

## Análisis bioinformático de las proteínas con cambios de expresión en el hígado de ratones alimentados con fructosa

Oscar Gerardo Silva Gaona<sup>1</sup>; Ana Sinaí Pérez Hernández<sup>2</sup>; Eder Jahir Nieva Ruiz<sup>1</sup>; Karla San Elías Landin<sup>1</sup>; Olga Regina De La Torre Morrill<sup>1</sup>; Oscar Gómez Rodríguez<sup>2</sup>; Joel Ramírez<sup>1</sup>; Emiliano Victoriano Pérez Vázquez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato, Campus León, División Ciencias de la Salud; <sup>2</sup>Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato, División Ciencias Naturales y Exactas.

### Resumen

**Introducción:** El consumo de fructosa ha aumentado en los últimos años, y se ha relacionado con enfermedades metabólicas. A su vez el alto consumo de fructosa produce cambios en la expresión de proteínas que modifican los procesos y vías metabólicas.

**Objetivo:** Analizar el cambio de expresión de proteínas en el hígado de ratones alimentados con fructuosa, mediante análisis bioinformático de ontología génica y vías metabólicas.

**Metodología:** Se realizó un estudio en ratones macho, se formaron dos grupos (n = 4/grupo), un grupo control (HC) recibió dieta estándar y un grupo fructosa (HF) que recibió dieta estándar y fructosa al 30% (peso/volumen) durante 15 semanas. Se realizó análisis bioinformático, con las proteínas identificadas con cambio de expresión, luego se realizó análisis del interactoma mediante la base de datos STRING (v. 11.0). Posteriormente las proteínas resultantes del interactoma fueron analizadas mediante análisis de ontología génica en términos de proceso biológico, función molecular y componente celular en la base de datos DAVID (v. 6.8). Además, las proteínas se analizaron de acuerdo con las vías de la enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG).

**Resultados:** Se encontraron 77 proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos control y fructosa. El análisis ontológico de acuerdo con el componente celular mostro que las proteínas se encuentran en membrana, exosoma extracelular y mitocondria; mientras que de acuerdo con las funciones moleculares encontramos proteínas involucradas en el proceso de unión de poli-ARN, en el componente estructural del ribosoma y en la actividad oxidorreductasa; también se encontraron proteínas que participan en transporte, proceso de oxido-reducción y traducción. Además, según las vías KEGG las proteínas que se encontraron con cambios de expresión participan en alteraciones de la fosforilación oxidativa, del metabolismo de lípidos y carbohidratos, y el desarrollo de enfermedad del hígado graso no alcohólico.

**Conclusión:** El alto consumo de fructuosa modifica la expresión de proteínas del hígado, tanto en los componentes celulares, su función molecular y los procesos biológicos. Igualmente altera vías metabólicas como la vía PPAR, el metabolismo de lípidos, metabolismo de carbohidratos y la fosforilación oxidativa que pueden llevar al desarrollo de patologías metabólicas y enfermedades como el hígado graso no alcohólico.

**Palabras clave:** fructosa; hígado; análisis bioinformático; metabolismo de lípidos, vía PPAR.

## Introducción

El consumo de fructosa ha aumentado en los últimos años debido al incremento del uso de sacarosa y jarabe de maíz con alto contenido de fructosa en los alimentos procesados (Zhao et al., 2020). La ingesta alta en fructosa ocasiona desórdenes en el metabolismo de lípidos, síntomas gastrointestinales (Basciano et al., 2005), hipertensión, dislipidemia, enfermedad del hígado graso no alcohólico, diabetes tipo 2, aterosclerosis y cáncer (Hannou et al., 2018).

La fructosa ingerida es absorbida en el intestino delgado y pasa a torrente sanguíneo (Hannou et al., 2018). Posteriormente, llega al hígado donde se metaboliza la mayor parte y es regulado por tres enzimas: la fructocinasa (KHK), la aldolasa B (ALDOB) y la triosa cinasa (Van den Berghe, 1994), generando metabolitos y subproductos que participan en diversas rutas metabólicas relacionadas con la glucosa, lactato, ácidos grasos libres, triglicéridos, VLDL-TG, diacilglicerol, ceramida, ácido úrico y metilglioxal (Zhang et al., 2017). Además, una parte de la fructólisis resulta en la formación de ácido úrico (Berghe et al., 1977), que produce estrés mitocondrial oxidativo e inhibe la oxidación de ácidos grasos, dando como resultado la estimulación de la lipogénesis de *novo* (Lanaspa et al., 2012).

La capacidad de las células para adaptarse a los cambios del entorno se da gracias al cambio en la expresión de proteínas (Causton et al., 2001). En un estudio realizado en ratones con dieta alta en grasas (DAG) y dieta alta en fructosa (DAF) al 30% (p/v) por 10 semanas, se reportó aumento de las enzimas que regulan la síntesis de ácidos grasos, como el trifosfato de adenosina (ATP), la citrato liasa (ACLY), y la acetil-CoA carboxilasa 1 (ACC1) (Softic et al., 2017). También, se ha reportado en ratones con DAF durante 11 semanas, incremento de la lipogénesis, la vía inflamatoria y la vía proapoptótica (Ciro-Ramírez & Gutiérrez-Vargas, 2020). Además, se ha estudiado en ratones con DAF el cambio de expresión de proteínas involucradas en procesos inflamatorios y lipogénico, generando el aumento en la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), del receptor tipo Toll 4 (TLR4), de la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la ácido graso sintasa (FAS), la glicoproteína plaquetaria 4 (CD36) y la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1 (SREBP1) en el hígado (Do et al., 2018). Estos estudios se han enfocado a analizar el efecto de la fructosa sobre el cambio de expresión en diversos procesos puntuales. Sin embargo, será interesante abordarlo de manera general.

Para evaluar los efectos que tiene el alto consumo de fructosa sobre las proteínas, se realizó un análisis bioinformático sobre las proteínas con cambio de expresión en el hígado de ratones con DAF para comprender las alteraciones globales generadas por la fructosa sobre los procesos biológicos.

