



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

T E S I S

**“IMPACTO DE LA RESTRICCIÓN DE FRUCTOSA Y EFECTO DE
ALOPURINOL SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL
EN SUJETOS CON HIPERTENSIÓN Y SOBREPESO”**

**QUE PRESENTA
DR. SERGIO HERNANDEZ ESTRADA**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN NEFROLOGÍA**

TUTOR: DRA. MAGDALENA MADERO ROVALO



MEXICO, D.F.

Agosto 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN	3
MARCO TEORICO	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
JUSTIFICACION	29
HIPOTESIS	31
OBJETIVOS	32
DESCRIPCION DE LA POBLACION	33
VARIABLES	36
MATERIAL Y METODOS	37
ANALISIS ESTADISTICO	43
RESULTADOS	44
DISCUSION	50
CONCLUSION	59
ANEXOS	60
BIBLIOGRAFIA	61

RESUMEN

INTRODUCCION: Datos epidemiológicos nacionales recientes han enfatizado la alarmante prevalencia de las enfermedades crónicas del adulto, en donde el sobrepeso y la hipertensión arterial sistémica (HAS) constituyen una de las principales causas de enfermedad cardiovascular (CV), enfermedad renal y muerte [1,2]. Esta cifra se ha atribuido en parte a la epidemia de obesidad y síndrome metabólico (SM). La obesidad observada en la actualidad ha crecido en paralelo al consumo de sacarosa y de jarabe de maíz alto en fructosa, lo que ha llevado a un aumento del 30% en la ingesta de ésta última durante los últimos 20 años [3-7]. En modelos experimentales y humanos, estudios recientes han observado que la alimentación a base de una dieta alta en fructosa puede inducir sobrepeso, obesidad, HAS, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, así como hiperuricemia [8-16]. También existe evidencia que sugiere la relación entre los niveles de AU y fructosa con TA y SM en ensayos clínicos, y en donde se ha reportado una asociación entre estas entidades con inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial [17-19].

Por otro lado, aunado a los efectos ya conocidos del alopurinol, se han descrito otros potenciales mecanismos de acción, reduciendo a su vez estrés oxidativo y estimulando la síntesis de óxido nítrico, por ende limitando daño endotelial y rigidez vascular [8]. Hasta donde tenemos conocimiento, no existe un estudio clínico controlado en pacientes adultos con HAS que evalúe el efecto de la restricción de fructosa en la dieta y la administración de alopurinol sobre la función mitocondrial y estrés oxidativo.

OBJETIVOS Y METODOLOGIA: Se realizó un estudio piloto, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, con dos grupos en paralelo, donde se evaluó el impacto de la administración de una dieta con restricción en fructosa, así como el tratamiento con alopurinol en individuos adultos con TA normal alta o prehipertensión y sobrepeso u obesidad teniendo como desenlaces principales la función mitocondrial y los marcadores de estrés oxidativo. Los individuos entraron a una primera fase (4 semanas) de manera aleatoria y divididos en: grupo con dieta isocalórica hiposódica sin restricción en fructosa y dieta isocalórica hiposódica con restricción en fructosa. Se realizaron determinaciones al inicio, a las 4 y 8 semanas de ADN mitocondrial (ADNmt) medida por Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real (RCP-TR) en células inmunes circulantes, Malondialdehído (MDA) y 2,4-dinitrofenilhidrazina (NDPH) como marcadores de estrés oxidativo, así como paraclínicos y somatometría relacionada a SM. Se registro la TA mediante monitoreo ambulatorio de la función arterial (MAPA). Posteriormente entraron a una segunda fase (4 semanas) asignándose de manera aleatoria nuevamente a los individuos de cada grupo a administración de alopurinol o placebo y realizando las mismas determinaciones.

RESULTADOS: Se incluyeron en el estudio un total de 15 pacientes. Ocho 8 fueron asignados al grupo con restricción en fructosa y sodio dejando los 7 restantes al grupo con restricción de sodio pero sin restricción de fructosa. Ambas dietas al final del seguimiento presentaron una reducción de TA con una diferencia significativa. Al analizar los deltas de MDA, se evidenció una tendencia a la disminución de ésta molécula al terminar el estudio. En el caso de DNPH, se reportan $p < 0.76$ y $p < 0.05$, a las 4 y 8 semanas respectivamente, alcanzando significancia al final

del seguimiento. Con respecto a ADNmt se observó una amplificación de los genes analizados por RCP-TR, obteniendo un incremento a las 4 semanas ($p < 0.03$) y a las 8 semanas ($p < 0.001$). Ninguna diferencia fue documentada entre los grupos durante el tiempo de seguimiento. Cuando se corrió el análisis en la segunda fase (alopurinol vs placebo), intergrupo y en la totalidad de los individuos, así como en los deltas de los parámetros medidos, no se evidenciaron diferencias significativas.

CONCLUSIONES: Tanto la restricción de sodio y fructosa así como la restricción de sodio estuvieron asociados con un incremento en el ADNmt además de una tendencia en la reducción del estrés oxidativo en las células inmunes circulantes. Ambas dietas fueron igualmente efectivas para reducción de TA con una diferencia significativa. Hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio que evalúa el impacto de una manipulación dietética y farmacológica sobre el ADNmt y estrés oxidativo.

MARCO TEORICO

INTRODUCCION

Datos epidemiológicos nacionales recientes han enfatizado la alarmante prevalencia de las enfermedades crónicas del adulto, en donde el sobrepeso y la hipertensión arterial sistémica (HAS) constituyen una de las principales causas de enfermedad cardiovascular (CV), enfermedad renal y muerte [1, 2]. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2006, el 30.8% de los mexicanos son portadores de HAS [3]. Esta cifra se ha atribuido en parte a la epidemia de obesidad y síndrome metabólico (SM), considerados a su vez problemas de salud pública [3]. En ambos casos, uno de los principales factores que contribuye a su desarrollo es la dieta. La obesidad observada en la actualidad creció en paralelo al consumo de sacarosa y de jarabe de maíz alto en fructosa, lo que ha llevado a un aumento del 30% en la ingesta de ésta última durante los últimos 20 años [4-7].

Se ha evidenciado recientemente que una dieta alta en fructosa parece condicionar un incremento en la presentación de síndrome metabólico (SM) o perpetuar algunas condiciones como resistencia a la insulina, hiperinsulinemia e hiperuricemia [8]. Incluso en adolescentes obesos la ingesta excesiva de bebidas azucaradas se asoció tanto a niveles elevados de ácido úrico (AU) como a un aumento en tensión arterial (TA) [9].

En modelos experimentales y humanos, estudios recientes han observado que la alimentación a base de una dieta alta en fructosa puede inducir sobrepeso, obesidad, HAS, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, así como hiperuricemia [8, 10-16]. La asociación entre el consumo excesivo de fructosa con la elevación de la TA en roedores sugieren como un mecanismo el incremento en los niveles intracelulares de AU [17]. Otros estudios realizados demostraron que la hiperuricemia experimental produce HAS con daño renal caracterizado por vasoconstricción renal, hipertensión glomerular y arteriopatía [10, 11] en donde la administración concomitante de algún fármaco que previene el incremento del AU plasmático (alopurinol, benzodiarona o febuxostat) evitó el desarrollo de la HAS, los cambios metabólicos y las alteraciones renales [10, 11, 18].

También existe evidencia que sugiere la relación entre los niveles de AU y fructosa con TA y SM en ensayos clínicos así como en el modelo experimental, existe evidencia de niveles mayores de angiotensina II, tromboxanos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, proteína C reactiva, molécula de adhesión endotelial tipo-1 (ICAM-1), y proteína quimioatrayente de monocitos (MPC-1), como factor condicionante de inflamación y disfunción endotelial [8, 19].

Por otro lado, aunado a los efectos ya conocidos del alopurinol, (un inhibidor de la xantina oxidasa utilizada para tratar hiperuricemia) se han descrito otros potenciales mecanismos de acción, reduciendo estrés oxidativo y estimulando la síntesis de óxido nítrico, por ende limitando daño endotelial y rigidez vascular [8], por lo que no se descarta que independientemente de los niveles séricos observados de AU se corrobore el beneficio del alopurinol sobre estrés oxidativo y disfunción endotelial.

Existen dos ensayos que han evidenciado el potencial papel favorable de alopurinol sobre TA. El primero no cegado en adultos entre 40 y 65 años con disparidad basal en niveles de AU [20]; y el segundo en adolescentes entre 11 y 17 años de edad con hipertensión estadio 1 e hiperuricemia sin tomar en cuenta dieta o cambios en somatometría [21].

Hasta donde tenemos conocimiento, no existe un estudio clínico controlado en pacientes adultos con HAS que evalúe el efecto del alopurinol sobre la TA y parámetros del SM. Sin embargo, el objetivo primario de este trabajo de tesis es el impacto que tienen estas dos intervenciones sobre el estrés oxidativo y la función mitocondrial.

EPIDEMIOLOGIA DEL SINDROME METABOLICO Y CONSUMO DE FRUCTOSA

Las enfermedades cardiovasculares suponen un problema de salud pública de primer orden. En todo el mundo, 16.7 millones de muertes se deben a enfermedades cardiovasculares. Cinco de las 10 principales comorbilidades para la salud a nivel mundial en población adulta están relacionadas con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y condicionantes del SM: La HAS, tabaquismo, consumo de alcohol, hipercolesterolemia, obesidad y sobrepeso. El actual aumento de la obesidad y el SM se ha constituido como una epidemia y un factor fundamental de esta, se asocia al incremento en la dieta occidental con un importante aporte de calorías y la disminución de la actividad física [4].

Actualmente, el 71.9% de las mujeres y 66.7% de los hombres mayores de 20 años de edad tienen prevalencia combinada para sobrepeso y obesidad. Estos son problemas que afectan a cerca del 70% de la población mexicana entre los 30 y 60 años, en ambos sexos. Así que la prevalencia de obesidad ($IMC > 30$) en los adultos ha ido incrementando con el tiempo. En 1993 la obesidad en adultos era del 21.5%, en 2000 de 24% y, hoy en día se reporta en alrededor del 30% de la población mayor de 20 años, constituyéndose como un importante problema de Salud Pública en nuestro país. Este aumento a su vez, de peso no saludable en los últimos 20 años ha sido en paralelo al incremento del consumo de energía proveniente de las bebidas azucaradas durante el mismo periodo de acuerdo a diversas fuentes [22].

Ya se ha documentado que el consumo de bebidas que proporcionan energía proveniente de la fructosa (jugos, aguas frescas, refrescos y otras bebidas endulzadas) elevan considerablemente la

ingesta de energía de la población mexicana entre un 19 a 22% a expensas de éstos productos solamente [23].

En un estudio desarrollado por el Estado de México y Morelos, se reportó una prevalencia de SM de 26.6 %, con sobrepeso y obesidad en un 56.6%. Aquí se identificó que cada bebida endulzada (sacarosa) se asoció con un incremento del 43.4 mg/dL en los triglicéridos y disminución del colesterol HDL de 12 mg/dL. Además se encontró que los individuos que consumieron más de dos bebidas endulzadas, tienen un riesgo 2 veces mayor a padecer SM en comparación con el consumo estándar [23]. En otros estudios y modelos experimentales, se ha identificado la relación entre la ingesta de bebidas azucaradas con un incremento en el peso y obesidad [24].

También, se ha evidenciado que el promedio de ingestión energética proveniente de bebidas calóricas para los mexicanos mayores de dos años ha aumentado de 100 a 300 kcal al día [25]. Y que durante el periodo comprendido entre 1999 y 2006, la proporción de energía obtenida del conjunto de varias bebidas con aporte energético se ha duplicado, incluidos refrescos, bebidas que contienen jugo de fruta adicionado con azúcar (aguas frescas), jugos de fruta sin azúcar y leche entera. Así, de acuerdo a un comité de expertos en el tema, se cree que el consumo de bebidas en México aporta aproximadamente el 20% de las calorías por día en la dieta y el consumo per capita de refrescos en México es de 440 ml/día y el de sacarosa de 121 gr/día (482 kcal/día), constituyéndose como uno de los principales consumidores de refrescos per capita en el mundo [25].

En las cantidades consumidas actualmente, las bebidas con azúcar y bajo contenido de nutrimentos facilitan la ingestión excesiva de calorías, y en estudios tanto en seres humanos

como en animales, se muestra que tales bebidas no producen saciedad por lo que el efecto neto es un aumento del consumo de energía y por lo tanto la obesidad [25-27].

De igual manera, en una cohorte de enfermeras de Estados Unidos de América, se realizó un estudio prospectivo donde se encontró que las mujeres que consumen una o más porciones de refrescos endulzados con azúcar al día tienen un riesgo significativamente más alto de contraer diabetes mellitus tipo 2 respecto de aquellas que consumen menos de una porción al mes [28].

