



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EFFECTO DEL RESVERATROL Y LA QUERCETINA EN EL CONTROL DE LA
EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS SUJETAS A CONTROL EPIGENÉTICO
ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO EN UN MODELO DE RATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Ana Elena Peredo Escárcega

TUTOR PRINCIPAL:
Dra. Verónica Guarner Lans
[Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. María Cristina Fernández Mejía
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)
Dr. Juan Miranda Ríos
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MÉXICO, D. F. Septiembre, 2015



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.

Agradecimientos:

El siguiente trabajo de tesis es fruto del esfuerzo directo e indirecto de gran cantidad de personas a las cuales deseo agradecer:

A mi familia por el apoyo moral, motivación y el cariño que me han brindado aun a pesar de mi ausencia estos dos años. A mis padres por que han sido fundamentales en mi formación, por su apoyo y amor incondicional.

A la Dra. Verónica Guarner por haberme recibido en su grupo de investigación en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por su paciencia, motivación y sabiduría con la que guio mi trabajo.

Agradezco por la paciencia y compromiso a la Dra. Esther Rubio por participar en mi formación académica y personal, por el tiempo que le dedico a revisar mi trabajo, por sus enseñanzas, aportes y consejos llenos de sabiduría ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible. La considero una entrañable amiga y modelo a seguir.

De la misma forma agradezco al “Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado” (PAEP) ya que me dio las facilidades para asistir al congreso: XIV Reunión Internacional de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato, así como también a CONACYT por la beca otorgada para mi manutención durante la realización de mis estudios de maestría.

A mis cotutores la Dra. Cristina Fernández y el Dr. Juan Miranda, por la paciencia, dedicación y compromiso en la revisión y corrección de mi proyecto de maestría a lo largo de estos dos años. Así como también a los miembros del jurado del examen de tesis por sus recomendaciones.

A mis maestros, por todos sus aportes que enriquecieron mi trabajo de manera importante, por su paciencia y exigencia para superarme día con día.

A toda la gente que me apoyo como mis amigos Majo, Selene, Jimena, Sergio, Gil que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que contribuyeron a que las tardes en el laboratorio con los ensayos fueran aún más agradables y en algunas ocasiones divertidas. A todo el equipo técnico y de apoyo en el departamento de Fisiología como Bertha, Mario, Florencio, por su paciencia, dedicación y compromiso con el trabajo.

DEFINICIONES (TABLA DE ABREVIATURAS)

ACC	Acetil coenzima A carboxilasa
Ace-CS2	Acetil coenzima A sintetasa 2
ADP	Adenín dinucleótido fosfato.
AMP	Adenín mononucleótido fosfato
AMPK	Cinasa de AMP
ANT2	Translocador del nucleótido adenina
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
Ap2	Proteína de unión a ácidos grasos
ApoB	Apolipoproteína B.
ATGL	Lipasa de triglicéridos de tejido adiposo
ATP	Adenosín trifosfato
C	Control
c no-HDL	Colesterol no HDL
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CD38	Hidrolasa de ADP-ribosa cíclica
c-HDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
c-IDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de densidad intermedia
c-LDL	Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad
CT	Colesterol total
COMT	Catecol-O-metil transferasa
CPS1	Carbamoil fosfato sintasa 1
CPT1	Carnitin palmitoil transferasa
c-VLDL	Colesterol asociado a Lipoproteína de muy baja densidad.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECV	Enfermedades cardiovasculares
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
FAS	Ácidos graso sintasa
FNDC5	Proteína 5 del dominio de fibronectina tipo III
FOXO1	Forkhead box 1
FOXO3	Forkhead box 3
g	Gramos
GHD	Glutamato deshidrogenasa
GLUT	Transportador de glucosa
HIF-1 α	Factor inducible de hipoxia 1 α
HNF4 α	Factor nuclear del hepatocito alfa
HOMA-IR	Homeostatic model assessment of insulin resistance
HTA	Hipertensión arterial
IDE	Enzima degradante de insulina
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a la insulina-1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
IRS	Sustrato receptor de insulina
KDa	Kilo Daltones
Km	Constante de Michaelis
LPL	Lipoproteín lipasa

Lts	Litros
mA	Miliamperios
min	Minutos
mM	Milimolar
MmHg	Milímetros de mercurio.
Mn-SOD	Superóxido dismutasa de manganeso
NAD ⁺ / NADH	Nicotín adenín dinucleótido oxidado/reducido
NADP ⁺ /NADPH ⁺	Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado/ reducido
NAMPT	Nicotinamida fosforribosiltransferasa o vifstatina
NCoR	Receptor nuclear co-represor
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NMN	Nicotinamida mononucleótido
NRF1	Factor nuclear E2 relacionado con el factor-1
O ₂	Oxígeno
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
ON	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Radical peroxinitrito
PA	Presión arterial
PCR	Proteína C reactiva
PEPCK	Fosfoenol piruvato carboxicinas
Pfk1	Fosfofructocinasa 1
PGC-1α	Coactivador de proliferador de peroxisoma activado del receptor gama
PKC	Protein cinasa C
PPARs	Proliferadores peroxisomales
PPAR-α	Proliferador de peroxisoma activado del receptor alfa
PPAR-γ	Proliferador de peroxisoma activado del receptor gama
PRDM16	PR domain containing 16
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTP-B1	Fosfotirosina fosfatasa-1B
QRC	Quercetina
RC	Restricción calórica
RI	Resistencia a la insulina
RIA	Radio Inmuno Análisis
RNA	Ácido ribonucleico
RSV	Resveratrol
Sir2	Silent Information Regulator dos
SIRT	Sirtuina
SM	Síndrome metabólico
SMRT	Mediador de silenciamiento de los receptores de la hormona tiroidea y retinoide
SNS	Sistema nervioso simpático
SOCS-3	Supresor de señalización de citocinas
SOD	Superóxido dismutasa
SR-B1	Scavenger receptor B1
SREBP-1c	Proteínas de unión a elementos de regulación de esteroides
TG	Triglicéridos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRPM2	Receptor de potencial transitorio de canal de cationes
UCP	Proteína desacoplante

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO.....	2
1.1. SÍNDROME METABÓLICO (SM)	2
1.1.1. ETIOPATOGENIA.....	3
1.1.1.1. RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)	3
1.1.1.2. ADIPOSIDAD CENTRAL: DEFINICIÓN E IMPLICACIONES	3
1.1.1.3. ADIPOCINAS.....	3
1.1.1.4. DISLIPIDEMIA.....	5
1.1.1.5. HIPERTENSIÓN.....	6
1.1.2. MODELOS ANIMALES DE SM.....	6
1.1.2.1. MODELO EN RATA DE SACAROSA AL 30%.....	6
1.2. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO	7
1.2.1. FÁRMACOS	7
1.2.2. COMPUESTOS NATURALES.....	8
1.2.2.1. RESVERATROL Y QUERCETINA.....	9
1.2.2.2. RSV Y QRC: MECANISMO EPIGENÉTICO, COMO ACTIVADORES DE LAS SIRT _s ..	11
1.2.2.3. FAMILIA DE LAS SIRT _s	12
1.2.2.4. EVIDENCIA DEL EFECTO DEL RSV, QRC Y LA PARTICIPACIÓN DE SIRT _s EN EL SM	19
1.2.2.5. INDUCCIÓN DE “BROWNING” DEL TEJIDO ADIPOSO, OTRO MECANISMO DE ACCIÓN DEL RSV RELACIONADO CON SIRT _s	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVO GENERAL.....	26
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	26
5. METODOLOGÍA.....	27
5.1 REACTIVOS.....	27
5.2 ANIMALES Y TRATAMIENTO:.....	27
5.2.1 DETERMINACIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA Y PESO:	28
5.2.2 CURVA DE TOLERANCIA A LA INSULINA:.....	29
5.2.3 OBTENCIÓN DE SUERO:	29
5.2.4 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA, TG Y CT EN SUERO:.....	29
5.2.5 DETERMINACIÓN DE INSULINA, LEPTINA Y ADIPONECTINA EN SUERO:.....	29

5.2.6	CÁLCULO DEL ÍNDICE HOMA-IR (HOMEOSTATIC MODEL ASSESSMENT OF INSULIN RESISTANCE):.....	29
5.2.7	DETERMINACIÓN DE C-HDL Y C-NO HDL EN SUERO:	30
5.3	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE TEJIDO ADIPOSO VISCERAL:.....	30
5.3.1	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA:.....	30
5.3.2	WESTERN BLOT:	30
5.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	32
6	RESULTADOS	33
7	DISCUSIÓN.....	48
8	CONCLUSIONES	54
9	REFERENCIAS.....	55

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) se caracteriza por resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipertensión arterial, obesidad central y dislipidemia y es una patología de alta prevalencia en México. Para su tratamiento se han propuesto compuestos naturales como el resveratrol (RSV) y la quercetina (QRC), cuyo efecto en el tejido adiposo visceral blanco aún no se ha dilucidado completamente. Por ello, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar los efectos de la administración de una mezcla de RSV y QRC en los signos de esta enfermedad y determinar la expresión de las sirtuinas de la 1 a la 3 (SIRT1-3), la proteína 5 del dominio de fibronectina tipo III (FNDC5), la proteína desacoplante-1 (UCP-1) y el proliferador de peroxisoma activado del receptor gama (PPAR- γ) en tejido adiposo visceral en un modelo de SM en rata inducido por sacarosa al 30%.

El diseño de este estudio es experimental (n total =36; ratas Wistar macho controles y con SM tratadas o no con la combinación RSV y QRC a diferentes dosis) y se realizó en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" de Enero 2013 a Diciembre 2014. Se midió la presión arterial (PA), el peso corporal, los parámetros bioquímicos, el perfil lipídico y las adipocinas en suero. Se pesó el tejido adiposo visceral y se determinó la expresión de las SIRT1-3, las cuales se encuentran involucradas en la desacetilación de histonas y de otras proteínas de acuerdo con el estado energético celular. Se estudió también la expresión de FNDC5 y UCP-1 involucrados en la transformación de tejido adiposo blanco en un tejido con características similares al tejido adiposo pardo denominado tejido adiposo beige, y de PPAR- γ el cual es un factor de transcripción en la adipogénesis. Se realizó estadística descriptiva, ANOVA de una vía y prueba t de student.

La PA, el peso corporal, el peso de la grasa visceral, las concentraciones de leptina, insulina y triglicéridos fueron mayores en el grupo SM que en el grupo C. Sin embargo, cuando las ratas con SM se trataron con la mezcla de RSV y QRC, la PA disminuyó 22%. Además se evitó el aumento de peso al disminuir el 25% de la grasa visceral y aumentó la sensibilidad a la insulina. Asimismo, la concentración de insulina disminuyó en un 54% y se corrigió la dislipidemia. La expresión de las SIRT 1 y 2 aumentó pero no hubo cambios en SIRT3. Se identificó la presencia de FNDC5 en tejido adiposo visceral, el cual sólo se había sido descrito en músculo. Además se observó una disminución de UCP-1. Se concluye que el tratamiento con la mezcla de RSV y QRC disminuye los signos del SM y aumenta la expresión de las SIRT 1 y 2.

Palabras clave: *síndrome metabólico, resveratrol, quercetina, tejido adiposo beige, sirtuinas, FNDC5, UCP-1 PPAR- γ .*

1. MARCO TEÓRICO

1.1. SÍNDROME METABÓLICO (SM)

El síndrome metabólico (SM) es una patología que incluye tres o más alteraciones de salud como hipertensión arterial (HTA) moderada, resistencia a la insulina (RI), obesidad abdominal, dislipidemia (hipertrigliceridemia, disminución en la concentración sérica del colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) y aumento en el colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL)), nefropatía, disfunción endotelial, aterosclerosis, entre otras (Baños y cols., 2011). El Adult Treatment Panel (ATP III) del Programa de Educación Nacional de Colesterol establece como criterios de diagnóstico del SM, los que se presenta en la Tabla 1. Como se mencionó anteriormente cumplir con tres de ellos es suficiente para el diagnóstico de SM (Reaven, 2010).

Tabla 1 Criterios para el diagnóstico de SM (Reaven, 2010)

Criterio	Punto de corte
Circunferencia de cintura elevada	>90 cm hombres, >80 cm mujeres
Triglicéridos (TG) elevados	>150 mg/dL
Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) bajo	< 40 mg/dL hombres, < 50 mg/dL mujeres
Presión arterial (PA) elevada	Sistólica >130 mm Hg, diastólica >85 mm Hg
Glucosa en ayuno elevada	> 100 mg/dL

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Nutrición del año 2012 (ENSANUT, 2012) la prevalencia de sobrepeso u obesidad ($IMC > 25 \text{ kg/m}^2$) en México es de 76%, siendo la población de mayor interés pacientes de entre los 30 y 60 años de edad. Además se observó que la distribución abdominal de la grasa tenía una prevalencia de 73%, y está relacionada con mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV). El aumento en la prevalencia de obesidad en México se encuentra entre los más rápidos documentados en el plano mundial. De 1988 a 2012 el sobrepeso de mujeres de 20 a 49 años, incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2%. En el último período de

evaluación 2006-2012, se redujo la velocidad del aumento de sobrepeso y obesidad de 2% anual a menos de 0.35% anual.

1.1.1. ETIOPATOGENIA

1.1.1.1. RESISTENCIA A LA INSULINA (RI)

De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes, la insulino-resistencia es una respuesta biológica alterada a la insulina cuya causa puede ser endógena o exógena. Comprende dos fenómenos: una resistencia de los tejidos periféricos a la captación de glucosa mediada por insulina y una resistencia hepática a la acción de la insulina (menor inhibición de la producción hepática de glucosa estimulada por insulina).

1.1.1.2. ADIPOSIDAD CENTRAL: DEFINICIÓN E IMPLICACIONES

La obesidad es resultado de un balance energético positivo, esto quiere decir que es mayor la energía que se consume de la que se utiliza. El tejido adiposo es una mezcla heterogénea de adipocitos, preadipocitos, células del sistema inmune y endotelio. Puede responder rápidamente al exceso de nutrientes mediante la hiperplasia e hipertrofia. En la obesidad, el aumento en el tamaño de los adipocitos evita el flujo sanguíneo adecuado en este tejido produciendo hipoxia que genera necrosis e infiltración de macrófagos, lo que permite la sobreproducción de ácidos grasos libres, glicerol, y citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) y proteína C reactiva (PCR), entre otros. Estas adipocinas tienen efectos endocrinos, autocrinos, y paracrinos que median múltiples procesos como RI, estrés oxidante, coagulación sanguínea, respuestas inflamatorias que aceleran la aterosclerosis, ruptura de placa y aterotrombosis. La evidencia sugiere que el TNF- α induce la apoptosis de adipocitos y promueve la RI por inhibición de la señalización del substrato receptor de insulina (IRS). La acción paracrina exagera la liberación de ácidos grasos induciendo dislipidemia (Kaur, 2014).

1.1.1.3. ADIPOCINAS

El tejido adiposo además de ser un tejido de almacenamiento de lípidos, es también un tejido de secreción interna ya que produce las hormonas leptina y adiponectina. La primera es una adipocina secretada en relación directa a la cantidad de tejido adiposo y algunas de sus funciones

son: regular el apetito, estimular el gasto de energía, aumentar la expresión de proliferador de peroxisoma activado del receptor alfa (PPAR- α) en hígado con lo cual se promueve la oxidación de ácidos grasos y la biogénesis mitocondrial mediante la activación de la cinasa de AMP (AMPK). La deficiencia de leptina o de su receptor en ratones se manifiesta por hiperfagia, obesidad y RI. Se ha descrito que los niveles de leptina en la circulación se encuentran incrementados en pacientes obesos así como modelos murinos de obesidad sugiriendo que presentan resistencia a la leptina; esta es una alteración en la señalización de la adipocina, inducida por el supresor de señalización de citocinas (SOCS3), también por defectos en la autofagia y estrés de retículo endoplásmico. La leptina activa monocitos y macrófagos para producir citocinas proinflamatorias como IL-6, TNF- α e interleucina 12 (IL-12). Se ha demostrado que el incremento en los niveles séricos de leptina está relacionado con la inhibición de secreción de insulina (Könner y Brüning, 2012).

Por el contrario, la adiponectina es una adipocina secretada en relación inversa a la cantidad de tejido adiposo. Aumenta la sensibilidad a la insulina e incrementa el consumo de glucosa en músculos, suprime la gluconeogénesis en hepatocito y promueve la oxidación de ácidos grasos. En tejido adiposo aumenta la expresión del proliferador de peroxisoma activado del receptor gama (PPAR- γ) promueve el almacenamiento de lípidos y corrige los TG en sangre. En el músculo aumenta la expresión de AMPK y proteínas desacoplantes como la proteína desacoplante 1 (UCP-1), además fosforila IRS mientras que en hígado aumenta AMPK (Orci y cols., 2004; Unger, 2003). Tiene efectos anti inflamatorios ya que suprime la secreción de TNF- α y bloquea la adhesión de monocitos a células endoteliales (Eseberri y cols., 2013). La adiponectina es blanco para la prevención de la obesidad ya que su administración reduce el peso corporal en ratones tanto con una dieta alta en grasa como con una alta en hidratos de carbono; lo que refleja su capacidad para estimular la oxidación de lípidos (Chandran y cols., 2003). El consumo de dietas altas en grasa, sobretodo saturada, reduce los niveles de adiponectina; mientras que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y, la suplementación con omega-3 y ácido eicosapentaenoico incrementan su expresión y por tanto, sus niveles séricos. Además, el incremento de adiponectina se ha asociado con una dieta mediterránea en humanos (Reis y cols., 2010).

El tejido adiposo blanco de tipo visceral y subcutáneo son órganos endocrinos moduladores de procesos metabólicos, ya que producen adipocinas para mediar inflamación y RI en roedores obesos y humanos. La mayoría de las adipocinas son clasificadas como pro y anti inflamatorias de acuerdo a su efecto en las respuestas de inflamación en el tejido adiposo. En humanos y roedores

obesos, las adipocinas anti inflamatorias están ausentes y las proinflamatorias se encuentran aumentadas, efecto que se ha asociado con RI.

1.1.1.4. DISLIPIDEMIA

La dislipidemia es un conjunto de alteraciones metabólicas que se manifiestan por cambios en la concentración de lípidos plasmáticos (aumento en colesterol total (CT) >200 mg/dL, TG >150 mg/dL, c-LDL >100 mg/dL, c-HDL <40 mg/dL en hombres y c-HDL <60 mg/dL en mujeres). Se la ha asociado como factor de riesgo para la salud, especialmente en aterosclerosis y ECV.

El colesterol no-HDL (c no-HDL) (incluye el c-VLDL, c-LDL, y las lipoproteínas de densidad intermedia c-IDL) se caracteriza por estar compuesto de moléculas pequeñas, densas y altamente aterogénicas; por lo que es un predictor de riesgo de muerte por ECV.

El papel de los ácidos grasos en la RI incluye la lipotoxicidad que se refiere a la liberación de ácidos grasos y TG, los cuales se acumulan en hígado, músculo y páncreas, y en este último, se manifiesta como una pérdida de sensibilidad a la glucosa. (Carvajal y cols., 2007). En el hígado, los ácidos grasos estimulan la gluconeogénesis (producción hepática de glucosa) como consecuencia de la inhibición de la acción de la insulina. Paralelamente, el músculo pierde la capacidad para metabolizar glucosa y lípidos, ocasionando la acumulación de TG intra-celulares y concluyendo en RI. Como resultado de la inhibición de la oxidación de ácidos grasos, en las células musculares aumentan algunos intermediarios como el diacilglicerol y acil-CoA. Estos intermediarios estimulan la actividad de isoformas de proteína cinasa C (PKC), las cuales fosforilan la serina del IRS, reduciendo la señalización de insulina (Carvajal y cols., 2007). Los pacientes con diabetes tienen un decremento en la expresión del coactivador del proliferador de peroxisoma activado del receptor gama (PGC-1 α) y genes relacionados con la fosforilación oxidativa en músculo (Shi y cols., 2005). PGC-1 α es un coactivador transcripcional PPAR- γ implicado en biogénesis mitocondrial, incremento del metabolismo oxidativo y regulación de la termogénesis adaptativa en respuesta al frío (Rodgers y cols., 2008).

