



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

“Efecto de los ácidos grasos libres y de la glicina sobre la reactividad vascular en un modelo de síndrome metabólico ”

Para obtener el título de Licenciado en Nutrición

TESIS

P R E S E N T A

P.L.N. Ely Osmar Ortiz Balderas

Bajo la Dirección de:  
Dr. Mohammed El-Hafidi Bentlakder  
Depto. de Biomedicina Cardiovascular  
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



Pachuca, Hgo.  
Agosto de 2013



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

**"Efecto de los Ácidos Grasos Libres y de la Glicina Sobre la Reactividad Vascular en un Modelo de Síndrome Metabólico."**

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta el Pasante

**C. Ely Osmar Ortiz Balderas.**

**ATENTAMENTE  
Pachuca, Hidalgo, 26 de Julio del 2013  
"Amor, Orden y Progreso"**

PRESIDENTE	M. EN C. MIROSLAVA PORTA LEZAMA
SECRETARIO	L. EN N. SANDRA CRUZ JAIME
PRIMER VOCAL	M. EN N. H. ZULI CALDERÓN RAMOS
SEGUNDO VOCAL	M. EN N. H. TRINIDAD LORENA FERNÁNDEZ CORTES
TERCER VOCAL	DR. MOHAMMED EL HAFIDI
PRIMER SUPLENTE	L.N. ARIANNA OMAÑA COVARRUBIAS
SEGUNDO SUPLENTE	M.C. YOLANDA SANCHEZ MOJARAZ

*“Por mí se va a la ciudad del llanto; por mí se va al eterno dolor; por mí se va hacia la raza condenada: la injusticia animó a mi sublime arquitecto; me hizo la Divina Potestad, la Suprema Sabiduría y el Primer Amor. Antes de mí, no hubo nada creado, a excepción de lo inmortal, y yo duro eternamente. ¡Oh, vosotros los que entráis, abandonad toda esperanza!”*

*Dante Alighieri*

**Dedicatoria:**

Quiero dedicarle éste trabajo y toda mi carrera a mi mamá, que es el motor de mi vida, gracias mamá por todo tu cariño y apoyo, estoy seguro que sin ti no hubiese logrado éste paso tan importante en mi vida, no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has brindado, sólo me queda decirte; gracias mamá, te quiero mucho.

A mis hermanos, Itzhel, Jorge y Erick que siempre me han otorgado su amor y apoyo en los buenos y malos momentos, gracias por todo lo que han hecho por mí. Hemos vivido tiempos difíciles, pero siempre hemos permanecido unidos y eso es lo que nos ha permitido salir adelante. Gracias por apoyarme todo éste tiempo.

Una dedicación especial a mi abuela Inés, que aunque ya no está conmigo siempre me apoyo y en todo momento estuvo a mi lado. A mi abuela Concha que me ha apoyado en todo momento, abuela, sin ti no hubiese llegado tan lejos.

Quiero agradecer profundamente al Dr. Mohammed por todo su apoyo, paciencia y su invaluable enseñanza, gracias Dr. por estos 2 años que ha sido mi maestro, le agradezco infinitamente todo lo que ha hecho por mí en este periodo tan importante de mi vida profesional.

A las excelentes personas que conocí durante este tiempo; Ocarol, Angélica, Dora, Alejandra, Ángel y al Dr. Israel que me brindaron su amistad y apoyo desde el primer día que los conocí, gracias por compartir todos sus conocimientos conmigo, me divertí mucho a su lado y les agradezco enormemente todo lo que han hecho por mí.

A Salvador e Irving, aunque ha sido poco el tiempo que hemos convivido he aprendido mucho a su lado y por todas las risas que me han sacado, gracias chavos.

## **Agradecimiento**

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto No. 106845 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); Responsable técnico: Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder.

Gracias al CONACyT por la beca otorgada por un año durante el desarrollo de la tesis (Proyecto No. 106845)

## Contenido

Tabla de abreviaciones .....	8
1. Resumen .....	9
2. Abstract .....	10
3. Marco teórico.....	10
3.1 Síndrome metabólico .....	10
3.1.1 Criterios para el diagnóstico del SM.....	13
3.1.1.1 Criterios diagnósticos de SM de la OMS .....	13
3.1.1.2 Criterios diagnósticos de SM de NCEP-ATP III.....	13
3.1.1.3 Criterios diagnósticos de SM de la IDF .....	14
3.1.3 Síndrome metabólico y estrés oxidativo .....	15
3.1.4 Hipertensión arterial en el síndrome metabólico .....	16
3.2 Ácidos grasos libres y estrés oxidativo .....	18
3.3 Estrés oxidativo y reactividad vascular .....	19
3.4 Algunas propiedades biológicas de la glicina .....	21
4. Planteamiento del problema.....	22
5. Justificación.....	24
6. Objetivos .....	25
6.1 Objetivo general.....	25
6.2 Objetivos particulares .....	25
7. Hipótesis.....	25
8. Diseño metodológico .....	26
8.1 Modelo de síndrome metabólico en ratas .....	26
8.2 Determinación de grasa corporal, tensión arterial, leptina, HDL, triglicéridos, insulina.....	27
8.3 Reactividad vascular.....	27
8.4 Homogenización y determinación de proteína .....	29
8.5 Extracción de ácidos grasos libres .....	30
8.6 Medición de la actividad de NAD(P)H oxidasa por luminiscencia.....	31

8.7 Análisis estadístico .....	31
9. Resultados .....	32
9.1 Características generales de los animales .....	32
9.2 Reactividad vascular .....	33
9.3 Efecto de la glicina sobre la reactividad vascular en presencia de AO y AP .....	38
9.4 Actividad de la NAD(P)H oxidasa .....	39
10. Discusión .....	42
11. Conclusión .....	48
12. Perspectivas .....	48
13. Referencias bibliográficas .....	49

## Tabla de abreviaciones

Palabra	Abreviación
Acetilcolina	AC
Ácidos grasos libres	AGL
Ácido oleico	AO
Ácido palmítico	AP
Butil hidroxitolueno	BHT
Comisión nacional de ciencia y tecnología	CONACyT
Dimetilsufoxido	DMSO
Difenilindol	DPI
Encuesta nacional de salud y nutrición	ENSANUT
Especies reactivas de oxígeno	ERO
Especies reactivas de nitrógeno	ERN
Federación internacional de diabetes	IDF
Glicina	Gly
Difenilindol	DPI
Dimetilsulfoxido	DMSO
Organización mundial de la salud	OMS
Óxido nítrico sintetasa endotelial	eNOS
Óxido nítrico sintetasa inducible	iNOS
Óxido nítrico sintetasa neural	nNOS
Programa nacional de educación de colesterol-panel III de tratamiento del adulto	NCEP-ATP III
Receptor de glicina	Gly-R
Síndrome metabólico	SM



## 1. Resumen

El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones metabólicas tales como la obesidad, la resistencia a la insulina así como la hipertensión que son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. La resistencia a la insulina induce un aumento de actividad lipolítica en el tejido adiposo abdominal promoviendo la liberación de ácidos grasos libres (AGL) hacia el torrente sanguíneo, estos AGL pueden inducir estrés oxidante produciendo una disfunción endotelial. Por lo tanto el objetivo del presente estudio es elucidar el mecanismo por el cual los AGL inducen estrés oxidativo promoviendo una disfunción endotelial y el efecto protector de la glicina. Para este fin se ha desarrollado un modelo animal de síndrome metabólico administrando 30% de sacarosa en el agua de bebida durante 24 semanas en ratas macho Wistar y al término de las 24 semanas se les administró glicina al 1% en el agua de bebida por 4 semana más, de esta manera se evaluó el efecto de los AGL como generadores de estrés oxidativo sobre la reactividad vascular en anillos de aorta y el efecto protector de la glicina contra el estrés oxidativo. La administración de sacarosa al 30% aumentó de manera significativa la presión arterial, los niveles de grasa intra-abdominal, los AGL ( $P<0.01$ ) y leptina ( $P<0.05$ ). Mientras el tratamiento de los animales con glicina mejoró todos los parámetros encontrados alterados en las ratas con síndrome metabólico (presión arterial, grasa abdominal, insulina y triglicéridos). Los anillos de aorta aislados de las ratas con síndrome metabólico muestran una menor vaso-relajación comparados con las ratas a las que se les administro la glicina ( $P<0.05$ ). La glicina revierte el estrés oxidativo generado por los AGL en los anillos de aorta aumentando la vasodilatación inducida por el acetilcolina en los anillos de aorta de los animales con síndrome metabólico.

**Palabras clave:** Síndrome metabólico, resistencia a la insulina, obesidad, ácidos grasos libres, estrés oxidativo, glicina.

## 2. Abstract

The metabolic syndrome, is a cluster of metabolic disorders such as obesity, insulin resistance and hypertension which are risk factors for developing cardiovascular diseases. The insulin resistance provokes an increased in the lipolytic activity on the tissue adipose causing the release of free fatty acids (FFA) in the bloodstream, these FFA can induce oxidative stress producing an endothelial dysfunction. The aim of this study is to elucidate the mechanism for the FFA, which induces oxidative stress, trigger endothelial dysfunction and the protective effect to the glycine. We have developed an animal model of metabolic syndrome by administering 30% of sucrose in the drinking water for 24 weeks in wistar male rats and at the end of the 24 weeks 1 % of glycine was administered for 4 more weeks. We evaluated the effect of the FFA as generators of oxidative stress in the vascular reactivity in aorta rings and the effect of the glycine against oxidative stress. The administration of sucrose significantly increased the blood pressure, abdominal fat levels, FFA ( $P<0.01$ ) and leptin ( $P<0.05$ ). While the animal treatment with glycine improved all the parameters found altered in the rats with metabolic syndrome (blood pressure, abdominal fat, insulin and triglycerides). The aorta rings from the rats with metabolic syndrome show lower relaxation vessel compared with the rats that were administered glycine ( $P<0.05$ ). The glycine protects against oxidative stress which generates from the FFA in the aorta rings increase the relaxation vessel induced by acetylcholine in the aorta rings from the animals with metabolic syndrome.

**Key words:** Metabolic syndrome, insulin resistance, obesity, free fatty acids, oxidative stress, glycine.

## 3. Marco teórico

### 3.1 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) ha recibido en las últimas décadas una gran atención por el personal de salud e investigadores debido al elevado número de la población

que lo padece y por el alto riesgo de presentar diversas complicaciones metabólicas y enfermedades cardiovasculares relacionadas con el SM (1).

El SM se refiere a un grupo de factores de riesgo cardiovasculares que incluye, obesidad, dislipidemia, resistencia a la insulina, e hipertensión arterial (2). Los pacientes identificados con SM tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (3). Un incremento en los riesgos cardiovasculares en el SM es resultado de una compleja interacción entre los diferentes factores de riesgo individuales que aún no está completamente establecida (4).

Particularmente en México, la incidencia de factores de riesgo para desarrollar el SM va en aumento con respecto a años anteriores, de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 2012, el sobrepeso y la obesidad son problemas que afectan a cerca de 73% para hombres y 69.4% para mujeres de entre los 30 y 60 años. Por otro lado, la prevalencia de hipertensión arterial en la población de 20 años o más resulta de 33.3% y por último la prevalencia de hipercolesterolemia en adultos es de 8.5%. La encuesta revela que el sobrepeso y la obesidad han seguido aumentando en todas las edades, regiones y grupos socioeconómicos, con lo que se colocan entre los problemas de salud pública más importantes. Si se compara con la encuesta realizada en ENSANUT 2006 se puede notar una pequeña alza en la incidencia de estos factores de riesgo (5). En la encuesta de 2006 la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en hombres de entre 20 y 80 años fue de 66.7% y para las mujeres de la misma edad fue de 71.9%, por otro lado la prevalencia de hipertensión arterial en la población de 20 años o más resultó de 30.8% y por último la prevalencia de hipercolesterolemia en el mismo rango de edad fue de 8.5% (6)

En cuanto a su etiología, algunos autores consideran que la resistencia a la insulina es la anormalidad metabólica central, que se define como la reducción en la habilidad de la insulina para estimular el consumo de glucosa en varios tejidos corporales, si bien pueden existir otras etiologías posibles; se ha comprobado la

relación positiva entre la hiperinsulinemia y la manifestación de enfermedad coronaria (7). Esta asociación incluye un efecto directo de la insulina sobre la pared arterial, este efecto puede ser atribuido a que la insulina estimula la liberación de óxido nítrico (ON) en las células endoteliales, disminuye la vaso constricción mediada por el simpático y potencia la vaso dilatación mediada por acetilcolina (AC). La resistencia a la insulina parece ser la responsable de la ausencia de estos efectos vaso-moduladores en el SM (8). Por otro lado, la obesidad, es definida como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo, que se ha considerado en diversas investigaciones como un modulador importante en el SM. Se ha establecido que la obesidad no es homogénea y que la distribución de la grasa juega un papel importante en la asociación entre el aumento del tejido adiposo y las alteraciones metabólicas. A este respecto, se sugiere que la obesidad intra-abdominal es responsable de desórdenes hemodinámicos y metabólicos, algunos de los cuales están mediados por la insulina (9).