FRUCTOSA Y METABOLISMO

La fructosa es un azúcar simple que se encuentra en frutas y miel principalmente. Sin embargo la principal fuente de esta cetohexosa es la sacarosa, formada de un 50% de glucosa y 50% de fructosa. Otra importante vía de aporte en la dieta actual y con un incremento en el consumo desde los años 70's son los jarabes de maíz altos en fructosa que desdoblán un 55% de fructosa y 45% de glucosa. La fructosa se absorbe en el intestino mediante transportadores específicos denominados Glut 5, Glut 2 y SLC2A9, de donde se metaboliza en su mayoría a nivel hepático (50 a 75%) dejando el resto en los riñones y tejido adiposo. Se han reportado concentraciones bajas de fructosa en ayuno bajas cercanas a 10-60 uM, sin embargo los niveles de fructosa posprandial alcanzan hasta 2.2 mM en el sistema porta y 1mM en las concentraciones sistémicas [4, 6, 29]. Una vez que la fructosa es absorbida, la enzima fructocinasa (ketohehexocinasa; KHK) es la encargada de continuar su metabolismo y posee dos isoformas, de las cuales la KHK-C es la principal involucrada expresándose primordialmente en el hígado, en el epitelio intestinal, tejido adiposo, endotelio vascular y en las células del túbulo proximal renal [4, 6, 29]. La fructosa presenta diferencias importantes con respecto a la glucosa, resumidas en el siguiente cuadro:

1. Provoca depleción de ATP
2. Carencia de autoregulación
3. Altamente lipogénica
4. Estimula el transportador Glut 5
5. No causa liberación de insulina
6. Produce hiperuricemia

La fructocinasa, consume ATP para fosforilar la fructosa en fructosa 1-fosfato mediante la hidrólisis del ATP. Aquí la aldolasa divide la fructosa 1-fosfato en gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato, en donde ambos pueden ser convertidos a gliceraldehído 3-fosfato. De aquí que, la molécula de fructosa es metabolizada en triosas de fosfato, evitando la acción de la enzima fosfofructocinasa-1 y por consiguiente limitando la glucólisis. Por otro lado, la incorporación de glucosa es regulada mediante la capacidad de almacenamiento a expensas de glucógeno hepático, e inhibición por fosfofructocinasa-1, citrato y ATP interrumpiendo la glucólisis, constituyendo un mecanismo de autorregulación primordial de esta molécula en comparación con fructosa. Así, cantidades mayores de fructosa continúan perpetuando la glucólisis y favorecen la producción ácidos grasos de cadena larga, que posteriormente son esterificados en triglicéridos en gran medida por el aumento en Acetil-coenzima A (CoA) y diacilglicerol incrementando la acumulación de grasa hepática [4, 6, 29] (figura 1).

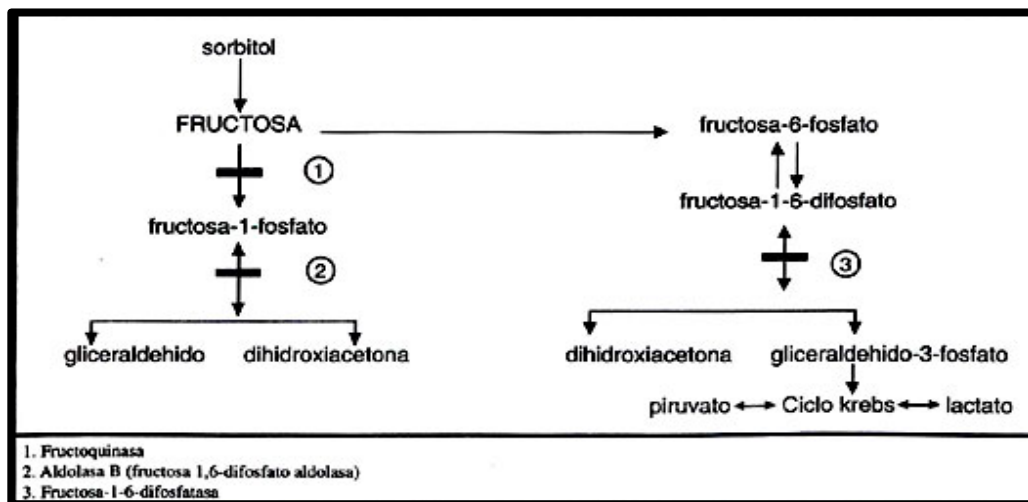


Figura 1. Tomado de Esquivel-Solís V, et al. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. AMC 2007: 49 (4).

En el estudio realizado por Teff y colaboradores, se observó que en aquellas mujeres jóvenes que ingirieron bebidas endulzadas con fructosa, la concentración plasmática de triglicéridos incrementó más rápidamente y alcanzó una mayor concentración, que en aquellas que recibieron bebidas endulzadas con glucosa [29]. Existe evidencia de que durante el consumo de fructosa se incrementa la síntesis de Apolipoproteína B, antecediendo al aumento de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), provocando la elevación de los triglicéridos. Estos cambios en las VLDL se asocian a modificaciones en lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de baja densidad (LDL), lo que se relaciona con el desarrollo de aterosclerosis [30, 31].

Otro efecto a destacar, es que la fructosa no estimula la producción de leptina e insulina, enzimas claves implicadas en la regulación del metabolismo energético, condicionando una alteración en la adiposidad corporal y el desarrollo de obesidad [30].

Sabemos que la insulina es una hormona anabólica que favorece la disposición de los nutrientes ingeridos para su empleo en los diferentes órganos, mediante la estimulación de la captura de glucosa por parte del músculo esquelético y el tejido adiposo. Facilita la disminución de la glucogenólisis así como en la gluconeogénesis hepáticas, y la supresión de la lipólisis con la liberación de ácidos grasos libres de tejido adiposo [31, 32]. En este sentido, vale la pena mencionar algunos estudios realizados en pacientes diabéticos y controles normoglicémicos, demostrando que la fructosa produce un leve incremento de la glicemia y de la insulinemia postprandial, en comparación con otros carbohidratos [31, 33].

Daly demostró en estudios realizados en roedores, que las dietas altas en sacarosa y fructosa reducen la sensibilidad a la insulina [34], también se ha observado en otros estudios con animales de laboratorio, que estas dietas incrementan el consumo total de energía, el peso corporal y la adiposidad [5].

En otro estudio, se evaluó la asociación entre el consumo de fructosa, índice glicémico, consumo de carbohidratos y concentraciones plasmáticas de péptido C, que se han asociado con resistencia a la insulina y con el desarrollo de diabetes tipo 2, concluyendo que las dietas altas en fructosa y el índice glicémico se asocian con el aumento en la concentración del péptido C [5].

FRUCTOSA, HIPERURICEMIA Y SU RELACION CON DISFUNCION ENDOTELIAL Y ESTRES OXIDATIVO

El ácido úrico (AU) es un producto final del metabolismo de las purinas. En contraste con algunos animales, los humanos carecen de la enzima uricasa, que se encarga de la conversión del AU en alantoina. Así el balance existente entre la ingesta diaria, el metabolismo interno de las purinas y la tasa de excreción urinaria determinan los niveles de ácido úrico plasmático. A nivel renal los transportadores del AU incluyen al transportador de urato 1 (URAT-1), transportadores de iones orgánicos (OAT1 y OAT3) y el transportador de urato dependiente de ATP (MRP4) [35, 36].

En contraste con la glucosa, la molécula de fructosa una vez absorbida por sus transportadores, se acompaña de una disminución en la concentración intrahepática de ATP y de los nucleótidos de adenina derivado de la síntesis de fructosa 1-fosfato. En detalle, como se describió previamente, la fosforilación es llevada a cabo por KHK-C, y lleva a la depleción del ATP debido a inhibición de la fosforilación oxidativa del ADP, ya que el fósforo se encuentra secuestrado en la fructosa 1-fosfato. Esta disminución es mediada de igual manera por la actividad de la triosa cinasa que utiliza la molécula para la fosforilación del gliceraldehído a gliceraldehído 3-fosfato. La depleción de fósforo inorgánico y el ATP, facilita la degradación del AMP, vía AMP desaminasa y 5' nucleotidasa, incrementando la concentración de manera recíproca de inosina y la síntesis de AU. Cabe señalar que si la 5' nucleotidasa está activa, el IMP generado es degradado a AU en lugar de ser convertido a AMP [35, 36] (figura 2).

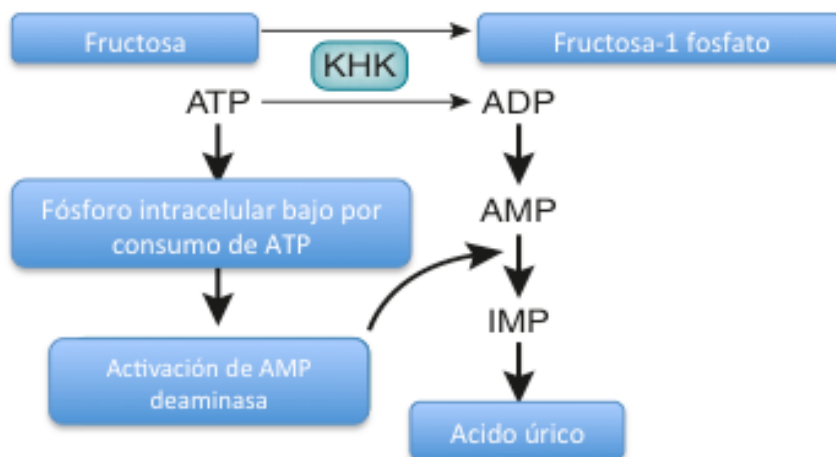


Figura 2. Modificado de Johnson R, Sánchez-Lozada LG, et al. The Effect of fructose on renal biology and disease. J Am Soc Nephrol 2010, 21: 2036-39

El AU tiene un efecto antioxidante, en donde tiene la capacidad de remover especies reactivas de oxígeno como peróxidos (RO₂) y iones hidroxilo (OH), así como reaccionar con la molécula de peroxinitrito y estabilizar la producción de la síntasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en el líquido extracelular. Además en conjunto con el ácido ascórbico puede remover los iones superóxido existentes en el plasma. En contraste surge recientemente una paradoja, el AU posee otra faceta en donde le confieren cualidades prooxidantes y proinflamatorias intracelularmente, mediados por la vía dependiente de la NADPH oxidada [38].

En estudios efectuados a principios de este siglo, la Dra. Mazzali, al inducir hiperuricemia leve a moderada en ratas mediante la administración de ácido oxónico evidenció el desarrollo de hipertensión, y que al administrar manejo farmacológico con alopurinol, pudo documentar el efecto contrario. Este estudio apoyó la hipótesis de que existe un efecto causal de la

hiperuricemia en la incidencia de hipertensión, dependiente de renina como se corroboró en el estudio [16].

En otro modelo de experimentación reportado por Nakagawa, se mostró que disminuir las concentraciones de AU, puede disminuir la prevenir la incidencia de SM inducido por fructosa y no reproducido por glucosa, con disminución de ganancia de peso, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e hipertensión. Este estudio constituye el primer reporte de la evidente relación entre la reducción de los niveles de AU, ya sea por alopurinol o benzbromarona y la incidencia de SM. Adicionalmente en este mismo estudio se pudo identificar que la disminución en el AU correlaciono de manera inversa con la vasorelajación mediada por Acetil Colina en segmentos de arteria aórtica [8]. Posteriormente Khosla, pudo demostrar en ratas a las cuales se les administró un inhibidor de uricasa (ácido oxónico) desarrollaron hiperuricemia, hipertensión y enfermedad microvascular. El punto primordial en este experimento es que permitió documentar una disminución en la sintasa de óxido nítrico (eNOS) y en la producción de nitritos, siendo revertida ante la administración de alopurinol. Además encontró una correlación directa entre los niveles séricos de AU óxido nítrico (ON). De manera agregada evidenció que el AU disminuyó la producción de ON mediada por Factor de crecimiento vascular endotelial (VEFG) en cultivos de células endoteliales (39). Estos dos estudios pusieron de manifiesto el papel de la disfunción endotelial inducida por AU.

También en células endoteliales, Corry y colaboradores, documentaron que el AU bloquea la liberación de óxido nítrico, inhibe la proliferación endotelial y estimula la producción de proteína C reactiva y en células de músculo liso, el AU puede activar la vía específica de la cinasa MAP

(MAPK), Factor de transcripción nuclear (FN-KB), con estimulación de COX-2 y mediadores de inflamación [40].

Por otro lado, en el modelo experimental de SM inducido por fructosa, se investigó su repercusión en la función renal, por lo tanto se expusieron ratas a diferentes concentraciones de fructosa (Fructosa al 10% y al 60%) confirmando el incremento en la incidencia de hipertensión, hipertrigliceridemia e hiperuricemia [17]. La importancia de este modelo es que al momento de valorar la hemodinámica glomerular se reportó un aumento en la presión intraglomerular con disminución concomitante de la tasa de filtración glomerular por nefrona, flujo plasmático glomerular y el coeficiente de ultrafiltración. Al analizar los tejidos por micropunción de arteriolas aferentes en ratas expuestas por 8 semanas a fructosa al 60%, se evidenció la aparición de hipertrofia renal, arteriopatía de los vasos preglomerulares y vasoconstricción cortical [17]. Estos hallazgos se asociaron al incremento de la TA en este modelo [17].

En otro estudio más reciente realizado en ratas normales, la fructosa indujo de igual manera hiperplasia tubular proximal, proliferación de células tubulares y daño tubular focal caracterizado por depósito de colágeno tipo III en el intersticio, incremento de alfa actinina de músculo liso en miofibroblastos y aumento en la infiltración por macrófagos [41]. Integrando estos cambios morfológicos y hemodinámicos señalados en los modelos anteriores se han capitulado como factores fundamentales en la presentación de hipertensión a expensas del sistema renina angiotensina.

De aquí que la información arrojada por los estudios comentados previamente hacen innegable la relación de hiperuricemia e hipertensión, ante la producción de factores condicionantes de disfunción endotelial por un lado y activación del sistema renina angiotensina por el otro, haciendo imposible analizarlos de manera separada, ya que la producción de metabolitos de ambas entidades incluso obligan a añadir un tercer componente interrelacionado condicionante de inflamación llamado estrés oxidativo.

En cuanto al estrés oxidativo, la fructosa provoca daño mediante dos mecanismos hasta el momento descritos, el primero es el incremento de las concentraciones intracelulares de AU, con posterior aumento en la expresión de la oxidasa de NADPH en los adipocitos, células del músculo liso y tejido renal [38]. Esto fue probado por Sautin y cols. donde demostraron que la diferenciación de los adipocitos cultivados de roedores, está incrementada con la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), ante el incremento de AU. De hecho la estimulación de la oxidasa de NADPH depende de la producción de EROS a expensas de AU activa a la MAPK produciendo una disminución en el ON y un incremento neto en moléculas de peroxidación lipídica [42].

