.Front. Endocrinol. 2021; 12:706978. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978.

Lissoni P, Brivio F, Fumagalli L, Messina G, Meregalli S, Porro G, Rovelli F, Vigorè L, Tisi E, D'Amico G. Effects of the conventional antitumor therapies surgery, chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy on regulatory T lymphocytes in cancer patients. Anticancer Res. 2009; 29:1847-52.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25:402–8

Londero AS, Arana MR, Perdomo VG, Tocchetti GN, Zecchinati F, Ghanem CI, Ruiz ML, Rigalli JP, Mottino AD, García F, Villanueva SSM. Intestinal multidrug resistance-associated protein 2 is downregulated in fructose-fed rats. J NutrBiochem 2017; 40: 178-86. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.11.002.

Long K, Suresh K. Pulmonary toxicity of systemic lung cancer therapy. Respirology. 2020; 25:72-79. https://doi.org/10.1111/resp.13915.

Lowenthal RM, Eaton K. Toxicity of chemotherapy. Hematol Oncol Clin North Am. 1996; 10:967-90. https://doi.org/10.1016/s0889-8588(05)70378-6.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J BiolChem 1951; 193: 265-75.

Lu X, Dong Y, Jian Z, Li Q, Gong L, Tang L, Zhou X, Liu M. systematic investigation of the effects of long-term administration of a high-fat diet on drug transporters in the mouse liver, kidney and intestine. Curr Drug Metab. 2019; 20:742-755. https://doi.org/10.2174/1389200220666190902125435.

Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. Diabetes 2007; 56:16–23.

Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. Curr Protoc Pharmacol. 2012; 61. https://doi.org 10.1002/0471141755.ph0561s58.

Mainetti LE, Rico MJ, Fernández-Zenobi MV, Perroud HA, Roggero EA, Rozados VR, Scharovsky OG. Therapeutic efficacy of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin on murine mammary adenocarcinomas. Annals of Oncology, 2013; 24:2310–16. https://doi.org/10.1093/annonc/mdt164.

Mainetti LE, Rico MJ, Kaufman CD, Grillo MC, Guercetti J, Baglioni MV, Del Giúdice A, Capitani MC, Fusini M, Viviana Rosa Rozados VR, Scharovsky OG. Losartan improves the therapeutic effect of metronomic cyclophosphamide in triple negative mammary cancer models. Oncotarget 2020; 11: 3048-3060.

Mainetti LE, Rozados VR, Rossa A, Bonfil RD, Scharovsky OG. Antitumoral and antimetastatic effects of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide combined with celecoxib on murine mammary adenocarcinomas. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2011; 137:151–63. https://doi.org/10.1007/s00432-010-0869-9.

Maiti B, Kundranda MN, Spiro TP, Daw HA. The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res Treat. 2010; 12:479-83. https://doi.org/10.1007/s10549-009-0591-y.

Malik PS, Raina V, André N. Metronomics as maintenance treatment in oncology: time for chemo-switch. Front Oncol. 2014; 4:76. https://doi.org /10.3389/fonc.2014.0007.

Marinho R, Pereira de Moura L, Almeida Rodrigues B, Santos Souza Pauli L, Sanchez Ramos da Silva A, Cristina ChiarreottoRopelle E, Teodoro de Souza C, Esper Corrêa Cintra D, Rochete Ropelle E, Rodrigo Pauli J. Effects of different intensities of physical exercise on insulin sensitivity and proteinkinase B/Akt activity in skeletal muscle of obese mice. Einstein (Sao Paulo) 2014; 12:82-9. https://doi.org/10.1590/S1679-45082014AO2881

Materna V, Liedert B, Thomale J, Lage H. Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. Int J Cancer. 2005;115:393-402. https://doi.org/10.1002/ijc.2089.

Matos Ferreira AV, Menezes-Garcia Z, Viana JB, Mario EG, Botion LM. Distinct metabolic pathways trigger adipocyte fat accumulation induced by high-carbohydrate and high-fat diets. Nutrition. 2014; 30:1138-43.

Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will? Fertil Steril. 2017; 107:833-39. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.10.

Milanesi E, Dobre M, Manuc TE, Becheanu G, Tieranu CG, Ionescu EM, Manuc M. Mucosal gene expression changes induced by anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease patients. Drug Dev Res. 2019; 80:831-36. https://doi.org/10.1002/ddr.21566.