## Metodología

### Diseño experimental, modelo animal y tratamiento con fructosa

Se llevó a cabo un estudio prospectivo y comparativo para realizar un análisis bioinformático que evalúe el cambio de expresión de proteínas hepáticas y su importancia de acuerdo con la ontología génica y vías KEGG (Enciclopedia Kioto de genes y genomas por sus siglas en inglés) en ratones macho de seis semanas de edad de la cepa C57BL/6J adquiridos en la Unidad de Producción de Animales de Laboratorio del CINVESTAV IPN y mantenidos en el bioterio de la División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guanajuato siguiendo los lineamientos correspondientes. El presente protocolo fue aprobado por el comité de Bioética de la Universidad de Guanajuato con el número CIBIUG-P28-2017. Los ratones fueron separados en grupo control (HC) y fructosa (HF) (Xie, 2017) (n=4 por grupo) y se mantuvieron en condiciones estándar durante 15 semanas, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12h, a una temperatura de 25  $\pm$  2 °C, 50 % humedad y alimento estándar a libre demanda (LabDiet 5001 Rodent Diet 28.5% proteínas, 13.5% grasa, 58% carbohidratos, 466 kcal/100g); además, al grupo fructosa (HF) se le administró fructosa al 30% (peso/volumen) (120 kcal/100mL) en el agua de beber ad libitum. Posteriormente se analizó a las proteínas con cambio de expresión en el

hígado de los ratones mediante identificación por LC-MS-MS (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem) y se cuantificaron por medio de la técnica libre de etiquetas para su análisis bioinformático.

## Determinación de variables bioquímicas y extracción del hígado

Al término del tratamiento los ratones fueron pesados a las 20:00 horas en una balanza granataria para obtener su peso basal y final, además se dejaron en ayuno por 8 horas y fueron anestesiados mediante inhalación en cámara cerrada de isoflurano para posteriormente ser sacrificados por decapitación, en ese momento se determinaron la concentración de glucosa sérica y colesterol total sérico; seguidamente se extrajo el hígado de los ratones para ser lavado con solución amortiguadora [Tris/HCl 20 mM, EDTA 10 mM, DTT 2 mM, pH 7.8 y FMSF (Fenilmetilsulfonyl fluoruro) 2 mM] e inhibidor de proteasas (mini complete, Roche, México), luego fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  en esta misma solución amortiguadora hasta su uso.

## Extracción, cuantificación y perfil electroforético de las proteínas.

Para obtener las proteínas hepáticas, se homogeneizó un gramo de hígado en un tubo Potter a  $4^{\circ}\text{C}$  con solución amortiguadora de extracción de proteína (Sacarosa 0.7 M, Tris 0.5 M, KCl 30 mM, EDTA 50 mM, 2- $\beta$ -mercaptoetanol 2 %, PVPP 12 mg/mL, a  $4^{\circ}\text{C}$ ) e inhibidor de proteasas (mini complete, Roche, México). Luego se hizo la extracción fenólica con gradiente de centrifugación diferencial como se describió por Hurkman W y cols. 1986 (Hurkman & Tanaka, 1986); a continuación, la proteína fue secada y re suspendida en 300  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de lisis (Urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4 %, TBP 2 mM, anfolinas 2 %, DTT 60mM) para su cuantificación mediante el método de Bradford modificado (Zor & Selinger, 1996). Se hizo la curva estándar y un patrón electroforético para garantizar la calidad de las proteínas y su adecuada separación; para esto se utilizaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína por muestra por carril, en un gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes de 7 cm, a un voltaje de 120 V/h, y teñido con azul de Coomassie. Después se corroboró que la cantidad de proteína cargada fuera la misma en cada muestra con el software ImageLab (Biorad, México).

## Preparación de la muestra y pre-fraccionamiento de péptidos por LC.

El tamaño de la muestra para el análisis se basó en los resultados obtenidos del cambio de expresión de ACC del estudio de (Maithilikarpagaselvi et al., 2016), el cual fue  $n = 3$  por grupo. La muestra se preparó según se describió por (Fernández-Coto et al., 2018), utilizando 100  $\mu\text{g}$  de proteínas por muestra, se sometieron a alquilación, se lavaron y el precipitado resultante se solubilizó. La muestra fue incubada con tripsina para posteriormente eliminar el SDS y el SDC, y finalmente secar la mezcla de péptidos en el equipo Speed Vac Plus de Savant (Thermo Fischer Scientific E.U.A.). Para pre-fraccionar las mezclas de péptidos se sometieron a cromatografía de fase inversa a pH alto en una columna C18-XTERRA MS (3,9 \* 150 mm) de Waters (EE. UU.), utilizando una bomba binaria HPLC (Waters, E.U.A.). Se obtuvieron 60 fracciones, que fueron agrupadas en 15 fracciones finales, cada una compuesta de fracciones incrementadas en 15. Cada fracción final fue secada, desalada, y secada nuevamente para luego almacenarla a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis por LC-MS/MS (Fernández-Coto et al., 2018).

## Análisis de expresión diferencial de proteínas mediante LC-MS/MS.

Los péptidos fueron disueltos y separados en un sistema Dionex UltiMate 3000 ESLC nano UPLC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive (Thermo Fischer Scientific, E.U.A.).

La identificación y cuantificación de las proteínas se realizó mediante el software MaxQuant v1.6.7.0 (Tyanova et al., 2016). Se seleccionó como enzima de digestión la tripsina y la carbamidometilcisteína como modificación fija. Se acetilaron y oxidaron las proteínas N-terminales (M) como modificaciones variables. Se utilizó el proteoma de ratón UP000000589 del repositorio de UniProt como base de datos para la identificación de proteínas. Para considerar como proteínas correctamente identificadas, se aceptaron únicamente aquellas con al menos dos péptidos únicos y un péptido único. Se reportó un porcentaje de falsos positivos = 1%, basado en la estrategia de señuelo objetivo para garantizar la calidad de identificaciones.

La cuantificación relativa de proteínas se realizó mediante la técnica libre de etiqueta (Label free) (Tyanova et al., 2016); se reportaron los datos cuantitativos solo para proteínas con al menos dos péptidos únicos identificado/cuantificados. Los datos cuantitativos fueron utilizados para comparar los perfiles de abundancia de proteínas entre las muestras. Se compararon los dos grupos usando los datos de abundancia de las proteínas del hígado de ratones de las 3 réplicas. Para evaluar las relaciones entre los grupos, se realizó análisis de agrupamiento jerárquico para evaluar las diferencias entre los grupos.

