



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

Análisis de los efectos crónicos de la metformina, de un análogo de metformina y 17- β estradiol sobre la disfunción vascular inducida por resistencia a la insulina

Tesis que presenta

M. en F. Erika Joana Gutiérrez Lara

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica
Experimental**

Director de Tesis: **Dr. David Centurión Pacheco**

Ciudad de México

Mayo, 2018

El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco, en el Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de la beca número 267177, así como al proyecto de ciencia básica CB2015-252702

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A CONACyT por la beca otorgada (No 267177) durante la realización de este proyecto.
- ❖ Al financiamiento otorgado por el proyecto CB2015-252702 CONACyT ciencia básica.
- ❖ Al CINVESTAV por el financiamiento interno otorgado para la realización de este proyecto.
- ❖ Al doctor David Centurión Pacheco por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y ser parte de su laboratorio
- ❖ Un enorme agradecimiento a las Doctoras Guadalupe Bravo, Leticia Gómez Viquez y Karla Carvajal Aguilera; así como a los Doctores Gabriel Navarrete Vázquez y David Centurión Pacheco quienes formaron parte del comité revisor. Gracias por todas sus aportaciones y observaciones a este proyecto, sin ellas este proyecto no sería el mismo.
- ❖ Al Doctor Gabriel Navarrete Vázquez por permitirme seguir trabajando con los compuestos diseñados en su laboratorio y permitirme realizar una estancia para realizar la síntesis a escala, además, de siempre apoyarme y darme muy buenos consejos.
- ❖ A la doctora Karla Carvajal Aguilar por su enseñanza en la extracción de los tejidos para la realización de los Western Blot.
- ❖ A los M. en C. Guadalupe García Pérez y Vladimir Martínez Rojas por compartir sus conocimientos de la técnica de Western Blot.
- ❖ A la doctora Araceli Sánchez López por su apoyo en la realización de los experimentos de rata descerebrada y desmedula.
- ❖ A Andrés Arrieta Pineda, Ramón Martínez Gómez y al personal del bioterio del departamento por su ayuda en el mantenimiento y limpieza de los animales.
- ❖ De manera muy especial a la Doctora Janet Murbartian Aguilar, sin su apoyo no hubiera podido terminar este proyecto ya que además, de permítame formar parte de su laboratorio, me hizo sentir integrada en su equipo de trabajo. Nunca tendré palabras para agradecerle los consejos y apoyo otorgado.

DEDICATORIAS

“La verdadera ignorancia no es la ausencia de conocimientos, sino el hecho de negarse a adquirirlos.”

Karl Popper

A mis padres, sin ustedes no sería la persona que soy ahora, esto es gracias a todos sus esfuerzos y sacrificios, jamás han dudo de mis sueños y planes. Los amo y espero sigan estando orgullosos de mí.

Para mi hermano, mi angelito, siempre conservare tu recuerdo en mi corazón. Para mi hermana Patito, enana tu siempre has estado conmigo, sé que cuento con tu apoyo, consejos y cariño. Sé que mi vida sin ti no sería igual, me haces reír hasta en los momentos más difíciles.

A mis amigos de toda la vida, Oswaldo (vaquita), Miriam, Blanca y Oswaldo su amistad es una de las mejores cosas que tengo en la vida, ya forman parte de mi familia.

Para Lupita, la mejor decisión que tome durante el doctorado fue elegirte como amiga, siempre estuviste para apoyarme en toda clase de problemas, te quiero mucho, espero seguir contando con tu amistad. A Lau seguramente sin ti hubiera muerto de hambre y de aburrimiento, te quiero mucho.

A mis amigos del alma y corazón Saúl, Erick, Mayra, Leo, Lalo, Gabo, Felipe y Ale, sin ustedes el doctorado hubiera sido muy aburrido, gracias por los momentos de procrastinación necesarios e indispensables para sobrevivir en el posgrado. A mis amigos y compañeros de doctorado Beto, Osmar, Josué y Vladimir gracias por su amistad y apoyo.

A mis compañeros y amigos de Laboratorio: Saúl, Maria Elena y Hernán gracias por la ayuda y apoyo brindado.

Para Fernando gracias por aparecer en mi vida y brindarle un poco de luz y alegría.

Al Doctor David Centurión, muchas gracias por permitirme desarrollar mi tesis en el laboratorio, he aprendido mucho de usted. Gracias por los consejos y momentos gratos en el laboratorio.

A la Doctora Janet Murbartian, por todo su apoyo, consejos y regaños, por la confianza que me otorgo. Sin usted no hubiera realizado este proyecto. Le tengo un gran cariño. Usted fue mi punto de apoyo cuando más lo necesite. Mi infinito agradecimiento.

“Un corazón lleno de amor es el principio de todo conocimiento”

Thomas Carlyle

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ABREVIATURAS	XII
ABSTRACT.....	1
RESUMEN	2
CAPITULO 1.INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 2.ANTECEDENTES.....	4
2.1 RESISTENCIA A LA INSULINA	4
2.2 ENFERMEDADES Y ESTADIOS FISIOLÓGICOS RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA A LA INSULINA 7	
2.2.1 Síndrome metabólico	7
2.2.2 Diabetes mellitus tipo 2	8
2.2.3 Diabetes y enfermedades cardiovasculares.....	8
2.2.4. Efectos de cardiovasculares de la metformina	10
2.2.4 Análogo de metformina (EGL-6M)	11
2.2.5 Obesidad.....	13
2.2.6 Síndrome de ovario poliquístico	14
2.2.7. Menopausia.....	16
2.2.8. Enfermedades cardiovasculares	17
a) Hipertensión arterial.....	18
b) Cardiopatía coronaria.....	18
c) Enfermedad cerebrovascular	19
d) Enfermedad vascular periférica	19
e) Insuficiencia cardíaca.....	19
f) Cardiopatía reumática.....	20
g) Miocardiopatías.....	20
2.3 SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	20
2.3.1 Presión arterial y su regulación	23

ÍNDICE GENERAL

2.3.1.1 Sistema nervioso central	23
2.3.1.2 Regulación por el sistema nervioso autónomo	24
2.3.1.3 Regulación humoral.....	25
2.3.1.4 Regulación local. Óxido nítrico	26
CAPITULO 3.JUSTIFICACIÓN.....	27
CAPITULO 4.HIPÓTESIS	28
CAPITULO 5.OBJETIVOS.....	29
5.1 OBJETIVO GENERAL	29
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
CAPITULO 6.DESARROLLO EXPERIMENTAL	30
6.1 METODOLOGÍA GENERAL	30
6.1.1 <i>Animales</i>	30
6.1.2 <i>Inducción del modelo experimental de resistencia a la insulina por tratamiento con fructosa.....</i>	31
6.1.3 <i>Determinación de parámetros bioquímicos y metabólicos del modelo experimental.....</i>	31
6.1.4 <i>Medición de la presión arterial y frecuencia cardiaca no invasiva.....</i>	31
6.1.5 <i>Curva de tolerancia a la glucosa.....</i>	32
6.1.6 <i>Modelo de rata descerebrada y desmedulada</i>	32
6.1.7 <i>Estimulación simpática.....</i>	33
6.1.8 <i>Estimulación de los receptores $\alpha_{1/2}$ adrenérgicos.....</i>	33
6.1.9 <i>Estimulación del endotelio y del musculo liso vascular.....</i>	34
6.1.10 <i>Western Blot</i>	34
6.1.10.1 <i>Obtención de muestras</i>	34
6.1.10.2 <i>Homogenización</i>	35
6.1.10.3 <i>Cuantificación</i>	36
6.1.10.4 <i>Inmunoblot</i>	37
6.2 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON METFORMINA O EL ANÁLOGO EGL-6M	38
6.2.1 <i>Síntesis a escala del análogo EGL-6M.....</i>	38

ÍNDICE GENERAL

6.2.2	<i>Protocolo experimental de la Fase 1 (Tratamiento con metformina o EGL-6M)</i>	38
6.2.3	<i>Perfil metabólico y hemodinámico</i>	40
6.2.4	<i>Western blot</i>	41
6.3	TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON ESTRADIOL	44
6.3.1	<i>Ovariectomía bilateral</i>	44
6.3.2	<i>Protocolo experimental del tratamiento con 17β-estradiol</i>	44
6.3.3	<i>Perfil metabólico y hemodinámico</i>	47
6.3.4	<i>Western blot</i>	47
6.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
CAPITULO 7.RESULTADOS		51
7.1	FASE 1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON METFORMINA O EL ANÁLOGO EGL-6M	51
7.1.1	<i>Parámetros bioquímicos</i>	51
7.1.2	<i>Valores hemodinámicos</i>	52
7.1.3	<i>Curva de tolerancia a la glucosa</i>	53
7.1.4	<i>Respuestas cardiovasculares</i>	55
7.1.4.1	Efecto de la resistencia a la insulina sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación del sistema simpático.	55
7.1.4.2	Efecto de la administración crónica de metformina o el análogo de metformina sobre las respuestas vasopresoras en animales control	56
7.1.4.3	Efecto de la administración crónica metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasopresoras en animales con resistencia a la insulina	57
7.1.4.4	Efecto de la administración de fructosa o su vehículo sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por acetilcolina, isoprenalina y nitroprusiato de sodio.	59
7.1.4.5	Efecto de la administración crónica de metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasodepresoras en animales control	59
7.1.4.6	Efecto de la administración crónica de metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasodepresoras en animales con resistencia a la insulina	61

ÍNDICE GENERAL

7.1.5	<i>Expresión de los receptores β adrenérgicos y activación de proteínas AMPK, Akt, eNOS</i>	62
7.1.5.1	<i>Expresión del receptor β_2 adrenérgico y activación de proteínas AMPK, Akt y eNOS en arterias mesentéricas</i>	62
7.1.5.2	<i>Expresión del receptor β_2 adrenérgico y activación de proteínas AMPK, AKT y eNOS en aortas</i>	64
7.1.5.3	<i>Expresión del receptor β_2 adrenérgico y activación de proteínas AMPK, Akt y eNOS en corazón</i>	65
7.2	FASE 2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON 17-B ESTRADIOL	68
7.2.1	<i>Características metabólicas</i>	68
7.2.2	<i>Valores hemodinámicos</i>	69
7.2.3	<i>Curva de tolerancia a la glucosa</i>	71
7.2.4	<i>Respuestas cardiovasculares</i>	74
7.2.4.1	<i>Respuestas vasopresoras</i>	74
7.2.4.2	<i>Respuestas vasodepresoras</i>	77
7.2.5	<i>Activación de la vía Akt/eNOS</i>	80
CAPITULO 8.DISCUSIÓN	83
8.1	FASE 1	83
8.1.1	<i>Efecto de la metformina y EGL-6M sobre las variables metabólicas</i>	83
8.1.2	<i>Cambios hemodinámicos producidos por los tratamientos farmacológicos</i>	84
8.1.3	<i>Efecto de la metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasopresoras inducidas por la estimulación del sistema adrenérgico</i>	85
8.1.4	<i>Efecto de la resistencia a la insulina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del endotelio y musculo liso</i>	88
8.1.5	<i>Efecto de la administración crónica de metformina y su análogo sobre las respuestas vasodepresoras</i>	88
8.1.6	<i>Expresión de receptores β-adrenérgicos y activación de enzimas AMPK, Akt y eNOS</i>	89

ÍNDICE GENERAL

8.1.6.1	Efecto de la administración crónica de metformina, EGL-6M o su vehículo en animales con resistencia a la insulina sobre la expresión del receptor β_2 y la activación de las enzimas AMPK, Akt y eNOS en las arterias mesentéricas	90
8.1.6.2	Efecto de la administración crónica de metformina, EGL-6M o su vehículo en animales con resistencia a la insulina sobre la expresión del receptor β_2 y la activación de las enzimas AMPK, Akt y eNOS en la aorta.....	92
8.1.6.3	Efecto de la administración crónica de metformina, EGL-6M o su vehículo en animales con resistencia a la insulina sobre la expresión del receptor β_2 y la activación de las enzimas AMPK, Akt y eNOS en el corazón	93
8.2	FASE 2	94
8.2.1	<i>Efecto de la administración crónica de 17β-estradiol sobre las variables metabólicas</i>	<i>94</i>
8.2.2	<i>Efecto de la administración crónica de 17β-estradiol sobre variables hemodinámicas</i>	<i>95</i>
8.2.3	<i>Efecto de la resistencia a la insulina sobre las respuestas cardiovasculares inducidas por la activación del sistema nervioso simpático</i>	<i>96</i>
8.2.4	<i>Efecto de la administración de 17β-estradiol sobre las respuestas cardiovasculares inducidas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina</i>	<i>97</i>
8.2.5	<i>Activación de la vía Akt/eNOS</i>	<i>98</i>
CAPITULO 9	CONCLUSIONES	99
9.1	FASE 1	99
9.2	FASE 2	99
CAPITULO 10	PERSPECTIVAS	101
CAPITULO 11	BIBLIOGRAFÍA	102
CAPITULO 12	ARTÍCULO DERIVADO DEL PROYECTO	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efectos de la insulina sobre sus principales órganos blancos..... 4

Figura 2. Relación entre la resistencia a la insulina y el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares..... 5

Figura 3. Activación de la vía de señalización PI3K/Akt por insulina en el endotelio..... 10

Figura 4. Estructura química del análogo **EGL-6M**..... 12

Figura 5. Fisiopatología de riesgo cardiovascular incrementado por la obesidad visceral, AGL, ácidos grasos libres; SAOS, Síndrome de apnea obstructiva del sueño; eRAA, Eje Renina-angiotensina; SNS, sistema nervioso simpático; IR, resistencia a la insulina. Tomado de (Gonzalez Jimenez, 2013)..... 13

Figura 6. Asociación del Síndrome de ovario poliquístico y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Influencia de la resistencia a la insulina. SAOS; síndrome de apnea obstructiva del sueño, SHBG; globulina fijadora de hormonas sexuales, IGFBP-1; proteína transportadora del factor de crecimiento similar a la insulina. 15

Figura 7. Circulación pulmonar y periférica 21

Figura 8. Síntesis del análogo **EGL-6M**. Tomada de (Gutierrez-Lara et al., 2017; Gutierrez-Lara, 2014). 38

Figura 9. Esquema de protocolo experimental para evaluar las respuestas vasopresoras. Metformina y su análogo fueron administrados a una dosis de 50 mg/kg por vía oral cada día durante 28 días, mientras que el vehículo fue administrado a 1 ml/kg. 39

Figura 10. Esquema de protocolo experimental para evaluar las respuestas vasodepresoras. Metformina y su análogo fueron administrados a una dosis de 50 mg/kg por vía oral cada día durante 28 días, mientras que el vehículo fue administrado a la dosis de 1 ml/kg. 40

Figura 11. Curso temporal de la fase 1. 41

Figura 12. Curso temporal del tratamiento con estradiol. 45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 13. Protocolo general para la medición de las respuestas vasopresoras del tratamiento con estradiol (10 µg/kg·día, 35 días).	46
Figura 14. Protocolo general para la medición de las respuestas vasopresoras del tratamiento con estradiol (10 µg/kg·día, 35 días).	47
Figura 15. Área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de glucosa e insulina obtenidos durante la curva de tolerancia a la glucosa a la semana 16 (antes de los diferentes tratamientos) y a la semana 20 (después de 4 semanas de administración de los diferentes tratamientos). * $P < 0.05$ vs control, ^a $P < 0.05$ vs Fructosa-vehículo. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.	54
Figura 16. Efecto del tratamiento crónico (16 semanas) con fructosa al 15% sobre las respuestas vasopresoras generadas por la estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 en animales control y fructosa (resistentes a la insulina), * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.	55
Figura 17. Efecto de la administración crónica de metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304, en los grupos control, * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.	56
Figura 18. Respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304, en los grupos tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.	57
Figura 19. Áreas bajo la curva de las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 en animales control o tratados con fructosa y tratados crónicamente con vehículo, metformina o EGL-6M . ^a $P < 0.05$ vs control-vehículo, ^b $P < 0.05$ vs fructosa-vehículo. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.	58

- Figura 20.** Efecto del tratamiento crónico con fructosa 15 % por 16 semanas sobre las respuestas vasodepresoras generadas por bolos intravenosos de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en los grupos control y fructosa. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. 59
- Figura 21.** Efecto de la administración crónica de metformina o **EGL-6M** sobre las respuestas vasodepresoras generadas por bolos intravenosos de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en el grupo control. * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. 60
- Figura 22.** Efecto del tratamiento crónico con metformina, **EGL-6M** o su vehículo sobre las respuestas vasodepresoras generadas por bolos intravenosos de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en los grupos tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. 61
- Figura 23.** Efecto de la resistencia a la insulina y del tratamiento farmacológico con metformina y **EGL-6M** sobre la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos y activación de las proteínas AMPK, AKT y eNOS en arterias mesentéricas. Grupo control (C), grupos resistentes a la insulina (Fructosa), vehículo (V), Metformina (M), **EGL (EGL-6M)**. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, # $P < 0.05$ vs control, * $P < 0.05$ vs vehículo. 63
- Figura 24.** Efecto de la resistencia a la insulina y del tratamiento farmacológico con metformina y **EGL-6M** sobre la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos y activación de las proteínas AMPK, AKT y eNOS en aortas. Grupo control (C), grupos resistentes a la insulina (Fructosa), vehículo (V), Metformina (M), **EGL (EGL-6M)**. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, * $P < 0.05$ vs vehículo. 65
- Figura 25.** Efecto de la resistencia a la insulina y del tratamiento farmacológico con metformina y **EGL-6M** sobre la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos y activación de las proteínas AMPK, Akt y eNOS en corazón. Grupo control (C), grupos resistentes a la insulina (Fructosa), vehículo (V), Metformina (M), **EGL**

(EGL-6M). Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, * $P < 0.05$ vs vehículo..... 67

Figura 26. Área bajo la curva de los valores de glucosa e insulina obtenidos durante la curva de tolerancia a la glucosa. Grupo control vs fructosa. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. * $P < 0.005$ vs sham+control. (C) Control, (F) Fructosa, sham (falsa cirugía) y Ovx (ovariectomía). 71

Figura 27. Cursos temporales y área bajo la curva de los valores de glucosa e insulina obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral en animales control después del tratamiento con vehículo (1 ml/kg; i.p.) o estradiol (10 μ g/kg) durante 5 semanas. Cada punto o barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. ^a $P < 0.05$ vs Ovx+vehículo, * $P < 0.05$ vs Sham+vehículo. 72

Figura 28. Cursos temporales y áreas bajo la curva de los valores de glucosa e insulina obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral en animales resistentes a la insulina. Cada punto o barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. * $P < 0.05$ vs Sham+vehículo. 73

Figura 29. Respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina, metoxamina o UK 14, 304, en animales falsamente operados u ovariectomizados tratados con fructosa o su vehículo. * $P < 0.05$ vs control. 74

Figura 30. Efecto de la ovariectomía sobre las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina, metoxamina o UK 14, 304 en animales control y tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales..... 75

Figura 31. Efecto del tratamiento con estradiol sobre las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina, metoxamina o UK 14, 304 en animales control y tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales..... 76

Figura 32. Efecto del tratamiento crónico con fructosa sobre respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en animales falsamente operados (panel superior) y ovariectomizados (panel

inferior), * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. 77

Figura 33. Efecto de la ovariectomía sobre las respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en animales control y tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. 79

Figura 34. Efecto de la administración de estradiol sobre las respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en animales control (panel superior) o fructosa (panel inferior) en ratas ovariectomizadas. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales..... 80