De éste modo, la resistencia a la insulina es componente de algunas enfermedades crónicas asociadas con la obesidad como son diabetes tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemia y SM. De esta manera, se ha propuesto la posible relación que hay entre la resistencia a la insulina y la obesidad abdominal, esta posible relación promueve la liberación de ácidos grasos libres (AGL) hacia el torrente sanguíneo. El aumento de la liberación de AGL a partir del tejido adiposo disminuye la captación de glucosa dependiente de insulina en el músculo esquelético. Este mecanismo inhibidor involucra una disminución de la actividad de la fosfatidilinositol-3 cinasa, enzima de la cascada de señalización intracelular de la insulina, que aumenta el número de transportadores de glucosa en la membrana. Estudios recientes indican que en la obesidad las células adiposas secretan en exceso varias proteínas, péptidos y citocinas que afectan las vías de señalización intracelular de la insulina. Por ejemplo los adipocitos producen el factor de necrosis tumoral alfa1 (TNF- $\alpha$ ), una citosina que disminuye la captación de glucosa vecina de los adipocitos (10),

La evidencia sugiere que los AGL juegan un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina, algunos mecanismos que se han sugerido tratan de explicar

cómo los AGL afectan la acción de la insulina como son el ciclo de Randle (Competición entre AGL y glucosa), acumulación de derivados lipídicos intracelulares (diacilglicerol y ceramidas), estrés oxidativo, modulación de la transcripción génica, inflamación y disfunción mitocondrial (11).

### 3.1.1 Criterios para el diagnóstico del SM

Se ha reconocido desde hace años, la existencia de alteraciones metabólicas asociadas a enfermedades cardiovasculares, proponiéndose varios términos para describir este conjunto de desórdenes metabólicos.

Recientemente, varias organizaciones han publicado diferentes criterios con el fin de establecer un diagnóstico oportuno; sin embargo, no hay una definición totalmente aceptada, la primera descripción del SM la hizo Reaven en 1988 describiéndolo como “Síndrome X” en el cual utilizó por primera vez el término “Síndrome de resistencia a la insulina”, definió el Síndrome X como un conjunto de alteraciones que tienden a darse en un mismo individuo, entre las que se encuentran, resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, bajos niveles de HDL e hipertensión arterial (4, 12).

#### 3.1.1.1 Criterios diagnósticos de SM de la OMS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1988 propuso la definición de SM y considera a esta entidad como una afección en la que se incrementa el riesgo cardiovascular, caracterizada por la asociación de varias enfermedades para establecer el diagnóstico debe de presentar resistencia a la insulina por hiperinsulinemia (13), intolerancia a la glucosa o el diagnóstico de Diabetes tipo 2 y más dos de los siguientes criterios: dislipidemia, hipertensión y micro albuminuria (14). (Tabla 1).

#### 3.1.1.2 Criterios diagnósticos de SM de NCEP-ATP III

Otra definición, es la que se estableció en 2001 por el Programa Nacional de Educación de Colesterol-Panel III de Tratamiento del Adulto (NCEP-ATPIII por sus siglas en inglés), en el cual incluye parámetros clínicos como son: circunferencia de cintura, es decir, obesidad abdominal (6) perfil lipídico, presión arterial e intolerancia

a la glucosa, en comparación con el criterio de la OMS no es necesario la presencia de resistencia a la insulina para elaborar el diagnóstico, la principal intención del NCEP-ATPIII es la de identificar a los individuos con un alto riesgo de enfermedad cardiovascular y enfatizar la importancia de los estilos de vida saludables (Tabla 1) (13, 14).

#### 3.1.1.3 Criterios diagnósticos de SM de la IDF

En el 2006 la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) postuló su criterio para el diagnóstico del SM, donde le otorga gran importancia a la medición de circunferencia de cintura la cual es un requisito necesario para el diagnóstico de SM ya que tiene como ventaja la simple medición de la cintura que se puede hacer de manera relativamente fácil y económica en cualquier lugar. Esta definición establece una lista de posibles criterios adicionales que deben incluirse para elaborar el diagnóstico oportuno (Tabla 1) (15).

Tabla 1. Diferentes criterios diagnósticos del SM

Característica	OMS	NCEP-ATPIII	IDF
<b>Presión sanguínea (mm/Hg)</b>	TA $\geq$ 140/90	TA $\geq$ 130/85	TA $\geq$ 130/85
<b>Niveles de lípidos en sangre (mg/dL)</b>	TG $\geq$ 150 HDL H $\leq$ 35 M $\leq$ 39	TG $\geq$ 150 HDL H $\leq$ 40 M $\leq$ 50	TG $\geq$ 150 HDL H $\leq$ 50 M $\leq$ 40
<b>Obesidad abdominal</b>	IMC $\geq$ 30 kg/m <sup>2</sup> ICC M: $\geq$ 0.90 H: $\geq$ 0.85	C. de cintura M: $\geq$ 102 cm H: $\geq$ 88 cm	C. de cintura H europeo $\geq$ 94 cm H asiático $\geq$ 90 cm Mujer $\geq$ 80 cm
<b>Niveles de glucosa en sangre (mg/dL)</b>	DT2 $\geq$ 110 mg/dL	Intolerancia a la glucosa $\geq$ 110	Intolerancia a la glucosa $\geq$ 100 o DT2
<b>Otros</b>	Elevaciones persistentes de albúmina en la orina $\geq$ 20 $\mu$ g/min	Elevaciones persistentes de albúmina en la orina $\geq$ 20 $\mu$ g/min o relación albúmina/creatinina $\geq$ 30 mg/g	

H: Hombre, M: Mujer, TA: Tensión arterial, TG: Triglicéridos, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, IMC: Índice de masa corporal (kg/m<sup>2</sup>), C. de cintura: Circunferencia de cintura, ICC: Índice cintura-cadera, DT2: Diabetes tipo 2,  $\geq$ : Mayor o igual a,  $\leq$ : Menor o igual a.

### 3.1.3 Síndrome metabólico y estrés oxidativo

Existen evidencias que el estrés oxidativo, definido como un desequilibrio persistente entre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) o de especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y la defensa antioxidante, tiene un papel directo y fundamental en la patogénesis y las complicaciones de la hipertensión y de la diabetes (16,17). Las EROs son definidas como derivados del oxígeno con características de inestabilidad y reactividad química, son producidos por varias enzimas oxidasas incluyendo: NAD(P)H oxidasa, xantina oxidasa, ciclooxigenasa, glucosa oxidasa, lipoxigenasa y la cadena respiratoria mitocondrial, y que incluyen los siguientes radicales libres: anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y el óxido nítrico porque tienen electrones apareados y potente habilidad oxidativa y los no radicales como son peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) (18). En condiciones normales las EROs son necesarias

para muchos procesos bioquímicos, tales como señalización intracelular para la diferenciación celular, en el factor de crecimiento celular o como defensa contra un antígeno, las EROs mantienen un balance óptimo entre su producción y eliminación, sin embargo, altos niveles de EROs resultan en estrés oxidativo que puede causar severos cambios metabólicos (19). El estrés oxidativo es un factor muy importante para el desarrollo y progresión de, hipertensión arterial, aterosclerosis e infarto al miocardio, esto puede estar ocasionado por disfunción endotelial debido al daño ocasionado por los altos niveles de EROs (6).

En el SM con obesidad de tipo androide existe un aumento en la actividad lipolítica debido a la resistencia a la insulina que resulta en un aumento de AGL circulantes; así como, un aumento de diferentes hormonas e interleucinas pro-inflamatorias (20). Los AGL inducen un aumento en la generación de EROs en las células endoteliales que disminuyen la disponibilidad del ON (21).

En modelos animales con SM inducido por dietas altas en grasa o altas en hidratos de carbono hay un aumento en la generación de EROs y una disminución en la actividad y expresión de la ON sintetasa endotelial (eNOS por su siglas en inglés) que se reflejan en un aumento de la vasoconstricción y una disminución de vaso relajación en anillos aislados de la aorta de los animales con SM (22).

#### 3.1.4 Hipertensión arterial en el síndrome metabólico

La hipertensión arterial es otro componente del SM que es independientemente asociado con el aumento de riesgo cardiovascular. La hipertensión en el SM está asociada con alteración en la función endotelial que se caracteriza por mayor vaso constricción y menor vaso relajación de las arterias. Estas alteraciones pueden ser debidas a un aumento en sustancias vaso constrictoras y una disminución de los vaso relajantes circulantes o a un cambio estructural de la pared vascular, ocasionando disfunción endotelial. La disfunción ocurre en muchos procesos patológicos y el estrés oxidativo se ha podido identificar como el común denominador de estos procesos. El término disfunción endotelial indica que ya sea



en condiciones basales o luego de estimulación, el endotelio no cumple apropiadamente sus funciones de regulación del tono vascular (23, 24).

El ON es un vaso relajante secretado por células endoteliales que regula el tono vascular y es producido a partir del aminoácido básico L-arginina por tres diferentes isoformas de la ON-sintetasa [NOSI o neuronal (nNOS), NOSII o inducible (iNOS), NOS III o endotelial (eNOS)] expresadas en prácticamente todos los tipos de células vasculares, pero es la isoforma endotelial la principal responsable de la síntesis de ON en las células endoteliales (25). Mientras que eNOS y nNOS son proteínas constitutivamente expresadas, la expresión de iNOS requiere la interacción de la célula con estímulos que generen señales nucleares apropiadas (Tabla 2). Las tres isoformas de NOS comparten un ciclo catalítico similar, que consiste en la oxidación de L-arginina para formar NO y L-citrulina en una compleja reacción que utiliza como co-sustratos  $O_2$  y NADPH y requiere varios cofactores redox como tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ), flavina adenina dinucleótido (FAD), flavina adenina mononucleótido (FMN) y el grupo hemo (26).

Tabla 2. Comparación de las isoformas de óxido nítrico sintetasa

eNOS	Endotelial o constitutiva	III	Endotelio	Membranal	Dependiente del sistema Ca <sup>2+</sup> - Calmodulina
nNOS	Neuronal	I	Neuronas	Citosólica	Dependiente del sistema Ca <sup>2+</sup> - Calmodulina
iNOS	Inducible	II	Músculo liso Macrófagos Hepatocitos Condrocitos	Citosolica	Independiente del Calcio

eNOS: Óxido nítrico sintetasa endotelial, nNOS: Óxido nítrico sintetasa neuronal, iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible.

Con respecto, a la generación molecular de EROs algunas enzimas se han sugerido para describir estos procesos incluyendo el desacoplamiento de la eNOS y xantina oxidasa (XOD), NAD(P)H oxidasa y la cadena respiratoria mitocondrial. Lo que provoca probablemente una reducción en la biodisponibilidad del ON que se ha sugerido como la principal causa de disfunción endotelial (27).

### 3.2 Ácidos grasos libres y estrés oxidativo

El exceso de grasa intra-abdominal se relaciona con altos niveles de AGL plasmáticos y que conlleva al desarrollo de resistencia a la insulina (28). En pacientes con diabetes tipo 2, hay una correlación inversa entre los niveles de los AGL plasmáticos y el cociente del glutatión reducido/oxidado (29). En sujetos sanos, la inyección de los AGL (como intra-lípido) aumenta el estrés oxidativo, evaluado por un aumento en el malondialdehído y una disminución en el plasma de la proporción del glutatión reducido/oxidado (30). La formación de EROs puede ser

una consecuencia directa de la hiperglicemia o de los niveles altos de los AGL (31,32). Se ha sugerido que los AGL inducen la generación de EROs activando el sistema de NAD(P)H oxidasa o al nivel de la mitocondria (33-35). Si bien se cree que la fuga de electrones de la cadena transportadora de electrones mitocondrial es la principal fuente de estrés oxidativo en enfermedades cardiovasculares. Recientes investigaciones sugieren que la enzima por el cual se producen estos EROs en el tejido vascular es la NAD(P)H oxidasa que es transmembranal y que está dedicada a la producción de anión superóxido por transferencia de un electrón proveniente de NAD(P)H oxidasa hacia el oxígeno molecular (36). Por otro lado, los EROs, además de su habilidad de inducir daño macromolecular (ADN, proteínas, y lípidos) directamente, pueden funcionar como moléculas de señalización para activar diversas vías sensibles al estrés oxidativo que causan daño celular responsable de las complicaciones de la diabetes. Estas mismas vías son vinculadas con la resistencia a la insulina. Estudios *in vitro* han descrito la activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B por los AGL, una consecuencia probable de la habilidad de los AGL de incrementar la formación de EROs y reducir la concentración del glutatión (37-39). Este efecto podría también ser vinculado con la activación de la PKC $\theta$  mediada por los AGL (40) que tiene la habilidad única entre las diferentes isoformas de la PKC $\theta$  de activar el factor de NF- $\kappa$ B (41,42)

### 3.3 Estrés oxidativo y reactividad vascular

El endotelio produce sustancias vaso constrictoras que a su vez estimulan la liberación de vaso relajantes limitando así su propio efecto con lo que la modulación del tono vascular resulta compleja y de un balance delicado (43). Las células endoteliales sintetizan y liberan varios factores que regulan la angiogénesis, respuestas inflamatorias y homeostasis

La AC es un vasodilatador potente secretado en las paredes endoteliales y una gran herramienta para la medición de la función endotelial. Su actividad está mediada por los receptores muscarínicos endoteliales los cuales activan la liberación de agentes vaso-relajantes como el ON, mientras que su efecto constrictor a

concentraciones altas, puede realizarse a través de receptores muscarínicos de las células del músculo liso, también estimulan los receptores nicotínicos en terminaciones nerviosas adrenérgicas, las cuales liberan norepinefrina. Se han identificado 3 tipos de receptores muscarínicos que intervienen en la relajación del endotelio: M1, M3, y M5, siendo el M3 que se encuentra principalmente en la aorta. (Figura 1) (44).

