



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

---

**T E S I S**

**“EVALUACIÓN DE LA RESTRICCIÓN DE FRUCTOSA Y DE SODIO SOBRE EL  
ESTRES OXIDATIVO Y LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN SUJETOS CON  
HIPERTENSION Y SOBREPESO”**

**QUE PRESENTA**

**DR. ROMÁN HERNÁNDEZ RÍOS**

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

**TUTOR: DRA. MAGDALENA MADERO ROVALO**



**MEXICO, D.F.**

**Agosto 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

---

Dr. Fernando Guadalajara Boo

Jefe del Departamento de Enseñanza

Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

---

Dra. Magdalena Madero Rovalo

Jefa del Departamento de Nefrología

Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>MARCO TEORICO</b>	<b>7</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>35</b>
<b>JUSTIFICACION</b>	<b>36</b>
<b>HIPOTESIS</b>	<b>38</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>DESCRIPCION DE LA POBLACION</b>	<b>40</b>
<b>VARIABLES</b>	<b>43</b>
<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>44</b>
<b>ANALISIS ESTADISTICO</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>DISCUSION</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>73</b>

## RESUMEN

**INTRODUCCION:** La hipertensión, la enfermedad vascular cerebral, la cardiopatía isquémica y la fibrosis renal están relacionadas a una alta ingesta de sodio [1-5]. La evidencia en humanos no hipertensos y en modelos experimentales con animales indica que la ingesta alta en sodio a largo plazo se asocia con incrementos en la tensión arterial (TA) [15, 17-21]. Una dieta alta en sal puede también inducir sensibilidad a la sal, esto ya ha sido reportado en roedores, posiblemente a través de disfunción endotelial [17].

El óxido nítrico (ON) es un potente vasodilatador que modula el tono vascular renal y la función renal manteniendo el balance de sodio y el volumen del líquido extracelular, por lo tanto regulando la presión arterial [34, 35].

En estudios y modelos experimentales, se ha identificado la relación entre la fructosa con un incremento en el peso y obesidad así como de muchos parámetros del síndrome metabólico, incluyendo HAS, resistencia a la insulina e hiperlipidemia [68]. El estrés oxidativo es también un efecto secundario a la ingestión de fructosa. La fructuosa y la combinación de sal producen un cambio de larga duración en el tejido vascular renal, conduciendo a hipertensión sostenida.

La hipertensión inducida por fructuosa es parcialmente generada por la absorción de sal incrementada en el intestino delgado. Este efecto puede tener un impacto principal en la presión arterial cuando la ingestión alta de sal es combinada con el consumo alto en fructosa [88, 89].

Además existe evidencia que sugiere la relación entre los niveles de Acido úrico y fructosa con tensión arterial y síndrome metabólico en ensayos clínicos, y en donde se ha reportado una asociación entre estas entidades con inflamación, estrés oxidativo y disfunción endotelial [77-78].

El acido úrico per se induce estrés celular y depleción de ATP. Se ha sugerido que existe una interrelación entre las alteraciones en la función mitocondrial y los defectos en el metabolismo oxidativo en tejido graso y en musculo esquelético [120-122].

El objetivo de este estudio es evaluar el impacto que tienen la dieta baja en sal y la dieta baja en sal y baja en fructosa sobre el estrés oxidativo y la función mitocondrial en pacientes hipertensos con sobrepeso u obesidad.

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

oxidativo, así como paraclínicos y somatometría relacionada a SM. Se registró la TA mediante monitoreo ambulatorio de la presión arterial (MAPA). Posteriormente entraron a una segunda fase (4 semanas) asignándose de manera aleatoria nuevamente a los individuos de cada grupo a administración de alopurinol o placebo y realizando las mismas determinaciones.

**RESULTADOS:** Se incluyeron en el estudio un total de 36 pacientes. Quince fueron asignados al grupo con restricción en fructosa y sodio dejando los 21 restantes al grupo con restricción de sodio pero sin restricción de fructosa. La pérdida de peso no fue alcanzada en ningún grupo. Ambas dietas fueron asociadas con una disminución importante en los niveles de NDPH y un incremento en el ADNmt, efecto que fue más marcado en la semana 8. Los niveles de ADNmt en la semana 8 fueron mayores en el grupo de dieta isocalórica hiposódica con restricción en fructosa comparado con el grupo dieta isocalórica hiposódica sin restricción de fructosa, aunque esto no fue estadísticamente significativo.

**CONCLUSIONES:** Tanto la restricción de sodio y fructosa así como la restricción de sodio estuvieron asociados con un incremento en el contenido de ADNmt además de una tendencia en la reducción del estrés oxidativo en las células inmunes circulantes. Estos efectos fueron independientes de la pérdida de peso.

## MARCO TEORICO

### INTRODUCCION

La hipertensión, la enfermedad vascular cerebral, la cardiopatía isquémica y la fibrosis renal están relacionadas a una alta ingesta de sodio [1-5]. La mayoría de los individuos consume sodio en exceso de las recomendaciones actuales de las principales organizaciones de la salud [14]. En muchas poblaciones a nivel mundial, la ingesta de cloruro de sodio se encuentra en el rango de 8 a 15 g por día. Esta cantidad contiene 3.2 a 6 g/día de sodio el cual es una cantidad mayor que sobrepasan las necesidades humanas [30].

Una dieta alta en sal se cree que es responsable de 20 a 40% de todos los casos de hipertensión en los Estados Unidos [15] y de 6% de casos de infarto al miocardio e infartos cerebrales de manera anual [16]. La evidencia en humanos no hipertensos y en modelos experimentales con animales indica que la ingesta alta en sodio a largo plazo se asocia con incrementos en la TA [15, 17-21]. Una dieta alta en sal puede también inducir sensibilidad a la sal, esto ya ha sido reportado en roedores, posiblemente a través de disfunción endotelial [17].

Existen varios mecanismos que controlan el balance de sodio en el cuerpo y una disrupción de sus funciones fisiológicas puede conducir al desarrollo de sensibilidad a la sal [31-33]. El óxido nítrico (ON) es un potente vasodilatador que modula el tono vascular renal y la función renal manteniendo el balance de sodio y el volumen del líquido extracelular, por lo tanto regulando la



presión arterial [34, 35]. El ON es producido en la mayoría de los tejidos por tres diferentes isoformas de la enzima síntasa de ON (NOS): isoformas neuronal, inducible y endotelial (eNOS). La inhibición inespecífica de todas las isoformas de NOS conducen al desarrollo de hipertensión sensible a sal sugiriendo que el sistema del ON es de importancia crítica en la regulación del balance de sodio y la TA [32, 33]. En particular, eNOS es una fuente crucial de ON que regula la función cardiovascular y renal, los ratones que carecen del gen eNOS exhiben mayores niveles de TA [35].

La eNOS es por lo tanto benéfica. El ácido úrico y el estrés oxidativo disminuye la eNOS. Una dieta alta en sodio disminuye la producción de ON. Se ha comprobado que en pacientes diabéticos, hipertensos el ON esta disminuido.

Las mitocondrias son consideradas un objetivo prioritario para este daño inducido por la disminución en la eNOS. Esta disminución de eNOS o su derivado especies reactivas de nitrógeno (ERN) pueden tener al menos 3 tipos de acciones sobre la mitocondria: 1.- Inhibición reversible de la respiración mitocondrial a citocromo oxidasa por el ON e inhibición irreversible a múltiples sitios por ERN; 2.- Estimulación de la producción mitocondrial de superóxido, peróxido de hidrogeno y peroxinitrito por el ON; e 3.- Inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial por ERN [58].

Por otro lado, se ha demostrado que la fructosa causa efectos similares al sodio, en cuanto a incremento en el peso y obesidad así como de muchos parámetros del síndrome metabólico, incluyendo HAS, resistencia a la insulina e hiperlipidemia [68].

El estrés oxidativo es un efecto secundario a la ingestión de fructosa; por lo tanto, este monosacárido ha sido mostrado en ser más reactivo que la glucosa en su capacidad de formar productos avanzados de glucosilación (PAG) [72]. Otro mecanismo para inducir estrés oxidativo es la concentración intracelular incrementada de ácido úrico, lo cual induce la sobreexpresión y la activación de NADPH oxidasa en adipocitos y en células de músculo liso vascular y en el tejido renal [75-77].

Finalmente la sinergia de la fructuosa y el sodio producen un cambio de larga duración en el tejido vascular renal, conduciendo a hipertensión sostenida. Estos datos proveen una evidencia fuerte de un efecto sinérgico de una dieta alta en sal con el consumo alto en fructuosa y explican parcialmente el efecto incrementado cuando ambos son combinados en modelos animales y en humanos.

La hipertensión inducida por fructuosa es parcialmente generada por la absorción de sal incrementada en el intestino delgado. Este efecto puede tener un impacto principal en la presión arterial cuando la ingestión alta de sal es combinada con el consumo de fructuosa alta [88, 89].

El objetivo primario de este trabajo de tesis es evaluar el impacto que tienen la dieta baja en sal y la dieta baja en sal y baja en fructosa sobre el estrés oxidativo y la función mitocondrial en pacientes hipertensos con sobrepeso u obesidad.

## SODIO E HIPERTENSIÓN.

La hipertensión, la enfermedad vascular cerebral, la cardiopatía isquémica y la fibrosis renal están relacionadas a una alta ingesta de sodio [1-5]. Aunque los efectos deletéreos de la alta ingesta de sodio están bien definidos, los mecanismos subyacentes no son claros. Una alta ingesta de sodio causa fibrosis y procesos inflamatorios en riñón y en corazón [6]. Además, la proteína C reactiva (PCR), conocida como un marcador de inflamación, se encuentra en niveles elevados cuando el endotelio vascular está rígido, esto es inducido por aldosterona, indicando que el sodio está involucrado en este proceso [7, 8].

Cuando la tasa de ingesta de sal en la dieta excede la capacidad excretoria renal, algo de este incremento es almacenado en el espacio entre las células, unido a un material orgánico extracelular [9]. Titze y cols [10] fueron los primeros en relacionar los depósitos de sodio inactivos osmóticamente a la hipertensión arterial. El sodio plasmático está ligeramente incrementado en la hipertensión cuando la ingesta de sodio en la dieta se ha incrementado [11, 12]. Por lo tanto se ha postulado que cambios en el sodio plasmático pueden controlar la presión arterial [12].

Experimentos in vitro han mostrado que cuando la concentración de sodio extracelular está incrementada en un 5%, existe una rigidez en las células endoteliales que ocurre dentro de unos minutos hasta en un 25%.

La siguiente figura (ver figura 1) ilustra el gran impacto de cambios pequeños en la concentración de sodio extracelular sobre la rigidez endotelial vascular [13]. Esta fuerte respuesta del endotelio a pequeños cambios en la concentración de sodio plasmático es dependiente de aldosterona. La inhibición del receptor de mineralocorticoide por espironolactona previene la rigidez endotelial. En conjunto, pequeños cambios en el sodio plasmático pueden alterar la función endotelial, al menos in vitro.

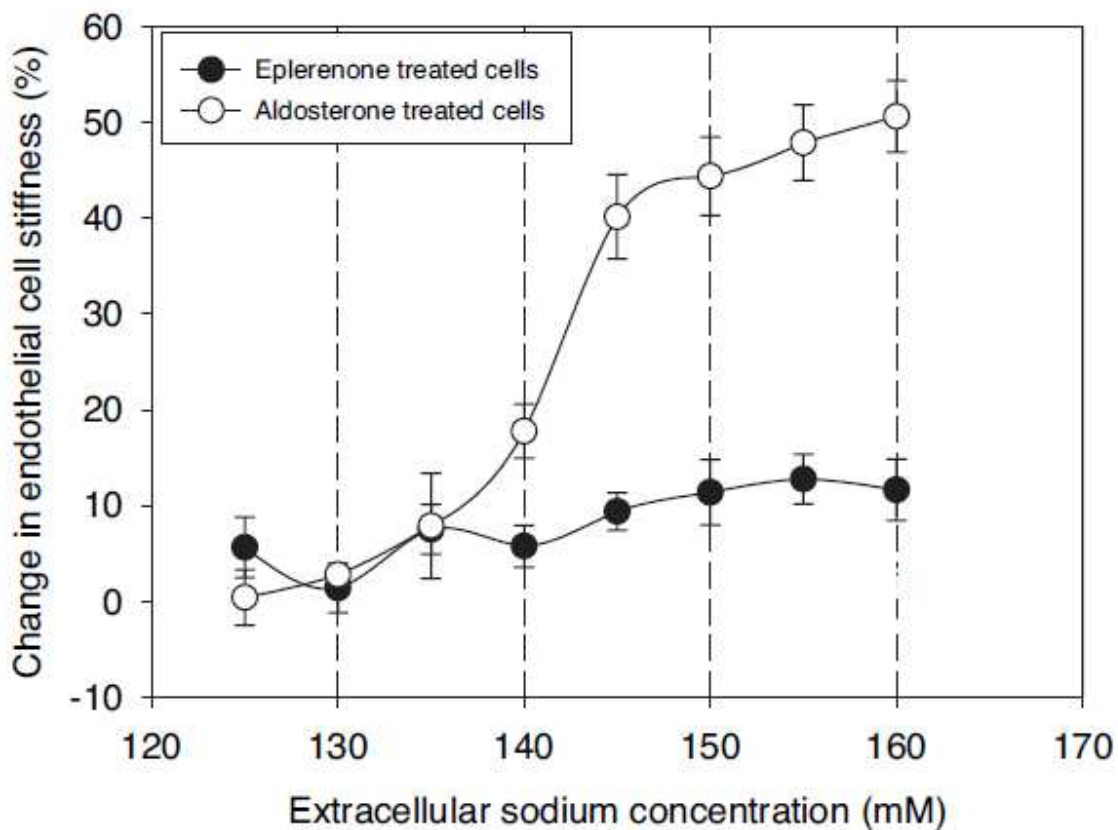


Figura 1. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;

104:16281 – 6.

La mayoría de los individuos consume sodio en exceso de las recomendaciones actuales de las principales organizaciones de la salud [14]. En muchas poblaciones a nivel mundial, la ingesta de cloruro de sodio se encuentra en el rango de 8 a 15 g por día. Esta cantidad contiene 3.2 a 6 g/día de sodio el cual es una cantidad mayor que sobrepasan las necesidades humanas [30].

Una dieta alta en sal se cree que es responsable de 20 a 40% de todos los casos de hipertensión en los Estados Unidos [15] y de 6% de casos de infarto al miocardio e infartos cerebrales de manera anual [16]. La evidencia en humanos no hipertensos y en modelos experimentales con animales indica que la ingesta alta en sodio a largo plazo se asocia con incrementos en la TA [15, 17-21].

Paradójicamente, la carga de sodio a corto plazo en estos humanos no incrementa substancialmente la TA [22, 23]. Como explicar el porqué los individuos quienes no eran sensibles a sal pueden desarrollar hipertensión relacionada a una sobrecarga de sodio crónica, esto no está bien comprendido. Sin embargo, estudios en humanos y animales han mostrado que la carga de sodio a corto plazo se ha asociado con disfunción endotelial y daño vascular y es posible que tales insultos, si son repetidos durante el tiempo, pudieran explicar el incremento en la presión arterial asociada con una dieta alta en sal de manera crónica [24-29].