## Análisis bioinformático.

Las proteínas identificadas con un cambio de expresión fueron cargadas en la base de datos Search Tool for the Retrieval of Inter-acting Genes/Proteins (STRING) (Szklarczyk et al., 2015) v. 11.0 con los parámetros: puntuación de interacción mínima de 0.400. interactores directos 10 e interactores secundarios 10; con la finalidad de generar un mapa de las interacciones proteicas. Posteriormente se cargaron las proteínas con cambios de expresión más las proteínas con las que presentaban interacción en Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (Huang et al., 2009) v. 6.8 para el análisis ontológico de las proteínas considerando los términos de proceso biológico, función molecular y componente celular. Además, las proteínas se analizaron de acuerdo con las vías metabólicas, de señalización e interacciones mediante las vías KEGG.

## Análisis estadístico.

Se hizo un análisis de la normalidad de los datos bioquímicos y peso corporal a través de la prueba de Shapiro Wilks y la homogeneidad de varianza por medio de la prueba de Levene. Posteriormente, se realizó ANOVA de una vía seguido del post hoc de Tukey para encontrar las diferencias entre los grupos, tomando como significativa una  $p < 0.05$ . Los valores fueron reportados como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) y se utilizó el Software SPSS 23 (IBM® SPSS® Statistics). El cambio de expresión de proteínas entre los grupos fue calculado utilizando la prueba T de Student considerando significativa una  $p < 0.05$  y veces de cambios  $\geq 1.5$ ; los resultados son presentados en gráficos de volcán. Usando la abundancia de las proteínas expresadas diferencialmente se realizó un análisis de agrupación jerárquica utilizando la correlación de Pearson por medio del software Perseus v1.6.15.0.

## Resultados

Los ratones alimentados con fructosa presentaron mayor ganancia de peso corporal respecto al grupo control (HF =  $11.0 \pm 1.6$  g vs HC =  $6.1 \pm 1.4$  g,  $p < 0.001$ ), mientras que la concentración de glucosa sérica es similar entre los grupos. Por su parte, la concentración de colesterol total sérico en los ratones alimentados con fructosa es mayor que en el grupo control ( $156.1 \pm 10.0$  g vs  $110.3 \pm 7.4$  g,  $p < 0.001$ ).

Se hizo un análisis de agrupamiento jerárquico para evaluar la correlación de la expresión de proteínas entre los grupos fructosa (HF) y control (HC) como se muestra en la Figura 1. Se encontró que los ratones del grupo HF están altamente correlacionados entre sí al igual que los ratones del grupo C. Sin embargo, el grupo HF y el grupo C muestran una menor correlación entre ellos. Esto indica que, la fructosa produce una variación en el perfil de expresión de las proteínas con respecto a los ratones control.

Se encontraron 77 proteínas expresadas diferencialmente entre los grupos HF y HC como se muestra en Figura 2 y en el Anexo 1. Se encontraron 4 proteínas que disminuyeron y 73 proteínas que aumentaron su expresión.

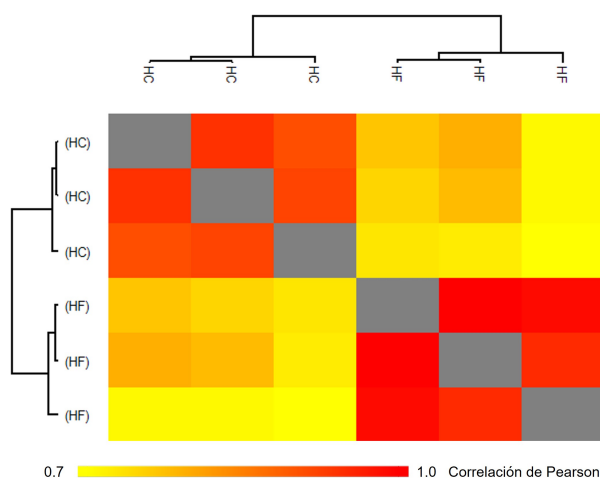


Figura 1. Análisis de agrupamiento jerárquico mediante mapa de calor. Análisis de la correlación de los grupos HF respecto a HC con base a la intensidad de las proteínas y el mapa de calor con la correlación de Pearson de las intensidades de las muestras. HF= grupo fructosa, HC= grupo control.

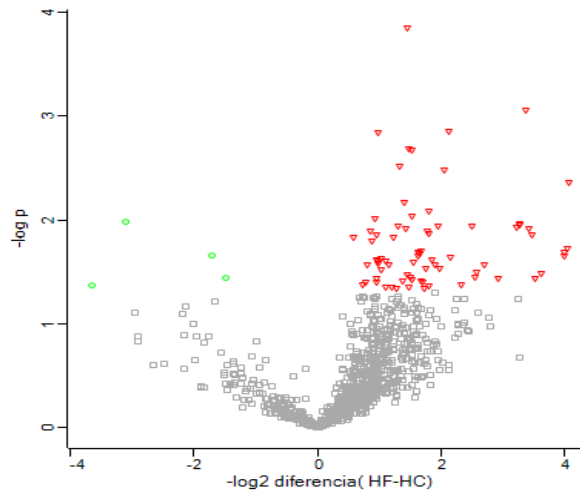


Figura 2.- Análisis de los cambios de expresión de las proteínas mediante gráficos de volcán. Comparación de las proteínas del grupo fructosa (HF) respecto al grupo control (HC). Se encontraron 4 proteínas que disminuyeron (verde) y 73 proteínas que aumentaron (rojo) su expresión en el grupo HF respecto al grupo HC. Se consideraron cambios de expresión aquellos con una  $p < 0.05$  y veces de cambio  $\geq 1.5$ . En el eje de las "x" se muestra la diferencia como el logaritmo de base 2 de la relación de proteínas entre los grupos y en el eje "y" el valor de p es presentado como menos logaritmo del valor de p.

A partir de las proteínas con cambios de expresión (Anexo 1) se hizo el análisis bioinformático de acuerdo con ontología génica de componente celular, función molecular y proceso biológico. En la Figura 3A se muestran los resultados de componente celular; la mayoría de las proteínas con cambio de expresión en el grupo tratado con fructosa respecto al grupo control están en membrana, exosoma extracelular, mitocondria, citosol, cadena respiratoria y ribosoma. De acuerdo con la función molecular, las proteínas se agrupan principalmente en unión de poli(A) RNA, constituyente estructural, actividad de óxido-reductasa, actividad de NADH deshidrogenasa (ubiquitina) y actividad catalítica como se muestra en la Figura 3B. Las proteínas con expresión diferencial en el grupo HF respecto al HC, participan principalmente en los biológicos de transporte, proceso de óxido-reducción, traducción y proceso metabólico de lípidos.