Miller DS, Bauer B, Hartz AM. Modulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier: opportunities to improve central nervous system pharmacotherapy. Pharmacol Rev. 2008; 60:196-209. https://doi.org/10.1124/pr.107.07109.

Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. 4° Encuesta Nacional de factores de riesgo. Dirección Nacional de promoción de la salud y control de enfermedades crónicas no transmisibles. 2019.

Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. Guía de práctica clínica nacional sobre diagnóstico y tratamiento de la obesidad en adultos para todos los niveles de atención. 2013.

Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. Riesgo Cardiovascular Global: obesidad, programa de capacitación “Terapéutica Racional en Atención Primaria de la Salud”(TRAPS). 2018; 7.

Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, Turner N. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. Diabetologia. 2013;56:1129-39. https://doi.org//10.1007/s00125-013-2846-8.

Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. Overview of Breast Cancer Therapy. PET Clin. 2018; 13:339-54. https://doi.org/10.1016/j.cpet.2018.02.006.

Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M. Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. J Pharmacol Exp Ther 2000; 293:717-23.

Moura E Dias M, Dos Reis SA, da Conceição LL, Sediyama CMNO, Pereira SS, de Oliveira LL, Gouveia Peluzio MDC, Martinez JA, Milagro FI. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. Diabetol Metab Syndr. 2021; 13:32. https://doi.org/10.1186/s13098-021-00647-2.

Muehler A, Slizgi JR, Kohlhof H, Groeppel M, Peelen E, Vitt V. Clinical relevance of intestinal barrier dysfunction in common gastrointestinal diseases. World J Gastrointest Pathophysiol 2020; 11: 114-130.

Müller P, Baldauf CK, Haage TR, Charakopoulos E, Böttcher M, Bhuria V, Mougiakakos D, Schraven B, Fischer T. Genetic Knock-out of TNFR1 and TNFR2 in a JAK2-V617F Polycythemia Vera Mouse Model. Hemasphere. 2022; 6:e717. https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000717.

Murakami T. Absorption sites of orally administered drugs in the small intestine. Expert Opin Drug Discov. 2017; 12:1219-32. https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1378176.

Nandini D, Jennifer A, Pradip D. Therapeutic Strategies for Metastatic Triple-Negative Breast Cancers: From Negative to Positive. Pharmaceuticals (Basel). 2021; 14:455. https://doi.org/10.3390/ph14050455.

Nasr KE, Osman MA, Elkady MS, Ellithy MA. Metronomic methotrexate and cyclophosphamide after carboplatin included adjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer: a phase III study. Ann Transl Med. 2015; 3:284. https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.1.

Nawa A, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. Inducible nitric oxide synthase-mediated decrease of intestinal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic conditions. Life Sciences 2010; 86: 402–9. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.01.009.

Novak A, Godoy YC, Martinez SA, Ghanem C, Celuch SM. Fructose-induced metabolic syndrome decreases proteinexpression and activity of intestinal P-glycoprotein. Nutrition 2015; 871–76.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979; 95:351-58.

Ohkura T, Yoshimura T, Fujisawa M, Ohara T, Marutani R, Usami K, Matsukawa A. Spred2 regulates high fat diet-induced adipose tissue inflammation, and metabolic abnormalities in mice. Front. Immunol 2019; 10-17.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola (FIDA), Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF),l Programa Mundial de Alimentos (PMA) y Organización Panamericana de la Salud (OPS). Panorama regional de la seguridad alimentaria y nutricional - América Latina y el Caribe 2022: hacia una mejor asequibilidad de las dietas saludables. 2023. https://doi.org/10.4060/cc3859esLas.

Organización Mundial de la Salud Noncommunicable diseases progress monitor, 2020.

Organización Mundial de la Salud. European regional obesity report, 2022.

Organización Mundial de la Salud. Obesity: preventing and managing the global epidemic. 2000, World Health Organization Technical Report Series 2000; 894.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat Rev Immunol. 2011; 11:85-97. https://doi.org/10.1038/nri2921.

Pamir N, McMillen TS, Kaiyala KJ, Schwartz MW, LeBoeuf RC. Receptors for tumor necrosis factor-alpha play a protective role against obesity and alter adipose tissue macrophage status. Endocrinology. 2009; 150:4124-34. https://doi.org/10.1210/en.2009-0137.