Una dieta alta en sal puede también inducir sensibilidad a la sal, esto ya ha sido reportado en roedores, posiblemente a través de disfunción endotelial [17].

## SODIO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

Existen varios mecanismos que controlan el balance de sodio en el cuerpo y una disrupción de sus funciones fisiológicas puede conducir al desarrollo de sensibilidad a la sal [31-33]. El óxido nítrico (ON) es un potente vasodilatador que modula el tono vascular renal y la función renal manteniendo el balance de sodio y el volumen del líquido extracelular, por lo tanto regulando la presión arterial [34, 35].

El ON es producido en la mayoría de los tejidos por tres diferentes isoformas de la enzima síntasa de ON (NOS): isoformas neuronal, inducible y endotelial (eNOS). La inhibición inespecífica de todas las isoformas de NOS conducen al desarrollo de hipertensión sensible a sal sugiriendo que el sistema del ON es de importancia crítica en la regulación del balance de sodio y la TA [32, 33]. En particular, eNOS es una fuente crucial de ON que regula la función cardiovascular y renal, los ratones que carecen del gen eNOS exhiben mayores niveles de TA [35].

El desarrollo de estrés oxidativo es dependiente del balance entre la producción y la degradación de radicales oxidantes como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y otras especies reactivas de oxígeno. El  $O_2^-$  es un producto del metabolismo oxidativo celular y la NADPH oxidasa es uno de las principales fuentes de  $O_2^-$  en tejidos vivos.

El  $O_2^-$  reactivo es rápidamente reducido por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Experimentos recientes muestran evidencia que el ON exhibe propiedades antioxidantes por su rápida reacción no enzimática con el  $O_2^-$  y por lo tanto ayuda a mantener niveles mínimos de  $O_2^-$

bajo condiciones normales y provee una función protectora en contra de las acciones del  $O_2^-$  [36-39].

Estos resultados sugieren que bajo condiciones de producción inadecuada de ON, hay acumulación incrementada de  $O_2^-$  que conduce al desarrollo de estrés oxidativo en el cuerpo. El  $O_2^-$  endógeno directamente estimula la función de reabsorción tubular conduciendo a retención de sodio y por lo tanto puede contribuir al desarrollo de sensibilidad a la sal asociado con un incremento en la TA [40-43].

Por lo anterior el Dr. Kopkan y cols [44] examinaron el rol de la actividad del  $O_2^-$  en el desarrollo de sensibilidad a la sal en ratones que carecían del gen para eNOS. Estos ratones fueron alimentados con dietas altas en sal o normales por 2 semanas. La PA y las respuestas excretorias fueron evaluados con o sin tratamiento de un eliminador de  $O_2^-$  tempol (4-hidroxitetrametilpiperidima-1-oxil) o un inhibidor de NADPH oxidasa durante el curso de 2 semanas del período experimental.

Este estudio demostró que la ingesta alta en sal por 2 semanas causaba un incremento sustancial en la TA en los ratones que tenían ausente el gen para eNOS, pero esto no sucedía en los ratones tipo silvestre; mostrando por primera vez que el incremento en la TA durante la ingesta alta en sal era marcadamente atenuada durante el tratamiento de un eliminador de  $O_2^-$  tempol o un inhibidor de NADPH oxidasa en los ratones que tenían ausente eNOS.

Estos hallazgos indican que el desarrollo de hipertensión sensible a sal en ratones Knock out (KO) eNOS es dependiente del incremento asociado en la actividad del  $O_2^-$  inducido por la ingesta alta de sal. Aunque la ingesta de sal también induce producción del  $O_2^-$  en ratones tipo silvestre, un balance oxidativo se mantiene por la producción óptima de ON, el cual funciona como un importante antioxidante.

Sin embargo, en los ratones KO eNOS, este balance no puede llevarse a cabo, resultando en un estrés oxidativo incrementado. Estos datos sugieren que tales alteraciones en el balance oxidativo modulan la función renal, contribuyendo en la fisiopatología de la sensibilidad a la sal.

Estudios previos también mostraron que el tratamiento antioxidante significativamente disminuía la TA en varios modelos de hipertensión, particularmente aquellos con sensibilidad a la sal [45, 46].

Un estudio previo realizado en ratas [37] también demostró que la actividad incrementada del  $O_2^-$  causada por la administración crónica de un inhibidor específico de NOS contribuía al desarrollo de sensibilidad a la sal.

El tratamiento de ratas con doxorubicina que une al dominio reductasa de eNOS y genera superóxido incrementa la presión arterial sistólica solo en el grupo de dieta alta en sal, la expresión de eNOS en la corteza y medula renal fueron mayores en el grupo de dieta alta en sal que en el de dita con ingesta normal, esto a pesar del tratamiento con doxorubicina; las ratas



alimentadas con una dieta alta en sal y tratados con doxorubicina mostraron menor excreción de ON a nivel urinario.

El estrés oxidativo inducido por doxorubicina parece dañar la producción de óxido nítrico en el riñón y el tratamiento con doxorubicina puede contribuir al desarrollo de hipertensión inducible por la sal a través de la activación reducida de eNOS por una dieta alta en sal [86].

Banday proporcionó evidencia que sugirió que la sufloximina, un oxidante, incrementa el estrés oxidativo y reduce la señalización de ON, mientras que la ingesta alta en sal reduce los niveles de ON al disminuir la actividad de NOS en ratas [87].

## HIPERTENSIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.

La disfunción endotelial contribuye a la patogénesis y progresión de la hipertensión y es un predictor independiente de riesgo cardiovascular [47]. Las células progenitoras endoteliales (CPE) pueden diferenciarse en células endoteliales maduras y regenerar el endotelio dañado. Existe evidencia de la disponibilidad reducida y de la función dañada de las CPE en la presencia de riesgo cardiovascular [48, 49]. Entre ellas, la hipertensión es un fuerte predictor del daño en la migración de las CPR. Estudios en animales y en humanos han indicado que la hipertensión tiene una correlación inversamente proporcional con la reducción y/o disfunción de las CPE [50-52].

En el modelo de hipertensión sal-acetato desoxicorticosterona (DOCA por sus siglas en ingles) se exhibe renina baja, es sensible a la sal pero tienen niveles elevados de endotelina 1 (ET 1) y de estrés oxidativo debido a la activación de NADPH oxidasa vascular y a la formación de superóxido, lo que resulta en disfunción endotelial. Las CPE circulantes son importantes copias de seguridad para la integridad y función del endotelio [53]. Chen y cols [54] demostraron por primera vez que la activación de la ET1 y los antioxidantes disminuidos ambos contribuían a la reducción y disfunción de CPE vía estrés oxidativo en hipertensión sensible a sal. El estrés oxidativo, la senescencia y la apoptosis pueden representar importantes mecanismos celulares involucrados en este modelo de hipertensión sensible a sal. La hipertensión con estrés oxidativo sistémico exacerbado daña la función de las CPE, con sus implicaciones obvias en la disfunción endotelial.

## DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y FUNCION MITOCONDRIAL.

El ON es un gas inorgánico radical libre sintetizado a partir de L-arginina por 3 isoformas de NOS. Puede ser formado no enzimáticamente durante la isquemia. El ON es producido por diferentes tipos de células y participa en una variedad de funciones biológicas, incluyendo sirviendo como una molécula de señalización en neurotransmisión y vasodilatación. El ON también lleva a cabo una tarea diferente para el sistema inmune, llamado, el asesino de células infectadas virales, células tumorales y parásitos patógenos [55, 56].

Aunque el ON juegue un rol prominente en regular muchas funciones biológicas, existe evidencia extensa que indica que altas concentraciones pueden también ser citotóxicas y mutagénicas. Por ejemplo, se demostró que concentraciones elevadas de ON estimulan apoptosis en macrófagos, timocitos, células del islote pancreático, neuronas y algunas células tumorales.

La sobreproducción de ON por células no inmunes, a través de sobreactivación de isoformas específicas de NOS, principalmente iNOS (isoforma dañina), pueden tener consecuencias adversas en todos los compartimientos celulares [57].

Las mitocondrias son consideradas un objetivo prioritario para este daño inducido por la disminución en la eNOS. Esta disminución de la eNOS o su derivado especies reactivas de nitrógeno (ERN) pueden tener al menos 3 tipos de acciones sobre la mitocondria: 1.- Inhibición reversible de la respiración mitocondrial a citocromo oxidasa por el ON e inhibición irreversible a múltiples sitios por ERN; 2.- Estimulación de la producción mitocondrial de superóxido,

peróxido de hidrogeno y peroxinitrito por el ON; e 3.- Inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial por ERN [58].

El ADN mitocondrial (ADNmt) es una molécula bicatenaria, circular, cerrada, sin extremos (cromosoma mitocondrial). Tiene un tamaño de 16.569 pares de bases, conteniendo un pequeño número de genes, distribuidos entre la cadena H (heavy) y L (light), debido a su diferente densidad. En él se codifican 24 ARNs requeridos para la síntesis de proteínas mitocondriales (Dos ARN ribosómicos y 22 ARN de transferencia) y 13 proteínas que participan en la fosforilación oxidativa [79].

El ADNmt contiene 37 genes, a diferencia de los 20.000 a 25.000 genes del ADN cromosómico nuclear. El cromosoma mitocondrial se organiza en nucleótidos de tamaño variable de 0.068 nanómetros aproximadamente y formados por entre 5-7 cromosomas y proteínas reguladoras de fosforilación oxidativa.

Estas proteínas permiten regular la codificación de nuevo ADNmt mediante la interacción de algunos factores nucleares [79]. Una de estas proteínas es el Factor A de transcripción mitocondrial (Tfam), principal factor para la elaboración de la cantidad de copias de ADNmt, aunque el encargado de codificar genes nucleares relacionados a la respiración mitocondrial, regulando la síntesis y replicación de ADNmt, es el Factor Respiratorio Nuclear (NRF-1). Este factor interactúa directamente con el Peroxisoma Proliferador Activado del Receptor Gamma

(PPAR- $\gamma$ ) y con el Coactivador 1 $\alpha$  del Peroxisoma Proliferador Activado del Receptor- $\gamma$  (PGC-1 $\alpha$ ) para estimular la formación de ADNmt (Figura 2) [80].

A este respecto, la producción de ROS induce la producción de citocinas inflamatorias y Factor Nuclear Kappa-B (NF-KB) a nivel intracelular, condicionando lisis celular y apoptosis. Por otro lado, ante la estimulación de ROS intracelulares, la biogénesis de ADNmt, esta mediada por un fenómeno de regulación a la alza a través del factor NRF-1 [80].

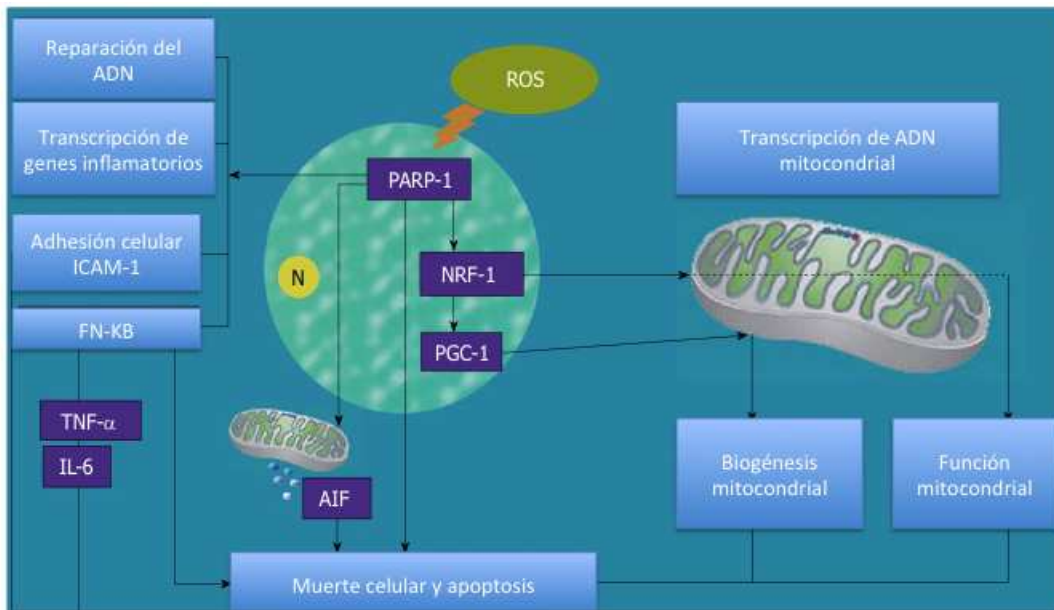


Figura 2. Tomado de Chang C y cols. *World J Cardiol* 2010 26; 2(6): 150-159.

El ON bajo ciertas circunstancias puede ser genotóxico. Puede causar tanto daño y mutaciones en el ADN. Además, se ha mostrado que el ON daña el ADNmt a un mayor grado que el ADN nuclear. Varios grupos recientemente han reportado que el ON puede ser generado dentro de la mitocondria. Aunque la identidad de la NOS mitocondrial permanece incierta. El ON producido

por el NOS mitocondrial se ha sido sugerido que juega un rol importante en el estrés oxidativo y apoptosis, regulación de la respiración mitocondrial y modulación de la homeostasis del Calcio intracelular [59, 60].

Mutaciones en el ADN mitocondrial han sido asociadas con una variedad de enfermedades incluyendo diabetes, cardiopatía isquémica, enfermedad de Parkinson, con el envejecimiento, etc [61, 62]. Estas mutaciones pueden ser parcialmente el resultado de tanto daño incrementado al ADNmt o reparación disminuida de este o una combinación de ambos factores.

Debido a que casi todo el ADNmt codifica para proteínas específicas de la cadena de transporte de electrones, rARNs y tARNs, cualquier mutación o delección en el ADNmt podría fácilmente resultar en una pérdida de uno o varias proteínas esenciales para el transporte de electrones o síntesis del ATP mitocondrial. Esto podría conducir a producción de energía disminuida, el cual es el sello de muchos trastornos mitocondriales. Por otra parte, la disfunción en la cadena del transporte de electrones podría causar producción adicional de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta manera incrementar las señales celulares para iniciar apoptosis, necrosis o una combinación de ambas [63].

La citotoxicidad inducida por ON puede resultar desde la producción de ERN. Cuando el ON es auto-oxidado, el anhídrido nitroso es formado. Alternativamente, si el ON reacciona con el anión superóxido, peroxinitrito es producido. El peroxinitrito es un agente oxidizante poderoso el cual causa oxidación y nitración de bases de ADN. La oxidación por oxígeno molecular y auto oxidación de ON causa la formación de anhídrido nitroso,  $N_2O_3$ , un agente nitrosante efectivo, el

cual reacciona con el grupo amino primario de adenina, citosina o guanina para formar hipoxantina, uracilo y xantina, respectivamente, todos ellos son potencialmente mutagénicos si no son reparados [64].