1.1.1.5. HIPERTENSIÓN

La insulina actúa sobre las células musculares lisas y sobre el endotelio. A nivel de los miocitos vasculares, esta hormona modifica los niveles intracelulares de calcio incrementando la contractilidad vascular. La insulina estimula el sistema nervioso simpático (SNS) promoviendo la secreción de renina por el aparato yuxtaglomerular, por lo que aumenta la reabsorción renal de sodio y causa un incremento en la concentración de angiotensina II. La insulina también aumenta la síntesis y la liberación de endotelina por el endotelio vascular y evita la síntesis del óxido nítrico (ON), el cual es un potente vasodilatador. Todos estos efectos en conjunto promueven la elevación de la PA (Sánchez y cols., 2004).

1.1.2. MODELOS ANIMALES DE SM

Para el estudio del SM se han diseñado diversos modelos animales que asemejan los signos del SM. Entre ellos se han documentado varios modelos genéticos de obesidad y diabetes tipo 2 incluyendo los ratones *db/db* y *ob/ob*, las ratas diabéticas Zucker (*fa/fa*), modelos a base de dietas altas en lípidos o altas en hidratos de carbono y lípidos y, altas en fructosa o sacarosa (Baños y cols., 2011).

Hwang y cols. (1987) describieron un modelo experimental de rata con HTA y RI inducida por fructosa. Más tarde dos investigadores del mismo grupo, describieron que el consumo elevado de sacarosa y/o glucosa puede inducir HTA en modelos de ratas (Baños y cols., 1997).

1.1.2.1. MODELO EN RATA DE SACAROSA AL 30%

A pesar de que existen numerosos modelos que asemejan los signos del SM, se decidió usar el modelo de sacarosa al 30%, el cual es una variante del descrito por Reaven. Baños y cols. (1997) describieron las características del modelo de ratas Wistar alimentadas con sacarosa en el agua de bebida al 30% durante un período de 12 a 17 semanas, las cuales incluyen el desarrollo de hipertrigliceridemia, HTA, hiperinsulinemia, anormalidades en la reactividad vascular manifestadas por hipercontractilidad e hiporelajación debido a un daño endotelial y a la concentración sérica de lípidos. Esta condición se asemeja a las complicaciones patológicas de los pacientes con SM (Baños y cols., 1997). Posteriormente, Rubio y cols. (2005) caracterizaron a detalle los cambios del modelo, estratificando por edad a los 4, 6, 12 y 18 meses; obteniendo un incremento en el peso (adiposidad central), HTA e hipertrigliceridemia a partir de los 4 meses, e hiperinsulinemia a partir

de los 6 meses, acompañado del incremento en la contractilidad vascular que disminuye durante el proceso de envejecimiento por incremento en la rigidez de los vasos.

1.2. TRATAMIENTO DEL SÍNDROME METABÓLICO

Una vez hecho el diagnóstico del SM, el manejo de esta condición debe ser agresivo, para reducir el riesgo de ECV y diabetes tipo 2. La intervención primaria incluye la restricción calórica (RC) moderada (objetivo: reducción de 5-10% del peso corporal en el primer año), incrementar la actividad física moderadamente y cambiar la composición de la dieta. Se ha documentado que una dieta baja en calorías combinada con ejercicio físico promueve: 1) pérdida gradual de peso, acompañado del incremento del gasto de energía, 2) aumento en la capacidad oxidativa del músculo, 3) corrección del estrés oxidativo, 4) la disminución de la PA, 5) mejoría en la sensibilidad a la insulina y 6) corrección de la dislipidemia, entre otros (Baños y cols., 2011; Chew y cols., 2006).

1.2.1. FÁRMACOS

La intervención secundaria se brinda a pacientes cuyo cambio en el estilo de vida no es suficiente y es considerado de alto riesgo para ECV. La terapia con fármacos es requerida para el tratamiento de los signos del SM y reducir sus complicaciones y los fármacos más frecuentemente empleados se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2 Fármacos recomendados para el tratamiento de los componentes del SM (Tomado de International Diabetes Federation, 2006)

Dislipidemia
<p>OBJETIVO: Disminución de TG (disminuyendo apolipoproteína B (Apo B) y c-VLDL y LDL).</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aumento de los niveles de c-HDL. • Reducir niveles de c-LDL. <p>OPCIONES: Fibratos (agonistas de PPAR) mejoran los componentes de la dislipidemia y reducen el riesgo de ECV en personas con SM.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estatinas, reducen las lipoproteínas que contienen ApoB para disminuir c-LDL y aumentar c-HDL. • Fibratos, en combinación con estatinas pero pueden tener efectos colaterales complicados.
HTA
<ul style="list-style-type: none"> • Categóricamente la HTA se considera cuando la PA es >140/>90 mmHg • En pacientes con diabetes establecida, los puntos de corte para la PA>130/>80 mmHg. <p>OPCIONES:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina 1 y bloqueadores del receptor de angiotensina son fármacos antihipertensivos útiles.
RI e hiperglicemia
<ul style="list-style-type: none"> • La metformina previene o retrasa el desarrollo de diabetes. • Las tiazolidendionas, retrasan y previenen la diabetes tipo 2 en personas con alteraciones en la tolerancia a la glucosa y RI. • El orlistat se usa para retrasar el desarrollo de diabetes tipo 2, ya que inhibe la lipasa pancreática encargada de hidrolizar los TG de la dieta, inhibiendo su absorción.

1.2.2. COMPUESTOS NATURALES

Se han probado algunos compuestos naturales para el tratamiento del SM en el modelo con sacarosa al 30%. Por ejemplo, la Jamaica, la cual presenta efectos antihipertensivos como inhibidor de la diferenciación adipogénica y antiaterogénica mediante la inhibición de la oxidación del c-LDL (Pérez-Torres y cols., 2013). Además, en pacientes con SM, funciona como un potente

antioxidante y reduce la concentración sérica de glucosa, CT y TG (Gurrola-Díaz y cols., 2010). Por otro lado, la glicina ejerce efectos protectores contra la HTA, incrementando la oxidación de ácidos grasos, reduciendo la acumulación de la grasa abdominal y de ácidos grasos no esterificados de la circulación en el modelo de ingestión de sacarosa al 30% (El Hafidi y cols., 2004).

Recientemente se han descrito algunos de los efectos benéficos a la salud del resveratrol (RSV) y la quercetina (QRC) para el control de alteraciones metabólicas tales como dislipidemia, RI, esteatosis hepática, HTA, y aunque los mecanismos no están completamente dilucidados, se sabe que ambos polifenoles tienen la capacidad de unirse a algunas proteínas y de esta manera activarlas alostéricamente. Tal es el caso de las sirtuinas (SIRT6) a las cuales se les han atribuido diversos efectos benéficos para la salud derivados de la RC (Rivera y cols., 2009; Ramadori y cols., 2009; Davis y cols., 2009; Bujanda y cols., 2008).

1.2.2.1. RESVERATROL Y QUERCETINA.

El RSV (5-(E)-2-(4-hidroxifenil) etenil) benzeno-1,3-diol) es un polifenol natural presente en la piel y semilla de las uvas, moras, cacahuates, y otros productos alimenticios, además del vino tinto al que se le han atribuido efectos cardioprotectores. Se cree que el RSV actúa como fitoalexina, protegiendo a las plantas contra patógenos en respuesta al estrés. Se han descrito gran variedad de efectos en la salud, dentro de ellos están sus propiedades anticancerígenas, anti-envejecimiento, anti-diabéticas, anti-virales, neuroprotectoras y cardioprotectoras (Kapetanovic y cols., 2011; Michan y Sinclair, 2007).

La evidencia de estudios clínicos demuestran que la suplementación de RSV a dosis 150 mg/día regula la PA, mejora la sensibilidad a la insulina, tasa metabólica y esteatosis hepática en pacientes obesos (Timmers y cols., 2011). En pacientes con diabetes tipo 2, 10 mg al día de este polifenol, mejoró la sensibilidad a la insulina debido a la disminución de estrés oxidativo y a la señalización más eficiente de la vía proteína cinasa B (Brasnyó y cols., 2011). El estudio de Chen y cols. (2015) nos muestra que la administración de 600 mg al día de RSV promueve en pacientes con hígado graso no alcohólico la disminución de glucosa, índice HOMA de resistencia a la insulina, CT, c-LDL, y marcadores enzimáticos inflamatorios de hígado como: alanina aminotransferasa (AST) y

aspartato aminotransferasa (ALT). De acuerdo al meta-análisis que incluyó 11 estudios aleatorizados y randomizados, se reportó que el RSV mejora significativamente la tolerancia a la insulina y mejora los niveles de glucosa en pacientes diabéticos (Liu y cols., 2014).

La QRC [2-(3,4-dihidroxifenil)- 3, 5, 7-trihidroxi-4H-cromen-4-no] es un derivado de plantas perteneciente al grupo de polifenoles denominados flavonoides. Las principales fuentes naturales de QRC incluyen cebolla, manzana y té negro. A este compuesto, se le atribuyen efectos cardioprotectores, antioxidantes, anti inflamatorios y anti carcinogénicos (Boer y cols., 2005).

Existe poca evidencia clínica acerca del uso de la QRC como agente preventivo o terapéutico de enfermedades crónicas. En estudios epidemiológicos existe una correlación inversa entre el consumo de flavonoides, específicamente de QRC, y la incidencia de cáncer, enfermedades inflamatorias, así como con la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares, debido a su capacidad antioxidante, que inhibe la peroxidación lipídica de membranas celulares, impide la oxidación de c-LDL y aumenta el c-HDL (Yang y cols., 2015; Kobylíńska y Janas, 2015). Por otro lado, Dower y cols. (2015) demostraron que la suplementación con 160 mg/día de la forma glucosilada de QRC durante 4 semanas no tiene efecto como vasodilatador, disminuyendo la resistencia a la insulina, u otros factores de riesgo cardiovasculares. Las estructuras químicas del RSV y QRC se presentan en la Figura 1.

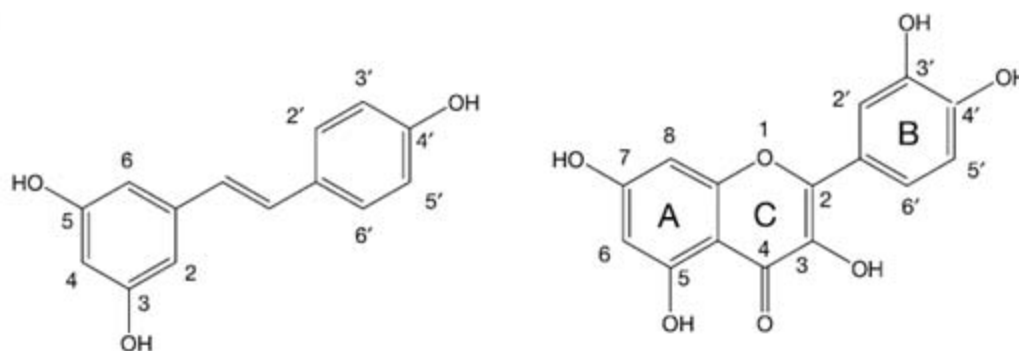


Figura 1. Estructura química del RSV (derecha) y la QRC (izquierda).

FARMACOCINÉTICA DEL RSV Y QRC

El RSV tiene una baja biodisponibilidad oral ya que sufre un metabolismo rápido de primer paso; en el plasma se pueden encontrar en mayor cantidad sus conjugados como glucurónido y sulfatos. En el estudio de Kapetanovic y cols. (2011) se observó que en ratas de 6 a 7 meses, la administración de RSV en dosis de 50 mg/kg durante 14 días tiene un tiempo de concentración

máxima de 15 min, con un pico de la concentración de 176 ng/mL y un tiempo de vida media de 5.5 h a una concentración de 902 ng* h/mL y una biodisponibilidad del 19.9%.

La QRC es absorbida en intestino delgado e inmediatamente metabolizada por enzimas de las células epiteliales y posteriormente por el hígado. El grupo catecol de la QRC es metilado en la posición 3'-4' por la catecol-O-metil transferasa (COMT) resultando en la formación de isorhamnetina (3'OCH₃-QRC) o tamarixetina (4'OCH₃-QRC), estos metabolitos junto con la QRC pueden ser conjugados en sus grupos hidroxil con ácido glucurónico o sulfato por la UCP-glucoronosiltransferasa o sulfotransferasa, respectivamente. La vida media de la QRC en plasma en humanos es de entre 17 y 18 h. En el estudio de Boer y cols. (2005) se analiza la distribución de la QRC (en una dosis de 50 y otra de 500 mg/kg durante 11 semanas) y sus metabolitos, encontrándose que los mayores niveles de QRC están en pulmones, y los niveles menores en cerebro y tejido adiposo blanco en las ratas, mientras que las concentraciones del metabolito aglicona isorhamnetina fueron mayores en hígado.

1.2.2.2. RSV Y QRC: MECANISMO EPIGENÉTICO, COMO ACTIVADORES DE LAS SIRTs

Durante el proceso normal de la transcripción existen dos estados de la cromatina: la primera es la forma laxa de la cromatina (eucromatina) en donde las histonas se encuentran acetiladas y ésta es la forma en la que se traduce activamente el DNA a proteínas, y la segunda es la forma compacta de la cromatina (heterocromatina) en que las histonas se encuentra desacetiladas y por tanto no se permite la transcripción de DNA a proteína. Las SIRTs son deacetilasas de histonas dependientes de nicotín adenín dinucleótido oxidado (NAD⁺), que sirven como sensores del estado energético celular y como reguladoras transcripcionales controlando el estado de desacetilación de las histonas (Houtkooper y cols., 2012). Algunas de sus funciones consisten en regular el silenciamiento postranscripcional, es decir, impedir la traducción del ácido ribonucleico (RNA) a proteína, controlar la estabilidad genómica de los telómeros y reparar sus daños, promover la transcripción del ácido desoxirribonucleico (DNA) ribosomal, retrasar el envejecimiento y extender la vida media de diversos organismos.

Howitz y cols. (2003) describieron que tanto el RSV como la QRC son polifenoles que pueden aumentar la actividad de la Sirtuina 1 (SIRT1) en 13 y 5 veces, respectivamente; esto lo hacen por activación alostérica, disminuyendo la constante de Michaelis (Km) de la SIRT1 por sustratos

acetilados, así como por NAD⁺; concluyendo que el RSV es el principal activador de SIRT1 de entre ocho polifenoles evaluados. Su capacidad se debe a su estructura, caracterizada por un anillo trans-estilbeno. Hubbard y cols. (2013) describieron que los activadores alostéricos de SIRT1 tienen efecto por la presencia en ésta de un residuo de glutamina en su dominio amino terminal y porque la activación de esta SIRT es facilitada por los sustratos acetilados con motivos hidrofóbicos de los polifenoles.

1.2.2.3. FAMILIA DE LAS SIRTs

Las SIRTs fueron descubiertas por primera vez en la levadura (*S. cerevisiae*). Su nombre proviene de las siglas en inglés “Silent Information Regulator Two” (Sir2) y el sufijo -in de proteína (Sirtuin).

En mamíferos, la familia de las SIRTs comprende siete proteínas (SIRT1-7). Éstas son tejido específicas, varían en su localización celular, actividad enzimática y sus blancos (Bitterman y cols., 2002). De acuerdo al análisis filogenético de los 60 dominios nucleares en eucariotas, se clasifican en cuatro clases diferentes (I-IV) como se observa en la Tabla 3 (Houtkooper y cols., 2012).

Tabla 3. Características principales de las SIRTs de mamíferos.

Clase	Localización		Actividad	Proteínas blanco	Función biológica
	intracelular				
SIRT 1	I	Núcleo	Deacetilasa	PGC-1 α , FOXO, NF- κ B	Metabolismo/ Inflamación/ Neurodegeneración
SIRT 2	I	Citoplasma	Deacetilasa	H4, α -tubulina	Ciclo celular/tumorogénesis
SIRT 3	I	Núcleo y mitocondria	Deacetilasa	Ace-CS2	Metabolismo
SIRT 4	II	Mitocondria	ADP-ribosil transferasa	GHD	Secreción de insulina
SIRT 5	III	Mitocondria	Deacetilasa	Desconocida	Desconocida
SIRT 6	IV	Núcleo (heterocromatina)	ADP-ribosil transferasa	DNA-polimerasa β	Reparación de ADN
SIRT 7	IV	Núcleo y nucleolo	Desconocida	RNA-polimerasa I	Transcripción de ADNr

PGC1- α : coactivador de proliferador de peroxisoma activado del receptor gama, *FOXO*: forkhead box, *NF- κ B*: factor de necrosis tumoral kappa B, *H4*: histona 4, *Ace-CS2*: acetil coenzima A sintetasa 2, *GHD*: glutamato deshidrogenasa.

FUNCIONES ENZIMÁTICAS

Las SIRTs son desacetilasas de histonas tipo III porque no son inhibidas por tricostatina A (inhibidor de la desacetilación de histonas) y por tener la característica de ser dependientes de NAD⁺, además que se ha descrito que SIRT4 y 6, tienen actividad de ADP-ribosiltransferasas (Bitterman y cols., 2002).

La reacción enzimática catalizada por las SIRTs requiere NAD⁺ como sustrato, cuya concentración está determinada por el estado nutricional de la célula (Houtkooper y cols., 2012). La reacción de desacetilación se genera mediante dos hidrólisis acopladas, el NAD⁺ que se encuentra formado por nicotinamida y ADP-ribosa mediante un enlace glicosídico es escindido mediante hidrólisis, seguido de una segunda escisión del enlace C-N entre el grupo acetilo y la lisina de histonas o

proteínas, generando dos productos: O- acetil- ADP-ribosa y nicotinamida (Figura 2). Esta última molécula ha sido reportada como inhibidora no competitiva de SIRT6. Se propone que la nicotinamida inhibe la desacetilación mediante la unión a SIRT en un residuo adyacente al sitio de unión de NAD⁺, bloqueando así su hidrólisis (Bitterman y cols., 2002).

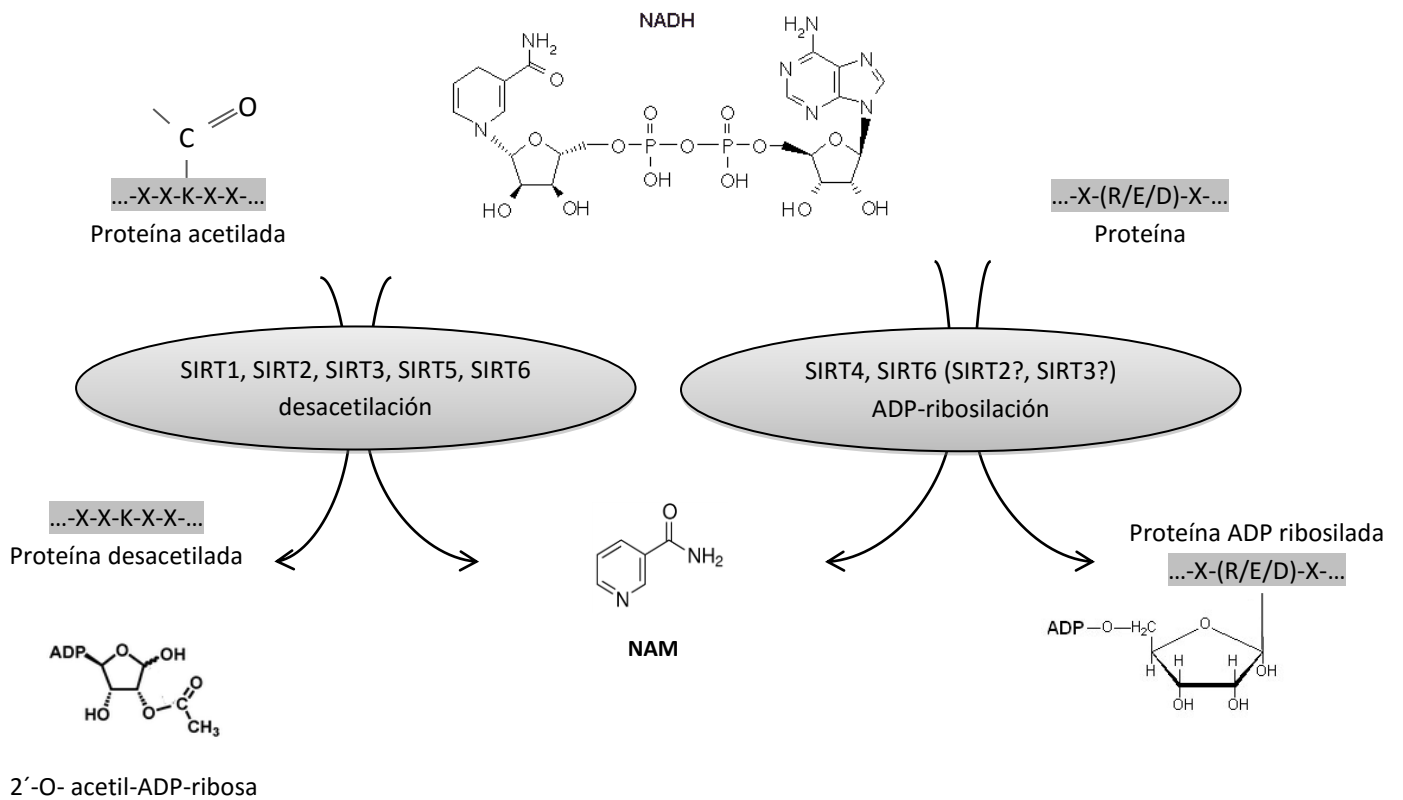


Figura 2. Actividades enzimáticas de las SIRTs. NAD⁺: nicotín adenín dinucleótido oxidado, NAM: nicotinamida, SIRT: sirtuina.