La norepinefrina tiene poca actividad metabólica general, y su función fundamental es como la principal sustancia neurotransmisora o mediadora de impulsos nerviosos adrenérgicos que actúan sobre el corazón y los vasos sanguíneos para elevar y conservar la presión arterial. La norepinefrina es un estimulante de receptores  $\alpha 1A$ -adrenoceptores que induce vasoconstricción sistémica y aumenta la contractilidad cardíaca (45).

Figura 1. Mecanismo por el cual la AC produce vaso relajación en el endotelio vascular.

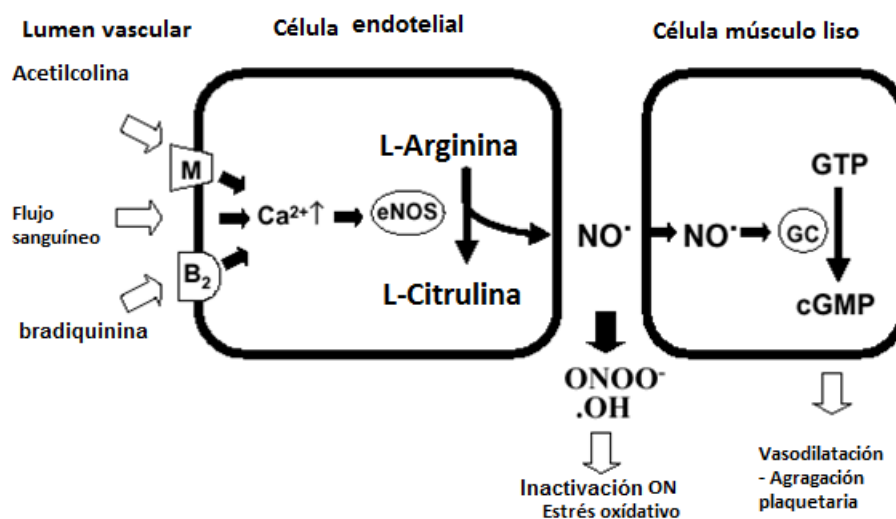


Figura 1. El flujo sanguíneo estimula la liberación de AC la cual es captada por receptores muscarínicos ubicados en la célula endotelial lo cual aumenta los niveles de  $Ca^{2+}$  estimulando la acción de eNOS, de esta manera se activa la liberación de ON causando vaso dilatación en las células del músculo liso.

En la literatura se ha descrito la relación que hay entre SM y disfunción endotelial, es claro que los pacientes con SM tienen dañada su función endotelial (6). Se ha sugerido que la principal causa de daño endotelial es causado por los EROs, se cree que el desacoplamiento de eNOS es la causante de una baja biodisponibilidad de ON a lo cual causa una deficiente dilatación, al formar peroxinitritos que pueden ser la causa del desacoplamiento de eNOS (27). Este daño endotelial puede ser la principal causa para desarrollar hipertensión arterial o aterosclerosis (23-25).

### 3.4 Algunas propiedades biológicas de la glicina

De acuerdo a la literatura disponible, la glicina tiene propiedades biológicas importantes como neurotransmisor, en el sistema nervioso la glicina actúa a través del canal del cloro activado por glicina (46). En los últimos años se ha caracterizado la presencia del receptor de la glicina (Gly-R) en las células endoteliales, es un miembro de una familia de canales de cloro activados por el ligando (47). También se ha demostrado el efecto anti-inflamatorio, citoprotector e inmunomodulador de la glicina en diferentes sistemas celulares y órganos (48,49). La activación del canal del cloro induce una hiperpolarización de la membrana celular bloqueando la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Sin embargo en neutrófilos humanos la glicina a una concentración de 0.1 a 10  $\mu\text{M}$ , disminuye la liberación de EROs estimulada por el péptido fLPM o por el éster de forbol (PMA). Este estudio mostró que el efecto de la glicina es independiente de la actividad del canal del cloro activado por glicina. Estos antecedentes sugieren que el mecanismo por el cual la glicina puede reducir la presión arterial en el SM es disminuyendo la generación de EROs aumentando la disponibilidad del óxido nítrico (50).

#### **4. Planteamiento del problema**

El SM es una enfermedad multifactorial que tiene un gran impacto en los servicios de salud debido al gran y creciente número de pacientes que lo padecen. En años recientes se ha identificado un aumento en la incidencia de casos con SM y de los factores de riesgo que desarrollan el SM, este incremento en la incidencia del SM debido principalmente a factores genéticos, endocrinos, malos hábitos nutricionales especialmente el alto consumo de hidratos de carbono simples y de lípidos saturados, otro factor importante es la poca o nula actividad física de la población entre 20-60 años, que es la más susceptible a desarrollar los factores de riesgo del SM. Recientemente se ha investigado que un alto consumo de carbohidratos simples y de lípidos resulta en una acumulación excesiva de tejido adiposo en la cavidad abdominal, incremento en los AGL, hiperinsulinemia, estos factores desencadenan una resistencia a la insulina debido a la actividad lipolítica del tejido adiposo que es responsable de desórdenes hemodinámicos y metabólicos, algunos de los cuales están mediados por la insulina.

El presente estudio se realizó en ratas macho de la cepa Wistar. Las consideraciones éticas y de sentido común restringen la experimentación en seres humanos, por lo cual la utilización de animales como reactivos biológicos en el ámbito de la investigación científica ha sido fundamental para el establecimiento de nuevos postulados y la constante validación de los mismos. En cuanto al modelo se ha podido caracterizar que este tipo de roedores son sensibles a desarrollar obesidad, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, además, está perfectamente caracterizada desde el punto de vista anatómico, fisiológico, genético y se reproduce sin complicaciones, son animales muy adaptables, fáciles de cuidar y de manejar (51).

El proyecto consistió en investigar el mecanismo por el cual los AGL circulantes afecta la reactividad vascular en anillos de aorta de los animales con SM y el efecto de la glicina sobre los AGL en la reactividad vascular. Los AGL inducen la generación intracelular de las especies reactivas de oxígeno que afectaran la liberación de óxido nítrico produciendo una vaso constricción. También los AGL

pueden inhibir directamente la actividad de la eNOS. Para elucidar este mecanismo se utilizaran atrapador del anión superóxido TEMPOL e inhibidores del sistema NAD(P)H-oxidasa con el DPI (difenilindol) y rotenona para la participación de la mitocondria. La glicina un aminoácido no esencial es precursor de la biosíntesis del GSH que participa en la neutralización del peróxido di hidrogeno vía la glutatión peroxidasa. El tratamiento de los animales con glicina protegería contra la vasoconstricción producida por medio de los AGL en anillos de la aorta.

## 5. Justificación

El modelo con SM ha sido desarrollado en el laboratorio con el objetivo de representar la patología resultante de factores genéticos, malos hábitos nutricionales como dietas inadecuadas por un consumo excesivo de hidratos de carbono simples y lípidos saturados que dan lugar a enfermedades asociadas a un alto índice de morbi-mortalidad como son la obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, entre otras. Además el modelo animal con SM permitirá dilucidar los mecanismos por los cuales la acumulación de grasa intra-abdominal está asociada con la hipertensión arterial. Estos mecanismos implican un alta actividad lipolítica en el tejido adiposo y que resulta en un aumento de AGL en la circulación. Estos ácidos grasos inducen un aumento en la generación de EROs que contribuyen a la evolución de la hipertensión presente en el SM por un aumento en la vasoconstricción. Por otro lado la glicina precursor del glutatión un cofactor de la glutatión peroxidasa puede reducir la generación de los radicales libres. Además el estudio del mecanismo por el cual la glicina disminuye la presión arterial no ha sido abordado en detalle, por lo que el proyecto pretende complementar el conocimiento actual; además la información que se obtenga podrá ser útil para aplicar medidas preventivas o terapéuticas para este cuadro patológico, aunque todavía queda por explicar la participación de otras vías y sus componentes, así como otros factores. El uso de antioxidantes o la modificación de la dieta con inclusión del aminoácido glicina para la posible prevención de enfermedades cardiovasculares ejemplifican tales aplicaciones.



## **6. Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de los AGL sobre la reactividad vascular y cómo participa la glicina en el restablecimiento de la reactividad vascular en anillos de aorta de un modelo de ratas Wistar con SM inducido por alto consumo de sacarosa.

### **6.2 Objetivos particulares**

- 1- Determinar el efecto del ácido palmítico y oleico sobre la vaso-relajación de la aorta en un modelo de SM.
- 2- Investigar la participación del estrés oxidante inducido por los AGL sobre la vaso-relajación de los anillos de aorta.
- 3- Determinar la participación de la mitocondria y la NAD(P)H oxidasa como generadores de EROs inducidos por los AGL en el endotelio vascular.
- 4- Analizar el efecto de la glicina sobre estrés oxidante inducido por los AGL mencionados anteriormente.

## **7. Hipótesis**

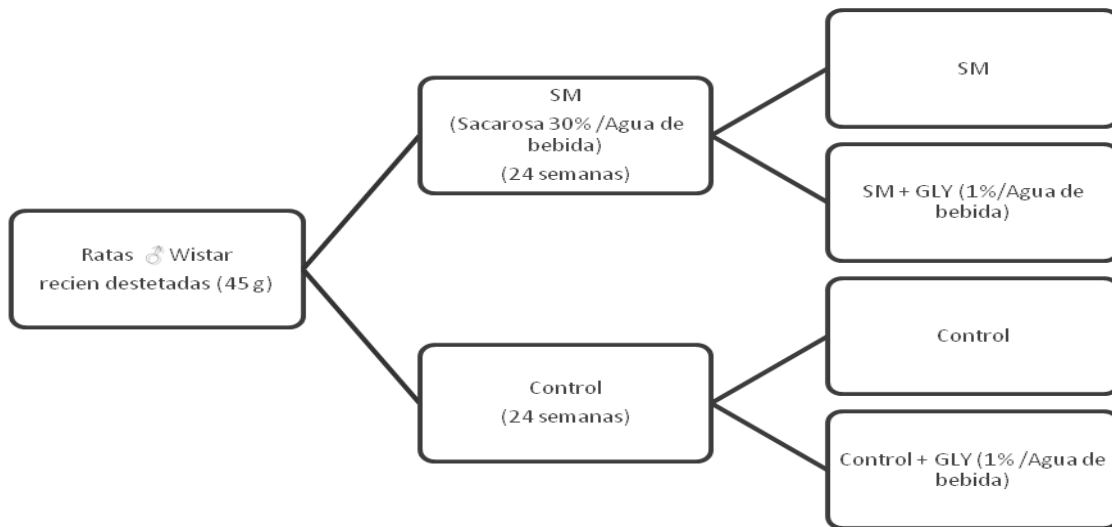
Los AGL inducen mayor vaso constricción y menor vaso relajación en los anillos de aorta aislados de ratas Wistar con SM inducido por alto consumo de sacarosa en comparación con los anillos aislados de ratas Wistar control por medio de un mecanismo que implica estrés oxidativo y cómo la glicina protege contra el estrés oxidativo y normalizaría las alteraciones en la reactividad vascular inducida por los AGL.

## 8. Diseño metodológico

### 8.1 Modelo de síndrome metabólico en ratas

En el laboratorio se ha desarrollado un modelo de SM suministrando una dieta hipercalórica, proporcionando 30% de sacarosa comercial en el agua de bebida de las ratas Wistar durante un periodo de 24 semanas. Las ratas fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, estas fueron aisladas en cajas especiales con una temperatura controlada a 22 C° y un ciclo de iluminación de 12:12 horas, se les proporciono acceso *ad libitum* al agua y alimento; el alimento consistió en croquetas estándar para ratas. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con una edad de 28 días y peso de 45 ± 5 g., se dividieron en 2 grupos con el mismo número de ratas, a un grupo se le dio sacarosa en el agua de bebida y se denominó **SM** y al grupo **Control** se le dio de beber agua simple, el tratamiento tuvo un periodo de 24 semanas. Transcurridos las 24 semanas los 2 grupos se dividieron en 4 subgrupos: El grupo **SM** se dividió en 2 Subgrupos de ratas: Subgrupo 1: **SM** y Subgrupo 2: **SM + Gly** (glicina), y al grupo **Control** de igual manera se dividió en 2 Subgrupos: Subgrupo **Control** y Subgrupo **Control + Gly**, ya con los subgrupos se prosiguió a darles la glicina al 1% en polvo disuelta en el agua de bebida, el tratamiento con glicina fue durante 4 semanas más. Al final del tratamiento y después de una noche en ayuno, las ratas se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron sangre y aorta (Figura 2).