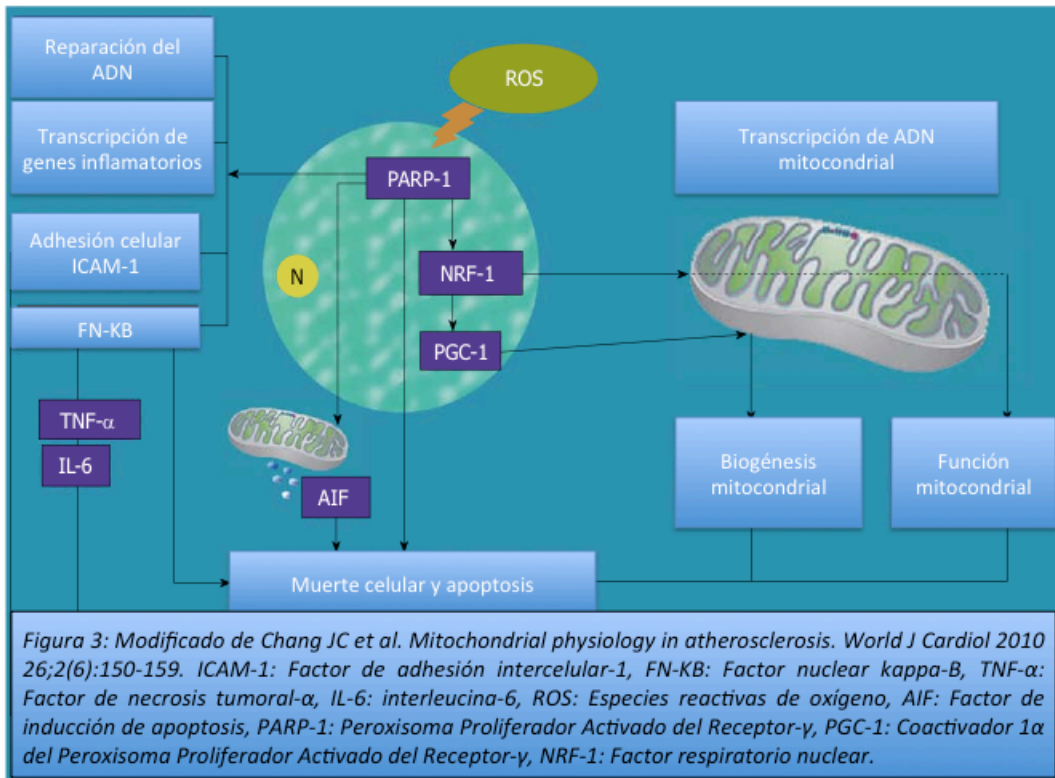
El segundo mecanismo a comentar es la formación de productos finales de la glucosilación avanzada (PGAs) a expensas de fructosa [43]. Se ha señalado que concentraciones de fructosa de hasta 1 mM posprandial, reducen los niveles de ATP en células endoteliales vasculares y tubulares proximales. La importancia de la disminución en los niveles de ATP, radica en simular un estado de isquemia con la producción concomitante de proteínas inflamatorias condicionando estrés oxidativo y depleción de ATP.

Incluso en 19 sujetos con sobrepeso y obesidad, se ha reportado una disminución de las reservas de ATP hepático ante la administración de 0.5 ml/kg de una solución de fructosa al 50%. Esto fue probado al realizarles resonancia magnética nuclear en intervalos de 5 minutos durante una hora. Este grupo pudo documentar una relación inversamente proporcional en la cantidad de ATP hepático y el incremento en el índice de masa corporal (IMC) [44].

Por otro lado, al estimular células endoteliales aórticas humanas con concentraciones fisiológicas (5mM) de fructosa se puede inducir la expresión de molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) y en donde se ven implicadas la inhibición de la eNOS [18]. Además en células tubulares renales (human kidney-2; HK-2) a concentraciones similares de fructosa, se pudo evidenciar la producción de proteína quimiotáctica de monocitos tipo-1 (MCP-1) [45]. De manera adicional la fructosa estimula la síntesis de metilglioxal que al reaccionar con proteínas incrementan los PGAs. Incluso Wang, hizo evidente la inhibición de la producción de PGAs, prevención de hipertensión, reducción de triglicéridos y metilglioxal, disminución de la remodelación en la aorta y vasos mesentéricos, así como disminución de la eNOS ante la administración de metformina [46].

PAPEL DEL ADN MITOCONDRIAL EN EL SINDROME METABOLICO

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula bicatenaria, circular, cerrada, sin extremos (cromosoma mitocondrial). Tiene un tamaño de 16.569 pares de bases, conteniendo un pequeño número de genes, distribuidos entre la cadena H (heavy) y L (light), debido a su diferente densidad. En él se codifican 24 ARNs requeridos para la síntesis de proteínas mitocondriales (Dos ARN ribosómicos y 22 ARN de transferencia) y 13 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa [47]. El ADNmt contiene 37 genes, a diferencia de los 20.000 a 25.000 genes del ADN cromosómico nuclear. El cromosoma mitocondrial se organiza en nucleótidos de tamaño variable de 0.068 nanómetros aproximadamente y formados por entre 5-7 cromosomas y proteínas reguladoras de fosforilación oxidativa. Estas proteínas permiten regular la codificación de nuevo ADNmt mediante la interacción de diferentes factores nucleares [47]. Una de estas proteínas es el Factor A de transcripción mitocondrial (Tfam), principal factor para la elaboración de la cantidad de copias de ADNmt, aunque el encargado de codificar genes nucleares relacionados a la respiración mitocondrial, regulando la síntesis y replicación de ADNmt, es el Factor Respiratorio Nuclear (NRF-1). Este factor interactúa directamente con el Peroxisoma Proliferador Activado del Receptor Gamma (PPAR- γ) y con el Coactivador 1 α del Peroxisoma Proliferador Activado del Receptor- γ (PGC-1 α) para estimular la formación de ADNmt (Figura 3) [48]. A este respecto, la producción de ROS induce la producción de citocinas inflamatorias y Factor Nuclear Kappa-B (NF-KB) a nivel intracelular, condicionando lisis celular y apoptosis. Por otro lado, ante la estimulación de ROS intracelulares, la biogénesis de ADNmt, esta mediada por un fenómeno de regulación a la alza a través del factor NRF-1 [48].



Kim reportó que con la sobreexpresión del gen PGC-1 α , principalmente estimulado por NRF-1, en células endoteliales y humanas de músculo liso aórticas, se indujo una reducción significativa en la producción de ROS mitocondriales (ROSmt), así como de la oxidasas de NADPH y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α). Estas conclusiones implicaron que PGC-1 α actúa como mediador y promotor de la cascada de defensa ante las ROSmt. Existen otros reportes evidenciando la estimulación también de este factor ante la exposición de ejercicio en el músculo esquelético [49]. Se ha documentado que el contenido de ADNmt, se encuentra disminuido en niños recién nacidos con peso anormal al nacer, en comparación con niños de peso adecuado para la edad gestacional. Esto ha hecho especular acerca de la implicación que tiene esta depleción en los niveles de ADNmt y el desarrollo fetal incluso con complicaciones metabólicas y cardiovasculares en la edad adulta [50]. La interrelación que tienen las alteraciones en la función

mitocondrial y la patogénesis del SM, se han probado en diversos estudios [51] y evidenciando defectos en el metabolismo oxidativo y resistencia a la insulina en tejido graso y en músculo esquelético de hecho cambios en el ADNmt se han relacionado con la patogénesis de diabetes mellitus tipo 2, mientras que el contenido de ADNmt en leucocitos de sangre periférica se asoció a resistencia a la insulina en población adulta [52]. De igual manera se ha demostrado que la leptina induce la expresión de PGC-1 α en tejido adiposo con el consiguiente aumento en la biogénesis de ADNmt [53].

De hecho Gianotti, en una cohorte de 175 adolescentes, calculó el índice HOMA, los dividió en resistentes y no resistentes a la insulina. Se les determinó ADNmt y ADN nuclear (ADNn) por reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (RCP-TR), pudiendo demostrar que la relación entre ADNmt/ADNn se encontró significativamente disminuida en el grupo con resistencia a la insulina. Adicionalmente esta relación ADNmt/ADNn correlacionó negativamente con el índice HOMA (R:-0.18, p<0.03), glucosa (R:-0.21, p<0.008) y con AU (R:-0.18, p<0.03). Analizó de igual manera los genotipos de PPAR- γ y PGC-1 α , sin encontrar relación entre el ADNmt/ADNn [54]. Además en un modelo experimental en ratas, se aislaron células de tejido adiposo y al inducir la producción de ON mediante GMPc, se pudo evidenciar el incremento en la producción de ADNmt y activación del PGC-1 α , explicando la relación entre el ON y la regulación de este gen para la producción de ADNmt [55]

EVIDENCIA CLINICA DEL IMPACTO DE LA FRUCTOSA EN SINDROME METABOLICO

Si bien los estudios a nivel experimental han mostrado una relación definitiva entre el consumo de fructosa y sus efectos sobre el SM y HAS, la evidencia en estudios clínicos ha emergido en la última década. En un estudio que incluyó a 4867 participantes entre 12 y 18 años de edad utilizando la cohorte de NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) se demostró una asociación importante entre la ingesta excesiva de bebidas azucaradas y los niveles elevados de AU así como un efecto sobre el incremento en la TA. En este estudio se observó que la administración de fructosa pero no glucosa ocasionó el incremento significativo de la TA [21]. Posteriormente estos efectos se demostraron en adultos de la misma cohorte (NHANES) entre el año 2003 a 2006, en donde se incluyeron 4528 adultos sin historia de hipertensión, con ingestas promedio de fructosa cuantificadas en 74 gr/día o mayores (2.5 bebidas azucaradas/día), se reportó que el consumo de este monosacárido se asoció significativamente a una elevación en la TA. Este consumo promedio incrementó el riesgo de hipertensión en un 26, 30 y 77% para TA > o igual a 135/75 mmHg, > o igual 140/90 mmHg y > 160/100 mmHg, respectivamente [56].

A pesar de que los estudios sobre la ingesta de fructosa en humanos se ha asociado a hipertensión, la evidencia de la restricción de la fructosa en la dieta sobre la TA y SM es limitada. El grupo de la Dra. Madero en el departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología, evaluó el efecto de una dieta baja en fructosa sobre los parámetros del SM. Se incluyeron a 131 individuos entre 18 y 60 años de edad, de ambos géneros, con IMC mayor de

25kg/m², sin morbilidad reconocida ni embarazo, que tuviesen TA menor a 140/90mmHg y glucosa en ayuno entre 60 y 100mg/dl. Los participantes se asignaron al azar en 2 grupos: Dieta muy baja en fructosa (ingesta menor a 20 gramos al día) o dieta moderada en fructosa (70 gramos al día). Ambos grupos recibieron un plan alimenticio en base a su gasto energético basal y que resultó en una restricción calórica con respecto a su gasto energético total. Tras un periodo de 6 semanas, en ambos grupos se observó una pérdida de peso significativa de 2.94±2.18 kg y 4.07±2.39 kg en los grupos de muy baja fructosa y fructosa moderada respectivamente, siendo también significativa la diferencia entre ellos, aspecto que fue discutido en términos del efecto antioxidante de las frutas naturales que contenía el segundo grupo. De igual forma, se observó en ambos una disminución en TA sistólica y diastólica, colesterol total, triglicéridos, resistencia a la insulina y niveles de AU, sin diferencia entre los grupos en estas variables [57].

Cuando se agrega el alopurinol como intervención en otros ensayos, se ha comprobado un resultado favorable en los desenlaces cuando se ha valorado función renal, como lo reportado por Kanbay en pacientes asintomáticos y con función renal normal al inicio del estudio, en donde se administró alopurinol a 48 de los individuos con hiperuricemia y 21 normouricémicos. Posterior a tres meses de tratamiento, se encontró un incremento en la tasa de filtrado glomerular (TFG) de 79 a 92 ml/min, asociándose a una disminución de 2.5 mg/dL en los niveles de AU [58].

Existen solo dos ensayos que han evidenciado el potencial papel favorable de alopurinol sobre TA, el primero, realizado por Pérez-Pozo y colaboradores [20] documentó el aumento en la incidencia de SM en 74 individuos a los cuales se les administró 200 gr de fructosa diario por 2 semanas, generando un incremento en la TA de 7±2mmHg y de 5±2mmHg en las cifras sistólicas

y diastólicas respectivamente, y una incidencia 25 a 30% mayor de SM. La asignación al azar de alopurinol previno tanto el incremento de la TA como la incidencia de SM comparado contra placebo. Este estudio no fue doble ciego y se enfocó en sujetos entre 40 y 65 años de edad, sin especificación de IMC aunque en promedio se encontraban en sobrepeso, y con niveles de ácido úrico de 5.2 y 6.0 mg/dl en los grupos sin y con alopurinol respectivamente, teniendo diferencia significativa entre ellos desde el inicio [20].

El segundo, un ensayo clínico controlado con asignación al azar, este sí doble ciego, realizado por Feig y colaboradores, reportó una disminución de la TA (sistólica de -6.9 mmHg vs -2.0 mmHg, y diastólica de -5.1 mmHg vs -2.4 mmHg) con la administración de 400mg de alopurinol diarios durante 4 semanas contra placebo en 30 adolescentes (edad entre 11 y 17 años) que eran portadores de HAS estadio 1 de reciente diagnóstico (cifras mayores que la percentil 95 para edad, género y talla) con niveles de AU mayores a 6 mg/dl y ausencia de antihipertensivos. No se hicieron comentarios sobre dieta en los grupos de estudio [9].