Pandey M, Tuncman G, Hotamisligil GS, Samad F. Divergent roles for p55 and p75 TNF-alpha receptors in the induction of plasminogen activator inhibitor-1. Am J Pathol. 2003; 162:933-41. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63888-6.

Parida S, Siddharth S, Sharma D. Adiponectin, Obesity, and Cancer: Clash of the Bigwigs in Health and Disease. Int J Mol Sci. 2019; 20:2519. https://doi.org/10.3390/ijms20102519.

Patutina OA, Mironova NL, Logashenko EB, Popova NA, Nikolin VP, Vasil'ev GV, Kaledin VI, Zenkova MA, Vlasov VV. Cyclophosphamide metabolite inducing apoptosis in RLS mouse lymphosarcoma cells is a substrate for P-glycoprotein. Bull Exp Biol Med. 2012; 152:348-52. https://doi.org/10.1007/s10517-012-1525-y.

Payen L, Sparfel L, Courtois A, Vernhet L, Guillouzo A, Fardel O. The drug efflux pump MRP2: regulation of expression in physiopathological situations and by endogenous and exogenous compounds. Cell Biol Toxicol. 2002; 18:221-33. https://doi.org /10.1023/a:1016020626941

Perroud HA, Alasino CM, Rico MJ, Mainetti L E, Queralt F, Pezzotto SM, Rozados VR, Scharovsky OG. Metastatic breast cancer patients treated with low-dose metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib: Clinical outcomes and biomarkers of response. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2016; 77:365–74. https://doi.org/10.1007/s00280-015-2947-9.

Perroud HA, Rico, MJ, Alasino CM, Queralt F, Mainetti LE, Pezzotto SM, Rozados VR, Scharovsky OG. Safety and therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide and celecoxib in advanced breast cancer patients. Future Oncology. 2013; 9:451–62. https://doi.org/10.2217/fon.12.196.

Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. J Immunol. 1998 ;160(2):943-52.

Petro AE, Cotter J, Cooper DA, Peters JC, Surwit SJ, Surwit RS. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. Metabolism. 2004; 53 :454-7. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2003.11.018.

Petry V, Gagliato DM, Leal AI, Arai RJ, Longo E, Andrade F, Ricci MD, Piato JR, Barroso-Sousa R, Hoff PM, Mano MS. Metronomic chemotherapy in the neoadjuvant setting: results of two parallel feasibility trials (TraQme and TAME) in patients with HER2+ and HER2- locally advanced breast cancer. Braz J Med Biol Res. 2015; 48:479-85. https://doi.org/10.1590/1414-431X20144354.

Poller B, Drewe J, Krähenbühl S, Huwyler J, Gutmann H. Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. Cell Mol Neurobiol. 2010; 30:63-70. https://doi.org/10.1007/s10571-009-9431-1.

Preguiça I, Alves A, Nunes S, Fernandes R, Gomes P, Viana SD, Reis F. Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders-A guide to a translational perspective. Obes Rev. 2020; 12:e13081. https://doi.org/10.1111/obr.13081.

Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr 1997; 127:838-41. https://doi.org/10.1093/jn/127.5.838S.

Renehan AG, Soerjomataram I, Leitzmann MF. Interpreting the epidemiological evidence linking obesity and cancer: A framework for population-attributable risk estimations in Europe. Eur J Cancer. 2010; 46:2581-92. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.07.05.

Reyes-Farias M, Fos-Domenech J, Serra D, Herrero L, Sánchez-Infantes D. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging. Biochem Pharmacol. 2021; 192:114723. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.11472.

Rico M, Baglioni M, Bondarenko M, Laluce NC, Rozados V, André N, Carré M, Scharovsky OG, Menacho Márquez M. Metformin and propranolol combination prevents cancer progression and metastasis in different breast cancer models. Oncotarget. 2017; 8:2874-89. https://doi.org/10 10.18632/oncotarget.1376.

Rico MJ, Perroud HA, Mainetti LE, Rozados VR, Scharovsky OG. Comparative effectiveness of two metronomic chemotherapy schedules-our experience in the preclinical field. Cancer Investigation, 2014; 32: 92–98. https://doi.org/10.3109/07357907.2013.877480.