Adicionalmente, xantina e hipoxantina son bases inestables en DNA debido a que están sujetos a hidrólisis a temperatura fisiológica conduciendo a depurinación y la formación de sitios apurínicos (AP). Además de ser un bloque para la replicación de ADN, los sitios AP también pueden ser tóxicos debido a que pueden causar la rotura de cadenas individuales [65].

## METABOLISMO DE FRUCTOSA

El metabolismo de la fructosa es diferente en muchas formas con el de la glucosa. Primero, la tasa de uso del cuerpo de la fructosa es rápida y excede a la de la glucosa; segundo, la recaptura de fructosa carece de un mecanismo de retroalimentación negativa el cual explica su catabolismo excesivo cuando altas dosis son consumidas [81].

El hígado es el sitio primario del metabolismo de la fructosa después de la absorción intestinal en el yeyuno. La recaptura de fructosa esta mediada por el transportador de fructosa específico GLUT 5 y el transporte de fructosa-glucosa GLUT 2 y es transportado vía vena porta, con acceso a los hepatocitos vía GLUT2 [82]. La fructosa también es metabolizada por el riñón y los intestinos debido a que estos órganos fuertemente expresan GLUT5 y ceto-oxigenasa [83, 84].

Las dietas ricas en fructosa incrementan los niveles plasmáticos de triglicéridos. Este efecto parece ser mediado por mecanismos complejos que promueven la acumulación de glucógeno, incrementan la síntesis de ácidos grasos de novo a nivel hepático y disminuyen la oxidación en la mitocondria. Los intermediarios de la fructosa también pueden ser metabolizados hacia piruvato vía piruvato deshidrogenasa a acetil-CoA y citrato en la mitocondria, dándole los sustratos para la lipogénesis de novo [85].

Una característica única del metabolismo de la fructosa es la síntesis del ácido úrico como un bioproducto (Figura 3). La vía metabólica involucrada en este efecto inicia cuando la fructosa es primero fosforilada por la ceto-oxigenasa C a fructosa-1-fosfato. Debido a que esta enzima no es



regulada por los mecanismos de retroalimentación negativa intracelular, cuando una carga grande de fructosa es ingerida, el ATP necesario para completar esta reacción se encuentra rápidamente agotado.

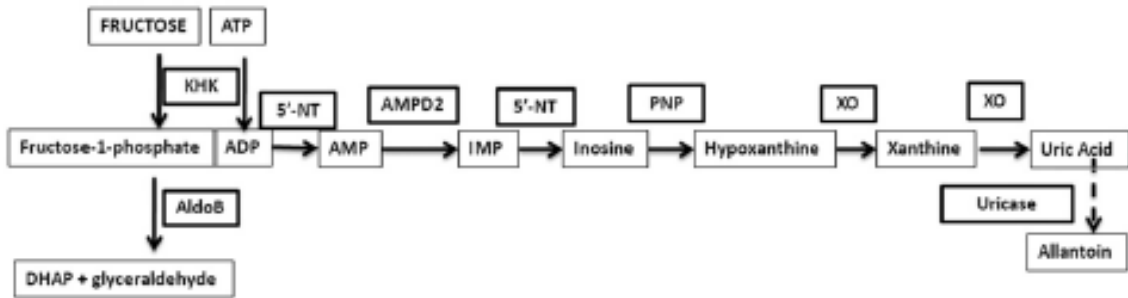


Figura 3. Tomado de Hallfrisch J. *Metabolic effects of dietary fructose*. *FASEB J.* 1990; 4: 2652-60.

La observación de que la concentración de fructosa puede ser un factor de riesgo importante para la depleción de ATP sugiere que la manera en la cual la fructosa es consumida puede tener importantes consecuencias. Por lo tanto, ingerir de manera rápida (deglutir) una bebida azucarada podría ser potencialmente más dañino que ingerirla de manera lenta debido a que mayores concentraciones pueden ser obtenidas. Por la misma razón, beber fructosa en general es más deletéreo que consumir fructosa contenida en una fuente de comida, tales como las frutas.

## FRUCTOSA Y OBESIDAD

Actualmente, el 71.9% de las mujeres y 66.7% de los hombres mayores de 20 años de edad tienen prevalencia combinada para sobrepeso y obesidad. Este aumento a su vez, de peso no saludable en los últimos 20 años ha sido en paralelo al incremento del consumo de energía proveniente de las bebidas azucaradas durante el mismo periodo de acuerdo a diversas fuentes [66].

Se ha documentado que el consumo de bebidas que proporcionan energía proveniente de la fructosa (jugos, aguas frescas, refrescos y otras bebidas endulzadas) eleva considerablemente la ingesta de energía de la población mexicana entre un 19 a 22% a expensas de éstos productos solamente [67].

En otros estudios y modelos experimentales, se ha identificado la relación entre la ingesta de bebidas azucaradas con un incremento en el peso y obesidad así como de muchos parámetros del síndrome metabólico, incluyendo HAS, resistencia a la insulina e hiperlipidemia [68].

En las cantidades consumidas actualmente, las bebidas con azúcar y bajo contenido de nutrimentos facilitan la ingestión excesiva de calorías, y en estudios tanto en seres humanos como en animales, se muestra que tales bebidas no producen saciedad por lo que el efecto neto es un aumento del consumo de energía y por lo tanto de obesidad [69, 70].

Sin embargo, existe un meta-análisis publicado recientemente, se observó que la fructosa parece

no causar ganancia de peso cuando esta es substituida por otros carbohidratos en dietas que proveen el mismo aporte de calorías. La fructosa libre a altas dosis que son aportadas por el exceso de calorías modestamente incrementa esta pérdida de peso, este efecto parece ser debido a las calorías extra que se consumen más que al efecto de la fructosa [71].

## FRUCTOSA Y DISFUNCION ENDOTELIAL

El estrés oxidativo es un efecto secundario a la ingestión de fructosa; por lo tanto, este monosacarido ha sido mostrado en ser mas reactivo que la glucosa en su capacidad de formar productos avanzados de glucosilación (PAG) [72].

Interesantemente, los eritrocitos transportan la fructosa a través de GLUT5. Una vez dentro de las células, la fructosa es convertida a fructosa-3-fosfato, el cual es un agente potente de la glucosilación [73].

De esta manera, la fructosa puede ejercer efectos dañinos en sitios distantes al hígado, el cual es el órgano que lo metaboliza principalmente.

Además, la formación de los PGA por fructosa ha sido implicado en el desarrollo de disfunción endotelial, por lo tanto, el dar tratamiento con metformin a ratas alimentadas con fructosa, el cual inhibe la formación de PGA, atenúa el síndrome metabólico, reduciendo la remodelación estructural en vasos mesentéricos y de la aorta, y previniendo la disminución en la expresión de eNOS vascular [74].

Otro mecanismo para inducir estrés oxidativo es la concentración intracelular incrementada de acido úrico, lo cual induce la sobreexpresión y la activación de NADPH oxidasa en adipocitos y en células de músculo liso vascular y en el tejido renal [75-77].

Otro mecanismo posible se demostró mediante la estimulación de células endoteliales aórticas humanas con concentraciones fisiológicas (5mM) de fructosa; los cuales inducían la expresión de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) [78]. El mecanismo que puede explicar esto es el efecto conocido de la fructosa para reducir la expresión de eNOS, la cual genera óxido nítrico, como la incubación con un donante de óxido nítrico podría prevenir la regulación a la alza de ICAM-1.

## INTERACCION FRUCTOSA Y SAL.

El balance de sal tiene un rol principal en la regulación de la presión arterial. Catena mostró que el incremento en la presión arterial inducida por la alimentación con fructuosa es dependiente del contenido de sodio en la dieta [88]. Por lo tanto, la presión arterial sistólica incrementada en ratas alimentadas con fructuosa de manera concomitante recibieron una dieta alta en sal y una normal, sin embargo los animales que recibieron una dieta baja en sal no desarrollaron hipertensión sistémica. Este efecto se atribuyó a una falla para disminuir receptores de insulina a nivel renal, en las ratas alimentadas con fructuosa en una dieta alta en sal (7.5%), por lo tanto la respuesta antinatriurética a la hiperinsulinemia persistió en estos animales, permitiendo retención de sal, la expansión de volumen e hipertensión.

Por otra parte, una dieta moderada en sal (4%) dada simultáneamente con fructuosa en agua, no incrementó la presión arterial más que la fructuosa sola, sin embargo esto fue asociado con hipertensión persistente después del retiro de la intervención [89]. Este efecto fue asociado con lesiones vasculares renales persistentes después del retiro de los tratamientos.

Dado lo anterior, la fructuosa y la combinación de sal produce un cambio de larga duración en el tejido vascular renal, conduciendo a hipertensión sostenida. Estos datos proveen una evidencia fuerte de un efecto sinérgico de una dieta alta en sal con el consumo alto en fructuosa y explican parcialmente el efecto incrementado cuando ambos son combinados en modelos animales y en humanos.

Las dietas altas en fructuosa han mostrado incrementar la absorción de sal y agua a nivel de yeyuno al incrementar la expresión del intercambiador Cl/base a nivel apical Slc26a6 (PAT1) y el intercambiador Na/H (NHE3) [90]. Un incremento en el volumen extracelular en animales alimentados con fructuosa fue sugerido por el hallazgo de una reducción del 45% en la expresión de renina en el riñón y un importante incremento en la presión arterial. Además, los ratones KO PAT1 fallaron en desarrollar hipertensión cuando fueron sometidos a una dieta alta en fructuosa sin embargo desarrollaron hiperinsulinemia y regularon a la alza el GLUT 5 en el intestino delgado, ambos efectos bien conocidos inducidos por la exposición a fructuosa.

En contraste los ratones KO GLUT5 fallaron en la capacidad de absorber fructuosa resultando en un daño de la absorción de nutrientes e hipotensión severa con muerte después de 7 a 10 días [91].

Estos estudios sugieren que la hipertensión inducida por fructuosa es parcialmente generada por la absorción de sal incrementada en el intestino delgado. Este efecto puede tener un impacto principal en la presión arterial cuando la ingestión alta de sal es combinada con el consumo alto en fructosa [88, 89].

## LEUCOCITOS CIRCULANTES EN SINDROME METABOLICO.

Una característica del síndrome metabólico (SM) es el desarrollo de un estado de inflamación sistémica subclínica, en estos pacientes se ha documentado un aumento de proteína C reactiva (PCR), de la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM1), IL-6, MCP-1 y de E-selectina séricas [116].

Más recientemente también se ha observado que la cuenta de leucocitos circulantes está aumentada y que el número de estas células correlaciona con el número de componentes del SM que se manifiestan [117].

A este respecto, existe evidencia, a nivel de RNAm, que sugiere que los linfocitos, monocitos, macrófagos y células espumosas pueden expresar el transportador de fructosa GLUT5. Más aún, se ha reportado que los macrófagos transportan fructosa activamente, lo que sugiere que el metabolismo de este azúcar tiene algún papel fisiológico o patológico en estas células [118].

El ácido úrico tiene otros efectos proinflamatorios asociados con células inmunes, por ejemplo el AU activa el inflamosoma (NLRP3) en macrófagos, mismo que se ha encontrado asociado a resistencia a la insulina [119].

De igual manera el AU promueve la activación directa de células T así como de células dendríticas, y activa el reclutamiento de neutrófilos en sitios de daño y muerte celular [120].



Recientemente se reportó adicionalmente, que el AU es un sustrato fisiológico para la mieloperoxidasa de los neutrófilos produciéndose un radical urato que al adicionarse al superóxido origina un radical hidroperóxido, este radical probablemente exagera el daño tisular por inflamación. Otro efecto del urato sobre la mieloperoxidasa es que aumenta el consumo de ON por esta enzima, lo cual es un mecanismo adicional por el que el aumento de AU podría promover el desarrollo de disfunción endotelial e hipertensión arterial [121].

Un mecanismo pro-oxidante y proinflamatorio adicional observado en sujetos con SM, y que opera en las células mononucleares circulantes es el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa mediada por el aumento de la insulina circulante. En este trabajo se documentó que el aumento en la actividad de esta enzima en fagocitos correlacionó positivamente con el incremento de marcadores de estrés oxidante (oxidación de LDL's y nitrotirosina en plasma) así como con arterioesclerosis subclínica [122].

## ESTUDIOS EN HUMANOS

Diversos estudios clínicos y epidemiológicos tanto en adolescentes como en adultos, han reportado la asociación entre la ingesta de fructuosa e hipertensión [98, 99, 112, 113].

En una muestra representativa que incluyó a 4867 participantes entre 12 y 18 años de edad utilizando la cohorte de NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey por sus siglas en inglés) se demostró una asociación importante entre la ingesta excesiva de bebidas azucaradas y los niveles elevados de AU así como un efecto sobre el incremento en la TA. En este estudio se observó que la administración de fructosa pero no de glucosa ocasionó el incremento significativo de la TA [112].

Posteriormente estos efectos se demostraron en adultos de la misma cohorte (NHANES) entre el año 2003 a 2006, en donde se incluyeron 4528 adultos sin historia de hipertensión, con ingestas promedio de fructosa cuantificadas en 74 gr/día o mayores (2.5 bebidas azucaradas/día), se reportó que el consumo de fructosa se asoció significativamente a una elevación en la TA. Este consumo promedio incrementó el riesgo de hipertensión en un 26, 30 y 77% para TA > o igual a 135/75 mmHg, > o igual 140/90 mmHg y > 160/100 mmHg, respectivamente [98].

En un estudio clínico reciente, la administración de 200 g de fructuosa a hombres adultos jóvenes, resultó en incrementos importantes en la presión arterial sistólica y diastólica, estos efectos fueron prevenidos en gran parte mediante la administración de alopurinol [114].

Un estudio prospectivo evaluó el efecto de la reducción de bebidas endulzadas con azúcar sobre la presión arterial y demostró que reducir la ingesta de una bebida endulzada con azúcar por día, tenía un impacto importante en la disminución de la presión arterial entre adultos jóvenes, un efecto que fue independiente de la pérdida de peso [99].

Madero y cols evaluaron el efecto de una dieta baja en fructosa sobre los parámetros del SM. Tras un periodo de 6 semanas, en ambos grupos se observó una pérdida de peso significativa de  $2.94 \pm 2.18$  kg y  $4.07 \pm 2.39$  kg en los grupos de muy baja fructosa y fructosa moderada respectivamente, siendo también significativa la diferencia entre ellos. De igual forma, se observó en ambos una disminución en la TA sistólica y diastólica, colesterol total, triglicéridos, resistencia a la insulina y niveles de AU, sin diferencia entre los grupos en estas variables [115].

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Tiene efecto en la función mitocondrial y marcadores de estrés oxidativo en leucocitos periféricos, en individuos adultos con TA normal alta o prehipertensión y sobrepeso u obesidad, la administración de una dieta con restricción en sodio sin restricción de fructosa contra la administración de una dieta con restricción tanto sodio como de fructosa?