La ADP-ribosa y O- acetil- ADP-ribosa, productos de la acción de las SIRTs, pueden funcionar como segundos mensajeros regulando funciones mitocondriales (Huang y cols., 2010). La O- acetil- ADP-ribosa se une al receptor TRPM2 (receptor de potencial transitorio de canal de cationes) que, en respuesta al estrés oxidativo y nitrosativo, influye en la secreción de insulina e inflamación. Se ha sugerido que la ADP-ribosa liberada del núcleo promueve una ADP-ribosilación masiva que interfiere con la producción de adenosín trifosfato (ATP) en mitocondria.

La familia de SIRT_s comparten su sitio catalítico compuesto por 275 aminoácidos, exhiben extensiones amino y carboxilo terminal variables, lo que contribuye a su localización celular, y regulan su actividad catalítica (desacetilasas o ADP-ribosil transferasas) (Huang y cols., 2010; Michan y Sinclair, 2007).

En estudios cinéticos se ha determinado que los valores de Km de las SIRT_s para NAD⁺ tienen un rango de entre 100-300 mM. Las concentraciones tisulares de NAD⁺ dependen del estado nutricional del organismo: aumentan en ayuno y aminoran con el aporte energético, es decir, las SIRT_s se activan durante el ayuno o RC (Houtkooper y cols., 2012).

SIRT 1

La SIRT1 se encuentra localizada principalmente en el núcleo y plasma (Houtkooper y cols., 2012). Durante la RC, se encuentra regulada a la baja en hipotálamo y a la alta en hígado, tejido adiposo blanco y músculo, indicando que su expresión es órgano dependiente (Huang y cols., 2010; Sebastián y cols., 2012). La SIRT 1 promueve la movilización de grasa en el tejido adiposo blanco mediante su unión y represión de genes involucrados en la adipogénesis como PPAR- γ , proteína de unión a ácidos grasos (Ap2) y proteínas de unión a elementos de regulación de esteroides (SREBP-1c) (Sebastián y cols., 2012) o activa genes encargados de la maquinaria de lipólisis de grasa como el factor de transcripción forkhead box 1 (FOXO1) que induce la expresión de la enzima triglicérido lipasa e incrementa las concentraciones de adiponectina (Michan y Sinclair, 2007; Rieckelt y cols., 2010).

La SIRT1 atenúa la esteatosis inducida por una dieta alta en grasas, mediante la regulación en la expresión hepática de SREBP-1c, superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD), del transportador de colesterol en membrana celular (SR-B1, por sus siglas en inglés scavenger receptor B1), factor nuclear del hepatocito alfa (HNF4 α), el factor nuclear E2 relacionado con el factor-1 (NRF1), TNF- α , IL-6, y el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Pfluger y cols., 2008; Michan y Sinclair, 2007; Rodgers y cols., 2005; Rodgers y Puigserver, 2007). Se ha descrito que SIRT1 regula positivamente la secreción de insulina en células β pancreáticas reprimiendo la expresión de la proteína desacoplante 2 (UCP-2) (Bordone y cols., 2006).

SIRT2

La sirtuina 2 (SIRT2) se encuentra localizada en plasma y en núcleo solamente durante la transición de fase G2 a fase M en el ciclo celular. Se ha descrito a SIRT2 como inhibidor de la diferenciación de adipocitos, posiblemente deacetilando FOXO1 y su transcripción es suprimida por el factor inducible de hipoxia 1α (HIF- 1α). SIRT2 toma parte del metabolismo de la glucosa promoviendo la gluconeogénesis a través de la deacetilación de fosfoenolpiruvato carboxicinasasa (PEPCK). Además la SIRT 2 se encuentra involucrada en la regulación a la baja de la inflamación mediante la deacetilación de NF- κ B en la subunidad p65 en la lisina 310 (Sebastián y cols., 2012).

SIRT 3

La sirtuina 3 (SIRT 3) es una desacetilasa de enzimas mitocondriales clave en el metabolismo. Tiene una secuencia blanco ubicada en mitocondria (Houtkooper y cols., 2012). En murinos se ha descrito que esta proteína incluye una isoforma larga inactiva (de 37 KDa) que se activa posterior a remoción de una secuencia N-terminal y esto es señal para que sea importada a mitocondria quedando la isoforma pequeña y activa de 28 KDa (Fu y cols., 2012; Huang y cols., 2010). Se ha estimado que el 20% de las proteínas mitocondriales, principalmente aquellas relacionadas con el metabolismo, se encuentran acetiladas y la hiperacetilación de éstas se relaciona con la disfunción mitocondrial (Newsom y cols., 2013; Fu y cols., 2012). La SIRT 3 es la principal desacetilasa mitocondrial y en ratones obesos se encuentra disminuida (Shi y cols., 2005).

Algunos de los blancos descritos para SIRT3 son las enzimas encargadas de la oxidación de ácidos grasos como la enoil CoA hidratasa /3 hidroxiaxil CoA deshidrogenasa; la malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa, involucradas en el ciclo de Krebs (Zhao y cols., 2010; Schlicker y cols., 2008; Huang y cols., 2010); la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 2 en la generación de cuerpos cetónicos; glutamato deshidrogenasa (GHD) en el catabolismo de aminoácidos; la acetil CoA sintetasa 2 (Ace-CS2) en la formación de acetil CoA; la carbamoil sintetasa I y la ornitina carbamoilasa en el ciclo de la urea; y la cinasa LKB1 que a su vez activa AMPK (Fu y cols., 2012; Lombard y cols., 2007).

Además la SIRT3 se encarga de activar enzimas antioxidantes como la Mn-SOD y regular el sistema de glutatión para la reducción del daño oxidativo (Qiu y cols., 2010; Tao y cols., 2010; Sebastián y cols., 2012), asimismo está involucrada en la síntesis de ATP a través de los cambios de

desacetilación de proteínas de los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones (Jing y cols., 2011; Finley y cols., 2011; Ahn y cols., 2008).

Previamente, se describió que SIRT3 juega un rol importante en la termogénesis adaptativa del tejido adiposo marrón, ya que la exposición al frío o la RC induce la expresión de SIRT3 en la membrana interna mitocondrial del tejido adiposo marrón, donde promueve la expresión de genes mitocondriales incluyendo la UCP-1, PGC-1 α , citocromo c oxidasa y ATP sintasa (Shi y cols., 2005).

SIRT4

La sirtuina 4 (SIRT4) se encuentra localizada en matriz mitocondrial (Houtkooper y cols., 2012) y sus primeros 28 aminoácidos son removidos después de su importación en mitocondria. La expresión de los niveles de SIRT4 son relativamente elevados en hígado, corazón, riñón y cerebro. Su actividad cataliza la transferencia de ADP-ribosa proveniente de NAD⁺ a una proteína blanco, es decir, tiene actividad de ADP-ribosiltransferasa (Sebastián y cols., 2012).

La SIRT4 regula negativamente la estimulación de secreción de insulina en el páncreas por aminoácidos y glucosa *in vitro* e *in vivo*, por inhibición de la glutamato deshidrogenasa (GHD). Se ha observado también que la expresión de esta enzima disminuye durante la RC, por tanto su regulación está dada por un mecanismo más complejo que por la presencia de NAD⁺ solamente (Haigis y cols., 2006).

La SIRT4 desacetila la enzima degradante de insulina (IDE) y el translocador de adenín dinucleótidos (ANT2). La IDE es una metaloproteinasa ubicuamente expresada, responsable de la degradación intracelular de insulina, implicada en la patogénesis de diabetes tipo 2. Por otro lado, el ANT2 cataliza la transferencia del grupo ADP entre citosol y mitocondria, también asociado con diabetes (Houtkooper y cols., 2012).

Se observó en un modelo *in vitro* con hepatocitos que la represión de SIRT4 aumenta la expresión de SIRT1 que activa enzimas del catabolismo de ácidos grasos. Estos efectos también se observaron en miotúbulos, además del aumento en la respiración celular y niveles de pAMPK (Nasrin y cols., 2010).

SIRT5

La sirtuina 5 (SIRT5) se encuentra localizada en la matriz mitocondrial. Se expresa ampliamente en varios tejidos, con relativamente niveles altos en corazón, músculo, cerebro, hígado y riñón (Huang y cols., 2010).

La SIRT5 exhibe su actividad de desacetilasa contra el citocromo C acetilado, una proteína de espacio intermembranal mitocondrial (Huang y cols., 2010). SIRT5 potencia la síntesis de urea mediante la desacetilación de carbamoil fosfato sintasa 1 (CPS1) encargada de remover el amonio generado del catabolismo de aminoácidos durante inanición, además un estudio reciente reveló que SIRT5 puede demalonilar y desuccinilar CPS1 (Sebastián y cols., 2012).

SIRT6

La sirtuina 6 (SIRT6) es predominantemente nuclear (Houtkooper y cols., 2012), promueve la oxidación de ácidos grasos a través de un mecanismo que involucra a SIRT1, los factores de transcripción forkhead box 3 (FOXO3) y NRF1 que forman un complejo en el promotor de SIRT 6 permitiendo su expresión y la oxidación de ácidos grasos en ratones *wild type*. Un modelo murino con delección de SIRT 6 en hígado mostró el desarrollo de hígado graso y la disminución en la oxidación de ácidos grasos en los hepatocitos. De forma contraria, un modelo con sobreexpresión de SIRT6 muestra una regulación a la baja de genes asociados con almacenamiento de lípidos y acumulación de grasa visceral cuando son alimentados con una dieta alta en grasa, por lo que se establece que SIRT6 promueve la utilización de grasa (Sebastián y cols., 2012).

En el modelo knockdown de *Sirt6*, los animales mueren prematuramente debido a hipoglucemia, exhiben un incremento en la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1), permitiendo el incremento de consumo de glucosa por el músculo esquelético y tejido adiposo marrón. Asimismo, las células madre embrionarias presentan una disminución en el consumo de oxígeno y un aumento en la producción de lactato en comparación con los controles, este fenotipo se debe a que la habilidad de SIRT6 de disminuir la expresión de genes glucolíticos como fosfofructocinasa 1 (*Pfk1*) y *Glut 1*, mediante la desacetilación de la lisina 9 de la histona 3, ésta a su vez permite la desestabilización de la subunidad RelA de NF-κB regulando a la baja su expresión, lo que tiene un efecto antiinflamatorio (Sebastián y cols., 2012).

SIRT7

La sirtuina 7 (SIRT7) se localiza en nucléolo, sin embargo, sus funciones y blancos son aún desconocidos (Houtkooper y cols., 2012).

1.2.2.4. EVIDENCIA DEL EFECTO DEL RSV, QRC Y LA PARTICIPACIÓN DE SIRTS EN EL SM

Se han descrito diversos estudios en modelos *in vivo* e *in vitro* en los que se emplea el RSV y la QRC. Lagouge y cols. (2006) demostraron en un modelo murino con una dieta hipercalórica a base de grasa que el tratamiento con RSV incrementa la capacidad aeróbica a través de un incremento en el consumo de oxígeno de fibras musculares. Estos efectos se asociaron con la desacetilación y el aumento en la actividad de PGC-1 α (mediada por SIRT1), el cual se encarga de promover la biogénesis mitocondrial. Se describe también que el tratamiento con RSV protege a los ratones del desarrollo de RI.

Otro grupo de investigación (Baur y cols., 2006) describió que en un modelo murino con alto consumo en grasas, la administración de RSV aumenta el tiempo de vida de los animales, incrementa la sensibilidad a la insulina, reduce los niveles del factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1) característico del SM, incrementa la actividad de AMPK y PGC-1 α , aumenta el número de mitocondrias y mejora la función motora, por lo que es efectivo en el tratamiento de la RI. Mientras que en el modelo murino de hígado graso alcohólico de Ajmo y cols. (2008), la administración de RSV aumentó la actividad y expresión de AMPK, SIRT1, PGC-1 α [y sus blancos acil-CoA oxidasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena media y carnitín palmitoiltransferasa 1(CPT1)], y los niveles de adiponectina y su receptor, mientras que suprimió la actividad y expresión de SREBP-1c (que regulan enzimas lipogénicas, incluyendo la glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial, la esteroil coenzima A desaturasa 1 y la enzima málica). Además se demostró que el tratamiento con RSV reduce la expresión de la enzima ácidos graso sintasa (FAS) lo que aumentaba la oxidación de ácidos grasos y reducía su síntesis.

Se ha documentado que la hidrolasa de ADP-ribosa cíclica (CD38) es una enzima que degrada al NAD⁺. Su delección se asocia con un aumento en los niveles de NAD⁺ que protege contra el SM y la obesidad. Escande y cols. (2013) caracterizaron *in vitro* e *in vivo* la inhibición de la proteína CD38

mediante la QRC, con ello hay un aumento de NAD⁺ y un decremento en los niveles de acetilación global así como de p53 y RelA-p65, a través de la estimulación de SIRT1.

La disfunción mitocondrial en tejidos periféricos y cerebro juega un papel importante en la etiología de la diabetes. En el estudio realizado por Davis y cols. (2009) con ratones se encontró que la QRC a dosis de 25 mg/kg por 7 días, incrementa la biogénesis mitocondrial en músculo y cerebro por un mecanismo que involucra el aumento en la concentración de citocromo C y en la expresión de SIRT1 y PGC-1 α .

El RSV y la QRC son activadores indirectos de SIRT1 y activan la expresión y actividad de Nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) y AMPK lo que tiene por resultado el incremento de los niveles intracelulares de nicotinamida mononucleótido (NMN), sustrato limitante en la formación de NAD⁺. Cuando se incuban células HepG2 con glucosa, nicotinamida o NADH se reducen los niveles de fosforilación de AMPK, de su blanco la enzima acetil CoA carboxilasa (ACC) involucrada en la β -reducción, de los niveles proteicos de SIRT1 y aumentan los niveles de PGC-1 α acetilado. Mientras que el piruvato revierte estos efectos. Durante la incubación con RSV y QRC se incrementa la fosforilación de AMPK y ACC de manera dosis dependiente. La cantidad de SIRT1 no se altera pero su actividad se eleva, incrementando la afinidad por sus sustratos (Suchankova y cols., 2009). Al activar AMPK, aumenta la transcripción de NAMPT, enzima encargada de la síntesis de NAD⁺, y por tanto activa a las SIRTs. Además durante la activación de AMPK algunos de sus blancos como las proteínas desacoplantes UCP-2 y 3 son reprimidas por SIRT1 en condiciones normo calóricas (Fulco y cols., 2008).

1.2.2.5. INDUCCIÓN DE “BROWNING” DEL TEJIDO ADIPOSO, OTRO MECANISMO DE ACCIÓN DEL RSV RELACIONADO CON SIRT1

El tejido adiposo blanco es el más común en humanos adultos, principalmente el tejido adiposo subcutáneo y el visceral. Se encarga del almacenamiento y liberación de lípidos en respuesta a condiciones metabólicas, sin embargo, carece de la capacidad de eliminar energía en forma de calor (Mc Gown y cols., 2014).

El “browning” es un proceso recientemente descrito que conduce a la transformación de tejido adiposo blanco a tejido adiposo beige por señalización química, agentes agonistas del Sistema nervioso simpático (SNS) y exposición al frío. El tejido adiposo beige presenta la expresión de

lipoproteína lipasa (LPL), lipasa de triglicéridos de adiposo (ATGL), GLUT1/4 y UCP-1, lo que permite generar calor y el catabolismo de lípidos y glucosa, de manera similar al tejido adiposo marrón (Mc Gown y cols., 2014; Townsend y Tseng, 2014).

El tejido adiposo marrón se presenta principalmente en niños recién nacidos, animales que hibernan, y en humanos adultos específicamente localizado en el cuello, clavícula y médula espinal. Su principal característica es generar calor a partir de la grasa en un proceso conocido como termogénesis, vía expresión de UCP-1 en la mitocondria. El tejido adiposo marrón se caracteriza por el almacén de lípidos en gotas multiloculares lo cual facilita el acceso a lipasas para acelerar el proceso de termogénesis. Se encuentra altamente innervado por el SNS y está altamente vascularizado (Mc Gown y cols., 2014). Grandes cantidades de tejido adiposo marrón están inversamente relacionadas con la incidencia de enfermedades metabólicas (Zhou y cols., 2003). Las diferencias entre los tres tipos de tejido adiposo se representan en la Figura 3.

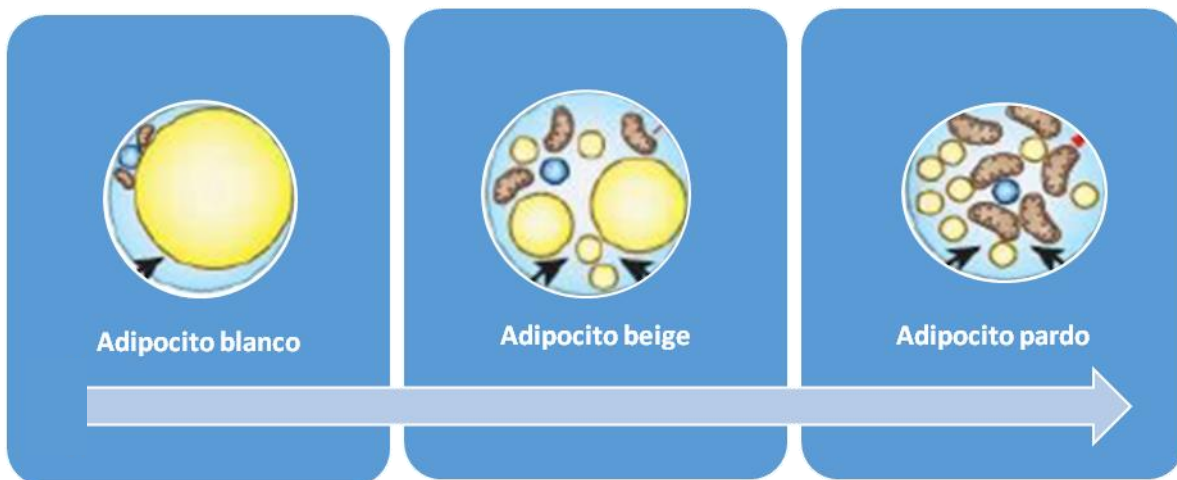


Figura 3. Tipos de adipocitos presentes en el humano adulto. De izquierda a derecha se observa adipocito blanco caracterizado por gotas lipídicas uniloculares, cuyo exceso produce mayor riesgo de RI, diabetes tipo 2 y ECV. En el centro se encuentra el adipocito beige caracterizado por gotas lipídicas multiloculares y más mitocondrias. Del lado derecho el adipocito pardo presenta al igual que el tejido beige gotas lipídicas multiloculares con mayor número de mitocondrias, UCP-1 y por tanto de termogénesis, por lo que está inversamente relacionado con la presencia de RI y obesidad, entre otros. Modificado de: Petrovic y cols. (2010).

