



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**ANÁLISIS DE LOS FACTORES ASOCIADOS AL DESARROLLO DE  
LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL POR LA INGESTA DE SACAROSA  
EN UN PERÍODO CERCANO AL DESTETE DE RATAS.  
REVERSIÓN DE LOS EFECTOS MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN  
DE LA MEZCLA RESVERATROL/QUERCETINA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Q.A. Mariana Villegas Romero

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. Verónica Guarner Lans

[Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. María Cristina Fernández Mejía

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Dr. Juan Miranda Ríos

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México. Noviembre, 2018



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.

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas desde hace 12 años, en sus aulas obtuve un gran crecimiento personal y académico. Agradezco a cada maestro que con su sabiduría me motivó a tomar la decisión de estudiar una maestría. Gracias U.N.A.M por ser ese universo donde las ciencias, la cultura y la amistad pueden ser uno mismo.

A mis padres por motivarme a alcanzar mis metas con el objetivo de siempre disfrutar el camino, ya que aunque este sea difícil el aprendizaje obtenido es invaluable. Gracias porque con su ejemplo me han enseñado la importancia de hacer algo bueno por mi país, gracias por enseñarme a ver la vida desde diferentes aristas, pero sobre todo gracias por regalarme la libertad de poder elegir mis pasos siempre guiándome con amor y sabiduría.

A Karen Traconis, por acompañarme desde el inicio de este proyecto, por estar ahí en los días buenos, malos y en los peores, por alentarme a ser mejor cada día, por llenar mi alma de alegría con su risa y ocurrencias, por cada aventura, por su amor, por su apoyo y sus palabras. Gracias por ser y por caminar juntas en esta vida.

A Adriana Solís por su amor incondicional, gracias por cada vivencia, por hacerme parte de su familia y por siempre estar al pendiente de mí.

A mi familia por todo su cariño, por enseñarme cosas de la vida a partir de sus relatos, gracias por compartir y por estar presentes en cada momento.

Al CONACYT, al módulo de becas y a todos los mexicanos que con sus impuestos hicieron posible que se me asignara una beca de manutención, la cual fue pieza clave para la realización de este posgrado. Al Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez por brindarme el servicio del comedor, así como todos los insumos necesarios para que este trabajo se pudiera llevar a cabo.

A mi tutora, la Dra. Verónica Guarner por aceptarme en su grupo de trabajo, por su confianza y disposición para proporcionarme todo lo necesario para el desarrollo y culminación de este proyecto.

A la Dra. María Esther Rubio por su tiempo y paciencia al guiarme en momentos difíciles, agradezco su amistad, pero sobre todo gracias por transmitirme su inmenso amor por la ciencia, eres un ejemplo a seguir.

A los Dres. Vicente Castrejón e Israel Pérez por compartir sus conocimientos conmigo y apoyarme a lo largo de estos dos años. Al equipo técnico del laboratorio de Fisiología Mario, Florencio y Bertha gracias por su apoyo y compromiso con el proyecto.

A los miembros del comité tutorial, la Dra. Cristina Fernández y el Dr. Juan Miranda. Así como a las sinodales las Dras. Marcia Hiriart, Nimbe Torres, Carolina Escobar, Esther Rubio y Patricia Canto, gracias por su tiempo para leer mi tesis, por sus comentarios y aportaciones los cuales fueron de gran ayuda para enriquecer este trabajo.

A la familia por elección Mago, Alejandra y Monse. Gracias por ser mis cómplices, por las pláticas interminables que llenan mi corazón, por sus palabras y por su apoyo incondicional.

A los amigos con los que he compartido risas y aventuras, Fer, Juan Luis, Vero, Sofi, Andrés, Mariana, Consu, Lily y Sofi M. Gracias por hacer de cada vivencia un momento inolvidable.

A Karla Vijil y Javier Olvera por ayudarme a encontrar paz en mi corazón.

*«Que tu medicina sea tu alimento y el alimento tu medicina»*

**-Hipócrates-**

# ÍNDICE DE ABREVIATURAS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| AA                            | Ácido araquidónico  |
| AADPR                         | O-acetil-ADP-ribosa   |
| ADN                           | Ácido desoxirribonucleico   |
| ADP                           | Adenosín difosfato  |
| Akt                           | Protein cinasa B  |
| AMPc                          | Adenosín monofosfato cíclico  |
| AMPK                          | Protein cinasa activada por adenosín monofosfato                          |
| AP-1                          | Proteína activadora 1   |
| ARNm                          | Ácido ribonucleico mensajero  |
| BH <sub>2</sub>               | Dihidropterina  |
| BH <sub>4</sub>               | 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina  |
| Ca <sup>2+</sup>              | Calcio  |
| CaM                           | Calmodulina   |
| CamKKβ                        | Calcio/calmodulina dependiente de cinasa cinasa β                         |
| C-HDL                         | Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad                      |
| C-IDL                         | Colesterol asociado a lipoproteínas de densidad intermedia                |
| C-LDL                         | Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad                      |
| COX                           | Ciclooxigenasa  |
| C-VLDL                        | Colesterol asociado a lipoproteínas de muy baja densidad                  |
| DHA                           | Ácido docosaheptaenoico   |
| eNOS                          | Sintasa de óxido nítrico endotelial                                       |
| EPA                           | Ácido eicosapentaenoico   |
| Epac 1                        | Factor de cambio directamente activado por adenosín monofosfato cíclico 1 |
| ERO                           | Especies reactivas de oxígeno   |
| ET-1                          | Endotelina 1  |
| FAD                           | Flavin adenin dinucleótido  |
| FMN                           | Flavin mononucleótido   |
| FOXO 1                        | Forkhead box 1  |
| FOXO 3                        | Forkhead box 3  |
| GAPDH                         | Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa                                   |
| GMPc                          | Guanosín monofosfato cíclico  |
| GPx                           | Glutación peroxidasa  |
| GR                            | Glutación reductasa   |
| GST                           | Glutación S-transferasa   |
| GTP                           | Trifosfato de guanosina   |
| GTPCH 1                       | Trifosfato de guanosina ciclohidrolasa 1                                  |
| HAT                           | Acetil transferasa de histonas  |
| HDAC                          | Deacetilasas de histonas  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de hidrogeno   |
| HOMA-IR                       | Homeostatic Model Assessment of insulin resistance                        |
| IDH2                          | Isocitrato deshidrogenasa 2   |
| RI                            | Resistencia a la insulina   |
| iNOS                          | Sintasa de óxido nítrico inducible  |
| IRS-1                         | Sustrato del receptor de insulina 1                                       |
| K <sub>m</sub>                | Constante de Michaelis  |
| LKB1                          | Serin treonin cinasa 1  |
| MAPK                          | Protein cinasas activadas por mitógenos                                   |
| NAD <sup>+</sup>              | Nicotin adenin dinucleotido oxidado                                       |
| NADPH                         | Nicotinamida adenin dinucleotidofosfato                                   |

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Nampt                       | Enzima productora de NAD <sup>+</sup>           |
| nNOS                        | Sintasa de óxido nítrico neuronal               |
| NO                          | Óxido nítrico                                   |
| NOX                         | Nicotinamida adenin dinucleotidofosfato oxidasa |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Anión superóxido                                |
| ONOO <sup>-</sup>           | Peroxinitrito                                   |
| PC                          | Período crítico                                 |
| PDE                         | Fosfodiesterasas                                |
| PDK 1                       | Fosfatidilinositol dependiente de cinasa 1      |
| PGE <sub>2</sub>            | Prostaglandina E <sub>2</sub>                   |
| PGI <sub>2</sub>            | Prostaciclina                                   |
| PI3-K                       | Fosfoinositol 3 cinasa                          |
| PKC                         | Protein cinasa C                                |
| PPAR-γ                      | Proliferador de peroxisoma- gamma               |
| QSC                         | Quercetina                                      |
| RSV                         | Resveratrol                                     |
| SIRT <sub>s</sub>           | Sirtuinas                                       |
| SIRT 1                      | Sirtuina 1                                      |
| SIRT 2                      | Sirtuina 2                                      |
| SIRT 3                      | Sirtuina 3                                      |
| SM                          | Síndrome metabólico                             |
| SOD                         | Superóxido dismutasa                            |
| SOD 1                       | Superóxido dismutasa 1                          |
| SOD 2                       | Superóxido dismutasa 2                          |
| STAC                        | Compuestos activadores de sirtuinas             |
| TG                          | Triglicéridos                                   |
| TGF-β                       | Factor de crecimiento transformante             |
| TXA 2                       | Tromboxano A <sub>2</sub>                       |
| VSMC                        | Células del músculo liso vascular               |
| XO                          | Xantina oxidasa                                 |
| Zn <sup>2+</sup>            | Zinc  |

## **ABREVIATURAS CORRESPONDIENTES A LOS GRUPOS EXPERIMENTALES**

|            |  |
|------------|--|
| C          | Grupo control                                      |
| C RSV/QSC  | Grupo control administrado con RSV/QSC             |
| PC         | Grupo período crítico                              |
| PC RSV/QSC | Grupo período crítico administrado con RSV/QSC     |
| SM         | Grupo síndrome metabólico                          |
| SM RSV/QSC | Grupo síndrome metabólico administrado con RSV/QSC |
| Sin Tx     | Grupo no administrado con la mezcla RSV/QSC        |

# ÍNDICE

## RESUMEN

|  |    |
|--|----|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 1  |
| <b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....   | 2  |
| 2.1 Períodos críticos en el desarrollo y cambios epigenéticos.....               | 2  |
| 2.1.1 Modificaciones en la dieta como reguladores de la<br>expresión génica..... | 2  |
| 2.2 Hipertensión.....  | 3  |
| 2.2.1 Etiopatogenia.....   | 4  |
| 2.2.1.1 Disfunción endotelial.....   | 4  |
| 2.2.1.2 Factores asociados a la disfunción endotelial.....                       | 5  |
| 2.2.1.2.1 Síndrome metabólico.....   | 6  |
| 2.2.1.2.2 Resistencia a la insulina.....   | 7  |
| 2.2.1.2.3 Dislipidemia.....  | 8  |
| 2.2.1.2.4 Estrés oxidativo.....  | 9  |
| 2.3 Terapéutica de la hipertensión arterial.....                                 | 11 |
| 2.3.1 Compuestos naturales como terapia alternativa.....                         | 12 |
| 2.3.2 Resveratrol y quercetina.....  | 12 |
| 2.3.3 Efecto del RSV/QSC en enfermedades cardiovasculares.....                   | 14 |
| 2.3.4 Efecto del RSV/QSC como moduladores epigenéticos<br>(SIRT6).....           | 15 |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....  | 20 |
| <b>IV. HIPÓTESIS</b> .....   | 21 |
| <b>V. OBJETIVOS</b> .....  | 21 |



|   |    |
|---|----|
| <b>VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b> .....   | 22 |
| 6.1 Animales.....   | 22 |
| 6.2 Diseño experimental.....  | 22 |
| 6.3 Determinación de presión arterial sistólica.....  | 24 |
| 6.4 Determinación del consumo energético.....   | 24 |
| 6.5 Determinación de parámetros bioquímicos en suero.....                                     | 25 |
| 6.5.1 Obtención de suero.....   | 25 |
| 6.5.2 Determinación de glucosa, TG y colesterol total en suero...25                           |    |
| 6.5.3 Determinación de insulina en suero.....   | 25 |
| 6.5.4 Cálculo del índice HOMA-IR (Homeostatic Model<br>Assessment of Insulin Resistance)..... | 25 |
| 6.5.5 Índice de tolerancia a la insulina.....   | 25 |
| 6.5.6 Determinación de colesterol HDL y colesterol no HDL en<br>suero.....                    | 26 |
| 6.5.7 Determinación del perfil de ácidos grasos libres en suero...26                          |    |
| 6.6 Extracción de proteína de la aorta torácica.....  | 27 |
| 6.6.1 Determinación de proteína.....  | 27 |
| 6.6.2 Determinación de expresión proteica por Western Blot.....                               | 27 |
| 6.6.3 Determinación de compuestos de lipoperoxidación.....                                    | 28 |
| 6.6.4 Determinación de capacidad antioxidante no enzimática.....                              | 28 |
| 6.7 Análisis estadístico.....   | 28 |
| <b>VII. RESULTADOS</b> .....  | 29 |
| 7.1 Efectos del consumo de sacarosa al finalizar el período crítico.....                      | 29 |
| 7.1.1 Características generales en el modelo PC.....  | 29 |
| 7.1.2 Efecto del consumo de sacarosa en la resistencia a la<br>insulina.....                  | 30 |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 7.1.3        | Efecto del consumo de sacarosa en el perfil lipídico y concentración de ácidos grasos libres.....  | 31        |
| 7.1.4        | Efecto del consumo de sacarosa en el estrés oxidativo.....   | 32        |
| 7.1.5        | Efecto del consumo de sacarosa en la expresión de eNOS y su regulación por factores epigenéticos.....  | 33        |
| 7.2          | Efecto de la mezcla RSV/QSC después del consumo de sacarosa durante el período crítico sobre el desarrollo de la hipertensión arterial en ratas adultas..... | 34        |
| 7.2.1        | Características generales de las ratas adultas en el modelo PC.....  | 34        |
| 7.2.2        | Efecto del consumo de sacarosa en la expresión de la proteína eNOS.....  | 35        |
| 7.2.3        | Efecto en la presión arterial.....   | 36        |
| 7.2.4        | Efecto en la resistencia a la insulina.....  | 37        |
| 7.2.5        | Efecto sobre el peso corporal, perfil lipídico y ácidos grasos libres.....   | 38        |
| 7.2.6        | Efecto en el estrés oxidativo.....   | 40        |
| 7.2.7        | Efecto en la expresión de eNOS y su regulación por factores epigenéticos.....  | 42        |
| <b>VIII.</b> | <b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>   | <b>46</b> |
| <b>IX.</b>   | <b>CONCLUSIONES.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>X.</b>    | <b>REFERENCIAS.....</b>  | <b>55</b> |

## RESUMEN

En los últimos años se ha observado la creciente relación entre el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono durante etapas tempranas de la vida con el aumento a desarrollar enfermedades como la hipertensión y el síndrome metabólico (SM) en ratas adultas. Por otra parte se ha demostrado que el consumo de polifenoles, como el resveratrol (RSV) y/o quercetina (QSC), disminuye los signos característicos del SM. Estos compuestos actúan sobre las sirtuinas (SIRT), que son deacetilasas de histonas, las cuales se han relacionado con la disminución en presión arterial y estrés oxidativo. En este estudio se propuso modificar la dieta en un período corto que abarca del día 12 al 28 (parte de la lactancia y el destete) incluyendo agua con sacarosa al 30% en el agua de bebida y posterior a esto, las ratas ingirieron agua sin sacarosa hasta los 6 meses (grupo PC). El objetivo fue determinar el efecto de este tratamiento en el aumento de la presión arterial al día 28 y a los 6 meses, así como los posibles mecanismos involucrados en este padecimiento. A modo de comparación se utilizó otro grupo con un tiempo largo de exposición al hidrato de carbono (SM). Finalmente a las ratas adultas se les administró una mezcla de RSV/QSC en dosis de 50/0.95 mg/kg/día respectivamente, para observar si esto revertía los efectos.

La presente tesis mostró que el consumo de sacarosa durante los días 12 al 28 está asociado con el aumento de la presión arterial de las ratas. Este aumento en la presión arterial coincide con la disminución de la expresión de eNOS, el aumento en la concentración de ácido oleico, aumento en compuestos de lipoperoxidación, disminución en capacidad antioxidante enzimática y no enzimática, así como la disminución en la expresión de la enzima SIRT 3. Además, el consumo de sacarosa durante este período tuvo un impacto a largo plazo cuando las ratas llegaron a adultas generando un aumento en la presión arterial, probablemente relacionada con el aumento en el estrés oxidativo que a su vez generó una disminución en la expresión de eNOS. Por otra parte, la mezcla RSV/QSC revirtió dichos efectos.

Estos resultados demuestran que el consumo de altas cantidades de sacarosa puede predisponer a las crías a desarrollar enfermedades cardiovasculares en la etapa adulta, condición que es posible revertir con un tratamiento de polifenoles.

# I. INTRODUCCIÓN

Durante las primeras etapas de vida existen períodos de tiempo relativamente cortos donde ocurren cambios en cuanto a la función, estructura y establecimiento de puntos de control en algunos órganos. Estos lapsos de tiempo son conocidos como período crítico (PC), y cambios ambientales durante su transcurso, pueden generar modificaciones permanentes en el individuo (Lucas, 1998; Aguayo, *et al*, 2006). Nuestro equipo de trabajo ha demostrado que cuando a las ratas se les administra una solución de sacarosa al 30% durante los días 12 al 28 postnatal, presentan un incremento en la presión arterial, con disminución en la expresión de eNOS y aumento en la expresión de iNOS en las aortas de los animales cuando llegan a la edad adulta (Guarner, *et al*, 2014). En este trabajo se evaluó el impacto del consumo de sacarosa durante un período corto de tiempo en el aumento en la presión arterial al día 28 y a los 6 meses de edad, el cual podría estar asociado a tres mecanismos. El primer mecanismo es a través de la insulina, la cual inhibe la actividad de eNOS por la vía de las MAPK (Hernández, *et al*, 2015); el segundo es por medio del incremento en los ácidos grasos libres, principalmente el ácido oleico, que disminuye la actividad de eNOS. Y el tercero es debido a la presencia de estrés oxidativo, ya que la eNOS desacoplada así como otras enzimas pueden generar especies reactivas de oxígeno (EROS) las cuales reaccionan con el óxido nítrico (NO) disminuyendo su biodisponibilidad (Pérez, *et al*, 2013). Se ha observado que una dieta rica en polifenoles como son el RSV y la QSC disminuyen la presión arterial simulando los efectos de la restricción calórica (Rivera, *et al*, 2008). El efecto de la mezcla de RSV/QSC puede aumentar la actividad de las SIRTs (Wakeling, *et al*, 2009). Las SIRTs son deacetilasas de histonas que tienen como sustrato al nicotin adenin dinucleotido oxidado ( $\text{NAD}^+$ ), que es un sensor energético de la célula (Potente, 2010). El RSV y las SIRTs pueden regular componentes relacionados con la vía del NO. La SIRT 1 aumenta y promueve la actividad de eNOS acoplada (Rivera, 2008), mientras que la SIRT 3 activa la enzima súper oxido dismutasa (SOD), esta enzima tiene capacidad antioxidante al reducir las EROS, evitando que el NO se vea disminuido. Estos mecanismos podrían estar asociados con la disminución en la presión arterial observada después de un tratamiento con RSV/QSC, lo cual representa una alternativa en el tratamiento contra este padecimiento.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Períodos críticos en el desarrollo y cambios epigenéticos

#### 2.1.1 Modificaciones en la dieta como reguladores de la expresión génica

En la actualidad se sabe que los cambios ambientales pueden inducir modificaciones persistentes en la estructura y función de los tejidos a través de la alteración en la regulación de la transcripción de los genes durante etapas tempranas del desarrollo. A estos cambios se les conoce como cambios epigenéticos, y pueden generar un posible riesgo en la salud que puede ser heredable (Rubio, 2014). Se ha descrito que estos posibles cambios epigenéticos podrían contribuir al desarrollo de enfermedades como hipertensión y SM.

Diversos autores han utilizado modelos en ratas en donde modificaciones en la dieta como: el aumento en el consumo de hidratos de carbono, sal, el destete temprano, y una sobre alimentación en la gestación y la lactancia predispone a las crías a tener hipertensión y obesidad. Srinivasan y colaboradores (2005) demuestran que ratas cuyas madres fueron alimentadas con una dieta rica en hidratos de carbono durante la gestación, presentan hiperinsulinemia y obesidad al llegar a la etapa adulta. Además, se ha observado que un destete temprano en ratas (4 días de edad) y una alta ingesta de hidratos de carbono (56 %) en la fórmula láctea en los primeros días postnatales generan cambios en el páncreas a partir de los 12 días de edad, lo cual predispone a las crías a desarrollar hiperinsulinemia y obesidad, condición se mantiene hasta la edad adulta (Aalinkeel, *et al*, 1999).

Sumado a esto, se han analizado los genes que participan en el desarrollo de células beta, observando que la expresión de estos genes aumentó en crías alimentadas con leche rica en hidratos de carbono del día 12 al 100 (Song, *et al*, 2001). Otros estudios han disminuido el número de crías por camada lo cual genera una sobre alimentación durante la lactancia. Bei y colaboradores en 2015, midieron los parámetros bioquímicos en ratas sobrealimentadas al día 21 (destete) y a los 4 meses de edad. Los resultados mostraron un aumento en la glucosa, insulina, TG y ácidos grasos libres a los 21 días, mientras que a los 4 meses la glucosa presentó valores normales. Contrario a esto, los ácidos grasos libres, la insulina y los TG se vieron elevados respecto al grupo control. Estudios similares demostraron que

ratas sobrealimentadas durante la lactancia presentaron altos niveles de insulina en plasma en el día 15 de edad y al llegar a la adultez desarrollaron hipertensión arterial y obesidad (Plagemann, *et al*, 2012).

Por lo tanto, la hipertensión arterial es una de las principales enfermedades que es posible desarrollar a partir de modificaciones en la dieta durante períodos críticos del desarrollo. Factores como la resistencia a la insulina (RI) y el aumento en la concentración de TG y ácidos grasos libres, se han asociado con la presencia de esta enfermedad.

## **2.2 Hipertensión**

La hipertensión arterial es considerada como uno de los grandes problemas de salud pública mundial. La presencia de presión arterial elevada aumenta el riesgo de desarrollar cardiopatías, insuficiencia renal y accidentes cerebrovasculares (OMS, 2013). A nivel mundial se estima que el 40% de la población mayor a 25 años presenta hipertensión, mientras que en México el 25 % de la población padece esta enfermedad (ENSANUT, 2016).

La hipertensión arterial se considera un trastorno donde los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta. La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos al ser bombeada por el corazón; cuanta más alta es la tensión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear (OMS, 2013). La hipertensión se define como una presión sistólica de 140 mmHg o mayor y la presión diastólica es de 90 mmHg o mayor, considerándose una presión normal cuando los valores son de 120 mmHg/ 80 mmHg (OMS, 2013; ENSANUT, 2016).

Esta enfermedad tiene diversas causas y puede estar relacionada con otras enfermedades como son diabetes, SM, obesidad, entre otras. Existen factores que pueden influir en la población a desarrollar estas enfermedades como son la predisposición genética y el estilo de vida de cada individuo. Por ello, y con el fin de poder prevenir o revertir los daños generados por estos padecimientos, investigadores y organismos de salud están interesados en conocer las causas y los tratamientos relacionados a estas enfermedades (OMS, 2013).