Robey RB, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer. Nat Rev Cancer 2018; 18(7): 452–464. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0005-8.

Rocha-Pereira C, Silva V, Costa1 VM, Silva R, Garcia J, Gonçalves-Monteiro S, Duarte-Araújo M, Santos-Silva A, Coimbra S, Dinis-Oliveira RJ, Lopes C, Silva P, Long S, Sousa E, Bastos MdeL, Remião F. Histological and toxicological evaluation, in rat, of a P-glycoprotein inducer and activator: 1-(propan-2-ylamino)-4-propoxy-9 H-thioxanthen-9-one (TX5). EXCLI J. 2019; 27, 18:697-722. https://doi.org/10.17179/excli2019-1675.

Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S. Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: a review. Adv Nutr 2020; 11:77–91. https://doi.org/10.1093/advances/nmz061.

Rozados VR, Mainetti LE, Rico MJ, Zacarías Fluck MF, Matar P, Scharovsky OG. The immune response and the therapeutic effect of metronomic chemotherapy with cyclophosphamide. Oncol Res. 2010; 18:601-5. https://doi.org 10.3727/096504010x12777678141662.

Rozados VR, Sánchez AM, Gervasoni SI, Berra HH, Matar P, Graciela Scharovsky O. Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity. Ann Oncol. 2004; 15:1543-50.https://doi.org/10.3727/10.1093/annonc/mdh384.

Ruiz Liard A, Latarjet M. Anatomía Humana. Editorial Panaméricana, Argentina, 4ta edición, 2007.

Sakers A, De Siqueira MK, Seale P, Villanueva CJ. Adipose-tissue plasticity in health and disease. Cell. 2022; 185:419-46. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.016.

Samuels BL, Hollis DR, Rosner GL, Trump DL, Shapiro CL, Vogelzang NJ, Schilsky RL. Modulation of vinblastine resistance in metastatic renal cell carcinoma with cyclosporine A or tamoxifen: a cancer and leukemia group B study. Clin Cancer Res. 1997; 3:1977-84.

Sánchez Gómez JM, Betancur Mejía MI, Cardona-Arias JA. Revisión sistemática de evaluaciones económicas en salud parael tratamiento de la obesidad en adultos, 2009-2019. Rev Panam Salud Publica. 2020;44:e158. https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.158.

Sawamoto K, Huong TT, Sugimoto N, Mizutani Y, Sai Y, Miyamoto K. Mechanisms of lower maintenance dose of tacrolimus in obese patients. Drug Metab Pharmacokinet 2014; 29: 341–7.

Scharovsky OG, Rico MJ, Mainetti LE, Perroud HA, Rozados VR. Achievements and challenges in the use of metronomics for the treatment of breast cancer. Biochem Pharmacol. 2020; 175:113909. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113909.

Schiepatti A, Cincotta M, Biagi F, Sanders DS. Enteropathies with villous atrophy but negative coeliac serology in adults: current issues. BMJ Open Gastroenterol. 2021; 8:e000630. https://doi.org/10.1136/bmjgast-2021-000630.

Scully T, Firth SM, Scott CD, de Silva HC, Pintar JE, Chan-Ling T, Twigg SM, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-3 links obesity and breast cancer progression. Oncotarget. 2016; 7:55491-55505. https://doi.org 10.18632/oncotarget.10675.

Silva CB, Fassini PG, Ramalho LNZ, da Conceição EC, Zordan AJCM, Carlos D, Suen VMM. Curcuma supplementation in high-fat-fed C57BL/6 mice: no beneficial effect on lipid and glucose profile or prevention of weight gain. Eur J Nutr. 2020;59:93-102.https://doi.org 10.1007/s00394-018-1887-7.

Singh S, Dulai PS, Zarrinpar A, Ramamoorthy S, Sandborn WJ. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2017; 14:110-21. https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.181.

Soriano J, Lima M, González J, Batista Albuerne N, López Soto MV, Rodríguez Menéndez M, Loys Fernández JL, Montejo Viamontes N. Quimioterapia metronómica con ciclofosfamida y metotrexato en pacientes con cáncer de mama metastásico en progresión. Revista Cubana de Medicina, 2009; 48(2).

Speakman JR. Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. Int J Obes (Lond). 2019; 43:1491-92. https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7.