Recientemente se reportó en un estudio piloto de 28 pacientes, la implicación que tiene la restricción de fructosa (12gr/día) en pacientes con Enfermedad Renal Crónica estadio 3 y 4 (Guías DOQI). Los resultados arrojaron una disminución de la TA ante la intervención en un grupo de pacientes etiquetados como “dippers” (reducción nocturna de TA sistólica y TA diastólica > 10%). También disminuyeron otras determinaciones como insulina en ayuno, PCR de alta sensibilidad e ICAM-1. Estos últimos parámetros confirman nuevamente lo documentado en modelos experimentales con respecto a la relación entre disfunción endotelial mediada por fructosa [59].

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Tiene efecto en la función mitocondrial y marcadores de estrés oxidativo, en individuos adultos con TA normal alta o prehipertensión y sobrepeso u obesidad, la administración de una dieta con restricción en fructosa y sodio, así como el tratamiento con alopurinol?

JUSTIFICACION

Los estudios expuestos en el marco teórico que apoyan la relación entre SM inducido por fructosa y AU, así como el establecimiento de HAS condicionando disfunción endotelial y estrés oxidativo, abren la posibilidad de incidir sobre ellos con fines de prevención o tratamiento en poblaciones de riesgo. Hasta donde tenemos conocimiento, no existe ningún estudio aleatorizado en población adulta joven con SM que evalúe el impacto de restringir fructosa y sodio (sin restricción calórica) y administrar alopurinol sobre la función mitocondrial y los marcadores de estrés oxidativo.

Es sabido que las EROS tienen una vida muy corta, por lo que una alternativa para evidenciar la presencia de estrés oxidativo es medir los productos estables finales de las reacciones oxidativas, como los grupos carbonilo que se originan por la acción de las EROS sobre las proteínas, por lo que se realizaron determinaciones de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). También se determinó malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica con la intención de documentar la relación existente entre estrés oxidativo con restricción de fructosa y sodio, así como la administración de alopurinol.

Por otro lado el hecho de determinar ADNmt con el propósito de cuantificar disfunción mitocondrial y poder correlacionar estos resultados con los reportados por estrés oxidativo, y a su vez integrar los mismos con las intervenciones propuestas (restricción de fructosa y administración de alopurinol) constituye una oportunidad para establecer la repercusión del SM

inducido por fructosa, hiperuricemia sobre mecanismos celulares de daño a este nivel. Esto suena factible cuando se compara la necesidad de obtener tejido hepático o grasa en pacientes para aislar el ADNmt en comparación con la determinación del mismo en células circulantes (leucocitos) eliminado el riesgo para el paciente que implica un procedimiento intervencionista

HIPOTESIS

Hipótesis alterna: En individuos adultos (edad de 18 a 60 años) con TA normal alta o prehipertensión (definida como TA sistólica entre 126-140mmHg y diastólica entre 80-90mmHg) y sobrepeso u obesidad (IMC mayor a 25kg/mts²), la administración de una dieta con restricción en fructosa y el tratamiento con alopurinol tendrá un efecto sobre la función mitocondrial (ADNmt) y marcadores de estrés oxidativo (MDA, DNPH) en celular inmunes humanas circulantes.

OBJETIVOS

Primario

Evaluar el efecto de una dieta con restricción en fructosa y el tratamiento con alopurinol sobre la función mitocondrial (ADNmt) en leucocitos (o células inmunes circulantes), en sujetos con TA normal alta o pre hipertensión y con sobrepeso u obesidad.

Secundario

Evaluar el efecto de una dieta con restricción en fructosa y el tratamiento con alopurinol sobre la marcadores de estrés oxidativo en leucocitos (o células inmunes circulantes), en sujetos con TA normal alta o pre hipertensión y con sobrepeso u obesidad.

TIPO DE ESTUDIO

Estudio piloto, clínico controlado, con asignación al azar, doble ciego, de 2 grupos en paralelo.

DESCRIPCION DE LA POBLACION

Población objetivo

Individuos adultos (de 18 a 60 años) de ambos géneros, con TA normal alta o pre hipertensión (sistólica entre 126 y 140 mmHg y diastólica entre 80 y 90 mmHg), con sobrepeso u obesidad (IMC mayor de 25 kg/m²) y consumo de fructosa no a expensas de frutas >70 gramos/día.

Población accesible

Voluntarios enterados a través de medios de difusión impresos en sitios públicos como centros comerciales, plazas, transporte público, además de salas de espera de bancos de sangre y centros de atención médica enfocándolo a familiares o acompañantes de pacientes en la Ciudad de México.

Población elegible

Sin morbilidad reconocida (HAS; diabetes mellitus; enfermedades renales, hepáticas, neurológicas, oncológicas y hematológicas, principalmente anemia o trastornos de la coagulación; así como tratamiento farmacológico de cualquier índole) y con escrutinio por laboratorio inicial sin alteración en perfil de función hepática, citopenias y con función renal estimada mayor a 60 ml/min/1.73m² SC.

CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION Y ELIMINACION

Criterios de inclusión

1. Personas adultas (de 18 a 60 años de edad)
2. Ambos géneros
3. Residentes del Distrito Federal
4. TA normal alta o pre hipertensión (sistólica entre 126 y 140 mmHg y diastólica entre 80 y 90 mmHg)
5. Sobrepeso u obesidad (IMC mayor de 25 kg/m²)
6. Ingesta de fructosa no a expensas de frutas >70 gramos/día

Criterios de exclusión

1. Ingesta menor de 70 gramos de fructosa al día al interrogatorio
2. Personas que se encuentren participando en algún protocolo al momento del interrogatorio
3. Personas con morbilidades conocidas como diabetes mellitus, enfermedad renal crónica, enfermedad hepática, HAS, neoplasias, hematológicas, etc.
4. Cualquier tratamiento farmacológico incluyendo hormonal, polivitamínicos, naturistas y homeopáticos
5. Alteración de pruebas de función hepática (transaminasas o bilirrubinas arriba del punto de corte normal) o citopenias en biometría hemática (leucocitos menores de 3,000/mm³, neutrófilos menores de 1,500/mm³, hemoglobina menor de 10 g/dl, plaquetas menores de 100,000/mm³) en la muestra de escrutinio basal
6. Embarazo actual

Criterios de eliminación

1. Requerimiento de fármacos durante el periodo de estudio (TA mayor de 160/100, glicemias en ayuno mayor de 200mg/dl, colesterol LDL mayor de 190 mg/dl, triglicéridos mayor de 500 mg/dl)
2. Niveles de AU menor de 2mg/dl o mayor de 12 mg/dl
3. Embarazo
4. Detección de enfermedad grave en el periodo de estudio (infecciosa, neoplásica, CV, neurológica) o requerimiento de hospitalización por causa médica o quirúrgica
5. Efectos adversos demostrados clínica o bioquímicamente derivados del medicamento de estudio (reacción alérgica, depleción de cuentas celulares en biometría hemática o alteración de pruebas de función hepática)
6. Deseo del paciente de suspender protocolo
7. Incumplimiento del protocolo (dieta, fármaco, o no acudir a dos consultas consecutivas)
8. Variación de 2 kg o más con respecto a peso basal previo a la asignación al azar

VARIABLES

Independientes

1. Prescripción de dieta isocalórica hiposódica con y sin restricción en la ingesta de fructosa
2. Maniobra farmacológica: Alopurinol (300mg diarios) contra placebo

Dependientes

1. Marcadores de estrés oxidativo: Proteínas carboniladas (2-4 dinitrofenilhidrazina, DNPH) y Peroxidación lipídica (Malondialdehído, MDA)
2. Función mitocondrial (Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo Real, RCP-TR)

MATERIAL Y METODOS

Posterior a la descripción de los procesos, objetivos, derechos, responsabilidades, potenciales riesgos y beneficios del protocolo, se solicita la firma de consentimiento informado como requisito indispensable para su ingreso (Se anexa formato de consentimiento informado, Anexo1).

El equipo de investigadores se distribuye en lo siguiente: dos elementos para obtención de información clínica y de laboratorio que a su vez vacían datos a la base concentradora, encargándose igualmente del seguimiento de dietas. Un tercer elemento con tarea de supervisión, evaluación de resultados de laboratorio o efectos adversos, y decisión sobre aspectos no considerados en el protocolo. Un cuarto elemento siendo éste el único enterado de la asignación de fármacos y su control, sin contacto con pacientes del protocolo. El protocolo consiste en las siguientes etapas:

1. Fase de reclutamiento (aprox 8 semanas).
2. Fase pre-aleatorización con dieta isocalórica sin restricción alguna (2 semanas).
3. Fase de primera intervención (4 semanas) de 2 grupos con aleatorización a restricción de fructosa o sin restricción de fructosa (mencionados debajo):
 - a. Dieta isocalórica hiposódica y restricción de fructosa
 - b. Dieta isocalórica hiposódica y sin restricción de fructosa
4. Fase de segunda intervención (4 semanas) de los 2 grupos previos con aleatorización a placebo o alopurinol

- a. Dieta isocalórica hiposódica y restricción de fructosa + placebo
- b. Dieta isocalórica hiposódica y restricción de fructosa + alopurinol
- c. Dieta isocalórica hiposódica y sin restricción de fructosa + placebo
- d. Dieta isocalórica hiposódica y sin restricción de fructosa + alopurinol

Descripción de planes de alimentación

1. Dieta isocalórica hiposódica y sin restricción de fructosa: Corresponde al consumo habitual en contenido calórico y proporción de macronutrientes en los pacientes con ingesta de sodio menor a 2.5 gramos/día e ingesta de fructosa de acuerdo a su ingesta basal calculada.
2. Dieta isocalórica hiposódica y restricción de fructosa: Corresponde al consumo habitual en contenido calórico y proporción de macronutrientes en los pacientes con ingesta de sodio menor a 2.5 gramos/día e ingesta de fructosa no a expensas de frutas <20 gramos/día.

En todos los grupos se indicará continuar con la misma actividad física que realizaba previo al inicio del protocolo. Para la determinación de ingesta basal se evaluó utilizando un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, diseñado y validado por el Instituto Nacional de Salud Pública con un paquete de captura independiente que despliega reporte automatizado, además el paciente acudirá con un diario de alimentación de 5 días. Para la determinación de ingesta basal de fructosa se utilizó un instrumento desarrollado en la Universidad de Colorado por el grupo de investigación del Dr. Johnson. Para la determinación de ingesta basal de sodio se empleó el

software Nutricalc®, desarrollado por Licenciados en Nutrición Clínica. Para evaluar el apego en la dieta se verificó mediante interrogatorios realizados en cada visita programada cada 2 semanas, donde se valoró el apego a los alimentos y bebidas (dieta instaurada). Se consideró un apego aceptable el 80%, en función del cumplimiento de la dieta instaurada mediante la verificación de los diarios realizados por los pacientes en cada visita.

La asignación de los pacientes a cada grupo de intervención se realizó por medio de tabla de números aleatorios. La elaboración del placebo la realizó la empresa ISP Corp México. El fármaco correspondiente se distribuyó en frascos cerrados etiquetados con la fecha y datos del paciente conteniendo 14 tabletas, regresándose cada dos semanas al evaluador clínico. No obstante el investigador encargado del manejo de fármacos fue el único responsable del conteo de tabletas como indicador del apego al tratamiento.

El peso corporal se medirá de forma instrumentada con báscula de piso previamente calibrada marca SECA, modelo 700. La estatura se midió con estadímetro SECA 220. La circunferencia de cintura y cadera se midió con una cinta antropométrica de fibra de vidrio marca Gulick por dos evaluadores mutuamente cegados; se colocó al paciente en bipedestación, tomando como referencia el punto medio entre el borde costal y la cresta ilíaca para la cintura, y la parte más ancha de la pelvis a nivel de la articulación coxofemoral para la cadera, determinadas en espiración profunda. La TA se midió en 3 ocasiones tras 10 min de reposo en posición sedente y 5 min de intervalo entre cada medición, con esfigmomanómetro aneroide de pared marca Welch Allyn modelo Tyco con 2 medidas de brazalete adaptable dependiendo de la circunferencia de brazo. Las mediciones de TA continua ambulatoria (MAPA) se realizan a través del monitor

BTL08ABPM. Las evaluaciones y tomas de muestras de sangre y orina se llevaron a cabo en el Área de Investigación Clínica del Departamento de Nefrología en el 4º piso de Nuestro Instituto. Se extrajeron 50 ml. de sangre y 50 ml. de orina.

Las muestras para mediciones de MDA se colectaron en tubos con EDTA como anticoagulante, se centrifugaron 500 microlitros de sangre total a 2500 revoluciones por 10 minutos a 4 grados C. Se utilizaron 200 microlitros para medición por técnica colorimétrica mediante el kit de ensayo de peroxidación lípica de CALBIOCHEM. Para cuantificación de proteínas carboniladas (DNPH), se incubaron 300 microlitros de la muestra con 100 microlitros de estreptomicina al 10%, se centrifugaron a 20000 revoluciones a 4 grados C por 40 minutos. Posterior a realizar adiciones de DNPH, HCl, TCA, en tres tiempos distintos con centrifugación a 2236 revoluciones a 4 grados C y desechos subsecuentes del sobrenadante, se realizó la lectura de la absorbencia de DNPH y se calculó el contenido de carbonilos usando el coeficiente de absorción.