## 2.2.1 Etiopatogenia

### 2.2.1.1 Disfunción endotelial

En este trabajo se explicaran algunas de las posibles causas que se han relacionado con el desarrollo de la hipertensión arterial. Algunos autores consideran la disfunción endotelial como uno de los mecanismos que producen hipertensión arterial, mientras que otros proponen a la hipertensión como la causa que genera el daño al endotelio (Davignon, 2004; Goligorsky, 2005). La disfunción endotelial puede definirse como el desbalance en la regulación del tono vascular, el desequilibrio en la liberación de vasodilatadores y vasoconstrictores, así como alteraciones en la inhibición y estimulación de la proliferación celular endotelial.

Además es considerada como un marcador temprano en la aterosclerosis. Sin embargo, para entender con mayor claridad lo que es la disfunción endotelial es necesario conocer que es el endotelio. El endotelio es un órgano paracrino, que se dispone formando una monocapa celular polarizada que reviste a los vasos sanguíneos. Cuenta con una membrana apical con glicocalix orientada hacia el lumen de los vasos sanguíneos y el corazón, y se encuentra adherida a una membrana basal adluminal. Las células endoteliales poseen una alta tasa de síntesis proteica, son metabólicamente muy activas y utilizan como sustratos energéticos glucosa y ácidos grasos (González, 2009).

Algunas funciones del endotelio son: 1) actuar como barrera entre la sangre y la pared vascular y a nivel capilar entre la sangre y los tejidos donde actúa como una membrana semipermeable que regula el pasaje de los fluidos, nutrientes y leucocitos hacia el intersticio (London, *et al*, 2009); 2) prevenir la coagulación intravascular mediante mecanismos anticoagulantes y antiplaquetarios (Verhamme, *et al*, 2006) y 3) participar en la regulación del tono vascular por medio de la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que actúan sobre las células musculares de la pared vascular (VSMC) (González, 2009).

## **Vasodilatadores y vasoconstrictores**

Para el adecuado funcionamiento vascular, es importante que las sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que son liberadas por el endotelio tengan un equilibrio ya que un desequilibrio en estos compuestos puede llevar al aumento o disminución en la presión (Feletou *et al*, 2006).

El agente vasodilatador más importante es el NO, el cual es un gas formado a partir de su precursor L-arginina. La reacción es catalizada por la enzima Óxido Nítrico Sintetasa (NOS). Existen tres isoformas, la neuronal (nNOS), la inducible (iNOS) y la endotelial (eNOS); esta última está presente en invaginaciones de la membrana de las células endoteliales denominadas caveolas (Matsubara, 2003). Esta enzima convierte al aminoácido L-arginina en L-citrulina y NO. Para catalizar esta reacción la eNOS necesita de calmodulina (CaM) y cuatro cofactores que son: el flavin mononucleótido (FMN), el flavin adenin dinucleótido (FAD), la 5,6,7,8-tetrahidropterina (BH<sub>4</sub>) y nicotinamida adenin dinucleotidofosfato (NADPH).

El NO difunde desde las células endoteliales a las VSMC de la pared vascular, donde activa a la guanilato ciclasa, provocando vasodilatación en el músculo liso dependiente de GMP cíclico (GMPc) y la consecuente vasodilatación (Deanfield, *et al*, 2007; Xia, *et al*, 2014). Por otra parte, la actividad de eNOS puede regularse a través de modificaciones postraduccionales en diferentes residuos de aminoácidos, un ejemplo es la fosforilación en la serina 1177 que activa a la enzima, mientras que la fosforilación en la treonina 495 la inhibe (Forsterman, *et al*, 2010). Además, existen factores epigenéticos como la SIRT 1 que es capaz de regular de manera positiva la actividad de eNOS (Mattagajasingh, *et al*, 2007).

### **2.2.1.2 Factores asociados a la disfunción endotelial**

Considerando la disfunción endotelial como una de las principales causas que se han asociado a la hipertensión arterial, a continuación se describirán algunos factores relacionados con el desarrollo de la disfunción en el endotelio.



### 2.2.1.2.1 Síndrome metabólico

El SM es una patología heterogénea caracterizada por una serie de signos que involucran desordenes metabólicos como son la RI, hipertensión arterial, obesidad, alteraciones en los niveles de glucosa en sangre, elevación en los niveles de TG en sangre y disminución en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (ATP III, 2018).

De acuerdo con el Panel de adultos III (ATP III) del Programa de educación sobre el colesterol, para poder diagnosticar a una persona con SM es necesaria la presencia de tres o más características que se describen en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Criterios para diagnosticar SM

| <b>Factor de riesgo</b> | <b>Valor</b>  |
|-------------------------|---------------|
| Obesidad abdominal      |               |
| Hombres                 | > 102 cm      |
| Mujeres                 | > 88 cm       |
| TG                      | ≥ 150 mg/dL   |
| C-HDL                   |               |
| Hombres                 | < 40 mg/dL    |
| Mujeres                 | < 50 mg/dL    |
| Presión arterial        | ≥ 130/80 mmHg |
| Glucosa en ayuno        | ≥ 110 mg/dL   |

En modelos murinos de SM, se ha demostrado que una dieta rica en azúcares (principalmente sacarosa) puede generar hiperinsulinemia, aumento en grasa visceral, TG, ácidos grasos libres y lipoproteínas de baja densidad (LDL) así como disminución en proteínas de alta densidad (HDL). Todos estos factores se han asociado directamente con el aumento en la presión arterial lo cual puede llevar a infartos y accidentes cerebrovasculares. (El Hafidi, *et al*, 2004; Pierre, 2007). En el SM, la presencia de estas variables, ya sea de forma independiente o en conjunto, pueden conducir a la disfunción endotelial.

En este trabajo postulamos tres vías que podrían estar asociadas con el aumento en la presión arterial, esto con el objeto de comparar si el consumo de sacarosa por un período corto de tiempo tiene el mismo impacto que la ingesta de azúcares por un período prolongado de tiempo (SM).

### 2.2.1.2.2 Resistencia a la insulina

El primer mecanismo es la RI la cual se define como una disminución de la sensibilidad y/o la capacidad de respuesta a las acciones metabólicas de esta hormona que promueven la utilización de la glucosa (Kim, 2006). Cuando los valores de insulina y glucosa son normales, la insulina promueve la producción de NO mediante mecanismos postraduccionales rápidos, así como por la inducción de la expresión génica de eNOS (Kuboki, *et al*, 2000).

Se ha observado que la insulina se une a un receptor con actividad de tirosin cinasa, el cual fosforila al sustrato del receptor de insulina (IRS-1), que luego se une y activa a la fosfoinositol 3 cinasa (PI3-K) que a su vez activa a la cinasa 1 dependiente de fosfatidil inositol (PDK 1), la cual activa a la protein cinasa B (Akt) que finalmente fosforila a la eNOS en la serina 1177 dando como resultado el aumento en la actividad de esta proteína con la consecuente producción de NO (Montagnani, *et al*, 2002; Zeng, *et al*, 2000). Sumado a esto, se ha demostrado en células endoteliales aórticas porcinas nativas incubadas durante 2 horas con insulina, el ARNm de eNOS aumentó al doble; y después de 18 a 24 horas, se observó un aumento equiparable en la proteína eNOS. Los autores han asociado el aumento en el ARNm y en la proteína mediante un mecanismo que implica la activación combinada de una vía dependiente de PI3-K y la proteína activadora 1 (AP-1) (Fisslthaler, 2003).

Por otro lado, cuando se presenta el fenómeno de RI es probable que exista hiperinsulinemia e hiperglicemia, que a su vez producen un aumento en la contractilidad vascular por medio de la endotelina 1 (ET-1) (vasoconstrictor) (Nava *et al*, 1997); ya que la insulina activa la expresión de ET-1, probablemente por la ruta de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK). Esto se ha demostrado en células endoteliales de ratones knockout del receptor de insulina, en donde la expresión de ET-1 disminuyó en 42 % (Oliver, *et al*, 1991; Vicent, *et al*, 2003). Además, se observó que PKC inhibe la actividad de PI3-K asociada a IRS 2 en células endoteliales y en ratas obesas se apreció una mayor actividad vascular de PKC y disminución en la fosforilación de IRS estimulada por insulina (Naruse, *et al*, 2006).

### 2.2.1.2.3 Dislipidemia

El segundo mecanismo que postulamos está relacionado con la dislipidemia ya que este padecimiento se ha asociado con el aumento en ácidos grasos libres. La dislipidemia es detectada a través de concentraciones sanguíneas anormales de colesterol total, TG y/o C-HDL y/o C-LDL, que participan como factores de riesgo cardiovascular (Secretaría de Salud).

Se ha observado que individuos con exceso de grasa abdominal presentan adipocitos agrandados y esto se asocia con un aumento en la tasa de lipólisis lo que conlleva a una mayor liberación de lípidos y ácidos grasos libres al torrente sanguíneo (Berger, *et al*, 1999; Grekin, *et al*; 1995). Enfermedades como la obesidad e hipertensión arterial se han relacionado con aumento en los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (particularmente ácido oleico), así como una disminución en los ácidos grasos poliinsaturados (Pérez, *et al*, 2013).

Estudios en nuestro laboratorio demostraron un aumento en la concentración sérica de ácido palmitoleico y oleico en ratas con SM, lo cual está acompañado de un incremento en la presión arterial. Además, se observó una disminución en los ácidos: esteárico, linoleico y araquidónico. Cabe mencionar que el ácido palmítico y esteárico son precursores del ácido palmitoleico y oleico, respectivamente; las desaturasas son las enzimas limitantes que participan en la conversión de estos ácidos grasos y algunos autores han reportado que después de un consumo prolongado de sacarosa, la actividad de estas enzimas aumenta (Peredo, *et al* 2015; Pérez, *et al*, 2013).

Los mecanismos que relacionan el aumento en la presión arterial con algunos de los ácidos grasos libres no se han dilucidado completamente; sin embargo, diversos autores han demostrado que el aumento en la concentración del ácido oleico activa a PKC la cual fosforila a eNOS en la treonina 495 mediante experimentos *in vitro* e *in vivo*. Esta fosforilación disminuye la actividad de la enzima y por consiguiente disminuye la vasodilatación (Davda, *et al*, 1995; Mamoru, *et al*, 2003; Sainsbury, *et al*, 2004).

Adicionalmente, se ha asociado una disminución en la concentración de ácidos grasos poliinsaturados esenciales como el ácido linoleico y  $\alpha$ -linoleico que solo pueden ser

obtenidos a partir de la dieta en ratas con SM. Una parte del ácido linoleico es desaturado a  $\alpha$ -linoleico, que a su vez es convertido en DHA y EPA; mientras que la otra parte constituyente del ácido linoleico se convierte en AA el cual es un precursor de compuestos vasodilatadores (prostaglandinas) y vasoconstrictores (tromboxanos) que son metabolizados mediante la enzima COX (Chung, *et al*, 2007; Rabelo, *et al*, 2010). La dirección del metabolismo hacia la producción de una u otra sustancia dependerá del estado fisiológico de la célula (El Hafidi, *et al*, 2004).

#### **2.2.1.2.4 Estrés oxidativo**

El tercer mecanismo asociado al aumento en la presión arterial es el estrés oxidativo que se define como el desequilibrio entre la excesiva producción de ERO que provocan un daño en las biomoléculas y la disminución en la capacidad de los sistemas antioxidantes, los cuales eliminan estos radicales. Las ERO se definen como especies que pueden o no ser radicales libres y que son más reactivas que el oxígeno molecular debido a que contienen oxígeno incompletamente reducido o con una distribución electrónica diferente (Sánchez, *et al*, 2011).

#### **Implicaciones en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares**

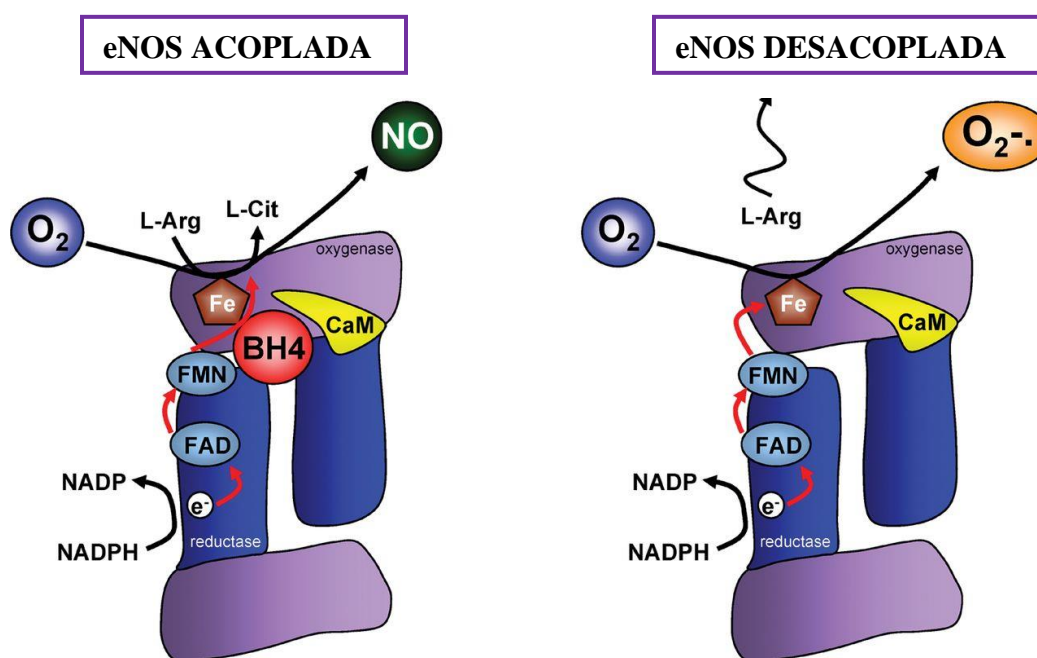
Estudios han demostrado la importancia de las ERO en el desarrollo y progresión de enfermedades cardiovasculares como obesidad y diabetes; específicamente, se ha observado una relación directa entre el aumento del estrés oxidativo y la elevación en la presión arterial. Los principales factores que participan en el aumento de ERO son: hiperglicemia, RI y elevación en la concentración de ácidos grasos libres (Forsterman, *et al*, 2010; Kizub, *et al*, 2014).

Algunos investigadores han comprobado en diferentes modelos (células endoteliales, VSMC, y aortas de ratas diabéticas e hipertensas) que las principales fuentes generadoras de ERO son: NADPH oxidasa (NOX), eNOS desacoplada, la disminución del cofactor BH<sub>4</sub> y la xantina oxidasa (XO); aunque el papel de ésta última enzima aún es controversial (Li *et al* 2006; Sorescu, *et al*, 2002; Landmesser, *et al*, 2007).

## eNOS desacoplada y oxidación de BH<sub>4</sub>

La eNOS es un dímero que transfiere electrones de NADPH, a través de las flavinas (FAD y FMN) y del BH<sub>4</sub> en el dominio carboxi-terminal reductasa, al grupo hemo en el dominio oxigenasa amino-terminal, donde el sustrato L-arginina se oxida a L-citrulina y NO. El flujo de electrones dentro de eNOS está estrechamente regulado, y si se altera, la reducción química del oxígeno y la generación de NO se desacoplan y se genera O<sub>2</sub><sup>-</sup> a partir del dominio oxigenasa (Stuehr, *et al.*, 2001; Forsterman, *et al.*, 2010).

Uno de los factores que conducen al desacople de eNOS es la oxidación del co-factor BH<sub>4</sub>. Esta molécula se biosintetiza a partir del trifosfato de guanósina (GTP), siendo la GTP ciclohidrolasa I (GTPCH I) la enzima limitante de la velocidad. En condiciones de estrés oxidativo el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el ONOO<sup>-</sup> pueden reaccionar con el BH<sub>4</sub> formando dihidropterina (BH<sub>2</sub>). Esto conduce a una deficiencia de BH<sub>4</sub> y por lo tanto al desacoplamiento de eNOS (Li, *et al.*, 2013).



**Figura 1.** Producción del radical O<sub>2</sub><sup>-</sup> por el desacople de eNOS debido a la oxidación de la BH<sub>4</sub>. Modificado de Schmidt y cols (2007)

## **Disminución de enzimas antioxidantes**

Otro de los factores que pueden estar asociados al desarrollo de la hipertensión es la disminución en las enzimas que eliminan las ERO como son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión S-transferasa (GST) (Coudray, *et al*, 2008; Kizub, *et al*, 2014).

Las células pueden eliminar las ERO mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos, dentro de los sistemas enzimáticos, la SOD es la encargada de convertir los  $O_2^-$  en peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ). Existen tres tipos de SOD, las primeras dos se encuentran en el citosol y son: la SOD 1 que depende del cofactor zinc y la SOD 3 que depende del cofactor cobre. El tercer tipo es la SOD 2, la cual se encuentra en la mitocondria, siendo este organelo uno de los principales lugares en donde se producen ERO, especialmente por el complejo I y el complejo III de la cadena transportadora de electrones. La SOD 2 es dependiente del cofactor manganeso (Kizub, *et al*, 2014). Una vez que se obtiene el  $H_2O_2$ , este puede ser eliminado mediante la catalasa o la GPx, esta última utiliza al glutatión como agente reductor para eliminar el  $H_2O_2$  (Coudray, *et al*, 2008).

Varios estudios han demostrado que el AA y el ácido oleico pueden disminuir los niveles de glutatión reducido en cultivos de células humanas y modular genes de enzimas antioxidantes como la SOD, GPx y GST (Verlengia, *et al*, 2003).

## **2.3 Terapéutica de la hipertensión arterial**

Una de las principales recomendaciones para disminuir la hipertensión es restringir la ingesta calórica en 5 a 10 % y realizar actividad física. Estudios han comprobado que esto disminuye el peso corporal, estrés oxidativo, presión arterial y mejora la sensibilidad a la insulina entre otros (Baños, *et al*, 2011). Aunado a esto, se recomienda un tratamiento con fármacos los cuales están enfocados en aumentar la expresión y actividad de eNOS, disminuir el estrés oxidativo inhibiendo la expresión y actividad de la NOX y por último en inhibir a PKC (Forsterman, *et al*, 2010).

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales objetivos para los investigadores e instituciones de salud, es determinar las posibles causas en el desarrollo de la hipertensión arterial con el fin de encontrar tratamientos. Una alternativa terapéutica ha sido el uso de compuestos naturales, ya que estos tienen la ventaja de no tener efectos secundarios en el organismo; en la siguiente sección, se describirán algunos de los estudios que proponen a estos compuestos como tratamiento para disminuir la presión arterial.

### **2.3.1 Compuestos naturales como terapia alternativa**

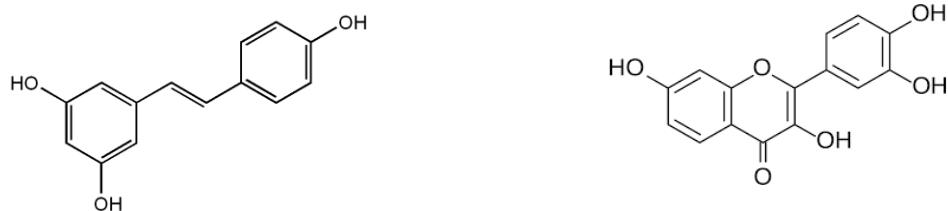
Se ha demostrado que las vitaminas, polifenoles y minerales, presentes en los frutos y vegetales, tienen capacidad antioxidante. Además, el uso de compuestos naturales se ha propuesto como una alternativa al uso de fármacos, tal es el caso de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* Linne), la cual se ha comprobado que incrementa la capacidad antioxidante celular, disminuye el estrés oxidativo y aumenta la actividad de eNOS en modelos de ratas con síndrome de Marfan (Pérez, *et al*, 2016). Estudios previos en el laboratorio han demostrado que la administración de una mezcla de RSV/QSC en una dosis de 50/0.95 mg/kg/día, respectivamente, disminuye los signos característicos del SM; estos son: el aumento en la presión arterial, RI, hiperinsulinemia, aumento en grasa visceral y dislipidemia (Peredo, *et al*, 2015).

### **2.3.2 Resveratrol y quercetina**

El resveratrol (3,5,4-trihidroxiestilbeno) (RSV) es un polifenol que se encuentra en los vinos, cacahuates, moras y uvas (Miatello, *et al*, 2005). En las plantas tiene la función de fitolaexina ya que las protege contra patógenos (Kapetanovic, *et al*, 2011). Se ha demostrado que el RSV puede tener efectos anticancerígenos, cardioprotectores, antioxidantes así como aumentar la esperanza de vida (Forsterman, *et al*, 2010).

La quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)- 3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-no) (QSC) es un compuesto polifenólico perteneciente a un grupo de compuestos llamados flavonoides. La QSC se puede encontrar en alimentos como el té, vino, cebollas y manzanas (Boer, *et al*, 2005). Los estudios realizados han comprobado que la QSC tiene efectos antioxidantes y antiinflamatorios, por esto se ha asociado principalmente con la prevención y el tratamiento

de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Russo, *et al*, 2012). En la siguiente figura se muestran las estructuras químicas del RSV y la QSC.



**Figura 2.** Estructuras químicas del RSV (izquierda) y QSC (derecha)

### Farmacocinética

Uno de los problemas que se presentan al momento de utilizar un compuesto como agente terapéutico es la eficacia que este puede tener sobre los blancos, para esto es muy importante conocer la biodisponibilidad del compuesto en el organismo. En el caso del RSV su actividad biológica puede ser limitada ya que su metabolismo es de primer paso. Se ha observado que la concentración sérica en animales de RSV es de 3  $\mu\text{M}$ , y esto se puede explicar ya que en el suero el RSV está conjugado como glucurónido o sulfato. Sin embargo, Chung (2012) explica que en tejidos como el músculo esquelético, se pueden expresar glucuronidasas las cuales pueden eliminar los conjugados y aumentar los niveles de RSV en el tejido. Por otra parte, se piensa que los efectos del RSV en los diferentes tejidos están afectados por el estado hepático del organismo.

La biodisponibilidad de la QSC dependerá de la forma en que se encuentre, esta puede ser de forma aglicona (sin grupos de azúcar) o glicosilada. La forma aglicona es absorbida a nivel intestinal por difusión pasiva debido a su naturaleza hidrofóbica, mientras que la forma glicosilada tiene que ser deglucosidada a nivel intestinal y/o en el transporte mediado por portadores. Posterior a esto, la QSC se puede metabolizar en el intestino delgado, el colon, el hígado y el riñón. En ese momento, la molécula se conjuga con grupos metilo, sulfato y ácido glucorónico para formar sus principales conjugados. Como resultado de la absorción y metabolismo la concentración de QSC en plasma es menor a 100 nM. Los metabolitos de QSC en tejidos de ratas se encuentran principalmente en pulmón y en el



caso de los cerdos las concentraciones más altas se encuentran en hígado y riñón (Russo, *et al*, 2012; Boer, *et al*, 2005).