Stage TB, Hu S, Sparreboom A, Kroetz DL. Role for Drug Transporters in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. Clin Transl Sci. 2021; 14:460-67. https://doi.org/10.1111/cts.12915.

Steck SE, Murphy EA. Dietary patterns and cancer risk. Nat Rev Cancer. 2020; 20:125-38. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0227-4.

Sugioka N, Haraya K, Fukushima K, Ito Y, Takada K. Effects of obesity induced by high-fat diet on the pharmacokinetics of nelfinavir, a HIVprotease inhibitor, in laboratory rats. Biopharm Drug Dispos 2009; 30:532–41.

Talbert EE, Cuitiño MC, Ladner KJ, Rajasekerea PV, Siebert M, Shakya R, Leone GW, Ostrowski MC, Paleo B, Weisleder N, Reiser PJ, Webb A, Timmers CD, Eiferman DS, Evans DC, Dillhoff ME, Schmidt CR, Guttridge DC. Modeling Human Cancer-induced Cachexia. Cell Rep. 2019; 28:1612-22.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.016.

Talbot SR, Biernot S, Bleich A, van Dijk RM, Ernst L, Häger C, Helgers SOA, Koegel B, Koska I, Kuhla A, Miljanovic N, Müller-Graff FT, Schwabe K, Tolba R, Vollmar B, Weegh N, Wölk T, Wolf F, Wree A, Zieglowski L, Potschka H, Zechner D. Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. Lab Anim. 2020; 54:99-110. https://doi.org/10.1177/0023677219883319.

Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. Cancer Res. 1996;56:4124-9.

Tao G, Huang J, Moorthy B, Wang C, Hu M, Gao S, Ghose R. Potential role of drug metabolizing enzymes in chemotherapy-induced gastrointestinal toxicity and hepatotoxicity. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2020; 16:1109-24. https://doi.org/10.1080/17425255.2020.181570.

Théron D, Barraud de Lagerie S, Tardivel S, Pélerin H, Demeuse P, Mercier C, Mabondzo A, Farinotti R, Lacour B, Roux F, Gimenez F. Influence of tumor necrosis factor-alpha on the expression and function of P-glycoprotein in an immortalised rat brain capillary endothelial cell line, GPNT. Biochem Pharmacol. 2003; 66:579-87. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00340-x.

Tinoush B, Shirdel I, Wink M. Phytochemicals: Potential Lead Molecules for MDR Reversal. Front Pharmacol. 2020; 11:832. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00832.

Tocchetti GN, Rigalli JP, Arana MR, Villanueva SSM, Mottino AD. Modulation of expression and activity of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 by xenobióticos. Toxicology and Applied Pharmacology 2016, 30: 45–57.

Uddin ME, Moseley A, Hu S, Sparreboom A. Contribution of membrane transporters to chemotherapy-induced cardiotoxicity. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2022; 130:36-47. https://doi.org/10.1111/bcpt.13635

Vauthier V, Housset C, Falguières T. Targeted pharmacotherapies for defective ABC transporters. Biochem Pharmacol 2017 15; 136:1-11. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.02.020.

Velazquez FN, Viscardi V, Montemage J, Zhang L, Trocchia C, Delamont MM, Ahmad R, Hannun YA, Obeid LM, Snider AJ. A Milk-Fat Based Diet Increases Metastasis in the MMTV-PyMT Mouse Model of Breast Cancer. Nutrients. 2021; 13:2431. https://doi.org/10.3390/nu13072431.

Villanacci V, Vanoli A, Leoncini G, Arpa G, Salviato T, Bonetti LR, Baronchelli C, Saragoni L, Parente P. Celiac disease: histology-differential diagnosis-complications. A practical approach. Pathologica. 2020;112:186-96.https://doi.org/10.32074/1591-951X-157.

Villanueva SSM, Perdomo VG, García F. Función de la barrera intestinal. Implicancia en la enfermedad celíaca. Rev Fac Cs Méd UNRV 2020; 1: 9-22.

Villanueva SSM, Perdomo VG, Ruiz ML, Rigalli JP, Arias A, Luquita MG, Vore M, Catania VA, Mottino AD. Effect of Glucagon-Like Peptide 2 on Hepatic, Renal, and Intestinal Disposition of 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene. Drug Metab Dispos 2012, 40:1252–58.