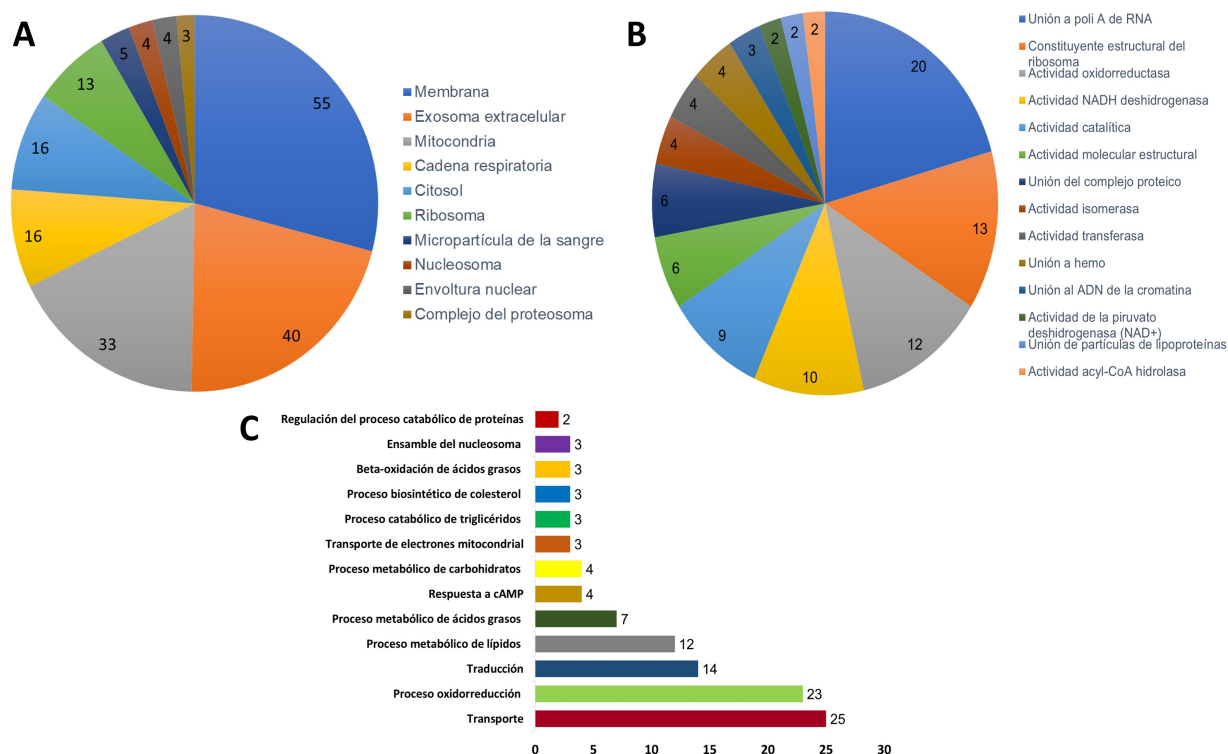


Figura 3.- Análisis de ontología génica A) Componentes Celulares: se muestran el número de proteínas que se encontraron con un cambio de expresión de acuerdo con el componente celular en el que están incluidos. B) Función Molecular: se muestran el número de proteínas que se encontraron con un cambio de expresión de acuerdo con la función molecular de la que forman parte. C) Proceso Biológico: se muestran el número de proteínas que se encontraron con un cambio de expresión de acuerdo con el proceso biológico en el que están involucradas.

## Discusión

Se realizó un análisis bioinformático global sobre las proteínas con cambio de expresión en el hígado de los ratones con DAF y se encontraron 77 proteínas con cambio de expresión de las cuales la mayoría se observaron sobre expresadas; y participan en procesos metabólicos de lípidos, procesos metabólicos de carbohidratos, y procesos de oxidorreducción. (Rönn et al., 2013), realizaron un estudio en ratas hembra alimentadas con DAF, donde encontraron incrementada la concentración de triglicéridos, la expresión de la apolipoproteína A-1(APOA1) y la HDL. En otro estudio realizado en ratas alimentadas con DAF se evaluó el deterioro en la transducción hepática en la señal de leptina y se observó que disminuyó la actividad de PPAR $\alpha$ , la cual regula el metabolismo de lípidos y carbohidratos en el hígado(Roglans et al., 2007). Nuestros hallazgos concuerdan con los estudios antes mencionados debido a que encontramos modificada la expresión de proteínas implicadas en la vía PPAR (EHHADH, CYP4A10, APOA1 y ACAA1B. Ver Figura 4), y que a su vez regulan el metabolismo de lípidos.

Por otro lado, los hallazgos acerca del aumento en la actividad de óxido-reducción concuerdan con el estudio de (Lanaspa et al., 2012) en el que se reporta que el ácido úrico incrementa la grasa en los hepatocitos mediante la estimulación del estrés oxidativo mitocondrial que bloquea la actividad de la aconitasa (ACO) e incrementa el citrato y con ello estimula la lipogénesis. Esto explica el aumento de expresión en proteínas involucradas con el metabolismo de ácidos grasos, así como el aumento de peso y el colesterol total sérico en los ratones estudiados en esta investigación.