Figura 35. Efecto de la resistencia a la insulina y el tratamiento con estradiol en arterias mesentéricas (A y B) y aorta (C y D). Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, # $P < 0.05$ vs control, * $P < 0.05$ vs control+vehículo. 82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico de acuerdo con Federación Internacional de Diabetes.</i>	7
Tabla 2. <i>Características y funciones de los vasos sanguíneos.</i>	22
Tabla 3. <i>Curva patrón para la cuantificación de proteínas.</i>	37
Tabla 4. <i>Parámetros bioquímicos después del tratamiento con fructosa.</i>	51
Tabla 5. <i>Parámetros bioquímicos posteriores a los tratamientos farmacológicos.</i>	52
Tabla 6. <i>Valores de presión arterial obtenidos por el método pletismográfico al final de las 16 semanas de tratamiento con fructosa al 15 %.</i>	52
Tabla 7. <i>Valores de presión arterial obtenidos por el método pletismográfico después del tratamiento farmacológico con vehículo (1 ml/kg·día), metformina (50 mg/kg·min) o EGL-6M (50 mg/kg·min).</i>	53
Tabla 8. <i>Resumen de la expresión de los receptores β- adrenérgicos y las proteínas AMPK, Akt y eNOS en arterias mesentericas, aortas y corazón de animales con resistencia a la insulina. R.I. (Resistencia a la insulina), ND (NO Determinado), NC (Ningún cambio), A (aumentó), Disminuyó (D).</i>	67
Tabla 9. <i>Parámetros bioquímicos de los grupos control y de los grupos tratados con fructosa.</i>	68
Tabla 10. <i>Efecto del estradiol sobre algunos parámetros bioquímicos y el peso corporal en animales tratados con fructosa.</i>	69
Tabla 11. <i>Valores de presión arterial y frecuencia cardiaca obtenidos por el método pletismográfico después del tratamiento con fructosa.</i>	70
Tabla 12. <i>Efecto del estradiol o su vehículo sobre los valores de presión arterial y frecuencia cardiaca obtenidos por el método pletismográfico.</i>	70

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
Akt	Proteína cinasa B
Akt-p	Proteína cinasa B fosforilada
AMP	Adenosin monofosfato
AMPK	Cinasa de AMP
AMPK-p	Cinasa de AMP fosforilada
Cat.	Catálogo
CFTR	Regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística
Cl⁻	Cloruro
CTG	Curva de tolerancia a la glucosa
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
e.e.m.	Error estándar medio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ENaC	Canal de sodio epitelial
eNOS	Sintasa del óxido nítrico
eNOS-p	Sintasa del óxido nítrico fosforilada
eRAA	Eje Renina-angiotensina-aldosterona
FC	Frecuencia cardíaca
Glima	Dimetoxietano
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HOMA	Homeostatic Model Assessment. Índice de resistencia a la insulina
Hz	Hertz
i.m.	Intramuscular
i.v.	Intra venoso
I2	Receptor Imidazolínico 2
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFBP-1	proteína transportadora del factor de crecimiento similar a la insulina
IL-6	Interleucina 6
K⁺	Ion Potasio
Na⁺	Ion Sodio
NaPPi	Pirofosfato sódico
NEFA	Ácidos grasos libres no esterificados
NKCC	Cotransportador Na ⁺ /K ⁺ /2Cl ⁻
OMS	Organización mundial de salud
Ovx	Ovariectomía
p.o.	Vía oral
PAD	Presión arterial diastólica
PAM	Presión arterial media

ABREVIATURAS

PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Buffer de fosfatos-solución salina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PKC	Proteína cinasa C
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RI	Resistencia a la insulina
s.c.	Sub cutánea
SAOS	Síndrome de apnea obstructiva del sueño
SDS	Duodecilsulfato sódico
Ser	Serina
Sham	Falsa cirugía
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
SNS	Sistema nervioso simpático
T7	Vertebra torácica 7
T9	Vertebra torácica 9
Thr	Treonina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
V-ATPasa	cotransportador H ⁺ -ATPasa vacuolar

ABSTRACT

This project evaluated the effect of chronic administration of metformin, **EGL-6M** (a metformin analog) and 17β -estradiol on cardiovascular responses as well as the expression of AMPK, AKT and eNOS in rats with fructose-induced insulin resistance.

Cardiovascular responses were evaluated using pharmacological tools for the induction of vasopressor responses; for example, the stimulation of the preganglionic sympathetic fibers that innervate the blood vessels; as well as by the administration of α - $_{1/2}$ adrenergic agonists. Likewise, the vasodepressor responses induced by stimulation of vascular smooth muscle and endothelium were evaluated by administering acetylcholine, isoprenaline and sodium nitroprusside. This project also evaluated the effects of treatment on the metabolic profile of animals and the activation of some cellular pathways associated with vascular dysfunction during insulin resistance.

A decrease in sympathetic transmission during insulin resistance was observed in both male and female animals, which was improved after the administration of the analog but not by the administration of metformin or estradiol. In the same way we observed a decrease in the activation of the AMPK pathway which was significantly improved after the administration of metformin and its analog in mesenteric arteries.

In the female rats we observed that ovariectomy affected the cardiovascular responses and the metabolic profile of the animals and this affectation can not be distinguished in insulin resistant animals. Remarkably, in animals resistant to insulin, estradiol lost its beneficial effects on the cardiovascular system.

RESUMEN

Este proyecto evaluó el efecto de la administración crónica de metformina, de **EGL-6M** (un análogo de metformina) y 17 β -estradiol sobre las respuestas cardiovasculares en animales resistentes a la insulina.

Las respuestas cardiovasculares fueron evaluadas utilizando herramientas farmacológicas para la inducción de respuestas vasopresoras; como la estimulación de las fibras simpáticas preganglionares que inervan los vasos sanguíneos; como por medio de la administración de agonistas α -adrenérgicos. Así mismo se evaluaron respuestas vasodepresoras inducidas por la estimulación del musculo liso y del endotelio administrando acetilcolina, isoprenalina y nitroprusiato de sodio. En este proyecto también se evaluaron los efectos del tratamiento sobre el perfil metabólico de los animales y la activación de algunas vías celulares asociadas a la disfunción vascular durante la resistencia a la insulina.

Se observó una disminución de la transmisión simpática durante la resistencia a la insulina tanto en animales machos como en hembras, la cual mejoró tras la administración del análogo pero no así por la administración de metformina o de estradiol. De la misma manera observamos una disminución en la activación de la vía AMPK la cual mejoró tras la administración de metformina y su análogo en arterias mesentéricas.

En las ratas hembras pudimos observar que la ovariectomía afecta las respuestas cardiovasculares y el perfil metabólico de los animales y que esta afectación no es posible distinguirla en animales resistentes a la insulina. Además, en animales resistentes a la insulina el estradiol perdió sus efectos benéficos sobre el sistema cardiovascular.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

Las principales causas de mortalidad en el mundo son la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular las cuales provocaron 15 millones de defunciones en el 2015 y han sido las principales causas de mortalidad durante los últimos 15 años. En el mismo sentido la diabetes alcanzó los 1.6 millones de defunciones en este año (OMS, 2017). En México, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes y el cáncer son las tres principales causas de muerte (INEGI, 2017). Se ha observado una relación entre las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Puesto que un paciente diabético tiene 2 a 4 veces más riesgo de padecer un derrame cerebral que los no diabéticos y se estima que entre el 60% y 65% de los diabéticos son hipertensos (OMS, FID, INEGI, 2017) (Benjamin *et al.*, 2017; Guyenet, 2006).

Varios mecanismos de asociación entre la diabetes y las enfermedades cardiovasculares han sido sugeridos incluyendo la disfunción endotelial (Schalkwijk *et al.*, 2005). Al inicio de la diabetes se observan algunas características que pueden modificar directamente las vías de señalización así como la función vascular; estas son baja respuesta a la señalización de la insulina, acumulación e inflamación del tejido adiposo (ectópico), e hiperglucemia. Estos factores impiden la vasodilatación estimulada por insulina, incrementan el efecto de algunas adipocinas y se observan productos de glicación de proteínas principalmente en células endoteliales (Eringa *et al.*, 2013). En estados fisiológicos las células endoteliales regulan el tono vascular liberando compuestos que promueven la contracción y la relajación. Sin embargo, durante la diabetes se observa una disminución en la respuesta a compuestos vasorelajantes, (Matsumoto *et al.*, 2004), una reducción de la concentración de óxido nítrico y un incremento de sustancias contráctiles como endotelinas y prostanoïdes (Wong *et al.*, 2013).

La resistencia a la insulina es uno de los factores que se correlacionan a estas enfermedades por ello se vuelve importante el estudio de las disfunciones cardiovasculares en este estadio, con la finalidad de conocer un poco más la fisiopatología de estas enfermedades.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES

La insulina es una hormona secretada por las células β del páncreas que se encarga de la regulación del metabolismo de la glucosa y de los lípidos, promueve la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo, y suprime la producción de ésta en el hígado mediante la inhibición de la gluconeogénesis y de la glucogenólisis (Reaven, 1993); además, regula el metabolismo de los lípidos incrementando la síntesis de ácidos grasos por esterificación de los ácidos grasos libres y suprimiendo la lipólisis (Sesti, 2006) (figura 1).

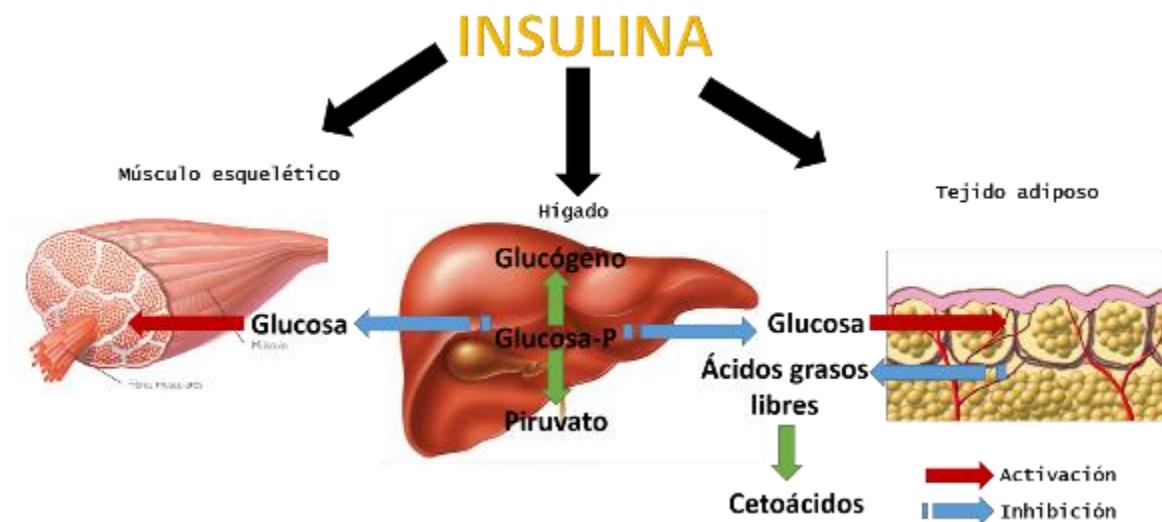


Figura 1. Efectos de la insulina sobre sus principales órganos blancos

2.1 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es normalmente definida como un estado metabólico en el que los efectos fisiológicos de la insulina sobre sus tejidos blanco se encuentran disminuidos. La resistencia a la insulina se compensa con un aumento en la secreción por parte de la célula β del páncreas, de lo cual resulta la hiperinsulinemia (Mercurio *et al.*, 2012; Sesti, 2006). Sin embargo, a pesar de existir grandes cantidades de insulina, esta no puede cumplir su función y debido a esto, la utilización periférica de glucosa se ve disminuida, provocando un aumento en la

ANTECEDENTES

producción de glucosa hepática y un aumento de los valores plasmáticos de glucosa (Bazotte *et al.*, 2014).

Uno de los principales mecanismos fisiopatológicos observado en la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina no solo desempeña un papel importante en la DM2 sino que también se considera como un defecto etiológico que da origen a varias alteraciones metabólicas, tales como: dislipidemias, en donde se observan que las concentraciones de triglicéridos están elevadas; así como, concentraciones bajas de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (figura 2) (Mlinar *et al.*, 2007).

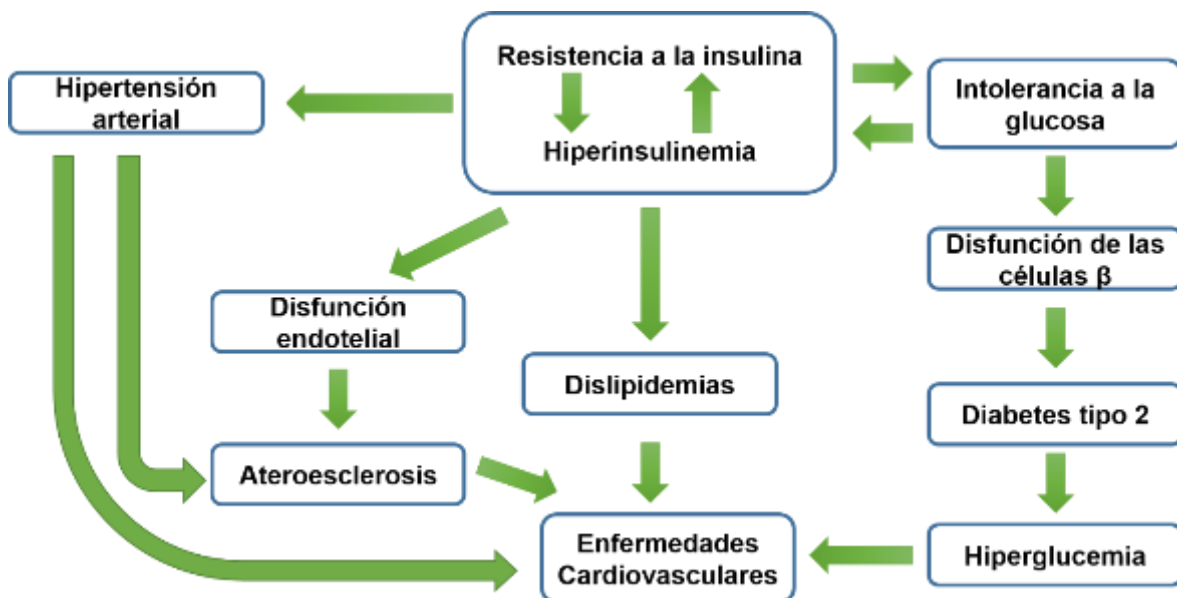


Figura 2. Relación entre la resistencia a la insulina y el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares

La resistencia a la insulina también ha sido relacionada con la obesidad abdominal, pues la mayoría de los pacientes con obesidad cursan con algún grado de resistencia a la insulina (Eckel *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la obesidad visceral es un factor causante de resistencia a la insulina. Se sabe que los adipocitos son capaces de secretar sustancias proinflamatorias: factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6). El TNF- α aumenta la lipólisis en el adipocito, aumentando las concentraciones de ácidos grasos libres no esterificados (NEFA

ANTECEDENTES

por sus siglas en inglés) y con ello afectando directamente la señalización de insulina (Johnson *et al.*, 2013). El aumento de los ácidos grasos libres provoca un aumento de metabolitos intracelulares, como diacilglicerol, acil CoA y ceramidas, los cuales son capaces de activar Ser/Thr cinasas, que al ser activadas tienen la capacidad de modificar y reducir la habilidad de la insulina de interactuar con su receptor, por lo que el transporte de glucosa se ve afectado (Samuel *et al.*, 2012).

El término de resistencia a la insulina o insensibilidad a la insulina fue empleado por primera vez por Himsworth en 1936 (Cabezas-Cerrato *et al.*, 2003; Himsworth, 2011). Este concepto fue retomado por Gerald Reaven en 1988, quien ante la coexistencia de diferentes factores de riesgo cardiovascular en un mismo individuo (obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y dislipidemias), propuso la existencia de una entidad patológica que denominó “Síndrome X” o “Síndrome de resistencia a la insulina”, debido a que considera a la resistencia a la insulina como la base fisiopatológica común entre todos estos factores. En la actualidad se le denomina síndrome metabólico (Reaven, 1993).

El método más utilizado para el diagnóstico de la resistencia a la insulina es el índice HOMA (Homeostasis Model Assessment), el cual se deriva de la interacción entre la función de la célula β y la sensibilidad a la insulina en un modelo matemático donde se utilizan las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (Tang *et al.*, 2015). El modelo se calibra con una función celular β de 100% y una resistencia a la insulina normal de 1 de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA} = \frac{\text{Insulina} \left(\frac{\mu\text{UI}}{\text{mL}} \right) * \text{Glucosa} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right)}{22.5}$$

2.2 Enfermedades y estadios fisiológicos relacionados con la resistencia a la insulina

2.2.1 Síndrome metabólico

El término síndrome metabólico se refiere a un conjunto de desórdenes metabólicos asociados a la resistencia a la insulina. Dentro de estos desórdenes se encuentran diabetes, obesidad abdominal, niveles sanguíneos de colesterol alto así como presión sanguínea alta (Alberti *et al.*, 2006). Se estima que el 20-25 % de la población adulta del mundo padecen este síndrome. El diagnóstico de este síndrome según la Federación Internacional de Diabetes se da cuando una persona padece obesidad abdominal y presenta dos de los cuatro siguientes factores: niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de colesterol HDL, presión sanguínea elevada y niveles elevados de glucosa en plasma en ayuno, (ver Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de diagnóstico de síndrome metabólico de acuerdo con Federación Internacional de Diabetes.

Obesidad central IMC>30 Kg/m²+ dos de los siguientes cuatro factores	
Niveles elevados de triglicéridos	≥150 mg/dL (1.7mmol) o estar recibiendo tratamiento previo para esta enfermedad lipídica
Niveles bajos de colesterol HDL	<40 mg/dL (1.03 mmol/L) en hombres <50 mg/dL (1.29 mmol/L) en mujeres o estar recibiendo tratamiento previo para esta enfermedad lipídica
Presión sanguínea alta	Presión sistólica ≥ 130 o presión diastólica ≥85 mmHg o estar recibiendo tratamiento previo para la hipertensión
Niveles plasmáticos altos de glucosa en ayuno	Glucosa plasmática en ayuno ≥ 100 mg/dL (5.6 mmol/L) o diagnóstico previo de diabetes tipo 2

Varios estudios han mostrado que personas con síndrome metabólico tiene más probabilidades de generar enfermedad cardiovascular aterosclerótica, reduciendo con ello la esperanza de vida de estos individuos (Alberti *et al.*, 2006; Eckel *et al.*, 2005).

2.2.2 Diabetes mellitus tipo 2

En el mundo existen 422 millones de personas con algún tipo de diabetes, de los cuales aproximadamente el 90 % padecen diabetes mellitus tipo 2 (DM2), en este tipo de diabetes la resistencia a la insulina juega un papel clave para el desarrollo de esta enfermedad (OMS, 2017) (Scheen, 2003).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la diabetes como un desorden metabólico de múltiple etiología caracterizado por hiperglucemia crónica con desordenes en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas como resultado de los defectos en la secreción de insulina, en su acción o en ambas. La DM2 actualmente ha comenzado a ser considerada como una pandemia. Es una enfermedad compleja que incluye varias anormalidades metabólicas; elevada producción de glucosa por el hígado, secreción deficiente de insulina por el páncreas y una pobre respuesta del organismo hacia la insulina. Es una enfermedad progresiva que a medida que transcurren los años su control metabólico va empeorando producto de la resistencia a la insulina (Sesti, 2006).