### **2.3.3 Efecto del RSV/QSC en enfermedades cardiovasculares**

Se ha demostrado que el RSV previene la hipertrofia ventricular izquierda, en ratones alimentados con una dieta rica en grasas y sacarosa (Qin, *et al*, 2012). Sumado a esto se observó que el RSV mejora la recuperación funcional post-isquémica y reduce el tamaño del infarto de miocardio en los sistemas modelo (Dai, *et al*, 2007). En pacientes hipertensos en estadio 1, la administración de 730 mg de QSC/día durante 28 días, se asoció con presiones arteriales sistólica, diastólica y media, reducidas (Edwards, *et al*, 2007). De manera similar, en una población de 93 sujetos con sobrepeso u obesidad con características de SM en riesgo, la suplementación con 150 mg de QSC/ día durante 6 semanas disminuyó la presión arterial sistólica y las concentraciones plasmáticas de LDL oxidada (Egert, *et al*, 2009).

Maccha y colaboradores (2005) demostraron que la administración oral de una mezcla de baicaleína, flavona y QSC en una dosis de 10 mg/kg/día durante cuatro semanas disminuyó la presión arterial sistólica en un modelo en ratas espontáneamente hipertensas. Se aislaron los anillos de ratas y se observó que las ratas tratadas con la mezcla de flavonoides mostraron mayor relajación dependiente del endotelio con acetilcolina y nitroprusiato en comparación con las ratas que no recibieron el flavonoide, lo que sugiere que la QSC mejora las funciones endoteliales vasculares por medio de diferentes mecanismos. Además se ha demostrado que la QSC a una concentración de 5 y 10  $\mu$ M es capaz de activar a eNOS y a AMPK, aumentar las concentraciones de S-nitrosotioles y nitrito en el medio de cultivo celular en células del endotelio aórtico humano (HAEC) y en anillos de aorta de ratones C57BL. Estos datos sugieren el efecto benéfico que puede tener la QSC sobre las funciones de las células endoteliales y que pueden estar mediados a través de la AMPK (Shen, *et al*, 2012).

Uno de los factores que se han relacionado con el aumento en la presión arterial es el aumento en el estrés oxidativo. El RSV y la QSC pueden ejercer función antioxidante de forma indirecta activando ciertas moléculas que tienen funciones antioxidantes (Xia, *et al*,

2014). Algunos autores han publicado que el RSV es capaz de regular de manera positiva: las tres isoformas de SOD, GPx, catalasa, entre otras enzimas antioxidantes en tejidos cardiovasculares. Se piensa que este mecanismo puede estar mediado por SIRT 1 que activa a FOXO 1 y FOXO 3 río abajo, lo cual aumenta la expresión de estas enzimas (Zhang, *et al*, 2008; Xia, *et al*, 2013).

Diversos estudios se han realizado para conocer el mecanismo preciso por el cual actúa el RSV y la QSC en el sistema cardiovascular; sin embargo, se ha llegado a la conclusión de que estos compuestos tienen efectos pleiotropicos y pueden estar implicados en diversos cambios celulares (Chung, *et al*, 2012).

### **2.3.4 Efecto del RSV/QSC como moduladores epigenéticos (SIRTs)**

Tanto el RSV como la QSC se han caracterizado por actuar en blancos epigenéticos como son las SIRTs, a su vez estas enzimas se han asociado con la activación de ciertos mecanismos que disminuyen la presión arterial. Estudios han comprobado la existencia de compuestos activadores de sirtuinas (STAC) naturales y sintéticos. Dentro de los compuestos naturales se encuentra el RSV y la QSC, y su principal característica es aumentar la actividad de la SIRT 1 en 13 y 5 veces, respectivamente.

Además se ha observado en ratas con SM que la administración de una mezcla de RSV/QSC aumenta la expresión de las proteínas SIRT 1 y 2 en tejido adiposo (Peredo, *et al*, 2015). El aumento en la actividad de SIRTs se ha relacionado con activación alostérica, al disminuir la constante de Michaelis (Km) por los sustratos acetilados y por  $\text{NAD}^+$  (Howitz, *et al*, 2003; Haigis, *et al*, 2010). Se han encontrado otros mecanismos por los cuales el RSV puede activar a SIRT 1, uno de ellos es el publicado por Park y colaboradores (2012) quienes demostraron que el RSV inhibe las enzimas fosfodiesterasas (PDE) y activa a SIRT 1 mediante una cascada de señalización que involucra al adenosín monofosfato cíclico (AMPc), factor de cambio directamente activado por AMPc 1 (Epac1), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), calcio/calmodulina dependiente de cinasa  $\beta$  (CamKK $\beta$ ) y AMPK. La activación de AMPK mejora la disponibilidad de  $\text{NAD}^+$  para SIRT 1 al cambiar de hidratos de carbono a lípidos como fuente de energía principal y al mejorar la expresión de la enzima productora de  $\text{NAD}^+$  (Nampt) (Fulco, *et al*, 2008; Canto, *et al*, 2010).

Otro mecanismo es directo, donde el anillo trans estilbeno del RSV se une a la glutamina 230 en su dominio N-terminal aumentando así la actividad de SIRT 1 (Xia, *et al*, 2014; Hubbard, *et al*, 2013). Por otra parte, el RSV aumenta el nivel mitocondrial de NAD<sup>+</sup> mediante la estimulación directa del complejo I, lo que lleva a la activación de SIRT 3 (Desquiret, *et al*, 2013).

### **Características generales de las SIRTs**

La cromatina (ADN y proteínas) se encuentra empaquetada en nucleosomas, los cuales están formados por 146 pares de bases enrolladas alrededor de 4 pares de proteínas llamadas histonas (H3, H4, H2A, H2B), cuando existe división celular esta compactación ocurre a niveles superiores formando los cromosomas.

Por otra parte, cuando ocurre la transcripción, la cromatina se puede encontrar de forma laxa (eucromatina) o de forma compacta (heterocromatina). Cada estado dependerá del tipo y de las necesidades de la célula en ese momento, ya que si la cromatina se encuentra muy compactada los factores transcripcionales y la ARN polimerasa no podrán actuar sobre el ADN (Kubicek, *et al*, 2006). El proceso de regulación de la transcripción está dado por modificaciones en las histonas. Para permitir la transcripción y que la cromatina se mantenga laxa, las histonas se acetilan; por el contrario, cuando las histonas están desacetiladas la cromatina se compacta inhibiendo la transcripción del gen (Kouzarides, 2007). La acetilación de las histonas está dada por las enzimas llamadas histonas acetil transferasas (HAT) y la desacetilación por las SIRTs.

El nombre de sirtuinas proviene de las siglas en inglés “Silent Information Regulator Two” (Sir 2) y el sufijo -in de proteína. Las SIRTs forman parte de una familia de enzimas evolutivamente conservadas que se encuentran en un amplio rango de organismos desde las bacterias hasta los mamíferos. En los humanos existen siete tipos de SIRTs, cada una con localización subcelular, actividad enzimática y blancos diferentes. Las SIRTs pueden clasificarse en cuatro clases diferentes, esto de acuerdo al análisis filogenético de los 60 dominios nucleares en eucariotas (Feldman, *et al*, 2012; Houtkooper, *et al*, 2012). A continuación se muestra una tabla con las características principales de las SIRTs.

**Tabla 2.** Características principales de las SIRTs

| <b>Sirtuina</b> | <b>Clase</b> | <b>Localización intracelular</b> | <b>Proteínas blanco</b>           | <b>Función</b>                               |
|-----------------|--------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|
| <b>SIRT 1</b>   | I            | Núcleo                           | FOXO, PGC-1 $\alpha$ , LKB1, eNOS | Metabolismo/ Estrés                          |
| <b>SIRT 2</b>   | I            | Citoplasma                       | $\alpha$ -tubulina, H4,           | Ciclo celular                                |
| <b>SIRT 3</b>   | I            | Núcleo y mitocondria             | Ace-CS2, SOD 2,                   | Metabolismo/ Antioxidante                    |
| <b>SIRT 4</b>   | II           | Mitocondria                      | GDH                               | Secreción de insulina                        |
| <b>SIRT 5</b>   | III          | Mitocondria                      | CPS1                              | Ciclo de la urea                             |
| <b>SIRT 6</b>   | IV           | Núcleo (heterocromatina)         | DNA polimerasa $\beta$            | Reparación de escisión de bases, metabolismo |
| <b>SIRT 7</b>   | IV           | Núcleo y nucleolo                | RNA-polimerasa I                  | Transcripción de ADNr                        |

Las SIRTs son deacetilasas de histonas tipo III (HDAC III) ya que catalizan la deacetilación de proteínas con lisinas  $\epsilon$ -amino-acetiladas, utilizando como sustrato a  $\text{NAD}^+$  y esto es lo que las diferencia de las HDAC clase I, II y IV, que cuentan con un mecanismo catalítico dependientes de  $\text{Zn}^{2+}$  e independiente de  $\text{NAD}^+$ . Aunque se ha descubierto que las SIRTs 4 y 6 tienen actividad ADP-ribosiltransferasa (Haigis, *et al*, 2010; Chen, *et al*, 2015). La reacción que catalizan las SIRTs se realiza en dos etapas, la primera es una hidrólisis del enlace glicosídico entre  $\text{NAD}^+$  y la ADP-ribosa, la segunda etapa es una escisión del enlace C-N entre el grupo acetilo y la lisina del sustrato acetilado dando como productos la nicotinamida (NAM), O-acetil-ADP-ribosa (AADPR) y el sustrato deacetilado (Feldman, *et al*, 2012). En el presente trabajo nos enfocaremos en las SIRTs 1 y 3.

Otras de las características de las SIRTs son: actuar como sensores energéticos de la célula, contribuir a la estabilidad genómica, al silenciamiento transcripcional y en la reparación del

ADN. La actividad de deacetilación de las SIRTs se dirige a las proteínas histonas, a p53, FOXO y otros factores de transcripción (Pirola, *et al*, 2008).

### **SIRT 1**

La SIRT 1 es una de las enzimas más estudiadas en la familia de las SIRTs. Se encuentra localizada en el núcleo y en el tejido adiposo es capaz de reprimir al proliferador de peroxisoma- gamma (PPAR- $\gamma$ ), lo cual genera la movilización de las grasas y consecuente pérdida de peso (Borradaile, *et al*, 2009). Sumado a esto SIRT 1 controla la acetilación de los factores de transcripción FOXO (forkhead), que son reguladores de los lípidos y la glucosa, así como de la respuesta al estrés (Houtkooper *et al*, 2016). Por otro lado, estudios más recientes han demostrado en células endoteliales que la SIRT 1 tiene funciones homeostáticas importantes en el endotelio vascular. Zu y colaboradores (2010), demostraron que el aumento de SIRT 1, modifica la vía de señalización LKB1/AMPK, lo cual disminuye la senescencia de células endoteliales.

La SIRT 1 puede aumentar la expresión de eNOS mediante la deacetilación de los factores de transcripción FOXO en estudios *in vitro* e *in vivo*. Además, la SIRT 1 es capaz de deacetilar a eNOS en la lisina 496 y 506 lo cual aumenta su actividad. Sumado a esto, la SIRT 1 también regula positivamente a GTPCH 1 enzima limitante para la producción de BH<sub>4</sub> (Mattagajasingh, *et al*, 2007; Xia, *et al*, 2014). Por otra parte, se ha observado en ratones ancianos y obesos que un tratamiento con RSV mejora la reactividad vascular, la elasticidad aortica y la reducción del estrés oxidativo en la pared vascular. Una explicación a esto puede ser la relación directa que existe entre el RSV y la activación de la SIRT 1, ya que, se ha observado que un incremento en la actividad de SIRT 1 tiene un efecto en la disminución de p53, el cual reprime el daño al ADN en cultivos de VSMC (Gilblin, *et al*, 2015; Borradeile, *et al*, 2009).

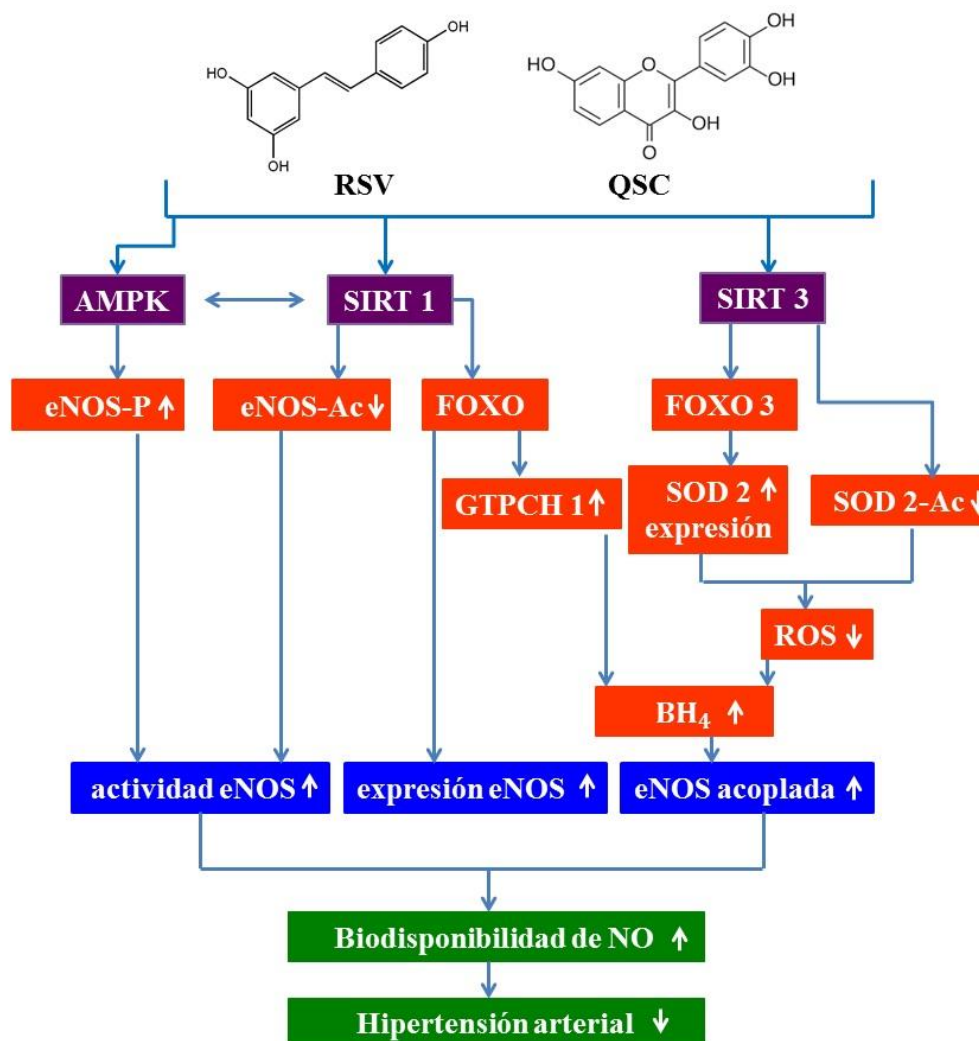
### **SIRT 3**

La SIRT 3 es una proteína deacetilasa ubicada en la mitocondria. Estudios han relacionado esta enzima con el control de la termogénesis adaptativa ya que aumenta la función mitocondrial en adipocitos marrones (Shi, *et al*, 2005). En fibroblastos cardiacos de ratón se describió que SIRT 3 inhibe la vía del factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ -Smad3)

en respuesta a la angiotensina II, esto se refleja en la mejora en la función cardiaca (Chen *et al*, 2014).

Por otro lado, se ha descrito la función de SIRT 3 en la disminución del estrés oxidativo, ya que estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que SIRT 3 es capaz de aumentar la expresión y actividad específica de SOD 2, mediante la activación de factores transcripcionales como FOXO 3 y por medio de la deacetilación en la lisina 68 de SOD 2 lo cual aumenta su actividad (Chen, *et al*, 2015; Sebastián, *et al*, 2012). Además, se ha descrito que aumenta la actividad de la isocitrato deshidrogenasa 2 (IDH2), lo que aumenta la proporción de glutatión reducido a oxidado y esto a su vez disminuye las especies reactivas de oxígeno (Lombard, *et al*, 2013).

En resumen, los antecedentes descritos sugieren que el tratamiento con RSV/QSC puede revertir el aumento en la presión arterial mediante la activación de blancos epigenéticos.



**Figura 3.** RSV y QSC como moduladores epigenéticos y su efecto en la biodisponibilidad del NO para el control en la presión arterial

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Es conocida la existencia de períodos críticos en el desarrollo, donde factores ambientales como la alimentación, pueden predisponer a la progenie a desarrollar enfermedades como son obesidad, diabetes e hipertensión arterial. Sumado a esto, se ha demostrado que un consumo prolongado de azúcares puede generar RI, incremento en la concentración de ácidos grasos libres, principalmente el ácido oleico y aumento en el estrés oxidativo. Estos elementos pueden disminuir la expresión y la actividad de eNOS, así como aumentar la cantidad de ERO las cuales disminuyen la biodisponibilidad del NO.

Se ha propuesto el uso de compuestos naturales como son el RSV y/o la QSC como tratamiento en las enfermedades cardiovasculares, ya que estos compuestos son capaces de activar a las SIRTs. Estas proteínas activan la expresión y actividad de eNOS y SOD 2 por la SIRT 1 y SIRT 3 respectivamente. Aunque se ha descrito un aumento en la predisposición a desarrollar hipertensión con cambios en la dieta durante periodos que abarcan la gestación y la lactancia en ratas, los cambios en la dieta en tiempos más cortos no se han determinado. Tampoco se conoce si los efectos pueden ser contrarrestados por un tratamiento rico en polifenoles en el momento en el que se establece la hipertensión de estos animales al llegar a la etapa adulta.

Por lo que en este proyecto se determinó el efecto del consumo de sacarosa durante un período corto cercano al destete en ratas y el efecto que éste tiene en el desarrollo de la hipertensión arterial en la etapa adulta. Además, se evaluaron los efectos de una mezcla RSV/QSC sobre los mecanismos postulados.

## **IV. HIPÓTESIS**

Las ratas que consuman agua con sacarosa presentarán aumento en la presión arterial asociada a resistencia a la insulina, aumento en la concentración de ácido oleico, aumento en el estrés oxidativo, así como disminución en la expresión de eNOS, SIRT 1 y 3. Esta condición se mantendrá en la etapa adulta.

El tratamiento con una mezcla de RSV/QSC en una dosis de 50 mg/kg/día y 0.95 mg/kg/día, respectivamente, disminuirá la presión arterial **elevada** en las ratas adultas, el estrés oxidativo y aumentará la expresión de las proteínas eNOS, SIRT 1 y 3 en aortas.

## **V. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del consumo de sacarosa por un período corto de tiempo (día 12 al 28) sobre la presión arterial en ratas neonatas y adultas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los mecanismos involucrados en cambios de la presión arterial en ratas neonatas y adultas.
- Evaluar la reversión de los efectos por la administración de una mezcla RSV/QSC.



## VI. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 6.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 12 días de edad, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez”. Los animales recibieron agua y alimento marca LabDiet 5001 *ad libitum* y se mantuvieron en condiciones de temperatura y ciclo de luz:oscuridad controladas. Los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de Atención de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" y se llevaron a cabo en conformidad con las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio descritas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 en congruencia con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Estados Unidos (USA).

### 6.2 Diseño experimental

- Ratas al finalizar el período crítico

Con el fin de conocer el estado fisiológico en el que se encontraban las ratas al finalizar el período crítico se utilizaron dos grupos cada uno conformado por 10 animales (n=10). El grupo Control (C) que recibió agua natural del día 12 al 28 y el grupo Período crítico (PC) que recibió agua con sacarosa al 30 % del día 12 al día 28. Ambos grupos se destetaron al día 21 y al llegar al día 28 se sacrificaron. A manera de resumen se muestra el siguiente esquema.



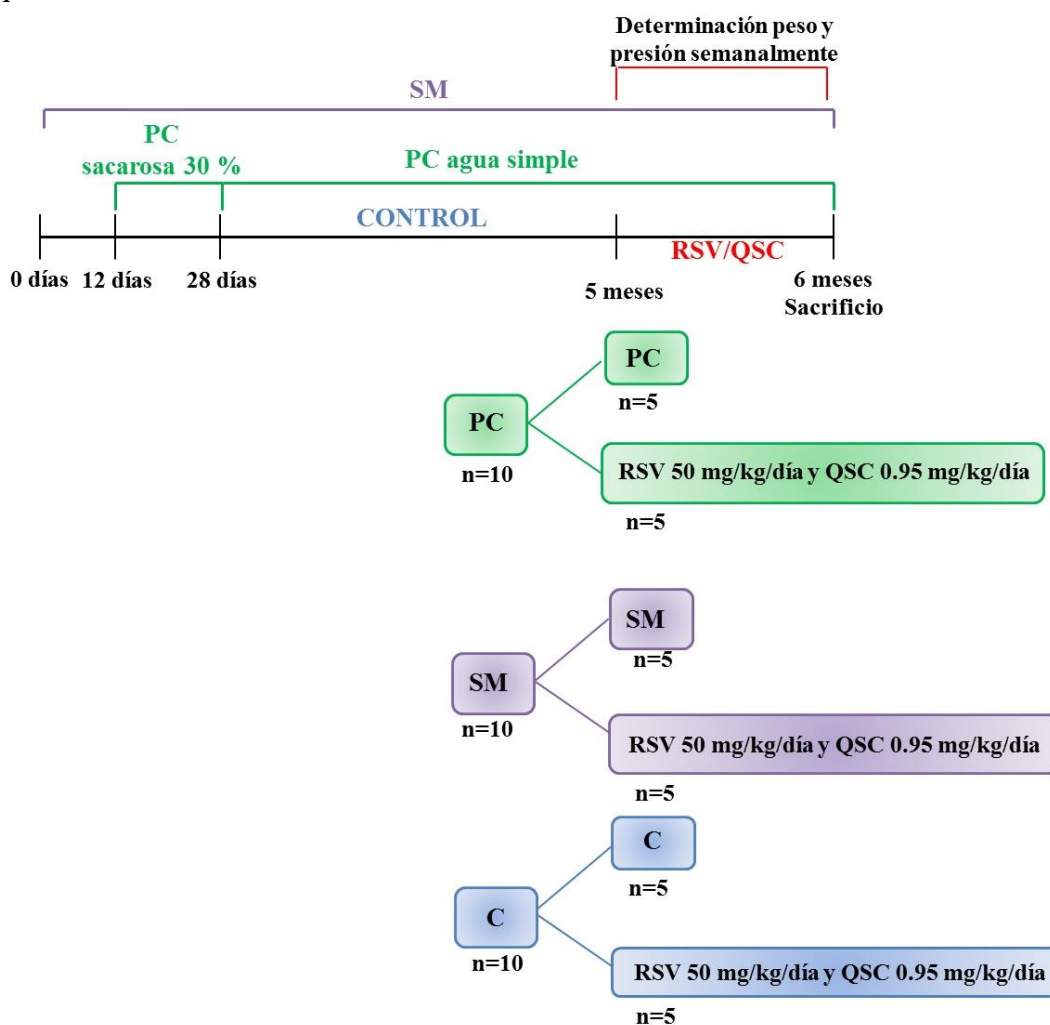
Figura 4. Esquema del diseño experimental para ratas neonatas

- Ratas adultas y tratamiento con la mezcla resveratrol/quercetina

Para conocer el efecto a largo plazo producido por la administración de sacarosa al 30 % durante los días 12 al 28 en ratas adultas, se utilizaron tres grupos, cada grupo conformado por 10 animales (n=10). El grupo Control (C), recibió agua natural hasta los 6 meses, el

grupo Síndrome metabólico (SM), el cual fue previamente caracterizado en el laboratorio y que sirvió como modelo de comparación, recibió agua con sacarosa al 30 % hasta los 6 meses y el grupo Período crítico (PC) que recibió agua con sacarosa al 30 % del día 12 al 28 y posteriormente recibió agua natural hasta los 6 meses. Los tres grupos fueron destetados al día 21. Cinco meses después cada grupo fue dividido en dos, la mitad de cada grupo siguió con el tratamiento asignado, mientras que la otra mitad recibió una mezcla de resveratrol/quercetina disuelta en etanol (0.2%) en el agua de bebida.