Dentro del análisis de las vías KEEG, sobre el metabolismo de lípidos como se muestra en la Figura 4. Las proteínas que tuvieron un aumento de expresión son la ATP-citrato sintasa (ACLY) la cual se aumentó 12.3 veces y la 3-oxoacil-[proteína transportadora de acilo] sintasa, mitocondrial (OXSM) con un aumento de 2.2 veces, ambas enzimas están relacionadas con la biosíntesis de ácidos grasos (Softic et al., 2020), lo que indica que los metabolitos intermediarios de la fructosa (como el acetil-CoA) se están dirigiendo en gran parte a la lipogénesis de *ново*, ya que en el análisis de las variables bioquímicas se observó un aumento en el colesterol total sérico, además se observó un aumento en las enzimas 3-cetoacil-CoA tiolasa B (ACAA1B), enzima bifuncional peroxisomal (EHHADH) y enoil-CoA delta isomerasa 1, mitocondrial (EC11), aumentadas 1.9 veces. Estas proteínas participan en la degradación de ácidos grasos, su aumento puede ser una respuesta para tratar de regular la homeostasis de los lípidos hepáticos, ya que el aumento de lípidos generado por la DAF provoca un desequilibrio entre el almacenamiento y la eliminación de lípidos (Ipsen et al., 2018). En los resultados de este análisis bioinformático encontramos proteínas con cambio de expresión que participan en varias vías metabólicas simultáneamente, sobre todo aquellas relacionadas con la fosforilación oxidativa y la enfermedad de hígado graso no alcohólico. Algunas de estas proteínas son: NDUFA8, NDUFB7, NDUFA11, COXA11, UQCRC1 y ATP5H (ver figura 4). Todas las proteínas que encontramos relacionadas con la fosforilación oxidativa se encuentran con un aumento de expresión. La fructosa genera estrés oxidativo hepático mediante varios mecanismos y produce cien veces más especies reactivas de oxígeno (ROS) que el metabolismo de la glucosa<sup>2</sup>; Al fosforilarse este carbohidrato mediante una reacción dependiente de ATP ocurre un descenso del fosfato que resulta en síntesis de ácido úrico que estimula la producción ROS<sup>3</sup>; producción de triglicéridos<sup>3</sup> y metilglioxal (MG), que altera la señalización de la insulina y ocasiona estrés celular<sup>2</sup>. Los efectos deletéreos del consumo de fructosa no dependen exclusivamente del estrés oxidativo, sin embargo, sí tiene un papel importante. La ATP sintasa de membrana mitocondrial (ATP5H) cumple la función de catalizar la reacción de ADP a ATP (Kim et al., 2006) y se encuentra aumentada en 1.7 veces probablemente como un mecanismo compensatorio en respuesta al exceso de fosforilación. El resto de las proteínas participan en la cadena de transporte de electrones mitocondrial en sus múltiples complejos y se encuentran sobre expresadas por el aumento del metabolismo de la fructosa. Esto nos demuestra que los procesos de oxidación tienen un papel fundamental en el desarrollo de las complicaciones ocasionadas por el consumo de la fructosa.



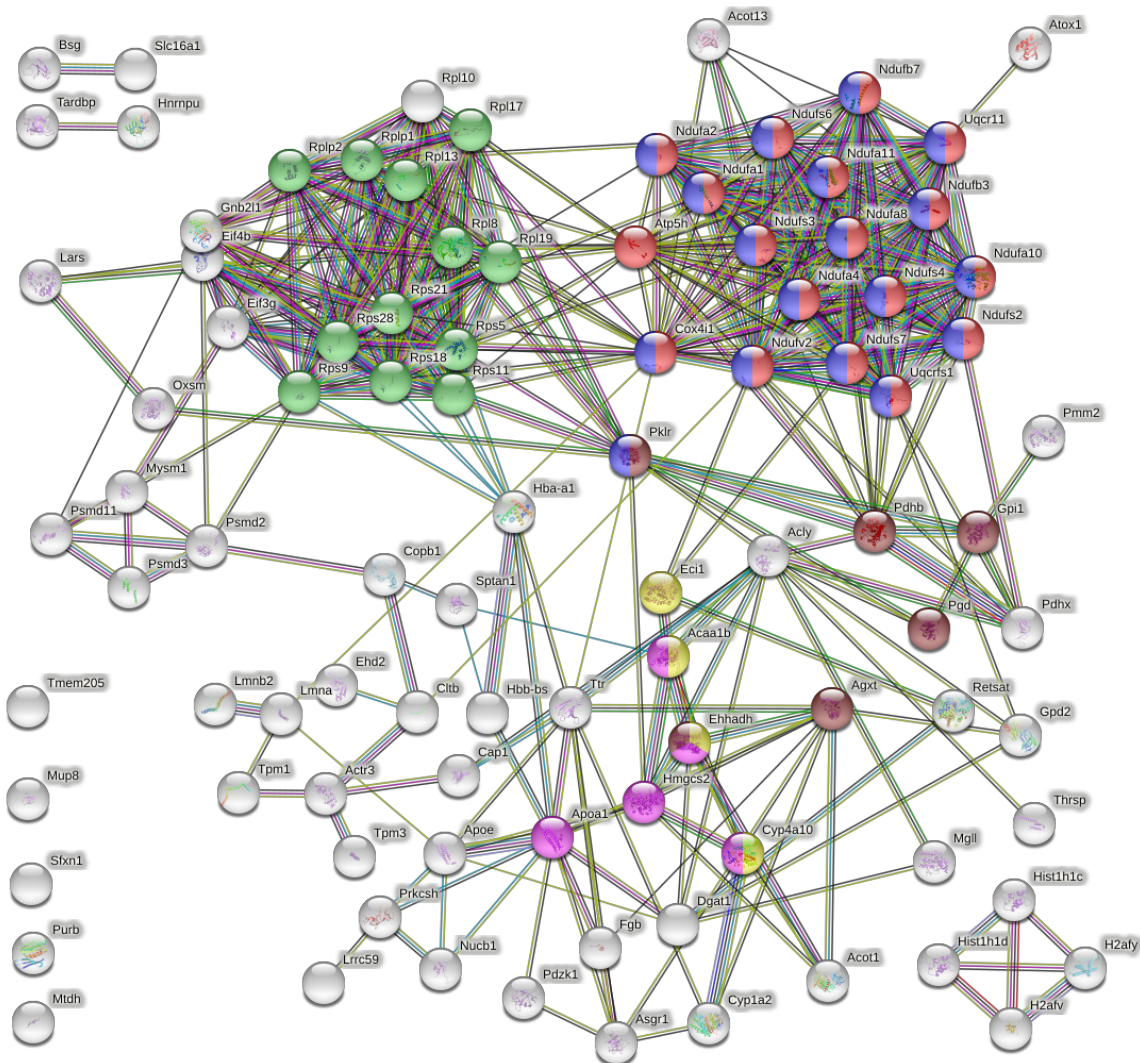


Figura 4. Análisis bioinformático del interactoma de las proteínas con cambio de expresión en el grupo HF respecto al grupo HC. Cada nodo representa una proteína y cada línea representa una interacción (interacciones conocidas, y/o predichas). En verde son las proteínas relacionadas con la traducción. En azul las proteínas relacionadas con la fosforilación oxidativa. En rojo las proteínas implicadas en la enfermedad de hígado graso no alcohólico, en rosa las proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos, en amarillo las proteínas implicadas en la vía PPAR y en café las proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos.