El principal mecanismo fisiopatológico observado en la DM2 es la resistencia a la insulina; la cual se define como una condición metabólica en la que los efectos tisulares de la insulina están disminuidos (Ostenson, 2001; Scheen, 2003). La resistencia a la insulina se compensa con un aumento en su secreción por parte de la célula, de lo cual resulta la hiperinsulinemia. Debido a la falta de acción de la insulina, la utilización periférica de glucosa se ve disminuida, provocando un aumento en la producción de glucosa hepática con lo que los valores plasmáticos incrementan (Sesti, 2006).

2.2.3 Diabetes y enfermedades cardiovasculares

Durante mucho tiempo se ha observado una asociación entre la diabetes y las enfermedades vasculares (Paneni *et al.*, 2013). Varios mecanismos de asociación han sido sugeridos incluyendo la disfunción endotelial (Schalkwijk *et al.*, 2005). Al inicio de la diabetes se observan algunas características que pueden modificar directamente la señalización así como la función vascular; estas son baja respuesta

a la señalización de la insulina, acumulación e inflamación del tejido adiposo (ectópico), e hiperglucemia. Estos factores impiden la vasodilatación estimulada por insulina, incrementan el efecto de algunas adipocinas, se observan productos de glicación de proteínas principalmente en células endoteliales (Eringa *et al.*, 2013).

El óxido nítrico (ON) es una sustancia vasodilatadora liberada por el endotelio vascular. Es una molécula gaseosa producida a partir del grupo guanidino de la L-arginina que es catalizada por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS) (Huang, 2009). Existen tres isoformas identificadas: (1) la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Uno de los mecanismos de regulación de la actividad de la eNOS es a través de la fosforilación de esta enzima. La fosforilación en los residuos de Ser617, Ser635 y Ser1177 da como resultado la activación de la eNOS mientras que la fosforilación en residuos de Ser116 y Thr497 reduce su actividad (Huang, 2009). Se ha observado que durante la DM2, la cual está caracterizada por resistencia a la insulina, hay modificaciones en algunas vías de señalización (PI3K/Akt) que afectan la fosforilación de la eNOS principalmente del residuo de Ser1177 (Ewart *et al.*, 2011; Taguchi *et al.*, 2011).

La vía fosfatidilinositol-3-cinasa/ Protein cinasa B (PI3K/Akt) (figura 3) es uno de los principales mecanismos para la fosforilación de la eNOS (Huang, 2009). La cascada de señalización se inicia cuando la insulina interacciona con su receptor, esta unión lleva a la activación de PI3K, la cual es activada al asociarse con el sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) a través de su dominio SH2. La activación de PI3K convierte el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), en fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual activa de forma indirecta a Akt. Cuando esta cinasa (IRS-1) se encuentra unida a PIP3 es activada por otra cinasa, denominada proteína cinasa D (PKD). Cuando Akt se encuentra activa, es capaz de fosforilar residuos de Ser o Thr de sus proteínas diana, en este caso el residuo de Ser1177 de la eNOS, provocando un incremento en la concentración de óxido nítrico (Eringa *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2004).

ANTECEDENTES

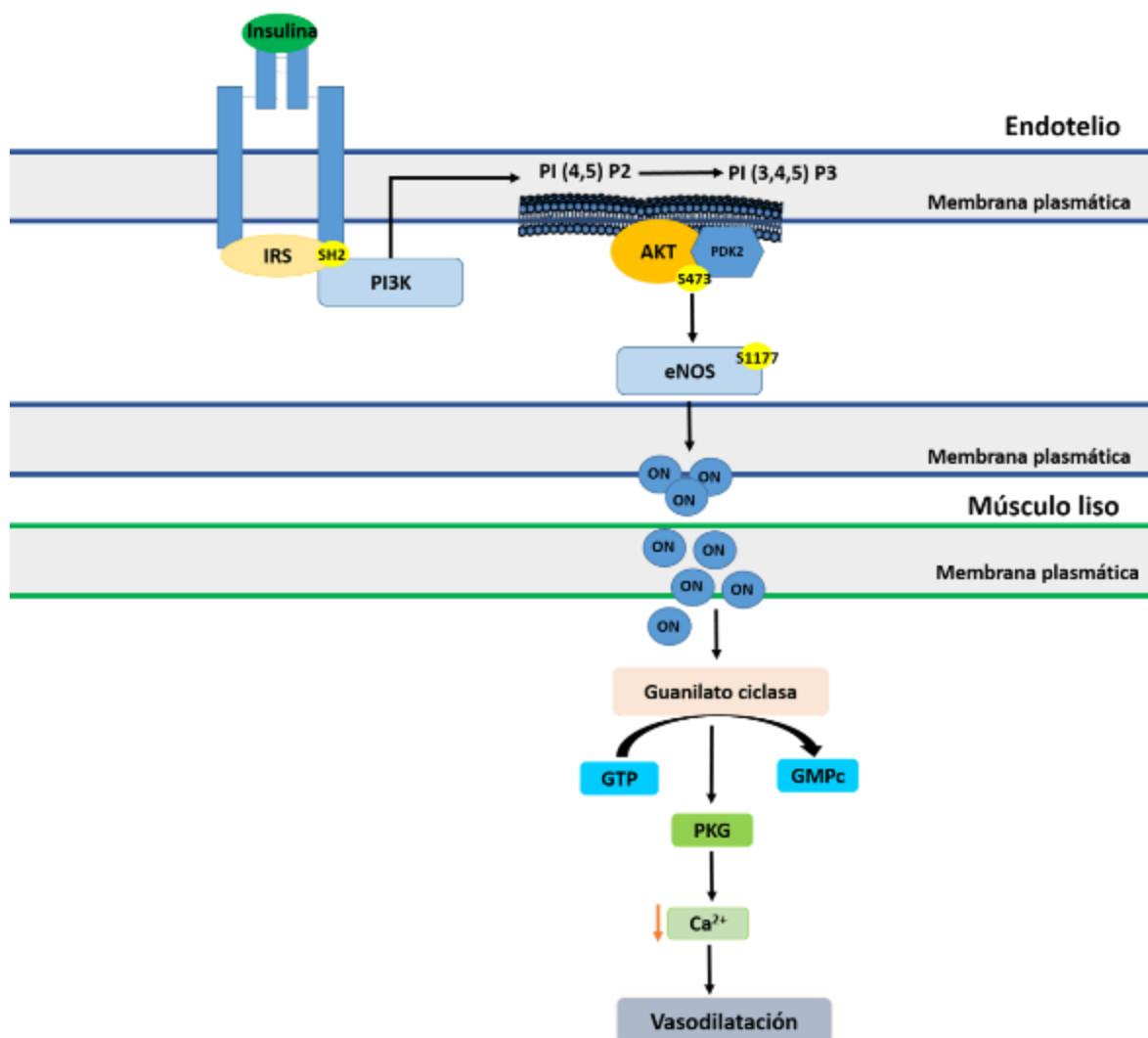


Figura 3. Activación de la vía de señalización PI3K/Akt por insulina en el endotelio.

2.2.4. Efectos de cardiovasculares de la metformina

La metformina es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Su mecanismo de acción es a través de la activación de la cinasa activada por AMP (AMPK). La activación de AMPK por metformina se da de manera indirecta por inhibición del complejo I de la cadena respiratoria aumentando los niveles de AMP con respecto a los de ATP (Thackeray *et al.*, 2011). Se ha demostrado que la cinasa activada por AMP (AMPK) también es capaz de fosforilar a la eNOS en el residuo de Ser1177 y con ello activarla, dando como resultado final

un aumento en la síntesis de óxido nítrico (Morrow *et al.*, 2003). Varios estudios han demostrado la capacidad de metformina para restaurar la función endotelial. Sin embargo, el mecanismo por el cual metformina mejora la función endotelial no se encuentra del todo clara (Katakam *et al.*, 2000; Sena *et al.*, 2011). Algunos estudios demuestran que metformina no solo incrementa los niveles de óxido nítrico sino que también tiene la capacidad de inhibir la producción de radicales libres de oxígeno (especies reactivas de oxígeno; ROS) o de compuestos vasoconstrictores (Lobato *et al.*, 2012; Puyo *et al.*, 2012). Recientemente se ha sugerido que la hiperglicemia (40 mM) en células endoteliales disminuyó los niveles de la proteína sirtuin-1 (Sirt1) y que la metformina puede restaurar los niveles de dicha proteína para que pueda restituir la función endotelial (Arunachalam *et al.*, 2014). Además, se ha observado que el tratamiento con metformina reduce la presión arterial y mejora la función endotelial en aortas aisladas de rata (Majithiya *et al.*, 2006; Sena *et al.*, 2011; Verma *et al.*, 2000) así como en arterias mesentéricas aisladas de ratas de las cepas SHR y Sprague-Dawley en las que se ha observado vasodilatación (Katakam *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2008; Puyo *et al.*, 2012; Sartoretto *et al.*, 2005). Se han investigado algunos mecanismos por los cuales metformina podría restaurar la función endotelial dentro de los cuales se ha encontrado disminución del estrés oxidativo sistémico (Ouslimani *et al.*, 2005; Sena *et al.*, 2011). También algunos estudios sugieren que la metformina es capaz de mejorar la función endotelial suprimiendo la producción de prostanoïdes (Lobato *et al.*, 2012).

2.2.4 Análogo de metformina (EGL-6M)

En el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Se llevó a cabo el diseño y la síntesis de análogos de metformina. Para su diseño se tomó como base la estructura de la metformina y la fenformina. El diseño del análogo **EGL-6M** fue basado en la estructura de la fenformina, este fármaco fue utilizado para el tratamiento de la diabetes tipo II, con una eficacia mayor que la de metformina; sin embargo, fue retirada del mercado en varios países debido a que causa ácidos láctico grave. Esta biguanida se conforma de un anillo de benceno unido al nitrógeno de la biguanida

ANTECEDENTES

por medio de un grupo etilo (figura 4), todas estas características le confieren una alta liposolubilidad, propiedad que le permite atravesar membranas fácilmente llegando a la mitocondria donde inhibe al complejo I de la cadena respiratoria, provocando que la glucólisis se lleve a cabo en ausencia de oxígeno, y generando ácido láctico como producto final. Debido a esto, en el diseño se consideró una homologación inferior de la cadena alifática, lo cual disminuirá la liposolubilidad pero conservando el anillo aromático, lo que podría conservar la eficacia del compuesto pero disminuyendo la toxicidad. Una vez diseñado de manera racional, se realizó la síntesis y purificación del compuesto; así como la obtención del compuesto en cantidades suficientes para su evaluación.

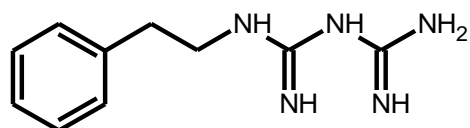


Figura 4. Estructura química del análogo **EGL-6M**

Se realizó una evaluación *in vitro* sobre un cultivo primario de hepatocitos en donde el **EGL-6M** provocó un incremento en la expresión de AMPK total, pAMPK Thr 172 (sitio de activación por fosforilación de la enzima) y en la pACC ser 79 mayor al observado por metformina.

Debido a ello se seleccionó al **EGL-6M** para su evaluación en un modelo murino de diabetes no insulino dependiente. Se realizó un ensayo agudo, observando que tras la administración del compuesto los niveles de glucosa disminuyeron y este efecto se mantuvo durante 7 horas. Además, de ello se realizó una curva de tolerancia a la glucosa tras la administración del **EGL-6M** en la cual se observó que el compuesto tiene un efecto antihiper glucemiante, puesto que retorna los valores glucosa disminuyeron a valores basales y no a valores menores como sucede con compuestos hipoglucemiantes.

2.2.5 Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica, compleja y multifactorial prevenible. La OMS la define como un acúmulo excesivo de grasa corporal, que se traduce en un aumento del peso corporal. De acuerdo con la OMS en el año 2016 más de 1900 millones de la población adulta (de 18 o más años) tenían sobrepeso, de los cuales 650 millones eran obesos (OMS, 2017).

La obesidad es considerada como uno de los mayores factores de riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular (figura 5). Sin embargo, no todos los obesos tienen el mismo grado de riesgo (Wilson *et al.*, 2002). Esta asociación entre la obesidad y el riesgo cardiovascular parece estar mediada por múltiples cambios metabólicos. Un exceso de tejido adiposo puede llegar a afectar al metabolismo de la glucosa y de los lípidos, a la regulación de la presión sanguínea, a los procesos tromboticos y fibrinolíticos, así como a las reacciones inflamatorias (Lambert *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2017).

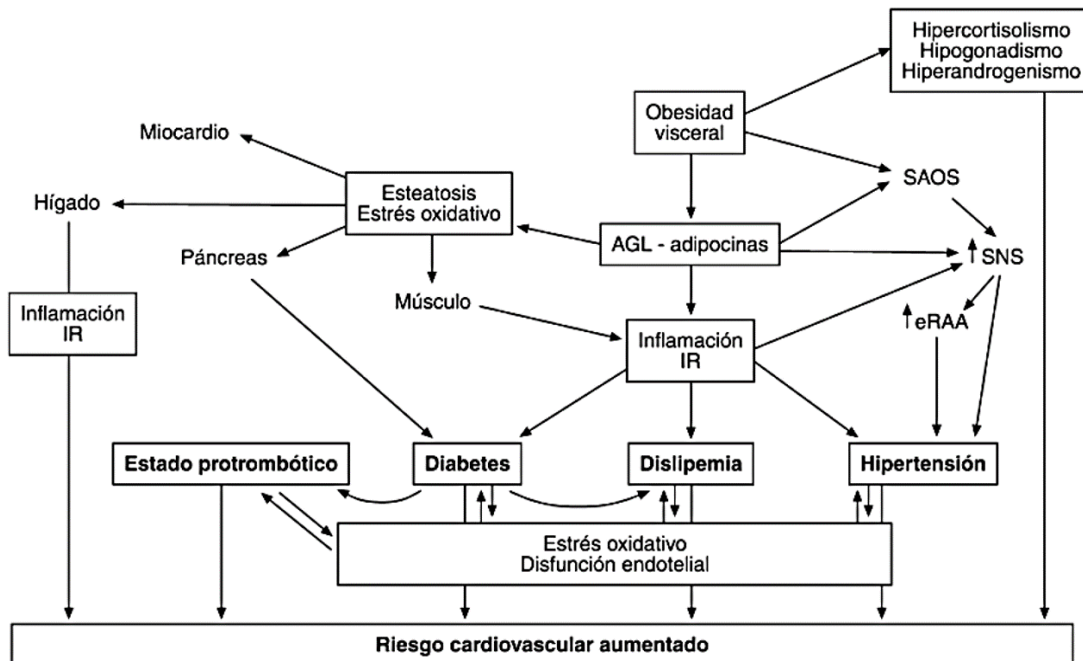


Figura 5. Fisiopatología de riesgo cardiovascular incrementado por la obesidad visceral, AGL, ácidos grasos libres; SAOS, Síndrome de apnea obstructiva del sueño; eRAA, Eje

Renina-angiotensina; SNS, sistema nervioso simpático; IR, resistencia a la insulina. Tomado de (Gonzalez Jimenez, 2013).

Los adipocitos son capaces de secretar sustancias proinflamatorias: factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interleucinas (IL-6, IL-1 β e IL10). El TNF- α aumenta la lipólisis en el adipocito, aumentando las concentraciones de los ácidos grasos libres no esterificados (NEFA) y con ello afectando directamente la señalización de insulina. Los NEFAs son capaces de activar los receptores FFAR1 (GPR40), FFAR2, FFAR3 y FFAR4. Dentro de los más importantes en la regulación del metabolismo son los receptores FFAR1 los cuales aumentan la producción de glucosa hepática y cuando se activan en el páncreas promueven la secreción de insulina (Milligan *et al.*, 2017). Además, se sabe que el aumento de NEFAs participa en la fisiopatología de la esteatosis tanto hepática y muscular, como en la cardíaca y pancreática, lo que conlleva a un estrés oxidativo y a una disfunción endotelial, permitiendo el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Gonzalez Jimenez, 2013; Nakamura *et al.*, 2014).

2.2.6 Síndrome de ovario poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) es un trastorno endocrino-metabólico. Es importante destacar que se trata de un síndrome y no de una enfermedad, esto con la finalidad de entender mejor su fisiopatología. Esta caracterizado por hiperandrogenismo, trastorno menstrual, infertilidad anovulatoria y obesidad. Es un trastorno heterogéneo que varía desde su presentación clásica, descrita con obesidad, amenorrea e hirsutismo, hasta mujeres con ciclos normales e incluso en algunos casos, con ovarios ecográficamente normales (Rasquin Leon *et al.*, 2017).

Uno de los posibles factores desencadenantes del síndrome es la hiperinsulinemia como resultado de la resistencia a la insulina pues se ha observado una correlación entre los niveles de andrógenos y la resistencia a la insulina (Dunaif, 1997). Además, se ha observado que mujeres con obesidad central (androide), las cuales tienen niveles de andrógenos libres mayores, presentan un grado significativamente más alto de resistencia a la insulina. Por lo que se cree que se establece un círculo vicioso entre los niveles de andrógenos y la insensibilidad a la insulina (Bellver *et*

ANTECEDENTES

al., 2017; Rasquin Leon *et al.*, 2017). Algunos de los efectos promovidos por la hiperinsulinemia (figura 6) observados son la facilitación de la secreción ovárica de andrógenos mediada por la hormona luteinizante (LH), la secreción de andrógenos suprarrenales mediada por corticotropina (ACTH), así como la reducción en la síntesis y secreción de globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) en el hígado, la cual aumenta la cantidad de testosterona circulante facilitando su unión a sus tejidos blancos (Anagnostis *et al.*, 2017; Dunaif, 1997; Rasquin Leon *et al.*, 2017).

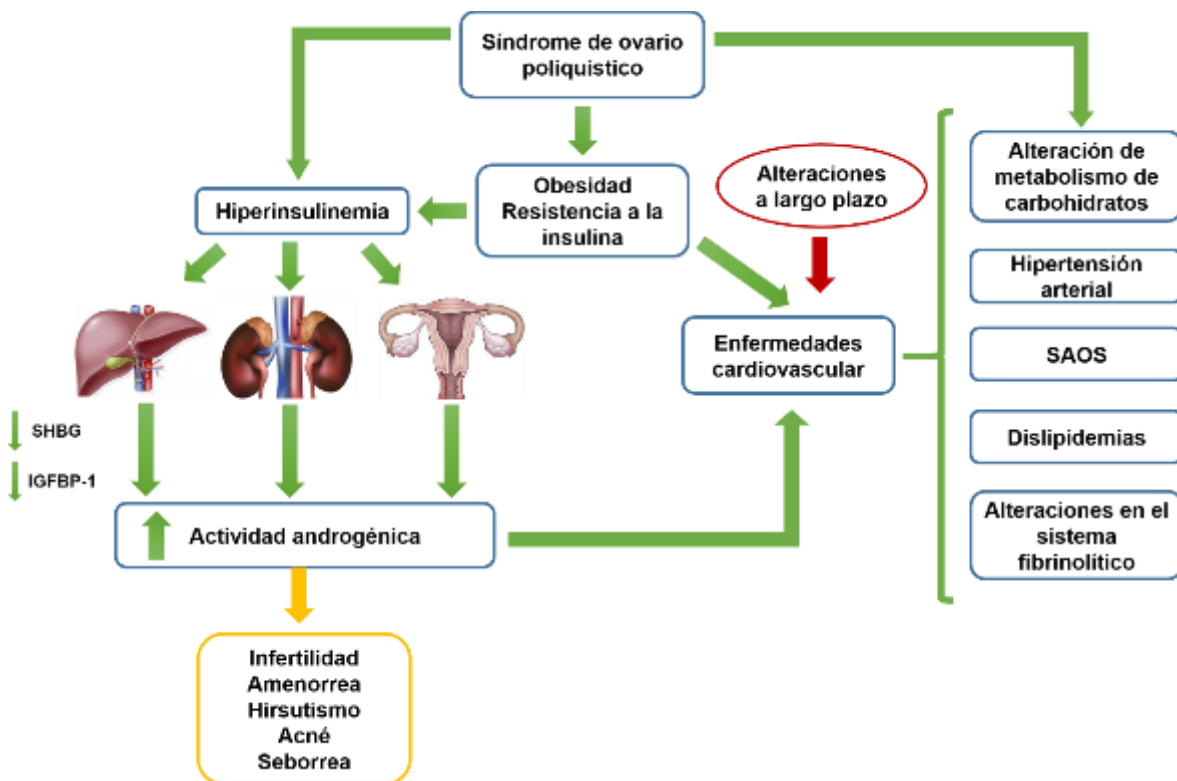


Figura 6. Asociación del Síndrome de ovario poliquístico y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Influencia de la resistencia a la insulina. SAOS; síndrome de apnea obstructiva del sueño, SHBG; globulina fijadora de hormonas sexuales, IGFBP-1; proteína transportadora del factor de crecimiento similar a la insulina.