La mezcla de RSV/QSC se obtuvo a partir del producto comercial ResVitále, el cual contiene 20 mg de quercetina por cada 1 050 mg de resveratrol. La dosis utilizada fue de 50 mg/kg/día de RSV y de 0.95 mg/kg/día de QSC. Cada semana se determinó el peso de los animales con el fin de ajustar la dosis. A manera de resumen se muestra el siguiente esquema.



**Figura 5.** Esquema del diseño experimental para ratas adultas

### **6.3 Determinación de presión arterial sistólica**

- Ratas finalizando el período crítico

Los animales fueron previamente anestesiados con pentobarbital sódico en una concentración de 40 mg/kg/pc, se realizó una traqueotomía, posteriormente se introdujo un catéter en la carótida y se conectó a un transductor de presión y a un polígrafo. La presión se expresa en mmHg. La presión arterial se registró al minuto 1 y al minuto 10.

- Ratas adultas tratadas con la mezcla resveratrol/quercetina

La presión arterial sistólica fue medida a los 5 meses para conocer si los grupos de PC y SM presentaban una elevación en la presión arterial, así mismo se determinó la presión un mes después de administrado el tratamiento con RSV/QSC para conocer el efecto que estos compuestos tenían sobre la presión arterial. La determinación fue realizada mediante el uso de un brazalete en la cola de los animales conscientes, que está conectado a un transductor de pulso neumático (Narcobio-systems, Inc., Healthdyne. CO, EUA) y a un electroesfingomanómetro programado.

### **6.4 Determinación del consumo energético**

Para comparar el consumo de agua y alimento en kcal de las ratas control contra las ratas que reciben agua con sacarosa al 30 % finalizando el período crítico, se utilizaron jaulas metabólicas. Cada rata fue colocada de manera individual un período de 48 h (24 h de adaptación y 24 h para la evaluación del consumo energético). Se midió el volumen del líquido colocado en los bebedores y se pesaron 45 g de alimento, 24 h después se midió el volumen y se pesó el alimento sobrante, mediante una resta se determinó la cantidad de líquido y alimento consumido. Para evaluar el consumo energético, se consideró que 100 g de alimento Rodent Diet 5001 aporta 156.5 kcal y 100 mL de agua con sacarosa al 30% aportan 120 kcal. Se utilizaron 6 ratas de cada grupo de 27 días de edad.

## **6.5 Determinación parámetros bioquímicos en suero**

### **6.5.1 Obtención de suero**

Se dejaron las ratas en ayuno 12 h previas al sacrificio (decapitación). Se recolectó la sangre y se dejó en reposo para que se formara un coágulo. Posterior a esto, se obtuvo el suero mediante centrifugación a 2 250 rpm durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente se separó el suero y guardó a - 20 ° C hasta su utilización.

### **6.5.2 Determinación de glucosa, TG y colesterol total en suero**

La determinación de glucosa, TG y colesterol total en suero se determinó por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales (Pointe scientific).

### **6.5.3 Determinación de insulina en suero**

La concentración de insulina en suero se determinó mediante un ensayo de Radioinmunoanálisis (RIA), con un estuche comercial específico para ratas (Linco Research, Inc, MO, EUA) con una sensibilidad de 0.1 ng/mL.

### **6.5.4 Cálculo del índice HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment of insulin Resistance)**

Para calcular el índice que indica si existe RI (HOMA-IR) a partir de las determinaciones de glucosa e insulina en suero. Se utilizó la fórmula publicada por Matthews y colaboradores (1985).

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

### **6.5.5 Índice de tolerancia a la insulina**

Para realizar la curva de tolerancia a la insulina se utilizaron 6 animales de cada grupo, dejándolos en ayuno por 12 h previas al estudio. Se pesaron a los animales para determinar la concentración de insulina administrada que se mezcló con solución fisiológica para obtener un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ , el cual fue inyectado de forma intraperitoneal y que corresponde a una concentración de 1U/kg pc.

La concentración de glucosa fue determinada en sangre obtenida mediante una pequeña incisión en la cola de los animales utilizando un glucómetro de tiras reactivas (Abbot, Free Style Optium, UK). La determinación de glucosa se realizó al tiempo cero (previa a la inyección de insulina) y posteriormente al minuto 15, 30, 60, 90 y 120. Se graficó en porcentaje de cambio de concentración de glucosa.

#### **6.5.6 Determinación de colesterol HDL y colesterol no HDL en suero**

Se determinó el C-HDL y no-HDL mediante ultracentrifugación secuencial del plasma a una densidad de 1.063 g/mL por 2.5 h a 436 000 xg (Beckman óptima TLX) (Peredo, 2015; Pérez y García, 2007).

La concentración de colesterol no-HDL se determinó mediante la resta del colesterol total menos el C-HDL. Cabe mencionar que el colesterol no-HDL incluye el colesterol LDL, IDL y VLDL.

#### **6.5.7 Determinación del perfil de ácidos grasos libres en suero**

El perfil de ácidos grasos libres en suero se determinó mediante cromatografía de gases. Para esto se utilizaron 200  $\mu$ L de cada muestra y se añadieron 100  $\mu$ L de estándar interno (ácido heptadecanoico; 1mg/mL). Para extraer los lípidos de la muestra se utilizó el método de Folch, *et al.* 1957. Posteriormente se derivatizó la muestra, añadiendo 1 mL de 2, 2 metoxipropano y 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para efectuar la reacción, se agregó 1 mL de NaCl 5% y 2 mL de hexano. Se centrifugó a 3000 rpm durante 4 min. Se recuperó la fase orgánica y se evaporó a sequedad utilizando un flujo de nitrógeno. Para inyectar la muestra en el cromatógrafo, se resuspendió la muestra en hexano y se inyectaron 4  $\mu$ L en el cromatógrafo de gases. Los resultados fueron expresados como porcentaje de cada ácido graso.

## **6.6 Extracción de proteína de la aorta torácica**

### **6.6.1 Determinación de proteína**

Se maceró la aorta torácica utilizando nitrógeno líquido y se homogenizó con ayuda de una jeringa en un buffer de lisis (Hepes 25mM, NaCl 100 mM, Imidazol 15 mM, Glicerol 10 %, Triton 100x 1 %, desoxicolato de sodio 19.1 mM, floruro de sodio 0.1 mM, O-vanadato 0.001 mM, Inhibidor de proteasas marca Amresco, pH: 8.0). Posteriormente se mantuvo en agitación suave a 4 °C por 1 h, seguido de esto se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se mantuvo en congelación hasta su uso.

### **6.6.2 Determinación de expresión proteica por Western Blot**

Se utilizó el volumen equivalente a 50 µg de proteína de cada muestra por ensayo. La electroforesis se realizó en geles de acrilamida/bis-acrilamida (30% : 8%) de concentración fija al 8 % , 10% y 15 % a 100 V. Una vez terminado el tiempo de corrida, los geles se transfirieron a membranas de floruro de polivinilideno por el método de Towin (1979) a 400 mV durante 1h 40 minutos para el gel al 8%, 1 h 20 minutos para el gel al 10 % y durante 1 h 5 minutos en los geles al 15%.

Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % en TBS-tween 0.1 % durante 50 minutos a temperatura ambiente. Seguido de ésto, las membranas se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche en agitación constante a una temperatura de 4 °C. Los anticuerpos utilizados fueron SIRT 1, SIRT 3, SOD 1, SOD 2, eNOS y GAPDH. Todos se emplearon en una dilución 1:1000. Posteriormente las membranas se incubaron con inmonoglobulina G conjugada con peroxidasa de rábano en una dilución 1:10 000, durante toda la noche en agitación constate y a una temperatura de 4 °C. Las membranas se revelaron por el método de quimioluminiscencia “Immobilon Western Chemiluminiscent HRP” y fueron expuestas a placas de rayos X en oscuridad. Para la normalización de los datos las membranas se incubaron con el anticuerpo GAPDH, como control de carga. La semicuantificación de las bandas se determinó mediante el densitómetro (Bio-Rad GS-800) y el programa Quantity One 4.6. El valor de cada proteína fue calculado a partir de la

expresión de su GAPDH correspondiente. Los valores se graficaron como unidades arbitrarias (UA).

### **6.6.3 Determinación de compuestos de lipoperoxidación**

En un tubo se añadió el equivalente a 100 µg de proteína de cada muestra, 1 mL de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.15 M) y 50 µL de BHT. Posteriormente se introdujeron los tubos en un baño de agua caliente (37 °C) durante 30 min en agitación constante y se agregaron 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8 % y 1 mL de ácido acético al 20 %. Posterior a esto, se introdujeron los tubos en agua en ebullición durante 1 h, al término de la hora se añadió 1 mL de solución salina y se agitó por 15 segundos; se agregó 1.5 mL de butanol y se agitó por 20 segundos. Posteriormente, se centrifugó a 2 500 rpm durante 4 minutos. Finalmente, se recuperó la fase orgánica y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm. Los valores fueron expresados como nmol de malondialdehído / mg de proteína.

### **6.6.4 Determinación de capacidad antioxidante no enzimática**

En un tubo eppendorf se colocó el equivalente a 100 µg de proteína de cada muestra, se añadió 1 mL de la mezcla acetato de sodio (300 mM): 2,4,6 Tris (10 mM) : Cloruro férrico (20 mM) en una proporción 10:1:1. Se introdujeron las muestras en un baño de agua a una temperatura de 37 °C durante 15 minutos en agitación constante. Terminado el tiempo, se centrifugó a 5 000 rpm por 2.30 minutos. Finalmente se leyó en el espectrofotómetro a 593 nm. Los resultados fueron expresados como nmol de alfa-tocoferol/ mg de proteína.

## **6.7 Análisis estadístico**

Los valores se describieron como la media  $\pm$  error estándar como se indica en cada pie de figura o tabla. Para comparar tres grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Fisher. Para la comparación de dos grupos se utilizó la prueba t-student. Esto con el fin de determinar si existía diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$  o  $P < 0.001$ ) en los grupos de estudio. El programa utilizado fue SigmaPlot 12.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Efectos del consumo de sacarosa al finalizar el período crítico

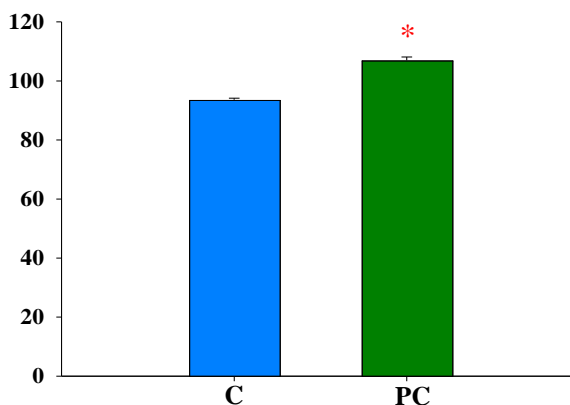
#### 7.1.1 Características generales en el modelo PC

En la tabla 3 se presentan las características generales del modelo PC, donde se puede observar que las ratas que recibieron sacarosa consumieron menos agua y alimento que las ratas C. Sin embargo, el consumo calórico fue mayor en las ratas pertenecientes al grupo PC, paradójicamente el peso de las ratas que consumieron sacarosa fue menor. Además, no se observó una diferencia significativa en la cantidad de grasa visceral.

**Tabla 3.** Características generales del grupo PC

|                          | C           | PC                   |
|--------------------------|-------------|----------------------|
| Peso corporal (g)        | 128 ± 2     | <sup>a</sup> 108 ± 2 |
| Grasa visceral (mg)      | 451.3 ± 0.1 | 461.3 ± 0.1          |
| Consumo líquido (mL/día) | 34 ± 1      | <sup>a</sup> 21 ± 1  |
| Equivalente kcal         | 0           | 25 ± 1               |
| Consumo alimento (g/día) | 15 ± 1      | <sup>a</sup> 8 ± 1   |
| Equivalente kcal         | 24 ± 2      | <sup>a</sup> 13 ± 1  |
| Total kcal               | 24 ± 2      | <sup>a</sup> 38 ± 2  |

En cuanto a los valores de presión arterial se aprecia en la figura 6 que el grupo PC mostró un aumento significativo con respecto al grupo C.



**Figura 6.** Efecto del consumo de sacarosa al 30% durante el período crítico en la presión arterial. Los valores son medias ± error estándar. n=16 por grupo. \*P<0.001 C: Control PC: Período crítico



### 7.1.2 Efecto del consumo de sacarosa en la resistencia a la insulina

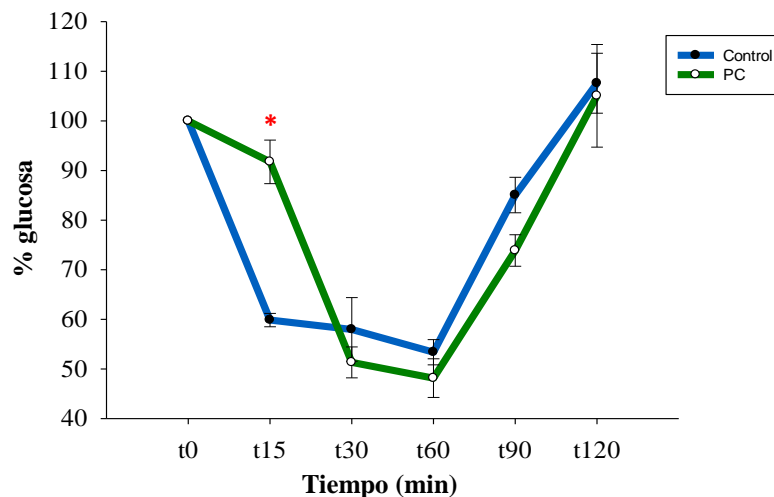
En tabla 4 se muestran las determinaciones de los niveles de glucosa e insulina en suero, observando que no hubo diferencia significativa entre el grupo PC y el grupo C. Con estos datos se calculó el índice HOMA para determinar el índice RI, el cual no presentó diferencia significativa.

**Tabla 4.** Parámetros relacionados con la RI

|                   | <b>C</b>      | <b>PC</b>     |
|-------------------|---------------|---------------|
| Glucosa (mg/dL)   | 62 ± 4        | 58.90 ± 3.3   |
| Insulina ( μU/mL) | 0.9268 ± 0.2  | 0.5738 ± 0.1  |
| HOMA-IR           | 0.1849 ± 0.04 | 0.0895 ± 0.02 |

Los valores son medias ± error estándar. n=16 por grupo. C: Control, PC: Período crítico HOMA-IR: Homeostatic model assesment of insulin resistance.

Se calculó el índice de tolerancia a la insulina; en la figura 7 se puede apreciar que el grupo PC presenta una tendencia a la RI, ya que en los 15 minutos posteriores a la inyección de insulina la concentración de glucosa se mantiene elevada y no es hasta el minuto 30 donde los valores se igualan con el grupo C.



**Figura 7.** Efecto del consumo de sacarosa al 30% durante el periodo crítico en el índice de tolerancia a la insulina. Los valores son medias ± error estándar. n=6 por grupo. \* P<0.05 C: Control, PC: Período crítico

### 7.1.3 Efecto del consumo de sacarosa en el perfil lipídico y concentración de ácidos grasos libres

Se determinó el perfil lipídico sérico, observando que las ratas correspondientes al PC no mostraron cambios en cuanto al colesterol total y C-No HDL, mientras que los TG presentaron un aumento en su concentración y el C-HDL una disminución significativa con respecto al grupo C.

**Tabla 5.** Perfil lipídico sérico

|                          | C      | PC                    |
|--------------------------|--------|-----------------------|
| TG (mg/dL)               | 75 ± 5 | <sup>a</sup> 120 ± 11 |
| Colesterol total (mg/dL) | 84 ± 5 | 82 ± 4                |
| C-HDL (mg/dL)            | 25 ± 1 | <sup>a</sup> 19 ± 2   |
| C-No HDL (mg/dL)         | 59 ± 4 | 63 ± 5                |

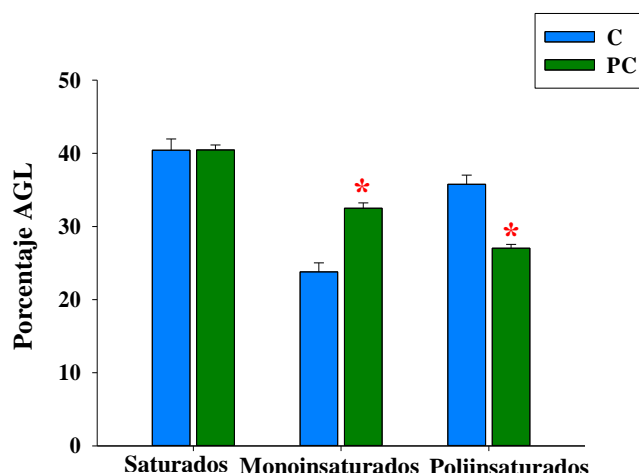
Los valores son medias ± error estándar. n=16 por grupo <sup>a</sup>P<0.05 C: Control, PC: Período crítico C-HDL: Colesterol asociado a proteínas de alta densidad, C-No HDL: Colesterol no HDL.

En cuanto al perfil de ácidos grasos libres, en la figura 8 se observa que las ratas PC presentaron un aumento en la concentración de ácidos grasos monoinsaturados y una disminución en los ácidos grasos poliinsaturados con respecto al grupo C, mientras que los ácidos grasos saturados no mostraron cambio entre ambos grupos. De manera particular, en la tabla 6 se puede apreciar que el grupo PC mostró un aumento en el ácido oleico, así como una disminución en los ácidos esteárico y linoleico comparado con el grupo C.

**Tabla 6.** Composición AGL en suero

| Ácido graso (%) | C      | PC                      |
|-----------------|--------|-------------------------|
| Palmítico       | 27 ± 1 | 30 ± 1                  |
| Esteárico       | 13 ± 1 | <sup>a</sup> 11 ± 1     |
| Oleico          | 18 ± 3 | <sup>a</sup> 23 ± 1     |
| Linoleico       | 15 ± 1 | <sup>a</sup> 12.2 ± 0.4 |
| Araquidónico    | 9 ± 1  | 7 ± 1                   |

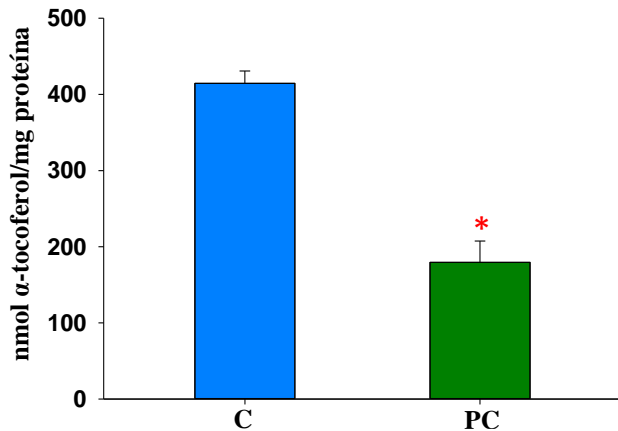
Los valores son medias ± error estándar. n=16 por grupo <sup>a</sup>P<0.05 C: Control, PC: Período crítico



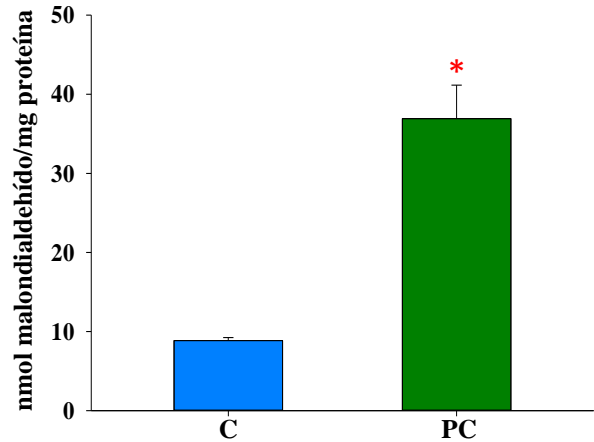
**Figura 8.** Perfil AGL en suero. Los valores son medias ± error estándar. n=16 por grupo <sup>a</sup>P<0.001 C: Control, PC: Período crítico

### 7.1.4 Efecto del consumo de sacarosa en el estrés oxidativo

Para conocer el efecto del consumo de sacarosa en el estrés oxidativo se determinó en homogenado de aorta la capacidad antioxidante no enzimática ( $\alpha$ -tocoferol), observando en la figura 9 que el grupo PC mostró una disminución respecto al grupo C; la concentración de compuestos de lipoperoxidación (malondialdehído) se aprecian aumentados en los animales del grupo PC comparada con los animales del grupo C (figura 10).