## JUSTIFICACION

Los estudios expuestos en el marco teórico apoyan la relación entre la ingesta de sodio y la de fructosa con la disfunción endotelial y el estrés oxidativo, esto abre la posibilidad de incidir sobre ellos con fines de prevención o tratamiento en poblaciones de riesgo. Hasta donde tenemos conocimiento, no existe ningún estudio aleatorizado en población adulta joven con SM que evalué el impacto de restringir fructosa y sodio (sin restricción calórica) sobre la función mitocondrial y los marcadores de estrés oxidativo.

Es sabido que las EROS tienen una vida muy corta, por lo que una alternativa para evidenciar la presencia de estrés oxidativo es medir los productos estables finales de las reacciones oxidativas, como los grupos carbonilo que se originan por la acción de las EROS sobre las proteínas, por lo que se realizaron determinaciones de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH).

También se determinó malondialdehído (MDA) como marcador de peroxidación lipídica con la intención de documentar la relación existente entre estrés oxidativo con la restricción de fructosa y sodio.

Por otro lado el hecho de determinar ADNmt con el propósito de cuantificar disfunción mitocondrial y poder correlacionar estos resultados con los reportados por estrés oxidativo, y a su vez integrar los mismos con las intervenciones propuestas (restricción de fructosa y restricción de sodio) constituye una oportunidad para establecer la repercusión del síndrome metabólico inducido por fructosa. Esto suena factible cuando se compara la necesidad de obtener tejido

hepático o grasa en pacientes para aislar el ADNmt en comparación con la determinación del mismo en células circulantes (leucocitos) eliminando el riesgo que implica para el paciente un procedimiento intervencionista.

## **HIPOTESIS**

Hipótesis alterna: En individuos adultos (edad de 18 a 60 años) con TA normal alta o prehipertensión (definida como TA sistólica entre 126-140 mmHg y diastólica entre 80-90 mmHg) y sobrepeso u obesidad (IMC mayor a 25 kg/m<sup>2</sup>), la administración de una dieta con restricción en fructosa y en sodio tendrá un efecto sobre la función mitocondrial (ADNmt) y marcadores de estrés oxidativo (MDA, DNPH) en células inmunes humanas circulantes.

## **OBJETIVOS**

### **Primario**

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

Este es un subestudio de un estudio aleatorizado de 100 pacientes con sobrepeso u obesidad con fines de evaluar estas dietas mas alopurinol sobre la hipertensión arterial.

### **Secundario**

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

## **TIPO DE ESTUDIO**

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



## **DESCRIPCION DE LA POBLACION**

### **Población objetivo**

Individuos adultos (de 18 a 60 años) de ambos géneros, con TA normal alta o pre hipertensión (sistólica entre 126 y 140 mmHg y diastólica entre 80 y 90 mmHg), con sobrepeso u obesidad (IMC mayor de 25 kg/m<sup>2</sup>) y consumo de fructosa no a expensas de frutas >70 g/día.

### **Población accesible**

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

### **Población elegible**

Sin morbilidad reconocida (HAS; diabetes mellitus; enfermedades renales, hepáticas, neurológicas, oncológicas y hematológicas, principalmente anemia o trastornos de la coagulación; así como tratamiento farmacológico de cualquier índole) y con escrutinio por laboratorio inicial sin alteración en perfil de función hepática, citopenias y con función renal estimada mayor a 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> SC.

## CRITERIOS DE INCLUSION, EXCLUSION Y ELIMINACION

### Criterios de inclusión

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

### Criterios de exclusión

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

### **Criterios de eliminación**

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

## VARIABLES

### **Independientes**

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

### **Dependientes**

1. Marcadores de estrés oxidativo: Proteínas carboniladas (2-4 dinitrofenilhidrazina, DNPH) y peroxidación lipídica (Malondialdehído, MDA)
2. Función mitocondrial (RCP-TR)

## MATERIAL Y METODOS

Posterior a la descripción de los procesos, objetivos, derechos, responsabilidades, potenciales riesgos y beneficios del protocolo, se solicita la firma de consentimiento informado como requisito indispensable para su ingreso (Se anexa formato de consentimiento informado, Anexo 1).

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

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

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

#### Descripción de planes de alimentación

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

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

realizados en cada visita programada cada 2 semanas, donde se valoró el apego a los alimentos y bebidas (dieta instaurada). Se consideró un apego aceptable el 80%, en función del cumplimiento de la dieta instaurada mediante la verificación de los diarios realizados por los pacientes en cada visita.

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

El peso corporal se medirá de forma instrumentada con báscula de piso previamente calibrada marca SECA, modelo 700. La estatura se midió con estadímetro SECA 220. La circunferencia de cintura y cadera se midió con una cinta antropométrica de fibra de vidrio marca Gulick por dos evaluadores mutuamente cegados; se colocó al paciente en bipedestación, tomando como referencia el punto medio entre el borde costal y la cresta ilíaca para la cintura, y la parte más ancha de la pelvis a nivel de la articulación coxofemoral para la cadera, determinadas en espiración profunda. La TA se midió en 3 ocasiones tras 10 min de reposo en posición sedente y 5min de intervalo entre cada medición, con esfigmomanómetro aneroide de pared marca WelchAllyn modelo Tycos con 2 medidas de brazalete adaptable dependiendo de la circunferencia de brazo. Las mediciones de TA continua ambulatoria (MAPA) se realizan a través del monitor BTL08ABPM. Las evaluaciones y tomas de muestras de sangre y orina se

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

Las muestras para mediciones de MDA se colectaron en tubos con EDTA como anticoagulante, se centrifugaron 500 microlitros de sangre total a 2500 revoluciones por 10 minutos a 4 grados C. Se utilizaron 200 microlitros para medición por técnica colorimétrica mediante el kit de ensayo de peroxidación lipídica de CALBIOCHEM.

Para la cuantificación de proteínas carboniladas (DNPH), se incubaron 300 microlitros de la muestra con 100 microlitros de estreptomina al 10%, se centrifugaron a 20000 revoluciones a 4 grados C por 40 minutos. Posterior a realizar adiciones de DNPH, HCl, TCA, en tres tiempos distintos con centrifugación a 2236 revoluciones a 4 grados C y desechos subsecuentes del sobrenadante, se realizó la lectura de la absorbencia de DNPH y se calculó el contenido de carbonilos usando el coeficiente de absorción.

Para realizar el análisis del ADNmt, se colectaron 7 ml de sangre de cada individuo en las fases de reclutamiento, primera y segunda intervención, en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. La extracción del ADN total, se realizó mediante el método de saltingout [92].

La evaluación del mismo fue por Reacción en Cadena de Polimerasa en tiempo real (PCR-TR). Para el análisis del ADN mitocondrial (ADNmt) se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores mtF3212 (5' CACCCAAGAACAGGGTTTGT 3') y mtR3319 (5' TGGCCATGGGTATGTTGTTAA3') y la sonda TaqMan 6FAM-



5'TTACCGGGCTCTGCCATCT 3' (Applied Biosystems). Como control endógeno se utilizaron oligonucleótidos iniciadores para el gen *18sRNAr* (subunidad 18s del ARN ribosomal) como parámetro de la medición del ADN nuclear, con una sonda Taqman marcada con el reportero fluorescente VIC (Applied Biosystems). La reacción de RCP-TR se llevó a cabo por triplicado, con una solución Master Mix Universal TaqMan 1X, 500 nanomoles (nM) de cada oligonucleótido iniciador, 200 nM de cada sonda TaqMan y 40 ng de ADN genómico total para cada muestra.

El análisis cuantitativo por Tiempo Real se realizó con el software Sequence Detector System ABI-Prism 7700. Se utilizaron diluciones 1:2 del ADN genómico con una concentración de 160 ng/ml a 10 ng/ml para construir una Curva Estándar con los valores  $C_T$  (Cycle Treshold) arrojados por la amplificación de los productos de RCP (Figura 4 y 5). Se obtuvieron las curvas de amplificación para cada muestra y el valor de  $C_T$  se usó para hacer las comparaciones entre el ADNmt y el control endógeno *18sRNAr*. Posteriormente se obtuvo nuevamente el radio de la cantidad de ADNmt mediante el cociente  $C_{TADNmt}/C_{T18sARNr}$ . La cantidad de ADNmt resultó restando el valor de  $C_{TADNmt}$  menos el  $C_{T18sARNr}$  (método  $\Delta C_T$ ).

Se obtuvo además el *18sRNAr* y el ADNmt de 10 personas sanas para obtener un  $\Delta CT$  promedio para poderse usar como grupo control y así poder estimar mediante formulas matemáticas el número de copias del ADN mt. Una vez obtenido el  $\Delta CT$  se procedió a restar el  $\Delta CT$  del grupo control con lo que se obtuvo el dDCt. Una vez que obtuvimos este número se elevó a la segunda potencia ( $2^{-dDCt}$ ) con lo que pudimos obtener el número de copias del ADNmt.

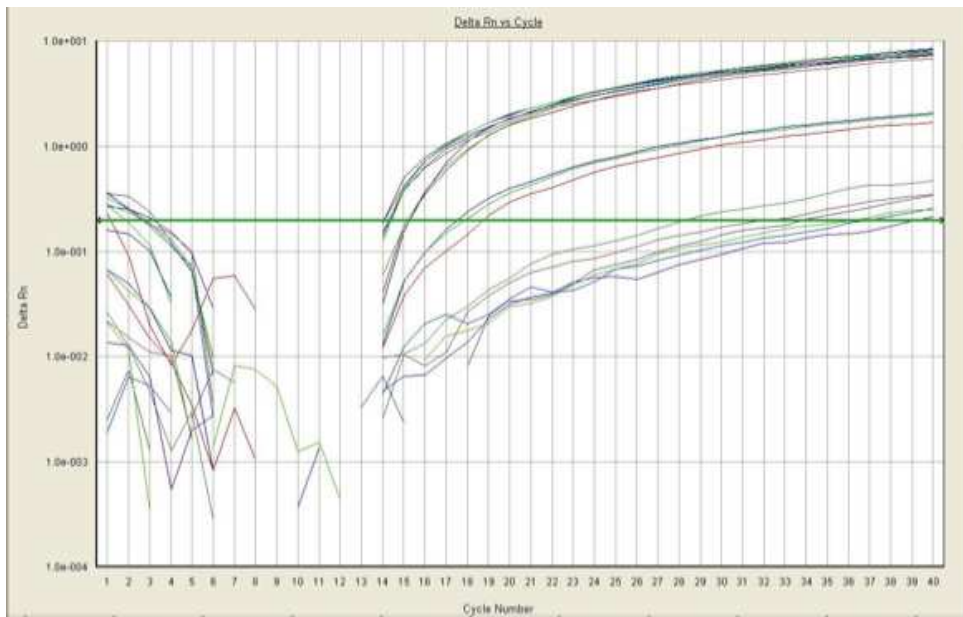


Figura 4. Representación esquemática de la curva de amplificación de un individuo con diferentes  $C_T$  para cada tratamiento.

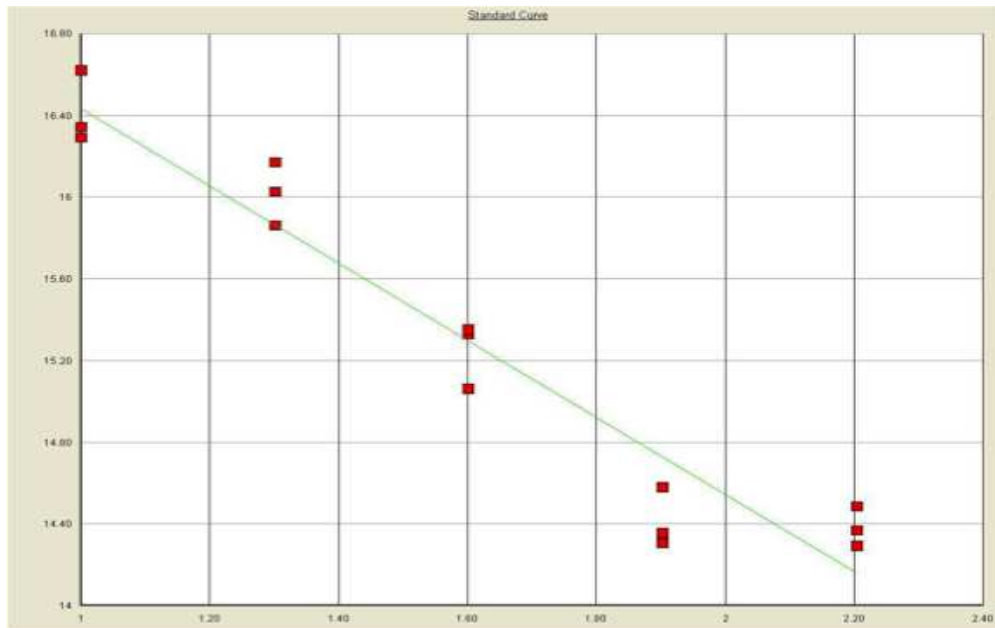


Figura 5. Representación esquemática que ejemplifica la curva estándar que ajusta la concentración de ADN a utilizar para el análisis del ADNmt.

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

## ANALISIS ESTADISTICO

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

## RESULTADOS

Se incluyeron en el estudio un total de 36 pacientes y en donde de manera aleatorizada 15 fueron asignados al grupo con restricción en fructosa y sodio dejando los 21 restantes al grupo con restricción de sodio pero sin restricción de fructosa. Una vez asignados los individuos a su correspondiente grupo de intervención se determinaron las características basales (Tabla 1).

El grupo con restricción de fructosa incluyó individuos de menor edad en comparación con el grupo de dieta hiposódica sin restricción de fructosa ( $44.6 \pm 8.9$  vs  $49.7 \pm 7.9$ ) aunque sin diferencia significativa. El grupo con restricción de fructosa incluyó individuos con mayor IMC, mayor circunferencia de cintura y de cadera en comparación con el grupo contrario pero sin diferencia significativa. El grupo con restricción de fructosa incluyó individuos con mayor peso en comparación con el grupo de dieta hiposódica sin restricción de fructosa ( $92.8 \pm 15.5$  vs  $86.9 \pm 15.7$ ) aunque sin diferencia significativa.

En cuanto a los parámetros de laboratorio se evidenció una diferencia en cuanto a mayores niveles de todos los parámetros evaluados (triglicéridos, colesterol, ácido úrico y glucosa) en el grupo con restricción de fructosa en comparación con el grupo de dieta hiposódica sin restricción de fructosa; sin embargo esto no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=NS$ ).

Cuando se realizaron las mediciones de TA por MAPA se reportan en la tabla los promedios de las cifras sistólicas y las cifras diastólicas globales (periodo de 24 horas). En estas determinaciones al momento del inicio no se documentaron diferencias entre los grupos.