Recientemente se describió la participación de SIRT1 en el “browning” de tejido adiposo subcutáneo de ratones con dieta alta en grasa y en modelos celulares con preadipocitos 3T3-L1. La administración de RSV y la sobreexpresión de SIRT1 promueven el aumento en la expresión de UCP-1, aumentan la desacetilación de PPAR- γ y la expresión de PRDM16, permitiendo la

asociación de estos últimos. Esto promueve la expresión de genes de tejido adiposo marrón e inhibe los de tejido adiposo blanco, incrementando el “browning” del adipocito blanco como se muestra en la Figura 4 (Qiang y cols., 2012).

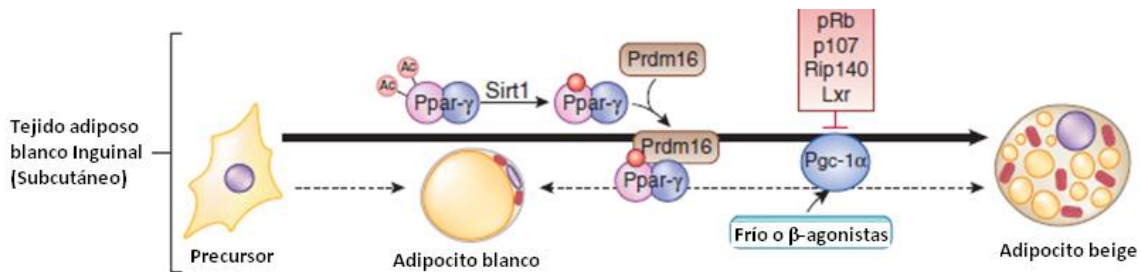


Figura 4. Regulación transcripcional en el desarrollo de adipocitos beige (Harms y cols., 2013). Ppar-γ: proliferador de peroxisoma activado del receptor gama, Sirt1: situina 1, Prdm16: proteína 16 con dominio PR, p-Rb: retino blastoma, Rip140: proteína de interacción con receptor 140, Lxr: receptor nuclear hepático x.

Las UCP son transportadores de membrana interna mitocondrial encargados de facilitar el paso de protones, resultando en el desacoplamiento de la cadena respiratoria y disipando la energía metabólica en forma de calor, proceso al cual se le denomina termogénesis. Se conocen 3 miembros de la familia de las UCPs, la UCP-1 se encuentra principalmente en tejido adiposo marrón en donde se encarga de generar termogénesis mediante activación del SNS, receptores β-adrenérgicos y vías dependientes de adenosín monofosfato cíclico (cAMP). La UCP-2 y 3 controlan la producción de ERO y la oxidación de ácidos grasos por lo que se han relacionado en la regulación metabólica de enfermedades como diabetes y obesidad (Villarroya y cols., 2007).

La regulación en la transcripción de los genes UCP-1, UCP-3 y en menor grado UCP-2 determina los niveles de proteínas en células y tejidos. Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) controlan la transcripción de los genes UCP, en respuesta a ligandos fisiológicos de los PPAR como ácidos grasos, o farmacológicos como los fibratos y tiazolidinedionas como se observa en la Figura 5. Los PPAR-γ son expresados en tejido adiposo blanco, pardo y beige donde se encarga de la diferenciación de adipocitos regulando la expresión de genes involucrados en adipogénesis y almacenamiento de energía (Villarroya y cols., 2007).

Los elementos de respuesta a PPAR del gen UCP-1 pueden unirse a PPAR- γ o PPAR- α , por lo que también la expresión de PPAR- α y su asociación con PGC-1 α inducen UCP-1 y genes para el catabolismo de lípidos en tejido adiposo pardo, por lo que se liberan ácidos grasos que sirven como inductores de la actividad de UCP-1 mediante interacción directa.

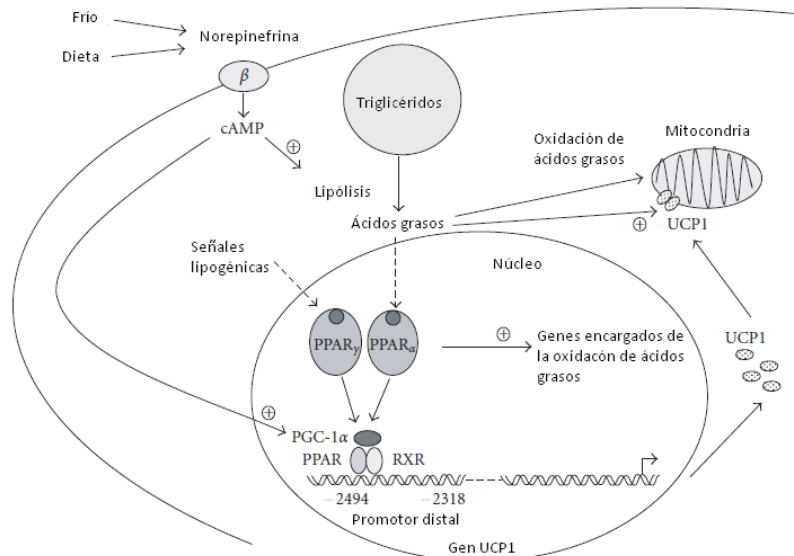


Figura 5. Regulación de la expresión de UCP-1 en tejido adiposo por ligando dependiente de la activación de PPAR- α y PPAR- γ en co-activación con PGC-1 α . Se observan los elementos de respuesta a PPAR en el promotor del gen UCP-1 en rata. Durante la diferenciación de un adipocito marrón se activa la transcripción de UCP-1 mediante PPAR- γ en co-activación con PGC-1 α . En respuesta a un estímulo termogénico en adipocitos maduros, se activa PPAR- α que contribuye a la coordinación de la transcripción de UCP-1 y a la lipólisis (Villarroya y cols., 2007). cAMP: Adenosín monofosfato cíclico, PPAR- α : proliferador de peroxisoma activador del receptor alfa, PPAR- γ : proliferador de peroxisoma activador del receptor gama, UCP-1: proteína desacoplante 1, PGC1- α : coactivador del proliferador de peroxisoma activado del receptor gama, RXR: receptor retinoide x.

El PGC-1 α fue identificado como una proteína de interacción con PPAR- α expresado en adipocitos pardos en respuesta a la activación termogénica de la vía inducida por cAMP. El PGC-1 α es esencial para la diferenciación de tejido adiposo pardo y la expresión del gen UCP-1. La expresión forzada de PGC-1 α en adipocitos blancos induce la biogénesis mitocondrial y la expresión de UCP-1 promoviendo termogénesis (Boström y cols., 2012). La inducción de “browning” en roedores promueve la disminución en el peso y mejora la homeostasis de glucosa (Zhou y cols., 2003). Uno de los efectos del ejercicio recientemente descrito, es la transformación de tejido adiposo blanco en pardo (“browning”) mediante el aumento en la expresión de una proteína denominada irisina.

La irisina es una proteína secretada por músculo esquelético a partir de su precursor denominado “Proteína 5 del Dominio de Fibronectina tipo III” (FNDC5) (25kDa). Esta es una proteína integral de membrana con un dominio de fibronectina que se sobre-expresa en presencia de PGC1- α , y que al ser cortado es capaz de viajar por el torrente sanguíneo hasta llegar a tejido adiposo blanco donde promueve la expresión de PPAR- α y de proteínas termogénicas como UCP-1 que caracterizan el tejido adiposo marrón o la biogénesis mitocondrial como se muestra en la Figura 6 (Boström y cols., 2012).

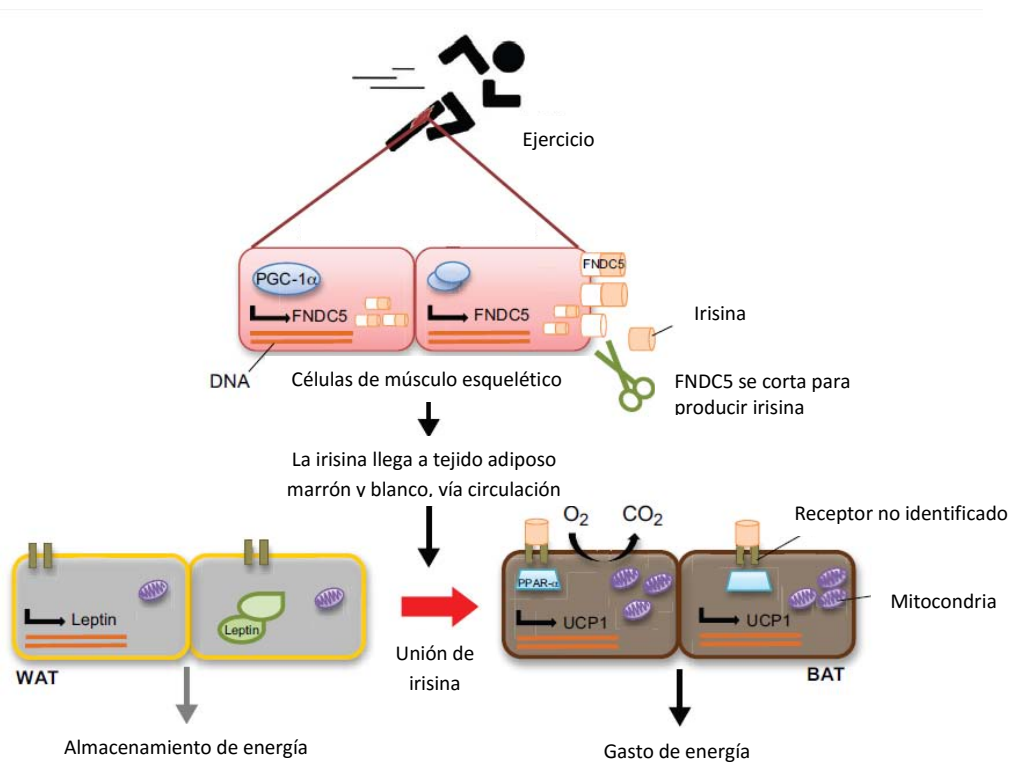


Figura 6. Mecanismo de regulación del “browning” en tejido adiposo blanco, comunicación entre músculo y tejido adiposo blanco (Castillo-Quan, 2012). PGC-1 α : coactivador de proliferador de peroxisoma activado del receptor gama, WAT: tejido adiposo blanco, FNDC5: proteína 5 del dominio de fibronectina tipo III, PPAR- α : proliferador de peroxisoma activado del receptor gama, O₂: oxígeno, CO₂: dióxido de carbono, UCP-1: proteína desacoplante 1, BAT: tejido adiposo marrón.

2. JUSTIFICACIÓN

En la población mexicana, 7 de cada 10 adultos presentan sobrepeso y de estos, la mitad presenta obesidad (ENSANUT, 2012) lo que constituye un serio problema de salud pública. La obesidad es uno de los parámetros claves en el SM, el cual se caracteriza por ser una enfermedad metabólica que incluye la presencia de HTA, hipertrigliceridemia, hiperglucemia y obesidad central, y que predispone al desarrollo de ECV (Reaven, 2010). El aumento en la incidencia de obesidad y SM se debe a que existe un excesivo consumo de productos industrializados altos en azúcares simples y grasas, por lo que aumenta la cantidad de tejido adiposo.

En el cuerpo humano existen dos depósitos de tejido adiposo blanco: el visceral y el subcutáneo. El primero es el metabólicamente activo porque secreta adipocinas y citocinas pro-inflamatorias que tienen efectos metabólicos en hígado y músculo. Se ha demostrado que en el tejido adiposo subcutáneo se lleva a cabo el proceso de “browning” o cambio de tejido adiposo blanco a beige y es resultado de los efectos benéficos del ejercicio en la obesidad y de la comunicación entre músculo y tejido adiposo mediado por la miocina llamada irisina derivada de FNDC5. Este proceso previene algunos de los efectos nocivos de la acumulación de tejido adiposo blanco.

Hasta el momento se continúan desarrollando estrategias para el tratamiento la obesidad y del SM, dentro de los que se encuentran compuestos de origen natural como es el RSV y la QRC. El RSV y/o QRC como la RC promueven la disminución de la cantidad de tejido adiposo visceral. El modo en el que estas sustancias actúan a nivel molecular aún no está completamente establecido aunque se sabe que estos polifenoles son capaces de activar a las SIRT6, proteínas involucradas en la activación de enzimas encargadas del catabolismo de ácidos grasos e inhibición de las encargadas de adipogénesis. Recientemente, se ha relacionado a las SIRT6 con el “browning” del tejido adiposo subcutáneo lo cual les permite realizar termogénesis y lipólisis con mayor eficacia.

En este trabajo decidimos explorar el mecanismo molecular mediante el cual actúan los polifenoles en el tejido adiposo visceral determinando la modificación en la expresión de las SIRT6, así como de proteínas claves del “browning”.

3. HIPÓTESIS

Debido a que compuestos naturales como el RSV y la QRC tienen efectos benéficos en el control de la obesidad y el SM mediante varios mecanismos, al administrarlos de forma oral en los animales con SM, se inducirá la expresión de las SIRT (1-3) así como el proceso de “browning” del tejido adiposo visceral.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración de RSV y QRC en un modelo de SM.

4.1.OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Caracterizar el modelo de SM con ingesta de sacarosa al 30%.
- 2.- Evaluar el efecto de la mezcla RSV y la QRC en las manifestaciones del SM y compararlos con los animales control.
- 3.- Determinar el efecto de la mezcla del RSV y QRC en la expresión de SIRT 1-3, FNDC5, UCP-1 y PPAR- γ en el tejido adiposo visceral.

5. METODOLOGÍA

5.1 REACTIVOS

Reactivo	Casa comercial
Etanol, sacarosa, alcohol metílico, alcohol etílico	Meyer
Solución fisiológica cloruro de sodio, insulina	PISA Farmacéutica
MgCl ₂ , HEPES, KCl, CaCl ₂ ,	J.T. Baker
NaCl	Golden Bell reactivos
Imidazol	Sigma Aldrich
Glicerol, glicerina	Técnica química
Tritón X-100, desoxicolato de sodio,	Shelton Scientific, Inc.
Inhibidor de proteasa. Complete	Roche
Reactivo de Bradford, persulfato de amonio, dodecilsulfato de sodio,	Bio Rad
TRIS BASE	Santa Cruz Biotechnology
Acrilamida, bis-acrilamida, glicina, azul de coomasie,	Ambresco
Mercaptoetanol	ICN Biomedicals
Tween 20	Hycel de México S.A. de C.V.
Luminol, peróxido de hidrógeno	Millipore
Albumina bovina	Irvine scientific
Revelador, fijador	Kodak

5.2 ANIMALES Y TRATAMIENTO:

Se utilizaron ratas Wistar macho de 21 días de edad que se dividieron en 2 grupos de los cuales el primero fue el grupo experimental (SM) al cual se le administró sacarosa al 30% en el agua de bebida y al segundo fue el grupo control (C) que bebió agua natural durante 6 meses. Cinco meses después de haber iniciado el tratamiento, se les administró una mezcla comercial de RSV y QRC disuelta en etanol (0.2%) como vehículo en el agua de bebida que se les preparaba a diario para evitar la degradación de los polifenoles. La cantidad de agua que los animales bebieron se ajustó

para que fuese la misma en todos los grupos, evitando sesgos en la investigación.

Los compuestos naturales se obtuvieron del suplemento alimenticio comercial marca ResVitalé que contiene 20 mg de QRC por cada 1,050 mg de RSV. En la Figura 7 se presentan las dosis de los tratamientos, los cuales se designaron de acuerdo a los antecedentes de este estudio.

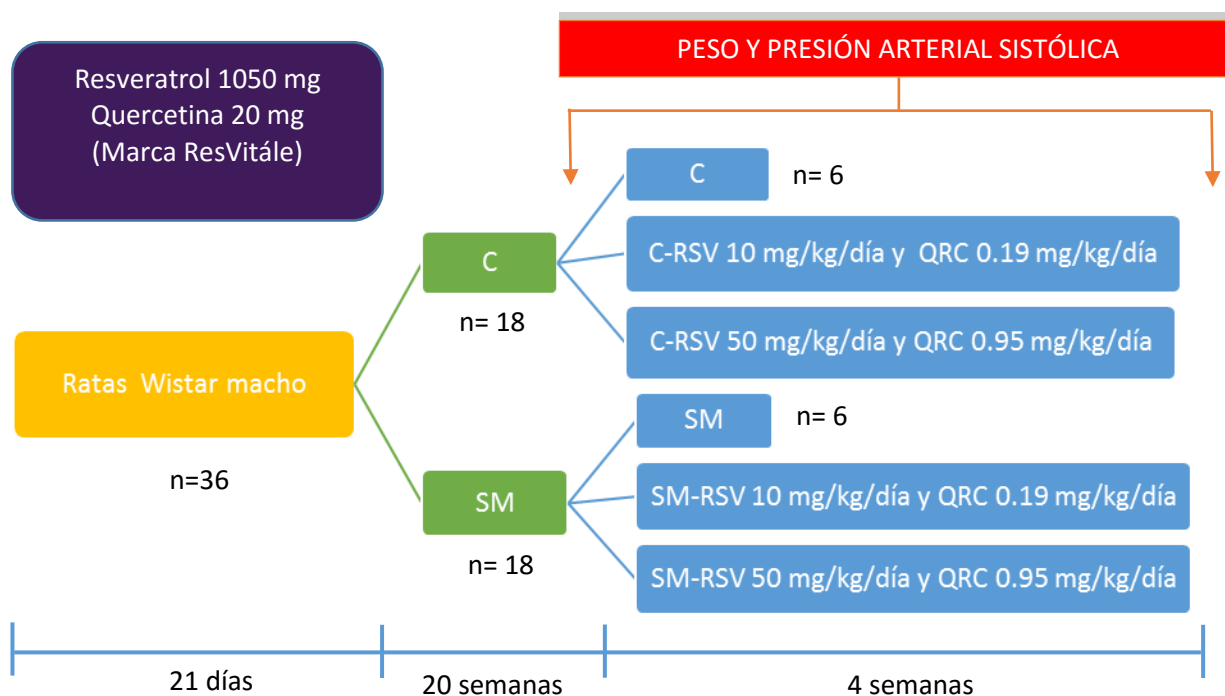


Figura 7. Esquema de tratamiento. Se emplearon 36 ratas macho Wistar que se dividieron en grupo SM y grupo C, a su vez estos grupos se subdividieron tres grupos más: el grupo sin tratamiento, el grupo con RSV y QRC a dosis de 10 mg/kg/día y 0.19 mg/kg/día, respectivamente, y el grupo con RSV y QRC a dosis de 50 mg/kg/día y 0.95 mg/kg/día, respectivamente. Este tratamiento se les aplicó por un período de cuatro semanas, cada semana se pesó a los animales para ajustar la dosis de RSV y QRC. RSV: resveratrol, QRC: quercetina, C: control, SM: síndrome metabólico.

Todos los animales recibieron alimento comercial para roedores *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de temperatura y ciclo de luz-obscuridad controlada.

5.2.1 DETERMINACIÓN DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA Y PESO:

La PA sistólica se midió en animales conscientes colocándoles un brazaletes en la cola; el brazaletes se conectó a un transductor de pulso neumático (Narcobio-systems, Inc., Healthdyne. CO, EUA) y un electroesfingomanómetro programado. La presión se tomó a los 5 meses del tratamiento con

sacarosa para comprobar la inducción del SM y 4 semanas después del tratamiento con RSV y QRC. El peso de los animales se registró semanalmente para ajustar la dosis de los tratamientos.

5.2.2 CURVA DE TOLERANCIA A LA INSULINA:

Se pesó a los animales para calcular la concentración de insulina (1 U/kg de peso) y esta se mezcló con solución fisiológica para obtener un volumen final de 100 µL. Se calibró el glucómetro marca Abbott (Free Style Optium, OX, UK) y se hizo una punción en la cola de la rata para medir la glucosa inicial en sangre. Se inyectó la solución de insulina vía intraperitoneal y posteriormente se tomaron mediciones de glucosa a los 15 min, 30 min, 60 min, 90 min y 120 min. Se graficó en porcentaje de cambio de glucosa.

5.2.3 OBTENCIÓN DE SUERO:

Tras 12 h de ayuno las ratas se sacrificaron por decapitación y se recolectó la sangre. Se obtuvo el suero mediante la centrifugación a 600 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y se guardaron los sobrenadantes a -20°C hasta que se necesitaron. Se disecó el tejido adiposo visceral, se pesó en fresco, se lavó en un amortiguador fisiológico (MgCl₂ 1.6 mM, NaCl 140 mM, HEPES 5 mM, KCl 5 mM, sacarosa 2.6 mM, CaCl₂ 6.8 mM, pH 7.4) y posteriormente se congeló a -70°C.