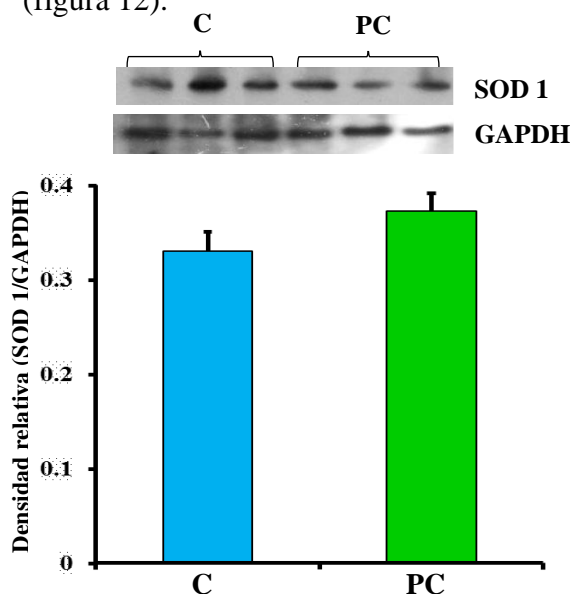


**Figura 9.** Capacidad antioxidante en homogenado de aorta. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=16 por grupo \*P<0.001. C: Control, PC: Período crítico

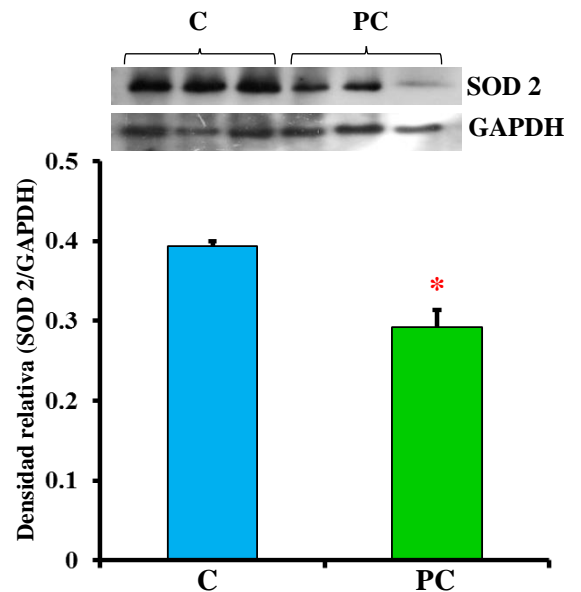


**Figura 10.** Producto de lipoperoxidación en homogenado de aorta. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=16 por grupo. \*P<0.001. C: Control, PC: Período crítico

Con respecto a la capacidad antioxidante enzimática se determinó la expresión de las proteínas SOD 1 y SOD 2, donde se observa que la única que mostro una reducción significativa en su expresión fue la SOD 2 en el grupo PC con respecto al grupo C (figura 12).



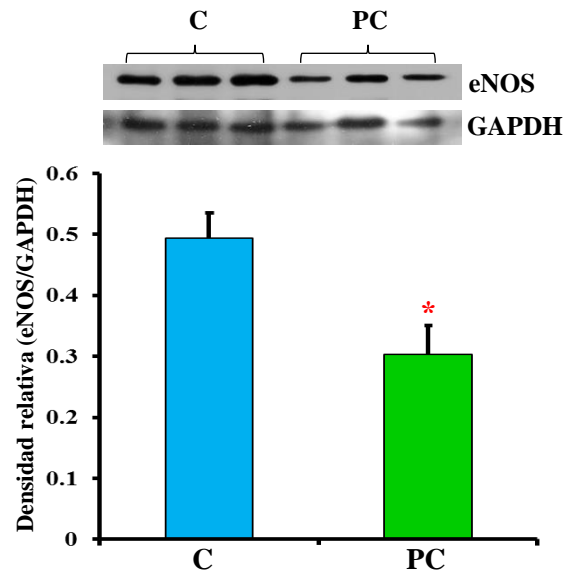
**Figura 11.** Efecto del consumo de sacarosa al 30% durante el período crítico en expresión de SOD 1. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=6 por grupo. C: Control, PC: Período crítico



**Figura 12.** Efecto del consumo de sacarosa al 30% durante el período crítico en expresión de SOD 2. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=6 por grupo. \*P< 0.05. C: Control, PC: Período crítico

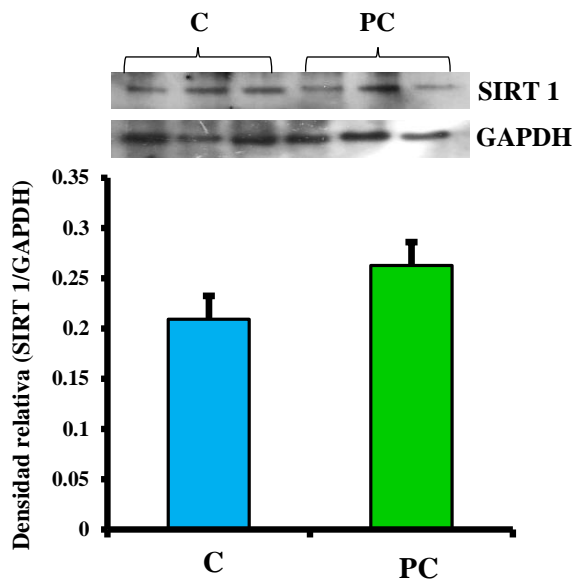
### 7.1.5 Efecto del consumo de sacarosa en la expresión de eNOS y su regulación por factores epigenéticos

Para conocer si el consumo de sacarosa influía en la expresión de las proteínas eNOS, SIRT 1 y SIRT 3, se realizaron los siguientes western blot. En la figura 13 se observa que la expresión de eNOS en el grupo PC disminuye significativamente con respecto al grupo C.

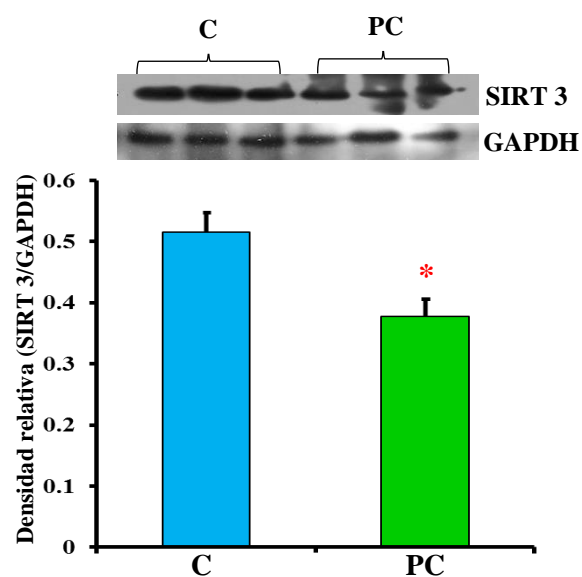


**Figura 13.** Efecto del consumo de sacarosa al 30 % durante el período crítico en la expresión de eNOS. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=6 por grupo. \*P<0.05. C: Control, PC: Período crítico

En cuanto a la expresión de SIRT 1, los resultados muestran que tanto las aortas de los animales C como los del grupo PC expresan la SIRT 1 en la misma proporción (figura 14). En cuanto a la expresión de SIRT 3 se observó una disminución significativa del grupo PC con respecto al grupo C (figura 15).



**Figura 14.** Efecto del consumo de sacarosa al 30 % durante el período crítico en expresión de SIRT 1. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=6 por grupo. C: Control, PC: Período crítico



**Figura 15.** Efecto del consumo de sacarosa al 30 % durante el período crítico en la expresión de SIRT 3. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=6 por grupo. \*P<0.05. C: Control, PC: Período crítico

## 7.2 Efecto de la administración de la mezcla RSV/QSC después del consumo de sacarosa durante el período crítico sobre el desarrollo de la hipertensión arterial en ratas adultas

### 7.2.1 Características generales de las ratas adultas en el modelo PC

De manera paralela, el grupo PC se estudió hasta llegar a la edad adulta (6 meses) y se comparó con un grupo C y un grupo SM, el cual fue previamente caracterizado en el laboratorio (Peredo, 2015) con el fin de observar las similitudes que se presentan por un consumo prologando de sacarosa.

En los animales adultos, se estudiaron los mismos mecanismos asociados al aumento de la presión arterial que se evaluaron en las ratas de 28 días de edad. Es decir, parámetros bioquímicos, RI, perfil de ácidos grasos libres y presencia de estrés oxidativo. De forma adicional, se quiso identificar si en este modelo, la administración de la mezcla de RSV/QSC (en una dosis de 50/0.95 mg/kg/día respectivamente) era eficaz para reducir la presión arterial.

Para caracterizar los modelos se determinó el peso corporal, la presión y parámetros bioquímicos séricos. Estos resultados se muestran en la tabla 7. El grupo con SM presenta

elevación en la presión arterial, aumento en la grasa visceral, hiperinsulinemia, RI (HOMA-IR) y un aumento en la concentración de TG con respecto al grupo C. El grupo PC presentó una elevación en la presión arterial con respecto al grupo C, así como una disminución significativa en la concentración de insulina y TG, además presentó un aumento en el C-HDL con respecto al grupo SM.

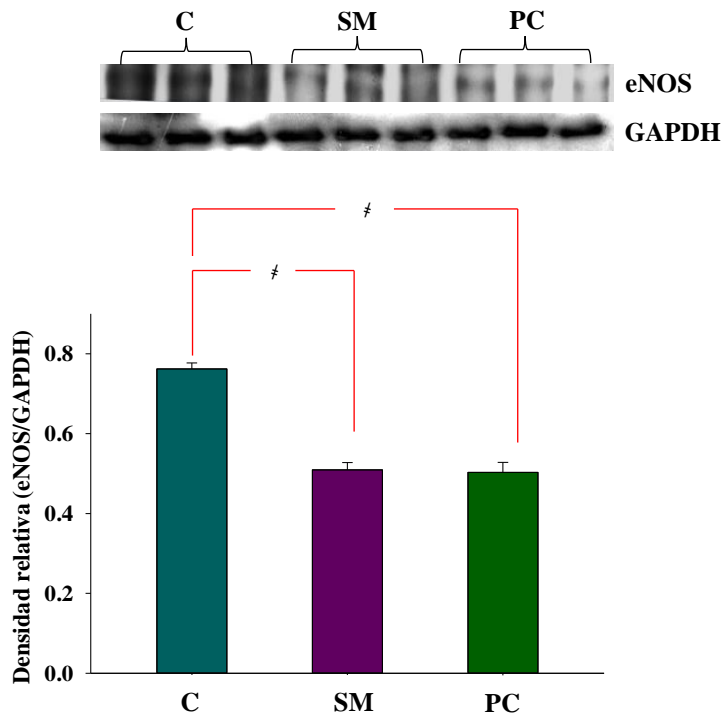
**Tabla 7.** Parámetros generales y parámetros bioquímicos en SM y PC

|                          | <b>C</b>  | <b>SM</b>              | <b>PC</b>            |
|--------------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| Presión (mmHg)           | 105 ± 2   | <sup>a</sup> 126 ± 4   | <sup>a</sup> 126 ± 4 |
| Glucosa (mg/dL)          | 101 ± 5   | 101 ± 5                | 93 ± 4               |
| Insulina (μU/mL)         | 8 ± 1     | <sup>a</sup> 14 ± 1    | <sup>b</sup> 10 ± 1  |
| HOMA-IR                  | 1.4 ± 0.2 | <sup>a</sup> 2.5 ± 0.3 | 2.0 ± 0.2            |
| Peso corporal (g)        | 509 ± 4   | 420 ± 5                | 496 ± 5              |
| Grasa visceral (g)       | 4.1 ± 0.4 | <sup>a</sup> 10 ± 1    | 4.2 ± 0.4            |
| TG (mg/dL)               | 67 ± 10   | <sup>a</sup> 127 ± 8   | <sup>b</sup> 47 ± 5  |
| Colesterol total (mg/dL) | 51 ± 4    | 55 ± 5                 | 62 ± 4               |
| C-HDL (mg/dL)            | 26 ± 2    | 20 ± 2                 | <sup>b</sup> 34 ± 3  |
| C-No HDL (mg/dL)         | 24 ± 2    | 32 ± 4                 | 26 ± 2               |

Los valores son medias ± error estándar. n=10 por grupo. <sup>a</sup>P<0.05 vs C, <sup>b</sup>P<0.05 vs SM. C: Control, SM: Síndrome metabólico, PC: periodo crítico.

### 7.2.2 Efecto del consumo de sacarosa en la expresión de la proteína eNOS

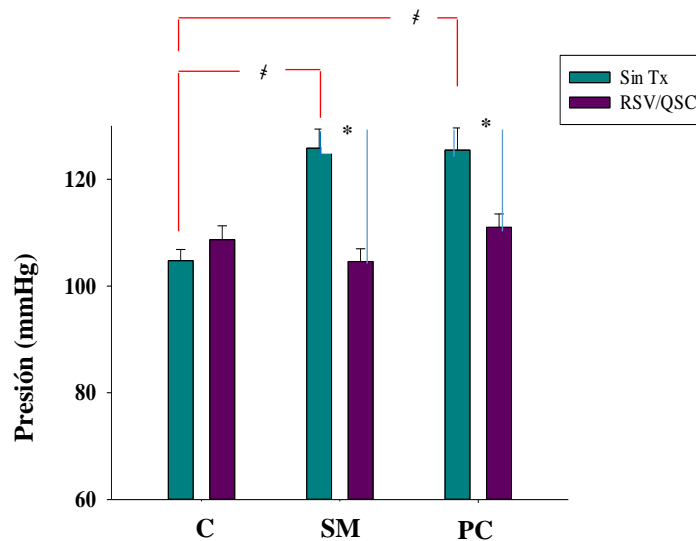
En la figura 16 se observa que el grupo PC mostró una disminución significativa en la expresión de eNOS con respecto al grupo C, la cual se asemeja a la disminución en la expresión de esta proteína en el grupo SM.



**Figura 16.** Expresión de eNOS en los grupos experimentales. Los valores son medias  $\pm$  error estándar.  $n=6$  por grupo.  $\#P<0.05$  vs C, C: Control, SM: Síndrome metabólico, PC: periodo crítico.

### 7.2.3 Efecto en la presión arterial

En la figura 17 se observa que tanto el grupo PC como el grupo SM presentan un aumento en la presión arterial con respecto al grupo C, este incremento se vio atenuando de manera significativa en ambos grupos después de un mes de recibir la mezcla RSV/QSC.



**Figura 17.** Efecto de la mezcla RSV/QSC en la presión arterial. Los valores son medias  $\pm$  error estándar.  $n=10$  por grupo.  $\#P<0.05$  vs C, \* $P<0.05$  vs mismo grupo sin tratamiento. C: Control, SM: Síndrome metabólico, PC: periodo crítico. RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento

### 7.2.4 Efecto en la resistencia a la insulina.

En la tabla 8 se puede apreciar que el grupo SM presenta un incremento en la concentración de insulina e índice HOMA-IR con respecto al grupo C, estos valores disminuyen significativamente posterior al tratamiento con RSV/QSC. En el caso del grupo PC se observa que después del tratamiento se atenúa significativamente la concentración de insulina mostrando valores equiparables al grupo C.

**Tabla 8.** Efecto de la mezcla RSV/QSC en los parámetros involucrados con la RI

|                  | C         | C RSV/QSC | SM                     | SM RSV/QSC             | PC                  | PC RSV/QSC         |
|------------------|-----------|-----------|------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|
| Glucosa (mg/dL)  | 111 ± 5   | 88 ± 6    | 101 ± 5                | 89 ± 6                 | 93 ± 4              | 71 ± 4             |
| Insulina (μU/mL) | 8 ± 1     | 8 ± 1     | <sup>a</sup> 14 ± 1    | <sup>b</sup> 9 ± 1     | <sup>b</sup> 10 ± 1 | <sup>c</sup> 8 ± 1 |
| HOMA-IR          | 1.4 ± 0.2 | 1.5 ± 0.2 | <sup>a</sup> 2.5 ± 0.3 | <sup>b</sup> 1.6 ± 0.3 | 2.0 ± 0.2           | 1.6 ± 0.2          |

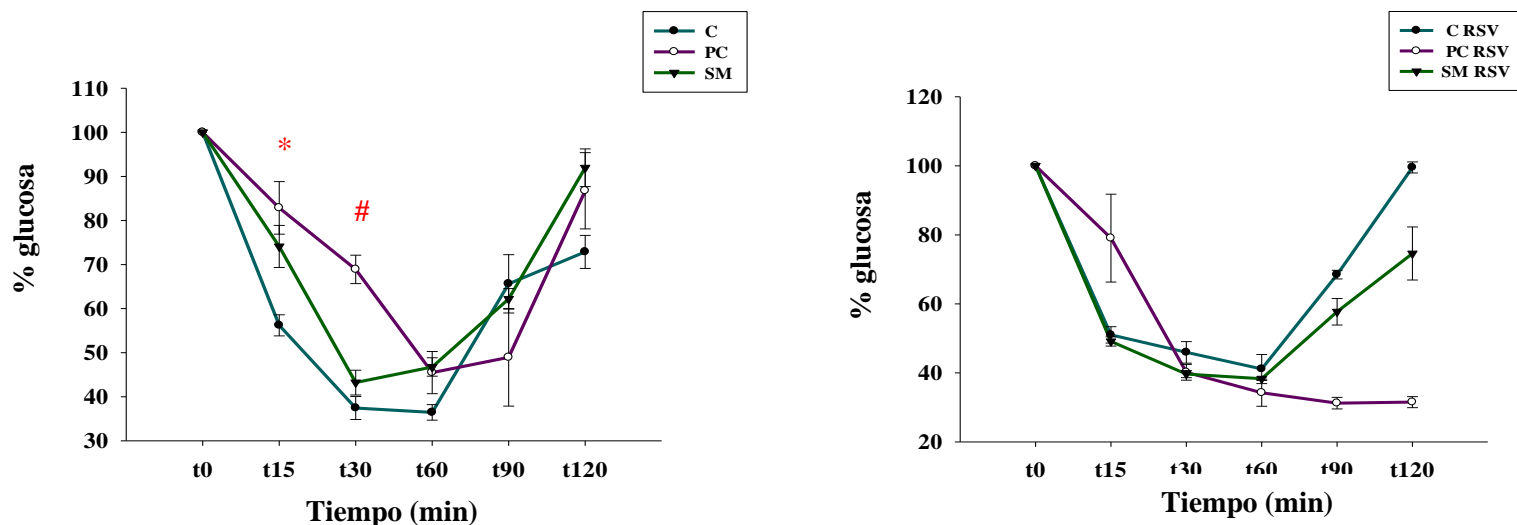
Los valores son medias ± error estándar. n=10 por grupo. <sup>a</sup>P<0.05 vs C, <sup>b</sup>P<0.05 vs SM, <sup>c</sup>P<0.005 vs PC. C: Control, SM: síndrome metabólico PC: período crítico, RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día

Como se observa en la tabla 8 los valores de insulina e índice HOMA del grupo PC presentan una tendencia a incrementarse comparados con el grupo C. Para comprobar la RI en el grupo PC y el efecto que tiene la administración de la mezcla RSV/QSC sobre este parámetro se realizó el índice de tolerancia a la insulina.

En el panel A de la figura 18 se puede apreciar que existe una tendencia en la disminución a la sensibilidad a la insulina en el grupo PC ya que la concentración de glucosa en el minuto 15 y 30 fue significativamente mayor con respecto al grupo C posterior a la inyección de insulina. En el caso del grupo SM se observa que la concentración de glucosa fue mayor solo en el minuto 15 posterior a la inyección de insulina. Ambos grupos mostraron un comportamiento similar al grupo C a partir del minuto 60 y hasta el minuto 120.

En el panel B de la figura 18 se presenta el efecto de la administración de la mezcla RSV/QSC sobre los grupos experimentales, observando que después de un mes de tratamiento los grupos PC y SM mejoraron la sensibilidad a la insulina, ya que ambos grupos presentan un comportamiento similar al grupo C. A pesar de que el grupo PC muestra una concentración mayor de glucosa al minuto 15 después de la inyección de insulina, este valor no es significativo.





### 7.2.5 Efecto sobre el peso corporal, perfil lipídico y ácidos grasos libres.

Para conocer el efecto del tratamiento con RSV/QSC en el peso corporal, se determinó el peso de las ratas así como la cantidad de grasa visceral, observando que el peso fue similar en todos los grupos. Sin embargo, el grupo SM presentó una disminución significativa en la cantidad de grasa visceral posterior al tratamiento, en cuanto al grupo PC se pueden apreciar valores similares al grupo C (tabla 9)

**Tabla 9.** Efecto de la mezcla RSV/QSC en el peso corporal

|                    | C             | C RSV/QSC    | SM                      | SM RSV/QSC             | PC            | PC RSV/QSC   |
|--------------------|---------------|--------------|-------------------------|------------------------|---------------|--------------|
| Peso corporal (g)  | 509 $\pm$ 4   | 503 $\pm$ 13 | 420 $\pm$ 5             | 460 $\pm$ 24           | 496 $\pm$ 5   | 485 $\pm$ 14 |
| Grasa visceral (g) | 4.1 $\pm$ 0.4 | 5 $\pm$ 1    | <sup>a</sup> 10 $\pm$ 1 | <sup>b</sup> 6 $\pm$ 1 | 4.2 $\pm$ 0.4 | 5 $\pm$ 1    |

Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=10 por grupo. <sup>a</sup>P<0.05 vs C, <sup>b</sup>P<0.05 vs SM. C: Control, SM: Síndrome metabólico PC: Período crítico, RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día

Por otra parte se puede observar en la tabla 10 una disminución de los TG así como del C-No HDL en el grupo SM. En cuanto al grupo PC no se presentan cambios significativos.

**Tabla 10.** Efecto de la mezcla RSV/QSC en el perfil lipídico

|                          | C       | C RSV/QSC  | SM                   | SM RSV/QSC          | PC     | PC RSV/QSC |
|--------------------------|---------|------------|----------------------|---------------------|--------|------------|
| TG (mg/dL)               | 67 ± 10 | 58 ± 7     | <sup>a</sup> 127 ± 8 | <sup>b</sup> 95 ± 4 | 47 ± 5 | 56 ± 4     |
| Colesterol total (mg/dL) | 51 ± 4  | 52 ± 4     | 55 ± 5               | 50 ± 4              | 62 ± 4 | 68 ± 4     |
| C-HDL (mg/dL)            | 26 ± 2  | 29 ± 2     | 20 ± 2               | 22 ± 2              | 34 ± 3 | 34 ± 3     |
| C-No HDL (mg/dL)         | 24 ± 2  | 17.1 ± 0.4 | 32 ± 4               | <sup>b</sup> 19 ± 2 | 26 ± 2 | 31 ± 2     |

Los valores son medias ± error estándar. n=10 por grupo. <sup>a</sup>P<0.05 vs C, <sup>b</sup>P<0.05 vs SM. C: Control, SM: Síndrome metabólico PC: Período crítico, RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día

Se analizó el perfil de ácidos grasos libres en suero y su posible relación con la hipertensión arterial así como el efecto de la administración de la mezcla de los polifenoles. Los resultados se muestran en la tabla 11. Se puede apreciar que el perfil de ácidos grasos libres del grupo PC es muy parecido al perfil del grupo C; en el grupo SM se observa que el ácido palmítico y linoleico están aumentados con respecto al grupo C, mientras que el ácido esteárico y araquidónico se ven disminuidos significativamente con respecto al grupo C. El ácido oleico mostró una tendencia al incremento, sin embargo este no es significativo.