Figura 2. Diseño metodológico del modelo de SM



SM: Síndrome metabólico, Gly: Glicina,

8.2 Determinación de grasa corporal, tensión arterial, leptina, HDL, triglicéridos, insulina.

Durante el tratamiento con glicina fue medida la presión sistólica por el método de tail-cuff (52, 53). Para la determinación de la grasa corporal, se obtuvo solo la grasa de la parte abdominal de la rata con instrumentos de disección, en seguida se colocó en una caja de Petri y se pesó en una báscula analítica. La determinación de leptina, HDL, triglicéridos e insulina se hizo a partir de las instrucciones del kit utilizado para la medición de cada una de las variables (22).

### 8.3 Reactividad vascular

La aorta torácica extraída de los animales se colocó en una caja de Petri que contenía buffer Tyrode (conformado de la siguiente manera (mM/L): 118 NaCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>2</sub>, 4.7 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 2.5 CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 4.5 de glucosa y, un pH de 7.35, el cual estuvo en constante burbujeo con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) a 37°C (52).

El tejido graso y conectivo que cubre la parte exterior de la aorta fue cuidadosamente retirado bajo un microscopio estereoscópico con ayuda de instrumentos de cirugía finos, evitando dañar el endotelio. Después se cortó la aorta en anillos de aproximadamente 2 mm de largo con un bisturí. Los anillos de la aorta se fijaron por medio de pequeños ganchos metálicos. Un extremo del gancho se fijó al fondo de una cámara para órgano aislado de 5 ml y por el otro lado se fijó a un transductor de tensión conectado a un polígrafo Grass modelo 79D con registrador. A los anillos se les aplicó una tensión basal de 2 gramos.

Las cámaras contenían solución Tyrode, el cual se cambió cada 20 minutos 3 veces para permitir la estabilización de la línea basal. Pasado este tiempo se comprobó que la tensión permaneciera constante a 2 gramos.

Para la contracción del tejido vascular se utilizó norepinefrina al  $10^{-7}$  mol/L o  $10^{-7}$  M. La vaso relajación se evaluó por una curva dosis-respuesta de acetilcolina de  $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M.

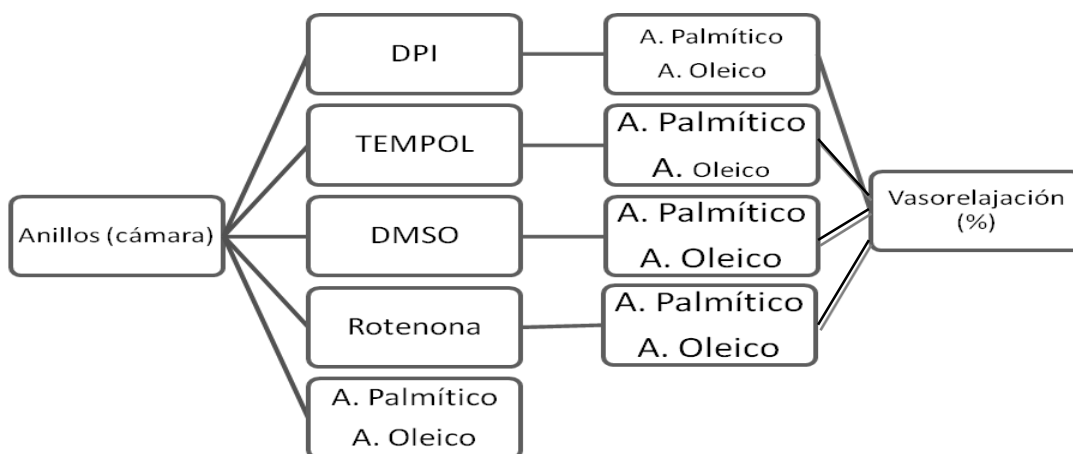
La participación de los EROs en la reactividad vascular se investigó en presencia del ácido palmítico (AP) y oleico (AO) como inductores y en presencia de diferentes inhibidores de EROs tales como:

- 4-hydroxy-TEMPOL (Sigma Chemical Co.): Atrapador de anión superóxido.
- DPI: Inhibidor de NADPH oxidasa.
- Rotenona: Inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.
- DMSO: Se utilizó como vehículo para los reactivos descritos.

Los anillos fueron pre-incubados con TEMPOL (100  $\mu$ M), DPI, Dimetilsulfoxido (DMSO) y rotenona durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se cambió la solución Tyrode y en seguida se incubó primero el ácido palmítico (100 $\mu$ M) por 30 minutos, al término del tiempo se volvió a cambiar la solución primero se contrajo la aorta con norepinefrina ( $10^{-7}$  M) después se relajó con AC ( $10^{-9}$  a  $10^{-5}$  M), en

seguida se cambió el buffer de incubación 3 veces cada 20 minutos para permitir la estabilización de los anillos, pasado el tiempo se volvió a incubar con los reactivos descritos durante 15 min. Se volvió a cambiar la solución y se incubó con ácido oleico (100µM) por 30 minutos y se realizó la curva de respuesta a AC de la misma manera. Y se registró tanto la contracción como la relajación de los anillos de aorta (Figura 3).

Figura 3: Diseño metodológico del experimento de reactividad vascular



DPI: Difenilindol, TEMPOL: 4-hydroxy-TEMPOL, DMSO: Dimetilsulfoxido

#### 8.4 Homogenización y determinación de proteína

Las aortas se pulverizaron con nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 500µL de una solución amortiguadora (Mm/L: HEPES: 50, NaCl:100, EDTA:1, fluoruro de sodio: 10, ortovanadato: 10, glicerol 10%, tritón X-100: 1%, doxicolato de sodio 7%, PMSF 1 mmol/L, aprotinina 100 mg/L, leupeptina 1 mg/L y pepstatina 1 mg/L, pirofosfato de sodio 1 mmol /L, fluoruro de sodio 100 mmol/L y pH:8.0) y por medio de una homogeneizador (1000 rpm/ 5 min) se homogenizaron, posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm / 10 min. A 4°C y se recuperó el sobrenadante.

Las proteínas se cuantificaron según el método modificado de Lowry (54).

Se utilizaron los siguientes reactivos:

- Solución A: NaOH a 0.1 N en NaHCO<sub>3</sub>.
- Solución B: Tartatro de sodio y potasio al 1%.
- Solución C: CuSO<sub>4</sub> al .05%.
- ABS (Albúmina) 1mg/ml
- Folin 1N (Sigma Chemical Co.)

El sobrenadante de las aortas se diluyó 1:100 en solución salina (NaCl al 0.9%), la determinación de la proteína se hizo en 100µL de ésta solución. Se realizó una curva de calibración utilizando albúmina de bovino sérica (ABS) al 1 mg/mL como estándar de la siguiente manera; 0, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 µL, en tubos de ensayo, se llevaron a 100µL con solución salina y se adicionó 800µL de la solución A, 80µL de sol. B y 80µL de la solución C y se dejó incubar por 10 minutos, transcurrido el tiempo se le añadió 100µL de Folin 1N y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

La lectura de absorbancia se realizó en un espectrofotómetro a 750 nm. La lectura de calibración que corresponde a la absorbancia en función de las concentraciones utilizadas de albúmina es lineal y obedece a la ley de Beer-Lambert, lo que permite determinar la concentración de proteína presente en las muestras de aorta.

#### 8.5 Extracción de ácidos grasos libres

Para la extracción de AGL se utilizó 100 µL de suero (48), las muestras se colocaron en tubos de ensayo, enseguida se le añadió 10µL de estándar interno (ácido heptadecanoico C17:0 , 1mg/mL) y se completó el volumen a 1mL con solución salina al 0.9% de NaCl, se le añadieron 1mL de metanol + BHT al 0.002% y se le aplicó vortex 30 seg, 2mL de cloroformo + BHT 0.002% y se le volvió aplicar vortex durante 30 seg, se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. En tubos nuevos se recuperó la fase orgánica y se evaporaron con gas nitrógeno.

A los residuos lipídicos se les agrego 1mL de metanol + BHT 0.002%, 100 µL de 2,2 dimetoxipropano, 10 µL de ácido sulfúrico y se les aplico vortex cada 5 min/ 3 veces, enseguida se le añadió 1mL de cloruro de sodio al 5%, 2mL de hexano grado HPLC y se les dio vortex durante 30 seg. Se separó en tubos nuevos la fase del hexano, la muestra se evaporo con gas nitrógeno y se almacenó a -20 °C.

Los AGL fueron separados y analizados en un cromatógrafo de gases marca Shimadzu, modelo GC-SA con un detector de ionización por flama.

#### 8.6 Medición de la actividad de NAD(P)H oxidasa por luminiscencia

La actividad de NADH y NAD(P)H oxidasa fue medida en homogenizado de aorta (SM, SM + GLY, Control y Control + Gly) utilizando peroxidasa (1mg/mL) y luminol (5-amino-2,3dihydro-1,4 phthalazinedione, Sigma Chemical Co.) (250 µM). Para el experimento se llevaron a cabo varias lecturas en ausencia o presencia de ácido graso palmítico, ácido graso oleico (100µM), TEMPOL (100µM), TEMPOL+ ácido palmítico (100µM), TEMPOL + Oleico (100µM), la reacción se llevó a cabo en 1mL de solución amortiguadora [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50mM), EGTA (1mM), Sacarosa (150mM), pH 7.0, 30°C]. Primero se realizó un experimento solo con el homogenizado (100µg/mL) para obtener la línea basal y en seguida se le añadió NADH (100µM) para verificar la producción de EROs. En los experimentos posteriores se incubaron los reactivos mencionados durante 5 min. La luminiscencia se produjo cuando se le añadió NADH, se realizó la integración de las lecturas con intervalos de 15 seg. Así mismo se realizó con NADPH oxidasa (100µM) en ausencia de los reactivos mencionados. Para la realización de los experimentos se utilizó un luminómetro Mod. 1254 Marca LKB Wallac con registrador.

#### 8.7 Análisis estadístico

Los datos son expresados en media ± EE (estándar error). La significancia estadística se obtuvo aplicando el ANOVA a simple vía. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a  $p < 0.05$ . Todos los análisis estadísticos y las gráficas fueron realizados por medio del software Sigma-Plot versión 11.0.

## 9. Resultados

### 9.1 Características generales de los animales

El modelo desarrollado de SM presenta patologías similares a las presentes en los seres humanos las características propias del modelo con SM sustentan esta afirmación. El diagnóstico se hace a partir de la comparación de las ratas a las cuales se les administro sacarosa con las ratas control de este modo se establece que el modelo presenta obesidad abdominal, hipertensión arterial, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina.

El tratamiento con sacarosa al 30% durante 24 semanas dio como resultado un incremento estadísticamente significativo en la presión arterial, en los triglicéridos, AGL, leptina y Kcal ingeridas y una mayor acumulación de tejido adiposo en la parte abdominal de las ratas con SM. Por otro lado, el análisis del colesterol total no mostró diferencia significativa en ambos grupos pero el colesterol asociado a las HDL disminuyó en los animales con SM. Los niveles de insulina en plasma fueron significativamente más altos en las ratas con SM en comparación con los otros grupos. En el peso corporal y en la ingesta de agua no hubo diferencia significativa. Mientras se observó una disminución en la ingesta de alimento sólido por los animales con SM. En cuanto al tratamiento con glicina tuvo un efecto positivo comparado con los parámetros de las ratas con SM de tal modo que la disminución de la grasa abdominal, insulina y triglicéridos fue estadísticamente significativas (Tabla 3).