2.2.7. Menopausia

La menopausia no es una enfermedad sino un periodo de transición normal en la mujer, en la que sufre la pérdida de la menstruación que incluye diversas alteraciones hormonales, como el descenso de los niveles de estrógenos (Yang *et al.*, 2017). La pérdida de estas hormonas provoca alteraciones en el metabolismo así como un descenso en la sensibilidad a la insulina (Bessesen *et al.*, 2015). Además, se ha observado una asociación entre la pérdida de los estrógenos y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Regensteiner *et al.*, 2015).

Las mujeres al igual que los hombres con la edad experimentan un aumento en el riesgo cardiovascular. Sin embargo, en la etapa reproductiva la mujer tiene una menor prevalencia de hipertensión arterial que el hombre, mientras que después de la menopausia esta relación se invierte, encontrando más mujeres mayores de 50 años con hipertensión que hombres con esta enfermedad. Esto sugiere que las hormonas sexuales pudieran estar implicadas en el desarrollo de esta enfermedad (Duckles *et al.*, 2010).

Algunos estudios han demostrado que las hormonas esteroideas tienen la capacidad de modular la producción de óxido nítrico endotelial. Una de estas hormonas investigadas es el 17β -estradiol. Esta hormona ha demostrado tener un efecto cardioprotector (Satake *et al.*, 2008) así como efectos vasorelajantes (Acosta-Cota *et al.*, 2014; Cairrao *et al.*, 2012; McNeill *et al.*, 1999). Se han propuesto algunos mecanismos por el cual el estradiol está generando esta protección y mejora de la función endotelial; tales como inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje del tipo L (LTCC; por sus siglas en inglés), así como la participación de los receptores vainilloides (Cairrao *et al.*, 2012; Ho, 2013). Mientras que en ratas con síndrome metabólico inducido por una dieta rica en grasas, el 17β -estradiol mejoró la disfunción endotelial y disminuyó las respuestas contráctiles inducidas por angiotensina II (Bendale *et al.*, 2013) además, de mejorar la función hemodinámica (Pelzer *et al.*, 2005). Otro de los mecanismos que se ha propuesto por la cual el 17β -estradiol provoca vasorelajación es a través de la activación de la vía PI3K/Akt, lo cual provocaría la liberación de óxido nítrico, produciendo con ello

un efecto vasorelajante, mientras que a largo plazo se lleva a cabo una regulación génica incrementando la cantidad de mRNA y así como de la cantidad de eNOS (Duckles *et al.*, 2010; Ishihara *et al.*, 2014; Satake *et al.*, 2008). Así, el 17 β -estradiol, no solo tiene la capacidad de aumentar la cantidad de óxido nítrico sino también aumenta la expresión de eNOS. Estudios en órgano aislado han demostrado que el 17 β -estradiol induce vasorelajación; esto se observó en aortas aisladas de rata (Reslan *et al.*, 2013; Seok *et al.*, 2012) mientras que en arterias mesentéricas reduce las respuestas vasoconstrictoras de fenilefrina (Zhang *et al.*, 1999). Este efecto también se ha observado en un modelo *in vivo* de rata descerebrada y desmedulada en donde se observó que las respuestas vasopresoras a noradrenalina se encuentran disminuidas (Acosta-Cota *et al.*, 2014). De la misma manera se ha observado una mejora en la función de las células β pancreáticas, dando como resultado un efecto benéfico en la hiperglucemia en ratas diabéticas inducida con estreptozotocina (Duckles, 1986; Satake *et al.*, 2008; Tiano *et al.*, 2012; Yamabe *et al.*, 2010). En este mismo modelo, Han y col. (2012) observaron una mejoría en la función endotelial vascular. Esta mejora se la atribuyeron a la activación de eNOS por medio de fosforilación a través de la vía de las MAP cinasas (MAPK1/3). Se han realizado algunos estudios para observar la importancia de esta vía en el efecto producido por estradiol utilizando aortas aisladas de ratas diabéticas así como algunos inhibidores, encontrando que cuando esta vía se encuentra afectada el efecto relajante del estradiol se ve disminuido (Taguchi *et al.*, 2012).

2.2.8. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo (OMS, 2017). Estas enfermedades afectan en mayor medida a los países de ingresos bajos y medios. Se estima que para el 2030 casi 23.6 millones de personas habrán muerto por alguna enfermedad cardiovascular, principalmente por cardiopatías y accidentes cerebrovasculares. Los factores de riesgo incluyen tabaquismo, inactividad física, mala alimentación, sobrepeso y obesidad, hipercolesterolemia y dislipidemias; así como, factores genéticos. Además, se ha observado una alta asociación entre la DM2 y el síndrome metabólico; siendo estos

los principales factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (Benjamin *et al.*, 2017).

De acuerdo con la OMS las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Las cuales pueden ser clasificadas en:

a) Hipertensión arterial

Se entiende por hipertensión arterial (HTA) la elevación sostenida de la presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) o ambas que, de manera uniforme, constante y exponencial aumenta la morbimortalidad cardiovascular. Este trastorno es debido a una tensión persistentemente alta, lo que con el paso del tiempo puede dañarlos. La tensión arterial normal en adultos es de 120 mmHg cuando el corazón está contraído (tensión sistólica) y de 80 mm Hg cuando el corazón se relaja (tensión diastólica). Cuando la tensión sistólica es igual o superior a 140 mmHg y/o la tensión diastólica es igual o superior a 90 mm Hg, la tensión arterial se considera alta o elevada (OMS, 2017) (Hall, 2011).

La mayoría de las personas no presentan síntomas, por ello se le conoce como el “asesino silencioso”. Si la hipertensión no se controla puede provocar infarto al miocardio, ensanchamiento del corazón y, a largo plazo, insuficiencia cardiaca. Posteriormente, los vasos sanguíneos pueden desarrollar protuberancias (aneurismas), los cuales si se forman en vasos pequeños son susceptibles a obstruirse y a romperse. Adicionado a esto la tensión arterial puede ocasionar que la sangre se filtre en el cerebro y provocar un accidente cerebrovascular. Además, se ha observado una correlación con deficiencia renal, ceguera y deterioro cognitivo (Forlivesi *et al.*, 2017).

b) Cardiopatía coronaria

La cardiopatía coronaria o enfermedad de las arterias coronarias, es una afección en la que se forma una placa dentro de las arterias coronarias. Esto es importante ya que estas arterias son las que suministran sangre oxigenada al músculo cardíaco. La placa está formada por grasa, colesterol, calcio y otras sustancias que

se localizan en la sangre; esta placa es conocida como ateroma y produce una enfermedad llamada aterosclerosis. En la lesión aterosclerótica se observan: acumulación sub-intimal de macrófagos, infiltración y diferenciación de células musculares lisas, esto incrementa el tejido conectivo, lo que con lleva a disminuir las propiedades antitrombogénicas y vasodilatadoras del endotelio (Hall, 2011).

c) Enfermedad cerebrovascular

Un accidente cerebrovascular ocurre cuando se interrumpe o se reduce gravemente el suministro de sangre al cerebro, lo cual hace que el tejido cerebral no reciba oxígeno y nutrientes. En cuestión de minutos, las células cerebrales empiezan a morir. Se clasifica en 2 subtipos: isquemia y hemorragia. La isquemia cerebral es la consecuencia de la oclusión de un vaso y puede tener manifestaciones transitorias (ataque isquémico transitorio) o permanentes, lo que implica un daño neuronal irreversible. En la hemorragia intracerebral (HIC) la rotura de un vaso da lugar a una colección hemática en el parénquima cerebral o en el espacio subaracnoideo (Hall, 2011).

d) Enfermedad vascular periférica

La enfermedad vascular periférica (EVP) consiste en un daño u obstrucción en los vasos sanguíneos más alejados del corazón: las arterias y venas periféricas. La EVP ocurre cuando hay un estrechamiento de los vasos sanguíneos fuera del corazón. La causa de esta enfermedad es la arterioesclerosis. Esto sucede cuando placa se acumula en las paredes de las arterias que abastecen de sangre a brazos y piernas. Si la obstrucción del flujo sanguíneo es lo suficientemente grave, puede causar la muerte de los tejidos y, a veces, la amputación del pie o la pierna (Zipes Douglas P. *et al.*).

e) Insuficiencia cardíaca

La insuficiencia cardíaca es una enfermedad grave en la que el corazón no bombea la sangre al organismo como debería. Esto significa que la sangre no puede llevar suficiente oxígeno y nutrientes al organismo para que funcione normalmente. Puede producirse cuando el corazón no bombea (sístole) o no se llena (diástole)

correctamente. La insuficiencia cardíaca es, en casi todos los casos, el resultado final de la mayoría de las enfermedades cardíacas primarias y de deterioro del corazón (Zipes Douglas P. *et al.*).

f) Cardiopatía reumática

La cardiopatía reumática es una afectación sobre las válvulas cardíacas. La cual es producida por la fiebre reumática, una complicación de una infección bacteriana con estreptococos con un mal tratamiento. La amigdalitis estreptocócica o la fiebre escarlatina pueden causar fiebre reumática si no son tratadas adecuadamente (Hall, 2011).

g) Miocardiopatías

Es un grupo heterogéneo de enfermedades del miocardio asociadas a una disfunción mecánica y/o eléctrica que generalmente (aunque de no de manera invariable) presentan hipertrofia ventricular inadecuada o dilatación. Estas afectaciones tienen una amplia variedad de causas (Zipes Douglas P. *et al.*).

2.3 Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular comprende el corazón y los vasos sanguíneos (arterias y venas) que conducen la sangre de ida y vuelta a los distintos tejidos y órganos del cuerpo. El corazón actúa como una bomba muscular doble cuyas partes se hayan vinculadas por la circulación pulmonar. La bomba derecha recibe la sangre desoxigenada a través de las venas cavas superior e inferior, mientras que la bomba izquierda expulsa la sangre oxigenada por la arteria aorta para su distribución por el cuerpo (Palastanga *et al.*, 2007) (figuras 7).

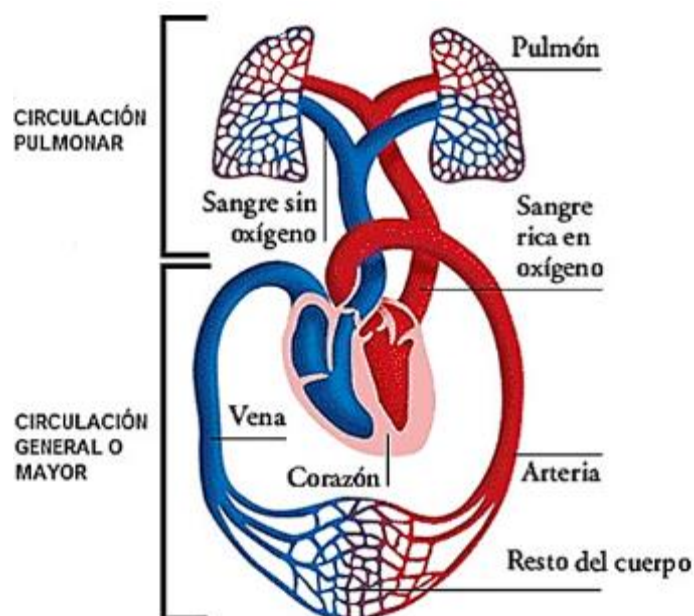


Figura 7. Circulación pulmonar y periférica

La función de la circulación es satisfacer las necesidades de los tejidos: transportar nutrientes a los tejidos, llevarse los productos de desecho, conducir hormonas de una parte del cuerpo a otra y en general, mantener un ambiente apropiado en todos los líquidos tisulares para una supervivencia y función óptimas de las células. Para cumplir con esta función los vasos sanguíneos se dividen en cinco grupos: arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas.

La función de las **arterias** es transportar sangre a una presión elevada a los tejidos. Por esta razón, las arterias tienen paredes vasculares fuertes, y la sangre fluye con rapidez en las arterias. Las arteriolas son las últimas ramas pequeñas del sistema arterial, y actúan como conductos de control a través de los cuales la sangre pasa a los capilares. Las **arteriolas** tienen una pared muscular fuerte que puede cerrar la arteriola por completo o dilatarla varias veces, lo que le da la capacidad de alterar enormemente el flujo sanguíneo que llega a los capilares en respuesta a las necesidades de los tejidos. La función de los **capilares** es intercambiar líquido, nutrientes, electrolitos, hormonas y otras sustancias entre la sangre y el líquido intersticial. Las **vénulas** recogen la sangre de los capilares y gradualmente se unen

ANTECEDENTES

para formar venas cada vez mayores. Las **venas** actúan como conductos de transporte de la sangre desde los tejidos hasta el corazón, pero de forma igualmente importante sirven como reservorio fundamental de la sangre (Hall, 2011; Palastanga *et al.*, 2007). En la tabla 2 se observan las principales características y funciones de los vasos sanguíneos.

Tabla 2. Características y funciones de los vasos sanguíneos

Vaso sanguíneo	Características	Función
Arterias	Diámetro: 10-0.1 mm, pared gruesa. Túnica íntima: células endoteliales Túnica media: más de 10 capas de células musculares	Regulan el flujo sanguíneo a un tejido u órgano determinado
Arteriolas	Diámetro: 100 μ m Túnica íntima: células endoteliales planas Túnica media: 1-3 capas de células musculares Túnica adventicia: tejido conectivo laxo	Vasos de resistencia periférica y presión sanguínea diastólica
Capilares	Diámetro: 10 μ m, se anastomosan y forman dominios capilares rodeados de células capilares lisas, su pared celular está formada por células endoteliales	Unen las arterias a las venas y llevan sangre al interior de los tejidos
Vénulas	Formadas por capilares, pared delgada, algunas veces hay células musculares lisas aplanadas	Colectoras de sangre.
Venas	Pared delgada, tejido elástico además, carecen de lámina externa e interna	Conducen la sangre de regreso al corazón

2.3.1 Presión arterial y su regulación

La presión arterial es definida como la fuerza o presión que ejerce la sangre sobre las paredes de las arterias, tiene dos componentes, la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica. La primera corresponde al valor máximo de la tensión arterial durante la sístole (contracción del corazón); mientras que la presión arterial diastólica corresponde al valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón está relajado (diástole). La cual depende principalmente de la resistencia vascular periférica. La regulación de la presión arterial es un proceso complejo, que está determinado por la acción del sistema nervioso autónomo y los centros de regulación cardiovascular del sistema nervioso central (SNC), los factores vasodilatadores y vasoconstrictores, así como el riñón. Cada uno de estos sistemas actúa diferente en forma y tiempo. La regulación nerviosa intenta mantener un nivel adecuado de la presión arterial mediante la corrección y el reajuste instantáneo de los cambios de presión arterial. Los sistemas humorales participan junto con el sistema nervioso simpático (SNS) en la regulación del diámetro de las arterias musculares, por lo que son los responsables de los cambios de la resistencia periférica (Hall, 2011; Klabunde, 2012).

2.3.1.1 Sistema nervioso central

El sistema nervioso central (SNC) coordina el control reflejo de la presión arterial y tiene su centro en el bulbo raquídeo. Este mecanismo de control se denomina reflejo barorreceptor. El reflejo se inicia en varios receptores sensitivos periféricos de distensión, denominados presorreceptores o barorreceptores, localizados en las arterias carótidas y aorta (estímulo aferente). Un aumento de la presión arterial distiende los barorreceptores y hace que transmitan señales aumentando su descarga hacia el SNC. Si por el contrario disminuye la presión, se reduce dicha descarga (Silverthorn, 2008). Estos receptores ubicados en las grandes arterias sistémicas se consideran de alta presión, pues responden a cambios en la presión arterial sistólica y diastólica, en el rango de 60 a 180 mmHg. Sin embargo, existen otros receptores que actúan de manera similar y están ubicados tanto en la aurícula derecha como en las arterias pulmonares y se denominan receptores de baja

presión. Estos contribuyen al control minimizando los cambios de la presión arterial en respuesta a las variaciones en el volumen de sangre; se activan a partir de variaciones, por ejemplo, en el tamaño de las cavidades cardíacas, ocurridas por aumentos o disminuciones del volumen sanguíneo (Dampney, 1994; Silverthorn, 2008).

2.3.1.2 Regulación por el sistema nervioso autónomo

El sistema cardiovascular es regulado por el sistema nervioso autónomo a través de sus divisiones simpática y parasimpática. Así, la división simpática produce efectos inotrópicos, cronotrópicos y dromotrópicos positivos en el corazón. En los vasos sanguíneos la división simpática puede producir vasoconstricción principalmente en los vasos sanguíneos de resistencia mientras que en las arterias coronarias produce vasorelajación.

Los efectos inotrópicos, cronotrópicos y dromotrópicos negativos son mediados principalmente por los receptores β -adrenérgicos mientras que los efectos vasoconstrictores son mediados por los receptores α_1/α_2 -adrenérgicos. Los receptores β -adrenérgicos median la relajación en las arterias coronarias.

La división parasimpática ejerce un efecto opuesto a la división simpática en el corazón. Estos efectos son mediados por receptores muscarínicos M_2 . En los vasos sanguíneos no existe inervación parasimpática, aunque existen receptores muscarínicos M_3 que producen relajación dependiente del endotelio (Klabunde, 2012; Zipes Douglas P. *et al.*).

La presión arterial está determinada por dos factores la propulsión de la sangre por el corazón y la resistencia al flujo de la misma a través de los vasos sanguíneos. La estimulación simpática aumenta tanto la propulsión por el corazón como la resistencia al flujo, con lo que habitualmente se observa un incremento agudo en la presión arterial, pero un cambio mínimo posterior, a menos que se estimule la retención simultánea de Na^+ y agua por los riñones. En contraste, la estimulación parasimpática moderada disminuye el bombeo cardíaco pero no tienen prácticamente efecto sobre la resistencia periférica (Hall, 2011).

Cuando el sistema nervioso simpático está estimulado en la mayor parte del cuerpo, durante el estrés o el ejercicio, las terminaciones nerviosas simpáticas de los tejidos liberan noradrenalina que estimula el corazón, las venas y las arteriolas. Además, los nervios simpáticos de la médula suprarrenal hacen también que estas glándulas secreten a la sangre noradrenalina y adrenalina. La noradrenalina es una catecolamina con múltiples funciones fisiológicas y homeostáticas que puede actuar como hormona y como neurotransmisor. En los vasos sanguíneos actúa como un vasoconstrictor potente. Mientras que la adrenalina es un potente estimulador alfa y beta con efectos beta predominantes a bajas dosis produciendo broncodilatación y aumento de gasto cardíaco sin incremento a la resistencia periférica. Si aumenta la concentración predominan los efectos alfa provocando vasoconstricción, hipertensión y taquicardia (Hall, 2011; Zipes Douglas P. *et al.*).