Posterior al tratamiento con polifenoles, se puede apreciar que en el grupo SM disminuyó significativamente la concentración de ácido oleico y araquidónico con respecto al mismo grupo sin tratamiento; mientras que en el grupo PC se observó una disminución en el ácido linoleico con respecto al mismo grupo sin tratamiento.

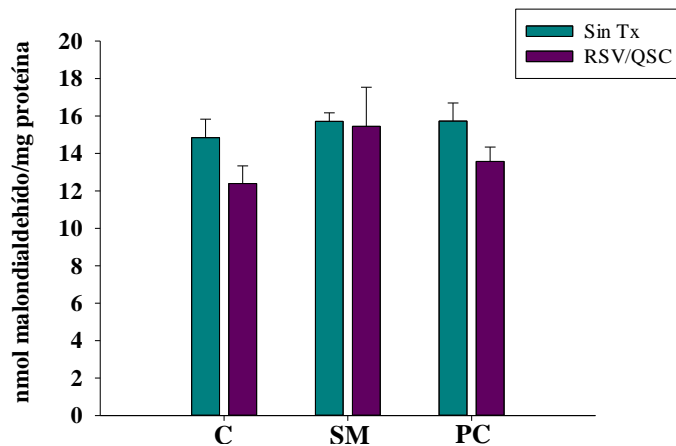
**Tabla 11.** Efecto de la mezcla RSV/QSC en el perfil de AGL

| Ácido graso (%) | C         | C RSV/QSC  | SM                  | SM RSV/QSC          | PC                  | PC RSV/QSC         |
|-----------------|-----------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Palmítico       | 27 ± 1    | 27.7 ± 0.3 | <sup>a</sup> 34 ± 1 | 32 ± 1              | <sup>b</sup> 27 ± 1 | 28 ± 1             |
| Esteárico       | 33 ± 1    | 31 ± 1     | <sup>a</sup> 21 ± 1 | 20 ± 1              | <sup>b</sup> 33 ± 1 | 32.4 ± 0.4         |
| Oleico          | 25 ± 1    | 24.3 ± 0.4 | 23 ± 1              | <sup>c</sup> 18 ± 1 | 24.2 ± 0.4          | 26 ± 1             |
| Linoleico       | 2.5 ± 0.3 | 2 ± 1      | <sup>a</sup> 11 ± 1 | 10 ± 1              | <sup>b</sup> 5 ± 1  | <sup>c</sup> 2 ± 1 |
| Araquidónico    | 11 ± 1    | 13 ± 2     | <sup>a</sup> 8 ± 1  | 7.7 ± 0.2           | 10 ± 1              | 12 ± 1             |

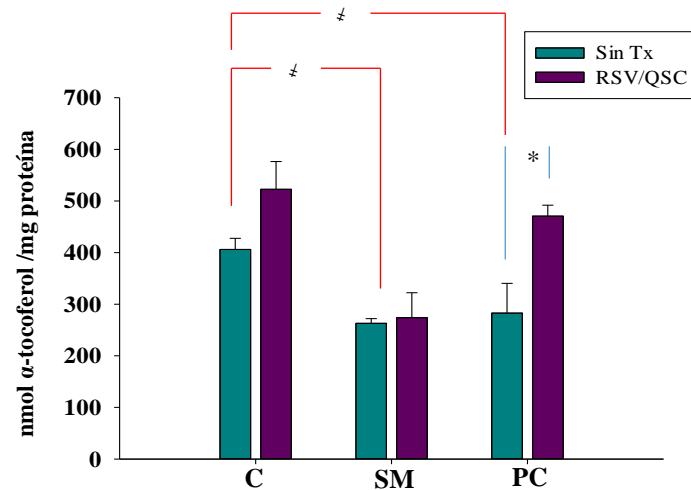
Los valores son medias ± error estándar. n=8 por grupo. <sup>a</sup>P<0.05 vs C, <sup>b</sup>P<0.05 vs SM <sup>c</sup>P<0.05 vs mismo grupo sin tratamiento. C: Control, SM: Síndrome metabólico PC: Período crítico, RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día

### 7.2.6 Efecto en el estrés oxidativo.

Respecto al estrés oxidativo se evaluó la concentración de malondialdehído en el homogenado de aorta observando que ninguno de los grupos presentó diferencias significativas por la exposición al agua azucarada, ni después de la administración de la mezcla RSV/QSC (figura 19). En cuanto a la capacidad antioxidante no enzimática ( $\alpha$ -tocoferol), se puede apreciar en la figura 20 que los grupos SM y PC mostraron una disminución significativa con respecto al grupo C; sin embargo, después de la administración de los polifenoles solo el grupo PC mostró un aumento significativo en la cantidad de  $\alpha$ -tocoferol con respecto al mismo grupo sin tratamiento (Sin Tx).

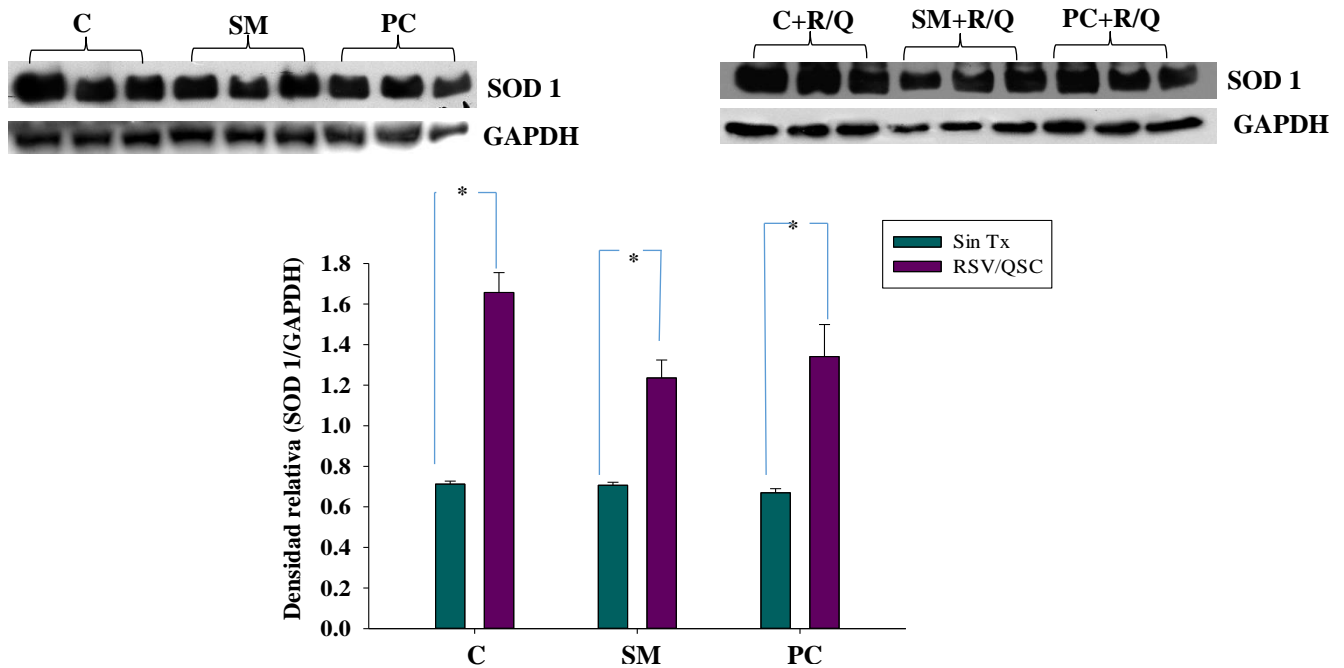


**Figura 19.** Efecto de la administración de la mezcla RSV/QSC en productos de lipoperoxidación en homogenado de aorta. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=6 por grupo C: Control SM: síndrome metabólico PC: período crítico. RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento



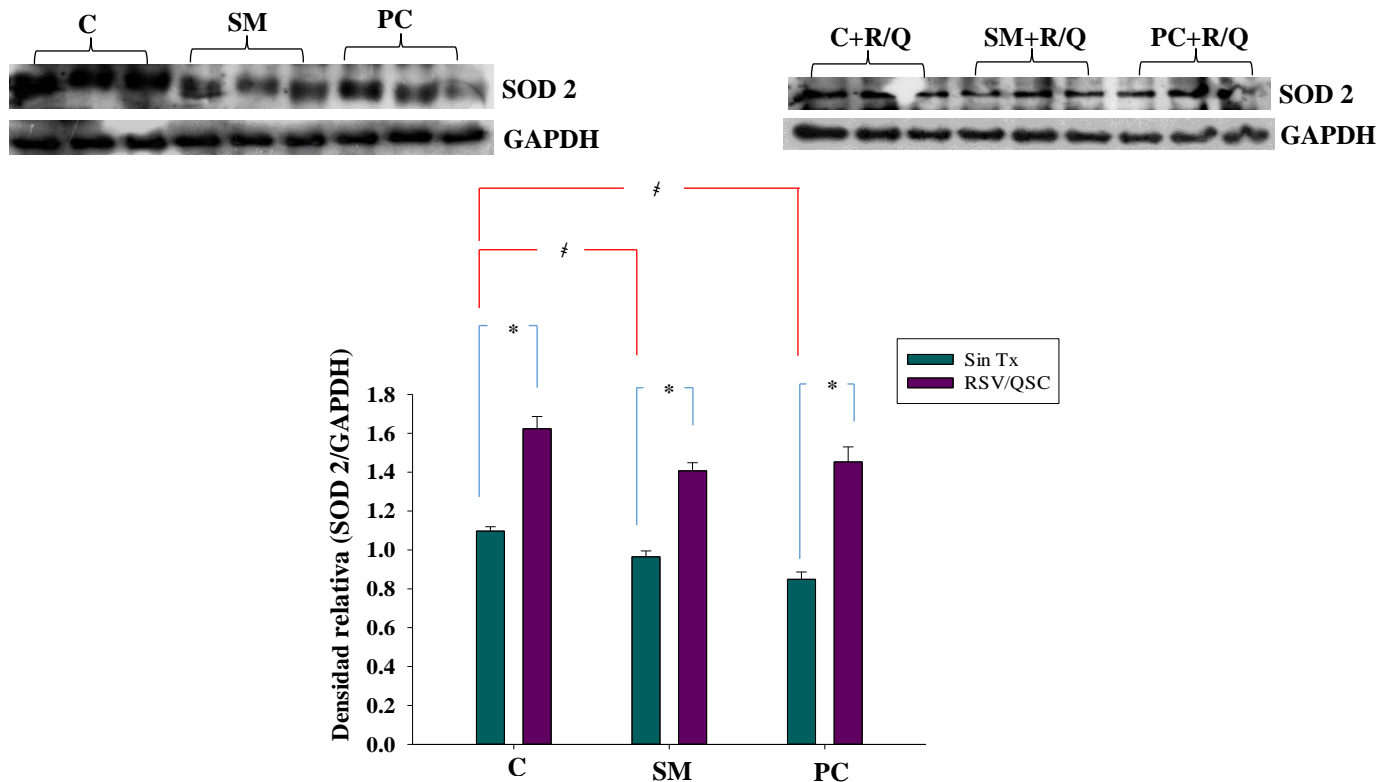
**Figura 20.** Efecto de la mezcla RSV/QSC en capacidad antioxidante no enzimática en homogenado de aorta. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. n=6 por grupo.  $\#P<0.05$  vs C,  $*P<0.05$  vs PC. C: Control SM: síndrome metabólico PC: período crítico. RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento

Para evaluar la capacidad antioxidante enzimática se determinó la expresión de las proteínas SOD 1 y SOD 2 mediante western blot. En la figura 21 se puede observar que el consumo de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre la expresión de SOD 1, sin embargo después del tratamiento con RSV/QSC los tres grupos mostraron un aumento significativo en la expresión con respecto al mismo grupo sin Tx.



**Figura 21.** Efecto del RSV y QSC en la expresión de SOD 1 en aorta torácica. Los valores son medias  $\pm$  error estándar.  $n=6$  por grupo  $^*P<0.05$  vs mismo grupo sin tratamiento. C: Control SM: síndrome metabólico PC: período crítico RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento

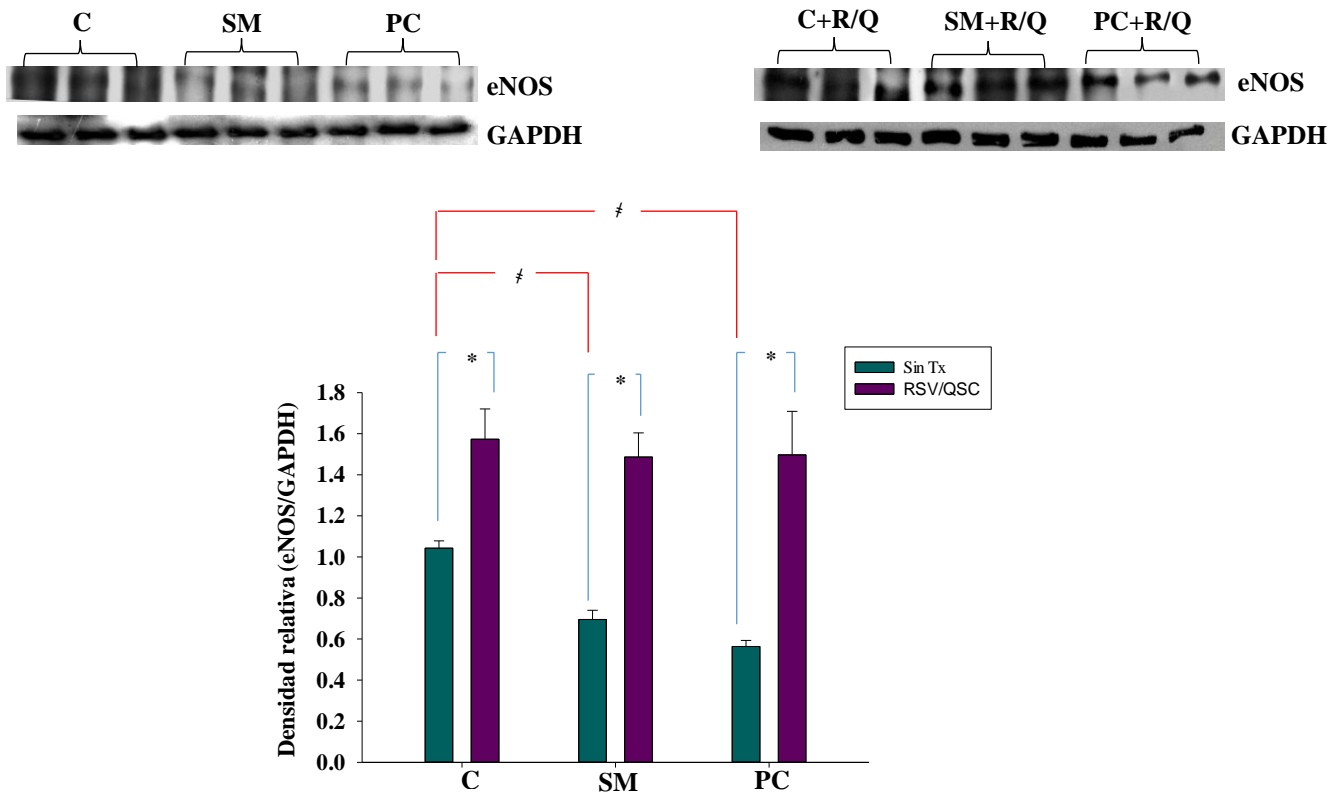
En cuanto a la proteína SOD 2 se aprecia que los grupos SM y PC que no recibieron la mezcla RSV/QSC mostraron una disminución significativa en la expresión con respecto al grupo C, posterior al tratamiento con los polifenoles se observa que en los tres grupos aumentó la expresión de esta enzima de manera significativa (figura 22).



**Figura 22.** Efecto del RSV y QSC en la expresión de SOD 2 en aorta torácica. Los valores son medias  $\pm$  error estándar.  $n=6$  por grupo.  $^{\#}P<0.05$  vs C,  $^*P<0.001$  vs mismo grupo sin tratamiento. C: Control SM: síndrome metabólico PC: período crítico. RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento

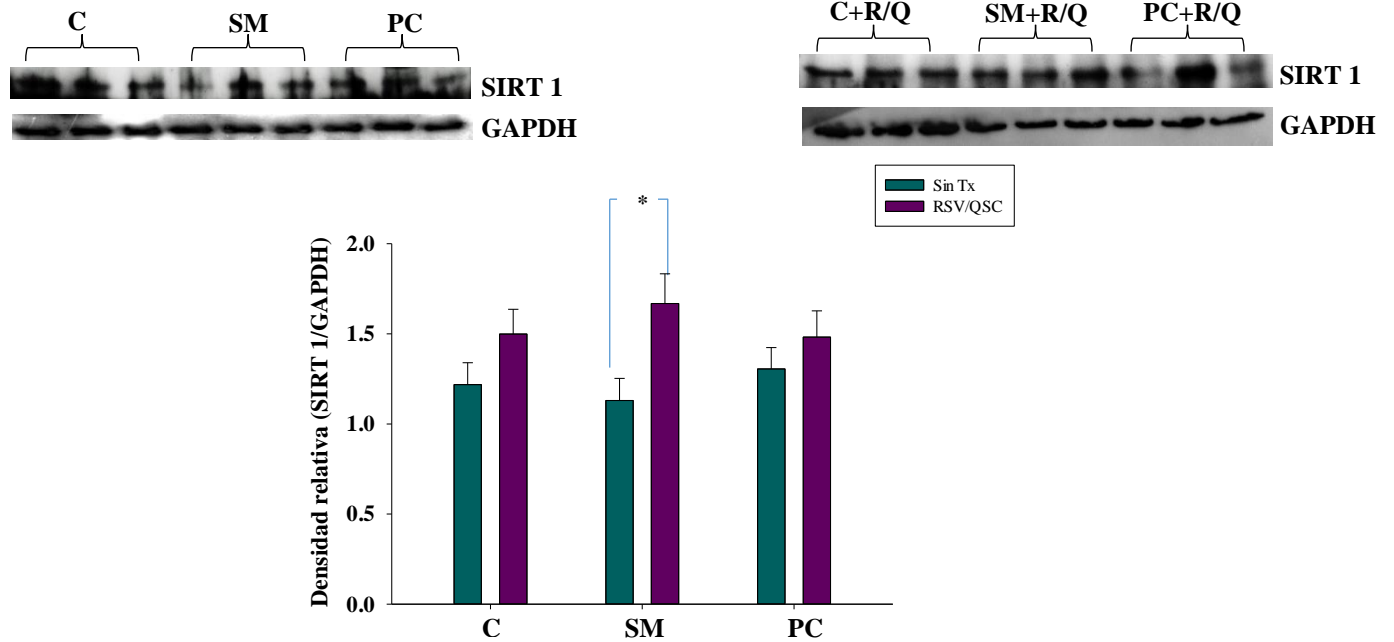
### 7.2.7 Efecto en la expresión de eNOS y su regulación por factores epigenéticos.

Para conocer el efecto del tratamiento con RSV/QSC en la expresión de eNOS se realizó el siguiente western blot (figura 23), como se mostró en la figura 14 el grupo SM y PC presentaron una disminución en la expresión de esta enzima con respecto al grupo C. Sin embargo, después de un mes de tratamiento con polifenoles se puede apreciar que en los tres grupos la expresión de esta enzima aumentó con respecto al mismo grupo sin Tx.

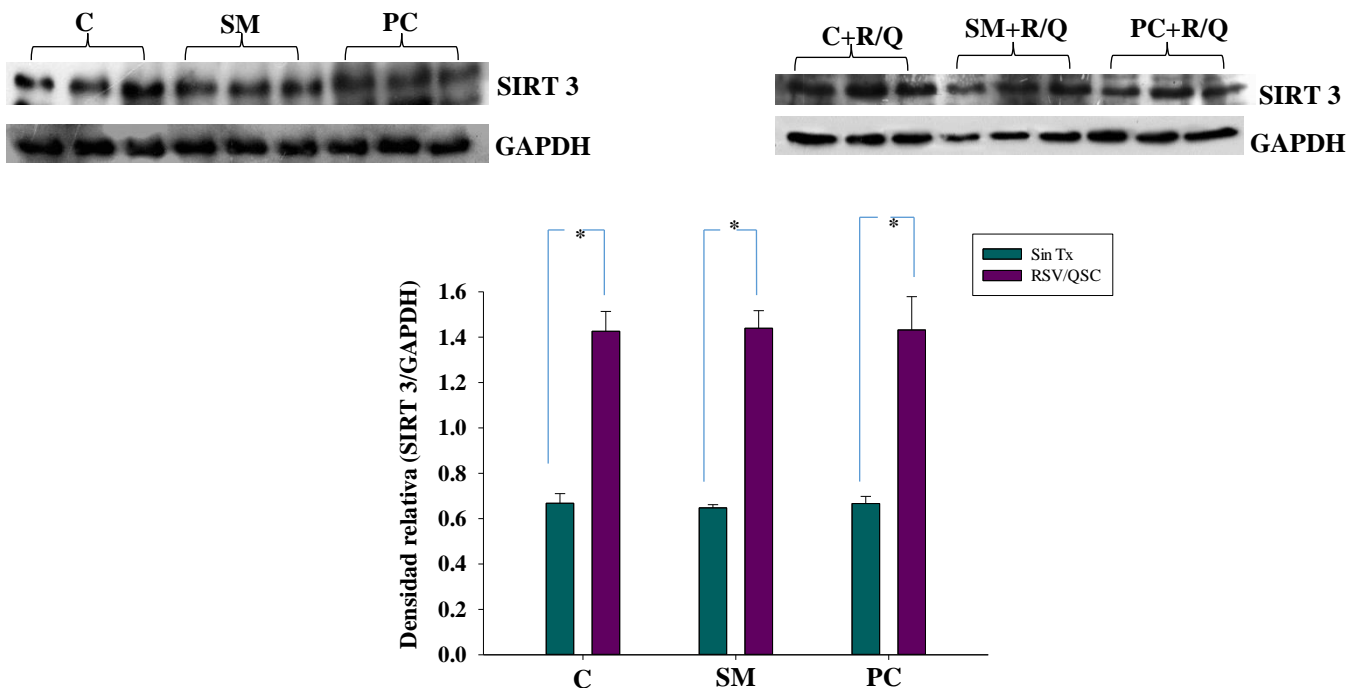


**Figura 23.** Efecto del RSV y QSC en la expresión de eNOS en aorta torácica. Los valores son medias  $\pm$  error estándar.  $n=6$  por grupo,  $\#P<0.001$  vs C,  $*P<0.05$  vs mismo grupo sin tratamiento. C: Control SM: síndrome metabólico PC: período crítico. RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento

En cuanto a los factores epigenéticos, se observa que la expresión de la enzima SIRT 1 no presentó diferencia significativa entre los grupos que no recibieron tratamiento, sin embargo, en el grupo SM después de la administración de polifenoles se observó un aumento en la expresión de esta proteína con respecto al mismo grupo sin Tx (figura 24). Para el caso de la enzima SIRT 3 no se observó diferencia significativa en ninguno de los tres grupos sin Tx; posterior a un mes de tratamiento con RSV/QSC la expresión de esta enzima aumento en los tres grupos con respecto al mismo grupo sin Tx (figura 25).