Nuestros hallazgos relacionados al metabolismo de carbohidratos muestran un aumento en la expresión de glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI) y la piruvato cinasa (PKLR). En el análisis se puede observar cómo existe un aumento de 11.1 veces de la PKLR, implicada para la síntesis del piruvato y se relaciona de igual forma con el metabolismo de ácidos grasos al formar parte de la síntesis de Acetil-CoA (Zhang et al., 2017), por lo que se espera un aumento de ácidos grasos libres; esto concuerda con los resultados obtenidos en otro estudio en ratones con DAF y DAG, en el que aumento la concentración de ácidos grasos y la expresión de la ATP citrato liasa (ACLY), la acetil-CoA carboxilasa  $\alpha$  (ACACA), la ácido graso sintasa (FAS) y la esteroil-CoA desaturasa 1 (SCD1); proteínas implicadas en la lipogénesis de *novo* (Softic et al., 2017).

En otros estudios se ha encontrado como la dieta alta en fructosa induce un aumento de la glucosa, condicionada también por insensibilidad a la insulina (Softic et al., 2017), (Softic et al., 2020). Sin embargo, nuestros resultados

muestran que la concentración sérica de glucosa se mantiene similares entre los grupos HC y HF. Esto podría deberse a que la fructuosa entra en la vía de gluconeogénesis y no es regulado por la insulina.

Algunos estudios han evaluado el desarrollo de enfermedad de hígado graso no alcohólico en ratas alimentadas con una DAF encontrando aumento de la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos y carbohidratos. (Mai & Yan, 2019) (DiNicolantonio et al., 2017) (Jensen et al., 2018). De manera similar, encontramos cambios en la expresión de proteínas involucradas en dichos metabolismos, que resultan en la alteración de la beta oxidación de ácidos grasos y el aumento de la lipogénesis *de novo*; Todo esto indicaría que nuestros ratones corren un alto riesgo de desarrollar enfermedad de hígado graso no alcohólico.

En estudios futuros será importante realizar un análisis más detallado del perfil lipídico de los ratones, con el propósito de corroborar qué tipo de lipoproteínas aumentan; medir la hemoglobina glicada (HbA1c) como indicador de hiperglucemia; evaluar las concentraciones de insulina y leptina para observar posibles alteraciones hormonales; medir reactantes de fase aguda y biomarcadores de inflamación hepática (TP, PCR, LDH, FA, ALT, AST, etc.), así como un examen histológico del tejido hepático para determinar de forma más amplia la existencia o no de daño histológico y bioquímico del hígado.

En conclusión, la dieta alta en fructosa modifica la expresión de proteínas del hígado relacionadas con la vía PPAR, el metabolismo de lípidos, el metabolismo de carbohidratos y la fosforilación oxidativa que pueden llevar al desarrollo de enfermedades metabólicas y enfermedad de hígado graso no alcohólico.

## Referencias

- Heather Basciano, Lisa Federico, Khosrow Adeli. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. In *Nutrition and Metabolism* (Vol. 2, pp. 1–14).
- G van den Berghe, M Bronfman, R Vanneste, H G Hers. (1977). The mechanism of adenosine triphosphate depletion in the liver after a load of fructose. *Biochemical Journal*, *162*(3), 601–609.
- Helen C. Causton, Bing Ren, Sang Seok Koh, Christopher T. Harbison, Elenita Kanin, Ezra G. Jennings, Tong Ihn Lee, Heather L. True, Eric S. Lander, Richard A. Young. (2001). Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(2), 323–337.
- Lina Ciro-Ramírez, Johanna Gutiérrez-Vargas. (2020). Alto consumo de fructosa y daño hepático. *Revista Novedades Colombianas*, *15*(1), 7–19.
- James J DiNicolantonio, Ashwin M. Subramonian, James H O’Keefe. (2017). Added fructose as a principal driver of non-alcoholic fatty liver disease: a public health crisis. *Open Heart*, *4*(2), 000631.
- Moon Do, Eunjung Lee, Mi-Jin Oh, Yoonsook Kim, Ho-Young Park. (2018). High-glucose or -fructose diet cause changes of the gut microbiota and metabolic disorders in mice without body weight change. *Nutrients*, *10*(6), 761.
- Diana Lashidua Fernández-Coto, Jeovanis Gil, et al. (2018). Quantitative proteomics reveals proteins involved in the progression from non-cancerous lesions to gastric cancer. *Journal of Proteomics*, *18*(July), 15–27.
- Sarah A. Hannou, Danielle E. Haslam, Nicola M. McKeown, Mark A. Herman. (2018). Fructose metabolism and metabolic disease. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(2), 545–555.
- Da Wei Huang, Brad T. Sherman, Richard A. Lempicki. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, *4*(1), 44–57.
- William Hurkman, Charlene Tanaka. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, *81*(3), 802–806.
- David Højland Ipsen, Jens Lykkesfeldt, Pernille Tveden-Nyborg. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *75*(18), 3313–3327.
- Thomas Jensen, Manal F. Abdelmalek, Shelby Sullivan, Kristen J. Nadeau, Melanie Green, Carlos Roncal, Takahiko Nakagawa, Masanari Kuwabara, Yuka Sato, Duk-Hee Kang, Dean R. Tolan, Laura G. Sanchez-Lozada, Hugo R. Rosen, Miguel A. Lanaspa, Anna Mae Diehl, Richard J. Johnson. (2018). Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, *68*(5), 1063–1075.
- Sung Chan Kim, Robert Sprung, Yue Chen, Yingda Xu, Haydn Ball, Jimin Pei, Tzuling Cheng, Yoonjung Kho, Hao Xiao, Lin Xiao, Nick V. Grishin, Michael White, Xiang-jiao Yang, Yingming Zhao. (2006). Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Molecular Cell*, *23*(4), 607–618.
- Miguel A. Lanaspa, Laura G. Sanchez-Lozada, Yea-Jin Choi, Christina Cicerchi, Mehmet Kanbay, Carlos A. Roncal-Jimenez, Takuji Ishimoto, Nanxing Li, George Marek, Murat Duranay, George Schreiner, Bernardo Rodriguez-Iturbe, Takahiko Nakagawa, Duk-Hee Kang, Yuri Y. Sautin, Richard J. Johnson. (2012). Uric acid induces hepatic steatosis by generation of mitochondrial oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(48), 40732–40744.
- Brandon H. Mai, Liang-Jun Yan. (2019). The negative and detrimental effects of high fructose on the liver, with special reference to metabolic disorders. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, Volume 12*, 821–826.
- Nachimuthu Maithilikarpagaselvi, Magadi Sridhar, R Swaminathan, et al. (2016). Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. *Pharmaceutical Biology*, *54*(12), 2857–2863.
- Núria Roglans, Laia Vilà, Mireia Farré, Marta Alegret, Rosa María Sánchez, Manuel Vázquez-Carrera, Juan Carlos Laguna. (2007). Impairment of hepatic STAT-3 activation and reduction of PPAR $\alpha$  activity in fructose-fed rats. *Hepatology*, *45*(3), 778–788.
- Monika Rönn, P. Monica Lind, Helen Karlsson, Katarina Cvek, Johan Berglund, Filip Malmberg, Jan Örborg, Lars Lind, Francisco Ortiz-Nieto, Joel Kullberg. (2013). Quantification of total and visceral adipose tissue in fructose-fed rats using water-fat separated single echo MRI. *Obesity*, *21*(9).
- Samir Softic, Manoj K. Gupta, Guo Xiao Wang, Shiho Fujisaka, Brian T. O’Neill, Tata Nageswara Rao, Jennifer Willoughby, Carole Harbison, Kevin Fitzgerald, Olga Ilkayeva, Christopher B. Newgard, David E. Cohen, C. Ronald Kahn. (2017). Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(11), 4059–4074.