5.2.4 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA, TG Y CT EN SUERO:

La concentración de glucosa, TG y CT en suero se realizó utilizando métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Laboratorios Randox Ltd, Antrin, Reino Unido).

5.2.5 DETERMINACIÓN DE INSULINA, LEPTINA Y ADIPONECTINA EN SUERO:

Se determinaron las concentraciones de insulina, leptina y adiponectina mediante Radioinmunoanálisis (RIA), con un estuche comercial específico para ratas (Linco Research, Inc. MO, EUA) con una sensibilidad de 0.1 ng/ml.

5.2.6 CÁLCULO DEL ÍNDICE HOMA-IR (HOMEOSTATIC MODEL ASSESSMENT OF INSULIN RESISTANCE):

Se calculó el índice de RI (HOMA-RI) mediante la fórmula publicada por Matthews y cols. (1985):

$$\text{HOMA-RI} = (\text{Insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{Glucosa (mmol/L)}) / 22.5$$

5.2.7 DETERMINACIÓN DE C-HDL Y C-NO HDL EN SUERO:

Se determinó el c-HDL mediante ultracentrifugación secuencial del plasma a una densidad de 1.063 g/ml por 2.5 h a 436,000 xg (Beckman óptima TLX) (Lehmann y cols., 1993; Pérez Méndez y García Hernández, 2007).

El c-no HDL: se define como la diferencia entre el valor de CT y el c-HDL, por lo que no solo incluye el c-LDL, sino que comprende las fracciones de IDL y las VLDL.

5.3 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA DE TEJIDO ADIPOSO VISCERAL:

El tejido adiposo se congeló con nitrógeno líquido y se maceró con amortiguador de lisis (HEPES 25 mM, NaCl 100 mM, Imidazol 14.86 mM, Glicerol 1 M, Triton x-100 15.4 mM, desoxicolato de sodio 16.9 mM, inhibidores de proteasas COMPLETE marca Roche, pH 8) posteriormente se homogeneizó con una jeringa, se centrifugó 10 minutos 19,954 xg en centrífuga refrigerada y se separó el sobrenadante del resto de los componentes celulares, posteriormente el sobrenadante se volvió a centrifugar 19,954 xg durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó y se utilizó posteriormente.

5.3.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA:

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford (1976) en un espectrofotómetro marca Eppendorf a una absorbancia de 595 nm.

5.3.2 WESTERN BLOT:

Para detectar la expresión de proteínas se realizó western blot. Para la determinación de las proteínas que se presentan en la Tabla 4 se hicieron geles de poliacrilamida y se cargó con 50 µg de proteína en cada caso. Se aplicó un campo eléctrico de 45 voltios durante 45 minutos y 100 voltios 3 h aproximadamente en un amortiguador de Tris-Glicina (Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8.3)

Se transfirió por el método de Towbin y cols. (1979) en condiciones húmedas durante 70 min a 500 mA en una tina con hielo en agitación constante con un equipo marca Bio Rad (Mini Trans-Blot[®] Cell, EUA. y PowerPac[™] HC High-Current Power Supply, EUA.)

Tras la transferencia, las membranas se bloquearon con leche al 5% en TBS-T al 0.1% durante toda la noche en agitación a 4°C. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie para verificar que la transferencia hubiera sido exitosa.

Posterior al bloqueo, las membranas se lavaron con TBS-T al 0.1% durante 5 min en agitación a 4°C y se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche en agitación constante a 4°C, las diluciones de los anticuerpos primarios se hicieron con TBS-T al 0.1%. Las marcas de los anticuerpos utilizados, así como sus respectivas diluciones se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4. Resumen de los anticuerpos utilizados para cada proteína analizada.

Anticuerpo	Concentración	Marca
Sirt1	1: 1,000	Santa Cruz Biotechnology
Sirt2	1: 1,000	Abcam
Sirt3	1: 500	Abcam
FNDC5	1: 1,000	Abcam
UCP-1	1: 1,000	Abcam
PPAR- γ	1: 1,000	Abcam
α -Actina	1: 1,000	Santa Cruz Biotechnology

Sirt1: sirtuina 1, Sirt2: sirtuina 2, Sirt3: sirtuina 3, FNDC5: proteína 5 del dominio de fibronectina tipo III, UCP-1: proteína desacoplante-1, PPAR- γ : proliferador de peroxisoma activado del receptor gama.

Posterior a la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 3 veces 15 min con TBS-T al 0.1% en agitación a 4°C, se incubaron con anticuerpo secundario peroxidado a dilución 1:10,000 durante 2 h en agitación constante a 4°C; se realizaron 2 lavados de 10 min con TBS-T al 0.1% con NaCl 150 mM y 2 lavados más de 10 min con TBS-T al 0.1% en agitación constante a 4°C.

Para la determinación de α -actina; las membranas se sometieron a un rasurado (glicina 25 mM, SDS 1%, pH 2) durante 45 min en agitación a temperatura ambiente, y se bloquearon con leche al 5% en TBS-T al 0.1% durante 2 h en agitación a 4°C, tras el bloqueo se incubó con anticuerpo primario durante toda la noche y se siguió con el procedimiento antes descrito.

Para el revelado, las membranas se incubaron con reactivos de quimioluminiscencia (400 μ l de luminol y 400 μ l de peróxido de hidrógeno) marca Millipore e inmediatamente después se expusieron las placas en la oscuridad.

Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el densitómetro (Bio Rad, GS-800) con el uso del programa Quantity One-4.6. Los valores de las proteínas estudiadas se expresaron en función en los valores de expresión de α -actina.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La estadística descriptiva presenta la media como medida de tendencia central y el error estándar como medida de dispersión. Para el análisis de resultados se utilizaron las pruebas t de student y ANOVA de una vía con el programa estadístico Sigma Plot, se consideró como una diferencia estadísticamente significativa, el valor de $p < 0.05$.

6 RESULTADOS

La Tabla 5 presenta la validación del modelo de sacarosa al 30%. El grupo con SM presentó una diferencia de peso de 68 g mayor comparado con el grupo C, de la misma manera resultó elevada la PA, RI determinado por el índice HOMA, así como hiperinsulinemia, mayor adiposidad central, hiperleptinemia, hiperadiponectinemia y dislipidemia, caracterizada por: hipertrigliceridemia, disminución en la concentración sérica de c-HDL y un aumento del c-no-HDL que agrupa el c-VLDL, c-LDL, y c-IDL.

Tabla 5. Validación el modelo de sacarosa al 30%. Los datos se obtuvieron después de 5 meses de tratamiento con sacarosa en el caso del grupo SM o agua natural en el grupo C.

GRUPO	C	SM	P
Peso (g)	502±19.5	570.4±13.4	<0.001
PAS (mm Hg)	103.3±1.0	140.5±0.99	<0.001
Insulina (ng/mL)	0.256±0.02	0.474±0.04	0.002
Glucosa (mg/mL)	119.9±12.2	131.35± 30.3	0.233
Índice- HOMA	1.29±0.18	2.14±0.33	<0.05
Adiposidad central (g)	6±0.73	12±0.57	<0.001
Leptina (ng/dL)	2.33±0.26	4.19±0.3	<0.001
Adiponectina (µg/mL)	3.78 ±0.24	6.67 ±0.29	<0.001
TG (mg/dL)	77.8±7.9	133.7±6.3	<0.01
CT (mg/dL)	57.6±5.6	52.3±3.5	0.459
c-HDL (mg/dL)	28.2±2.5	17.6±1.8	<0.01
c no-HDL (mg/dL)	22.8±2.1	35.2±3.02	<0.01

Los valores son medias \pm error estándar; n=12; C: control, SM: síndrome metabólico, HOMA-IR: Homeostatic model assesment of insulin resistance, PAS: presión arterial sistémica, TG: triglicéridos, CT: colesterol total, c-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c no-HDL: colesterol no HDL.

Se registró el peso corporal de las ratas cada semana durante el mes de tratamiento con RSV y QRC como se presenta en la Figura 8. En el panel A se presenta el peso del grupo C que

permaneció sin cambio durante las 4 semanas del tratamiento. En el panel B se presenta el peso del grupo SM, el cual fue mayor comparado con el grupo C, sin embargo, cuando a las ratas se les administró el tratamiento con RSV y QRC se vio atenuado el aumento de peso corporal siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$) a partir de la segunda semana de tratamiento.

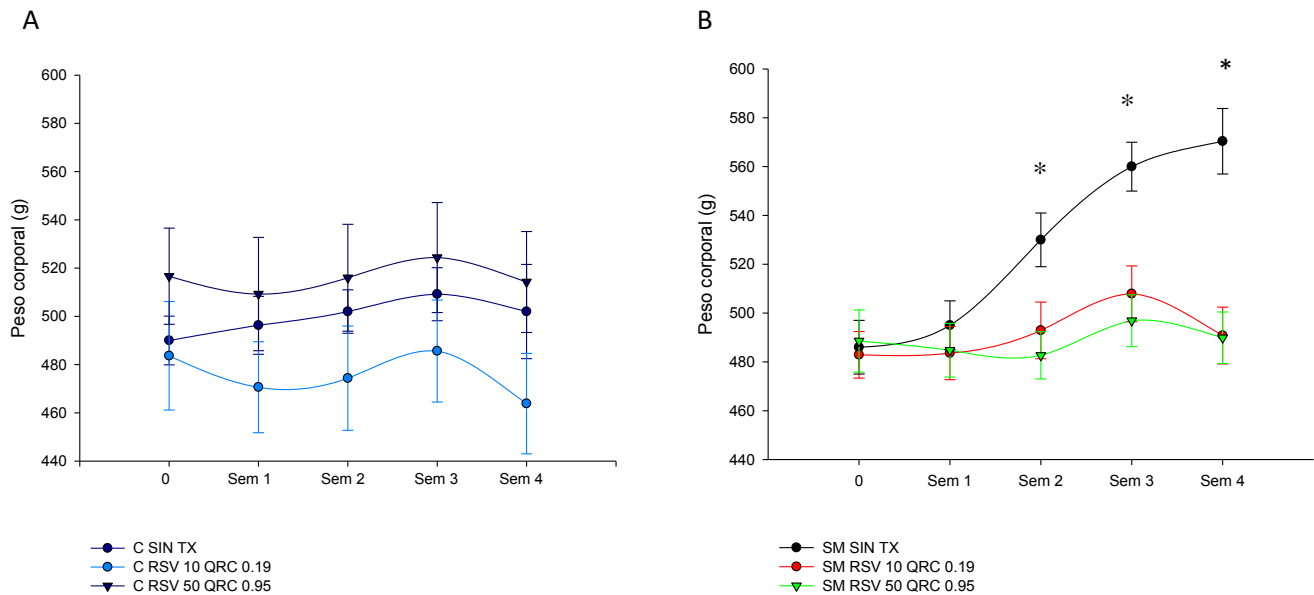


Figura 8. Efecto del tratamiento con RSV y QRC en el peso corporal durante un mes de tratamiento. En el panel A se presenta el grupo C y en el panel B el grupo SM. * $p < 0.05$ SM vs mismo grupo diferente dosis. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C SIN TX: control sin tratamiento, C RSV 10 QRC 0.19: control con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, C RSV 50 QRC 0.95: control con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SM SIN TX: síndrome metabólico sin tratamiento, SM RSV 10 QRC 0.19: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, SM RSV 50 QRC 0.95: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día.

Se evaluó la presencia de HTA en el modelo de SM y como se observa en la Figura 9 la PA en este grupo se encontraba elevada con respecto al grupo C con una $p < 0.001$, la HTA se vio atenuada de manera dosis dependiente, ya que la presión disminuyó 14% con la dosis RSV 10 mg/kg/día y QRC 0.19 mg/kg/día, y 22% con la dosis RSV 50 mg/kg/día y QRC 0.95 mg/kg/día esta última logró mayor efecto antihipertensivo ($p < 0.001$).

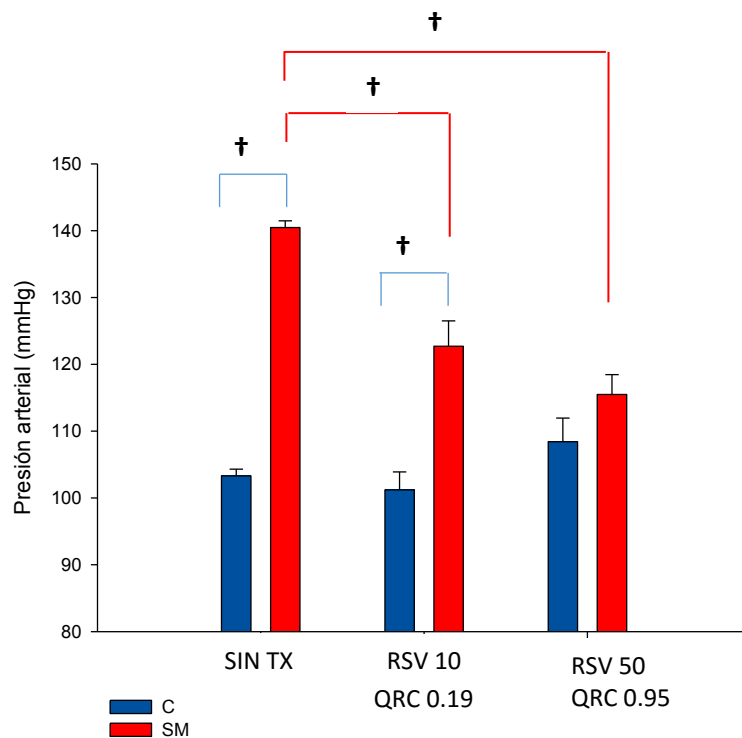


Figura 9. Efecto de la administración con RSV y QRC durante un mes en la PA. † $p < 0.001$. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día.

Se evaluó el efecto del tratamiento en otras alteraciones bioquímicas que caracterizan al SM (Tabla 6). Los niveles séricos de insulina del grupo SM se encuentran elevados comparados con el grupo C ($p=0.002$), sin embargo, en el grupo SM se observó la disminución de los niveles de insulina durante la administración del tratamiento en las diferentes dosis 36.9% con RSV 10 mg/kg/día y QRC 0.19 mg/kg/día y 51% con RSV 50 mg/kg/día y QRC 0.95 mg/kg/día; mientras que en el grupo C no se observaron cambios.

Se determinaron los niveles de glucosa en suero, no habiendo diferencias entre los grupos SM y C, ni durante la administración de RSV y QRC en sus diferentes dosis en el grupo SM. De manera adicional, se calculó el índice HOMA para determinar la presencia de RI; el grupo SM presentó insulino resistencia ($p < 0.05$) que disminuye con la administración del tratamiento sin haber diferencias entre las dosis ($p < 0.001$).

Tabla 6. Efecto de RSV y QRC administrado durante un mes en los parámetros bioquímicos séricos.

	C	C RSV 10 QRC 0.19	C RSV 50 QRC 0.95	SM	SM RSV 10 QRC 0.19	SM RSV 50 QRC 0.95
INSULINA (ng/mL)	0.256±0.02	0.248±0.05	0.187±0.04	0.474±0.04 *	0.299±0.05 Δ	0.232±0.02 #
GLUCOSA (mg/dL)	119.9±12.2	118.8±13.7	87.9±5.9	131.85±30.3	85.31±9.5	90.7±7.7
HOMA-IR	1.29±0.18	0.31±0.034 #	0.89±0.12	2.14±0.33 *	0.95±0.09 † #	0.81±0.083 #

Los valores son medias ± error estándar; n=36; # p<0.001 vs mismo grupo sin tratamiento, Δ p<0.01 vs mismo grupo sin tratamiento, * p<0.05 vs grupo C misma dosis, † p<0.001 vs grupo C misma dosis. ‡ p<0.001 vs mismo grupo diferente dosis. C: control sin tratamiento, C RSV 10 QRC 0.19: control con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, C RSV 50 QRC 0.95: control con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SM: síndrome metabólico sin tratamiento, SM RSV 10 QRC 0.19: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, SM RSV 50 QRC 0.95: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día. HOMA-IR: Homeostatic model assesment of insulin resistance.

Los resultados anteriores se comprobaron al construir las curvas de tolerancia a la insulina, como se observa en la Tabla 7 el grupo C es sensible a la insulina y el tratamiento no tiene efecto significativo. Mientras que el grupo con SM presenta RI, es decir, retrasa la disminución en los niveles plasmáticos de glucosa posterior a la inyección de insulina, efecto que se corrige con la administración de los polifenoles, siendo el grupo con la dosis RSV 50 y QRC 0.95 la de mayor efectividad (p<0.001).

Tabla 7. Efecto del tratamiento de un mes con RSV y QRC en la tolerancia a la insulina.

Tiempo (min)	C	C RSV 10 QRC 0.19	C RSV 50 QRC 0.95	SM	SM RSV 10 QRC 0.19	SM RSV 50 QRC 0.95
0	100	100	100	100	100	100
15	52.6±1.7	50.3±2.7	54.6±3.4	67.2±3.6 # Δ	43.6±2.5	48.4±4.5
30	47.5±2.3	41.6±1.6	41.7±1.8	47.2±1.7	44±1.8	41.9±4.6
60	47.2±2.04	46.8±3.4	37.3±1.8*	52.3±3.06	46.02±2.9	46.7±9.7
90	72.8±4.3	72.6±6.2	57.7±5.2	72.7±5.9	57.95±4.7	43.8±6.9*
120	96.3±6.07	100.6±7.9	77.6±7.5	112±9.9	80.06±3.9	64.6±7.3*

Los valores son medias del porcentaje de cambio de glucosa ± error estándar; n=36; # p<0.001 vs mismo grupo dosis RSV 10 QRC 0.19, Δ p< 0.001 vs grupo control, * p<0.05 vs mismo grupo sin tratamiento. C: control sin tratamiento, C RSV 10 QRC 0.19: control con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, C RSV 50 QRC 0.95: control con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SM: síndrome metabólico sin tratamiento, SM RSV 10 QRC 0.19: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, SM RSV 50 QRC 0.95: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de los polifenoles en el desarrollo de la dislipidemia en el modelo de SM determinando los niveles de TG, CT, c-HDL y c no-HDL en suero como se presenta en la Tabla 8. El grupo SM presentó una mayor concentración de TG comparado con el grupo C (p<0.01), sin embargo, la administración de RSV y QRC a diferentes dosis en el grupo SM corrige el aumento de la concentración sérica de TG de manera dosis dependiente (p<0.01), mientras que en el grupo C el tratamiento no tiene efecto.

Se determinó la concentración sérica de CT en el grupo SM y C, pero no se encontraron diferencias entre ellos, ni con los grupos tratados. El grupo SM presentó menores concentraciones de c-HDL en suero comparado con el grupo C (p<0.01) y cuando al grupo SM se le administra RSV y QRC aumenta la concentración de c-HDL de manera significativa (p<0.01) con la dosis RSV 10 mg/kg/día y QRC 0.19 mg/kg/día.

Tabla 8. Efecto de RSV y QRC en el perfil lipídico sérico.

	C	C RSV 10 QRC 0.19	C RSV 50 QRC 0.95	SM	SM RSV 10 QRC 0.19	SM RSV 50 QRC 0.95
TG (mg/dL)	77.8±7.9	71.4±7.4	57.8±9.2	133.7±6.3 ∪	103.2±9.7 ∪	90.5±5.4 ∪ #
CT (mg/dL)	57.6±5.6	55.5±3.4	45.7±1.7	52.3±3.5	56.6±5.7	38.2±4.7
c-HDL (mg/dL)	28.2±2.5	27.1±1.8	28.6±1.6	17.6±1.8 ∪	29.1±4.2 £	20.3±2.4
c no-HDL (mg/dL)	22.8±2.1	29.4±2.7	17.1±0.4 £	35.2±3.02 ∪	27.5±2.2	17.9±2.8 £

Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; # $p<0.001$ vs mismo grupo sin tratamiento, ∪ $p<0.01$ vs grupo C misma dosis, £ $p<0.05$ vs mismo grupo diferente dosis. C: control sin tratamiento, C RSV 10 QRC 0.19: control con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, C RSV 50 QRC 0.95: control con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SM: síndrome metabólico sin tratamiento, SM RSV 10 QRC 0.19: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, SM RSV 50 QRC 0.95: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, TG: triglicéridos, CT: colesterol total, c-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad, c no-HDL: colesterol no HDL.