**Figura 24.** Efecto del RSV y QSC en la expresión de SIRT 1 en aorta torácica. Los valores son medias  $\pm$  error estándar.  $n=6$  por grupo,  $*P<0.05$  vs mismo grupo sin tratamiento. C: Control SM: síndrome metabólico PC: período crítico. RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento



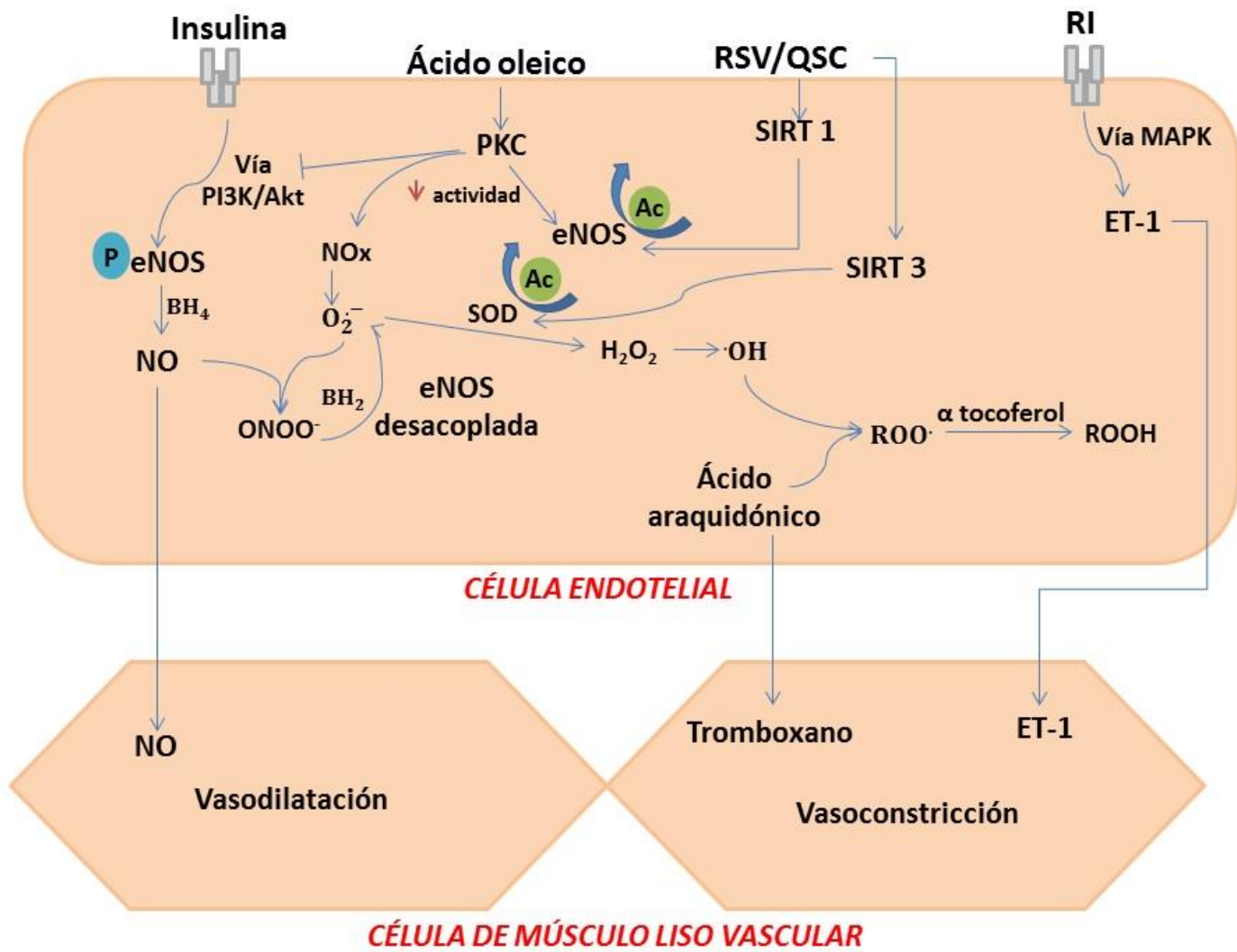
**Figura 25.** Efecto del RSV y QSC en la expresión de SIRT 3 en aorta torácica. Los valores son medias  $\pm$  error estándar.  $n=6$  por grupo,  $*P<0.001$  vs mismo grupo sin tratamiento. C: Control SM: síndrome metabólico PC: período crítico. RSV/QSC: RSV a dosis 50 mg/ kg de peso/ día y QSC a dosis 0.95 mg/ kg de peso/ día. Sin Tx: Sin tratamiento

En la siguiente tabla se comparan los resultados obtenidos para el grupo PC a los 28 días, a los 6 meses y posterior al tratamiento con RSV/QSC. Se observa que tanto las ratas a los 28 días como las ratas adultas presentaron un aumento en la presión arterial, tendencia en la RI, disminución en concentración de  $\alpha$ -tocoferol, así como en la expresión de las proteínas eNOS y SOD 2. Sin embargo, posterior a la administración de la mezcla de polifenoles, la presión arterial y la tendencia a la RI disminuyeron. En cuanto a la concentración de  $\alpha$ -tocoferol y la expresión de las proteínas determinadas se observó un aumento.

**Tabla 12.** Comparación de parámetros determinados en ratas PC al día 28 vs ratas PC adultas vs ratas PC adultas que recibieron tratamiento RSV/QSC

| <b>28 días</b>  | <b>Adultas PC<br/>sin tratamiento</b>               | <b>PC<br/>RSV/QSC</b>                           |
|---|---|---|
| Elevación en presión arterial   | Elevación en presión arterial                       | Disminución presión arterial                    |
| Tendencia a RI  | Tendencia a RI                                      | Disminución en la tendencia a RI                |
| Aumento en concentración de ácido oleico  | Concentración de ácido oleico parecido al control   | No presentó cambios en concentración            |
| Aumento en concentración de malondialdehído y disminución en concentración de $\alpha$ -tocoferol | Disminución en concentración de $\alpha$ -tocoferol | Aumento de $\alpha$ -tocoferol                  |
| Disminución en expresión de eNOS, SOD 2 y SIRT 3  | Disminución de expresión de eNOS y SOD 2            | Aumento en expresión de eNOS, SOD 1 y 2, SIRT 3 |

A continuación, la figura 26 ilustra la relación de cada uno de los parámetros estudiados con el aumento en la presión en la presión arterial y su reversión por la administración de la mezcla RSV/QSC.



**Figura 26.** Esquema de los mecanismos asociados en el aumento en la presión arterial y su reversión por RSV/QSC. eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial, PI3K: fosfoinositol 3 cinasa, Akt: protein cinasa B, BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina, NO: óxido nítrico, PKC: protein cinasa C, NOX: NADPH oxidasa, O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido, BH<sub>2</sub>: dihidrobiopterina, ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito, SOD: superóxido dismutasa, P: fosfato, Ac: acetato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogeno, ·OH: ion hidroxilo, MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno, ET-1: endotelina 1, ROO·: radical peroxilo, ROOH: Hidroperóxido, RI: resistencia a la insulina, SIRT 1: sirtuina 1, SIRT 3: sirtuina 3, RSV: resveratrol, QSC: queretina



## VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Paradójicamente el peso de las ratas que consumieron sacarosa fue menor y no presentaron un aumento en la cantidad de grasa visceral. Estos resultados fueron sorprendentes ya que modelos en ratas con SM no presentan diferencia en el peso y tienen un incremento en la grasa visceral, como consecuencia de tener una mayor ingesta calórica (Hafidi, *et al*, 2001). Estos resultados podrían explicarse debido a los cambios corporales que se presentan asociados al desarrollo de los animales. Las ratas PC están en etapa de crecimiento por lo que al consumir menos alimento sólido están teniendo una deficiencia en cuanto a proteínas, grasas y minerales, teniendo un exceso en el consumo de hidratos de carbono. Por ello, es probable que las ratas PC sean más activas que las ratas C y que el exceso en kcal consumidas se esté utilizando para estas actividades y no para desarrollar masa muscular.

### **Presión arterial**

En relación a la presión arterial, observamos que las ratas PC mostraron un aumento significativo con respecto al grupo C (figura 6), estos datos son parecidos a los publicados por Samuelsson y cols (2013) donde reportan que las crías de ratas alimentadas con una dieta rica en hidratos de carbono (26 % de la energía total) antes, durante y después del embarazo, presentan una elevación en la presión arterial al llegar a los 3 meses de edad.

### **Insulina y glucosa**

Estudios previos han mostrado que la RI y la hiperinsulinemia están asociados con el aumento en la presión arterial ya que el aumento en la concentración de insulina es capaz de potenciar la expresión de ET-1 por la ruta MAPK, además de disminuir la actividad de eNOS a través de la inhibición de la vía PI3-K – Akt (Nava, *et al*, 1997; Vicent, *et al*, 2003; Naruse, *et al*, 2006). Con estos antecedentes, determinamos la concentración de glucosa e insulina en suero, así como el índice HOMA-IR (tabla 4), apreciando que no hubo diferencia significativa entre ambos grupos. En el caso del grupo C este valor coincide con lo publicado por Aguayo y cols (2006) donde determinaron los valores de insulina en plasma del día 12 al 28 observando que la concentración de insulina tenía el valor más alto al día 20 pero disminuía al día 28. En el caso del grupo PC se aprecia que el consumo

durante 15 días de sacarosa al 30% no fue suficiente para elevar los niveles de insulina y glucosa en suero, esto se puede deber a que la concentración de sacarosa fue excesiva y por consiguiente los animales consumieron menos líquido.

Para corroborar el resultado anterior, se realizó el cálculo del índice de tolerancia a la insulina. En la figura 7 se puede observar que en el grupo PC existe una tendencia a la RI, estos valores son muy similares a los resultados obtenidos en el modelo de SM que se ha estudiado en el laboratorio (Peredo, *et al*, 2015). Con base en estos resultados no podemos descartar totalmente la hipótesis de que la RI tenga una posible contribución con el aumento en la presión arterial; sin embargo no se le atribuye un papel importante para la explicación de este fenómeno.

### **Perfil lipídico**

La tabla 5 muestra el perfil lipídico sérico en ambos grupos de animales. Los valores de TG presentaron un aumento significativo en el grupo PC con respecto al grupo C; mientras que el C-HDL del grupo PC mostró una disminución significativa con respecto al grupo C. Estos parámetros son importantes ya que un aumento en TG y C-No HDL, así como una disminución en los niveles de C-HDL en el suero están relacionados con problemas de aterosclerosis, hipertensión y riesgo de sufrir eventos cardiovasculares (Rohatgi, *et al*, 2014). Además, los resultados de este estudio son muy similares a los obtenidos en el modelo de SM (Peredo, *et al*, 2015), por lo que se puede inferir que el consumo de sacarosa por un período de tiempo corto impacta de forma similar que un consumo prolongado de hidratos de carbono (6 meses) sobre el incremento de la concentración de TG y colesterol.

Estudios previos han demostrado que un incremento en la concentración de TG generalmente viene acompañado de un aumento en la concentración de ácidos grasos libres en suero (Bei, *et al*, 2015); los cuales, a su vez pueden generar un aumento en la presión arterial. Estudios en modelos animales de SM han mostrado que una disminución en el ácido esteárico, es consecuencia de que las enzimas desaturasas convierten este ácido graso en ácido oleico. Se ha descrito mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* que el ácido oleico disminuye la actividad de eNOS a través de la activación de PKC la cual fosforila a eNOS en la treonina 495, lo cual disminuye la actividad de la enzima y por consiguiente disminuye la vasodilatación (Matsubara, *et al*, 2003; Sainsbury, *et al*, 2004; Pérez, *et al*,

2013). Por otra parte en modelos de SM se ha observado una disminución del ácido linoleico, lo cual se debe a que puede ser desaturado a AA. Este a su vez, puede ser metabolizado a prostaglandinas y tromboxanos ( $PGE_2$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$ ), los cuales se encuentran implicados en la regulación del tono vascular (Davda, *et al*, 1995; Hafidi, *et al*, 2001). Estos resultados concuerdan con lo obtenido el grupo PC (tabla 6), lo cual es consistente con el aumento en la presión arterial.

### **Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo puede estar asociado con el aumento en la presión arterial. Se han encontrado alteraciones en las principales enzimas generadores de ERO como la NOX, eNOS desacoplada y una disminución del cofactor  $BH_4$  en aortas de ratas diabéticas e hipertensas (Li, *et al*, 2006; Sorescu, *et al*, 2002; Landmesser, *et al*, 2007). Sumado a esto, diversos estudios han demostrado que ratas con SM y problemas cardiovasculares como el Síndrome de Marfan presentan un aumento en los productos de lipoperoxidación (malondialdehído) y una disminución en la capacidad antioxidante no enzimática ( $\alpha$ -tocoferol) en suero (Soto, *et al*, 2016; Pérez, *et al*, 2016). En el presente estudio se reportaron resultados de la capacidad antioxidante total y de la lipoperoxidación en homogenado de aorta (figura 9; figura 10). Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores. En cuanto a la capacidad antioxidante enzimática existen investigaciones en cultivos de células humanas donde un incremento en el ácido oleico disminuye la expresión de los genes para SOD (Verlengia, 2003). Esto coincide con el aumento en este ácido graso y la disminución de la expresión de la proteína SOD 2 en el grupo PC de este trabajo (figura 12). Es importante mencionar que la SOD 2 se encuentra en la mitocondria, lugar donde ocurre la mayor producción de ERO (Chen, *et al*, 2011). Por ello se infiere que al existir un aumento en la producción de ERO y tener un sistema antioxidante deficiente, los aniones superóxido estén reaccionando con el NO formando peroxinitritos (Sainsbury, *et al*, 2004). Además es probable que las ERO estén reaccionando con la  $BH_4$ , cofactor esencial para que la eNOS este acoplada. La eNOS desacoplada se convierte en una fuente de radicales libres lo que disminuye la biodisponibilidad de NO. Todo esto podría explicar el aumento en la presión arterial que presenta el grupo PC.

## **eNOS y su regulación por factores epigenéticos**

En la figura 13 se observa que la expresión de eNOS en el grupo PC, disminuye significativamente con respecto al grupo C. Este hallazgo, se relaciona directamente con el aumento en la presión arterial del grupo PC. Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado para un modelo de SM donde la expresión de esta proteína se encuentra disminuida (Pérez, *et al*, 2013), dando como consecuencia una menor producción de NO.

Finalmente, y para asociar los resultados anteriores con la regulación epigenética, se evaluó la expresión de las SIRT1 y 3. Estas proteínas se han relacionado con la disminución de algunos síntomas del SM en la rata adulta, particularmente en la disminución de la hipertensión arterial (Peredo, *et al*, 2015). Se conoce que SIRT1 aumenta la expresión y la actividad de eNOS mediante la activación del factor de transcripción FOXO1 y la desacetilación en la lisina 496 y 506 del dominio de unión a la calmodulina respectivamente (Mattagajasingh, *et al*, 2007; Napoli, *et al*, 2008, Xia, *et al*, 2013; Xia, *et al*, 2014). Por otra parte, la SIRT3 aumenta la expresión y actividad de SOD2 mediante la activación de FOXO3 y la desacetilación en la lisina 68 respectivamente (Chen, *et al*, 2011; Sebastián, *et al*, 2012). En la figura 14 se observa que el consumo de sacarosa durante este período no afectó la expresión de SIRT1, sin embargo se aprecia una tendencia al incremento en el grupo PC. Esto puede ser explicado por el incremento en el estrés oxidativo el cual aumenta la expresión y actividad de SIRT1 como un mecanismo para revertir el daño, tal como lo explica Chen y cols (2010). Estos autores evaluaron la expresión de SIRT1 utilizando cultivos de células endoteliales, las cuales fueron expuestas a estrés durante varias horas, observando que la expresión y actividad de SIRT1 aumentaba de manera tiempo – estrés dependiente. Respecto a la SIRT3 se observó una disminución significativa en el grupo PC con respecto al grupo C (figura 15), este hallazgo coincide con algunos autores que reportan la disminución en la expresión de esta enzima en hígado por el consumo de una dieta hipercalórica (Bao, *et al*, 2010; Hirschey, *et al*, 2011).

De manera paralela y con el fin de conocer el efecto que tiene el consumo de sacarosa durante los días 12 al 28 en las ratas del grupo PC sobre la presión arterial y los posibles mecanismos que se relacionan con este fenómeno en ratas adultas, se realizaron las mismas determinaciones en los grupos C, PC y SM. Este último grupo se utilizó con el fin de

comparar los efectos que genera un consumo prologando de sacarosa con el consumo limitado al período anteriormente descrito.

Como primer punto se realizó la caracterización de los tres modelos, observando en la tabla 7 que el grupo SM presentó un perfil muy similar al obtenido previamente en el laboratorio (Peredo, *et al*, 2015). En el caso del grupo PC se observó un aumento en la presión arterial el cual es equiparable al valor presentado por el grupo SM. Sin embargo, los demás parámetros fueron muy parecidos al grupo C. Es importante mencionar que los niveles de insulina y HOMA-IR presentan una tendencia al incremento con respecto al grupo C a pesar de no ser significativos.

Con relación a la expresión de eNOS se puede apreciar que tanto el grupo SM como el grupo PC mostraron una disminución en la expresión de esta enzima (figura 16). Esto es un reflejo del impacto que tiene el consumo de sacarosa durante los días 12 al 28, cuando las ratas llegan a la etapa adulta y que es equiparable con el consumo prologando de sacarosa como es el caso del grupo SM.

### **El efecto del RSV/QSC**

Al evaluar el efecto de la mezcla RSV/QSC en una dosis de 50/0.95 mg/kg/día respectivamente, se observó que esta mezcla es efectiva para disminuir la presión arterial elevada en los grupos PC y SM en 17 % y 11 % respectivamente (figura 17). Además de disminuir los niveles de insulina en 34 % (SM) y 20 % (PC) y mejorar la sensibilidad a la insulina, lo cual se puede apreciar en una mejora del 38 % en el HOMA-IR para el grupo SM (tabla 8), tal como lo reporta Peredo y cols (2015) para este modelo.

Por otra parte, se realizó el cálculo del índice de tolerancia a la insulina (Panel A\_ figura 18) observando que el grupo PC y SM muestran una tendencia a la RI, lo cual concuerda con el modelo de SM que se tiene previamente caracterizado en el laboratorio. Estos resultados sugieren una posible influencia de la insulina sobre el aumento en la presión arterial, de manera importante en el grupo PC. En el panel B de la figura 18 se observa cómo la sensibilidad a la insulina mejoró en los grupos PC y SM tal como lo reportan otros autores (Rivera, *et al*, 2008; Peredo, *et al*, 2015).

Se ha demostrado en otros modelos de SM, que el aumento en la adiposidad central y la dislipidemia están relacionadas con un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Pierre, *et al*, 2007; Peredo, *et al*, 2015). En este estudio se observó que el aumento en TG coincide con lo reportado en el grupo SM; sin embargo, en el colesterol total, C-HDL y C-No HDL no se observaron diferencias con respecto al grupo C. En el grupo PC no se observaron alteraciones en estos parámetros con respecto al grupo C (tabla 10). Esto se puede explicar debido a que a partir del día 28 el grupo PC dejó de consumir sacarosa en el agua de bebida, por lo tanto no se generó un aumento en la adiposidad central. Posterior al tratamiento con polifenoles se observó que el grupo SM disminuyó en 43 % la adiposidad central (tabla 9), en 25 % la concentración de TG así como en 40 % la concentración del C-No HDL (tabla 10), tal como lo reporta Peredo para este modelo, mientras que en el grupo PC no se observaron cambios.

En nuestro modelo de SM se observó un aumento en el ácido palmítico. Este ácido se ha relacionado con el aumento en la actividad de NOX, que a su vez aumenta el estrés oxidativo (Inoguchi, *et al*, 2000); sin embargo, el ácido oleico no presentó cambios. Por otra parte se observó que el AA disminuyó su concentración (tabla 11), probablemente porque se está metabolizando a tromboxanos (Davda, *et al*, 1995). En cuanto al grupo PC se aprecia un perfil muy similar al grupo C, dato que sugiere que los ácidos grasos libres podrían no desempeñar un papel importante en el aumento en la presión arterial en la etapa adulta. Posterior al tratamiento con RSV/QSC, el grupo SM mostró una disminución significativa en la concentración del ácido oleico, lo cual concuerda por lo reportado por Peredo y cols (2015) en este modelo. En los grupos C y PC no se observó que la mezcla tuviera algún efecto en la concentración de los ácidos grasos libres (tabla 11).

En cuanto al estrés oxidativo no se presentó diferencia en la concentración de malondialdehído en ninguno de los tres grupos (figura 19); sin embargo, en el caso de la capacidad antioxidante no enzimática ( $\alpha$ -tocoferol) y enzimática (expresión de SOD 2) se observó una disminución en los grupos SM y PC que no recibieron tratamiento (figura 20; figura 22) lo cual coincide con experimentos hechos en el laboratorio en un modelo de SM (Pérez, *et al*, 2013). Además estos resultados coinciden con los obtenidos en el grupo PC a los 28 días de edad. Debido a esto, se puede inferir que en el grupo PC existe un desbalance

entre las ERO producidas de manera normal, principalmente por la mitocondria y la eliminación de éstas ya que tanto el sistema antioxidante enzimático como no enzimático están disminuidos, lo cual podría estar generando el desacoplamiento de eNOS así como la producción de peroxinitritos, que a su vez disminuyen la producción de NO. Con base en los experimentos realizados se puede atribuir al estrés oxidativo un papel importante en el aumento en la presión arterial en las ratas adultas del grupo PC.