- Samir Softic, Kimber L. Stanhope, Jeremie Boucher, Senad Divanovic, Miguel A. Lanaspa, Richard J. Johnson, C. Ronald Kahn. (2020). Fructose and hepatic insulin resistance. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 57(5), 308–322.
- Damian Szklarczyk, Andrea Franceschini, Stefan Wyder, et al. (2015). STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D447–D452.
- Stefka Tyanova, Tikira Temu, Juergen Cox. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, 11(12), 2301–2319.
- Georges Van den Berghe. (1994). Inborn Errors of Fructose Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 14(1), 41–58.
- Xiong-Wei Xie. (2017). Liquiritigenin attenuates cardiac injury induced by high fructose-feeding through fibrosis and inflammation suppression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 694–704.
- Dong-Mei Zhang, Rui-Qing Jiao, Ling-Dong Kong. (2017). High dietary fructose: direct or indirect dangerous factors disturbing tissue and organ functions. *Nutrients*, 9(4), 335.
- Steven Zhao, Cholsoon Jang, Joyce Liu, Kahealani Uehara, Michael Gilbert, Luke Izzo, Xianfeng Zeng, Sophie Trefely, Sully Fernandez, Alessandro Carrer, Katelyn D. Miller, Zachary T. Schug, Nathaniel W. Snyder, Terence P. Gade, Paul M. Titchenell, Joshua D. Rabinowitz, Kathryn E. Wellen. (2020). Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature*, 579(7800), 586–591.
- Tsaffir Zor, Zvi Selinger. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302–308.

Anexo 1.- Tabla de proteínas con cambios de expresión

Nombre de la proteína	No. de A. UniProtKB	Símbolo de la proteína	CS (%)	PM (kDa)	N MS/MS	P	VC
3-cetoacil-CoA tiolasa B, peroxisomal	Q8VCHo	ACAA1B	66.7	42	280	0.010	1.9
ATP-citrato sintasa	Q91V92	ACLY	44.3	121	229	0.033	12.3
Acil-coenzima A tioesterasa 1	O55137	ACOT1	31.9	46	56	0.001	10.3
Acil-coenzima A tioesterasa 13	Q9CQR4	ACOT13	31.4	15	26	0.044	3.5
Proteína 3 relacionada con la actina	Q99JY9	ACTR3	28.5	47	70	0.044	2.2
Serina-piruvato aminotransferasa, mitocondrial	Q35423	AGXT	29.8	44	47	0.043	-15.8
Apolipoproteína A-I	Q00623	APOA1	45.5	31	400	0.007	2.6
Apolipoproteína E	P08226	APOE	39.5	36	402	0.016	1.8
Receptor de la asialoglicoproteína 1	P34927	ASGR1	29.2	33	75	0.036	5.9
Proteína de transporte de cobre ATOX1	O08997	ATOX1	58.8	7	39	0.042	1.7
Subunidad d de la ATP sintasa, mitocondrial	Q9DCX2	ATP5H	77.5	19	509	0.040	1.7
Basigina	J3QP71	BSG	23.9	22	43	0.012	3.9
Proteína 1 asociada a adenilil ciclasa	P40124	CAP1	23.6	52	23	0.021	3.1
Cadena ligera de la clatrina B	Q6IRU5	CLTB	22.7	23	47	0.011	9.7
Subunidad del coatómero beta	Q9JIF7	COPB1	6.8	107	14	0.040	3.3
Citocromo c oxidasa subunidad 4 isoforma 1, mitocondrial	P19783	COX4I1	46.2	20	275	0.030	2.1
Citocromo P450 1A2	P00186	CYP1A2	48.1	58	193	0.022	-3.3
Citocromo P450 4A10	O88833	CYP4A10	57.7	57	163	0.012	10.6
Diacilglicerol O-aciltransferasa 1	Q9Z2A7	DGAT1	5	57	12	0.002	2.9
Enoil-CoA delta isomerasa 1, mitocondrial	P42125	EC1	38.8	32	290	0.040	1.9
Enzima bifuncional peroxisomal	Q9DBM2	EHHADH	74.4	78	1427	0.037	1.9
Factor de iniciación de la traducción eucariota 4B	Q8BGD9	EIF4B	12	69	102	0.002	2.8
Proteína 5 similar a Fer-1	P0DM40	FER1L5	6	35	18	0.036	-2.4
Cadena beta de fibrinógeno	Q8K0E8	FGB	36.2	55	114	0.040	3.2
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, mitocondrial	Q64521	GPD2	27.1	83	52	0.023	16.0
Glucosa-6-fosfato isomerasa	P06745	GPI	41.6	63	137	0.011	9.7
Histona H1.2	P15864	H2A	61.2	14	281	0.015	1.5
Histona H2A	Q3THW5	H2AFV	31.2	14	28	0.046	3.3
Histona central macro-H2A.1	Q9QZQ8	H2AFY	34.7	40	52	0.047	2.4
Subunidad alfa de la hemoglobina	A8DUV3	HBA	90.1	15	1114	0.003	2.5
Subunidad beta de la hemoglobina	A8DUK4	HBBT1	95.2	16	1162	0.025	1.9
Histona H1.2	Q5SZA3	HIST1H1C	25	21	66	0.025	2.1
Histona H1.3	P43277	HIST1H1D	24	22	21	0.001	4.3
Hidroximetilglutaril-CoA sintasa, mitocondrial	P54869	HMGCS2	70.9	57	1543	0.038	2.9
Ribonucleoproteína nuclear heterogénea U	Q8VEK3	HNRNPU	15.1	88	60	0.014	3.5
Leucina - ARNT ligasa, citoplasmática	Q8BMJ2	LARS	1.9	134	4	0.008	3.5
Prelamina-A / C	P48678	LMNA	38.8	74	217	0.012	2.7
Lamina -B2	P21619	LMNB2	13.7	69	28	0.043	5.0
Proteína 59 rica en motivos repetidos de leucina	Q922Q8	LRRC59	62.4	20	87	0.000	2.7
Monoglicérido lipasa	Q35678	MGLL	11.9	35	13	0.003	4.1
Proteína LYRIC	Q80WJ7	MTDH	23.1	64	47	0.022	3.1
Proteína urinaria mayor 8	E9PVW0	MUP8	75.6	21	17	0.011	-5.1
Subunidad 10 del subcomplejo 1 alfa de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona]	Q99LC3	NDUFA10	46.2	41	136	0.030	3.9
Subunidad NDUFA4 de la citocromo c oxidasa	Q62425	NDUFA4	77.6	6	74	0.027	3.7
Subunidad 8 del subcomplejo 1 alfa de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona]	Q9DCJ5	NDUFA8	48.8	20	53	0.032	5.9
Subunidad 3 del subcomplejo 1 beta de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona]	Q9CQZ6	NDUFB3	17.3	12	47	0.025	2.0