El grupo con restricción de fructosa presento mayores niveles de DNPH (indicador de estrés oxidativo) en comparación con el grupo de solo restricción en sodio ( $5.8 \pm 2.2$  vs  $4.6 \pm 2.2$ ) aunque sin diferencia significativa. Con respecto a los niveles de MDA tampoco fueron evidentes cambios significativos. El grupo con restricción de fructosa presento menores niveles de ADNmt (indicador de función mitocondrial) en comparación con el grupo de solo restricción en sodio ( $1.9 \pm 4.3$  vs  $2.4 \pm 6$ ) aunque sin diferencia significativa.

En la semana 4 de seguimiento (Tabla 1), se realizaron las mismas determinaciones y comparaciones entre los parámetros de ambos grupos y presentaron un comportamiento similar al momento basal sin diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. Sin embargo, al hacer el análisis intragrupo el grupo de dieta hiposódica y con restricción de fructosa presento disminución en el IMC con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Importante destacar que al hacer el análisis intragrupo en cuanto a estrés oxidativo el grupo de dieta hiposódica sin restricción de fructosa presento disminución en los niveles de DNPH con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En cuanto a la evaluación de la función mitocondrial el análisis intragrupo demostró incremento en los niveles de ADNmt que resulto estadísticamente significativo para ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

En la semana 4 se inició una segunda intervención de manera aleatorizada para los individuos de ambos grupos consistente en la administración de alopurinol o placebo. De tal manera que en el grupo de restricción de fructosa, a 7 pacientes les fue administrado alopurinol y a 8 más placebo. En el grupo con restricción de sodio pero sin restricción de fructosa fueron asignados aleatorizadamente de la siguiente manera: 13 a administración de alopurinol y 8 a placebo.

Cuando se corrió el análisis para esta intervención (alopurinol vs placebo), la variabilidad entre grupo y en la totalidad de los individuos, no se evidenciaron diferencias significativas. Al no contar con un poder estadístico al analizar tantos grupos y al no encontrar diferencias significativas se decidió realizar el análisis a únicamente 2 grupos: el de restricción de sodio sin fructosa y el de restricción de sodio con restricción de fructosa.

Al final del seguimiento (Tabla 1), se realizaron las mismas determinaciones y comparaciones entre los parámetros de ambos grupos y continuaron con un comportamiento similar al momento basal sin diferencias significativas en todos los parámetros evaluados. La pérdida de peso no fue alcanzada en ningún grupo. Sin embargo, hubo una tendencia a menores niveles de colesterol y de triglicéridos en los 2 grupos, esto sin tener una significancia estadística ( $p=NS$ ). Nuevamente al realizar el análisis intragrupo el grupo de dieta hiposódica sin restricción de fructosa presentó disminución en los niveles de glucosa con una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ). Los niveles de ácido úrico disminuyeron importantemente en el análisis intragrupo de ambos grupos logrando significancia estadística ( $p<0.05$ ); esto se debe principalmente a que en estos momentos se encontraban bajo el efecto del alopurinol. Además, hubo una tendencia a menores niveles de TAS y TAD globales en los 2 grupos, esto sin tener una significancia estadística ( $p=NS$ ) (Figura 6, 7). No hubo diferencias significativas intragrupo en cuanto a niveles de MDA [figura 8]. En cuanto a estrés oxidativo los 2 grupos al realizarse el análisis intragrupo presentaron disminución en los niveles de DNPH con una diferencia estadísticamente significativa ( $p<0.05$ ) [figura 9, 10]. En cuanto a la evaluación de la función mitocondrial el análisis intragrupo nuevamente demostró incremento en los niveles de ADNmt que resultó estadísticamente significativo para ambos grupos ( $p<0.05$ ); el grupo de dieta hiposódica con

restricción de fructosa presento niveles mayores de ADNmt en comparación con el grupo de dieta hiposódica pero esto no fue estadísticamente significativo [figura 11, 12].

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

	Basales		Semana 4		Semana 8	
<b>Somatometría</b>	Bajo en sodio	Bajo en sodio-fructosa	Bajo en sodio	Bajo en sodio-fructosa	Bajo en sodio	Bajo en sodio-fructosa
Edad (años)	49.7±7.9	44.6±8.9				
Talla (cm)	1.63±.11	1.68±.09				
Peso (kg)	86.9±15.7	92.8±15.5	86.6±16.1	91.7±16	86.5±16.3	91.7±15.4
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32.2±3.6	32.7±3.7	34.6±11.09	32.4±3.8	32±3.7	32.4±3.7
Cadera (cm)	108.8±8	111.5±8.3	108.6±7.6	111.1±7.7	108.5±7.7	110.4±8.3
Cintura (cm)	103.5±10.6	105.5±12.5	104.7±10.6	104±11.9	103.3±10.2	104.1±11.7
<b>Parámetros de laboratorio</b>						
Colesterol (mg/dl)	185.5±37	199.7±40.8	183.5±39.4	187±40.8	179.2±40.3	187.1±35.2
Glucosa (mg/dl)	92.8±8.5	94.9±14.2	92.3±9.8	92.2±9	96.1±7.4 <b>b</b>	95±7.3
Triglicéridos (mg/dl)	166.7±81.8	186.2±112.5	168.3±79.1	148±69.8	177.4±90.8	152.6±60.8
Acido Úrico (mg/dl)	6.2±1.3	6.3±1.7	6.1±1.4	6.2±1.8	5.1±0.9 <b>c</b>	5±2.12 <b>i</b>
<b>MAPA (mmHg)</b>						
Global sistólico	136.8±10.8	134.7±12.5	134.2±14	132.5±14.2	131.3±11.2	128±9.6
Global Diastólico	79.9±8.5	78.2±7.9	79.2±11	77.7±8	77.8±10.3	75±7.2
<b>Estrés oxidativo</b>						
MDA (nmol)	2.2±2.3	1.9±2	1.8±1.7	1.1±1.3	1.4±1.8	2±2.6
DNPH (nmol)	4.6±2.2	5.8±2.2	3.4±1.7 <b>d</b>	4.8±3.1	2.6±0.88 <b>e</b>	2.2±1.9 <b>j</b>
<b>Función mitocondrial</b>						
ADNmt (Copias x 10 <sup>3</sup> )	2.4±6	1.9±4.3	3.7±6.7 <b>f</b>	1±0.6 <b>a</b>	13.1±25 <b>g</b>	147.2±421.7 <b>k</b>

Valores expresados como promedio ± DS

a = p<0.05 grupo 1 vs 2

b = p<0.05 semana 8 vs semana 4 (Grupo 1)

c = p<0.05 semana 8 vs semana 4 (Grupo 1)

d = p<0.05 semana 4 vs basal (Grupo 1)

e = p<0.05 semana 8 vs semana 4 (Grupo 1)

f = p<0.05 semana 4 vs basal (Grupo 1)

g = p<0.05 semana 8 vs semana 4 (Grupo 1)

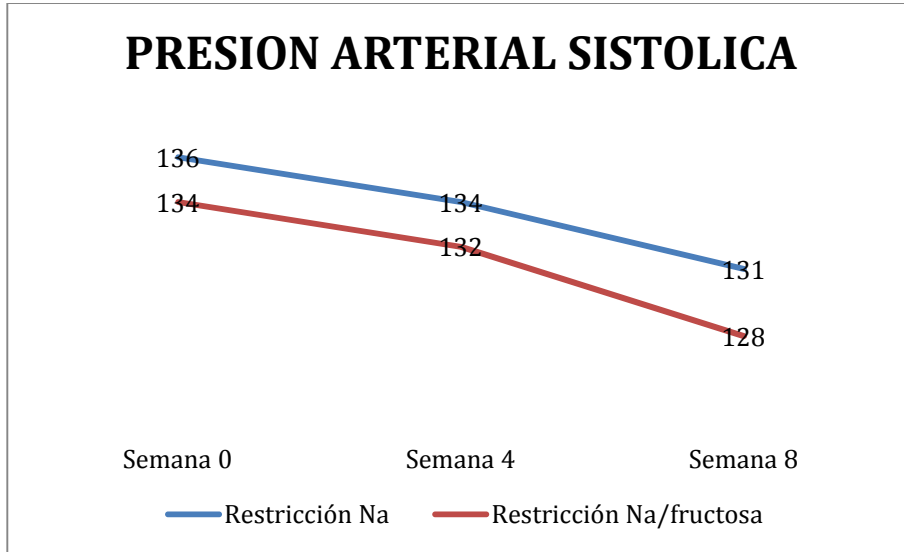
h = p<0.05 semana 4 vs basal (Grupo 2)

i = p<0.05 semana 8 vs semana 4 (Grupo 2)

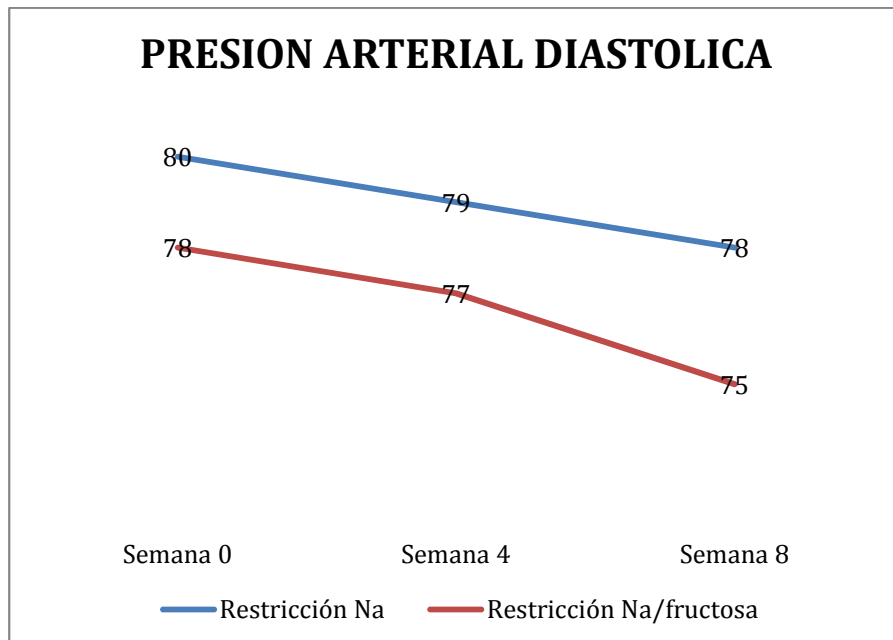
j = p<0.05 semana 8 vs semana 4 (Grupo 2)

k = p<0.05 semana 8 vs semana 4 (Grupo 2)





*Figura 6.*



*Figura 7.*

Medias marginales estimadas de MDA

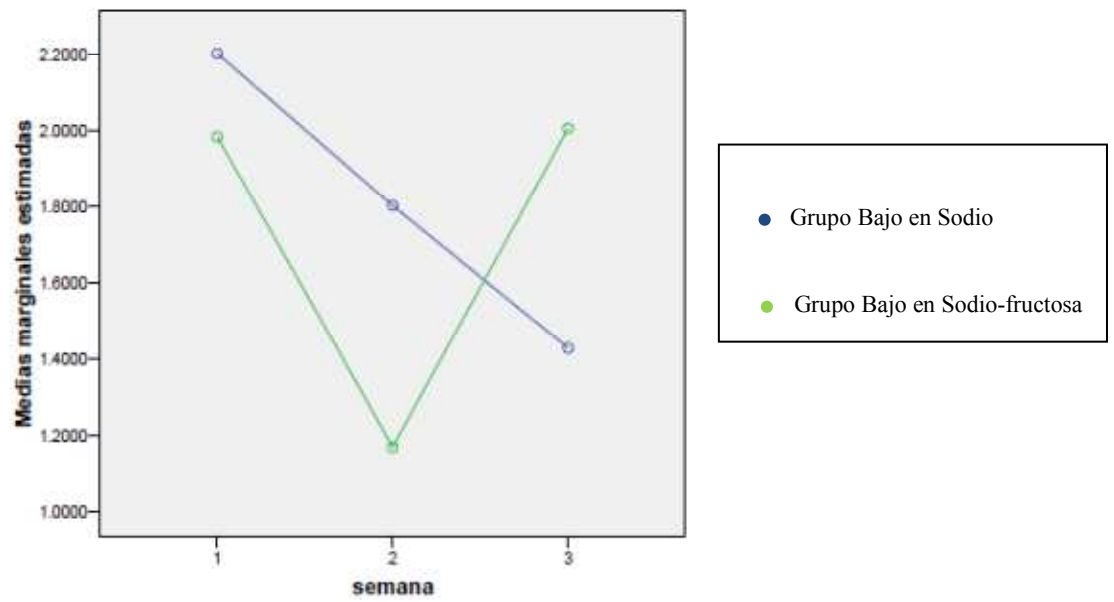


Figura 8.