Vona-Davis L, Rose DP, Hazard H, Howard-McNatt M, Adkins F, Partin J, Hobbs G. Triple-negative breast cancer and obesity in a rural Appalachian population. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17:3319-24. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0544.

Walther W, Kobelt D, Bauer L, Aumann J, Stein Ulrike Chemosensitization by diverging modulation by short-term and long-term TNF-α action on ABCB1 expression and NF-κB signaling in colon cancer Int J Oncol. 2015; 47:2276-85. . https://doi: 10.3892/ijo.2015.3189.

Wandrer F, Liebig S, Marhenke S, Vogel A, John K, Manns MP, Teufel A, Itzel T, Longerich T, Maier O, Fischer R, Kontermann RE, Pfizenmaier K, Schulze-Osthoff K, Bantel H.TNF-Receptor-1 inhibition reduces liver steatosis, hepatocellular injury and fibrosis in NAFLD mice. Cell Death Dis. 2020, 11:212. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2411-6.

Williams JM, Duckworth CA, Watson AJ, Frey MR, Miguel JC, Burkitt MD, Sutton R, Hughes KR, Hall LJ, Caamaño JH, Campbell BJ, Pritchard DM. A mouse model of pathological small intestinal epithelial cell apoptosis and shedding induced by systemic administration of lipopolysaccharide. Dis Model Mech. 2013; 6:1388-99. https://doi.org/10.1242/dmm.013284.

Woods SC, D'Alessio D A, Tso P, Rushing PA, Clegg DJ, Benoit S C, Gotoh K, Liu M, Seeley RJ. Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance. Physiol. Behav.2004; 83:573–78.

Wu H, Ballantyne CM. Metabolic inflammation and insulin resistance in obesity Circ Res. 2020; 22; 126:1549-1564. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315896.

Wu Q, Siddharth S, Sharma D. Triple Negative Breast Cancer: A Mountain Yet to Be Scaled Despite the Triumphs. Cancers (Basel). 2021; 13:3697. https://doi.org/10.3390/cancers13153697.

Yan S, Khambu B, Chen X, Dong Z, Guo G, Yin XM. Hepatic autophagy deficiency remodels gut microbiota for adaptive protection via FGF15-FGFR4 signaling. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology 2021; 11:973-97. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.10.011.

Yu F, Zhang T, Zhou C, Xu H, Guo L, Chen M, Wu B. The circadian clock gene Bmal1 controls intestinal exporter MRP2 and drug disposition. Theranostics 2019; 9: 2754-67. https://doi.org/10.7150/thno.33395.

Zecchinati F, Barranco MM, Arana MR, Tocchetti GN, Domínguez CJ, Perdomo VG, Ruiz ML, Mottino AD, García F, Villanueva SSM. Reversion of down-regulation of intestinal multidrug resistanceassociatedprotein 2 in fructose-fed rats by geraniol and vitamin C. Potential role of inflammatory response and oxidative stress. J NutrBiochem 2019; 68: 7-15.

Zecchinati F, Barranco MM, Tocchetti GN, Domínguez CJ, Arana MR; Perdomo VG, Mottino AD, García F, Villanueva SSM. Multidrug resistance-associated protein 2 is negatively regulated by oxidative stress in rat intestine via a posttranslational mechanism. Impact on its membrane barrier function.Toxicology 2021; 460:152873. https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152873

Zhang AMY, Wellberg EA, Kopp JL, Johnson JD. Hyperinsulinemia in Obesity, Inflammation, and Cancer. Diabetes Metab J. 2021; 45:285-311. https://doi.org/10.4093/dmj.2020.0250. Erratum in: Diabetes Metab J. 2021; 45:622.

Zimmermann C, Gutmann H, Hruz P, Gutzwiller JP, Beglinger C, Drewe J. Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract. Drug Metab Dispos. 2005; 33:219-24. https://doi.org 10.1124/dmd.104.001354.

Zinöcker MK, Lindseth IA. The Western Diet-Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. Nutrients. 2018; 10:365. https://doi.org/10.3390/nu10030365

Zorena K, Jachimowicz-Duda O, Ślęzak D, Robakowska M, Mrugacz M. Adipokines and Obesity. Potential Link to Metabolic Disorders and Chronic Complications. Int J Mol Sci. 2020; 21:3570. https://doi.org/10.3390/ijms21103570.