Subunidad 7 del subcomplejo beta 1de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona]	Q9CR61	NDUFB7	51.8	16	52	0.012	2.5
Proteína hierro azufre 6 de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona], mitocondrial	P52503	NDUFS6	50	14	80	0.013	3.4
Proteína hierro azufre 7 de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona], mitocondrial	Q9DC70	NDUFS7	8	25	29	0.037	11.4
Flavoproteína 2 de la NADH deshidrogenasa [ubiquinona], mitocondrial	Q9D6J6	NDUFV2	29	27	127	0.015	2.3
Nucleobindina-1	Q02819	NUCB1	32.9	53	82	0.030	3.3
3-oxoacil- [proteína transportadora de acilo] sintasa, mitocondrial	Q9D404	OXSM	15.7	49	18	0.028	2.2
Componente E1 de la piruvato deshidrogenasa subunidad beta, mitocondrial	Q9D051	PDHB	44	39	139	0.020	3.2
Componente de la proteína piruvato deshidrogenasa X, mitocondrial	Q8BKZ9	PDHX	20.8	54	14	0.004	16.6
Cofactor NHE-RF3 regulador del intercambio Na (+) /H (+)	Q9JIL4	PDZK1	5.2	56	18	0.045	2.8
6-fosfogluconato deshidrogenasa, descarboxilante	Q91V28	PGD	21.3	53	43	0.021	15.8
Piruvato cinasa	P53657	PKLR	56.2	59	293	0.014	11.1
Fosfomanomutasa 2	Q9Z2M7	PMM2	5.6	26	15	0.009	2.9
Glucosidasa 2 subunidad beta	O08795	PRKCSH	20.2	59	95	0.024	2.1
Subunidad reguladora 2 del proteasoma 26S no ATPasa	Q8VDM4	PSMD2	8.4	100	29	0.025	3.6
Proteína activadora transcripcional Pur-beta	O35295	PURB	5.6	34	13	0.023	4.4
All-trans-retinol 13,14-reductasa	Q64FW2	RETSAT	30.5	67	159	0.012	9.3
Proteína ribosómica L17 de la subunidad 60S	Q9CPR4	RPL17	31.5	21	73	0.012	5.6
Proteína ribosomal ácida P2 subunidad 60S	P99027	RPLP2	72.2	12	311	0.028	1.7
Proteína ribosómica S21 de la subunidad 40S	Q9CQR2	RPS21	40.7	9	94	0.013	1.8
Proteína ribosómica S28 de la subunidad 40S	P62858	RPS28	37.5	6	79	0.039	2.6
Sideroflexina-1	Q99JR1	SFXN1	34.8	36	95	0.014	1.9
Transportador de monocarboxilatos 1	P53986	SLC16A1	15.9	25	32	0.019	16.5
Cadena alfa de espectrina, no eritrocitaria 1	P16546	SPTAN1	18.2	285	143	0.026	2.9
Proteína TAR 43 de unión al ADN	Q921F2	TARDBP	26.7	27	20	0.037	7.5
Proteína hepática inducible por hormona tiroidea	Q62264	THRSP	24	17	10	0.027	6.5
Proteína transmembranal 205	Q91XE8	TMEM205	9.8	20	17	0.034	2.7
Cadena de tropomiosina alfa-1	Q8BP43	TPM1	39.1	29	59	0.001	2.0
Cadena de tropomiosina alfa-1	E9Q456	TPM1	44.4	33	137	0.036	2.8
Proteína Tpm3	Q58E70	TPM3	40.3	29	186	0.045	2.3
Transtiretina	Q5MgK1	TTR	62.6	16	140	0.021	3.1
Subunidad 11 del complejo del citocromo b-c1	Q9CR68	UQCRFS1	53.6	29	156	0.027	2.0

Abreviaturas: No. de A UniProtKB: número de acceso uniprot; PM (kDa): peso molecular teórico en kilo daltones; % CS: porcentaje de cobertura de la secuencia; N de MS/MS: número de espectros utilizados para la identificación;  $p$ : valor de  $p$ ; VC: veces de cambio.