Medias marginales estimadas de DNPH

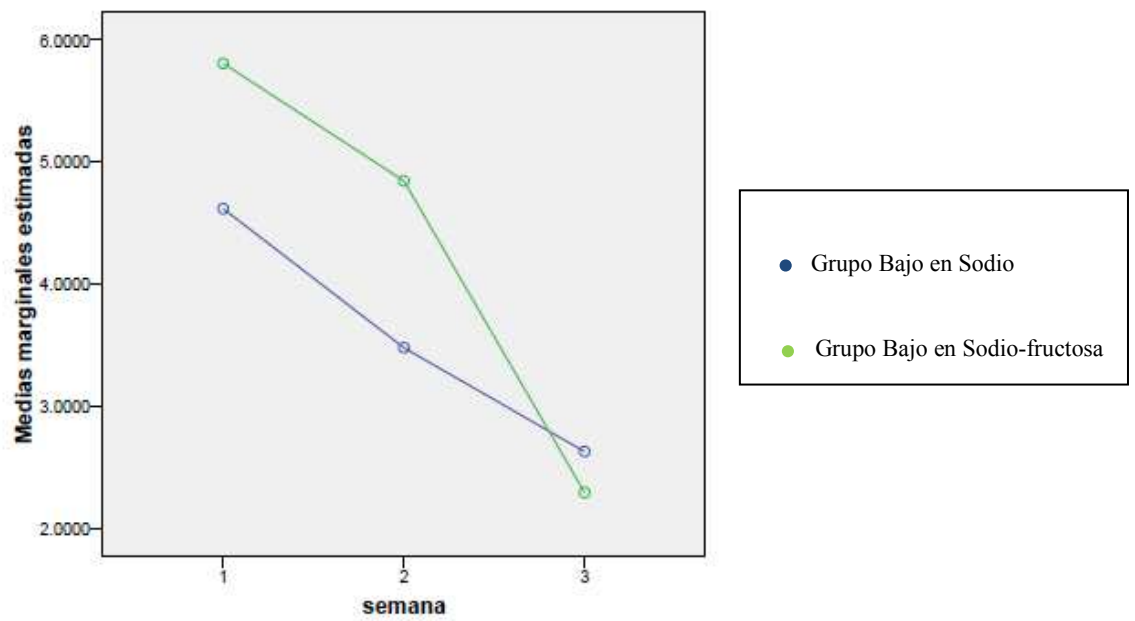
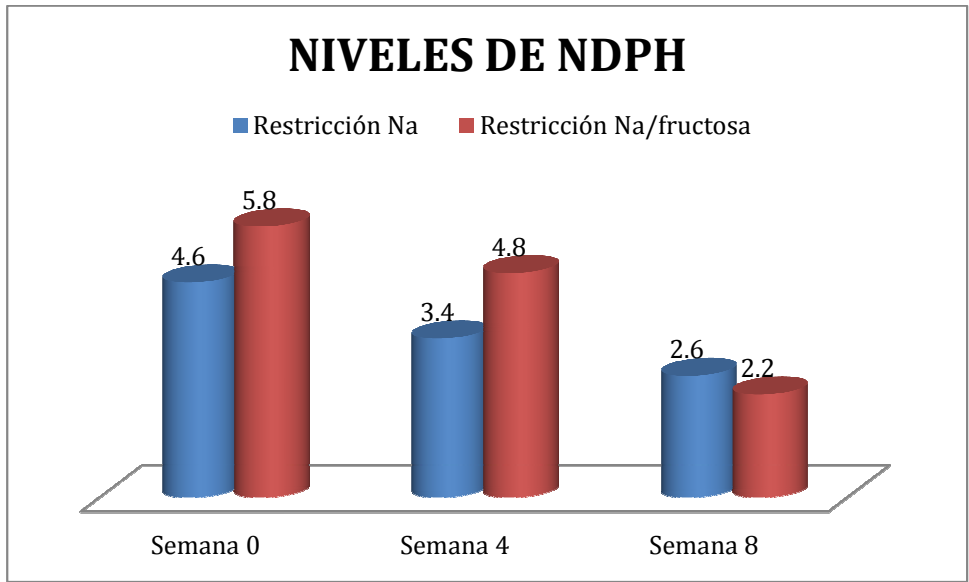
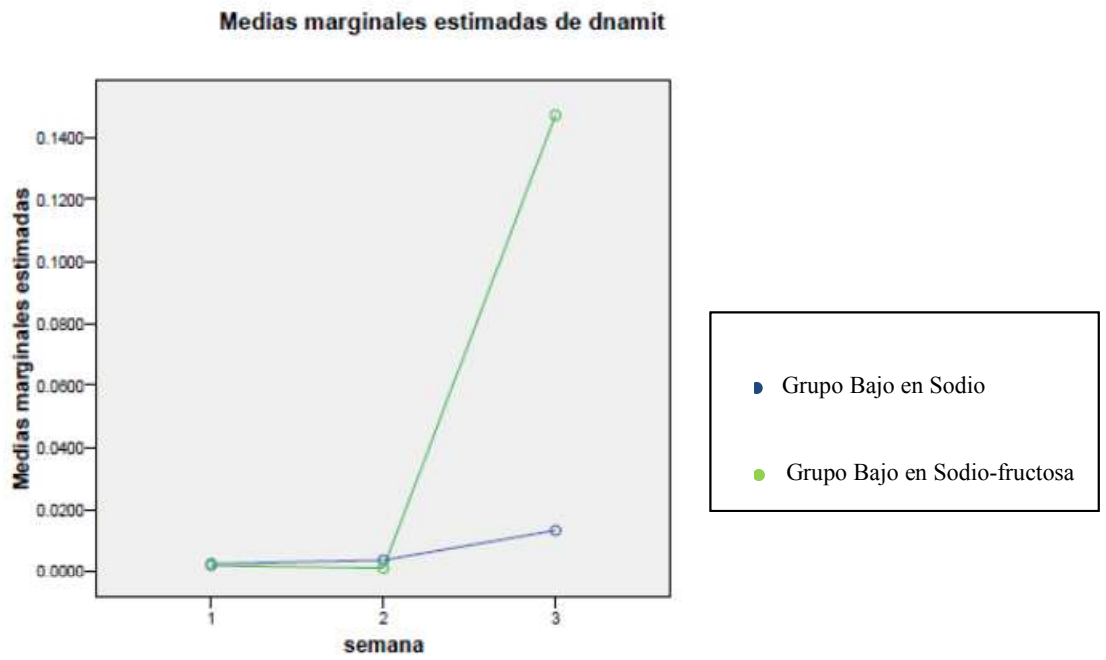


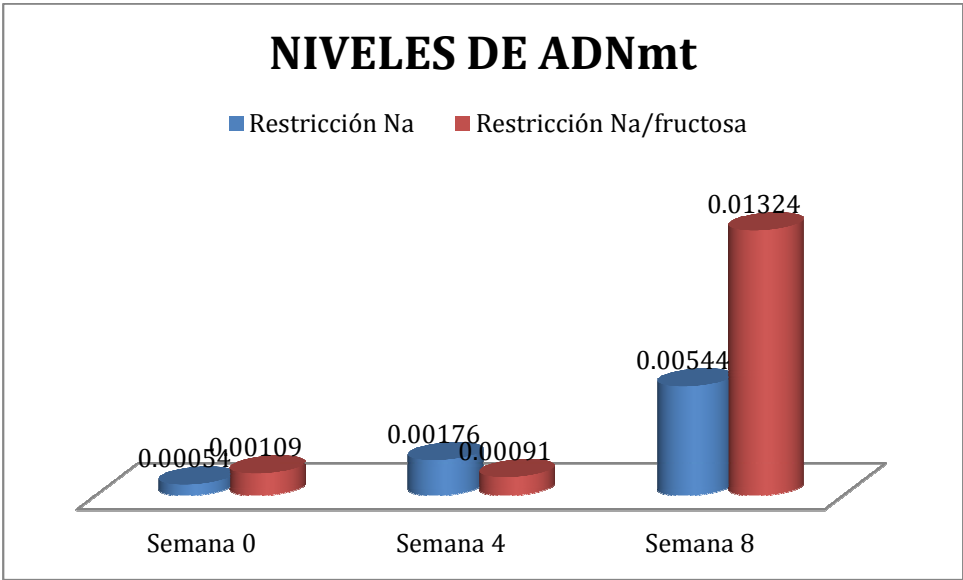
Figura 9.



**Figura 10.**



**Figura 11.**



**Figura 12.**

## DISCUSION

En este estudio piloto aleatorizado y doble ciego, se encontró que tanto la restricción de sodio y fructosa así como la restricción de sodio estuvieron asociados con un incremento en el ADNmt además de condicionar una tendencia en la reducción del estrés oxidativo en células inmunes circulantes. Importante mencionar que hasta donde tenemos conocimiento este es el primer estudio que evalúa el impacto de una manipulación dietética sobre el ADNmt y el estrés oxidativo.

Por otro lado, pudimos observar que ambas intervenciones dietéticas fueron igualmente efectivas para provocar una reducción en la TA pero no se encontró con una diferencia estadísticamente significativa al terminar el estudio, probablemente debido a la falta de poder estadístico ya que el estudio original con objetivo primario de reducción de TA se encuentra diseñado para incluir a 100 pacientes.

Con respecto al ADNmt, se ha descrito una asociación en la disminución del mismo con entidades que cursan con inflamación persistente. Recientemente el Dr. Chia Te-Kung y cols evaluaron niveles tanto de ADN nuclear y ADNmt mediante RCP en tiempo real para determinar su valor pronóstico en pacientes con sepsis severa. Fueron evaluados 65 pacientes con sepsis severa y 33 pacientes como grupo control. Los niveles tanto de ADN nuclear como de ADNmt fueron significativamente mayores que aquellos del grupo control, además los niveles correlacionaron también con el nivel de lactato en el momento de la admisión (ADN nuclear  $p=0.03$  y ADN mt  $p=0.01$ ). El ADN nuclear y el ADNmt fueron predictores independientes de

mortalidad, concluyendo que ambos podrían tener utilidad en el momento de la evaluación inicial del paciente grave en el departamento de urgencias [93]. Este papel del ADN nuclear ya había sido evaluado por el Dr. Rhodes llegando a las mismas conclusiones [94].

Sin embargo también hay estudios que no aportan estos resultados, tal es el caso del estudio del Dr. Puskarich el cual realizó un estudio observacional prospectivo en el que midió niveles plasmáticos de ADNmt mediante RCP en tiempo real, los cuales fueron comparados en un análisis de regresión lineal para evaluar su asociación en los pacientes con sepsis. Se evaluaron 93 pacientes: 24 controles, 29 con sepsis y 40 con choque séptico. Ellos no encontraron diferencia en los niveles de ADNmt entre los 3 grupos ( $p=0.14-0.30$ ); por lo que concluyeron que los niveles de ADNmt no tuvieron significancia estadística con disfunción orgánica, sugiriendo que los niveles de ADNmt no contribuyen de manera importante en la fisiopatología de la sepsis [95].

Con respecto a ADNmt y obesidad se han demostrado asociaciones en la disminución del mismo teniendo a la obesidad como una entidad causante de inflamación, esto fue reportado por Gianotti, se trató de una cohorte de 175 adolescentes en los que calculó el índice HOMA, los dividió en resistentes y no resistentes a la insulina, y a los cuales se les determinó ADNmt y ADN nuclear (ADNn) por RCP en tiempo real, logró demostrar que la relación entre ADNmt/ADNn se encontraba significativamente disminuida en el grupo con resistencia a la insulina. De igual manera correlacionó negativamente con el índice HOMA ( $R:-0.18$ ,  $p<0.03$ ),

glucosa (R:-0.21,  $p<0.008$ ) y con AU (R:-0.18,  $p<0.03$ ) [111]. Sin embargo tanto en este estudio como en otros solo esta descrito el contenido de ADNmt basal y nunca se han realizado estudios que mediante una manipulación se observe un incremento en el mismo, como lo reportado en nuestro estudio.

Nuestro estudio piloto logró documentar que al momento de determinar el ADNmt (número de copias) basal y durante el periodo de seguimiento, se observó un aumento en el número de las copias del ADN basal de cada paciente con su mismo ADN obtenido a las 4 semanas ( $p<0.03$ ) y a las 8 semanas ( $p<0.01$ ).

De esta manera, este hallazgo parece tener relevancia, ya que independientemente de las intervenciones instauradas se documentó un incremento en la ADNmt en cantidad.

Un hallazgo interesante de nuestro estudio fue que una dieta baja en sodio también fue capaz de incrementar los niveles de ADNmt; en nuestra hipótesis original se pensó que la dieta de restricción concomitante de sodio y fructosa sería superior a la de restricción únicamente de sal, esto se pudo demostrar en cuanto a niveles medidos tal y como se ve en la figura 11 y 12, sin embargo esto no alcanzo un valor estadísticamente significativo.

Hemos revisado la estrecha relación entre el oxido nítrico y la función mitocondrial (59, 60), el efecto dañino de la ingesta alta en sal en cuanto a la disfunción mitocondrial depende de tanto la función endotelial como de la regulación hemodinámica por el ON. Los trastornos circulatorios

inducidos por la sal tales como hipertensión resultan de: a) activación de eNOS reducida vía daño de la fosforilación de eNOS y la inhibición de la estimulación mecanoreceptora debida a rigidez endotelial; b) expresión disminuida de la proteína eNOS y de la actividad de eNOS; c) activación mitigada de la isoforma NOS en asociación con producción incrementada de niveles de AMDA; d) degradación acelerada del ON vía generación del anión superoxido a través de NADH oxidasa y; e) deficiencia de SOD [110].

El alimentar con fructosa a las ratas se ha relacionado con un incremento en el estrés oxidativo; esto se ve reflejado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que juegan un rol clave en las anormalidades cardiovasculares asociadas con la resistencia a la insulina. Hay evidencia de que el tratamiento con antioxidantes, tales como vitamina E, mejora la resistencia a la insulina en ratas alimentadas con fructosa, mientras el daño oxidativo es debido a un defecto en el mecanismo de defensa antioxidante y a la producción de radicales libres incrementados. Hay una elevación en la peroxidación lipídica cuando se evaluó por el incremento en niveles plasmáticos de MDA y disminución en los niveles de glutatión (GSH). El exceso del radical superoxido ( $O_2^-$ ) está producido en la vasculatura de las ratas con resistencia a la insulina las cuales a su vez pueden degradar oxido nítrico e incrementar la generación de otras especies reactivas de oxígeno las cuales son responsables de la peroxidación lipídica y por lo tanto del daño vascular.

El Dr. Korandji y cols han reportado que el nivel de dimetilarginina asimétrica (AMDA por sus siglas en ingles), un modulador endógeno de función endotelial y estrés oxidativo, es alto en ratas alimentadas con fructosa. Este incremento en AMDA es posible debido al estrés oxidativo



incrementado y la hipertensión asociada en este modelo. Por lo tanto, el estrés oxidativo debido a la alimentación con fructosa está asociado con mayores niveles de peroxidación lipídica y otras sustancias reactivas en la presencia de un sistema antioxidante defectuoso [96].

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

En individuos obesos, el tejido adiposo contiene más macrófagos que los encontrados en individuos delgados y los macrófagos parecen ser activados. Los adipocitos y los macrófagos producen leptina y otros factores, los cuales regulan a la alza el número de moléculas de adhesión sobre las células endoteliales. Esto conduce a la trans migración de monocitos y a un incremento en el número de macrófagos residentes en el tejido adiposo. Consecuentemente, las citocinas son liberadas en grandes cantidades desde el tejido adiposo. El exceso en la ingesta de energía conduce a obesidad e hiperglucemia, la cual puede causar estrés oxidativo y cambios inflamatorios, incluyendo la activación del FN- $\kappa$ B y niveles incrementados de FNT- $\alpha$  e interleucina-6. Estos cambios inflamatorios inhiben la señalización de la insulina y pueden

conducir a resistencia a la insulina [97].

La Dra Jalal y cols reportaron que las cantidades incrementadas de fructosa en la dieta, ya sea en los alimentos que comemos o en bebidas endulzadas con azúcar, se asocian con niveles más altos de presión arterial en los adultos sin historia de hipertensión arterial. Ellos notaron que la ingesta de fructosa >74 g/día se asociaba con un riesgo mayor de 30% de tener una TA de 140/90. Esta ingesta de fructosa en la dieta correspondía a un equivalente de aproximadamente 2 ½ bebidas azucaradas cada día. Lo anterior confirmó la estrecha relación entre fructosa y presión arterial [98].

El Dr. Chen y cols realizaron un análisis prospectivo de 810 adultos durante un seguimiento de 18 meses, al inicio del estudio la media de la ingesta de bebidas endulzadas con azúcar era de 1 gr/día. Ellos demostraron que una reducción en sólo una bebida endulzada con azúcar por día se asoció con una reducción de 1.8/1.1 mmHg de TA a los 18 meses, incluso después del ajuste de cambio de peso durante el mismo período [99]. Existen datos reportados en el estudio de salud de enfermeras los cuales indicaron una fuerte asociación positiva entre la ingesta de bebidas de cola y el riesgo de hipertensión arterial [100]. En nuestro estudio no se reportaron diferencias estadísticamente significativas en los promedios de TA medidos por MAPA entre grupos, pero si fue evidente una tendencia hacia la disminución en los valores de TAS y TAD. Tampoco evidenciamos un efecto potenciador estadísticamente significativo en la disminución de las medias de TA, ante la administración de alopurinol. Nuestros resultados si bien no van acorde

con lo establecido en la evidencia hasta el momento; quizás un tiempo mayor en el seguimiento de nuestros pacientes evidenciaría un cambio mayor en las cifras de TA. La disminución observada en los promedios de TA se podrían explicar en lo ya sustentado en relación a el aumento en el ADNmt, así como el tipo de dieta hiposódica.