Para realizar el análisis del ADNmt, se colectaron 7 ml de sangre de cada individuo en las fases de reclutamiento, primera y segunda intervención, en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. La extracción del ADN total, se realizó mediante el método de salting out [60]. La evaluación del mismo fue por Reacción en Cadena de Polimerasa en tiempo real (PCR-rt). Para el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores mtF3212 (5' CACCCAAGAACAGGGTTTGT 3') y mtR3319 (5' TGGCCATGGGTATGTTGTAA3') y la sonda TaqMan 6FAM-5'TTACCGGGCTCTGCCATCT 3' (Applied Biosystems). Como control endógeno se utilizaron oligonucleótidos iniciadores para el gen *18sRNAr* (subunidad 18s del ARN ribosomal) como

parámetro de la medición del ADN nuclear, con una sonda Taqman marcada con el reportero fluorescente VIC (Applied Biosystems). La reacción de PCR se llevó a cabo por triplicado, con una solución Master Mix Universal TaqMan 1X, 500 nanomoles (nM) de cada oligonucleótido iniciador, 200 nM de cada sonda TaqMan y 40 ng de ADN genómico total para cada muestra. El análisis cuantitativo por Tiempo Real se realizó con el software Sequence Detector System ABI-Prism 7700. Se utilizaron diluciones 1:2 del ADN genómico con una concentración de 160 ng/ml a 10 ng/ml para construir una Curva Estándar con los valores C_T (Cycle Treshold) arrojados por la amplificación de los productos de PCR (Figura 4 y 5). Se obtuvieron las curvas de amplificación para cada muestra y el valor de C_T se usó para hacer las comparaciones entre el ADNmt y el control endógeno *18sRNAr*. Posteriormente se obtuvo nuevamente el radio de la cantidad de ADNmt mediante el cociente $C_T\text{ADNmt}/C_T18\text{sARNr}$. La cantidad de ADN mt resultó restando el valor de $C_T\text{ADNmt}$ menos el $C_T18\text{sARNr}$ (método ΔC_T).

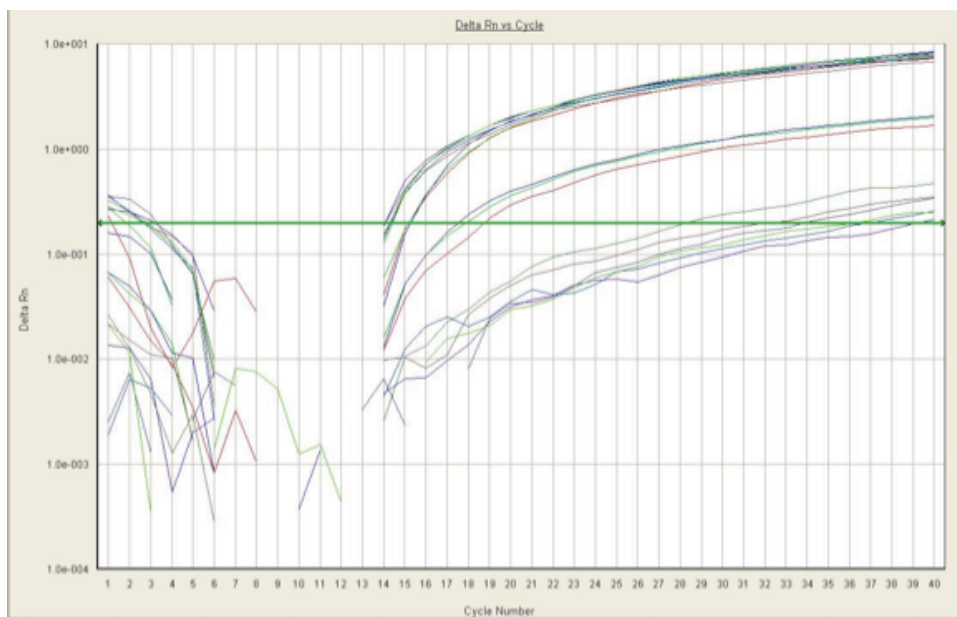


Figura 4. Representación esquemática de la curva de amplificación de un individuo con diferentes C_T para cada tratamiento.

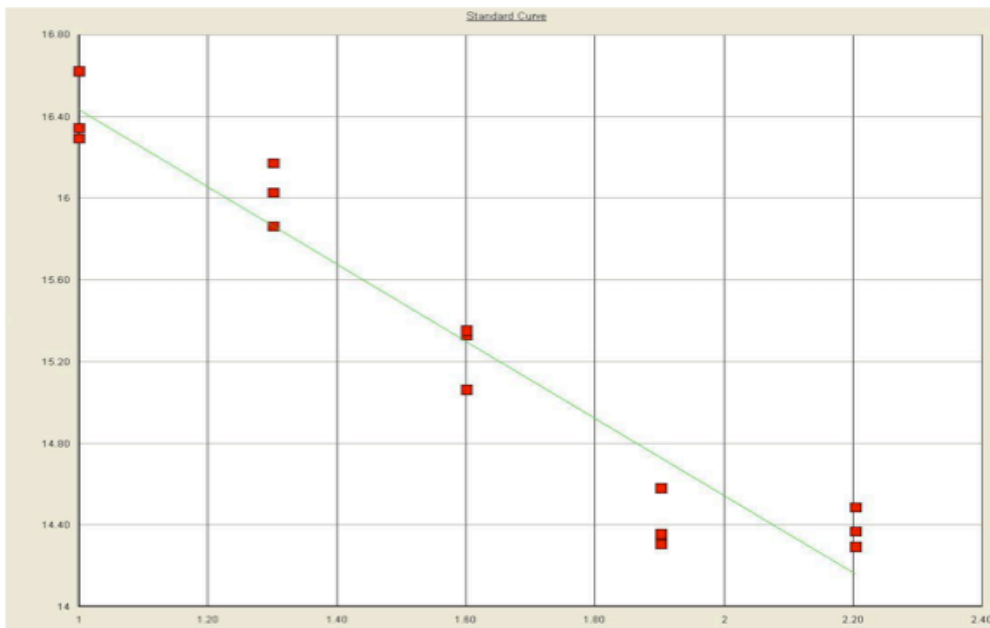


Figura 5. Representación esquemática que ejemplifica la curva estándar que ajusta la concentración de ADN a utilizar para el análisis del ADNmt.

El resto de las determinaciones de laboratorio fueron automatizadas con el autoanalizador ILAB 300 PLUS para el caso de glucosa por método enzimático de glucosa oxidasa; AU por método enzimático de uricasa; triglicéridos por método enzimático con lipoprotein lipasa, glicerol cinasa, glicerol fosfato oxidasa y peroxidasa; colesterol por método de Allain modificado para colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa y creatinina por reacción de Jaffé. Las mediciones de gamma-glutamil transpeptidasa se realizaron por espectrofotometría cinética con la técnica de sustrato carboxilado; AST por el método enzimático con malato deshidrogenasa y ALT con lactato deshidrogenasa. En un tubo con anticoagulante EDTA se analizó la biometría hemática completa a través del principio de impedancia eléctrica, conductividad, láser de helio-neón y dispersión de luz con ayuda del equipo COULTER Gen-S Hematology Analyzer. La prueba inmunológica rápida de embarazo se llevó a cabo a través de la determinación en tira reactiva de orina de gonadotropina coriónica humana, con una sensibilidad a partir de 25 UI/L.

ANALISIS ESTADISTICO

La captura de datos se llevó a cabo en el programa Excel, con información basal y subsecuente del seguimiento incluyendo antropometría, laboratorios, y efectos adversos en cada visita. Los resultados se expresaron para variables cuantitativas como promedio \pm desviación estándar o mediana con rango intercuartílico según su distribución. Las comparaciones se hicieron empleando χ^2 para proporciones, correlaciones de Pearson o Spearman entre cuantitativas, y comparación de medias mediante prueba de ANOVA (comparación entre grupos) o t-pareada para muestras dependientes (comparaciones intragrupo antes-después), o bien se usaron sus alternativas no paramétricas (Kruskal-Wallis o Wilcoxon respectivamente). Se consideró una diferencia significativa con $p < 0.05$ y se utilizó el programa estadístico SPSS 18.

RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 15 pacientes y en donde de manera aleatorizada 8 fueron asignados al grupo con restricción en fructosa y sodio dejando los 7 restantes al grupo con restricción de sodio pero sin restricción de fructosa. Una vez asignados los individuos a su correspondiente grupo de intervención se determinaron las características basales (Tabla 1).

El grupo sin restricción de fructosa incluyó individuos de mayor edad en comparación con el grupo contrario (51.8 ± 10.02 vs 44.4 ± 11.51) aunque sin diferencia significativa. En el resto de los parámetros de somatometría no se evidenciaron mayores diferencias. A pesar de no presentar diferencia estadística entre el peso basal de los dos grupos, si existió una diferencia en las medias de hasta 9 kilogramos de peso a favor del grupo con restricción de fructosa. En cuanto a los parámetros de laboratorio se evidencio una diferencia en los triglicéridos (TGL) de 199 ± 112 mg/dL del grupo sin restricción de fructosa en comparación con 174 ± 86 mg/dL a los individuos a los cuales se les restringió la misma ($p=NS$). En cuanto a colesterol total, glucosa, y ácido úrico no se presento una diferencia importante al momento del inicio del estudio. Cuando se realizaron las mediciones de TA por MAPA se reportan en la tabla los promedios de la cifras sistólicas y diastólicas: globales (periodo de 24 horas), promedio día (entre las 8:00 y las 22:00hrs) y promedio noche (22:00 a 8:00 horas del día siguiente). En estas determinaciones al momento del inicio no se documentaron diferencias entre los grupos. Con respecto a los indicadores de estrés oxidativo y a la función mitocondrial tampoco fueron evidentes cambios significativos.

En la semana 4 de seguimiento (Tabla 1), se realizaron las mismas determinaciones y comparaciones entre los parámetros de ambos grupos y presentaron un comportamiento similar al momento basal sin diferencias significativas. Sin embargo referente al peso, el grupo sin restricción de fructosa presentó un aumento (85.54 ± 18.21 a 87.67 ± 21 kg) y el grupo con restricción de fructosa una disminución del mismo (96.77 ± 16.69 a 94 ± 17 kg) sin tener significancia cuando se analizaron los deltas de estas variables. Al final del seguimiento (Tabla 1), tampoco se reportaron diferencias significativas entre grupos a pesar de presentar una tendencia en los resultados a favor del grupo con restricción de fructosa en las cifras de triglicéridos, las determinaciones de TA sistólicas y diastólicas globales, promedio día y promedio noche. En cuanto al peso, al final del seguimiento, no mostró significancia la disminución de 3 kg aproximados en el grupo con restricción de fructosa.

Al analizar los deltas de las medias en diferentes variables se encontró una disminución, cuando se contrastaron los niveles basales vs a la semana 8 de TGL (186.5 ± 99 vs 161 ± 60.5 mg/dL) y AU (6.3 ± 1.3 vs 5.27 ± 1.42 mg/dL) sin significancia estadística.

En la tabla 2, se pueden observar las ingestas basales de macronutrientes y fructosa como se señaló en la sección de metodología para posteriormente prescribirles la dieta con restricción de fructosa a los individuos seleccionados. Cuando se compararon los grupos en el momento basal con respecto a la cantidad de kilocalorías, macronutrientes, fructosa total, fructosa proveniente de las frutas y la ingesta de sodio no se encontraron diferencias significativas.

Tabla 1: Comparación entre grupos al momento del inicio de la intervención, a las 4 y 8 semanas de los parámetros evaluados.

	BASALES			SEMANA 4			SEMANA 8		
	Sin restricción de fructosa	Con restricción de fructosa	p	Sin restricción de fructosa	Con restricción de fructosa	p	Sin restricción de fructosa	Con restricción de fructosa	p
Somatometría									
Edad (años)	51.8+/-10.02	44.4+/-11.51	NS						
Talla (cm)	1.59+/-0.144	1.72+/-0.083	NS						
Peso (kg)	85.54+/-18.21	96.77+/-16.69	NS	87.67+/-21	94+/-17	NS	85.05+/-18.97	93.73+/-16.66	NS
IMC	33.59+/-2.16	32.41+/-4.255	NS	33.49+7-2.26	31.97+7-4.15	NS	33.4+7-2.38	31.91+/-3.92	NS
Cadera (cm)	110+/-6.5	109+/-7.14	NS	110.36+/-7.28	109.23+/-7.28	NS	109.11+/-7.13	107.14+/-7.37	NS
Cintura (cm)	106.7+/-10.5	108+/-12.7	NS	106.31+/-10.35	106.63+/-12.64	NS	106.06+/-7.95	105.79+/-13.33	NS
Parámetros laboratorio									
Colesterol (mg/dL)	200+/-47.47	205+/-46.62	NS	191.14+/-51.37	188.75+/-31.02	NS	188.57+/-61.73	180+/-15.5	NS
Triglicéridos (mg/dL)	199+/-112	174+/-86	NS	188.43+/-110	148+/-78	NS	174.29+/-69.7	148.63+/-52.64	NS
Glucosa (mg/dL)	90.71+/-6.42	93.63+/-12.4	NS	94.1+/-6.59	91+/-6.18	NS	97.57+/-9.25	97.63+/-7.98	NS
Acido Úrico (mg/dL)	6.09+/-1.3	6.64+/-1.287	NS	6.39+/-1.76	6.84+/-1.34	NS	5.04+/-1.2	5.53+/-1.65	NS
MAPA (mmHg)									
Global Sistólica	142.14+/-9.04	141.13+/-9.46	NS	138.9+/-14.65	139.13+/-14.85	NS	132.57+/-12.94	128.38+/-10.33	NS
Global Diastólica	81.29+/-7.06	81.25+/-7.7	NS	79.7+/-9.25	81.5+/-8.43	NS	77.57+/-6.8	74.38+/-7.38	NS
Promedio Día Sistólica	145.43+/-9.28	146.63+/-8.86	NS	138.71+/-17.38	144.88+/-13.22	NS	136.29+/-11.62	132.38+/-9.5	NS
Promedio Día Diastólica	83.86+/-7.81	85.25+/-9.23	NS	83.43+/-11.25	83.88+/-7.9	NS	81.57+/-6.52	77.25+/-7.88	NS
Promedio Noche Sistólica	135.57+/-9.18	131+/-12	NS	131.86+/-12.49	131.38+/-17.2	NS	124.29+/-16.38	120.38+/-12.68	NS
Promedio Noche Diastólica	76+/-6.32	73.75+/-7.57	NS	75.14+/-6.69	73.75+/-8.76	NS	70+/-8.71	68.13+/-6.6	NS
Estrés oxidativo									
MDA (µM)	0.8535+/-0.6156	2.182+/-2.2559	NS	0.8286+/-0.75	0.8073+/-0.9617	NS	0.6637+/-0.505	0.8805+/-0.73	NS
DNPH/mg	1.4371+/-0.4563	1.5129+/-0.3559	NS	1.2852+/-0.46	1.559+/-0.3773	NS	1.3475+/-0.281	1.189+7-0.207	NS
Función mitocondrial									
ADNmt (CT)	14.9572+/-0.243	15.0816+/-0.7833	NS	14.6274+/-0.36	14.8326+/-0.4202	NS	14.51+/-0.27	14.801+/-0.57	NS

Cuando se realizo la misma comparación entre grupos en la dieta prescrita, se pudo documentar diferencia significativa entre la cantidad de fructosa total y la fructosa proveniente de frutas en el grupo al cual se le restringió la fructosa derivado de la maniobra. Importante a destacar es que las dietas instauradas fueron hiposódicas en ambos grupos una vez iniciado el seguimiento de los pacientes y en este sentido se pudo evidenciar diferencia entre ellos ($p < 0.01$).