**Tabla 3.** Características generales de los animales

Variables	C	CG	SM	SMG
Ingesta(g/día/rat)	20.3 ± 0.5	20.3 ± 0.5	7.3 ± 0.4 **	7.7 ± 0.3
Ingesta de agua (ml/día/rat)	47.9 ± 1.2	43.9 ± 1.9	46.2 ± 1.9	45.7 ± 1.9
Kcal ingeridas (Kcal/día/rat)	296.6 ± 7.1	297.8 ± 7.3	346.1 ± 6.9 *	344.9 ± 4.7



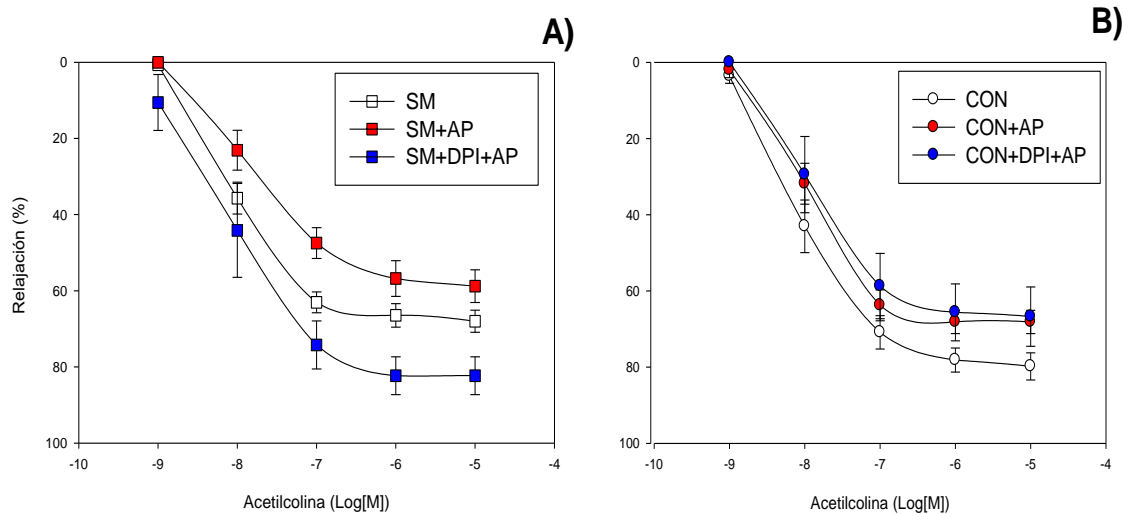
<b>Peso corporal (g)</b>	488.0 ± 19.1	471.0 ± 13.8	437.0 ± 31.7 *	467.0 ± 31.4 ‡
<b>Presión arterial (mm/Hg)</b>	121.0 ± 2.2	115.8 ± 1.8	148.2 ± 4.2 *	127.7 ± 3.7 ‡
<b>Grasa intra-abdominal (g)</b>	7.4 ± 2.2	6.5 ± 1.9	15.3 ± 2.6 *	9.1 ± 1.2 ‡‡
<b>Triglicéridos (mM)</b>	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1 §	1.8 ± 0.1 **	1.1 v 0.1 ‡
<b>Glucosa (mM)</b>	5.9 ± 0.1	5.7 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.4
<b>Colesterol total (mM)</b>	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.6 ± 0.1
<b>Colesterol-HDL (mg/dL)</b>	42.65 ± 3.5	37.5 ± 7.6	28.1 ± 4.1	39.7 ± 3.1
<b>AGL (mM)</b>	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1 **	0.7 ± 0.1 ‡‡
<b>Insulina (µM)</b>	99.6 ± 5.1	106.5 ± 7.6§	167.6 ± 7.8**	109.9 ± 6.2‡
<b>Leptina (ng/ml)</b>	0.6 ± 0.2	1.4 ± 0.6	2.7 ± 0.3**	1.3 ± 0.2 ‡‡

Los valores fueron expresados en +/- EE (n=7 diferentes animales). Los valores de todas las variables fueron obtenidas al final del periodo del tratamiento. C, Control, CG Control con Glicina, SM, Síndrome Metabólico, SMG, Síndrome Metabólico con Glicina. \*P<0.05. \*\* P<0.01, Diferencia significativa de C. ‡ P<0.05. ‡‡ P<0.01, Diferencia significativa de SM. §P<0.05, Diferencia significativa de C.

## 9.2 Reactividad vascular

El tratamiento de los animales con sacarosa induce una alteración endotelial en la vaso relajación de anillos de aorta aislada. La figura 4 muestra el efecto que tiene el AP y el DPI, un atrapador del anión superóxido, sobre la vaso-relajación inducida por acetilcolina en anillos de aorta con SM y control. En anillos de aorta con SM pre-contraídos con norepinefrina, la acetilcolina induce una menor relajación comparados con los control (Figura 4). El AP indujo una menor relajación en los anillos de aorta con SM, la acetilcolina indujo una relajación del 60% (Fig. 4A) la cual comparada con los control es estadísticamente significativa, la relajación inducida en presencia de AP fue de 70% en los anillos aislados de aorta controles (Fig. 4B). La incubación de DPI revirtió significativamente el efecto del AP en los

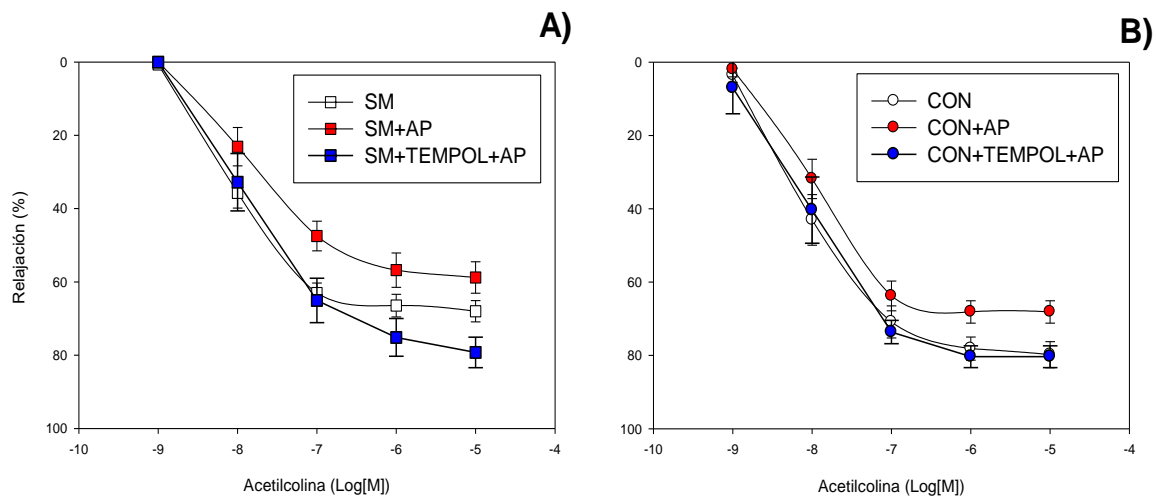
anillos de aortas con SM induciendo una relajación del 80%, en las aortas controles el DPI no mejoró la vaso relajación (Fig. 4B).



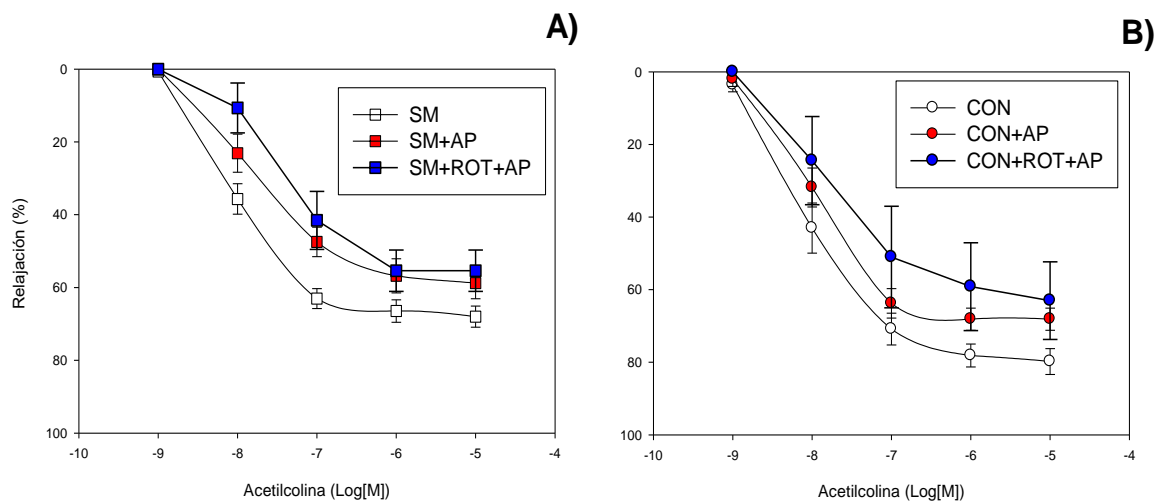
**Figura 4:** A) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas con SM en presencia de AP y de AP+DPI. B) Relajación producida en anillos de aortas control en presencia de AP y de AP+DPI. Los valores son expresados en  $\pm$  EE (n=5 diferentes animales).

En la Figura 5 se muestra la vaso relajación inducida por acetilcolina en los anillos aislados de aorta con SM y control en presencia de AP y AP+TEMPOL. La pre-incubación con TEMPOL, un inhibidor de la NADPH oxidasa, revirtió significativamente el efecto del AP induciendo una relajación del 80% en los anillos aislados de SM (Fig. 5A) y control (Fig. 5B).

La diferencia en la vaso relajación en los anillos aislados de aorta con SM y control se debe a un mecanismo de generación de EROs, el cual se ve aumentado en la presencia de AP. Además la pre-incubación de DPI y TEMPOL inhibió significativamente el efecto del AP y normalizó a un 80% la vaso relajación de los anillos con SM y control.



**Figura 5:** A) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas con SM en presencia de AP y de AP+TEMPOL. B) Relajación producida en anillos de aortas controles en presencia de AP y de AP+TEMPOL. Los valores son expresados en  $\pm$  EE (n=5 diferentes animales).

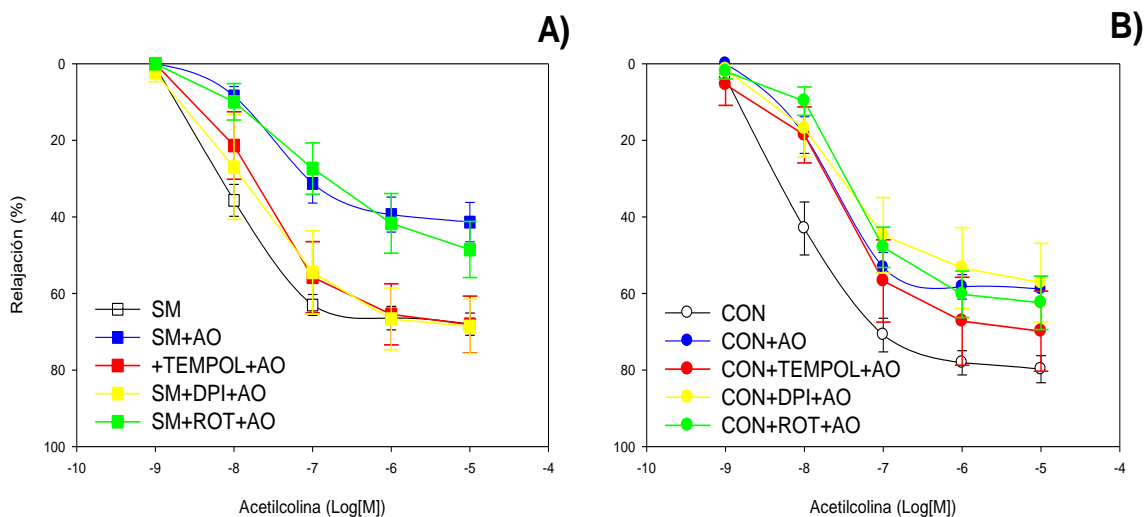


**Figura 6:** A) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas con SM en presencia de AP y de AP+ROT (Rotenona). B) Relajación producida en anillos de aortas controles en presencia de AP y de AP+ROT. Los valores son expresados en  $\pm$  EE (n=5 diferentes animales).

En la Figura 6 muestra la incubación de AP y rotenona, un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. El AP induce una menor relajación en los anillos de aorta con SM (Fig. 6A) comparados con los control (Fig. 6B) y que se ve potenciado en la presencia de rotenona en los anillos con SM pero con menor

magnitud en los anillos control, la relajación en los anillos con SM fue de 55% (Fig. 6A) en comparación con los control que fue de 60% (Fig. 6B), no hay diferencia significativa entre SM y control.

La Figura 7 muestra la vaso relajación inducida por AC en anillos aislados de aorta con SM y control. Los anillos con SM inducen una menor vaso relajación comparados con los control (Fig.7). El AO tiene un efecto inhibitorio mayor al de AP, el efecto del AO es más potente en los anillos con SM que en los control (Fig. 7), de igual forma la presencia de rotenona con AO tiene un efecto inhibitorio sobre la vaso relajación del tejido endotelial ya que solo llega a 50% de relajación (Fig. 7A) comparado con los control que llega al 60% de relajación (Fig. 7B).



**Figura 7:** A) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas con SM en presencia de AP, AO, ROT, DPI y TEMPOL. B) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas controles en presencia de AP, AO, ROT y TEMPOL. Los valores son expresados en  $\pm$  EE (n=5 diferentes animales).