La concentración de c no-HDL en suero aumentó en el grupo con SM comparada con el grupo C ($p<0.01$), el tratamiento con RSV y QRC disminuyó los niveles de c no-HDL en el grupo SM y C siendo evidente en la dosis RSV 50 y QRC 0.95 mg/kg/día ($p<0.05$).

Para identificar la presencia de adiposidad central característica del SM, se pesó el tejido adiposo visceral. Como se observa en la Figura 10 el grupo con SM presentó mayor adiposidad central comparado con el grupo C ($p<0.001$), sin embargo, con la administración del tratamiento RSV 50 mg/kg/día y QRC 0.95 mg/kg/día disminuyó la cantidad de grasa visceral en 25% ($p<0.05$).

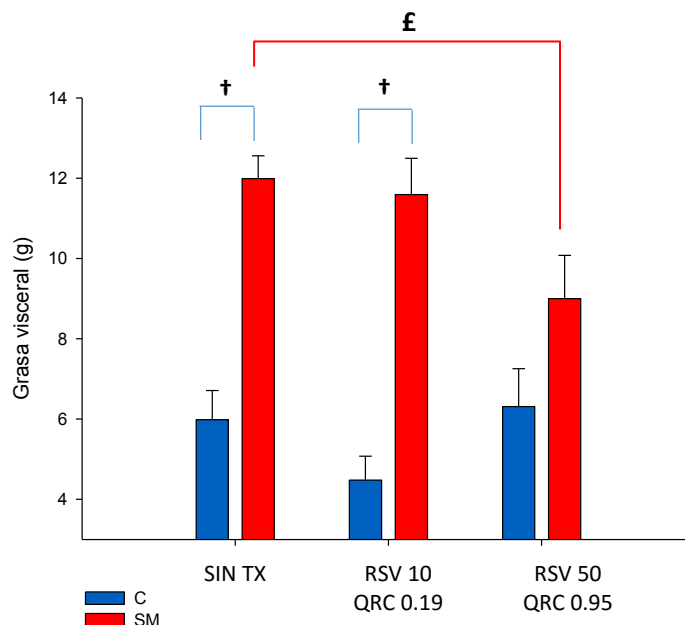


Figura 10. Efecto de RSV y la QRC en la cantidad de grasa visceral. £ $p < 0.05$, † $p < 0.001$. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día.

La concentración sérica de leptina es superior en el SM comparado con el grupo C ($p < 0.05$), y que la administración del tratamiento RSV 10 mg/kg/día y QRC 0.19 mg/kg/día promueve el aumento de esta hormona en el SM ($p < 0.05$), sin embargo la dosis RSV 50 mg/kg/día y QRC 0.95 mg/kg/día la disminuye (Tabla 9). Este efecto que se observó también en el grupo C.

La concentración sérica de adiponectina aumentó en el grupo SM comparada con el grupo C, sin embargo la administración del tratamiento tiende a disminuir la secreción de esta adipocina ($p < 0.05$).

Tabla 9. Efecto de RSV y QRC en la concentración sérica de adipocinas.

	C	C RSV 10 QRC 0.19	C RSV 50 QRC 0.95	SM	SM RSV 10 QRC 0.19	SM RSV 50 QRC 0.95
LEPTINA (ng/dL)	2.33 ±0.26	3.27 ± 0.28	£ 2.56 ±0.14	4.19 ±0.3 †	5.2 ± 0.3 £ †	3.85 ±0.27 †
ADIPONECTINA (µg/mL)	3.78 ±0.24	4.19 ±0.35	3.68 ±0.31	6.67 ±0.29 †	6.11 ±0.5 *	5.77 ± 0.24 †

Los valores son medias ± error estándar; n=36; * p<0.05 vs grupo C misma dosis, † p<0.001 vs grupo C misma dosis. £ p<0.05 vs mismo grupo diferente dosis. C: control sin tratamiento, C RSV 10 QRC 0.19: control con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, C RSV 50 QRC 0.95: control con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SM: síndrome metabólico sin tratamiento, SM RSV 10 QRC 0.19: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, SM RSV 50 QRC 0.95: síndrome metabólico con resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día.

Con el fin de determinar si la disminución de grasa visceral estaba relacionada con la modificación en la expresión de moléculas sujetas a control epigenético, se determinó la expresión de las SIRTs. Como se observa en la Figura 11 panel A y B, el SM presenta menores niveles de expresión de SIRT1 comparado con las ratas C (p<0.05), sin embargo, cuando se administra el tratamiento con RSV y QRC hay una tendencia al aumento en la expresión de esta SIRT.

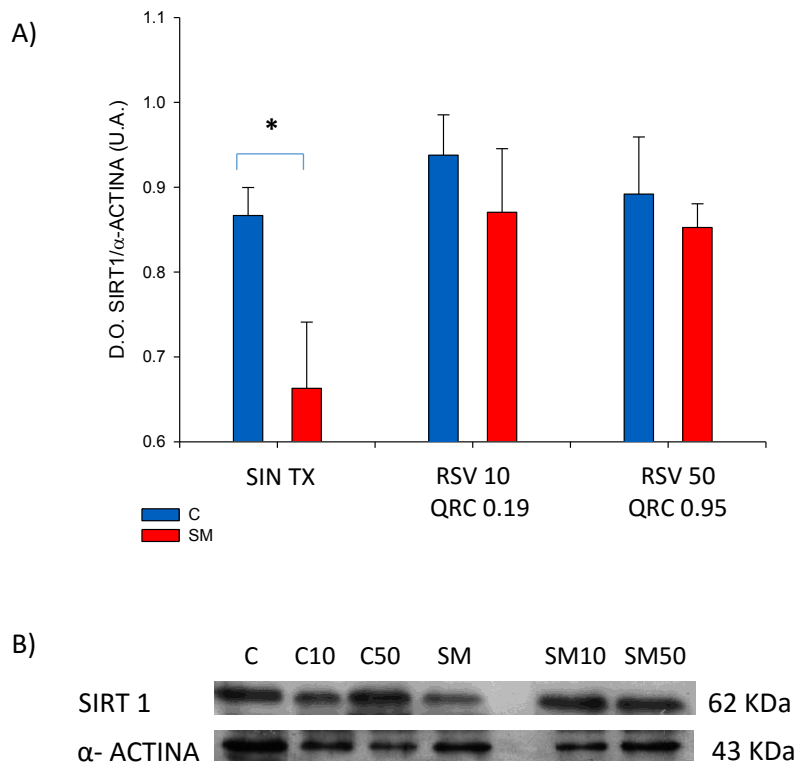


Figura 11. Efecto del RSV y QRC en la expresión de la proteína SIRT1 en tejido adiposo de forma cuantitativa (panel A) y western blot representativo (panel B). * $p < 0.05$. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SIRT1: sirtuina 1.

En la Figura 12 panel A se observa de manera cuantitativa que el grupo SM tenía menor expresión de SIRT2 comparado con el grupo C, sin embargo, la administración del tratamiento promovió el aumento en la expresión de esta SIRT 1.1 veces sin haber diferencia significativa entre las dosis (ver panel A y B). Mientras que en el grupo C no se observan cambios en la expresión de SIRT2 con la administración del tratamiento.

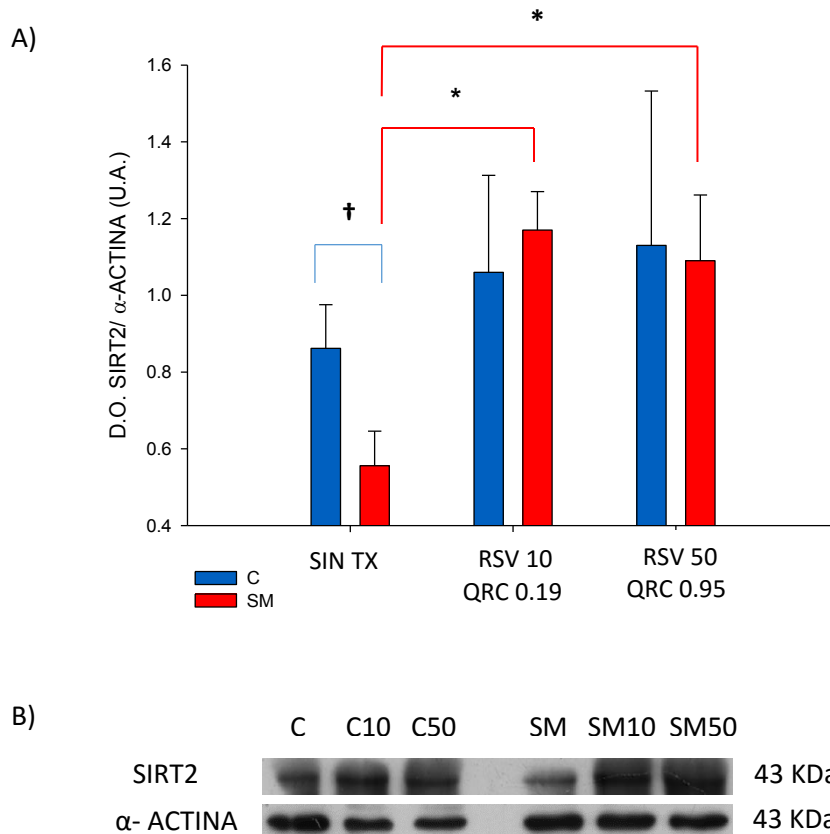


Figura 12. Efecto del RSV y QRC en la expresión de la proteína SIRT2 en tejido adiposo visceral de forma cuantitativa (panel A) y western blot representativo (panel B). † $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SIRT2: sirtuina 2.

Como se observa en la Figura 13 la expresión de SIRT3 en C y SM es muy similar (ver panel A y B), sin embargo, en los C parece haber una tendencia al aumento de la expresión de esta SIRT con el tratamiento con RSV y QRC, al contrario del grupo SM que tiende a disminuir de manera dosis dependiente, siendo evidente esta diferencia en el grupo RSV 50 y QRC 0.95 entre SM y C (ver panel A).

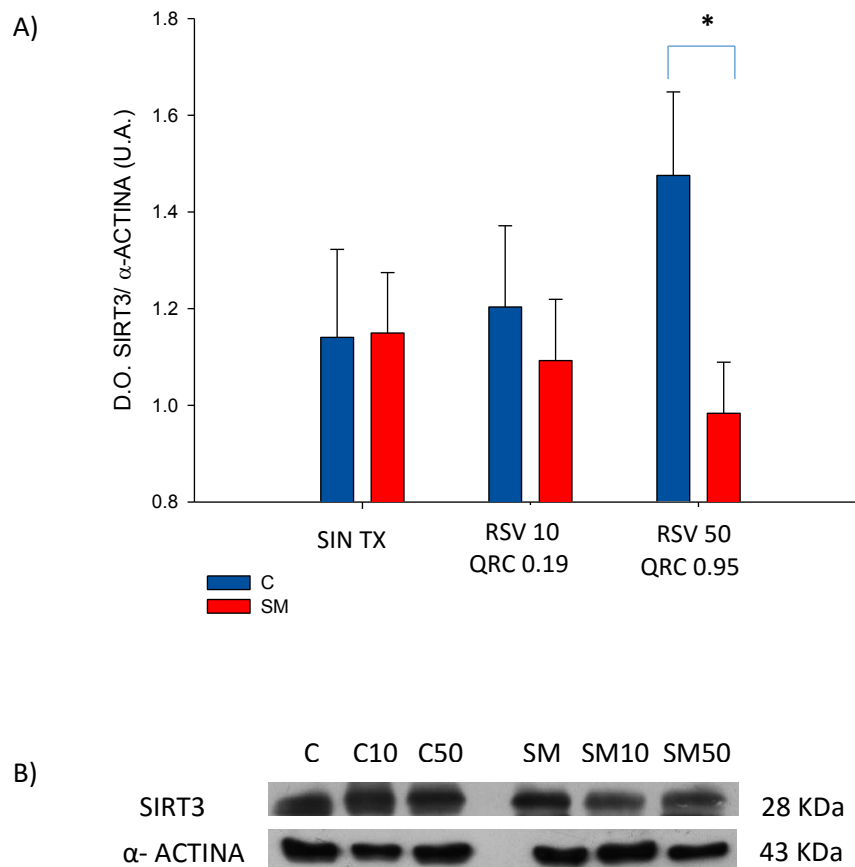


Figura 13. Efecto del RSV y QRC en la expresión de SIRT3 en tejido adiposo visceral de forma cuantitativa (panel A) y western blot representativo (panel B). * $p < 0.05$. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, SIRT3: sirtuina 3.

Para evaluar la presencia del fenómeno de “browning” del tejido adiposo, se evaluó la expresión de FNDC5, precursor de la irisina. Como se observa en la Figura 14, no hubo diferencias en la expresión de FNDC5 entre el grupo SM y el C. Sin embargo, se observa una tendencia a la disminución con la administración del tratamiento en el grupo SM.

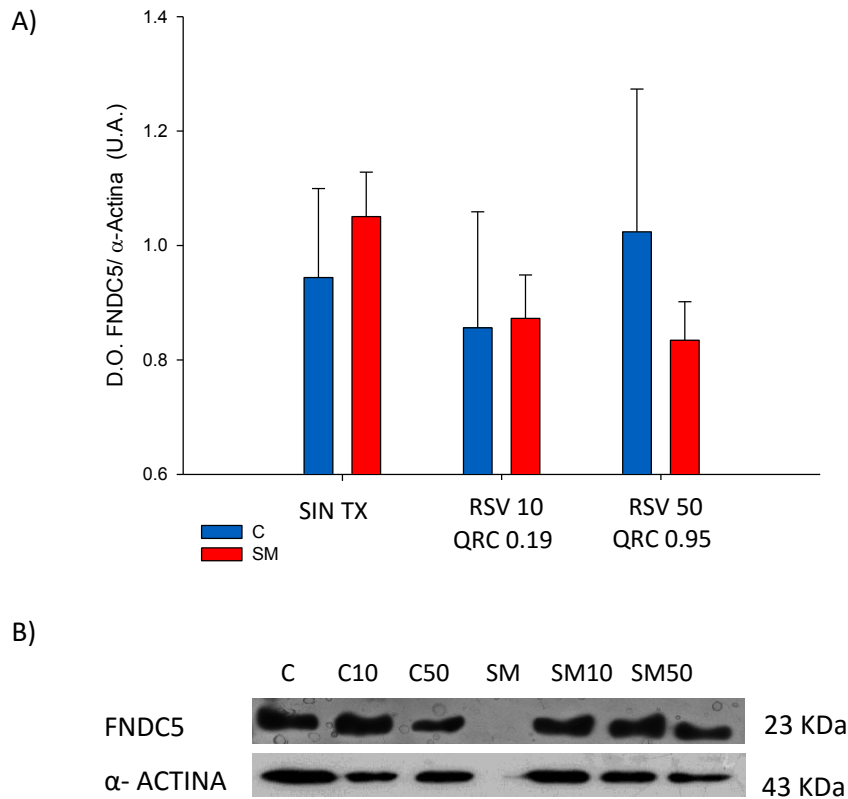


Figura 14. Efecto del RSV y QRC en la expresión de FNDC5 en tejido adiposo visceral de forma cuantitativa (panel A) y western blot representativo (panel B). Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día, FNDC5: proteína 5 del dominio de fibronectina tipo III.

Se evaluó la expresión de uno de los blancos de SIRT1, mediante la determinación de la expresión del factor adipogénico PPAR- γ . Como se observa en la Figura 15 (ver panel A y B), el SM presenta mayores niveles de expresión de PPAR- γ con respecto al grupo C, la administración del tratamiento no tuvo efecto en la expresión de esta proteína en el grupo SM. Sin embargo, cuando se administra el RSV y QRC en el grupo C la cantidad de PPAR- γ incrementa de manera dosis dependiente siendo la dosis de RSV 50 y QRC 0.95 la de mayor efecto (ver panel A y B de la figura 15).

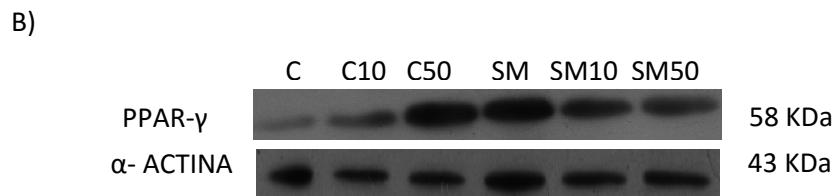
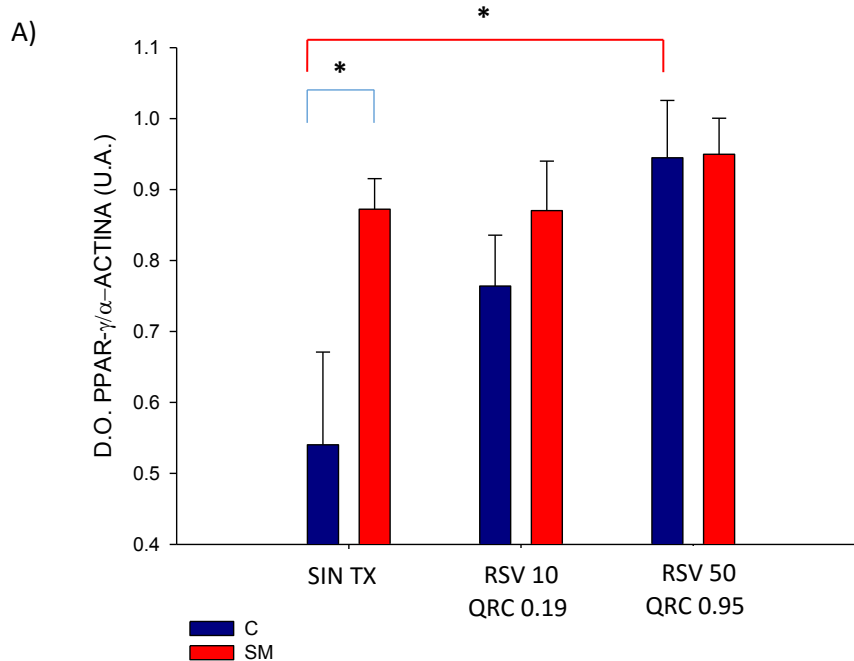


Figura 15. Efecto del RSV y QRC en la expresión de PPAR- γ en tejido adiposo visceral de forma cuantitativa (panel A) y western blot representativo (panel B). * $p < 0.05$. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día.

Dado que una de las proteínas clave en el proceso de “browning” y que además es transcrita por PPAR- γ es UCP-1, decidimos evaluar su expresión. En la Figura 16 se observa que la expresión de UCP-1 de manera cuantitativa (panel A) y cualitativa (panel B) es mayor en el grupo SM respecto al C sin embargo, el tratamiento con RSV y QRC disminuye de manera dosis dependiente la expresión de UCP-1 en el grupo SM, teniendo el efecto contrario en el grupo C siendo la dosis de RSV 50 y QRC 0.95 la de mayor efecto.