El estudio multicéntrico Intersalt incluyó pacientes normotensos e hipertensos, se llevó a cabo en 52 países. Este estudio mostró que la ingesta de sodio en la dieta (100 mEq/día) estaba asociada con diferencias en la presión sistólica de aproximadamente 2.2 mmHg aún después de ser ajustado para edad, género, excreción de potasio, IMC e ingesta de alcohol [101]. Meta análisis de estudios de intervención con restricción de sal mostraron reducciones en TAS (3.7 a 7 mmHg) y en TAD (0.9 a 2.5 mmHg) en pacientes hipertensos [102, 103].

La respuesta de la TA a la restricción de sodio es directa y progresiva, pero no lineal; disminuir la ingesta de sodio cerca de 0.9 g/día causa una mayor reducción en la TA cuando la ingesta de sodio al inicio es cerca de 2.3 g/día en comparación de cuando la ingesta es de 3.5 g/día [104, 105]. Sin embargo, algunos investigadores creen que la participación de la sal en la hipertensión es por mucho más compleja que lo ya reportado en estudios previos y han llegado a la conclusión de que la sobrecarga de sal conduce a cambios estructurales y funcionales negativos a largo plazo observados en órganos blanco, a pesar de su efecto en la TA [106].

Esto es aplicable a lo demostrado en nuestro estudio, teniendo en cuenta el hecho de los beneficios ya explicados de la dieta hiposódica y/o en combinación con la restricción de fructosa, con la disminución a su vez del estrés oxidativo e incremento en los niveles de ADNmt.

Otra posible explicación del porque la dieta hiposódica mejora los niveles de ADNmt y disminuye a su vez el estrés oxidativo es que la dieta alta en sodio favorece la secreción de copeptina.

La copeptina, es un glucopeptido de 39 aminoácidos, es la parte C-terminal de la pro-hormona arginina vasopresina (hormona antidiurética, ADH por sus siglas en ingles), la cual tiene efectos hemodinámicos y osmoreguladores y refleja la respuesta individual al estrés. Los niveles de copeptina correlacionan con los niveles de ADH en plasma [123].

Ehnhörning y cols [124] demostraron que un aumento en la concentración de copeptina estaba asociado con resistencia a la insulina y que esto predecía el desarrollo futuro de diabetes mellitus; la hiperinsulinemia es un factor trascendental para el desarrollo de síndrome metabólico. Como hemos revisado la resistencia a la insulina favorece además la disminución de eNOS.

Ensayos previos indican varios enlaces entre el sistema ADH y los componentes del síndrome metabólico. Una asociación mediante un estudio transversal fue encontrada entre los niveles plasmáticos de copeptina y síndrome metabólico, circunferencia de cadera, TA sistólica, diabetes mellitus e hipertrigliceridemia aun después de ajustar a IMC [125].

Datos de estudios en animales y humanos han sugerido la participación del sistema ADH y en el metabolismo de las grasas. La ADH estimula la producción de triglicéridos en hepatocitos de las ratas [126].

Los mecanismos por los cuales la fructosa provoca incremento en el peso y por consiguiente el riesgo de obesidad, son: no estimular la producción de leptina ni la liberación de insulina y por lo tanto no dispara respuestas de saciedad normal [107]. Además puede inducir resistencia a la acción de la leptina, la cual es clave para la regulación del metabolismo energético; lo cual conduce a ingesta de comida incrementada y al desarrollo de obesidad visceral [108]. Interesantemente, las ratas con dietas altas en fructosa pueden no mostrar incremento en el peso corporal total a menos que se encuentre asociado con un consumo de grasas alto en la dieta [109].

Lo anterior también se ve expuesto en el meta-análisis reportado este mismo año [71] donde se documenta que la fructosa por sí misma no causa ganancia de peso, sino que es el aumento en la ingesta de calorías lo que hace que el paciente gane peso. Nuestros resultados no evidenciaron cambios significativos en cuanto al peso al final del seguimiento entre grupos.

Uno de los puntos importantes de nuestro estudio fue que las determinaciones de ADNmt y estrés oxidativo fueron realizadas en linfocitos periféricos sin necesidad de realizar procedimientos invasivos en los pacientes.

Así, el hecho de tomar células de sangre periférica, ha estimulado a los grupos de investigación para poder realizar pruebas de escrutinio sin necesidad de realizar procedimientos de intervención para toma de tejido hepático o adiposo y resaltando la utilidad de realizar distintas determinaciones en células circulantes, constituyéndose como potencial marcador del síndrome metabólico, de fácil obtención, no invasivo con implicaciones diagnósticas y pronósticas.

Las fortalezas de nuestro estudio incluyen, ser parte de un ensayo clínico aleatorizado mayor en donde se pretende incluir a 100 pacientes siendo el desenlace mayor la disminución de la TA a expensas de la restricción de fructosa y sodio, así como la administración de alopurinol como maniobra de intervención, reportar nuestros hallazgos contribuye a establecer la relación existente entre el comportamiento del ADNmt y las moléculas de estrés oxidativo con las dietas tanto hiposódicas como restringidas en fructosa.

Tiene la ventaja sobre otros ensayos, de ser aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, en donde la población no presentó restricción calórica en las dietas establecidas y las determinaciones de TA fueron realizadas mediante monitoreo ambulatorio de la presión arterial, el estándar de oro de medición de TA.

Constituye el primer estudio que evalúa el impacto de una manipulación dietética sobre el ADNmt y estrés oxidativo, en donde surge la posibilidad de continuar esta línea de investigación derivado de que la determinación del estrés oxidativo fue realizada en células circulantes brindando el beneficio de un método práctico, fácil y no intervencionista en comparación con la realización de biopsia de tejido hepático o muscular para la obtención de tejido analizable.

Una limitación de nuestro estudio es el no haber realizado determinación de ADN nuclear (ADNn), como se ha hecho en diversos estudios, impidiendo la cuantificación de la proporción de ADNmt vs ADNn siendo este otro parámetro a evaluar en cuanto al estado oxidativo celular. No se valoró también en nuestro estudio la excreción de sodio en la orina como marcador de

apego a la dieta hiposodica.

Sin embargo el hecho de que se pueda continuar con la determinación de ADNmt y estrés oxidativo mediante leucocitos circulantes en población abierta, abre la posibilidad para establecer la relación entre ADNmt, síndrome metabólico y estrés oxidativo con fines diagnósticos y con potencial implicación pronostica identificando poblaciones de riesgo.

## CONCLUSIONES

En este estudio en estudio nuestros pacientes con HAS y SM, tanto una dieta baja en sodio como la restricción de fructosa y sodio se asociaron con un incremento en el ADNmt, así como una disminución del estrés oxidativo en células inmunes humanas. Estos efectos son independientes de la pérdida de peso. Asimismo se observó una disminución de la TA en ambos grupos sin tener significancia estadística.



## ANEXO 1

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

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

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

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

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

Paciente:

\_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_

Testigos

\_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_

Médico Responsable:

\_\_\_\_\_  
Firma \_\_\_\_\_

## BIBLIOGRAFIA

1. Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, MacGregor GA. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev.* 2005; 85:679 – 715.
2. Adroge HJ, Madias NE. Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med.* 2007; 356: 1966 – 78.
3. Funder JW. Mineralocorticoid receptors and cardiovascular damage: it's not just aldosterone. *Hypertension.* 2006; 47: 634 – 5.
4. He FJ, Marciniak M, Markandu ND, Antonios TF, MacGregor GA. Effect of modest salt reduction on skin capillary rarefaction in white, black, and Asian individuals with mild hypertension. *Hypertension.* 2010; 56:253 – 9.
5. Ritz E. Salt— friend or foe? *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21: 2052 – 6.
6. Sanders PW. Vascular consequences of dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009; 297: F237 – 43.
7. Lang F. Stiff endothelial cell syndrome in vascular inflammation and mineralocorticoid excess. *Hypertension.* 2011; 57:146 – 7.
8. Kusche-Vihrog K, Urbanova K, Blanque A, Wilhelmi M, Schillers H, Kliche K, et al. C-reactive protein makes human endothelium stiff and tight. *Hypertension.* 2011; 57:231 – 7.
9. Titze J, Lang R, Ilies C, Schwind KH, Kirsch KA, Dietsch P, et al. Osmotically inactive skin Na<sub>+</sub> storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 285:F1108 – 17.
10. Titze J, Machnik A. Sodium sensing in the interstitium and relationship to hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010; 19:385 – 92.

11. Adams JM, Bardgett ME, Stocker SD. Ventral lamina terminalis mediates enhanced cardiovascular responses of rostral ventrolateral medulla neurons during increased dietary salt. *Hypertension*. 2009; 54:308 – 14.
12. He FJ, Markandu ND, Sagnella GA, de Wardener HE, MacGregor GA. Plasma sodium: ignored and underestimated. *Hypertension*. 2005; 45:98 – 102.
13. Oberleithner H, Riethmuller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:16281 – 6.
14. He FJ, Macgregor GA. A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes. *J Hum Hypertens*. 2009; 23:363–384.
15. Institutes of Medicine. A Population-Based Policy and Systems Change Approach to Prevent and Control Hypertension. <http://www.iom.edu/Reports/2010/A-Population-Based-Policy-and-Systems-Change-Approach-to-Prevent-and-Control-Hypertension.aspx>. Accessed July 2011.
16. Bibbins-Domingo K, Chertow GM, Coxson PG, Moran A, Lightwood JM, Pletcher MJ, Goldman L. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 2010; 362:590 –599.
17. Carlstrom M, Sallstrom J, Skott O, Larsson E, Persson AE. Uninephrectomy in young age or chronic salt loading causes salt-sensitive hypertension in adult rats. *Hypertension*. 2007; 49:1342–1350.
18. Chien KL, Hsu HC, Chen PC, Su TC, Chang WT, Chen MF, Lee YT. Urinary sodium and potassium excretion and risk of hypertension in Chinese: report from a community-based cohort study in Taiwan. *J Hypertens*. 2008; 26:1750 –1756.

19. He FJ, MacGregor GA. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;CD004937.
20. Meneely GR, Tucker RG, Darby WJ, Auerbach SH. Chronic sodium chloride toxicity in the albino rat, II: occurrence of hypertension and of a syndrome of edema and renal failure. *J Exp Med.* 1953; 98:71– 80.
21. Prior IA, Evans JG, Harvey HP, Davidson F, Lindsey M. Sodium intake and blood pressure in two Polynesian populations. *N Engl J Med.* 1968; 279:515–520.
22. Guyton AC, Coleman TG, Young DB, Lohmeier TE, DeClue JW. Salt balance and long-term blood pressure control. *Annu Rev Med.* 1980; 31:15–27.
23. Richards AM, Nicholls MG, Espiner EA, Ikram H, Maslowski AH, Hamilton EJ, Wells JE. Blood-pressure response to moderate sodium restriction and to potassium supplementation in mild essential hypertension. *Lancet.* 1984; 1:757–761.
24. Bragulat E, de la Sierra A, Antonio MT, Jimenez W, Urbano-Marquez A, Coca A. Effect of salt intake on endothelium-derived factors in a group of patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2001; 101:73–78.
25. He FJ, Marciniak M, Markandu ND, Antonios TF, MacGregor GA. Effect of modest salt reduction on skin capillary rarefaction in white, black, and Asian individuals with mild hypertension. *Hypertension.* 2010; 56: 253–259.
26. Ni Z, Vaziri ND. Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens.* 2001; 14:155–163.
27. Todd AS, Macginley RJ, Schollum JB, Johnson RJ, Williams SM, Sutherland WH, Mann JI, Walker RJ. Dietary salt loading impairs arterial vascular reactivity. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91: 557–564.

28. Tsuchiya K, Naruse M, Nihei H. Glomerular expression of endothelial nitric oxide synthase in deoxycorticosterone acetate-salt-treated rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000; 27:818–820.
29. Tzemos N, Lim PO, Wong S, Struthers AD, MacDonald TM. Adverse cardiovascular effects of acute salt loading in young normotensive individuals. *Hypertension*. 2008; 51:1525–1530.
30. Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, MacGregor GA. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev* 2005; 85:679–715.
31. Majid DS, Kopkan L. Nitric oxide and superoxide interaction in the kidney and its implication in the development of salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 946–952.
32. Tolins JP, Shultz PJ. Endogenous nitric oxide synthesis determines sensitivity to the pressor effect of salt. *Kidney Int* 1994; 46: 230–236.
33. Yamada SS, Sasaki AL, Fujihara CK, Malheiros DM, De Nucci G, Zatz R. Effect of salt intake and inhibitor dose on arterial hypertension and renal injury induced by chronic nitric oxide blockade. *Hypertension* 1996; 27: 1165–1172.
34. Kone BC. Nitric oxide synthesis in the kidney: isoforms, biosynthesis, and functions in health. *Semin Nephrol* 2004; 24: 299–315.
35. Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens* 2001; 14, Suppl 3: 74S–82S.
36. Kopkan L, Majid DS. Enhanced superoxide activity modulates renal function in NO-deficient hypertensive rats. *Hypertension* 2006; 47: 568–572.