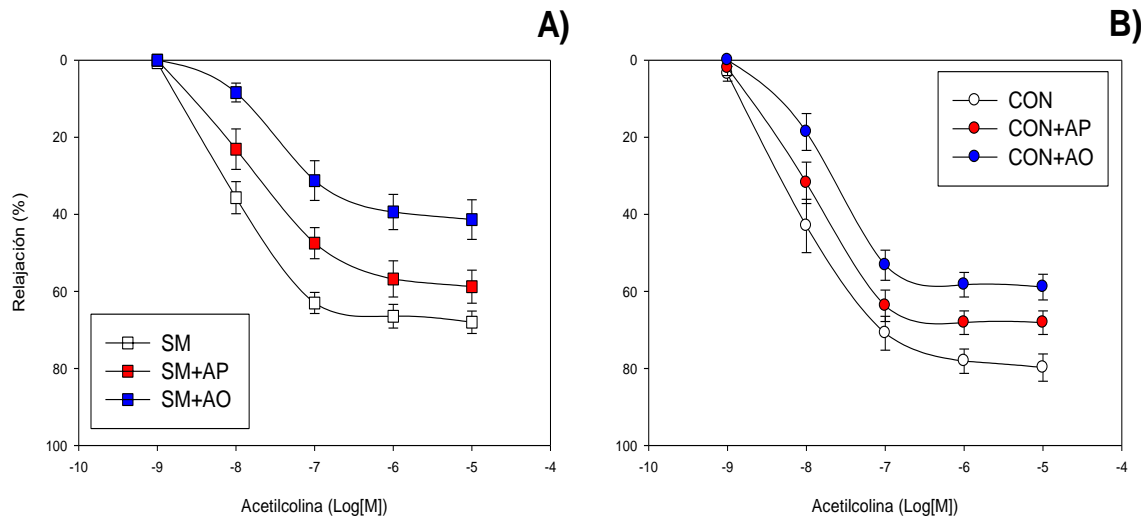
La incubación de DPI contrarresta significativamente el efecto inhibitorio del AO en los anillos con SM (Fig. 7A), no obstante, el DPI no consigue disminuir el efecto inhibitorio del AO en aortas control (Fig. 7B). Por otra parte, el TEMPOL en presencia de AO induce una vaso relajación del 70% en los anillos con SM, existe una diferencia significativa en los anillos con SM incubados con TEMPOL comparados con los anillos con SM incubados con AO. El TEMPOL incubado en

anillos controles inhibe el efecto causado por el AO, sin embargo no es estadísticamente significativo (Fig. 7B).

Sin embargo, aunque la incubación de los anillos de aorta en SM y control con DPI y TEMPOL disminuyen el efecto inhibitorio del AO no logran normalizar la vaso relajación de los anillos de aorta.

La Figura 8 muestra la relajación inducida por AC en anillos aislados de aorta con SM (Fig. 8A) y control (Fig. 8B) en presencia de AP y AO. La incubación con AO disminuye significativamente la vaso relajación de los anillos con SM comparados con los control. El AO induce una menor relajación en comparación con el AP en anillos de aorta con SM (Fig.8A). Los anillos de aorta con SM pre-incubados con AO inducen una vaso relajación de 40% comparados con los anillos con SM pre-incubados con AP que se relajan un 60%. Hay diferencia estadísticamente significativa entre los anillos con SM incubados con AO y AP. El AO disminuye la relajación de los anillos control comparados con los anillos incubados con AP (Fig. 8B). La relajación inducida por AC en presencia de AO en anillos control es de 60% y en presencia de AP la relajación es de 70%, no hay diferencia significativa en los anillos control con AO comparados con anillos incubados con AP.

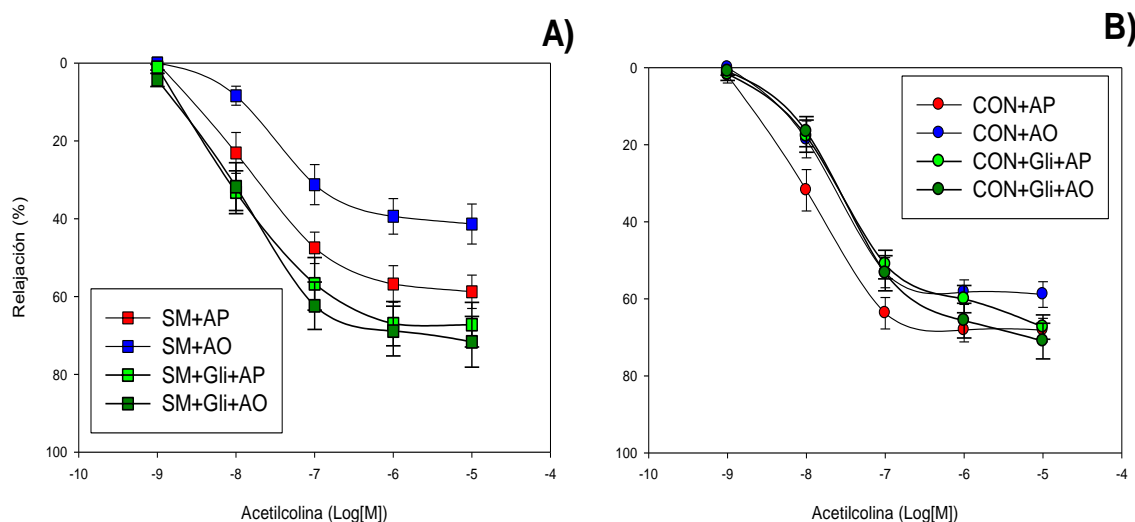
El AO tiene un potente efecto inhibitorio sobre la vaso relajación en anillos con SM y control, por encima del efecto del AP, debido probablemente a factores físico-químicos de cada ácido graso que a su vez provoquen que el AO sea más susceptible a la liberación del anión superóxido a nivel endotelial que comprometa la disponibilidad de ON y disminuya la vaso relajación.



**Figura 8:** A) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas con SM en presencia de AP y AO. B) Relajación producida en anillos de aortas controles en presencia de AP y AO. Los valores son expresados en  $\pm$  EE (n=5 diferentes animales).

### 9.3 Efecto de la glicina sobre la reactividad vascular en presencia de AO y AP.

En la Figura 9 se muestra la vaso relajación inducida por AC en anillos aislados de aorta con SM, SM + Gly, control y control + Gly. Los animales tratados con glicina no disminuyen los efectos inhibitorios del AO y del AP (Fig.9) La glicina disminuye el efecto inhibitorio del AP, sobre la vaso relajación de los anillos con SM (Fig. 9A) pero no llega a normalizar la vaso relajación, ya que la relajación inducida por acetilcolina es de 65%. El efecto inhibitorio sobre la vaso relajación del AO se ve disminuido en los anillos de animales tratados con glicina (Fig. 9A). Aunque hay diferencia significativa entre los anillos de SM y SM + Gly, la glicina no normaliza la vaso relajación en presencia de AO debido a que la relajación solo llega al 70%. De igual manera la glicina no afecta el efecto inhibitorio de AP y AO en los anillos control con glicina (Fig. 9B).



**Figura 9:** A) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas con SM y SM+Gli en presencia de AP y AO. B) Relajación producida por acetilcolina en anillos de aortas controles y controles + Gli en presencia de AP y AO. Los valores son expresados en  $\pm$  EE (n=5 diferentes animales).

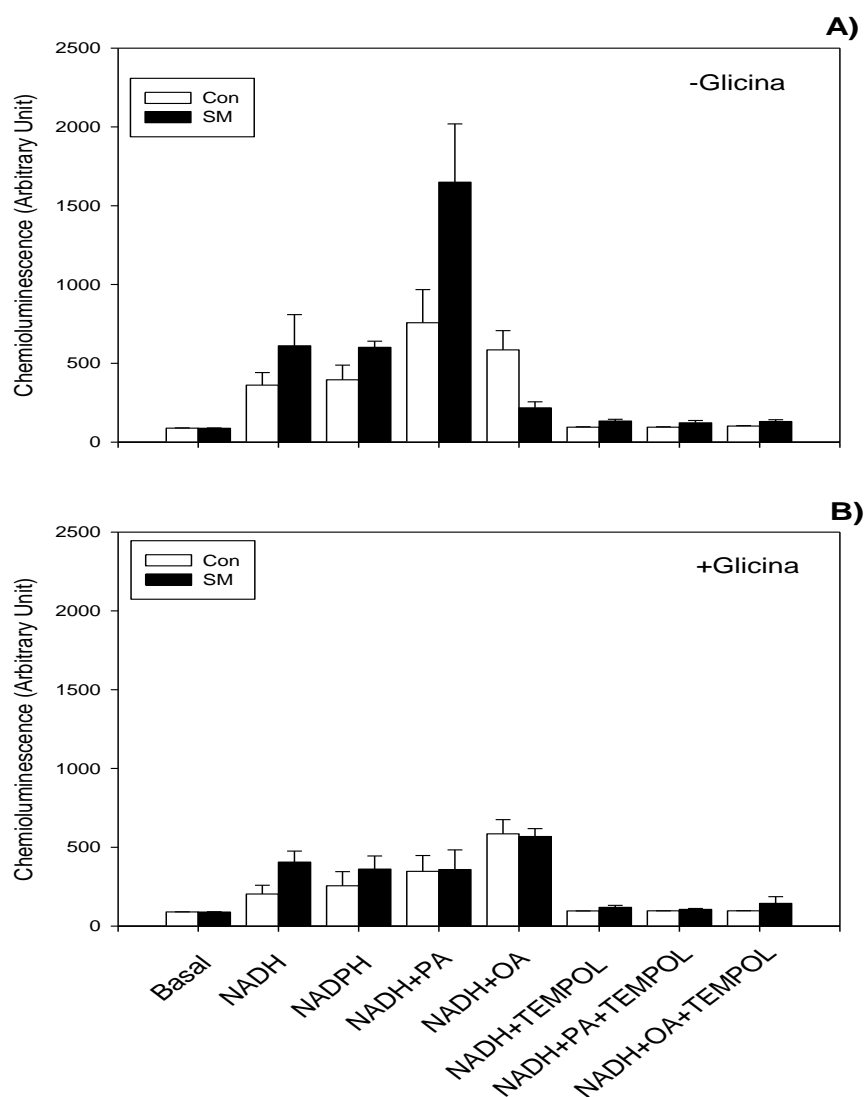
#### 9.4 Actividad de la NAD(P)H oxidasa

La figura 10 muestra la generación del peróxido dihidrogeno ( $H_2O_2$ ) en el homogenizado de aorta en presencia de NADH como sustrato de la NAD(P)H oxidasa. En la Figura 10A se muestra la generación del  $H_2O_2$  en homogenizado de aorta con SM y control. En presencia de NADH o NAD(P)H oxidasa hay un aumento en la generación de  $H_2O_2$  en el homogenizado de aorta con SM comparado con el homogenizado control (Fig. 10A). La incubación con AP induce un aumento en la generación de  $H_2O_2$  en el homogenizado de aorta con SM en comparación con el homogenizado control, sin embargo, no hay diferencia significativa entre SM y control. Por otra parte, la incubación con AO exagera la producción de  $H_2O_2$  de manera significativa en el homogenizado con SM comparado con el homogenizado control. Se puede determinar que el AO es más susceptible a la estimulación en la generación de  $H_2O_2$  en comparación con el AP, este efecto puede deberse a las propiedades físico-químicas de cada ácido graso, como ya se había mencionado anteriormente.

De igual manera, la incubación con TEMPOL (descrito anteriormente) en el homogenizado con SM y control disminuye significativamente el efecto de los ácidos

grasos (AP y AO) y de la NADH y NAD(P)H oxidasa en ambos homogenizados, la inhibición por parte TEMPOL es tal, que llegan a estados basales.

Este efecto del TEMPOL se debe principalmente a la inhibición de la NAD(P)H oxidasa, está inhibición provoca una disminución en la generación de radicales libres. Estos datos sugieren que el aumento en la producción de  $H_2O_2$  refleja la actividad de la NAD(P)H oxidasa en la generación de radicales libres.



**Figura 10:** A) Muestra la generación de  $H_2O_2$  en homogenizados de aorta con SM y control en la presencia de NADH como sustrato de NAD(P)H oxidasa, AP, AO y TEMPOL. B) Muestra la



generación de  $H_2O_2$  en homogenizado de aorta con SM con glicina y control con glicina en la presencia de NADH, NAD(P)H oxidasa, AP, AO y TEMPOL. Los valores son expresado en media  $\pm$  EE (n=20 animales)

El tratamiento de los animales con SM y control con glicina disminuyeron significativamente la producción de  $H_2O_2$  en presencia de NADH, NAD(P)H oxidasa, AP y AO (Fig. 10B). La glicina genera un efecto protector ante la producción de  $H_2O_2$  en los homogenizados con SM y control por parte del AP y AO (Fig. 7B). La glicina disminuye significativamente la generación de  $H_2O_2$  en el homogenizado con SM pre-incubado con AP, del mismo modo la glicina inhibió el efecto del AP en el homogenizado control. La glicina inhibió de manera significativa el efecto del AO en la generación de  $H_2O_2$ , este efecto protector de la glicina se presentó en ambos homogenizados SM y control. Así mismo, la glicina no aumento el efecto del TEMPOL sobre los ácidos grasos.