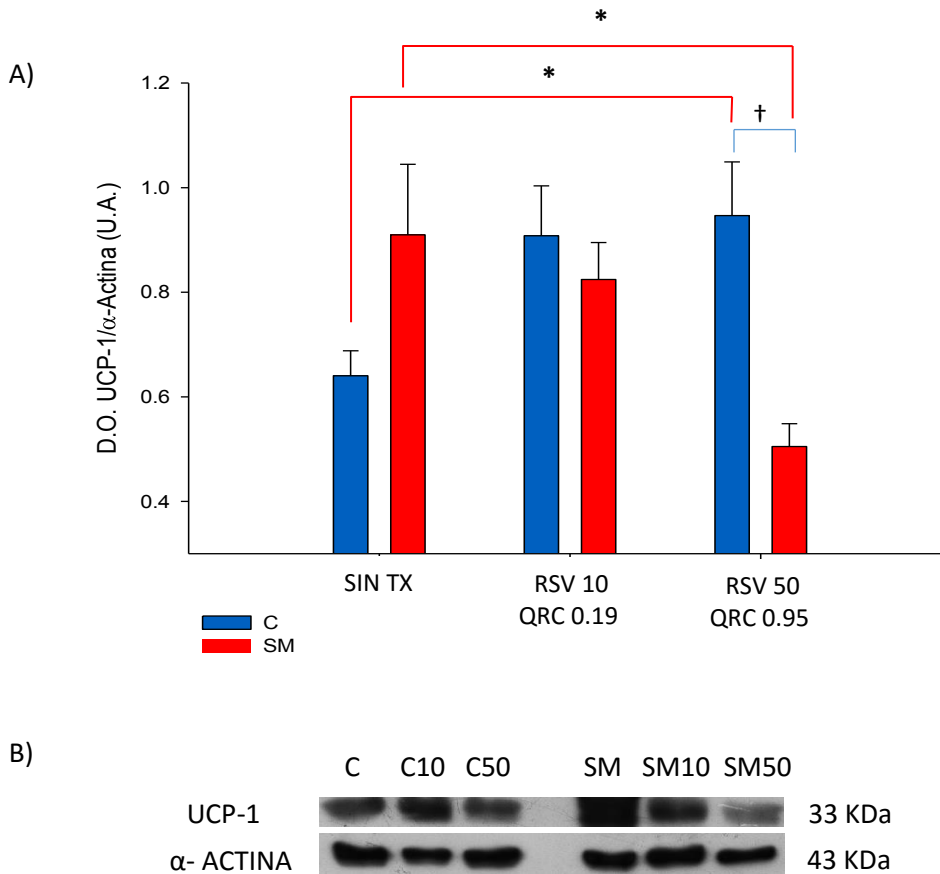


Figura 16. Efecto del RSV y QRC en la expresión de UCP-1 en tejido adiposo visceral de forma cuantitativa (panel A) y western blot representativo (panel B). † $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Los valores son medias \pm error estándar; $n=36$; C: control, SM: síndrome metabólico, SIN TX: sin tratamiento, RSV 10 QRC 0.19: resveratrol a dosis 10 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.19 mg/kg de peso/día, RSV 50 QRC 0.95: resveratrol a dosis 50 mg/kg de peso/día y quercetina a dosis 0.95 mg/kg de peso/día.

En la Figura 17 se observa un esquema integrativo de los efectos de RSV y QRC en el tratamiento del SM. De acuerdo a nuestros resultados la administración de estos polifenoles promueve la disminución de los signos de esta patología como: peso corporal, grasa visceral, presión arterial, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, aumento de los niveles de c-HDL y disminución de los niveles de c no-HDL. En particular se investigó el papel de estos polifenoles en la disminución de grasa visceral evaluando su efecto sobre moléculas sujetas a control epigenético involucradas en el “browning”. Se observó un aumento en las SIRT1 y 2 que inferimos tiene efecto en la inhibición de lipogénesis mediante inhibición de PPAR- γ , además se mostró un incremento

en la expresión de SIRT1 que puede activar a PPAR- α y PGC-1 α promoviendo lipólisis, no así el “browning” ya que se observó una clara disminución de UCP-1 y FNDC5 proteínas clave para el desarrollo de este proceso.

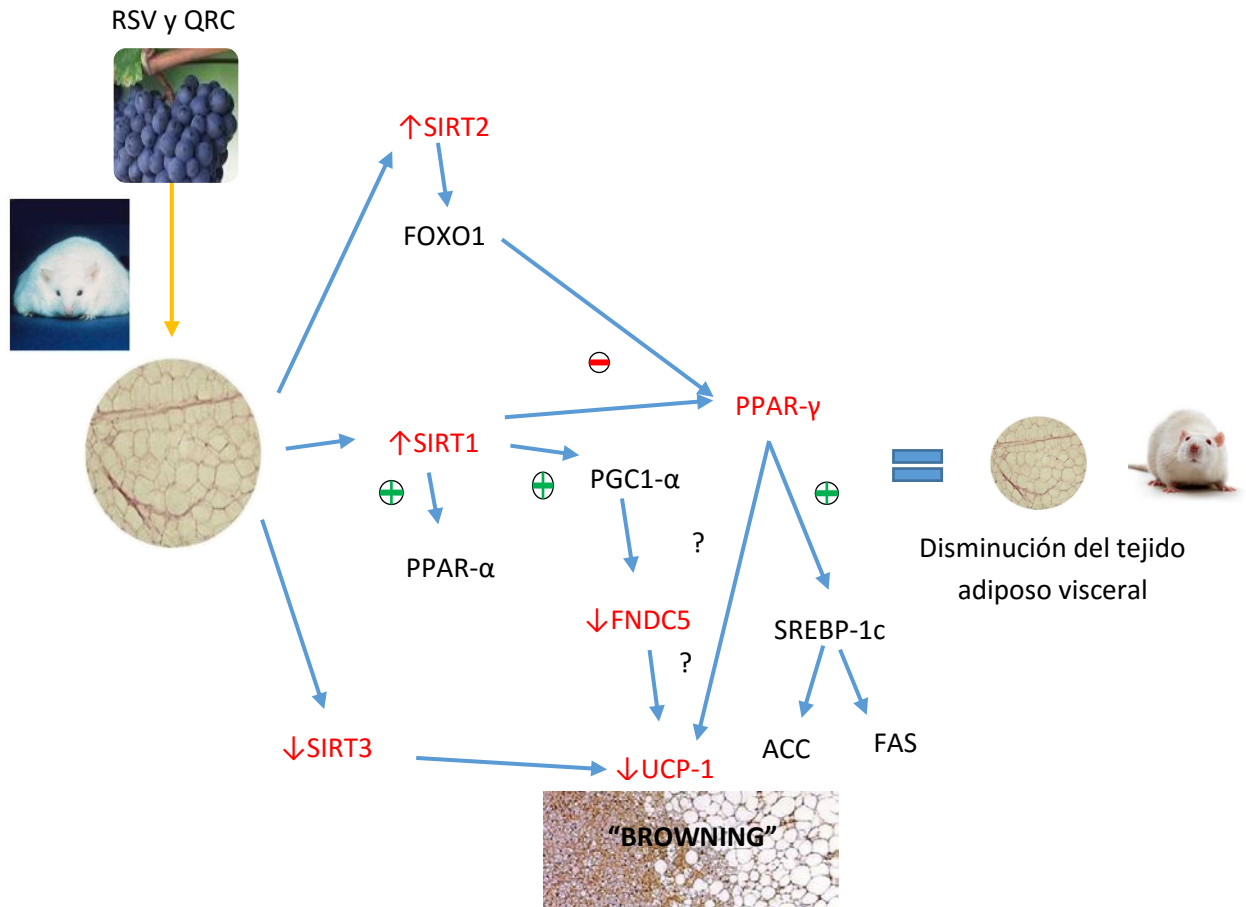


Figura 17. Esquema integrativo de los efectos de la administración de RSV y QRC en el tejido adiposo visceral de un modelo de SM. RSV: resveratrol, QRC: quercetina, SIRT2: sirtuina 2, FOXO1: forkhead box 1, PPAR- γ : proliferador de peroxisoma activado del receptor gama, SIRT1: sirtuina 1, PPAR- α : proliferador de peroxisoma activado del receptor alfa, PGC1- α : Coactivador de proliferador de peroxisoma activado del receptor gama, FNDC5: Proteína 5 del dominio de fibronectina tipo III, UCP-1: proteína desacoplante 1, ACC: acetil coenzima A carboxilasa, FAS: ácido graso sintasa, SREBP-1c: proteínas de unión a elementos de regulación de esteroides, SIRT3: sirtuina 3.

7 DISCUSIÓN

El SM es un problema de salud pública del siglo XXI. Para el tratamiento de esta patología se han utilizado diferentes herramientas entre ellas, el uso de plantas medicinales. Recientemente se ha centrado la atención en los efectos benéficos que tienen algunos compuestos naturales presentes en las frutas y vegetales en la prevención y/o tratamiento de algunas enfermedades como el cáncer, trastornos neurológicos, diabetes, obesidad e HTA. Esta actividad biológica se ha atribuido en parte a la activación de algunas clases de proteínas SIRT por los polifenoles de estos compuestos.

En el presente trabajo se valoró la presencia del SM en los animales con 6 meses de edad alimentados con sacarosa al 30%. Estos animales desarrollaron adiposidad central, HTA moderada, hiperinsulinemia, y RI (Tabla 5). Estos resultados coinciden con reportes previos de este modelo desarrollados en el Instituto (Baños y cols., 1997; Rubio y cols., 2005).

Al evaluar el efecto del tratamiento con RSV y QRC, principalmente la dosis de 50 mg/kg/día y de 0.95 mg/kg/día, respectivamente, se encontró que son efectivos para promover la disminución del peso corporal y adiposidad central (25%) lo que concuerda con lo descrito por diversos grupos de investigación donde evalúan los efectos del RSV o la QRC en modelos experimentales de obesidad y diabetes en la pérdida de peso corporal y grasa visceral mediante la activación de la enzima sensora de nutrientes intracelulares AMPK en hígado y músculo (Panchal y cols., 2012; Rivera y cols., 2009; Do y cols., 2012). Rivera y cols. (2008) describieron en el modelo de ratas Zucker que la administración de QRC 10 mg/kg/día durante 10 semanas disminuye el 20% peso corporal. Esta evidencia apoya los resultados encontrados, porque en ambos grupos de tratamiento el peso corporal disminuyó 14%, sin embargo, en el presente estudio las dosis utilizadas son menores (0.19 y 0.95 mg/kg/día) así como el tiempo de administración (4 semanas). Sin embargo, podríamos estar observando un efecto sinérgico con el RSV y la QRC, como el descrito por Yang y cols. (2008) en el modelo *in vitro* de preadipocitos 3T3-L1 donde estos polifenoles tienen un efecto sinérgico para disminuir la concentración intracelular de TG 68% en conjunto vs 9.4% solo con RSV y 15.9% solo con QRC. Se demostró que inhibía la diferenciación e induce la apoptosis de adipocitos, efecto que puede explicar el que en este modelo los animales tratados disminuyeran la grasa visceral. Es importante resaltar que las diferencias en el peso y grasa visceral de los animales tratados y no tratados con RSV y QRC no estuvieron influenciados por la cantidad de consumo del agua con sacarosa ya que este fue igual en ambos casos.

Al evaluar el efecto del tratamiento en la PA, se observó que la presión disminuyó de manera dosis-dependiente 14% y 22% respectivamente, lo que concuerda con lo informado por Rivera y cols. (2008) y Yamamoto y Oue (2006). Una de las hipótesis para explicar las propiedades antihipertensivas de estos polifenoles son resultado del aumento en la expresión y actividad de la sintasa de ON endotelial (eNOS) (Yamamoto y cols., 2006; Miatello y cols., 2005; Rivera y cols., 2009; Rivera y cols., 2008), disminución del estrés oxidativo mediante el aumento en la enzima SOD (Machha y cols., 2007), la disminución de la nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidasa (GAPDH), la enzima se encarga de oxidar al nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) en oxidado (NADP⁺) y formar anión superóxido (O₂⁻). El O₂⁻ es un radical libre que reacciona rápidamente con el ON generando el radical peroxinitrito (ONOO⁻), disminuyendo la biodisponibilidad de este potente vasodilatador y aumentando el estrés oxidativo (Sánchez y cols., 2006). Además el RSV aumenta la expresión de la guanilatociclasa soluble y de los canales de potasio (Nagaoka y cols., 2007).

En el presente estudio se demostró que la mezcla de polifenoles mejora la sensibilidad a la insulina, ya que la hiperinsulinemia disminuyó 32% en el grupo con RSV 10/ QRC 0.19 y 45% en el grupo RSV 50/ QRC 0.95 que se reflejó en la disminución de la RI, que se corroboró con el índice HOMA que mejoró 56% en el grupo RSV 10/ QRC 0.19 y 62% en el grupo RSV 50/ QRC 0.95, esto concuerda con los hallazgos de Rivera y cols. (2008, 2009) y Sun y cols. (2007).

La Tabla 7 muestra que el tratamiento con RSV y QRC es efectivo para corregir la dislipidemia, pues disminuye los niveles séricos de TG (28.6%) y c no-HDL (49%) teniendo el mayor efecto con la dosis RSV 50 y QRC 0.95, así como el aumento del c-HDL con la dosis RSV 10 y QRC 0.19 (65%). La importancia del análisis del c no-HDL como predictor y blanco para el tratamiento de enfermedad cardiovascular, radica en que incluye lipoproteínas de muy baja densidad como los remanentes de VLDL, las cuales por ser moléculas pequeñas y densas son altamente aterogénicas. El uso potencial del c no-HDL, es para predecir el riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular, que resulta ser tan bueno como el c-LDL. Recientemente se ha descrito que los niveles de c no-HDL (CT menos HDL) entre los usuarios de estatinas están relacionados con el riesgo de sufrir un evento cardiovascular mayor con más fuerza que los niveles de c-LDL y de ApoB, según los resultados de un estudio de meta-análisis dirigido por Boekholdt y Kastelein (2012) en el centro médico académico de Amsterdam, Holanda que incluyó un total de ocho ensayos clínicos y 62.154 pacientes. De acuerdo a la evidencia generada en este estudio el tratamiento con polifenoles

disminuye la concentración sérica de c no-HDL en el grupo SM lo que sugiere reducen el riesgo de padecer ECV.

Otro mecanismo mediante el cual actúan los polifenoles es mediando la secreción de adipocinas, pues en modelos *in vivo* e *in vitro* el RSV puede disminuir la expresión del mensajero y proteína de la leptina (Rivera y cols., 2009; Eseberri y cols., 2013) y aumentar su sensibilidad ya que disminuye la expresión de proteínas implicadas en la resistencia a la leptina como: SOCS-3 y fosfotirosina fosfatasa-1B (PTP-B1) (Ghanim y cols., 2010). Este modelo de SM presenta hiperleptinemia derivada de la resistencia a la leptina, la cual no se modificó por la presencia del RSV y QRC en sus diferentes dosis aun y a pesar de que la cantidad de tejido adiposo visceral disminuyó significativamente. Esto puede deberse a que la leptina es un sensor de cambios a corto plazo de en el balance de energía (Margetic y cols., 2002) ya que la sobrealimentación aumenta los niveles de leptina y dado que ningún grupo fue sometido a restricción calórica es de esperar que los niveles de leptina no hayan cambiado entre grupos.

A pesar de que en modelos animales de obesidad y SM la concentración de adiponectina está disminuida, en este estudio, el grupo SM presentó niveles elevados de adiponectina en suero. Esto puede ser resultado de resistencia a esta adipocina, que mejora con la administración del tratamiento a dosis RSV 50 y QRC 0.95 (13%), sin embargo, no se encontró significancia estadística entre estos grupos. Los resultados encontrados concuerdan con el estudio de Olholm y cols. (2010), quienes demostraron que existe disminución en la expresión de adiponectina causada por IL-1 β , que se corrige con la incubación de RSV en adipocitos humanos. Además, Qiao y Shao (2006) sugirieron que la SIRT1 incrementa la transcripción de adiponectina mediante la activación de FOXO1 en adipocitos 3T3-L1.

Este modelo de SM se caracteriza por la disminución de SIRT1 que se corrige con el RSV y QRC. Este mecanismo concuerda con lo reportado por Kreutzenberg y cols. (2010) quienes hallaron que el palmitato o glucosa disminuyen la expresión de SIRT1 y de NAMPT, la enzima encargada del reciclaje de NADH en NAD⁺. Sin embargo, el tratamiento con RSV revierte este efecto y abate la producción de especies reactivas de oxígeno características del SM, por lo que sería conveniente analizar en otro estudio cada uno de estos factores en el modelo.

La SIRT1 desacetila la histona 3 inhibiendo la transcripción de PTP-B1 (el cual actúa revirtiendo la acción de la tirosinacinas) (Sun y cols., 2007). Por ello, el decremento de SIRT1 en músculo,

hígado y células mononucleares se relacionan con la RI, y por tanto su aumento se relaciona con un aumento en la sensibilidad a la insulina (Sun y cols., 2007; Kreutzenberg y cols., 2010). Esto concuerda con los resultados del presente estudio.

El RSV y la QRC aumentan la expresión y actividad de SIRT1 mediante la activación alostérica, disminuyendo la Km por sustratos acetilados, así como por NAD⁺ (Howitz y cols., 2003). Esta evidencia apoya los resultados derivados de este estudio. Además se observó que la QRC aumenta la expresión de SIRT1 y de AMPK-p en tejido adiposo subcutáneo y disminuye el tejido adiposo en un modelo de ratones con dieta alta en grasa (Dong y cols., 2014).

La posible explicación sugerida para la disminución de peso en el grupo SM tratado con RSV y QRC es que la SIRT1 regula positivamente o activa por desacetilación: PGC-1 α y PPAR- α con lo que promueven la activación de genes encargados de la oxidación de grasas.

Los resultados indican que el desarrollo del SM se acompaña de una disminución de SIRT2. Esta molécula se regula a la alta con el tratamiento de RSV y QRC. Gregory (2010) describió que el ayuno (del que el RSV es mimético) induce la expresión de SIRT2 en tejido adiposo blanco, efecto que se refleja en el presente estudio. Además la sobreexpresión de SIRT2 en el modelo *in vitro* de preadipocitos 3T3-L1 promueve la lipólisis y la inhibición de adipogénesis, lo que concordaría con la pérdida de peso de los animales. Se ha demostrado que SIRT2 desacetila a FOXO1 favoreciendo la asociación de este último con PPAR- γ , lo que reprime su actividad transcripcional, inhibiendo la diferenciación de preadipocitos en adipocitos (Wang y Tong, 2009) y evitando la ganancia de peso de los animales.

El tratamiento con RSV y QRC disminuyó la expresión de SIRT3 en el grupo SM y tuvo el efecto contrario en el grupo C. Este efecto podría deberse a que durante el estrés oxidativo tanto la forma activa de la SIRT3 como la inactiva son reclutadas en la mitocondria (Scher y cols., 2007). En este estudio no se refleja la relación en la expresión entre la enzima activa o corta e inactiva y larga. No se puede descartar que la SIRT 3 activa estuviera disminuida porque se utilizaba más, y por tanto se consumió con mayor rapidez.

Además, existe una asociación positiva entre la regulación a la alta de SIRT3 durante el ayuno y el metabolismo oxidativo mitocondrial en tejido adiposo pardo. Esto promueve la desacetilación de numerosas enzimas involucradas en el catabolismo de ácidos grasos y termogénesis, incluyendo la acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, UCP-1 y PGC-1 α (Sebastián y cols., 2012; Shi y cols.,

2005). En el grupo SM el tratamiento con los polifenoles disminuyó la expresión de SIRT3; sin embargo, no se descarta que influya sobre su actividad.

Por otro lado, en modelos de enfermedades metabólicas tales como la obesidad, el contenido mitocondrial de la SIRT3 se encuentra disminuido y las proteínas acetiladas elevadas (Shi y cols., 2005; Newsom y cols., 2013). Mientras que en el presente estudio no se encontraron cambios en la expresión de SIRT3 en el grupo SM comparado con los controles.

Además el aumento de PGC-1 α , blanco de SIRT3 en células musculares, promueve la elevación de FNDC5 y de la irisina, proteína que induce el “browning” en tejido adiposo blanco (Boström y cols., 2012). Propusimos que el cambio en la expresión de SIRT3, con el tratamiento podría estar implicado en la expresión de FNDC5. Los resultados indican que no existen diferencias en la expresión de FNDC5 entre el grupo C y el SM como sucedió con la SIRT3. Sin embargo, la administración del tratamiento con RSV y QRC promovió la tendencia a la disminución de FNDC5 en el grupo SM, efecto que está relacionado directamente con la expresión de SIRT3 e inversamente con SIRT1. Sugerimos que esto puede deberse a los efectos del ayuno ya que este promueve la regulación a la baja en la expresión de FNDC5 de acuerdo a lo descrito por Roca-Rivada y cols. (2013). Este efecto concordaría con lo demostrado en este estudio, ya que con el tratamiento con polifenoles miméticos del ayuno, tiende a disminuir la expresión de FNDC5 en el SM. Además el mismo grupo de investigación señala que una dieta elevada en grasa disminuye la expresión de FNDC5 en tejido adiposo visceral de ratas Zucker obesas, lo que de acuerdo a los resultados que se encontraron no sucede con una dieta alta en hidratos de carbono.