2.3.1.3 Regulación humoral

La regulación humoral de la circulación es una regulación por sustancias secretadas o absorbidas en los líquidos corporales, como hormonas o iones. Algunas de estas sustancias se forman en glándulas especiales y después son transportadas por la sangre a todo el organismo. Mientras que otras se producen en zonas definidas de tejido y causan sólo efectos circulatorios locales. Algunos de estos factores que regulan la presión arterial son los siguientes:

a) Renina-Angiotensina-Aldosterona.

El sistema renina-angiotensina aldosterona cumple una función importante en el mantenimiento de la presión arterial y del volumen extracelular. El sistema consiste en una serie de proteínas y péptidos que reaccionan en una cascada para desencadenar una serie amplia de acciones. La cascada básica consiste en la conversión del angiotensinógeno en angiotensina I a través de la acción de la renina. La angiotensina I es transformada en angiotensina II por la acción de la enzima convertidora de angiotensina producida por el endotelio de los vasos pulmonares. La angiotensina II produce diversos efectos como la vasoconstricción

en los vasos sanguíneos, incremento de la ingesta de agua al estimular el centro de la sed en el hipotálamo; mientras que en la corteza suprarrenal estimula la producción de aldosterona, la cual promueve la reabsorción de NaCl, excreción de K⁺ y de H⁺ en el riñón. De esta manera el sistema renina-angiotensina-aldosterona regula la presión arterial (Dampney, 1994; Hall, 2011).

b) Vasopresina

La vasopresina denominada hormona antidiurética, es un vasoconstrictor potente. Se forma en el hipotálamo, pero es transportada siguiendo el eje de axones a la neurohipófisis, desde donde se secreta al torrente sanguíneo. Es claro que la vasopresina podría cambiar drásticamente la presión arterial. Sin embargo, en condiciones normales, sólo se secretan cantidades mínimas. Se ha observado que la secreción aumenta durante hemorragias graves, lo suficiente como para incrementar la presión hasta 60 mmHg (Hall, 2011).

2.3.1.4 Regulación local. Óxido nítrico

El óxido nítrico (ON) es una sustancia vasodilatadora liberada por el endotelio vascular. Es una molécula gaseosa producida a partir del grupo guanidino de la L-arginina que es catalizada por un grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (NOS). Existen tres isoformas identificadas: (1) la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Uno de los mecanismos de regulación de la actividad de la eNOS es a través de la fosforilación de esta enzima; la fosforilación en los residuos de Ser617, Ser635 y Ser1177 da como resultado la activación de la eNOS mientras que la fosforilación en residuos de Ser116 y Thr497 reduce su actividad. Se ha observado que durante la DM2, la cual está caracterizada por resistencia a la insulina, hay modificaciones en algunas vías de señalización (PI3K/Akt) que afectan la fosforilación de la eNOS principalmente del residuo de Ser1177 (Hall, 2011; Rochette *et al.*, 2013).

CAPITULO 3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a la insulina tiene una alta prevalencia en la población en general y se encuentra altamente asociada a algunas patologías como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, hipertensión, aterosclerosis y obesidad lo cual a largo plazo puede incrementar el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Por ello en este trabajo se pretende analizar la función vascular en un modelo de resistencia a la insulina y si el tratamiento crónico con metformina o su análogo (**EGL-6M**) pueden revertir los efectos de la resistencia a la insulina sobre la función vascular; puesto que en estudios *in vitro* se ha demostrado que la metformina mejora la función vascular en modelos experimentales de diabetes.

De la misma manera, se ha observado una disminución a la sensibilidad a la insulina en mujeres postmenopáusicas; así como un incremento en la prevalencia de enfermedades cardiovasculares. Esto denota una importancia de las hormonas sexuales femeninas sobre la regulación de las respuestas cardiovasculares por ello se pretende evaluar el efecto de la administración crónica de 17β -estradiol en animales resistentes a la insulina.

CAPITULO 4. HIPÓTESIS

La metformina, el análogo de la metformina (**EGL-6M**) y el 17 β -estradiol mejorarán las respuestas cardiovasculares en un modelo experimental de resistencia a la insulina inducido por una dieta alta en fructosa.

CAPITULO 5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la administración crónica de la metformina, el análogo de la metformina (**EGL-6M**) y el 17 β -estradiol sobre la función vascular *in vivo* en ratas descerebradas y desmeduladas con resistencia a la insulina inducida por fructuosa.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

5.2.1 Determinar en ratas resistentes a la insulina inducidas por fructosa el efecto de la administración oral crónica de metformina, el análogo o el vehículo sobre:

- 5.2.1.1 Las respuestas vasopresoras por estimulación simpática en la región T7-T9 después del tratamiento o bolos i.v. de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304.
- 5.2.1.2 Las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos i.v. de acetilcolina, isoprenalina o nitroprusiato de sodio
- 5.2.1.3 La activación de las proteínas AMPK, AKT y eNOS y sobre la expresión de los receptores β adrenérgicos mediante un ensayo de western blot.

5.2.2 Determinar en ratas resistentes a la insulina inducidas por fructosa el efecto de la administración crónica de 17 β -estradiol o su vehículo sobre:

- 5.2.2.1 Las respuestas vasopresoras inducidas por la estimulación simpática en la región T7-T9 después del tratamiento o bolos i.v. de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304.
- 5.2.2.2 Las respuestas vasodepresoras inducidas por bolos i.v. de acetilcolina, nitroprusiato de sodio o isoprenalina.
- 5.2.2.3 La activación de la vía AKT/eNOS mediante un ensayo de western blot.

CAPITULO 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para el cumplimiento de los objetivos, este proyecto fue dividido en dos fases de estudio. En la primera fase se evaluó el efecto de la administración crónica de la metformina y su análogo (**EGL-6M**). En la segunda fase se evaluó el efecto de la administración crónica de 17 β -estradiol.

El desarrollo experimental de este proyecto se dividió en tres partes. La primera parte se describe la metodología general para la inducción del modelo experimental y su validación. La metodología general para la evaluación de las respuestas cardiovasculares (vasopresoras y vasodepresoras), la metodología para determinación de la expresión y activación de las proteínas AKT, AMPK y eNOS, y de los receptores β adrenérgicos. La segunda parte (fase 1 del proyecto) se describe la metodología para la evaluación del efecto de la administración crónica de metformina y su análogo sobre el perfil metabólico y las respuestas cardiovasculares. Finalmente, en la tercera parte (fase 2) se detallan los métodos para determinar los efectos de la administración crónica de 17 β -estradiol sobre las respuestas cardiovasculares y el perfil metabólico.

6.1 Metodología general

6.1.1 Animales

Se utilizaron un total de 216 ratas de la cepa Wistar de las cuales 120 ratas fueron hembras y 96 ratas macho con un rango de peso inicial de 200-250 g. Los animales fueron alojados en el bioterio del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en cajas de plástico en un cuarto con temperatura controlada (22 ± 1 °C, 50 % de humedad) así como períodos de luz-oscuridad (12/12 h), con libre acceso a alimento y agua. Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el Uso y el Bienestar de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en EE.UU (Wolfensohn *et al.*, 2013), tratando de minimizar el número de animales empleados así como el sufrimiento de los mismos.

6.1.2 Inducción del modelo experimental de resistencia a la insulina por tratamiento con fructosa.

Para la primera fase del proyecto se utilizaron un total de 96 ratas macho de la cepa wistar de las cuales 72 ratas se utilizaron para la evaluación de las respuestas cardiovasculares y 24 ratas fueron empleadas para determinar la expresión de las proteínas AMPK, AKT y eNOS así como la expresión de los β adrenoreceptores. En la segunda fase del proyecto se emplearon 120 ratas hembras de las cuales 96 ratas se utilizaron para la determinación de las respuestas cardiovasculares y 24 ratas para la evaluación de la expresión de las proteínas AKT y eNOS. Las ratas fueron seleccionadas al azar y divididas en 2 grupos (Control y Fructosa) El grupo control recibió una dieta regular para ratas y agua *ad libitum* mientras que el grupo de tratamiento con fructosa recibió una dieta regular para ratas y una solución de fructosa al 15% (p/v) *ad libitum*, durante 16 semanas.

6.1.3 Determinación de parámetros bioquímicos y metabólicos del modelo experimental

Los niveles de glucosa y triglicéridos fueron evaluados antes y después de los tratamientos farmacológicos utilizando un glucómetro portátil (AccuCheck® y Accutrend® Plus; Roche of Mexico). Así mismo, los niveles de insulina fueron determinados posterior a la administración de 1 g/kg de glucosa a los tiempos 0, 5, 10, 15, 30 y 60 min por medio de un ensayo inmunoenzimático competitivo (ELISA). Para ello se utilizó un kit de la marca ALPCO (Windham, NH, USA), el cual consta de una microplaca de 96 pozos, los cuales contienen un anticuerpo conjugado e inmovilizado específico para insulina. La cuantificación de la reacción enzimática se realizó a una longitud de onda de 450 nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se incluyó una curva estándar en cada experimento según lo sugerido por el proveedor.

6.1.4 Medición de la presión arterial y frecuencia cardiaca no invasiva

La frecuencia cardiaca y la presión arterial se obtuvieron por la medición del pulso pletismográfico utilizando el aparato automático de presión arterial LE 5001

(Letica1, PanLab, Barcelona, España). Las mediciones se realizaron antes y después de los tratamientos farmacológicos.

6.1.5 Curva de tolerancia a la glucosa

Para la realización de la curva de tolerancia a la glucosa los animales fueron sometidos a un periodo de ayuno de 12 horas. Las muestras sanguíneas se obtuvieron realizando una pequeña incisión en la cola. Las muestras fueron recolectadas a los tiempos 0 (antes), 5, 10, 15, 30 y 60 min después de la administración de 1 g/kg de glucosa por vía oral para la determinación de los niveles plasmáticos de insulina. Las muestras sanguíneas para la determinación de los niveles de glucosa fueron tomadas a los tiempos 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 min. Este ensayo se realizó antes y después de los tratamientos farmacológicos.

6.1.6 Modelo de rata descerebrada y desmedulada

Los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3%. Después de la anestesia se realizó una traqueostomía; que consiste en realizar una incisión en el cuello y tráquea para permitir la inserción de una cánula en está. Posteriormente, las ratas fueron descerebradas y desmeduladas por medio de la inserción de un estilete de acero inoxidable a través de la órbita ocular y el *foramen magnum* en el canal vertebral (Shiple *et al.*, 1947). Enseguida, los animales fueron ventilados artificialmente con aire ambiental usando una bomba de Ugo Basile (Comerio, VA, Italy) a 56 respiraciones por minutos con un volumen de respiración de 20 ml/kg (Kleinman *et al.*, 1964). Después de realizar una vagosimpatectomía bilateral a nivel cervical. Se colocaron dos o tres catéteres. El primero se colocó en la arteria carótida izquierda y los demás en las venas femoral izquierda y/o derecha para la administración de fármacos. El catéter de la arteria carótida izquierda se conectó al transductor de presión P23XL (Grass Technologies, Warwick, RI, USA) para registrar la presión arterial sanguínea y la frecuencia cardiaca. Estos parámetros fueron registrados simultáneamente usando una unidad de adquisición de datos (MP150A-CE) y procesados a través del software Acqknowledge v3.8.1 (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA).

6.1.7 Estimulación simpática

Para realizar la estimulación simpática, al finalizar el procedimiento de descerebración y desmedulación, el estilete de acero inoxidable fue remplazado por un electrodo esmaltado en su superficie excepto por 1 cm de longitud localizado a 9 cm de la punta. De esta manera el segmento no aislado se situó en la región T₇-T₉ de la médula espinal para permitir la estimulación selectiva del tono simpático vasopresor (Gillespie *et al.*, 1970). Previo a la estimulación eléctrica se administró galamina (25 mg/kg, i.v.) con la finalidad de evitar los espasmos musculares inducidos por la estimulación eléctrica. Después de alcanzar una condición hemodinámica estable por al menos 30 minutos, se determinaron los valores basales de presión sanguínea diastólica y la frecuencia cardiaca. El tono simpático vasopresor fue estimulado con un generador de pulsos cuadrados S88X (Grass Technologies, Warwick, RI, USA) mediante la aplicación de trenes monofásicos de 10-s, en pulsos rectangulares (2 ms, 60 volts), a frecuencias crecientes de estimulación a 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 Hz. Estas frecuencias aplican 1, 1, 3, 10 y 30 pulsos en 10 segundos. Para minimizar los artefactos ocasionados por los estímulos se utilizó una unidad de aislamiento SIU-V (Grass Technologies, Warwick, RI, USA). Cuando la presión sanguínea diastólica regreso a los niveles basales, se aplicó la siguiente frecuencia de estimulación. Este procedimiento se llevó a cabo sistemáticamente hasta completar la curva estímulo-respuesta (aproximadamente en 30 min).

6.1.8 Estimulación de los receptores $\alpha_{1/2}$ adrenérgicos

Después de la descerebración y desmedulación, se colocaron dos catéteres el primero en la arteria carótida para realizar la medición de la presión arterial y el segundo en la vena femoral derecha en la cual se administraron los agonistas α adrenergicos. Una vez que los niveles de presión arterial fueron estables se realizaron las curvas dosis respuesta a los agonistas. Se empleó noradrenalina para la estimulación de ambos receptores ($\alpha_{1/2}$) a las dosis de 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mientras que para la estimulación selectiva de los receptores α_1 se utilizó metoxamina a las dosis 1, 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Las respuestas inducidas

por la activación de los receptores α_2 fueron determinadas mediante la administración i.v. de UK 14,304 a dosis de 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

6.1.9 Estimulación del endotelio y del músculo liso vascular

Para evaluar la función endotelial y la función del músculo liso vascular, se determinaron las respuestas vasodepresoras inducidas por la administración de acetilcolina (agonista muscarínico), isoprenalina (agonista β -adrenergico) y nitroprusiato de sodio (donador de óxido nítrico). Después del procedimiento de descerebración y desmedulación se observa una caída de la presión arterial, la cual alcanza valores aproximados de 50 mmHg, por esta razón es necesario administrar un compuesto que permita elevar y mantener la presión arterial alrededor de 100 mmHg para poder observar el efecto vasodepresor de los compuestos. Por esta razón se colocaron 3 cateteres. El primero en la arteria carótida para realizar la medición de la presión arterial y la frecuencia cardiaca. El segundo se colocó en la vena femoral derecha en el cual se administró por infusión intravenosa metoxamina (agonista α_1 -adrenergico; produce un efecto vasoconstrictor) a una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$. El tercer cateter fue colocado en la vena femoral izquierda en la cual se administraron los compuestos a evaluar (acetilcolina, isoprenalina y nitroprusiato de sodio). Una vez que los niveles de presión arterial fueron estables se realizó una curva dosis respuesta a acetilcolina a las dosis de 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Este mismo procedimiento se siguió para realizar la curva dosis-respuesta de nitroprusiato de sodio a dosis 0.56, 1.0, 1.8, 3.1, 5.6, 10 y 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$; así como la curva dosis-respuesta a isoprenalina utilizando las dosis de 0.056, 0.1, 0.18, 0.31, 0.56 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

6.1.10 Western Blot

6.1.10.1 Obtención de muestras

Una vez establecido el modelo experimental y posterior a los tratamientos farmacológicos (metformina, **EGL-6M**, estradiol o sus vehículos) los animales fueron anestesiados con isoflurano al 3%. Bajo anestesia se realizó una incisión en el abdomen inferior y se expusieron los intestinos. Posterior a ello se buscó la arteria

renal, pues debajo de ella corre la primera porción de la arteria mesentérica cuando se localizó se colocó un hilo para impedir el flujo sanguíneo, se limpió y se extrajo la arteria completa. Esta se colocó en solución salina sobre una cama de hielo para terminar de limpiarla del tejido adiposo teniendo cuidado de no dañar al endotelio. Una vez limpios los tejidos se colocaron en un tubo para su almacenamiento (-70°C) y posterior homogenización.

Para la extracción de la aorta se realizó una incisión sobre el abdomen superior hasta las costillas, esto con la finalidad de observar más fácilmente la aorta; la cual se localiza a lo largo de la columna vertebral. Para poder limpiarla más fácilmente se colocan dos hilos al inicio y al final de esta y se realizaron los cortes y se extrajo la aorta. Se colocó en solución salina sobre una cama de hielo y se quitaron todos los restos de sangre, una vez limpios los tejidos se colocaron en un tubo para su almacenamiento (-70°C) y posterior homogenización.

Finalmente se extrae el corazón y se realiza una perfusión continua con solución salina fría hasta observar un cambio de coloración del tejido (un tejido más claro), Una vez limpios se colocaron en un tubo para su almacenamiento (-70°C) y posterior homogenización.

6.1.10.2 Homogenización

Para la homogenización de las arterias (mesentéricas y aorta) se utilizó buffer RIPA más inhibidores de proteasas y fosfatasa con tritón al 1% (buffer de lisis). Mientras que para el corazón se realizan dos homogenizaciones la primera bajo las mismas condiciones pero sin tritón y la segunda con tritón al 10%. La cantidad de volumen depende de la cantidad de tejido que se tenga.

Buffer RIPA

Para la preparación de este buffer se utilizan:

- NaCl 150 mM
- EDTA 5mM
- Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM

Buffer de lisis:

Esta solución se utilizó para inhibir a las proteasas y fosfatasa que se encuentran naturalmente en los organismos vivos. Para preparar esta solución se utilizó buffer RIPA más Tritón X100 al 1 o 10% dependiendo del tejido.

Inhibidores de proteasas (1:1000)

- Aprotinina 2 mg/ml
- Leupeptina 2 mg/ml
- Pepstatina 10 mg/ml
- PMSF 100 mM

Inhibidores de fosfatasa (1:100)

- Sacarosa 250 mM
- NaPPi 5 mM
- NAF 50 mM
- EDTA 1 mM
- EGTA 1 mM
- PMSF 0.5 mM
- *o*- vanadato 0.5 M
- β -glicerol 5 mM

6.1.10.3 Cuantificación

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford, usando un kit de BIORAD (Cat. 500-0001, BioRad). Primero se realizó una curva patrón utilizando γ -globulina (stock 1.39 mg/ml en un volumen final de 20 μ l) como patrón de referencia. Cada valor de la curva, así como las muestras se prepararon por duplicado. En la tabla 3 se muestran las cantidades a colocar para la realización de la curva patrón. Para las muestras se colocaron 1 μ l de muestras más 19 μ l de Buffer RIPA para un volumen final de 20 μ l, a los cuales se les adiciona 1 ml de solución de Bradford (diluido previamente con agua miliQ, (1:5)) y se midió a una longitud de onda de 595 nm.

Tabla 3. Curva patrón para la cuantificación de proteínas.