37. Kopkan L, Majid DS. Superoxide contributes to development of salt sensitivity and hypertension induced by nitric oxide deficiency. *Hypertension* 2005; 46: 1026–1031.
38. Majid DS, Nishiyama A, Jackson KE, Castillo A. Inhibition of nitric oxide synthase enhances superoxide activity in canine kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: R27–R32.
39. Majid DS, Nishiyama A. Nitric oxide blockade enhances renal responses to superoxide dismutase inhibition in dogs. *Hypertension* 2002; 39: 293–297.
40. A, Fukunaga M, Tamaki T, Kiyomoto H, Kohno M, Shokoji T, Kimura S, Abe Y. The SOD mimetic tempol ameliorates glomerular injury and reduces mitogen-activated protein kinase activity in Dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol* 2004, 15: 306–315.
41. Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286: F606–F616.
42. Romero JC, Reckelhoff JF. Role of angiotensin and oxidative stress in essential hypertension. *Hypertension* 1999; 34: 943–949.
43. Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link to hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R913–R935.
44. High-salt intake enhances superoxide activity in eNOS knockout mice leading to the development of salt sensitivity. Libor Kopkan, Arthur Hess, Zuzana Husková, L. Gabriel Navar, and Dewan S. A. Majid. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 299: F656–F663.
45. Nishiyama A, Yoshizumi M, Hitomi H, Kagami S, Kondo S, Miyatake A, Fukunaga M, Tamaki T, Kiyomoto H, Kohno M, Shokoji T, Kimura S, Abe Y. The SOD mimetic tempol

- ameliorates glomerular injury and reduces mitogen-activated protein kinase activity in Dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol* 15: 306–315, 2004.
46. Tian N, Moore RS, Phillips WE, Lin L, Braddy S, Pryor JS, Stockstill RL, Hughson MD, Manning RD Jr. NADPH oxidase contributes to renal damage and dysfunction in Dahl salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: R1858–R1865.
47. Marrotte E, Chen DD, Hakim JS, Chen AF. Restoration of endothelial progenitor cell function with manganese superoxide dismutase accelerates wound healing in diabetic mice. *J Clin Invest.* 2010; 120:4207-4219.
48. Xie HH, Zhou S, Chen DD, Channon KM, Su DF, Chen AF. GTP Cyclohydrolase I/BH4 Pathway Protects EPCs via Suppressing Oxidative Stress and Thrombospondin-1 in Salt-sensitive Hypertension. *Hypertension.* 2010; 56:1137-1144.
49. Garipey CE, Ohuchi T, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M. Salt-sensitive hypertension in endothelin-B receptor-deficient rats. *J Clin Invest.* 2000; 105:925-933.
50. Li L, Fink GD, Watts SW, Northcott CA, Galligan JJ, Pagano PJ, Chen AF. Endothelin-1 increases vascular superoxide via endothelin(A)-NADPH oxidase pathway in low-renin hypertension. *Circulation.* 2003; 107:1053-1058.
51. Li L, Watts SW, Banes AK, Galligan JJ, Fink GD, Chen AF. NADPH oxidase-derived superoxide augments endothelin-1-induced vasoconstriction in mineralocorticoid hypertension. *Hypertension.* 2003; 42:316-321.
52. Wang Y, Chen AF, Wang DH. ET(A) receptor blockade prevents renal dysfunction in salt-sensitive hypertension induced by sensory denervation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 289:H2005-2011.

53. Yu Y, Fukuda N, Yao EH, Matsumoto T, Kobayashi N, Suzuki R, Tahira Y, Ueno T, Matsumoto K. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension. *Am J Hypertens.* 2008; 21:72-77.
54. Endothelin 1 Activation of Endothelin A Receptor/NADPH oxidase Pathway and Diminished Antioxidants Critically Contribute to Endothelial Progenitor Cell Reduction and Dysfunction in Salt-Sensitive Hypertension Dan-Dan Chen, Yu-Gang Dong, Hong Yuan, Alex F. Chen. *Hypertension.* 2012; 59:1037-1043.
55. Joshi, M. S.; Ponthier, J. L.; Lancaster, J. R. Jr. Cellular antioxidant and pro-oxidant actions of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* 27:1357–1366; 1999.
56. Chung, H. T.; Pae, H. O.; Choi, B. M.; Billiar, T. R.; Kim, Y. M. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:1075–1079; 2001.
57. Brown, G. C.; Borutaite, V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52:189–195; 2001.
58. Giulivi, C.; Poderoso, J. J.; Boveris, A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273:11038–11043; 1998.
59. Sarkela, T. M.; Berthiaume, J.; Elfering, S.; Gybina, A. A.; Giulivi, C. The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:6945–6949; 2001.
60. Ghafourifar, P.; Bringold, U.; Klein, S. D.; Richter, C. Mitochondrial nitric oxide synthase, oxidative stress and apoptosis. *Biol. Signals Recept.* 10:57–65; 2001.
61. Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482– 1488; 1999.



62. Schapira, A. H. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim. Biophys. Acta* 1410:159–170; 1999.
63. Yermilov, V.; Rubio, J.; Ohshima, H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.* 376:207–210; 1995.
64. Caulfield, J. L.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 273:12689–12695; 1998.
65. Taylor, J. S. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions. *Mutat. Res.* 510:55–70; 2002.
66. Olaiz RJ, Shama T, Rojas R, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006: 85-106.
67. DENOVA E, TALAVERA JO, HUITRÓN G, et al. Sweetened beverage consumption and increased risk of metabolic syndrome in Mexican adults. *Public Health Nutr.* 2010; 13(6): 835-42.
68. MALIK VS, SCHULZE MB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: A systematic review. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(2): 274-288.
69. RIVERA JA, MUÑOZ-HERNÁNDEZ O, ROSAS-PERALTA M, et al. Beverage consumption for a healthy life: recommendations for the Mexican population. *Salud Pública Mex* 2008; 50:173-195.
70. LUDWIG DS, PETERSON KE. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: A prospective, observational analysis. *Lancet* 2001; 357(9255):505-508.

71. Effect of Fructose on Body Weight in Controlled Feeding Trials. A Systematic Review and Meta-analysis. John L. Sievenpiper, MD, PhD; Russell J. de Souza, ScD, RD; Arash Mirrahimi, HBSc; Matthew E. Yu, HBSc; Amanda J. Carleton, MSc; Joseph Beyene, PhD; Laura Chiavaroli, MSc; Marco Di Buono, PhD; Alexandra L. Jenkins, PhD, RD; Lawrence A. Leiter, MD; Thomas M.S. Wolever, MD, PhD; Cyril W.C. Kendall, PhD; and David J.A. Jenkins, MD, PhD, DSc. *Ann Intern Med.* 2012;156:291-304.
72. Schalkwijk CG, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW. Fructose mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004; 20:369-82.
73. Concha II, Velasquez FV, Martinez JM, Angulo C, Droppelmann A, Reyes AM, et al. Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructose. *Blood.* 1997; 89:4190-5.
74. Wang X, Jia X, Chang T, Desai K, Wu L. Attenuation of hypertension development by scavenging methylglyoxal in fructose treated rats. *J Hypertens.* 2008; 26:765-72.
75. Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ: Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007, 293:C584–C596.
76. Chao HH, Liu JC, Lin JW, et al.: Uric acid stimulates endothelin-1 gene expression associated with NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 2008, 29:1301–1312.
77. Sanchez-Lozada LG, Soto V, Tapia E, et al.: Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 295:F1134–F1141.
78. Glushakova O, Kosugi T, Roncal C, et al.: fructose induces the inflammatory molecule ICAM-1 in endothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19:1712–1720.

79. He L, Chinnery Pf, Durham SE, et al. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jul 15; 30(14):e68.
80. Jui-Chih C, Shou-Jen K, Wei-Ting L, et al. Regulatory role of mitochondria in oxidative stress and atherosclerosis. *World J Cardiol* 2010, 26; 2(6): 150-159.
81. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J.* 1990; 4:2652-60.
82. Le GM, Tobin V, Stolarczyk E, Dalet V, Leturque A, Brot-Laroche E. Sugar sensing by enterocytes combines polarity, membrane bound detectors and sugar metabolism. *J Cell Physiol.* 2007; 213:834-43.
83. Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada LG, Lanaspá MA, et al. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 298:F712-20.
84. Diggle CP, Shires M, Leitch D, Brooke D, Carr IM, Markham AF, et al. Ketohexokinase: expression and localization of the principal fructose-metabolizing enzyme. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57:763-74.
85. Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010; 7:251-64.
86. Hirai T, Okumura K, Nishimoto Y, Shumiya T, Murakami R, Takahashi R, et al. Upregulation of renal eNOS by high-sodium diet facilitates hypertension in doxorubicin-treated rat through enhanced oxidative stress. *Toxicology* 2006; 225:81–89.
87. Banday AA, Muhammad AB, Fazili FR, Lokhandwala M. Mechanisms of oxidative stress-induced increase in salt sensitivity and development of hypertension in Sprague-Dawley rats. *Hypertension* 2007; 49:664–671.

88. Catena C, Cavarape A, Novello M, et al.: Insulin receptors and renal sodium handling in hypertensive fructose-fed rats. *Kidney Int* 2003, 64:2163–2171.
89. Vasdev S, Gill V, Parai S, Gadag V: Fructose-induced hypertension in Wistar-Kyoto rats: interaction with moderately high dietary salt. *Can J Physiol Pharmacol* 2007, 85:413–421.
90. Singh AK, Amlal H, Haas PJ, et al.: Fructose-induced hypertension: essential role of chloride and fructose absorbing transporters PAT1 and Glut5. *Kidney Int* 2008, 74:438–447.
91. Barone S, Fussell SL, Singh AK, et al.: Slc2a5 (Glut5) is essential for the absorption of fructose in the intestine and generation of fructose-induced hypertension. *J Biol Chem* 2009, 284:5056–5066.
92. Bai, R, Chang H, Wong L, et al. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann NY AcadSci* 2004, 1011: 304-9.
93. Chia-Te Kung, et al. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. *Journal of Translational Medicine* 2012, 10:130.
94. Rhodes Andrew, et al. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Critical Care* 2006, 10: 1-7.
95. Puskarich Michael, et al. Plasma Levels of Mitochondrial DNA in Patients Presenting to the Emergency Department with Sepsis. *Shock* 2012, Vol. 6.
96. Mohammed H. Abdulla, et al. The Relation between Fructose-Induced Metabolic Syndrome and Altered Renal Haemodynamic and Excretory Function in the Rat. *International Journal of Nephrology*. Mayo 2011.
97. Leon Ferder & Marcelo Damián Ferder & Felipe Inserra. The Role of High-Fructose Corn Syrup in Metabolic Syndrome and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* (2010) 12:105–112

98. Jalal DI, Smits G, Johnson RJ, Chonchol M: Increased fructose associates with elevated blood pressure. *J Am Soc Nephrol* 2010; 32: 1543–1549.
99. Chen L, Caballero B, Mitchell DC, Loria C, Lin PH, Champagne CM, Elmer PJ, Ard JD, Batch BC, Anderson CA, Appel LJ: Reducing consumption of sugar-sweetened beverages is associated with reduced blood pressure: A prospective study among United States adults. *Circulation* 2010; 121: 2398–2406.
100. Winkelmayr WC, Stampfer MJ, Willett WC, Curhan GC: Habitual caffeine intake and the risk of hypertension in women. *JAMA* 2005; 294: 2330–2335.
101. J. Stamler, “The INTERSALT study: background, methods, findings, and implications,” *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 65, no. 2, supplement, pp. 626S–642S, 1997.
102. F. J. He and G. A. MacGregor, “Effect of modest salt reduction on blood pressure: a meta-analysis of randomized trials. Implications for public health,” *Journal of Human Hypertension*, 2002: vol. 16, no. 11, pp. 761–770.
103. L. J. Appel, “The role of diet in the prevention and treatment of hypertension,” *Current Atherosclerosis Reports*, 2000: vol. 2, no. 6, pp. 521–528.
104. E. D. Frohlich, “The salt conundrum: a hypothesis,” *Hypertension*, 2007: vol. 50, no. 1, pp. 161–166.
105. R. L. Sacco, P. A. Wolf, and P. B. Gorelick, “Risk factors and their management for stroke prevention: outlook for 1999 and beyond,” *Neurology*, 1999: vol. 53, no. 7, supplement, pp. S15–S24.

106. Z. N. Hasan, M. Q. Husseinand, and G. F. Haji, "Hypertension as a risk factor: is it different in ischemic stroke and acute myocardial infarction comparative cross-sectional study?" *International Journal of Hypertension*, 2011: vol. 2011.
107. K. L. Teff, S. S. Elliott, M. Tschöop et al., "Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2004: vol. 89, no. 6, pp. 2963–2972.
108. A. Shapiro, W. Mu, C. Roncal, K. Y. Cheng, R. J. Johnson, and P. J. Scarpance, "Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding," *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 2008: vol. 295, no. 5, pp. R1370–R1375.
109. A. Shapiro, N. Tümer, Y. Gao, K.-Y. Cheng, and P. J. Scarpance, "Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content," *British Journal of Nutrition*, 2011: vol. 22, pp. 1–8.
110. Salt-induced hemodynamic regulation mediated by nitric oxide. Noboru Toda and Kikuo Arakawa. *J Hypertens* 2011; 29:415–424.
111. Gianotti TF, Sookoian S, Dieuzeide G, et al. A decreased mitochondrial DNA content is related to insulin resistance in adolescents. *Obesity (Silver Spring)*. 2008 Jul;16(7):1591-5. Epub 2008 Apr 24.
112. Nguyen S, Choi HK, Lustig RH, Hsu CY: Sugar-sweetened beverages, serum uric acid, and blood pressure in adolescents. *J Pediatr* 2009, 154:807–813.

113. Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, et al.: Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community. *Circulation* 2007, 116:480–488.
114. Perez-Pozo SE, Schold J, Nakagawa T, et al.: Excessive fructose intake induces the features of metabolic syndrome in healthy adult men: role of uric acid in the hypertensive response. *Int J Obes (Lond)* 2010, 34:454–461.
115. Madero M, Arriaga JC, Jalal D, et al. The effect of a very low fructose diet versus a moderate natural fructose diet on weight loss and metabolic syndrome parameters. A randomized trial. (*Metabolism* 2011, En prensa).
116. Ingelsson E, Hulthe J, Lind L. Inflammatory markers in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest.* 2008 Jul; 38(7):502-9.
117. Shim WS, Kim HJ, Kang ES, Ahn CW, Lim SK, Lee HC, Cha BS. The association of total and differential white blood cell count with metabolic syndrome in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2006 Sep; 73(3):284-91.
118. Fu Y, Maianu L, Melbert BR, Garvey WT. Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation. *Blood Cells Mol Dis.* 2004 Jan-Feb; 32(1):182-90.
119. Mori MA, Bezy O, Kahn CR *Circ Res.* Metabolic syndrome: is Nlrp3 inflammasome a trigger or a target of insulin resistance? 2011 May 13; 108(10):1160-2.
120. 55. Webb R, Jeffries M, Sawalha AH. Uric acid directly promotes human T-cell activation. *Am J Med Sci.* 2009 Jan; 337(1):23-7.

121. Meotti FC, Jameson GN, Turner R, Harwood DT, Stockwell S, Rees MD, Thomas SR, Kettle AJ. Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: implications for hyperuricemia and inflammation. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15; 286(15):12901-11.
122. Fortuño A, Bidegain J, San José G, Robador PA, Landecho MF, Beloqui O, Díez J, Zalba G. Insulin resistance determines phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase overactivation in metabolic syndrome patients. *J Hypertens*. 2009 Jul; 27(7):1420-30.
123. Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. *Peptides* 2005; 26: 2500–2504.
124. Enhörning S, Wang TJ, Nilsson PM, Almgren P, Hedblad B, Berglund G, Struck J, Morgenthaler NG, Bergmann A, Lindholm E, Groop L, Lyssenko V, Orho-Melander M, Newton-Cheh C, Melander O. Plasma copeptin and the risk of diabetes mellitus. *Circulation* 2010; 121: 2102–2108.
125. Saleem U, Khaleghi M, Morgenthaler NG, Bergmann A, Struck J, Mosley Jr TH, Kullo IJ. Plasma carboxy-terminal provasopressin (copeptin): a novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:2558–2564.
126. Pollard AD, Brindley DN. Effects of vasopressin and corticosterone on fatty acid metabolism and on the activities of glycerol phosphate acyltransferase and phosphatidate phosphohydrolase in rat hepatocytes. *Biochem J* 1984; 217:461–469.