El ejercicio por una semana en un modelo en rata promueve el aumento de FNDC5 en tejido adiposo visceral, mientras que el ejercicio por un período mayor de tiempo (3 semanas), promueve su disminución. Esto demuestra que incluso el tiempo de tratamiento influye en el efecto en la expresión de esta proteína (Roca-Rivada y cols., 2013). Por ello, resultaría interesante evaluar los cambios en la expresión de FNDC5 con el RSV y QRC de manera aguda y crónica.

Nuestros resultados pudieran sugerir que la disminución en la expresión de FNDC5 en el grupo SM es resultado de un mecanismo compensatorio al exceso de tejido adiposo y a la desregulación metabólica presente en esta patología. No existen antecedentes del efecto de la combinación de RSV y QRC en la expresión de FNDC5 en tejido adiposo visceral en un modelo de SM, motivo de su relevancia. Faltaría por explorar la expresión de irisina en músculo esquelético así como analizar si

existen cambios morfo-fisiológicos en el tejido adiposo visceral para determinar la presencia de “browning”.

Puesto que SIRT1 y SIRT2 disminuyeron en SM, se exploró la expresión diferencial de su blanco: el factor de transcripción PPAR- γ , involucrado en la diferenciación de adipocitos. Se encontró que el grupo C presenta menor expresión de PPAR- γ comparado con el SM y que el tratamiento con polifenoles aumenta su expresión, permaneciendo sin efecto en el SM. Esto se debe probablemente a que el SM se caracteriza por aumento de la adipogénesis y diferenciación de adipocitos por lo que es usual el aumento en la expresión de PPAR- γ .

El RSV aumenta la expresión del mRNA de FOXO1, un inhibidor de adipogénesis y transrepressor de PPAR- γ , por lo que se infiere que el tratamiento con RSV inhibe su actividad pero no su expresión. Asimismo se encontró que el RSV aumenta la actividad de SIRT 1, que a su vez reprime la actividad de PPAR- γ en tejido adiposo blanco mediante el acoplamiento con el receptor nuclear co-represor (NCoR) y el mediador de silenciamiento de los receptores de la hormona tiroidea y retinoide (SMRT) (Picard y cols., 2004). Por ello se sugiere que la actividad de PPAR- γ se encuentra disminuida más no su expresión. Costa y cols. (2011) sugirieron que RSV disminuye la expresión de PPAR- γ .

Dado que PPAR- γ se encarga de transcribir a UCP-1, se evaluó la expresión de esta proteína clave del “browning”. Se encontró que en el grupo SM aumentó la expresión de UCP-1 comparado con el grupo C, sin embargo el tratamiento con polifenoles disminuyó la expresión de UCP-1 de manera dosis dependiente en el SM, esa misma tendencia se observó con la SIRT3. Esto puede ser explicado en modelos in vitro knockdown para SIRT3, en los cuales PGC-1 α es incapaz de inducir la expresión de genes termogénicos, lo que implica que la transcripción de esta sirtuina es un proceso sumamente importante para la expresión de UCP-1. El PGC-1 α activa la transcripción del gen SIRT3 mediante la coactivación del receptor nuclear relacionado con estrógenos- α (Err- α) que se une a la región promotora proximal del gen SIRT3 (Giralt y cols., 2011).

Por lo tanto la explicación por la que en el SM se encuentre elevado el UCP-1 es por el aumento de su factor de transcripción. En el estudio de Oliveira Andrade y cols. (2014) se demostró que la administración de RSV (4 mg/kg de comida, durante 2 semanas) disminuye la acumulación de grasa en tejido adiposo mediante la promoción de termogénesis ya que aumenta la expresión de SIRT1, de la fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), UCP-1 y 3. Estos hallazgos

difieren de los resultados derivados de este estudio, posiblemente debido a diferencias tanto en el modelo de estudio como en las dosis del tratamiento empleadas.

8 CONCLUSIONES

El tratamiento con la mezcla de RSV y QRC disminuye los signos del SM. Dicho fenómeno se acompañó del incremento en la expresión de SIRT1 y SIRT2 y sin modificaciones significativas en SIRT3 en tejido adiposo visceral. Así mismo, se identificó la presencia de la proteína FNDC5 involucrada en el proceso de “browning” del tejido adiposo, cuya expresión no se modificó con el tratamiento mientras que la expresión de UCP-1 disminuyó en los animales con SM.

9 REFERENCIAS

Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, Deng CX, Finkel T. 2008. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (38): 14447–14452.

Ajmo JM, Liang X, Rogers CQ, Pennock B, You M. 2008. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 295 (4): G833-G842.

Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J, Franco M. 1997. Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens*. 1997 (10): 379-388.

Baños C, Carbó R, El Hafidi M, Guarner V. 2011. Therapeutical procedures to treat the metabolic syndrome in humans and animal models. *Current topics in pharmacology*. 15 (2): 27-83.

Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nat*. 444 (7117): 337-342.

Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. 2002. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*. 277 (47): 45099-45107.

Boekholdt SM, Kastelein JJ. 2012. Lipid Parameters and Cardiovascular Events in Patients Taking Statins—Reply. *JAMA*. 308 (2): 131-133.

Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts IC, Wolfram S, Alink GM, Rietjens IM, Keijer J, Hollman PC. 2005. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J Nutr*. 135 (7): 1718-1725.

Bordone L, Motta MC, Picard F, Robinson A, Jhala US, Apfeld J, Mc Donagh T, Lemieux M, McBurney M, Szilvasi A, Easlson EJ, Lin SJ, Guarente L. 2006. Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP-2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol*. 4 (2): e31.

Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM. 2012. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nat*. 481 (7382): 463-468.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, Mikolás E, Sziártó IA, Mérei A, Halmai R, Mészáros LG, Sümegi B, Wittmann I. 2011. Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces

oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *Br J Nutr.* 106 (3): 383-389.

Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, García-Urkia N, Sarasqueta C, Cosme A, Irastorza B, González A and Arenas JI. 2008. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol.* 8: 40

Carvajal K, Hernández-Esquivel ML, Moreno-Sánchez R. 2007. PPARs síndrome metabólico y enfermedad cardíaca. *Arch Cardiol Mex.* 77 (S4): 66-76

Castillo-Quan. 2012. From white to brown fat through the PGC-1 α -dependent myokine irisin: implications for diabetes and obesity. *Dis Model Mech.* 5 (3): 293–295.

Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. 2003. Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone? *Diabetes Care.* 26 (8): 2442-2450.

Chew TG, Gan SK, Watts FG. 2006. General practice-review. *MJA.* 185 (8): 446-449.

Chen S, Zhao X, Ran L, Wan J, Wang X, Qin Y, Shu F, Gao Y, Yuan L, Zhang Q, Mi M. 2015. Resveratrol improves insulin resistance, glucose and lipid metabolism in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Dig Liver Dis.* 47 (3): 226-232.

Costa Cdos S, Rohden F, Hammes TO, Margis R, Bortolotto JW, Padoin AV, Mottin CC, Guaragna RM. 2011. Resveratrol upregulated SIRT1, FOXO1, and adiponectin and downregulated PPAR γ 1-3 mRNA expression in human visceral adipocytes. *Obes Surg.* 21 (3): 356-361.

Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B. 2009. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 296 (4): R1071–R1077.

Do GM, Jung UJ, Park HJ, Kwon EY, Jeon S M, McGregor RA, Choi MS. 2012. Resveratrol ameliorates diabetes-related metabolic changes via activation of AMP-activated protein kinase and its downstream targets in db/db mice. *Mol Nutr Food Res.* 56 (8): 1282-1291.

Dong J, Zhang X, Zhang L, Bian H-X, Xu N, Bao B, Liu J. 2014. Quercetin reduces obesity-associated adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in mice: a mechanism including AMPK α 1/SIRT1. *J Lipid Res.* 2014. 55 (3): 363–374.

Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, Zock PL, Kromhout D, Hollman PC. 2015. Quercetin-3-glucoside supplementation (160 mg/d), for 4 wk has no effect on flow-mediated dilation, insulin resistance, or other CVD risk factors. *Am J Clin Nutr.* 101(5):914-921.

El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. 2004. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287 (6): R1387-R1393.

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2012 [Internet]. (Consultado Enero 2014). Disponible en: <http://www.ensanut.insp.mx>

Eseberri I, Lasa A, Churrua I, Portillo MP. 2013. Resveratrol metabolites modify adipokine expression and secretion in 3T3-L1 pre-adipocytes and mature adipocytes. *PLoS One*. 8 (5): e63918.

Escande C, Nin V, Price NL, Capellini V, Gomes AP, Barbosa MT, O'Neil L, White TA, Sinclair DA, Chini EN. 2013. Flavonoid apigenin is an inhibitor of the NAD⁺ ase CD38: implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes*. 62 (4): 1084-1093.

Finley LW, Haas W, Desquirit-Dumas V, Wallace DC, Procaccio V, Gygi SP, Haigis MC, 2011. Succinate dehydrogenase is a direct target of sirtuin 3 deacetylase activity. *PLoS One*. 6 (8):e23295.

Fu J, Jin J, Cichewicz RH, Hageman SA, Ellis TK, Xiang L, Peng Q, Jiang M, Arbez N, Hotaling K, Ross CA, Duan W. 2012. trans-(-)- ϵ -Viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK), and protects cells in models of Huntington Disease. *J Biol Chem*. 287 (29): 24460-24472.

Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V. 2008. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev Cell*. 14 (5): 661–673.

Ghanim H, Sia CL, Abuaysheh S, Korzeniewski K, Patnaik P, Marumganti A, Chaudhuri A, Dandona P. 2010. Antiinflammatory and reactive oxygen species suppressive effects of an extract of *Polygonum cuspidatum* containing resveratrol. *J Clin Endocrinol Metab*. 95 (9): E1-E8.

Giralt A, Hondares E, Villena JA, Ribas F, Díaz-Delfín J, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha controls transcription of the Sirt3 gene, an essential component of the thermogenic brown adipocyte phenotype. *J Biol Chem*. 286 (19): 16958-16966.

Gregory, S. 2010. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 2. *Altern Med Rev*. 15 (4): 313-328.

Gurrola-Díaz CM, García-López PM, Sánchez-Enríquez S, Troyo-Sanromán R, Andrade-González I, Gómez-Leyva JF. 2010. Effects of Hibiscus sabdariffa extract powder and preventive treatment (diet) on the lipid profiles of patients with metabolic syndrome (MeSy). *Phytomed*. 17 (7): 500-505.

Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Karow M, Blander G, Wolberger C, Prolla TA, Weindruch R, Alt FW, Guarente L. 2006. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*. 126 (5): 941-954.

Harms M, Seale P. 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 19 (2013): 1252–1263

Houtkooper RH, Pirinen E, Auwerx J. 2012. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13 (4): 225-238.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nat.* 425 (6954): 191-196.

Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L, Verdin E. 2010. Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta.* 1804 (8): 1645-1651.

Hubbard BP, Gomes AP, Dai H, Li J, Case AW, Considine T, Riera TV, Lee JE, E SY, Lamming DW, Pentelute BL, Schuman ER, Stevens LA, Ling AJ, Armour SM, Michan S, Zhao H, Jiang Y, Sweitzer SM, Blum CA, Disch JS, Ng PY, Howitz KT, Rolo AP, Hamuro Y, Moss J, Perni RB, Ellis JL, Vlasuk GP, Sinclair DA. 2013. Evidence for a common mechanism of SIRT1 regulation by allosteric activators. *Science.* 339 (6124): 1216-1219.

Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.* 10 (5): 512-516.

International Diabetes Federation. Worldwide definition of the metabolic syndrome. [Internet]. (Consultado el 20 de enero de 2014). Disponible en: http://www.idf.org/webdata/docs/IDF_Meta_def_final.pdf.

Jing E, Emanuelli B, Hirschey MD, Boucher J, Lee KY, Lombard D, Verdin ED, Kahn CR. 2011. Sirtuin-3 (Sirt3) regulates skeletal muscle metabolism and insulin signaling via altered mitochondrial oxidation and reactive oxygen species production. *PNAS.* 108 (35): 14608–14613.

Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, Thompson TN, McCormick DL. 2011. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 68(3):593-601.

Kaur. 2014. A comprehensive review on Metabolic Syndrome. *Cardiology Research and Practice.* (2014): 943162

Kobylińska A, Janas KM. 2015. [Health--promoting effect of quercetin in human diet]. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 9(69):51-62.

Könner AC, Brüning JC. 2012. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metab.* 16 (2): 144-52.

Kreutzberg SV, Ceolotto G, Papparella I, Bortoluzzi A, Semplicini A, Dalla Man C, Cobelli C, Fadini GP, Avogaro A. 2010. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin

resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes*. 59 (4): 1006-1015.

Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*. 127 (6): 1109–11022.

Lehmann R, Bhargava AS, Günzel P. 1993. Serum lipoprotein pattern in rats, dogs and monkeys, including method comparison and influence of menstrual cycle in monkeys. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 31 (10): 633-637.

Liu K, Zhou R, Wang B, Mi MT. 2014. Effect of resveratrol on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 99 (6): 1510-1519.

Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, et al. 2007. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*. 27 (24): 8807–8814.

Machha A, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. 2007. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide*. 16 (4): 442-447.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. 2002. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 26 (11): 1407-1433.

Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28 (7): 412-419.

Mc Gown C, Birerdinc A, Younossi ZM. 2014. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin Liver Dis*. 18 (1): 41-58.

Miatello R, Vázquez M, Renna N, Cruzado M, Zumino AP, Risler N. 2005. Chronic administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*. 18 (6): 864-870.

Michan S, Sinclair D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 404 (1): 1–13.

Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, Ku L. 2007. Resveratrol, a component of red wine, elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and potassium channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48 (9): 4232-4239.

Nasrin N, Wu X, Fortier E, Feng Y, Bare OC, Chen S, Ren X, Wu Z, Streeper RS, Bordone L. 2010. SIRT4 regulates fatty acid oxidation and mitochondrial gene expression in liver and muscle cells. *J Biol Chem*. 285 (42): 31995–32002

Newsom SA, Boyle KE, and Friedman JE. 2013. Sirtuin 3: A major control point for obesity-related metabolic diseases?. *Drug Discov Today Dis Mech*. 10 (1-2): e35–e40.

Olholm J, Paulsen SK, Cullberg KB, Richelsen B, Pedersen SB. 2010. Anti-inflammatory effect of resveratrol on adipokine expression and secretion in human adipose tissue explants. *Int J Obes (Lond)*. 34 (10): 1546-1553.

Oliveira Andrade JM, Montes Frade AC, Bohnen Guimaraes J, Freitas KM, Paz Lopes MT, Sena Guimaraes AL, Batista de Paula AM, Celso Coimbra C, Sousa Santos SH. 2014. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr*. 53 (7)

Orci L, Cook WS, Ravazzola M, Wang M, Park B-H, Montesano R, Unger R. 2004. Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines. *PNAS*. 101 (7): 2058-2063.

Panchal SK, Poudyal H, Brown L. 2012. Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J Nutr*. 142 (6): 1026-1032.

Pérez Méndez O, García Hernández L. 2007. High-density lipoproteins (HDL) size and composition are modified in the rat by a diet supplemented with "Hass" avocado (*Persea americana* Miller). *Arch Cardiol Mex*. 77 (1): 17-24.

Pérez-Torres I, Ruiz-Ramírez A, Baños G, El-Hafidi M. 2013. Hibiscus sabdariffa Linnaeus (Malvaceae), curcumin and RSV as alternative medicinal agents against metabolic syndrome. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 11 (1): 25-37.

Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B. and Nedergaard J. 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*. 285 (10): 7153-7164.

Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschöp MH. 2008. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *PNAS*. 105 (28): 9793-9798.

Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nat*. 429 (6993): 771.

Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, Rosenbaum M, Zhao Y, Gu W, Farmer SR, Accili D. 2012. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppar- γ . *Cell*. 150 (3): 620-632.

- Qiao L, Shao J. 2006. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem*. 281 (52): 39915–39924.
- Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. 2010. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metabol*. 12 (6): 662–667.
- Ramadori G, Gautron L, Fujikawa T, Vianna CR, Elmquist JK, Coppari R. 2009. Central administration of resveratrol improves diet-induced diabetes. *Endocrinol*. 150 (12): 5326-5333.
- Reaven GM. 2010. The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round?. *J Intern Med*. 269 (2): 127-136.
- Reis CE, Bressan J, Alfenas RC. 2010. Effect of the diet components on adiponectin levels. *Nutr Hosp*. 25 (6): 881-888.
- Houtkooper RH, Cantó C, Wanders RJ, Auwerx J. 2010. The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. *Endocr Rev*. 31 (2): 194-223.
- Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. 2008. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity (Silver Spring)*. 16 (9): 2081-2087.
- Rivera L, Morón R, Zarzuelo A, Galisteo M. 2009. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochem Pharmacol*. 77 (6): 1053-1063.
- Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A, Seoane LM, Casanueva FF, Pardo M. 2013. FNDC5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS One*. 8 (4): e60563.
- Rodgers TJ, Lerin C, Gerhart-Hines Z, Puigserver P. 2008. Metabolic adaptations through the PGC-1a and SIRT1 pathways. *FEBS Letters*. 582 (1): 46–53.
- Rodgers JT, Puigserver P. 2007. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *PNAS*. 104 (31): 12861–12866.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1a and SIRT1. *Nat*. 434 (7029): 113-118.
- Rubio ME, Baños G, Díaz E, Guarner V. 2006. Effect of age on insulin-induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Exp Gerontol*. 41 (3): 282- 288.
- Sánchez GT, Baños GM, editors. Interiorización cardiovascular 2. "Hipertensión arterial": Fisiopatología. México D.F. Piensa S.A. de C.V; 2004.

Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. 2006. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 24 (1): 75-84.

Scher MB, Vaquero A, Reinberg D. 2007 Sirt3 is a nuclear NAD⁺-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev*. 21 (8): 920-928.

Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CFW, Steegborn C. 2008. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol*. 382 (3): 790–801.

Sebastián C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R. 2012. From sirtuin biology to human diseases: an update. *J Biol Chem*. 287 (51): 42444–42452.

Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. 2005. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Med Biochem*. 280 (14): 13560-13567.

Suchankova G, Nelson LE, Gerhart-Hines Z, Kelly M, Gauthier MS, Saha AK, Ido Y, Puigserver P, Ruderman NB. 2009. Concurrent regulation of AMP-activated protein kinase and SIRT1 in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 378 (4): 836-841.

Sun C, Zhang F, Ge X, Yan T, Chen X, Shi X, Zhai Q. 2007. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab*. 6 (4): 307-319.

Tao R, Coleman MC, Pennington JD, Ozden O, Park S-H, Jiang H, Kim H-S, Flynn CR, Hill S, Hayes McDonald W, Olivier AK, Spitz DR, Gius D. 2010. Sirt3-mediated deacetylation of evolutionarily conserved lysine 122 regulates MnSOD activity in response to stress. *Mol. Cell*. 40 (6): 893–904.

Timmers S, Konings E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, Goossens GH, Hoeks J, van der Krieken S, Ryu D, Kersten S, Moonen-Kornips E, Hesselink MK, Kunz I, Schrauwen-Hinderling VB, Blaak EE, Auwerx J, Schrauwen P. 2011 Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab*. 14 (5): 612-622.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*. 76 (9): 4350-4354.

Townsend KL, Tseng YH. 2014. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 25 (4): 168-177.

Unger RH. 2003. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*. 14 (9): 398-403.

Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. 2007. PPARs in the control of uncoupling proteins gene expression. *PPAR Res*. 2007: 74364.

Wang, Tong Q. 2009. SIRT2 suppresses adipocyte differentiation by deacetylating FOXO1 and enhancing FOXO1's repressive interaction with PPAR- γ . *Mol Biol Cell*. 20 (3): 801–808.

Yamamoto Y, Oue E. 2006. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Bio sci Biotechnol Biochem*. 70 (4): 933-939.

Yang F, Song L, Wang H, Wang J, Xu Z, Xing N. 2015. Quercetin in prostate cancer: Chemotherapeutic and chemopreventive effects, mechanisms and clinical application potential (Review). *Oncol Rep*. 33(6):2659-68.

Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, Baile CA. 2008. Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of RSV and quercetin. *LifeSci*. 82 (19-20): 1032-1039.

Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, et al. 2010. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*. 327 (5968): 1000–1004.

Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, Lin SC, Hong W, Li P. 2003. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet*. 35 (1): 49-56.