Tabla 2: Comparación entre ambos grupos de la dieta basal y la dieta prescrita donde se evaluaron macronutrientes, cantidad de fructosa y sodio.

Parametros Nutricionales	BASALES			DIETA PRESCRITA		
	Sin restricción de fructosa	Con restricción de fructosa	p	Sin restricción de fructosa	Con restricción de fructosa	p
Kcal	2832+/-466	2859+/-750	NS	2940+/-492	2962+/-72	NS
% Proteínas	14.13+/-1.90	14.13+/-1.25	NS	14.47+/-1.22	14.93+/-1.14	NS
% Lípidos	26.47+/-3.86	25.76+/-3.57	NS	26.9+/-4.3	24.63+/-4.03	NS
% Hidratos de Carbono	58.99+/-3.751	59.71+/-4.34	NS	58.14+/-4.375	60.13+/-4.29	NS
Fructosa total (gr)	174.41+/-51	168.45+/-46.18	NS	161.33+/-76.08	37.75+/-44.2	0.002
Fructosa de frutas (gr)	54.5+/-31.86	51.41+/-36.59	NS	53.99+/-32.64	17.88+/-5.07	0.008
Sodio (gr)	3.74+/-1.1	4.21+/-0.97	NS	1.59+/-0.351	2.11+/-0.35	0.01

En la tabla 3, se describen las diferencias significativas entre los deltas de TA medida por monitoreo ambulatorio en sus determinaciones sistólicas y diastólicas globales, promedio día y promedio noche, a excepción del promedio noche sistólica. Cabe señalar que no se reporto significancia entre los deltas de TA cuando se analizaron los grupos independientemente. De manera individual, gráficamente se puede evidenciar una tendencia a la disminución de la TA sistólica y diastólica global en el total de los individuos durante el seguimiento (Figura 6).

Tabla 3: Comparación entre los deltas de TA medida por MAPA basales, a la semana 4 y 8.

MAPA (mmHg)	BASALES	SEMANA 4	SEMANA 8	RESULTADOS
Global Sistólica	141.6+/-8.95 *	139+/-14.2	130.33+/-11.4 ^	* vs ^, $p < 0.001$
Global Diastólica	81.27+/-7.14 *	80.67+/-8.55	75.87+/-7 ^	* vs ^, $p < 0.03$
Promedio Día Sistólica	146+/-8.75 *	142+/-15	134+/-10.35 ^	* vs ^, $p < 0.036$
Promedio Día Diastólica	84.6+/-8.33 *	83.67+/-9.24	79.2+/-7.37 ^	* vs ^, $p < 0.011$
Promedio Noche Sistólica	133+/-10.7	131.6+/-14.7	122+/-14.12	NS
Promedio Noche Diastólica	74.8+/-6.86 *	74.4+/-7.62	69+/-7.43 ^	* vs ^, $p < 0.008$

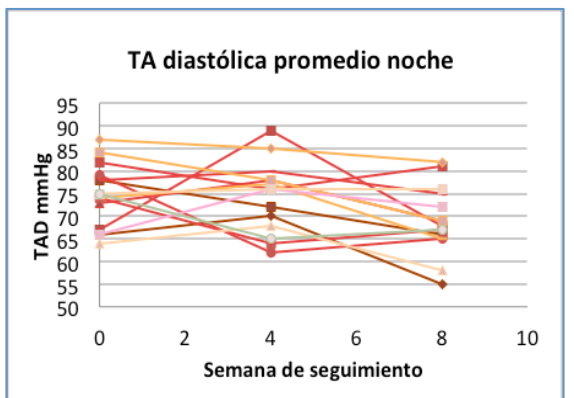
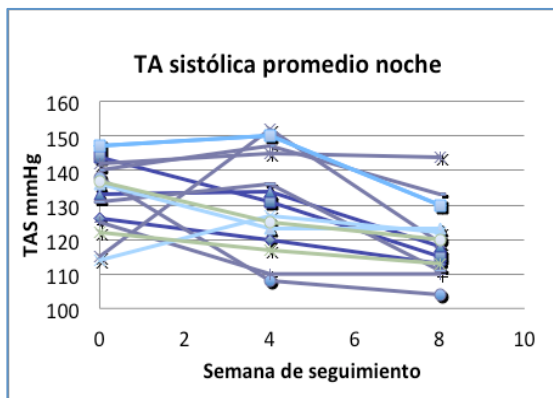
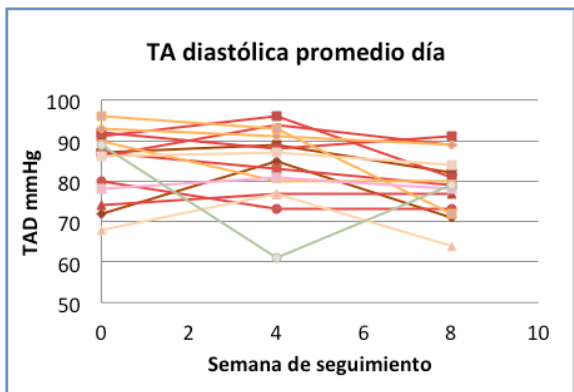
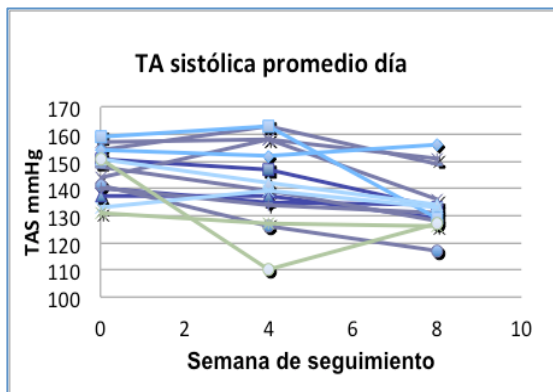
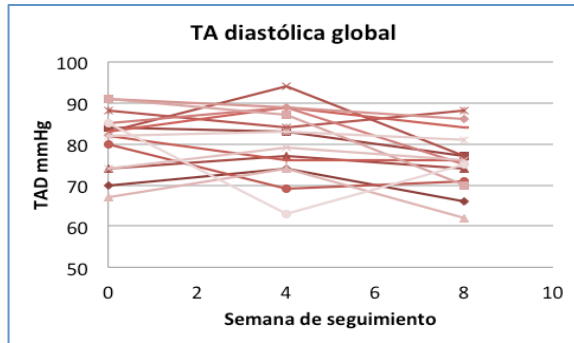
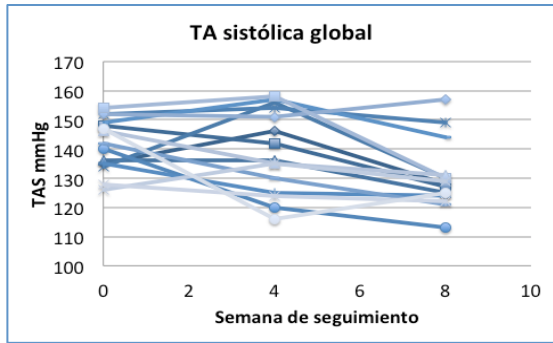


Figura 6. Representación esquemática de los promedios de TA en los individuos medida por MAPA de manera global, promedio día y promedio noche.

Al hacer las determinaciones de los deltas de MDA, se evidenció una tendencia a la disminución de ésta molécula al terminar el estudio. En el caso de DNPH, se reportan $p < 0.76$ y $p < 0.05$, a las 4 y 8 semanas respectivamente, alcanzando significancia al final del seguimiento. Esto evidenció una tendencia a la disminución de las moléculas de estrés oxidativo (Tabla 4). Con respecto, al ADNmt, se documentó una disminución significativa a la semana 4 y que permaneció a la semana 8. Al igual que la TA, cuando se realizó el análisis de éstos deltas por semana y de manera independiente para cada grupo no mostró significancia.

Tabla 4: Comparación entre los deltas de MDA, DNPH y ADNmt basales, a la semana 4 y 8.

Estrés oxidativo	BASALES	SEMANA 4	SEMANA 8	RESULTADOS
MDA (μM)	1.562+/-1.7826 *	0.8173+/-0.8394 ^a	0.7793+/-0.6229 [^]	* vs ^a $p < 0.13$; * vs [^] $p < 0.07$
DNPH/mg	1.4775+/-0.3912 *	1.4314+/-0.4269 ^a	1.263+/-0.3912 [^]	* vs ^a $p < 0.76$; * vs [^] $p < 0.05$
Función mitocondrial				
ADNmt	15.0236+/-0.5798 *	14.73+/-0.3926 ^a	14.6662+/-0.465 [^]	* vs ^a $p < 0.03$; * vs [^] $p < 0.001$

Por otro lado, en la semana 4 se inició una segunda intervención de manera aleatorizada para los individuos de ambos grupos consistente en la administración de alopurinol o placebo. (gráfica frecuencia). De tal manera que en el grupo de restricción de fructosa, a 4 pacientes les fue administrado alopurinol y a 4 más placebo. En el grupo contrario (con restricción de sodio pero sin restricción de fructosa) fueron asignados aleatorizadamente de la siguiente manera: 4 a administración de alopurinol y 3 a placebo. Cuando se corrió el análisis para esta intervención (alopurinol vs placebo), intergrupo y en la totalidad de los individuos, así como en los deltas de los parámetros medidos, no se evidenciaron diferencias significativas.

DISCUSION

Las alteraciones en el ADNmt, se encuentran asociadas principalmente a defectos en los genes mitocondriales condicionando enfermedades genéticas por mencionar algunas como Síndrome de MELAS (encefalomiopatías mitocondriales asociadas a acidosis láctica con episodios sincopales), Síndrome de epilepsia mioclónica asociada a fibras rojas rotas (epilepsia mioclónica progresiva, baja estatura), Síndrome de Kearns-Sayre (oftalmoplejía externa con defectos en la conducción cardíaca), Neuropatía óptica hereditaria de Leber (esclerosis múltiple y síndrome de Wolff-Parkinson-White) y Síndrome de Leigh (demencia en estados tempranos de la vida, insuficiencia respiratoria). Estas entidades pueden presentarse esporádicamente en función de la aparición de deleciones puntuales en el ADNmt o pueden ser heredadas por herencia autosómica recesiva o ligada al X. Las enfermedades se manifiestan cuando el ADNmt es heteroplásmico o que un individuo posee poblaciones distintas de mitocondrias, excediendo el número convencional de las mismas en el ADNmt no lesionado. El seguimiento y manejo de las enfermedades genéticas asociadas a ADNmt, abarcan una diversidad desde tratamiento quirúrgico (para corrección de problemas estructurales) hasta administración de vitamina C, vitamina K, tiamina, riovflavina, con el potencial efecto de disminución del daño mitocondrial a expensas de EROS [61]. Asimismo, también se han demostrado asociaciones en la disminución del ADNmt con entidades causantes de inflamación persistente, como lo reportado por Gianotti, en donde en una cohorte de 175 adolescentes en los que calculo el índice HOMA, los dividió en resistentes y no resistentes a la insulina, y a los cuales se les determino ADNmt y ADN nuclear (ADNn) por RCP en tiempo real, pudiendo demostrar que la relación entre ADNmt/ADNn se

encontró significativamente disminuida en el grupo con resistencia a la insulina. De igual manera correlacionó negativamente con el índice HOMA (R:-0.18, $p<0.03$), glucosa (R:-0.21, $p<0.008$) y con AU (R:-0.18, $p<0.03$) [54]. De manera adicional existe también información acerca de la reducción en la cantidad de ADNmt en pacientes con sepsis. Esto fue reportado por Pyle y cols, cuando en una cohorte de 147 pacientes con sepsis severa hospitalizados en una unidad de terapia intensiva, se les determinó la cantidad de ADNmt en células mononucleares, encontrando una disminución significativa con respecto a controles sanos ($p<0.0001$). Incluso en un subanálisis a 13 pacientes con sepsis y a los que se les realizó determinación de las subpoblaciones de leucocitos, se evidenció que cuando existió un incremento en la cantidad de neutrófilos presentaban hasta 3 veces menos ADNmt en comparación con las células mononucleares [61]. A pesar de lo reportado actualmente, existen pocos estudios prospectivos y continua creciendo la evidencia acerca las asociaciones la disminución en la cantidad de ADNmt y sus implicaciones en diversos campos clínicos.