	Concentración de proteína (mg/ml)	Stock γ-globulina (μl)	Buffer RIPA (μl)
Blanco	0.00	20	0
	0.25	15	5
	0.50	10	10
	0.75	5	15
	1.00	0	20

6.1.10.4 Inmunoblot

Para realizar el western blot se colocó el volumen necesario para tener 50 μ g de muestra por carril y se ajustó a un volumen de 15 μ l con buffer RIPA. Posteriormente se agregó 15 μ l con buffer muestra 2X y se hirvieron las muestras a 95 °C por 3 minutos. Se utilizó un gel desnaturalizante de SDS-poliacrilamida al 10% desnaturalizante de acrilamida se colocaron las muestras de proteínas totales y se realizó la electroforesis a 60 volts hasta que las muestras estuvieron en el gel resolvidor; en ese momento se cambió el voltaje a 120. Posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF durante 2 horas continuas a 75 volts. Después de la transferencia las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche al 5% y albumina al 1% en PBS-Tween al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

La membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación se realizaron tres lavados de 10 min con leche al 1% en PBS-tween 20 al 0.1%. Para su posterior incubación con el anticuerpo secundario (anti-conejo 1:3000 o anti-ratón para la actina) durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación constante. Esto se realizó para la determinación de las proteínas fosforiladas, totales y actinas. Este procedimiento fue el mismo para los tres tejidos y para ambas fases del proyecto.

6.2 Tratamiento farmacológico con metformina o el análogo EGL-6M

6.2.1 Síntesis a escala del análogo EGL-6M

La síntesis del análogo **EGL-6M** (figura 8) se realizó a partir de cianoguanidina la cual se hizo reaccionar con bencilamina utilizando 1,2 dimetoxietano (glima) como disolvente, así como una solución de HCl al 50% (v/v), para protonar la cianoguanidina. Para monitorear el avance de la reacción se realizó cromatografía de capa fina y para la visualización de la placa se utilizó una lámpara de UV. Para mayor detalle ver (Gutierrez-Lara *et al.*, 2017; Gutierrez-Lara, 2014).

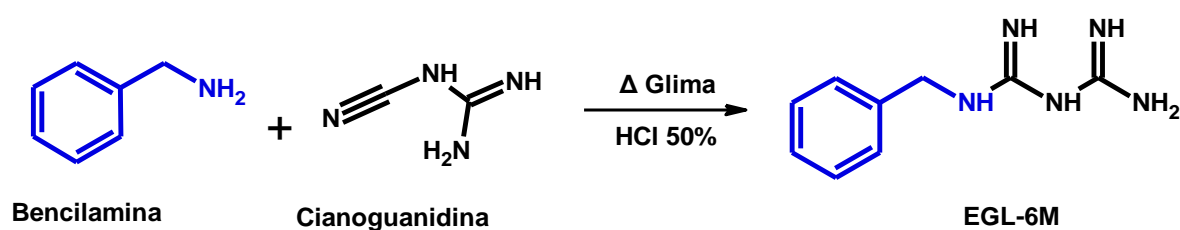


Figura 8. Síntesis del análogo **EGL-6M**. Tomada de (Gutierrez-Lara *et al.*, 2017; Gutierrez-Lara, 2014).

6.2.2 Protocolo experimental de la Fase 1 (Tratamiento con metformina o EGL-6M)

Los animales (n=72) fueron divididos en dos grupos (n=36 cada uno). El primer grupo recibió el vehículo de fructosa (agua) durante 16 semanas y posteriormente fue dividido en tres subgrupos que recibieron durante 28 días por vía oral: (1) metformina (50 mg/kg por día; n=12); (2) **EGL-6M** (50 mg/kg por día; n=12); o (3) su vehículo (1 ml/kg por día n=12).

El segundo grupo (n=36) recibió fructosa (15%, p/v) durante 16 semanas y posteriormente fue dividido en tres subgrupos que recibieron durante 28 días por vía oral: (1) metformina (50 mg/kg·día; n=12); (2) **EGL-6M** (50 mg/kg·día; n=12); o (3) su vehículo (1 ml/kg·día; n=12). Al término de este tratamiento cada uno de estos grupos se dividió en dos, a la primera mitad (n=6 por subgrupo) se le midieron respuestas vasopresoras inducidas por:

DESARROLLO EXPERIMENTAL

- 1) Estimulación simpática en la región torácica T₇-T₉ (0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 Hz);
- 2) Noradrenalina, un ligando endógeno de los receptores α adrenérgicos (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$);
- 3) Metoxamina, un agonista de los receptores α_1 -adrenérgicos (1, 3, 10, 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$).
- 4) UK 14,304, un agonista de los receptores α_2 adrenérgicos (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Ver figura 9.

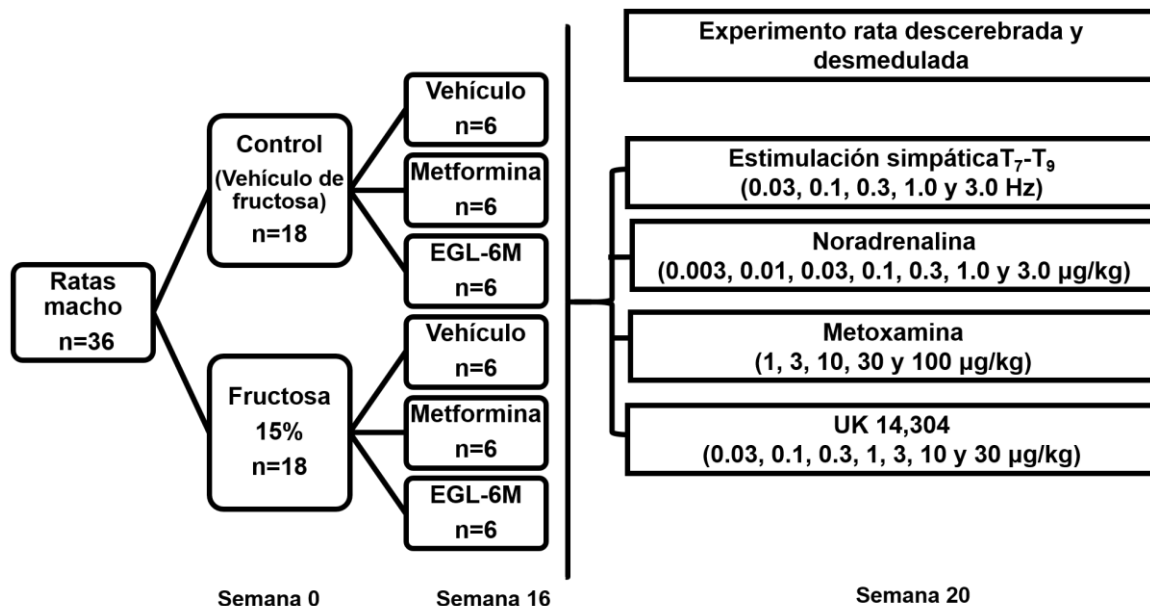


Figura 9. Esquema de protocolo experimental para evaluar las respuestas vasopresoras. Metformina y su análogo fueron administrados a una dosis de 50 mg/kg por vía oral cada día durante 28 días, mientras que el vehículo fue administrado a 1 ml/kg.

El segundo subgrupo (n=6 por subgrupo) fueron utilizadas para determinar respuestas vasodepresoras. Para tal propósito se administró una infusión de metoxamina (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ min) y posteriormente se administró de manera secuencial:

DESARROLLO EXPERIMENTAL

- 1) un agonista muscarínico, acetilcolina (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$);
 - 2) un donador de óxido nítrico, nitroprusiato de sodio (0.56, 1.0, 1.8, 3.1, 5.6, 10 y 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$);
 - 3) un agonista β - adrenérgico, isoprenalina (0.056, 0.1, 0.18, 0.31, 0.56, y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$);
- Véase figura 10.

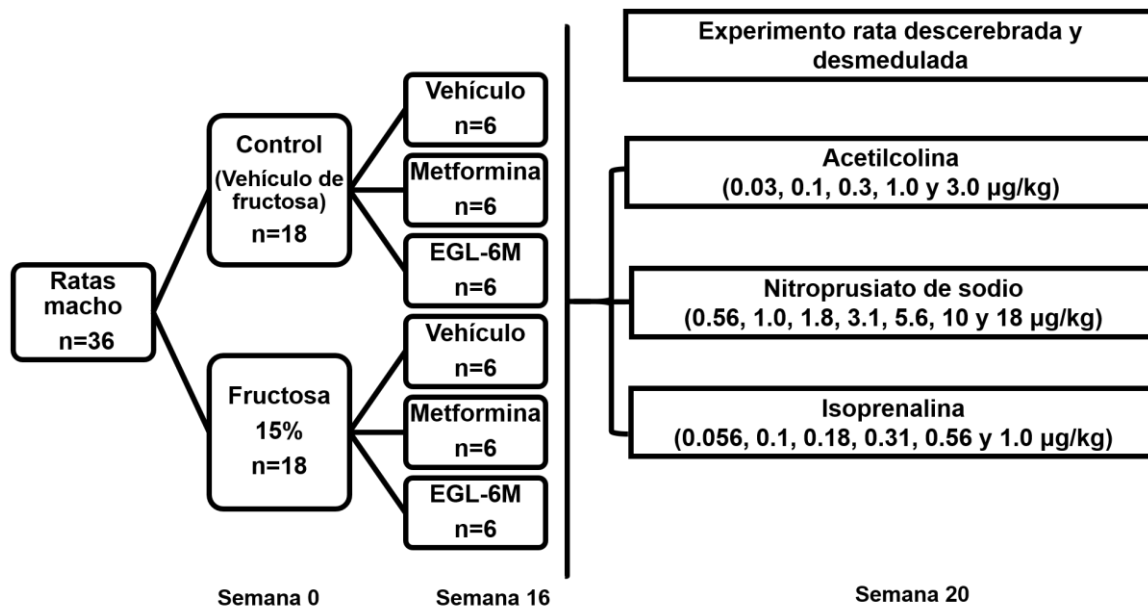


Figura 10. Esquema de protocolo experimental para evaluar las respuestas vasodepresoras. Metformina y su análogo fueron administrados a una dosis de 50 mg/kg por vía oral cada día durante 28 días, mientras que el vehículo fue administrado a la dosis de 1 ml/kg.

6.2.3 Perfil metabólico y hemodinámico

Para evaluar el perfil metabólico y hemodinámico, los niveles sanguíneos de triglicéridos y glucosa e insulina plasmática fueron determinados antes y después de los tratamientos con metformina (50 mg/kg por día durante 28 días), **EGL-6M** (50 mg/kg por día durante 28 días) o el vehículo (agua destilada; 1 ml/kg por día durante 28 días). Con ello se calcularon los índices HOMA de los animales. Además, la presión arterial diastólica (PAD), sistólica (PAS), media (PAM) y frecuencia cardiaca (FC) fueron medidas. Así mismo curvas de tolerancia a la glucosa fueron

determinadas para medir los niveles de glucosa sanguínea e insulina plasmática. Ver figura 11.

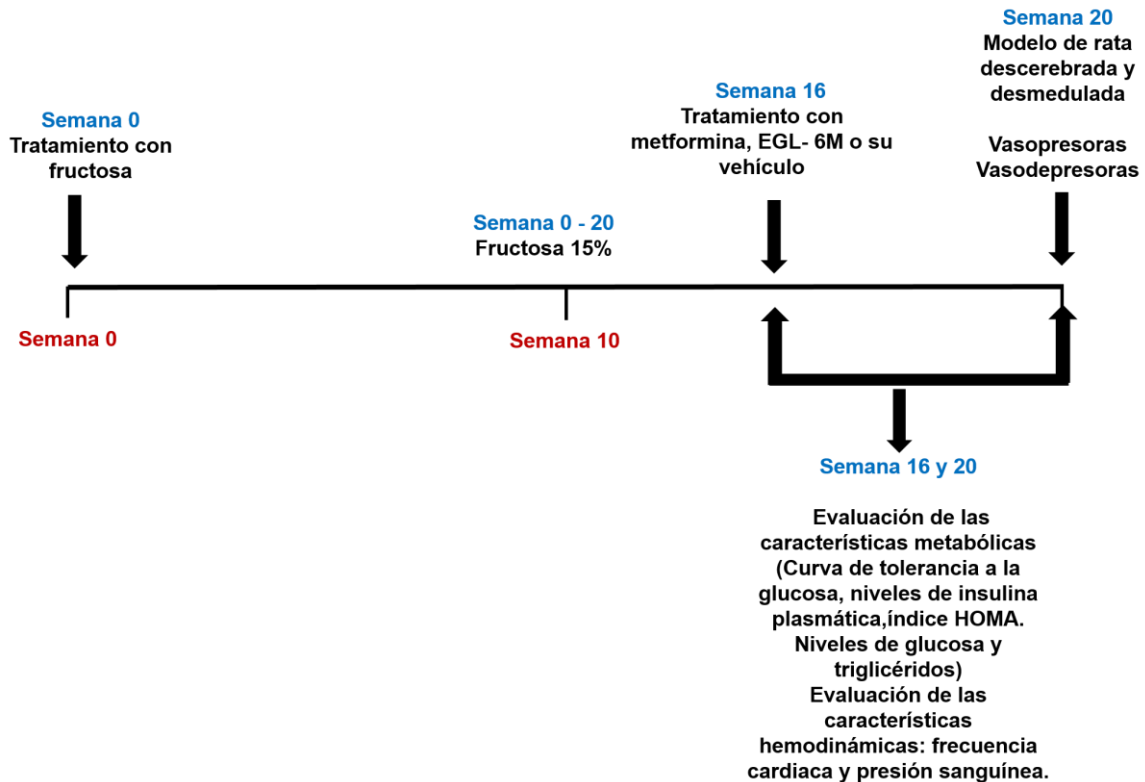


Figura 11. Curso temporal de la fase 1.

6.2.4 Western blot

Con la finalidad de encontrar un posible mecanismo de acción de los fármacos administrados la expresión y activación de algunas proteínas (AMPK, AKT, eNOS) y receptores β adrenérgicos fueron medidas en arterias mesentéricas, aorta y corazón de animales control (n=4). Para tal propósito, a los animales con resistencia a la insulina a los que se les administró (n=12, tratados con fructosa): 1) vehículo de fructosa, grupo control (n=4), 2) metformina (n=4), 3) **EGL-6M** (n=4) o su 4) vehículo (n=4). Se utilizaron arterias mesentéricas y aortas torácicas sin tejido adiposo y con endotelio y corazones limpios de sangre completos.

Para la determinación de las proteínas de interés se utilizaron 50 µg de proteína total (de cada tejido), las cuales se colocaron en un gel desnaturante de SDS-poliacrilamida al 10% para la electroforesis. Al término de ésta se realizó una electrotransferencia a una membrana de PVDF durante 2 horas a 75 volts. La membrana fue bloqueada con leche al 5% y albumina al 1% en PBS-Tween 20 al 0.1%.

La expresión de la proteína total y la proteína fosforilada Akt fue determinada utilizando como control la expresión de β actina. Primero se determinó la proteína Akt fosforilada utilizando el anticuerpo, anti-fosfo Akt (S473) Pan de la marca RyD Systems (Cat. AF887; Minneapolis, Minnesota) en una dilución 1:800. La membrana se dejó incubar con el anticuerpo primario durante 12 horas a 4°C. Posterior a ello la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante a una dilución 1:3000. Una vez que se obtuvieron las imágenes a las membranas se les realizó una separación del anticuerpo fosforilado (stripping) con la finalidad de medir la proteína total utilizando el anticuerpo anti-Akt Pan (Akt1+Akt2+Akt3) de la marca Thermo Fisher Scientific (Cat. MA5-14999; Rockford, IL) a una dilución 1:800 e incubándola durante 2 horas. Ambas proteínas tienen un peso molecular de 60 kDa. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anti-actina (1:5000, Cat. MAB1501R; MerckMillipore, Billerica, MA) durante 1 hora y su anticuerpo secundario: anti-mouse (Cat. 115-035-003; Jackson Immuno Research, West Grove, PA) a una dilución de 1:10000 durante 1 hora. En el caso del corazón primero se determinó la actina y posteriormente las proteínas de interés.

La activación de la enzima AMPK se realizó midiendo primero la AMPK fosforilada utilizando el anti-fosfo-AMPK alfa pThr172 (Cat. PA5-36045; Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL) a una dilución 1:400 y dejándola incubar 12 horas a 4°C. Posteriormente la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario (anti-rabbit) a una dilución 1:3000 durante 3 horas. Después, se realizó un stripping ligero, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario de AMPK total (AMPK alfa 1+2;

Cat. PA5-17831; Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL) a una dilución 1:500 durante 3 horas a temperatura ambiente y posteriormente con su anticuerpo secundario (anti-rabbit) durante 2 horas. Esta proteína tiene un peso molecular de 63 kDa. Posteriormente las membranas se incubaron con anti-actina durante 1 hora y su anticuerpo secundario: anti-mouse a una dilución de 1:10000 durante 1 hora. Para el corazón primero se determinó la actina y posteriormente las proteínas de interés.

Para observar la activación de la eNOS, la eNOS fosforilada fue determinada utilizando el anticuerpo fosfo-eNOS (Ser1177) de la marca Thermo Fisher Scientific (Cat. PA5-17917; Rockford, IL) a una dilución de 1:700 durante toda la noche. Posterior a ello la membrana se incubo con el anticuerpo secundario (anti-rabbit) durante 2 horas. Después de obtener la imagen se realizó un stripping ligero y la membrana fue incubada con el anticuerpo primario de eNOS (Cat. PA3-031A; Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL) a una dilución de 1:800 durante 3 horas y posteriormente fue incubada con el anticuerpo secundario (anti-rabbit) durante 2 horas. Esta proteína tiene un peso molecular de 140 kDa. En las arterias tanto mesentéricas como en aorta se observa una solo banda. Sin embargo, en el corazón se observaron 2 bandas una en 140 kDa y otra en 70 kDa perteneciente al monómero de la proteína. Para el corazón primero se determinó la actina y posteriormente las proteínas de interés.

La expresión de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos fue determinada utilizando el anticuerpo específico para esta proteína (Cat. PA5-27083; Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL) a una dilución de 1:500 y dejándola incubar durante 24 horas, posteriormente la membrana fue incubada durante 3 horas con el anticuerpo secundario (anti-rabbit). Esta proteína se localiza a 55 kDa. Nuevamente para el corazón se incubo primero con actina y posteriormente con el anticuerpo $\beta 2$ adrenérgico.

Finalmente, la expresión de los receptores $\beta 1$ adrenérgicos solo se realizó en corazón. Para ello, las membranas fueron incubadas con anti-actina y posteriormente con el anticuerpo $\beta 1$ adrenérgico (Cat. PA1-049; Invitrogen™,

Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL) a una dilución de 1:500 durante 3 horas y posteriormente con el anticuerpo secundario (anti-rabbit) durante 2 horas.

6.3 Tratamiento farmacológico con estradiol

Para esta fase del proyecto se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar (n=96) con un rango de peso de 200-250 g iniciales. Estas fueron alojadas bajo las condiciones antes descritas y separadas en los grupos control y fructosa.

6.3.1 Ovariectomía bilateral

Después de 16 semanas de tratamiento con fructosa o vehículos, los animales fueron sometidos a una ovariectomía o una falsa cirugía. Para ello los animales fueron anestesiados con ketamina (70 mg/kg, i.m.) y xilazina (5 mg/kg, i.m.). Después de la anestesia, el abdomen medio inferior fue rasurado, limpiado y desinfectado con benzal; posteriormente se realizó una pequeña incisión en piel (aproximadamente 1 cm) y en músculo (cercano a 0.5 cm). Los oviductos fueron ligados con catgut crómico 3-0 y posteriormente se hizo un corte por debajo de la ligadura; después de la extirpación de los dos ovarios, el músculo fue suturado con catgut crómico y la piel con hilo de seda de 2-0. El sitio de cirugía limpiada con solución salina, benzal y además, se aplicó un insecticida y acaricida de uso tópico que ayudó a una rápida cicatrización. Después se les administró fluvicina® 1 ml/kg, i.m. que contiene los antibióticos penicilina G procainica (80,000 IU/kg) y dihidroestreptomicina (2.5 mg/kg) y el agente anti-inflamatorio flumetasona (12.5 µg/kg). Se les dio una semana de recuperación a los animales.