El efecto protector de la glicina se debe probablemente a que es precursor de la biosíntesis de glutatión reducido que es un cofactor para la generación de glutatión peroxidasa provocando una eliminación del  $H_2O_2$  a  $H_2O$ .

## **10. Discusión**

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo animal de SM por medio de la administración de carbohidratos simples. Estos animales han desarrollado algunas condiciones patológicas como son la obesidad, hipertensión arterial, resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia.

Está bien establecido en la literatura que una dieta rica en carbohidratos simples (sacarosa, fructosa) induce obesidad, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial; así como, una elevación en la concentración de insulina plasmática (7). Los resultados muestran diferencias significativas en la presión arterial, triglicéridos, AGL, insulina plasmática y una mayor acumulación de tejido adiposo en la cavidad abdominal entre los dos grupos.

En varios estudios se ha demostrado que una dieta rica en sacarosa induce obesidad abdominal en los roedores (35,55,56), así como se ha descrito en nuestro modelo, donde la administración de sacarosa ha inducido cambios significativos en el metabolismo de lípidos que se reflejan en la acumulación de grasa en la cavidad intra-abdominal. Esta mayor acumulación de tejido adiposo se debe principalmente al efecto que tiene la glucosa sobre el metabolismo de los AGL, por medio del metabolismo de la glucosa se generan precursores (gliceraldehído-3-fosfato, acetilCoA y acil glicerol), para sintetizar glicerol y ácidos grasos y por medio de la esterificación formar TG, a su vez estos TG son hidrolizados por lipoproteína lipasas para formar AGL, el tejido adiposo puede re-esterificar los AGL y almacenarlos en forma de TG (57,58). En nuestro modelo el exceso en la ingesta de sacarosa se refleja en la hipertrigliceridemia y en un exceso en los AGL circulantes y contribuir al desarrollo de obesidad. Una acumulación excesiva de tejido adiposo visceral se ha relacionado estrechamente con hiperlipidemia, resistencia a la insulina e hipertensión arterial (11).

En este modelo, el aumento de los triglicéridos observado en los animales con SM, refleja una alta actividad lipogénica en el hígado (59). La hipertrigliceridemia resulta en una acumulación del exceso de energía como triglicéridos en el tejido adiposo.

La acumulación de grasa intra-abdominal se asocia con alteraciones en el metabolismo de los lípidos y de la glucosa y con la hiperinsulinemia e hipertensión (60-62) y como se ha encontrado en nuestro modelo de SM. El mecanismo por el cual se acumula grasa en el tejido adiposo está bien descrito en la literatura (6). En el tejido adiposo hay una alta actividad lipolítica que está asociada con mayor liberación de ácidos grasos no esterificados o libres.

El mecanismo por el cual la glicina reduce la concentración de los triglicéridos y la acumulación de la grasa intra-abdominal no está establecido pero en un trabajo anterior (61) se ha observado que a nivel mitocondrial, el consumo de oxígeno en presencia de sustratos de la  $\beta$ -oxidación aumenta en mitocondrias de hígado de SM tratado con glicina. Este resultado sugiere un posible mecanismo que implica la degradación de los AGL en el hígado.

Las concentraciones fisiológicas de los AGL plasmáticos circulantes deben ser mantenidas dentro de un intervalo muy estrecho y un aumento anormal de ellos se asocia con diversas enfermedades entre ellas: obesidad, diabetes tipo 2, aterosclerosis y otras. En nuestro modelo la presión arterial es significativamente alta en comparación con el control como se ha descrito en otros modelos de SM (7, 35, 56,60), Esto se puede explicar por la acumulación de tejido adiposo abdominal y que libera varias sustancias vasoconstrictoras que afectan la liberación de ON e incrementan los niveles de EROs que se han descrito como los principales participantes en el desarrollo y progresión de la hipertensión arterial (54,63).

Un estudio realizado anteriormente en nuestro laboratorio (35) ha mostrado el papel que tiene la mitocondria en la generación de EROs y el rol que ejerce sobre la progresión del SM, el estudio confirma una mayor generación de EROs por la mitocondria en los animales tratados con sacarosa. Además el aumento en los EROs en el SM está asociado con una disminución en la moléculas antioxidantes (64).

En la literatura se ha descrito el efecto dañino que tienen las EROs sobre el desarrollo de las enfermedades presentes en el SM, Con anterioridad se reportó ,

reportó que los animales con SM inducido por alto consumo de fructosa presentan un daño en la vaso-relajación inducida por acetilcolina en anillos de aorta aislados (55). En nuestro modelo de SM se observó que la vaso relajación está disminuida en los animales con SM. Esta alteración en la vaso relajación puede deberse a un aumento en la generación de EROs por vía de la actividad de la NAD(P)H oxidasa y/o por el desacoplamiento mitocondrial que probablemente estas alteraciones sean inducidas por los AGL (65). La excesiva producción de EROs por parte de la NAD(P)H oxidasa y mitocondria puede estar afectando la biodisponibilidad de ON e induciendo el desacoplamiento de eNOS debido a una excesiva producción de anión superóxido que se une al ON formando peroxinitritos (ONOO-) que resulta en la oxidación del tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) que es un cofactor de eNOS y así generar un desacoplamiento de eNOS, disminuyendo la biodisponibilidad de ON, este efecto es agravado por la disminución del sistema antioxidante que es sobrepasado por la producción de EROs (18,65). La reducción en la biodisponibilidad del ON aumenta la vaso-constricción incrementando la resistencia vascular, y por lo tanto disminuyendo la vaso-relajación (Figura 11) (66).

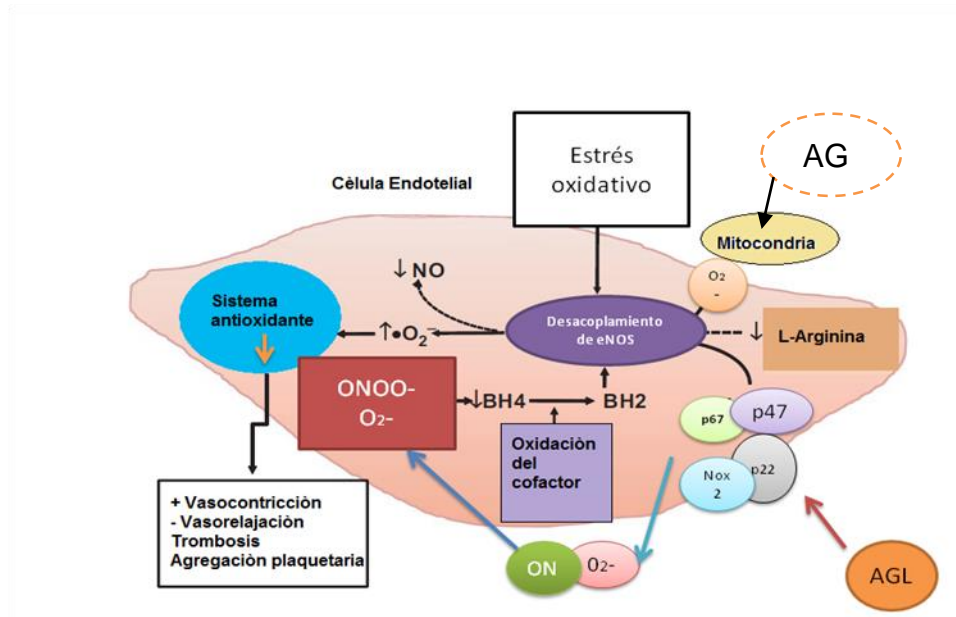


Figura 11: Efecto de los AGL en la producción de anión superóxido y el desacoplamiento de eNOS.

Los AGL como el palmítico o el oleico han sido descritos como inductores de estrés oxidativo en diferentes tejidos por medio de estimulación de la generación de EROs intracelular (35, 67). En nuestro trabajo se observó que la incubación de los anillos con el AP reduce la vaso-relajación y el AO que es un ácido graso mono insaturado, afecto significativamente la vaso relajación de los anillos de las ratas tratadas con sacarosa con mayor magnitud comparado con el AP.

La pre-incubación con DPI un inhibidor de flavo proteínas que requieren de nucleótidos como la NAD(P)H oxidasa aumentó la vaso-relajación de los anillos de aorta al inhibir la generación del anión superóxido (68) probablemente aumentando la disponibilidad del ON necesario para aumentar una vaso-relajación óptima.

La pre-incubación con TEMPOL (atrapador del anión superóxido) aumenta la vaso-relajación de los anillos de aorta en los 4 grupos analizados. Estos resultados sugieren la participación directa del anión superóxido en el la reactividad vascular (55).

Por otro lado la pre-incubación de los anillos con rotenona (inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial) exacerbo el efecto vasoconstrictor del ácido oleico reduciendo significativamente la vaso relajación de los anillos de aorta tanto en grupos con SM y control. Estos resultados sugieren que la mitocondria en presencia de los ácidos grasos libres como el AP o AO contribuye de manera significativa en la generación de EROs activando principalmente el complejo I en el tejido vascular. Varios estudios han demostrado que la inhibición el complejo I con rotenona y en presencia de sustratos que generan NADH como piruvato/malato o glutamato malato exacerba la generación de EROs en mitocondrias aisladas de varios tejidos (35). La presencia de los AGL como AP o AO alimentaria la cadena respiratoria mitocondrial con el NADH que resulta de la beta-oxidación de los diferentes ácidos grasos, Entonces en presencia de un pool de NADH y rotenona se exacerbaría la generación del anión superóxido que reaccionaria con el ON y produciría una menor vaso-relajación. La administración de glicina al 1% en el agua de bebida en los grupos SM y control aumenta el vaso relajación reducida por ambos ácidos grasos. En una tesis realizada en el Laboratorio (69) se ha demostrado que la administración de glicina contribuye al aumento en la biosíntesis de GSH y a una disminución en el GSSG en diferentes tejidos como el corazón el hígado el musculo esquelético y el riñón de los animales con SM y controles. También se ha descrito que la glicina disminuye la peroxidación lipídica y la carbonilación de proteína que son marcadores del estrés oxidativo. Este es probablemente mediado por el aumento en la biosíntesis de GSH que es un cofactor para la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) que cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua. Además en este trabajo se demostró que la glicina disminuye la actividad de la NAD(P)H oxidadas con y sin presencia de los AGL en los homogenizados de aorta provenientes de animales con glicina en comparación con los SM y control sin glicina. También, se ha relacionado a la glicina por su efecto antiinflamatorio por medio de la activación de canales de cloro que se activan por glicina (GLY-R) lo cual origina una despolarización de la membrana y de este modo inhibir la entrada de Ca<sup>++</sup>, este incremento del calcio bloquea la producción de citocinas que son dependientes al incremento de calcio intracelular, lo que previene la producción de

citocinas (49, 69, 70). La NAD(P)H oxidasa es una proteína considerada como la mayor fuente de radicales libres en el tejido vascular (36, 63, 66). El mecanismo por el cual los AGL activan la NAD(P)H oxidasa no está bien establecido; sin embargo, recientemente se han propuesto 2 mecanismos por el cual los AGL activan el complejo NAD(P)H oxidasa. Uno de los mecanismos propuestos es la activación de la proteína cinasa C épsilon (PKC $\epsilon$ ) por el diacilglicerol que se acumula dentro de la célula por la alta actividad lipogénica debido al exceso de AGL acumulado en la célula y asociada con la obesidad y el SM. La PKC épsilon induce la fosforilación del subunidad P47 de la NAD(P)H oxidasa y adquiere mayor actividad (33,71). Otro mecanismo propuesto para la activación del complejo oxidasa es mediante la activación de Rac (complejo de proteínas que activan y desactivan el ciclo de unión a GTP e hidrólisis) (72,73), se ha propuesto que los AGL activan a Rac1 que en su estado activo se une a GTP ligándose a la subunidad citosólica p67 y así activando al complejo NAD(P)H oxidasa (71, 74). En nuestro modelo hay un aumento en los TGs y de los ácidos grasos libres en la circulación que puede indicar una acumulación de estos precursores de los diacilgliceroles en las células. La glicina disminuye la concentración de TG y de AGL en la circulación probablemente debido a una estimulación de la oxidación de estos compuestos. En un trabajo previo se ha demostrado que la glicina aumenta la velocidad de consumo de oxígeno de las mitocondria aisladas de hígado de los animales con SM, en presencia de sustrato de la beta oxidación como el ácido octanoico y la palmitoilcarnitina. Este resultado sugiere que la glicina reduce la acumulación de grasa en la cavidad intra-abdominal promoviendo la beta oxidación de los ácido graso (61).

## **11. Conclusión**

La glicina revierte la reactividad vascular alterada en el SM y causada por la generación de EROs inducido por AGL por medio de una mayor síntesis de GSH, así como también reduce los niveles de triglicéridos, colesterol-HDL, insulina, tensión arterial y leptina. Promoviendo la oxidación de ácidos grasos.