Nuestro estudio a pesar de ser piloto y contar con una población limitada, pudo documentar que al momento de determinar el ADNmt (C_T) basal y durante el periodo de seguimiento, observó una amplificación de los genes analizados por PCR-TR en ciclos más tempranos, comparando el ADN basal de cada paciente con su mismo ADN obtenido a las 4 semanas ($p<0.03$) y a las 8 semanas ($p<0.001$). Todo esto recordando que el hecho de disminuir el ADNmt C_T implica un aumento logarítmico de la cantidad de ADNmt, es decir, la cantidad de ADNmt se encuentra aumentado 10 veces más por cada C_T anticipado. De esta manera, este hallazgo parece tener

relevancia, ya que independientemente de las intervenciones instauradas se documento un incremento en la ADNmt en cantidad.

Aunque nuestra hipótesis original se basó en que la dieta de restricción concomitante de sodio y fructosa sería superior a la puramente restrictiva de sal, un hallazgo interesante del estudio fue que una dieta baja en sodio también fue capaz de incrementar el ADNmt. Los mecanismos por los cuales estas dietas incrementaron el ADNmt incluyen un potencial efecto directo en la disminución de la TA y el AU. Estas reducciones, provocarían que al disminuir estos parámetros condicionen una menor producción de EROS con el resultante efecto sobre ADNmt.

Otra posibilidad es que el efecto de la combinación de dieta con restricción de sodio y una potencial dieta DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) en base a incrementos en productos vegetales, derivados de los granos, leguminosas, etc. y que pudiera contribuir a la disminución en TA en todos los individuos [63]. Esto ya ha sido reportado, teniendo un efecto potenciador junto a la restricción de sodio en la disminución de las cifras arteriales. Más evidencia de la reducción en las delecciones del ADNmt se ha encontrado en modelos experimentales en ratas, expuestos a tratamiento con vitamina C, melatonina y restricción calórica [64]. En este sentido las modificaciones dietéticas realizadas a nuestros pacientes en el estudio, si bien no fueron significativas, si pudieron incrementar la ingesta de alimentos como los comentados previamente con el consiguiente efecto en TA y ADNmt. Cabe señalar que como se comenta más adelante, el tamaño de la muestra limita la interpretación de estas observaciones.

En cuanto a estrés oxidativo, la producción de esta condición se estudio en primera instancia en pacientes portadores de diabetes mellitus, donde se sabe que la generación de PGAs, la activación de la vía de los polioles y de las hexosaminas, así como la activación de las proteínas C cinasa están en estrecha relación con la generación de EROS que conducen a un estrés oxidativo persistente [65]. La característica de la fructosa es que produce un incremento en las cantidades de los intermediarios gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dihidroxiacetona-fosfato (DHAP), este último a expensas de la fructosa-1 fosfato. Los metabolitos antes mencionados poseen también capacidad reactiva suficiente como para glicosilar proteínas y generar por tanto EROS, entre ellas el anión superóxido. Esto es de radical importancia, ya que condiciona la producción concomitante de proteínas inflamatorias condicionando estrés oxidativo, disminución en la síntesis proteica y depleción de ATP [66].

Nosotros determinamos MDA como marcador de peroxidación lipídica, con la intención de contrastar el incremento en esta molécula ante la restricción de fructosa en los pacientes. Los resultados reportados con nuestra intervención dejaron en claro una tendencia a la disminución durante el seguimiento, sin embargo no se plasmó con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.135$ a las 4 semanas y $p < 0.079$ a las 8 semanas). Otro marcador que utilizamos, fue DNPH como producto carbonilado y que se genera a partir de EROS, mostrando la misma tendencia que MDA, y que al final del seguimiento en los pacientes, alcanzó significancia estadística ($p < 0.765$ a la semana 4 y $p < 0.05$ a la semana 8).

Esta bien estudiado que, en el tejido adiposo en pacientes con obesidad y sobrepeso existe un aumento en la producción de TNF- α , leptina, interleucina-6, MCP-1 y PAI-1 [51], condicionando

inflamación. Por otro lado, algunos estudios reportan niveles incrementados de MDA en sujetos hipertensos en relación con controles sanos y que también presentan niveles más elevados de marcadores de oxidación de lípidos y proteínas [67, 68]. En contraste, Alessio y cols. obtuvieron una buena correlación entre MDA y grupos carbonilo, no así entre MDA e hidroperóxidos en sujetos hipertensos [69].

Con respecto a los resultados reportados en TA, existe ya evidencia en diversos estudios, donde la fructosa causa elevación de las cifras de TA de manera independiente [9, 20]. Madero observó que ante la restricción de fructosa, se produce una reducción en las cifras de TA sistólica y diastólica [57]. En los dos estudios clínicos citados previamente en el texto, tanto en el doble ciego, controlado por placebo, entrecruzado por Feig y en el aleatorizado por Pérez-Pozo, también se ha demostrado de manera independiente un incremento de la TA a expensas de fructosa y con la prevención de HAS ante la administración de alopurinol. En nuestro estudio no se reportaron diferencias en los promedios de TA medidos por MAPA entre grupos, pero cuando se analizaron los deltas en los diferentes tiempos de seguimiento, se mostró una disminución en la totalidad de los individuos a las 8 semanas de seguimiento. Tampoco evidenciamos un efecto potenciador estadísticamente significativo en la disminución de las medias de TA, ante la administración de alopurinol. Al no evidenciar que el grupo con restricción de fructosa presento una mayor reducción de la TA y al no encontrar un efecto favorable ante la administración de alopurinol, se podría plantear que nuestros resultados no van acorde con lo establecido en la evidencia hasta el momento, sin embargo no podemos aseverarlo tomando en cuenta que, nuevamente el número de pacientes es muy limitado. Asimismo esta reducción en los promedios

de TA, podría tener consideraciones similares a lo ya sustentado en relación a la disminución del ADNmt, como el tipo de dieta (antioxidante, DASH), incluso restricción de la ingesta de sodio.

En este sentido ya se sabe que el incremento en el consumo de sodio, esta relacionado a efectos cardiovasculares desfavorables independientes de la TA, afectando la función cardiovascular y estimulando fibrosis miocárdica. Incluso en el estudio THOP, los sujetos con prehipertensión en los que se disminuye la ingesta de sodio experimentan una reducción disminución del riesgo cardiovascular del 25% a 30% luego de 10 a 15 años. Es decir, la dieta hiposódica ayuda a prevenir la enfermedad cardiovascular [70]. Trasladando esta afirmación a nuestros resultados, entonces, cabría la posibilidad de atribuirle peso a la dieta hiposódica y/o en combinación con la restricción de fructosa, con la disminución a su vez del estrés oxidativo y ADNmt. Sin embargo habría que continuar realizando estudios en esta línea para tener información más significativa.

Ya reportado en estudios previos, se sabe que el efecto por el cual la fructosa induce SM es mucho mayor en pacientes con incremento en el peso corporal o en los cuales se documenta hiperinsulinismo [66]. Y de hecho, los mecanismos por los cuales la fructosa provoca incremento en el peso y por consiguiente el riesgo de obesidad, son en primera instancia, no estimular la producción de leptina e inducir resistencia a la acción de esta enzima, la cual es clave para la regulación del metabolismo energético. Provoca una disminución transitoria en la cantidad de ATP en hepatocitos y en el hipotálamo con la consecuente alteración en la regulación del mecanismo del hambre e incluso se ha documentado adicción en ratas alimentadas con azúcares añadidos mediante la estimulación de vías dopaminérgicas en el núcleo accumbens [4-7].

Al respecto, el estudio de la Dra. Madero [57] mostró recientemente que cuando expuso a dos grupos a dietas muy bajas en fructosa (ingesta menor a 20 gramos al día) o a dietas moderadas en fructosa (70 gramos al día) después de un periodo de 6 semanas, observó una pérdida de peso significativa de 2.94 ± 2.18 kg y 4.07 ± 2.39 kg. en los grupos arriba mencionados respectivamente. De igual manera fue discutido el papel de la administración de fructosa a expensas de frutas por tener un efecto antioxidante en el grupo de fructosa moderada y modulando en teoría la disminución de peso, siendo esta variable el objetivo central de su ensayo.

Nuestros resultados no evidenciaron cambios significativos en cuanto al peso al final del seguimiento entre grupos, aunque reportamos una disminución de 3 kg aproximados en el grupo con restricción de fructosa sin significancia estadística.

Partiendo de las implicaciones del SM y hablando del punto central del estudio, los primeros antecedentes de expresión y metabolismo de ciertas poblaciones celulares como los leucocitos circulantes fueron descritos en modelos de roedores a los cuales se les inducía un estado similar a diabetes provocado por aloxona [65] y en donde se reportó el cambio en el metabolismo de los linfocitos posterior a administración de insulina, aquí se hizo evidente una falla en la regulación celular cuando persistían las ratas diabéticas. Sabiendo que ante la presencia de glucosa aumenta la actividad de los transportadores de membrana, la glucólisis y el ciclo de Krebs, y que éstos a su vez son necesarios para mantener la síntesis del ADN y la proliferación de linfocitos [4, 71], continuaron los estudios en esta línea de investigación. De hecho, actualmente el incremento en la subpoblación de linfocitos se ha postulado como marcador de riesgo para la presentación de SM, esto documentado en un análisis de regresión logística en una cohorte de 4225 veteranos de guerra de Vietnam, y en donde se reportó que con incrementos en las poblaciones de linfocitos T,

T4 y T8, existe un incremento a su vez de riesgo para SM de 2.68, $p < 0.001$; 2.37, $p < 0.001$ y 1.79, $p < 0.001$; respectivamente [72]. En otro estudio, usando células mononucleares, se estudiaron la expresión de los polimorfismos de PPAR- γ RNAm y FN-KB RNAm antes de una carga de lípidos y 3 horas después de la misma. Los hallazgos a comentar fueron la correlación negativa de PPAR- γ RNAm con marcadores de peroxidación lipídica y proteínas carboniladas [73]. Esto tiene importancia ya que al saber que el PPAR- γ es un regulador de la biogénesis mitocondrial y que tanto las moléculas de estrés oxidativo, como los EROS intracelulares son los estímulos para la producción de ADNmt, podemos sugerir que, si existe una alteración en el equilibrio entre ROSmt y ADNmt, se puede condicionar un estado inflamatorio y de disfunción mitocondrial.

Así, el hecho de tomar células de sangre periférica, ha estimulado a los grupos de investigación para poder realizar pruebas de escrutinio sin necesidad de realizar procedimientos de intervención para toma de tejido hepático o adiposo y resaltando la utilidad de realizar distintas determinaciones en células circulantes, constituyéndose como potencial marcador de SM, de fácil obtención, no invasivo con implicaciones diagnósticas y pronósticas, sin embargo es necesario continuar con más estudios que puedan ayudar a construir la evidencia en este sentido.

Cabe señalar que este ensayo clínico es un brazo de un estudio aleatorizado mayor en donde se pretende incluir a 100 pacientes siendo el desenlace mayor la disminución de la TA a expensas de la restricción de fructosa y sodio, así como la administración de alopurinol como maniobras de intervención, sin embargo al reportar nuestros hallazgos, contribuye a establecer la relación existente entre el comportamiento del ADNmt, las moléculas de estrés oxidativo y las maniobras

realizadas. Tiene la ventaja sobre otros ensayos, de ser aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, en donde la población no presento restricción calórica en las dietas establecidas y las determinaciones de TA fueron realizadas mediante MAPA. Incluso se constituye como el primer estudio que evalúa el impacto de una manipulación dietética y farmacológica sobre el ADNmt y estrés oxidativo, en donde surge la posibilidad de continuar esta línea de investigación derivado de que la determinación de ADNmt y estrés oxidativo fue realizada en células circulantes brindando el beneficio de un método práctico, fácil y no intervencionista en comparación con la realización de biopsia de tejido hepático o muscular para la obtención de tejido analizable.

Una limitación por otro lado, es el número reducido de pacientes, condicionando poder estadístico bajo. Esta razón, no permite descartar nuestra hipótesis original, ya que al incrementar el universo de la muestra, pudiera hacerse evidente que la dieta baja en sodio y fructosa más la administración de alopurinol pudiesen ser superiores a una dieta baja en sodio y con una mayor impacto en el incremento del ADNmt y estrés oxidativo. De igual manera sabemos que de haber realizado determinación de ADN nuclear (ADNn), se facilitaría la cuantificación a detalle de la proporción de ADNmt vs ADNn con la intención de documentar la dinámica entre estos dos parámetros con las repercusiones sobre el estado oxidativo celular.

Al reportar nuestras observaciones, el hecho de continuar con la determinación de ADNmt y estrés oxidativo mediante leucocitos circulantes en población abierta, abre la posibilidad para establecer la relación entre ADNmt, SM, y estrés oxidativo con fines diagnósticos y con potencial implicación pronóstica identificando poblaciones de riesgo.

CONCLUSIONES

En este estudio en pacientes con HAS y SM, tanto una dieta baja en sodio como la restricción de fructosa y sodio se asociaron con un incremento en el ADNmt, así como una tendencia hacia la disminución del estrés oxidativo en células inmunes humanas. Asimismo se observó una disminución significativa de la TA en ambos grupos.

Basado en lo reportado en este ensayo, es necesario incrementar el tamaño de la muestra para así poder determinar que tipo de intervención es más efectiva para aumentar ADNmt y disminuir estrés oxidativo (MDA, DNPH), así como optimizar parámetros como TA, AU, TGL, colesterol total y glucosa. De aquí que más estudios en este campo son necesarios para determinar la aplicabilidad y significancia clínica de estos marcadores.