6.3.2 Protocolo experimental del tratamiento con 17β-estradiol

Para esta fase del proyecto se utilizaron ratas hembras de la cepa wistar (n=96) las cuales fueron divididas en dos grupos control (n=48) y fructosa (n=48). Después de 16 semanas de tratamiento, la mitad de los animales de cada grupo fueron sometidos a una ovariectomía, mientras que la segunda mitad fueron sometidos a una falsa cirugía. Dos semanas después de los procedimientos, los subgrupos fueron divididos de acuerdo con el tratamiento que recibirían vehículo; es decir,

DESARROLLO EXPERIMENTAL

aceite de maíz, (0.5 mL/kg por vía subcutánea, diariamente 35 días) o estradiol (10 µg/kg por vía subcutánea, diariamente 35 días) (figura 12).

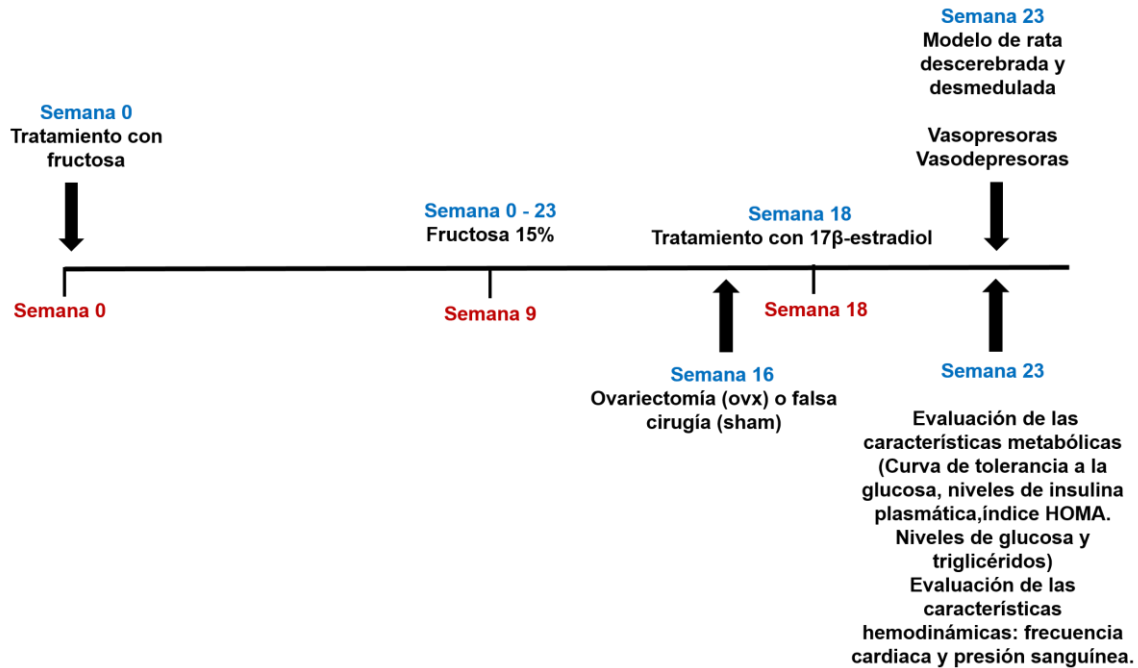


Figura 12. Curso temporal del tratamiento con estradiol.

Después de 35 días de tratamiento cada subgrupo se dividió en dos. La primera mitad fue utilizada para medir las respuestas vasopresoras; mientras que la segunda mitad fue utilizada para realizar el protocolo de las respuestas vasodepresoras.

Los animales fueron anestesiados con isoflorano y posteriormente fueron descerebrados y desmedulados para la determinaron respuestas vasopresoras (figura 13). Para este propósito se administró:

- 1) Estimulación simpática en la región torácica T₇-T₉ (0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 Hz);
- 2) Noradrenalina, un ligando endógeno de los receptores α adrenérgicos (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 µg/kg);
- 3) Metoxamina, un agonista de los receptores adrenérgicos α_1 (1, 3, 10, 30 y 100 µg/kg).

4) UK 14,304, un agonista de los receptores α_2 adrenérgicos (0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

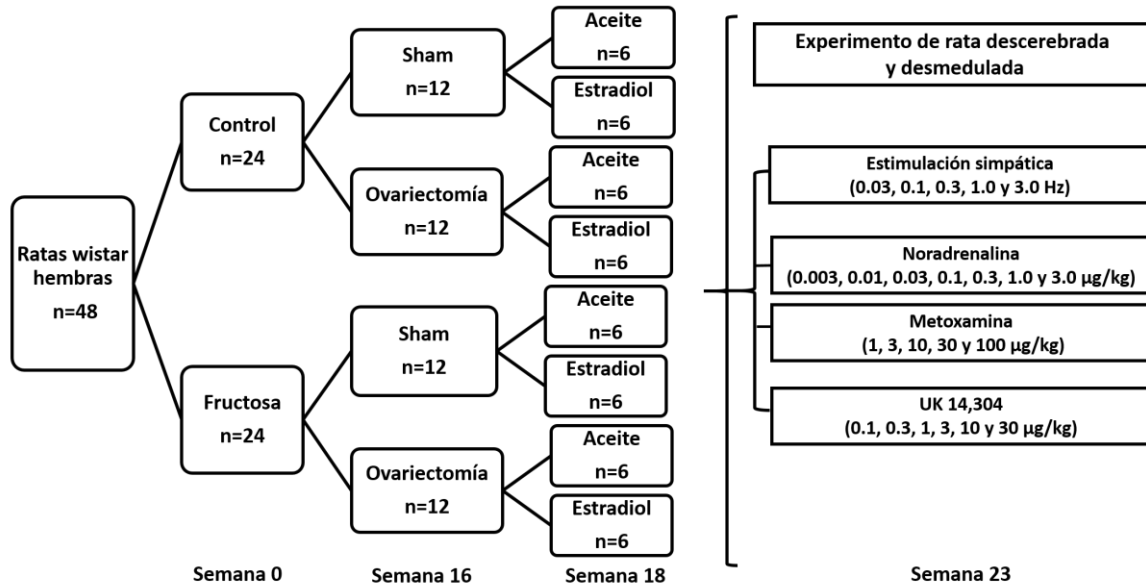


Figura 13. Protocolo general para la medición de las respuestas vasopresoras del tratamiento con estradiol (10 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{día}$, 35 días).

En la segunda mitad de los animales las respuestas vasodepresoras fueron determinadas. Para este propósito se administró una infusión de metoxamina (20 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$) y posteriormente se determinaron las respuestas vasodepresoras (figura 14) inducidas por:

- 1) Una administración secuencial de acetilcolina, agonista muscarínico (0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$);
- 2) Una administración secuencial de nitroprusiato de sodio, donador de óxido nítrico (1.8, 3.1, 5.6, 10 y 18 $\mu\text{g}/\text{kg}$);
- 3) Una administración secuencial de isoprenalina, agonista β adrenérgico (0.056, 0.1, 0.18, 0.31, 0.56, y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$); en la figura 14 se representa el protocolo experimental.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

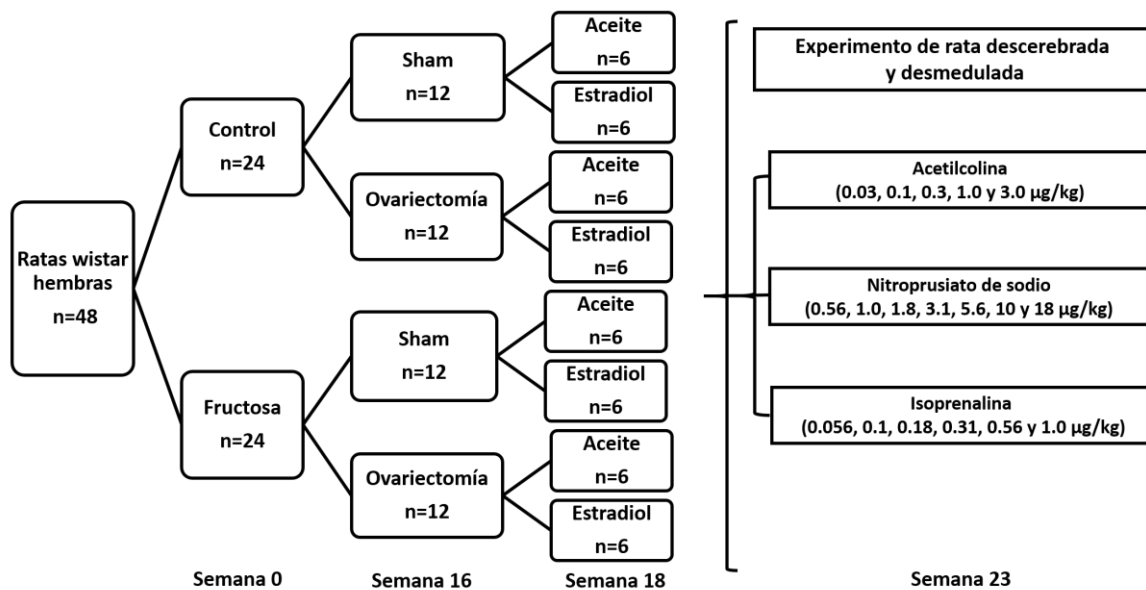


Figura 14. Protocolo general para la medición de las respuestas vasopresoras del tratamiento con estradiol (10 µg/kg·día, 35 días).

6.3.3 Perfil metabólico y hemodinámico

Después del tratamiento con estradiol (10 µg/kg por día durante 28 días, p.o.) o su vehículo (aceite de maíz; 0.5 ml/kg por día durante 28 días, s.c.) se realizaron determinaciones de los niveles de triglicéridos y glucosa sanguínea e insulina plasmática. Con ello se calcularon los índices HOMA de los animales. Además, los siguientes valores hemodinámicos fueron determinados por el método del pletismográfico: presión arterial diastólica (PAD), sistólica (PAS), media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC). Así mismo se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa en donde se evaluaron los niveles de glucosa sanguínea e insulina plasmática. Ver figura 15.

6.3.4 Western blot

Para la determinación de la activación de las proteínas Akt y eNOS se utilizaron ratas control (sin resistencia a la insulina) y tratadas con fructosa (resistentes a la insulina) a las cuales a la semana 16 se les realizó la remoción de los ovarios. En

la semana 18 se inició el tratamiento con estradiol o su vehículo teniendo así 4 grupos experimentales: 1) control+vehículo, 2) control+estradiol, 3) fructosa+vehículo y 4) fructosa+ estradiol).

Al final del tratamiento crónico se procedió a sacrificar a los animales y a disectar las arterias mesentéricas, aortas del segmento toraco-lumbar con endotelio y corazones. Las cuales fueron homogenizadas y guardadas a 70 °C hasta su utilización.

Para la determinación de las proteínas de interés se utilizaron 50 µg de proteína total (de cada tejido). Las cuales se colocaron en un gel desnaturante de SDS-poliacrilamida al 10% para la electroforesis. Al término de ésta, se realizó una electrotransferencia a una membrana de PVDF durante 2 horas a 75 volts. La membrana fue bloqueada con leche al 5% y albumina al 1% en PBS-Tween 20 al 0.1%.

La activación de la enzima Akt, fue medida a través de la expresión de la proteína total y fosforilada utilizando como control la expresión de β actina. Así, la determinación de Akt fosforilada fue realizada utilizando el anticuerpo, anti-fosfo Akt (S473) Pan de la marca RyD Systems (Cat. AF887; Minneapolis, Minnesota) en una dilución 1:800. La membrana fue incubada con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. 12 horas después, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante a una dilución 1:3000. Una vez que se obtuvieron las imágenes, las membranas fueron sometidas a una separación del anticuerpo fosforilado (stripping) con la finalidad de medir la proteína total utilizando el anticuerpo anti-Akt Pan (Akt1+Akt2+Akt3) de la marca Thermo Fisher Scientific (Cat. MA5-14999; Rockford, IL) a una dilución 1:800 e incubándola durante 2 horas. Ambas proteínas tienen un peso molecular de 60 kDa. Posteriormente las membranas fueron incubadas con anti-actina (1:5000, Cat. MAB1501R; MerckMillipore, Billerica, MA) durante 1 hora y su anticuerpo

secundario: anti-mouse (Cat. 115-035-003; Jackson Inmuno Research, Wesr Grove, PA) a una dilución de 1:10000 durante 1 hora.

La activación de la eNOS fue medida a través de la expresión de la eNOS fosforilada utilizando el anticuerpo fosfo-eNOS (Ser1177) de la marca Thermo Fisher Scientific (Cat. PA5-17917; Rockford, IL) a una dilución de 1:700 durante 12 horas a 4°C. Posterior a ello se incubo con el anticuerpo secundario (anti-rabbit) durante 2 horas. Después de obtener la imagen, la membrana fue sometida a un stripping ligero y fue incubada con el anticuerpo primario de eNOS (Cat. PA3-031A; Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL) a una dilución de 1:800 durante 3 horas y posteriormente fue incubada con el anticuerpo secundario (anti-rabbit) durante 2 horas. Esta proteína tiene un peso molecular de 140 kDa. En las arterias tanto mesentéricas como en aorta se observó una solo banda. Sin embargo, en el corazón se observaron 2 bandas una en 140 kDa y otra en 70 kDa perteneciente al monómero de la proteína.

6.4 Análisis estadístico

Para determinar el efecto del tratamiento con fructosa o del vehículo sobre el peso corporal, niveles de glucemia, niveles de triglicéridos en sangre, presión arterial, y niveles de insulina, los datos fueron sometidos a un análisis estadístico en el que se determinó la media \pm error estándar de la media (e.e.m) de los valores obtenidos de ambos grupos. Posteriormente se realizó análisis de varianza (anova) de una vía para comparar el grupo experimental (fructosa) con el grupo control (vehículo de fructosa), utilizando una prueba de post-hoc de Tukey, considerando un nivel de significancia de $P < 0.05$. Estos mismos análisis se realizaron al final del tratamiento con los compuestos a evaluar: metformina, el análogo de metformina y 17β -estradiol comparados con sus respectivos vehículos.

Para determinar el efecto de los tratamientos (metformina, análogo de metformina y 17β -estradiol) sobre las respuestas vasodepresoras (inducidas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina), los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico obteniendo la media \pm e.e.m. de los decrementos máximos

de la presión arterial diastólica. Después de esto se realizó una anova de dos vías y una prueba post-hoc de Tukey, considerando un nivel de significancia estadística de $P < 0.05$.

Para determinar el efecto de los tratamientos (metformina, análogo de metformina y 17β -estradiol) sobre las respuestas vasopresoras (inducidas por estimulación eléctrica, noradrenalina, metoxamina y UK 14,304) los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico obteniendo la media \pm e.e.m. de los aumentos máximos de la presión arterial diastólica. Se aplicó un anova de dos vías y una prueba de post-hoc de Tukey, considerando un nivel de significancia de $P < 0.05$.

Finalmente, para determinar las diferencias en la expresión y activación de las proteínas evaluadas por western blot se obtuvieron las medias \pm e.e.m. y fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía y una prueba pos-hoc de Dunnett considerando una significancia estadística de $P < 0.05$.

CAPITULO 7. RESULTADOS

7.1 FASE 1. Tratamiento farmacológico con metformina o el análogo EGL-6M

7.1.1 Parámetros bioquímicos

La tabla 4 muestra el efecto del tratamiento de una solución de fructosa al 15% después de 16 semanas sobre los niveles de glucosa sanguínea, insulina plasmática, índice HOMA, triglicéridos sanguíneos, peso corporal, comparados versus el grupo control que únicamente recibieron agua de la llave.

De manera interesante, el tratamiento con fructosa: 1) disminuyó los niveles de glucosa sanguínea; y 2) aumentó los niveles plasmáticos de insulina, HOMA-IR, triglicéridos sanguíneos y peso corporal de manera significativa, comparadas contra el control.

Tabla 4. Parámetros bioquímicos después del tratamiento con fructosa.

Semana 16					
Grupo	Glucosa (mmol/L)	Insulina (µUI/mL)	HOMA-IR	Triglicéridos (mg/dL)	Peso corporal (Kg)
Control (n=9)	5.52 ± 0.15	7.59 ± 0.89	1.77 ± 0.23	142 ± 7	0.46 ± 0.01
Fructosa (n=15)	4.79 ± 0.12*	17.27 ± 2.66*	5.25 ± 1.6*	177 ± 6*	0.54 ± 0.02*

* P<0.05 vs. Control cada valor representa la media ± error estándar de la media 9 o animales

Por otra parte, la tabla 5 muestra el efecto del tratamiento farmacológico durante 4 semanas con vehículo (1 ml/kg·día), metformina (50 mg/kg·día) o **EGL-6M** (50 mg/kg·día) sobre la glucosa sanguínea y peso corporal en los grupos control o tratados con fructosa al 15%. Es importante señalar que en animales control, la metformina o el **EGL-6M** no modificaron significativamente las variables medidas, al compararse control el vehículo.

De manera notable, en animales tratados con fructosa, el tratamiento con metformina o **EGL-6M** disminuyeron significativamente los niveles plasmáticos de insulina y el índice HOMA, cuando se compararon contra el vehículo.

RESULTADOS

Tabla 5. Parámetros bioquímicos posteriores a los tratamientos farmacológicos

		Tratamiento farmacológico				
	Grupo	Glucosa (mmol/L)	Insulina (μUI/mL)	HOMA-IR	Triglicéridos (mg/dL)	Peso corporal (Kg)
Control (n=18)	Vehículo	5.09 ± 0.31	6.81 ± 1.41	1.63 ± 0.71	145 ± 5	0.48 ± 0.02
	Metformina	5.26 ± 0.19	7.43 ± 1.00	1.64 ± 0.32	136 ± 4	0.47 ± 0.02
	EGL-6M	5.76 ± 0.21	7.43 ± 1.52	1.94 ± 0.45	131 ± 12	0.45 ± 0.02
Fructosa (n=18)	Vehículo	5.52 ± 0.31	34.64 ± 4.13	8.21 ± 1.00	143 ± 15	0.55 ± 0.02
	Metformina	4.53 ± 0.92	4.53 ± 0.92 ^a	0.95 ± 0.16 ^a	164 ± 13	0.57 ± 0.05
	EGL-6M	5.00 ± 0.21	16.93 ± 3.07 ^a	3.81 ± 1.06 ^a	176 ± 15	0.56 ± 0.04

^a P<0.05 vs. Fructosa-vehículo. Cada valor representa a media ± error estándar de la media de 6 animales

7.1.2 Valores hemodinámicos

La tabla 6 muestra los valores de FC, PAS, PAD y PAM en animales control o en aquellos que recibieron fructosa al 15% durante 16 semanas. Así, el tratamiento con fructosa durante 16 semanas incrementó de manera significativa la PAS, PAD y PAM sin modificar significativamente a la FC. Cabe resaltar que los valores normales de FC de una rata adulta se encuentran entre 250-450 latidos/min.

Tabla 6. Valores de presión arterial obtenidos por el método pletismográfico al final de las 16 semanas de tratamiento con fructosa al 15 %.

Semana 16				
Grupo	FC (lat/min)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
Control (n=6)	418 ± 10	113 ± 2	86 ± 3	95 ± 2
Fructosa (n=6)	431 ± 8	134 ± 3*	109 ± 2*	117 ± 2*

* P<0.05 vs. Control. Cada valor representa la media ± error estándar de la media de los 6 animales.

La tabla 7 muestra el efecto del tratamiento crónico de vehículo (1 ml/kg-día), metformina (50 mg/kg-min) o **EGL-6M** (50 mg/kg-min) sobre algunas variables hemodinámicas obtenidas con el método pletismográfico.