Posterior al tratamiento con RSV/QSC se observa que la capacidad antioxidante no enzimática solo aumenta en el grupo PC (figura 20), mientras que la expresión de las enzimas antioxidantes (SOD 1 y SOD 2) aumenta en los tres grupos (figura 21; figura 22), esto coincide con lo reportado por varios autores quienes indican que tanto el RSV como la QSC activan los genes de las enzimas antioxidantes y aumentan la capacidad antioxidante (Maccha, *et al*, 2007; Xia, *et al*, 2014).

Por otro lado, al administrar la mezcla de los polifenoles, se aprecia un aumento significativo en la expresión de eNOS en los tres grupos de estudio (figura 23) tal como lo había reportado previamente Csiszar y cols (2009). Esto coincide con la disminución en la presión arterial en los grupos PC y SM posterior al tratamiento. Sorpresivamente la expresión de eNOS también aumentó en el grupo C, sin embargo, no se observó que este grupo presentara una disminución en la presión arterial. Por ello, se puede inferir que a pesar de mostrar un aumento en su expresión, los mecanismos involucrados en la actividad de la enzima no están incrementados.

Diversos autores han relacionado el aumento en la expresión y actividad de eNOS y SOD 2 con SIRT 1 y SIRT 3, respectivamente. A su vez, las SIRTs pueden aumentar su expresión y actividad al ser estimuladas por el RSV y la QSC mediante activación alostérica al disminuir la constante de Michaelis (Km) por los sustratos acetilados y por NAD<sup>+</sup> (Chen, *et al*, 2015; Haigis, *et al*, 2010; Howitz, *et al*, 2003; Mattagajasingh, *et al*, 2007). En la figura 24 se aprecia que los grupos que no recibieron la mezcla de polifenoles no mostraron cambios en la expresión de SIRT 1. Sin embargo, posterior al tratamiento se puede observar que los tres grupos mostraron un aumento significativo en su expresión. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos previamente en tejido adiposo de los animales con SM, reportado por Peredo y cols quienes observaron un aumento en la expresión de esta

proteína después de un mes de tratamiento con RSV/QSC en dosis de 50/0.95 mg/kg/día. Además esto podría estar asociado con el aumento en la expresión de eNOS en los tres grupos así como la consecuente disminución en la presión arterial.

En cuanto a la SIRT 3 se observa que no hay diferencias en la expresión de esta proteína en ninguno de los tres grupos sin Tx (figura 25). Sin embargo, después de la administración de la mezcla RSV/QSC se observa un incremento en la expresión de esta enzima en los tres grupos de estudio, lo cual puede relacionarse con el aumento en la expresión de SOD 2 (Chen, *et al*, 2011). Esto coincide con lo reportado por Zhou y cols (2014) donde utilizaron células de cordón umbilical humano pre-tratadas con RSV en una concentración de 10  $\mu$ M durante dos horas observando un incremento en la expresión de SIRT 3 y la actividad de SOD 2, así como una disminución en la expresión de SOD 2 acetilada. Sumado a esto, experimentos *in vitro* demostraron que dosis bajas de RSV (1-5  $\mu$ M) estimulan directamente la actividad del complejo I mitocondrial, aumentando la proporción  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . El incremento en  $\text{NAD}^+$  inicia un aumento dependiente de SIRT 3 en las vías del ciclo del ácido tricarboxílico y la oxidación de los ácidos grasos (principales sustratos mitocondriales) (Desquiret, *et al*, 2013).

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran la importancia de tener una alimentación balanceada en las etapas tempranas de la vida. El exceso de hidratos de carbono (sacarosa, en este caso) puede predisponer a las crías a desarrollar enfermedades cardiovasculares en la etapa adulta, como la hipertensión. Adicionalmente, estudiamos tres de los mecanismos que podrían estar involucrados en el aumento de la presión arterial y demostramos que el tratamiento con RSV y QSC es una herramienta terapéutica útil para esta patología.



## **IX. CONCLUSIONES**

El consumo de sacarosa durante los días 12 al 28 aumentó la presión arterial de las ratas, lo cual podría estar asociado a la disminución de la expresión de eNOS, el aumento en la concentración de ácido oleico, aumento en compuestos de lipoperoxidación, disminución en capacidad antioxidante enzimática y no enzimática así como la disminución en la expresión de la enzima SIRT 3. Además, el consumo de sacarosa durante este período tuvo un impacto a largo plazo cuando las ratas llegaron a adultas generando un aumento en la presión arterial, la cual podría estar relacionada con el aumento en el estrés oxidativo que a su vez generó una disminución en la expresión de eNOS. Por otra parte, la mezcla RSV/QSC administrada en una dosis de 50/0.95 mg/kg/día respectivamente revirtió dichos efectos.

## X. REFERENCIAS

Adult Treatment Panel III. Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults Final Report. 2018 (Consultado marzo 2018) Disponible en <http://circ.ahajournals.org/>

Aguayo C, Sanchez C, Godinez V, Gutiérrez G, Hiriart M. 2006. Restructuring of pancreatic islets and insulin secretion in a postnatal critical window. *Plos One*. 1: 1-8

Alinkeel R, Srinivasan M, Kalhan S, Laychock S, Patel M. 1999. A dietary intervention (high carbohydrate) during the neonatal period causes islet dysfunction in rats. *Am. J. Physiol.* 277 (*Endocrinol Metab* 40): E1061-E1069

Baños C, Carbó R, El Hafidi M, Guarner V. 2011. Therapeutic procedures to treat the metabolic syndrome in humans and animal models. *Current topics in pharmacology*. 15 (2): 27-28

Bao J, Scott I, Lu Z, Pang L, Dimond C, Gius D, Sacka M. 2010. Sirt 3 is regulated by nutrient excess and modulates hepatic susceptibility to lipotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 49 (7): 1230-7

Bei F, Jia J, Jia Y, Sun J, Liang F, Yu Z, Cai W. 2015. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids in Health and Disease*. 14: 96

Berger J, Bernard R. 1999. Effect of diet on fat cell size and hormone sensitive lipase activity. *J Appl Physiol* 87: 227–232

Boer V, Dihal A, Woude H, Arts I, Wolfram S, Alink G, Rietjens I, Keijer J, Hollman P. 2005. Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *Nutrient Metabolism*. 135: 1617-1618

Borradaile N, Pickering G. 2009. NAD<sup>+</sup>, sirtuins, and cardiovascular disease. *Current Pharmaceutical Design*. 15: 110-117

Canto C, Jiang Q, Deshmukh S, Matakis C, Coste A, Lagouge M, Zierath R, Auwerx J. 2010. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab*. 11, 213–219.

Chen Z, Peng I, Cui X, Li Y, Chien S, Shyy J. 2010. Shear stress, SIRT 1, and vascular homeostasis. *PNAS*. 107(22): 10268-10273

Chen Y, Zhang J, Lin Y, Lei Q, Guan K, Zhao S, Xiong Y. 2011. Tumour suppressor SIRT 3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. *EMBO Reports*. 12 (6): 534-541

- Chen F, Kumar S, Yu Y, Aggarwal S, Gross C, Wang Y, Chakraborty T, Verin A, Catravas J, Lucas R, Black S, Fulton D. 2014. Regulates eNOS coupling and endothelial barrier function in response to G<sup>+</sup>-Toxins. *PLoS ONE*. 9 (7): e99823
- Chen T, Li J, Liu J, Wang S, Liu H, Zeng M, Zhang Y, Bu P. 2015. Activation of SIRT 3 by resveratrol ameliorates cardiac fibrosis and improves cardiac function via the TGF- $\beta$ /Smad3 pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 308: H424-434
- Chung A, Yang H, Van Breemen C. 2007. Imbalanced synthesis of cyclooxygenase-derived thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin compromises vasomotor function of the thoracic aorta in Marfan syndrome. *British Journal of Pharmacology*. 152: 305-312
- Chung J, Manganiello V, Dyck J. 2012 Resveratrol as a calorie restriction mimetic: therapeutic implications. *Trends Cell Biol*. 22 (10): 546-554
- Coudray C, Sutra T, Fouret G, Ramos J, Wrutniak-Cabello C, Cabello G, *et al.* 2008. Oxidative stress in rats fed a high-fat high-sucrose diet and preventive effect of polyphenols: Involvement of mitochondrial and NAD(P)H oxidase systems. *Free Radical Biology and Medicine*. 46: 624-632
- Csiszar, A.; Labinskyy, N.; Pinto, J.T.; Ballabh, P.; Zhang, H.; Losonczy, G.; Pearson, K.; de Cabo, R.; Pacher, P.; Zhang, C. 2009. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 297, H13–H20.
- Dai J, Wang Z, Sun D, Lin R, Wang S. 2007. SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J. Cell. Physiol*. 210:161–166
- Davda R, Stepniakowski K, Lu G, Ullian M, Goodfriend T, Egan B. 1995. Oleic acid inhibits endothelial nitric oxide synthase by a protein kinase C-independent mechanism. *Hypertension*. 26: 764-770
- Davignon J, Ganz P. 2004. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 109: 27-32
- Deanfield J, Halcox J, Rabelink T. 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. 115: 1285-1295
- Desquiere V, Gueguen N, Leman G, Baron S, Nivet-Antoine V, Chupin A, Chevrollier A, Vessieres E. 2013. Resveratrol induces a mitochondrial complex I dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells. *JBC*. 288: 36662-36675
- Edwards R, Lyon T, Litwin S, Rabovsky A, Symons J, Jalili T. 2007. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J Nutr* 137:2405–11
- Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, Kurbitz C, Settler U, Plachta-Danielzik S, *et al.* 2009. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low density lipoprotein

concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *Br J Nutr* 102:1065–74

Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (Consultado marzo 2018)

Feldman J, Dittenhafer-Reed K, Denu J. 2012. Sirtuin catalysis and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (51): 42419-42427

Feletou M, Vanhoutte PM. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291:H985-1002.

Fisslthaler B, Benzing T, Busse R, Fleming I. 2003. Insuline enhances the expression of the endothelial nitric oxide synthase in native endothelial cells: a dual role for Akt and AP-1. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*. 8: 253-261

Forsterman U, Li Huige. 2010. Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling. *British Journal Pharmacology*. 164: 213-223

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

Goligorsky M. 2005. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288: F871-F880

González M, Salech F, Toro L, Miche L. 2009. Función y disfunción endotelial. *Rev. Med. Clin. Condes*. 20 (3): 257-266

Grekin R, Vollmer A, Sider R. 1995. Pressor effects of portal venous oleate infusion. *Hypertension*. 26: 193-198

Guarner V, Sánchez G. 2014. La evolución biológica y la hipertensión arterial esencial. Capítulo 3 Primera edición 46-52.

Hafidi M, Cuéllar A, Ramírez J, Baños G. 2001. Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal  $\Delta 9$  and  $\Delta 5$ -desaturase activities. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 12: 396-403

Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G, Baños G. 2004. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287: 1387-1393

Haigis M, Sinclair D. 2010. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 5: 253-295

- Hernández A, Arana J, Carbó R, Espinosa R, Sánchez F. 2015. Omentina: papel en la resistencia a la insulina, inflamación y protección cardiovascular. *Archivos de cardiología de México*. 86 (3): 233-243
- Hirschev M, Shimazu T, Jing E, Grueter C, Collins A, Aouizerat B, Stancáková A, Goetzman E, Lam M, Schwer B, Stevens R, Muehlbauer M, Kakar S, Bass N, Kuusisto J, Laakso M, Alt F, Newgard C, Farese R, Kahn C, Verdin E. 2011. SIRT 3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic síndrome. *Cell Press*. 44: 177-190
- Howitz K, Bitterman K, Cohen H, Lamming D, Lavu S, Zipkin R, Chung P, et al. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nat*. 425 (6954): 191-196
- Houtkooper R, Pirinen E, Auwerx J. 2012. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Cell Biol*. 13 (4): 225-238
- Hubbard B, Gomes A, Dai H, Li J, Case A, Considine T, Riera T, Lee J, E S, Lamming D, et al. 2013. Evidence for a common mechanism of SIRT 1 regulation by allosteric activators. *Science*. 339 (6124): 1216-1219
- Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu H, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 2000. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 49 (11):1939-45
- Kapetanovic I, Muzzio M. 2011. Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol*. 68: 593-601
- Kim J, Montagnani M, Koh K, Quon M. 2006. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction. *Circulation*. 113: 1888-1904
- Kizub I, Klymenko K, Soloviev A. 2014. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *International Journal of Cardiology*. 174: 230-242
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128(4), 693–705.
- Kubicek, S., Schotta, G., Lachner, M., Sengupta, R., Kohlmaier, A., Perez-Burgos, L. 2006. The role of histone modifications in epigenetic transitions during normal and perturbed development. *Ernst Schering Research Foundation Workshop*. 57, 1–27
- Kuboki K, Jiang Z, Takahara N, Ha S, Igarashi M, Yamauchi T, Feener E, Herbert T, Rhodes C, King G. 2000. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 101: 676–681

- Landmesser U, Spiekermann S, Preuss C, Sorrentino S, Fischer D, Manes C. 2007. Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 943–948.
- Li H, Witte K, August M, Brausch I, Gödtel-Armbrust U, Habermeier A. 2006. Reversal of eNOS uncoupling and upregulation of eNOS expression lowers blood pressure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 47: 2536–2544.
- Lombard D, Zwaans B. 2013. SIRT : as simple as it seems? *Gerontology*. 60: 56-64
- London N, Whitehead K, Li D. 2009. Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis*.
- Lucas A. 1998. Programming by early nutrition. *An experimental approach. J Nutr* 128: 401S–406S
- Maccha A, Mustafa M. 2005. Chronic treatment with flavonoids prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol*. 46: 36-40
- Maccha A, Achike F, Mustafa A, Mustafa M. 2007. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. *Nitric Oxide Biology and Chemistry*. 16: 442-447
- Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. 2003. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J. Biochem*. 133: 773-781
- Mattagajasingh I, Kim C, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman T, Jung D, Kasuno K, Irani K. 2007. SIRT 1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *PNAS*. 104 (37): 14855-14860
- Miatello R, Vázquez M, Renna N, Cruzado M, Zumino A, Risler N. 2005. Chronic Administration of resveratrol prevents biochemical cardiovascular changes in fructose-fed rats. *AJH*. 18: 864-870
- Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh G, Goalstone M, Mundhekar A, Johansen M, Kucik D, Quon M, Draznin B. 2002. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 277:1794–1799.
- Montagnani M, Ravichandran L, Chen H, Esposito D, Quon M. 2002. Insulin receptor substrate-1 and phosphoinositide dependent kinase-1 are required for insulin-stimulated production of nitric oxide in endothelial cells. *Mol Endocrinol* 16:1931–1942
- Napoli C, Balestrieri ML, Sica V, Lerman LO, Crimi E, De Rosa, G. 2008. Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis. *Heart Vessels*. 23: 124-33.

- Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha S, Suzuma K, Way K, Jacobs J, Clemont A, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine A, King G. 2006. Activation of vascular PKC- $\beta$  inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes* 55: 691–698
- Nava P, Collados T, Massó F, Guarner V. 1997. Endothelin mediation of insulin and glucose-induced changes in vascular contractility. *Hypertension*. 30 (4): 825-829
- Oliver F, de la Rubia G, Feener E, Lee M, Loeken M, Shiba T, Quertermous T, King G. 1991. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. *J Biol Chem* 266: 23251–23256
- OMS. Información general sobre la hipertensión en el mundo. 2013 (Consultado marzo 2018)
- Park J, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown A.L. 2012. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*. 148, 421–433.
- Peredo A, Guarner V, Pérez I, Ortega S, Carreón E, Castrejón V, Díaz E, Rubio E. 2015. The combination of resveratrol and quercetin attenuates metabolic síndrome in rats by modifying the serum fatty acid composition and by upregulating SIRT 1 and SIRT 2 expression in white adipose tissue. *Hindawi*. 2015: 1-9
- Pérez I, Zúñiga A, Beltrán U, Díaz E, Martínez R, Guarner V. 2013. Modification of the liver fatty acids by Hibiscus Sabdariffa Linnaeus (Malvaceae) infusion, its possible effect on vascular reactivity in a metabolic syndrome model. *Clinical and Experimental Hypertension*. 36 (3): 123-131
- Pérez I, Torres J, Pedraza J, Rubio E, Díaz E, Del Valle L, Martínez R, Varela E, Guarner V. 2016. Effect of the aged garlic extract on cardiovascular function in metabolic syndrome rats. *Molecules*. 21: 1-15
- Pierre J. 2007. Cardiovascular disease under the influence of excess visceral fat. *Critical Pathways in Cardiology*. 6 (2): 51-59
- Pirola L, Frojdo S. 2008. Resveratrol: One molecule, many targets. *Life*. 60 (5): 323-332
- Plagemann A, Harder T, Schellong K, Schulz S, Stupin J. 2012 Early postnatal life as critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*. 26: 641-653
- Potente M. 2010. An energy sensor network takes center stage during endothelial aging. *Circulation Research*. 106: 1316-1318
- Qin F, Siwik D, Luptak I, Hou X, Wang L, Higuchi A, Weisbrod R, Ouchi N, Tu N, Calamaras T, Miller E, *et al.* 2012. The polyphenols resveratrol and s17834 prevent the

structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in mice. *Circulation*. 125:1757–1764

Rabelo L, Nunes V, Sá L, et al. 2010. Desbalance redox: NADPH oxidasa como un objetivo terapéutico en el manejo cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 94 (5): 666-675

Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. 2008. Quercetin ameliorates metabolic síndrome and improves the inflammatory status in obese zucker rats. *Obesity* 16: 2081-2087

Rohatgi A, Khera A, Berry J, et al. 2014. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N. Engl. J. Med*. 371:2383–2393

Rubio ME, Guarner V, Peredo AE. 2014. “Medicina Darwiniana: el desarrollo de síndrome metabólico desde una perspectiva evolutiva” Mensaje Bioquímico. XXXVIII: 145-164

Russo M, Spangnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo G. 2012. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. *Biochemical Pharmacology*. 83: 6-15

Sainsbury C, Sattar N, Connel J, Hillier C, Petrie J. 2004. Non-esterified fatty acids impair endothelium-dependent vasodilation in rat mesenteric resistance vessels. *Clinical Science*. 107: 625-629

Samuelsson A, Matthews P, Jansen E, Taylor P, Poston L. 2013. Sucrose feeding in mouse pregnancy leads to hypertension, and sex-linked obesity and insulin resistance in female offspring. *Frontiers in Physiology*. 4 (14): 1-11

Sánchez C, Peiró C, Rodríguez L. 2011. Disfunción endotelial asociada al envejecimiento vascular humano. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 23 (3): 135-139

Sebastián C, Satterstrom F, Haigis M, Mostoslavsky R. 2012. From sirtuina biology to human diseases: an update. *JBC*. 287 (51): 42444-42452

Secretaria de Salud. 2015 Protocolo clínico para el diagnóstico y tratamiento de las dislipidemias. <https://www.gob.mx/salud/documentos/protocolo-clinico-para-el-diagnostico-y-tratamiento-de-las-dislipidemias>. (Consultado abril 2018)

Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. 2005. SIRT3, a mitochondrial sirtuina deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem*. 280: 13560-7

Shen Y, Croft K, Hodgson J, Kyle R, Lee I, Wang Y, Stocker R, Ward N. 2012. Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. *Biochem Pharmacol*. 84 (8): 1036-44



- Song F, Srinivasan M, Aalinkeel R, Patel M. 2001. Use of a cDNA array for the identification of genes induced in islets of suckling rats by a high-carbohydrate nutritional intervention. *Diabetes*. 50: 2053-2060
- Sorescu D, Weiss D, Lassegue B, Clempus R, Szocs K, Sorescu G. 2002. Superoxide production and expression of NOX family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 105: 1429–1435.
- Soto M, Iturriaga A, Guarner V, Zúñiga A, Aranda A, Velázquez R, Pérez I. 2016. Participation of oleic acid in the formation of the aortic aneurysm in Marfan syndrome patients. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 123: 46-55
- Srinivasan M, Aalinkeel R, Song F, Mitrani P, Pandya J, Strutt B, Hill D, Patel M. 2005. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290: E129-E134
- Stuehr D, Pou S, Rosen G. 2001. Oxygen reduction by nitric-oxide synthase. *JBC*. 276 (18): 14533-14536
- Verhamme P, Hoylaerts M. 2006. The pivotal role of the endothelium in homeostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg*. 61:213-219
- Verlengia R, Gorjão R, Kanunfre C. 2003 Genes regulated by arachidonic and oleic acids in Raji cells, *Lipids* 38: 1157–1165.
- Vicent D, Ilany J, Kondo T, Naruse K, Fisher S, Kisanuki Y, Bursell S, Yanagisawa M, King G, Kahn C. 2003. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance. *J Clin Invest* 111: 1373–1380
- Wakeling L, Ions L, Ford D. 2009. Could Sirt 1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *AGE*. 31:327-341
- Xia N, Strand S, Schluffer F, Siuda D, Reifenberg G, Kleinert H, Forstermann U, Li H. 2013. Role of SIRT1 and FOXO factors in eNOS transcriptional activation by resveratrol. *Nitric Oxide*. 32:29–35.
- Xia N, Forstermann U, Li H. 2014. Resveratrol and endothelial nitric oxide. *Molecules*. 19: 16102-16121
- Zeng G, Nystrom F, Ravichandran L, Cong L, Kirby M, Mostowski H, Quon M. 2000. Roles for insulin receptor, PI3- kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* 101:1539–1545

Zhang Q, Wang Z, Chen H, Zhou S, Zheng W, Liu G, Wei Y, Cai H, Liu D, Liang C. 2008. Endothelium-specific overexpression of class III deacetylase SIRT1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc. Res.* 80:191–199

Zhou X, Chen M, Zeng X, Yang J, Deng H, Yi L, Mi M. 2014. Resveratrol regulates mitochondrial reactive oxygen species homeostasis through SIRT 3 signaling pathway in human vascular endothelial cells. *Cell Death Dis.* 18;5e1576

Zu Y, Liu L, Lee M, Xu C, Liang Y, Man R, Vanhoutte P, Wang Y. 2010. SIRT 1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary aortic endothelial cell. *Circ Res.* 106: 1384-1393