## **12. Perspectivas**

- Determinar la expresión de la subunidades (p67, NOX2, p47, p22) del complejo oxidasa. Así como también la expresión de Rac1 y eNOS en el modelo de SM.
- Analizar el efecto del GLY-R en células endoteliales y así poder elucidar su efecto antiinflamatorio a nivel vascular.



### 13. Referencias bibliográficas

1. Llamas G. Síndrome metabólico como factor de riesgo cardiovascular. En: Guadalajara F, editor. *Cardiología*. Sexta edición. México D.F.: Méndez editores; 2006: p.745.
2. Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome - an ongoing story. *Journal of physiology and pharmacology*. 2009; 60 suppl 7: 19-24.
3. Camarillo-Romero E, Domínguez-García M, Amaya-Chávez A, Huitrón-Bravo G, Majluf-Cruz A. Difficulties in the classification of metabolic syndrome. The example of adolescents in Mexico. *Salud Publica Mex*. 2010; 52: 524-527.
4. Hutcheson R, Rocic P. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: The great exploration. *Experimental Diabetes Research*; 2012: 2012: 271028.
5. Encuesta nacional de salud y nutrición. México, D.F. Instituto nacional de salud pública; 2012 (Consulta el 14 de noviembre de 2012). Disponible en: [http://ensanut.insp.mx/doctos/FactSheet\\_ResultadosNacionales14Nov.pdf](http://ensanut.insp.mx/doctos/FactSheet_ResultadosNacionales14Nov.pdf)
6. Encuesta nacional de salud y nutrición. México, D.F. Instituto nacional de salud pública; 2006 (Consulta el 14 de noviembre de 2012). Disponible en: <http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>
7. Reaven G, Helen H. Sugar-Induced hypertension in sprague-Dawley rats. *AJH*.1991; 4: 610-614.
8. Levesque J, Lamarche B; The metabolic syndrome: definitions, prevalence and management. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2008; 1:100-108.
9. Zeyda M, Stulnig T. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance – A Mini-Review. *Gerontology*. 2009; 55: 379-386.

10. Fujihara S, Mori H, Kobara H, Nishiyama N, Kobayashi M, Oryu M, Masaki S, Fujihara S. Metabolic syndrome, obesity, and gastrointestinal cancer. *Gastroenterol Res Pract*. 2012: 483-623.
11. Amanda R, Martins A, Nachbar R, Gorjao R, Vinolo M, Festuccia W, Lambertucci R, Cury-Boaventura M, Silveira L, Curi R, Hirabara S. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids in Health and Disease*. 2012: 11-30.
12. Martínez M, Martínez M, Serrano M. Síndrome de la resistencia a la insulina y síndrome metabólico: similitudes y diferencias. Síndrome metabólico: concepto, fisiopatología y epidemiología. *Cardiovascular risk factors*. 2003; 12(2): 89-96.
13. González A, Lavalle F, Elizondo S, Malanco L, Camacho J. Conceptos actuales, criterios diagnósticos y algunas consideraciones sobre la fisiopatología del síndrome metabólico. En: González A, Lavalle F, Ríos J, editors. Síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular: obesidad, dislipidemia, hipertensión, prediabetes, diabetes tipo 2 y resistencia a la insulina. México D.F.: Inter sistemas editores; 2006: p. 8-9.
14. Cornier M, Dabelea D, Hernandez T, Lindstrom R, Steig A, Stob N, Van R, Wang H, Eckel R. The metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 2008; 29(7): 777-822.
15. Rezaianzadeh A, Namayandeh S, Sadr S. National cholesterol ducation program adult treatment panel III versus international diabetic federation definition of metabolic syndrome, which one is associated with diabetes mellitus and coronary artery disease?. *Int J Prev Med*. 2012; 3(8):552-558.
16. Rosen P, Nawroth P, King G, Moller W, Tritschler J, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its

- complications: a summary of a congress series sponsored by UNESCO MCBN, the American Diabetes Association, and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev.* 2001; 17:189-212.
17. Miles M, Morrison J, Horn P, Tang P, Pesce A. Coenzyme Q10 changes are associated with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta.* 2004; 344:173-179.
  18. Higashi Y, Yoshizumi M, Noma K, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009; 73: 411-418.
  19. Matés M, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry.* 1999; 32(8): 595-603.
  20. Lionetti L, Mollica M, Lombardi A, Cavaliere G, Gifuni G, Barletta A. From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009; 19(2):146-152.
  21. Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H, Aljada A, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes.* 2003; 52(12): 2882-2887.
  22. Baños G, Carvajal K, Cardoso G, Zamora J, Franco M. Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am J Hypertens.* 1997; 10(4 Pt 1):379-388.
  23. Félétou M, Vanhoutte P. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H985-H1002.
  24. Bauersachs J, Bouloumie A, Mülsch A, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Vasodilator dysfunction in aged spontaneously hypertensive rats: changes in NO synthase III and soluble guanylylcyclase expression, and in superoxide anion production. *Cardiovascular Research.* 1998; 37:772-779.

25. Leite A C, Oliveira H, Utino F, Garcia R, Alberici L, Fernandes M, Castilho R, Vercesi A. Mitochondria generated nitric oxide protects against permeability transition via formation of membrane protein S-nitrosothiols. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010; 1797:1210-1216.
26. Tengan C, Rodrigues G, Godinho R. Nitric oxide in skeletal muscle: Role on mitochondrial biogenesis and function. *Int J Mol Sci*. 2012; 13(12): 17160-17184.
27. Wind S, Beuerlein K, Armitage M, Taye A, Kumar A, Janowitz D, Neff C, Shah A, Winkler K, Schmidt H. Oxidative stress and endothelial dysfunction in aortas of aged spontaneously hypertensive rats by NOX1/2 Is reversed by NADPH oxidase inhibition. *Hypertension*. 2010; 56: 490-497.
28. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Masanori Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004; 114(12): 1752-1761.
29. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action. Is there a relationship?. *Diabetologia*. 1996; 39: 357-363.
30. Paolisso G, Di Maro G, Pizza G, D'Amore A, Sgambato S, Tesauro P, Varricchio M, D'Onofrio F. Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetics. *Am J Physiol*. 263: E435-E440.
31. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414: 813-820.
32. Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int*. 2000; 58: 26-30.
33. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yan Yu H, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NADPH oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 2000; 49: 1939-1945.

34. Coco T, Di Paola M, Papa S, Loruso M. Arachidonic acid interaction with mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Rad Biol Med.* 1999; 27: 51-59.
35. Ruiz-Ramírez A, Chávez-Salgado M, Peñeda-Flores J, Zapata E, Masso F, El-Hafidi M. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011; 301(6):E1198-207.
36. Kuroda J, Sadoshima J. NADPH Oxidase and Cardiac Failure. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010; 3(4): 314-320.
37. Toborek M, Hennig B. Fatty acid-mediated effects on the glutathione redox cycle in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59: 60-65.
38. Hennig B, Meerarani P, Ramadass P, Watkins B, Toborek M. Fatty acid-mediated activation of vascular endothelial cells. *Metabolism.* 2000; 49: 1006-1013.
39. Lee J, Sohn K, Rhee S, Hwang D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001; 276: 16683-16689.
40. Griffin M, Marcucci M, Cline G, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear L, Kraegen E, White M, Shulman G. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes.* 1999; 48: 1270-1274.
41. Evans J, Goldfine I, Maddux B, Grodsky G. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?. *Diabetes.* 2003; 52: 1-8.
42. Coudronniere N, Villalba M, Englund N, Altman A. NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 co-stimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 3394-3399.
43. Baños de MacCarthy G. Models of experimental hypertension. *Arch Cardiol Mex.* 2002;72 Suppl 1:S22-6.
44. Gericke A, Sniatecki J, Mayer V, Goloborodko E, Patzak A, Wess J, Pfeiffer N. Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic

- dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(5): H1602-H1608.
45. Villalobos-Molina R, Vázquez-Cuevas F, López-Guerrero F, Figueroa-García M, Gallardo-Ortiz I, Ibarra M, Rodríguez-Sosa M, González F, Elizondo G. Vascular  $\alpha$ 1D-adrenoceptors are overexpressed in aorta of the arylhydrocarbon receptor null mouse: role of increased angiotensin II. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2008; 28(2-3): 61-67.
  46. Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. The glycine receptor. *Pharmacol Ther*. 1997; 73: 121-146.
  47. Webb T, Lynch J. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des*. 2007; 13: 2350-2367.
  48. Yamashina S, Ikejima K, Enomoto N, Takei Y, Sato N. Glycine as a therapeutic immuno-nutrient for alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29:162S-165S.
  49. Zhong. Z, Wheeler M, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B, Lemasters J. L-Glycine: a novel anti-inflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2: 550-562.
  50. Giambelluca M, Gende O. Effect of glycine on the release of reactive oxygen species in human neutrophils. *IntImmunopharmacol*. 2009; 9(1): 32-37.
  51. Islam MS, Wilson RD. Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods Mol Biol*. 2012; 933: 161-74.
  52. Nava P, Guarner V, Posadas R, Perez I, and Baños G. Insulin-induced endothelin release and vasoreactivity in hypertriglyceridemic and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.1999; 277: H399-H404.
  53. Chávez P, Vázquez O, Torres G, Memije R, Rossini G. Detección de signos vitales en ratas mediante métodos no invasivos. *Veterinaria México*. 2002; 33 (2):179-187.

54. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
55. Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin E. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension.* 2009; 54: 1384-1392.
56. Sun X, Zemel MB. Dietary calcium regulates ROS production in aP2-agouti transgenic mice on high-fat/high-sucrose diets. *International Journal of Obesity.* 2006; 30: 1341-1346.
57. Rutledge A, Adeli K. Fructose and metabolic syndrome: Pathophysiology and molecular mechanism. *Nutrition Reviews.* 2007; 65(6); S13.
58. Hallfrisch J. Metabolic effects of dietary fructose. *FASEB J.* 1990; 4: 2652-2660.
59. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance; *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 1999; 107 (2): 119-125.
60. Rodríguez-Rodríguez E, Perea J, López-Sobaler A, Ortega R. Obesity, insulin resistance and increase in adipokines levels: importance of the diet and physical activity. *Nutr Hosp.* 2009; 24 (4): 415-421.
61. El Hafidi M, Valdez R, Baños G. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exper Hypertension.* 2000; 22(1): 99-108.
62. El Hafidi M, Perez I, Zamora J. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and BP in sucrose-fed rats. *Am J Physiol.* 2004; 287: R1387-1393.
62. Reaven GM. Syndrome X. *Blood Press Suppl.* 1988; 4:13-16.

63. Ungvari Z, Csiszar A, Huang A, Kaminski P, Wolin M, Koller A. High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. *Circulation*. 2003; 108:1253-1258.
64. Sibel Ülker S, McMaster D, McKeown P, Bayraktutan U. Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovascular Research*. 2003; 59: 488-500.
65. Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2010; 459: 923-939.
66. Endemann D, Schiffrin S. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15: 1983-1992.
67. Steinberg H, Tarshoby M, Monestel R, Hook G, Cronin J, Johnson A, Bayazeed B, Baron A. Elevated circulating free fatty acid levels impair endothelium-dependent vasodilation. *The Journal of Clinical Investigation*. 1997; 100(5): 1230-1239.
68. Osaki T, Uchida Y, Hirayama J, Nishina H; Diphenyliodonium chloride, an inhibitor of reduced nicotinamideadenine dinucleotide phosphate oxidase, suppresses light-dependent induction of clock and DNA repair genes in zebrafish. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34(8): 1343-1347.
69. Pineda Flores J; Efecto de la glicina sobre el metabolismo del glutatión en un modelo de obesidad inducida por alto consumo de sacarosa; Tesis de licenciatura; Facultad de Química; Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.
70. Zhong Z, Connor Yin M, Moss N, Mason R, Bunzendahl H, Forman D, Thurman R. Dietary glycine and renal denervation prevents cyclosporine-induced hydroxyl radical production in rat kidney. *Molecular pharmacology*. 1999; 56:455-463.



71. Chinen I, Shimabukuro M, Yamakawa K, Higa N, Matsuzaki T, Noguchi K, Ueda S, Sakanashi M, Takasu N. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology*. 2006; 148(1): 160-165.
72. Hordijk P. Regulation of NADPH oxidases: The role of Rac proteins. *Circ Res*. 2006; 98: 453-462.
73. Heyworth P, Knaus U, Settleman J, Curnutte J, Bokoch G. Regulation of NADPH oxidase activity by Rac GTPase activating protein(s). *Molecular Biology of the Cell*. 1993; 4: 1217-1223.
74. Rinckel L, Faris S, Hitt N, Kleinberg M. Rac1 disrupts p67phox/p40phox binding: A Novel role for Rac in NADPH oxidase. *Activation; Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999; 263: 118-122.