ANEXO 1

EFFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE FRUCTOSA Y EFFECTO DE ALOPURINOL SOBRE EL ESTRES OXIDATIVO Y FUNCION MITOCONDRIAL EN SUJETOS CON HIPERTENSION Y SOBREPESO CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de este documento se le invita a usted a participar en un estudio enfocado a un medicamento actualmente en uso para controlar los niveles de ácido úrico, además de interrogar sobre su dieta actual, evaluando el efecto combinado de ambos factores sobre la presión arterial, colesterol, triglicéridos, peso y otros parámetros relacionados con enfermedades crónicas degenerativas y las complicaciones de salud que las acompañan. Este estudio surge por la evidencia basada en que el consumo excesivo de fructosa ha propiciado un aumento en los índices de obesidad, hipertensión arterial, síndrome metabólico, diabetes, enfermedades cardiovasculares y renales. La fructosa es un tipo de azúcar que sirve como endulzante en muchos productos y alimentos procesados, y que en uso excesivo o prolongado se relaciona a incremento en los niveles de ácido úrico, que a su vez se asocia potencialmente a elevación de presión arterial entre otros. El plan está diseñado en 2 periodos de 4 semanas cada uno, en donde se comparan los efectos del alopurinol (medicamento que reduce ácido úrico) contra un placebo (sin efecto alguno), y al mismo tiempo su dieta habitual contra una prescripción en donde se reduce el consumo de fructosa. El primer periodo consistente en consultas semanales sin modificación alguna en sus hábitos alimenticios; el segundo periodo se asigna al azar la toma de ya sea alopurinol o placebo, y permanecer en su misma dieta o ser restringido el consumo solamente de cierto tipo de azúcares. Los fármacos son entregados en un frasco cerrado etiquetado con sus datos debiendo ingerir una tableta diaria sin exceder ésta dosis y regresar el frasco en su siguiente cita. Entre algunos efectos secundarios reportados del alopurinol en menos del 1% de los casos se encuentran: mareo, comezón, salpullido, dolor de cabeza, sangrado nasal, inflamación de articulaciones, irritación gástrica, alteración de pruebas de función del hígado o anemia. Es importante reportar cualquier síntoma en forma inmediata y no esperar a su siguiente cita. Las evaluaciones son una vez por semana basadas en interrogatorio, llenado de cuestionarios, toma de presión arterial, peso, talla, circunferencias de cintura y cadera. Se tomarán muestras de sangre y orina al inicio y posteriormente cada 4 semanas. Las complicaciones de la punción con aguja para la obtención de la muestra de sangre pueden incluir dolor, ardor, moretón, sangrado e infección. Igualmente cada 4 semanas se colocará un brazalete en el brazo para medir la presión arterial durante 24 horas sin interrupción el cuál usted se llevará a casa y deberá regresarlo al día siguiente. Este brazalete aunque es cómodo y ligero en aisladas ocasiones puede causar irritación en la piel.

Las consultas, laboratorios y fármacos otorgados no tendrán costo alguno para usted y la información que proporcione será completamente confidencial. Toda la atención es por personal médico calificado y contará con un número de atención telefónica en el que le podremos ayudar personalmente. De estas evaluaciones usted obtendrá una detección temprana de las enfermedades más frecuentes y recomendaciones para prevenirlas o controlarlas. En caso de requerir mayor atención será enviado con su médico de confianza fuera del instituto.

Yo _____ declaro que he sido informado ampliamente por parte del equipo médico de los detalles del estudio, aceptando los procedimientos que me serán asignados, entendiendo los efectos que podrían derivarse, tanto benéficos como adversos. Como paciente, tengo derecho a que se me respondan las dudas que se generen en el transcurso, al igual que decidir salirme del estudio en cualquier momento bastando con exponer mis motivos, sin que esto vaya a afectar mi atención en el futuro.

México D.F. a _____ de _____ de 20 ____

Paciente:

Firma _____

Testigos

Firma _____

Firma _____

Médico Responsable:

Firma _____

BIBLIOGRAFIA

1. Velázquez-Monroy O, Rosas P, Lara E, et al. Arterial hypertension in Mexico: results of the national health survey 2000. *Arch Cardiol Mex* 2002; 72:71-84.
2. Velazquez-Monroy O, Rosas P, Lara E, et al. Prevalence and interrelations of non-communicable chronic diseases and cardiovascular risk factors in Mexico. Final outcomes from the national health survey 2000. *Arch Cardiol Mex* 2003; 73:62-77.
3. Olaiz G, Rojas R, Barquera S, et al. Encuesta Nacional de Salud. Tomo 2. La salud de los adultos. Cuernavaca, Morelos México, Instituto Nacional de Salud Pública, 2003.
4. Johnson RJ, Segal M, Sautin Y, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:899-906.
5. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:537-43.
6. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *Faseb J* 1990; 4:2652-60.
7. Elliott S, Keim N, Stern J, et al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:911-22.
8. Nakagawa T, Tuttle K, Short R, Johnson R. Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome. *Nature Clin Practice Nephrology* 2005; 1:80-6.
9. Feig D, Soletsky B, Johnson R. Effect of Allopurinol on Blood Pressure of Adolescents with newly diagnosed essential hypertension: A randomized Trial. *JAMA* 2008; 300(8): 924-32.

10. Sanchez-Lozada L, Tapia E, Jimenez A, et al. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292:f423-9.
11. Sanchez-Lozada L, Tapia E, Bautista-Garcia P, et al. Effects of febuxostat on metabolic and renal alterations in rats with fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(4):F710-8.
12. Emmerson B. Effect of oral fructose on urate production. *Ann Rheum Dis* 1974; 33:276-80.
13. Fields M, Lewis C, Lure MD. Allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, reduces uric acid levels and modifies the signs associated with copper deficiency in rats fed fructose. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:595-600.
14. Gao X, Qi L, Qiao N, et al. Intake of added sugar and sugar-sweetened drink and serum uric acid concentration in us men and women. *Hypertension* 2007; 50:306-12.
15. Choi H, Curhan G. Soft drinks, fructose consumption, and the risk of gout in men: prospective cohort study. *BMJ* 2008; 336:309-12.
16. Mazzali M, Hughes J, Kim YG, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism. *Hypertension* 2001; 38:1101–6.
17. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Avila-Casado C, et al. Mild hyperuricemia induces glomerular hypertension in normal rats. *Am J Physiol* 2002, 283:F1105–10.
18. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290:f625-31.
19. Glushakova O, Kosugi T, Roncal C, et al.: Fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19:1712–1720.

20. Pérez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG et al. Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes* 2010; 34(3):454-61.
21. Nguyen S, Choi HK, Lustig RH, Hsu CY. Sugar-sweetened beverages, serum uric acid, and blood pressure in adolescents. *J Pediatr* 2009, 154(6):807-13.
22. Olaiz RJ, Shama T, Rojas R, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006: 85-106.
23. DENOVA E, Talavera JO, HUITRÓN G, et al. Sweetened beverage consumption and increased risk of metabolic syndrome in Mexican adults. *Public Health Nutr.* 2010; 13(6): 835-42.
24. Malik VS, Schulze MB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(2): 274-288.
25. Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, et al. Beverage consumption for a healthy life: recommendations for the Mexican population. *Salud Publica Mex* 2008;50:173-195.
26. Hulshof T, De Graaf C. The effects of preloads varying in physical state and fat content on satiety and energy intake. *Appetite* 1993;21(3):273-286.
27. Ludwig DS, Peterson KE. Relation between consumption of sugar- sweetened drinks and childhood obesity: A prospective, observational analysis. *Lancet* 2001;357(9255):505-508.
28. Schulze MB, Manson JE. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA* 2004; 292(8): 927-934.
29. Henry RR, Crapo PA, Thornburn AW, et al. Current issues in fructose metabolism. *Annu Rev Nutr* 1991; 11: 21-39.

30. Teff KL, Elliot SS, Tschop M, et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89: 2963-2972.
31. Havel P. Dietary fructose: Implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition Review* 2005, 63: 133-157.
32. Davail S, Ridea N, Bernardet MD, et al. Effect of dietary fructose on liver steatosis in overfed mule ducks. *Horm Metab Res* 2005, 37: 32-35.
33. Bantle JP. Is fructose the optimal low glycemic index sweetener? *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme*. 2006. 11: 83-91.
34. Daly M. Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state. *Am J Clin Nutr* 2003, 78 (suppl): 865S-72S.
35. Wu T, Giovannucci E, Pischon T, et al. Fructose, glycemic load, and quantity and quality of carbohydrate in relation to plasma C-peptide concentrations in US women. *Am J Clin Nutr* 2004, 80:1043-9.
36. Johnson R, Kang D, Feig D, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension* 2003; 41:1183-90.
37. Johnson R, Feig D, Herrera-Acosta J, Kang DH. Resurrection of uric acid as a causal risk factor in essential hypertension. *Hypertension* 2005; 45:18-20.
38. Sautin YY, Johnson RJ. Uric acid: the oxidant and antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; 27: 608-19.
39. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, et al: Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int* 2005;67:1739–1742.

40. Corry DB, Eslami P, Yamamoto K, et al. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. *J Hypertens* 2008; 26:269–275.
41. Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, et al. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010, 298: F712–F720.
42. Sautin YY, Nakagawa T, Johnson RJ, et al. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C584–C59.
43. D'Agati V, Schmidt AM: RAGE and the pathogenesis of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2010, 6:352–360.
44. Nair S, Chacko P, Arnold C, et al. Hepatic ATP reserve and efficiency of replenishing: comparison between obese and nonobese normal individuals. *Am J Gastroenterol.* 2003; 98 (2):466-70.
45. Cirillo P, Gersch MS, Mu W, et al.: Ketohexokinase-dependent metabolism of fructose induces proinflammatory mediators in proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20:545–553.
46. Wang X, Jia X, Chang T, et al.: Attenuation of Hypertension Development by Scavenging Methylglyoxal in Fructose-Treated Rats. *J Hypertens* 2008, 26:765–772.
47. He L, Chinnery Pf, Durham SE, et al. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15;30(14):e68.
48. Jui-Chih C, Shou-Jen K, Wei-Ting L, et al. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World J Cardiol* 2010, 26; 2(6): 150-159.

49. Kim HJ, Park KG, Yoo EK, et al. Effects of PGC-1alpha on TNF-alpha-induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF-kappaB activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 301-307.
50. Gemma C, Sookoian S, Alvariñas J et al. Mitochondrial DNA depletion in small and large for gestational age newborns. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14:2193–2199.
51. Nisoli E, Clementi E, Carruba MO, et al. Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circ Res.* 2007, 30; 100 (6): 795-806.
52. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:2944–2950.
53. Kakuma T, Wang ZW, Pan W, Unger RH, Zhou YT. Role of leptin in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 expression. *Endocrinology* 2000; 141:4576–4582.
54. Gianotti TF, Sookoian S, Dieuzeide G, et al. A decreased mitochondrial DNA content is related to insulin resistance in adolescents. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jul;16(7):1591-5. Epub 2008 Apr 24.
55. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, et al. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 2003; 299: 866-99.
56. Jalal DI, Smits G, Johnson RJ, Chonchol M. Increased fructose associates with elevated blood pressure. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Sep;21(9):1543-9
57. Madero M, Arriaga JC, Jalal D, et al. The effect of a very low fructose diet versus a moderate natural fructose diet on weight loss and metabolic syndrome parameters. A randomized trial. (*Metabolism* 2011, En prensa).

58. Kanbay M, ozkara A, Selcoki Y, et al. Effect of treatment of hiperuricemia with allopurinol on blood pressure, creatinine clearence and proteinuria in patients with normal renal function. *Int Urol Nephrol* 2007; 39: 1227-33.
59. Brymora A, Flisinski M, Johnson RJ, et al. Low-fructose diet lowers blood pressure and inflammation in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2011, (En prensa).
60. Bai, R, Chang H, Wong L, et al. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann NY Acad Sci* 2004, 1011: 304-9.
61. Mackenzie J, Payne R. Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772 (2007) 509–523.
62. Pyle A, Burn D, et al. Fall in circulating mononuclear cell mitochondrial DNA content in human sepsis. *Intensive Care Med* (2010) 36:956–962.
63. Sacks F, Svetkey L, Vollmer W, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med* 2001;344:3-10.
64. Seidman M. Effects of dietary restriction and antioxidants on presbycusis. *Laryngoscope* 2000; 110: 727-38.
65. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
66. Hallfrish J, ellwood KC, Michaelis O, et al. Effects of dietary fructose on plasma glucose and hormone responses in normal and hyperinsulinemic men. *J Nutr* 1983; 113: 1819-26.
67. Kumar CA, Das UN. Lipid peroxides, antioxidants and nitric oxide in patients with pre-eclampsia and essential hypertension. *Med Sci Monit* 2000;6(5):901-7.

68. Kedziora K, Czuczejko J, Pawluk H, et al. The markers of oxidative stress and activity of the antioxidant system in the blood of elderly patients with essential arterial hypertension. *Cell Mol Biol Letters* 2004; 9:635-41.
69. Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, et al. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32:1576-81.
70. Hond D, Staessen Ja, Celis H, et al. antihypertensive treatment based on home or office blood pressure. The THOP trial. *Blood Press Monit.* 2004; 9 (6): 311-4.
71. Otton R, Mendoza JR, Curi R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. *Journal of Endocrinology* 2002, 174, 55–61.
72. Phillips A, Carroll D, Gale C, et al. Lymphocyte sub-population cell counts are associated with the metabolic syndrome and its components in the Vietnam Experience Study. *Atherosclerosis* 2010, 213: 294–298.
73. Macias-Gonzalez M, Cardona F, Queipo-Ortun M, et al. PPAR γ mRNA Expression Is Reduced in Peripheral Blood Mononuclear Cells after Fat Overload in Patients with Metabolic Syndrome. *J Nutr* 2008, 138: 903–907.