RESULTADOS

En animales control, el tratamiento con metformina o el **EGL-6M** incrementó ligeramente la FC, PAS, PAD, PAM. Sin embargo, es importante enfatizar que dichos valores se encuentran dentro del rango normal de una rata adulta.

En animales tratados con fructosa, la metformina no modificó dichas variables hemodinámicas. Sin embargo, el **EGL-6M** incrementó de manera significativa la PAS, comparado contra el vehículo.

Tabla 7. Valores de presión arterial obtenidos por el método pletismográfico después del tratamiento farmacológico con vehículo (1 ml/kg·día), metformina (50 mg/kg·min) o **EGL-6M** (50 mg/kg·min).

Semana 20					
	Grupo	F.C. (lat/min)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
Control	Vehículo	438 ± 10	108 ± 3	74 ± 3	83 ± 3
	Metformina	447 ± 10	116 ± 2 ^a	90 ± 3 ^a	97 ± 2 ^a
	EGL-6M	401 ± 13 ^a	124 ± 5 ^a	84 ± 4 ^a	97 ± 4 ^a
Fructosa	Vehículo	382 ± 12	130 ± 7	108 ± 5	115 ± 6
	Metformina	394 ± 22	145 ± 9	118 ± 6	127 ± 7
	EGL-6M	405 ± 14	147 ± 5 ^b	121 ± 5	129 ± 5

^a P<0.05 vs control-vehículo, ^b P<0.05 vs Fructosa-vehículo. Cada valor representa la media ± error estándar de la media de los 6 animales. PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; PAM, presión arterial media; F.C. frecuencia cardiaca.

7.1.3 Curva de tolerancia a la glucosa

La figura 14 ilustra el área bajo la curva (ABC) del curso temporal de los niveles de glucosa sanguínea e insulina plasmática durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa en: 1) animales control o tratados con fructosa después de 16 semanas (panel superior) y 2) animales tratados con vehículo, metformina o **EGL-6M** durante 4 semanas, diariamente (panel inferior).

Así, el tratamiento durante 16 semanas con fructosa no modificó significativamente la curva de glucosa (figura 15A). En contraste, el tratamiento con fructosa incrementó significativamente la curva de insulina plasmática, sugiriendo hiperinsulinemia (figura 15B). Por otra parte, en animales control, el tratamiento

RESULTADOS

crónico con metformina, **EGL-6M** o su vehículo por 4 semanas, no modificó la curva de glucosa (figura 15C) o la curva de niveles plasmáticos de insulina (figura 15D) durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa.

En marcado contraste, en animales tratados con fructosa, la metformina o el **EGL-6M** disminuyó ligera pero significativamente la curva de los niveles de glucosa sanguínea (figura 15C) durante la prueba oral de tolerancia a la glucosa. Así mismo, la metformina disminuyó significativamente la curva de insulina plasmática (figura 15D). Por último, el **EGL-6M** disminuyó la curva de insulina plasmática aunque este decremento no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa.

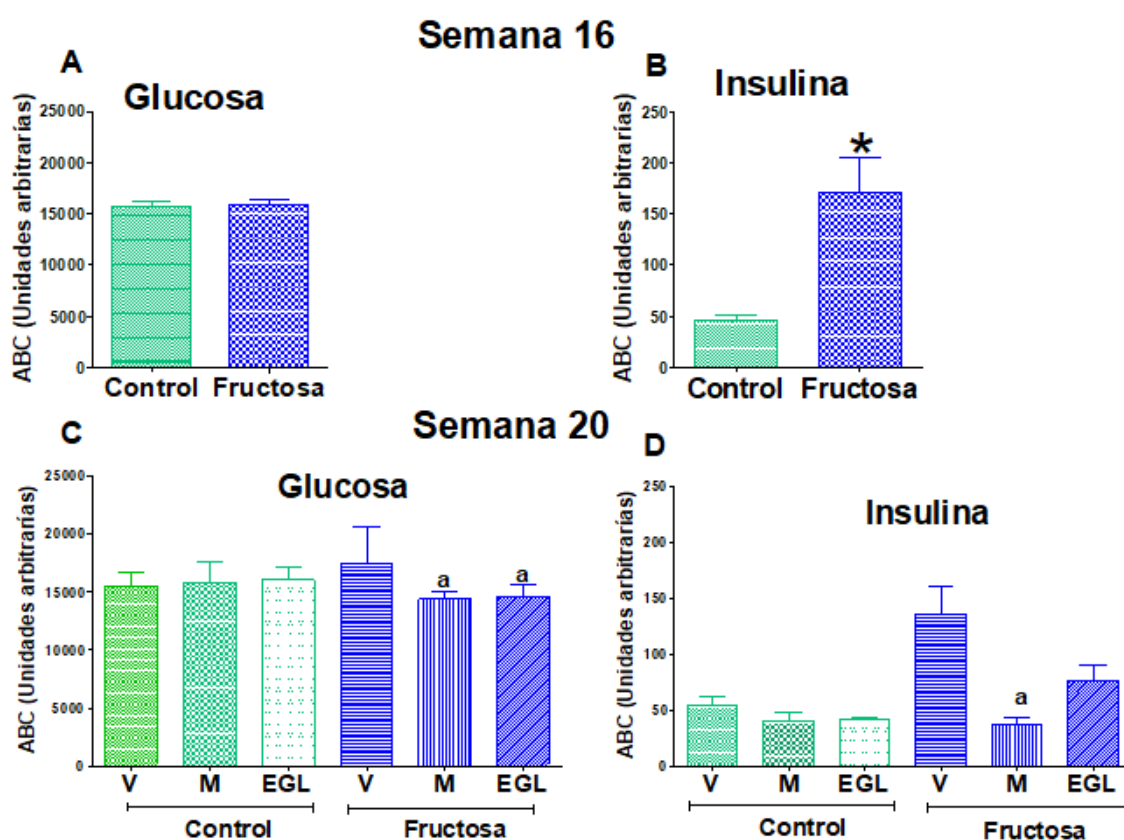


Figura 15. Área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales de glucosa e insulina obtenidos durante la curva de tolerancia a la glucosa a la semana 16 (antes de los diferentes tratamientos) y a la semana 20 (después de 4 semanas de administración de los diferentes tratamientos). * $P < 0.05$ vs control, ^a $P < 0.05$ vs Fructosa-vehículo. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

7.1.4 Respuestas cardiovasculares

7.1.4.1 Efecto de la resistencia a la insulina sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación del sistema simpático.

La figura 16 muestra las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina (agonista α y β adrenérgico), metoxamina (agonista α_1) y UK 14,304 (agonista α_2) en el grupo control y el grupo tratado con fructosa (con resistencia a la insulina). La estimulación simpática o los bolos i.v. de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 produjeron incrementos de la presión arterial diastólica de manera dependiente de la frecuencia de estimulación o de la dosis. Así, las respuestas inducidas por la estimulación simpática no fueron modificadas por la fructosa, excepto a la frecuencia de 3 Hz. Efectivamente, dicha respuesta fue significativamente disminuida en animales tratados con fructosa (figura 16A). En contraste las respuestas vasodepresoras inducidas por la administración de noradrenalina (figura 16B) fueron mayores en el grupo tratado con fructosa. Por ultimo las repuestas vasopresoras inducidas por metoxamina o UK 14,304 no fueron modificadas por el tratamiento con fructosa (figuras 16C y 16D).

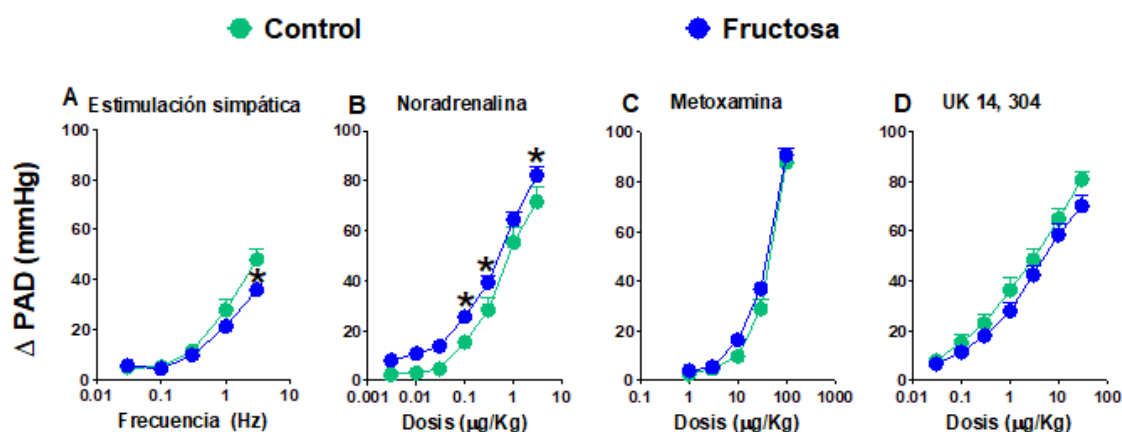


Figura 16. Efecto del tratamiento crónico (16 semanas) con fructosa al 15% sobre las respuestas vasopresoras generadas por la estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 en animales control y fructosa (resistentes a la insulina), * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

7.1.4.2 Efecto de la administración crónica de metformina o el análogo de metformina sobre las respuestas vasopresoras en animales control

En la figura 17 se pueden observar las respuestas generadas en los grupos control después de los tratamientos con el vehículo, metformina o el análogo. La metformina no modificó las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o por bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina o UK 14,304. Sin embargo, el análogo (**EGL-6M**) incrementó significativamente las respuestas generadas por la estimulación simpática sobre todo a las frecuencias de estimulación de 0.3 a 3 Hz. En contraste las respuestas generadas por UK 14,304, un agonista selectivo a los receptores α_2 adrenérgicos, fueron disminuidos por el tratamiento con **EGL-6M**. Por último, el **EGL-6M** no modificó significativamente las respuestas generadas por noradrenalina o metoxamina.

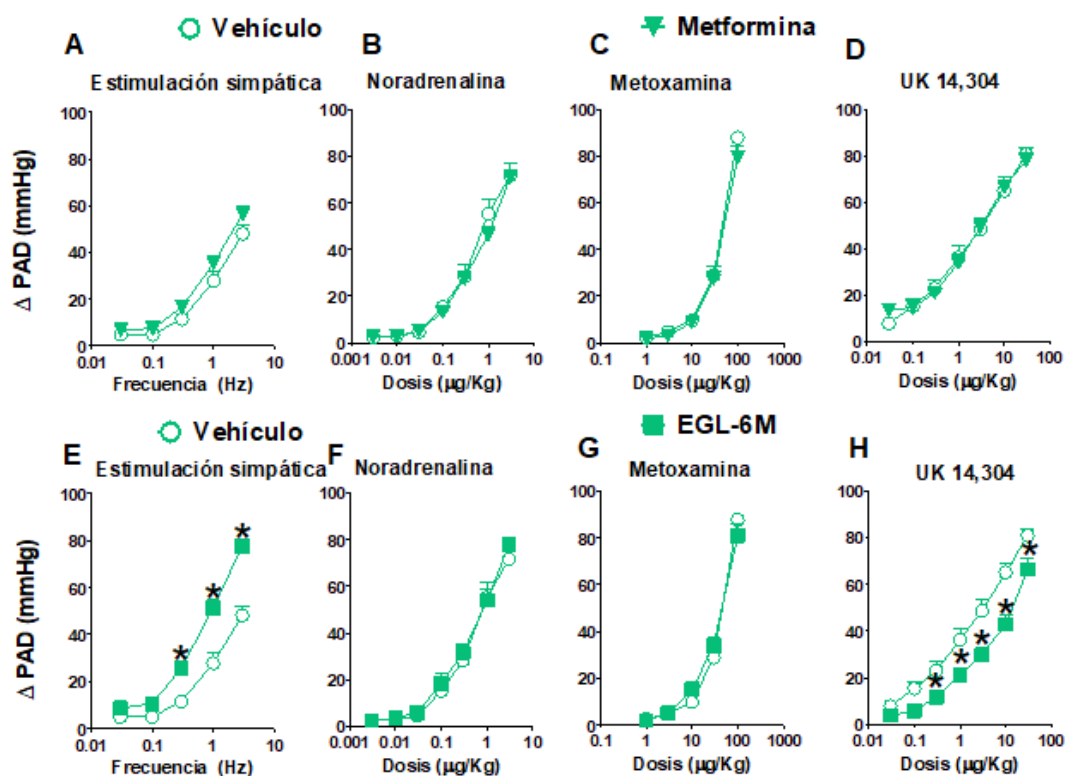


Figura 17. Efecto de la administración crónica de metformina o **EGL-6M** sobre las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304, en los grupos control, * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

7.1.4.3 Efecto de la administración crónica metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasopresoras en animales con resistencia a la insulina

En la figura 18 se puede observar el efecto de la metformina o **EGL-6M** sobre las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 en los animales tratados con fructosa. De manera interesante, la metformina disminuyó las respuestas generadas por noradrenalina, así como en la última dosis de metoxamina (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En contraste, la metformina no modificó las respuestas generadas por la estimulación simpática y por UK 14,304. En el grupo tratado con **EGL-6M** no se observaron diferencias estadísticamente significativas en las respuestas generadas por noradrenalina y UK 14,304. Sin embargo, el **EGL-6M** incrementó las respuestas generadas por la estimulación simpática a las a frecuencias de estimulación altas (1 y 3Hz).

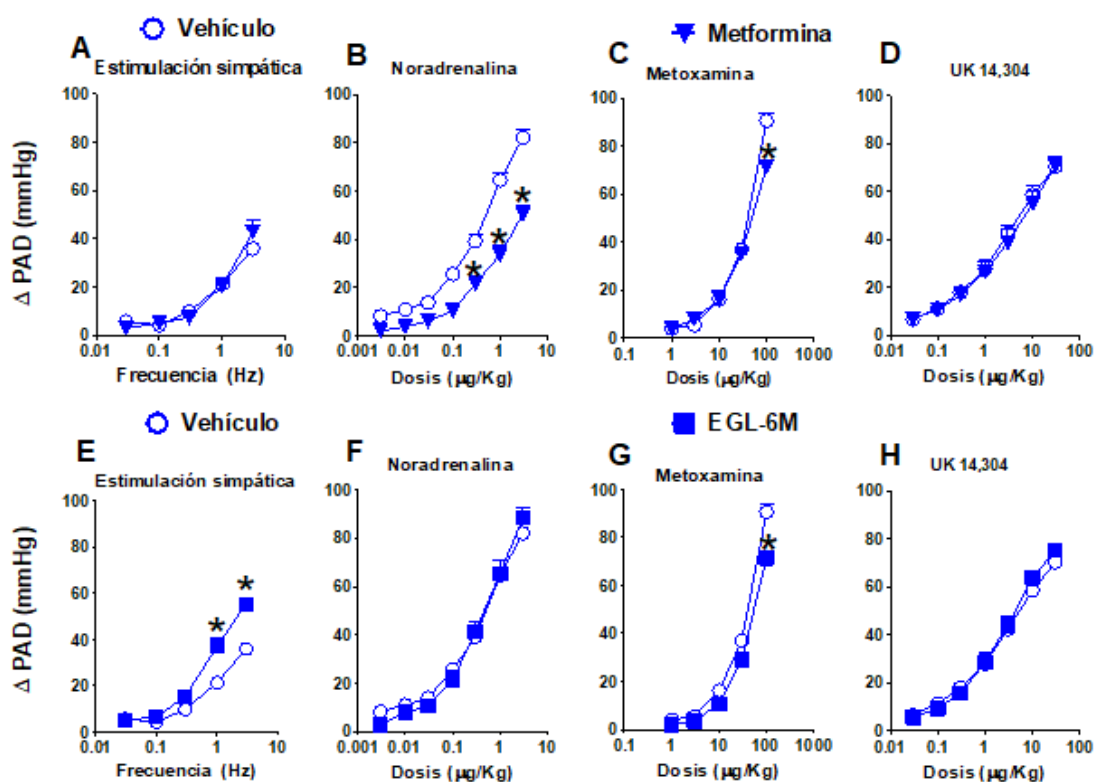


Figura 18. Respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304, en los grupos tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

En la figura 19 se ilustra el área bajo la curva de las respuestas vasopresoras generadas por la estimulación simpática o por bolos intravenosos de los agonistas noradrenalina, metoxamina y UK 14,304. Así se puede observar que el área bajo la curva generados por las respuestas simpáticas en los grupos tratados con **EGL-6M** fueron significativamente mayores comparadas con los grupos tratados con vehículo o con metformina en animales control o tratados con fructosa (figura 19A y 19E). Así mismo, se puede observar una disminución estadísticamente significativa sobre las respuestas generadas por metoxamina en animales resistentes a la insulina posterior a la administración de metformina y su análogo (figura 19G).

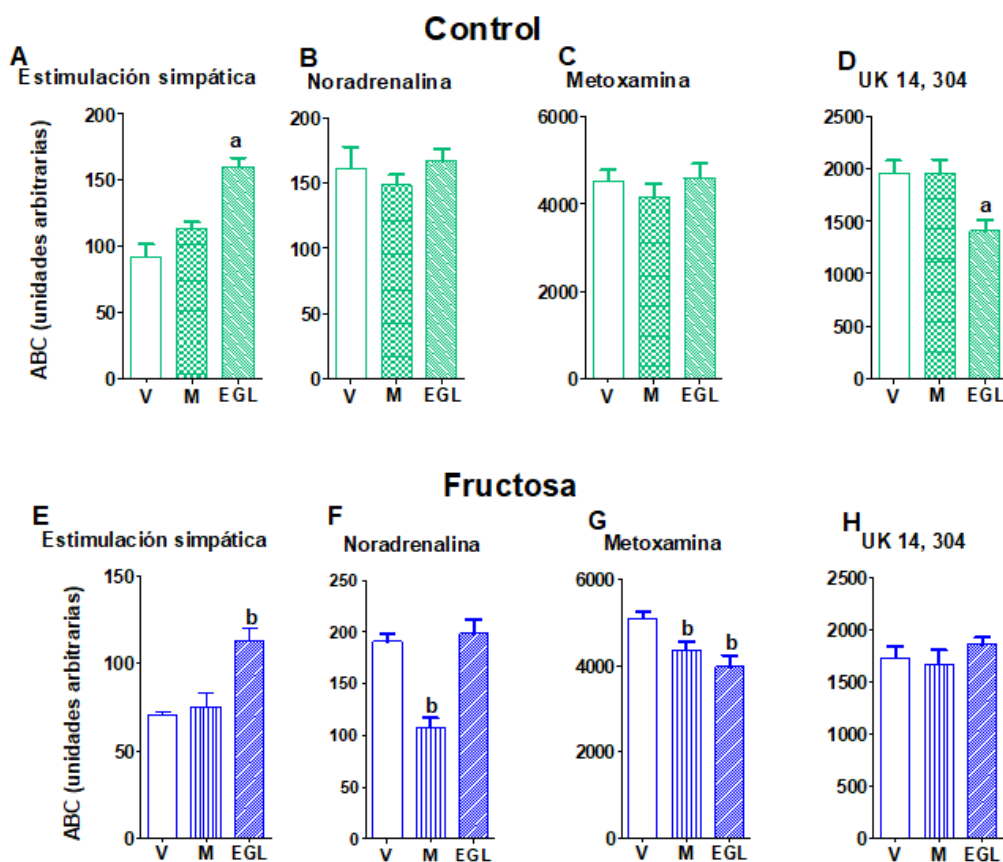


Figura 19. Áreas bajo la curva de las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o bolos intravenosos de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 en animales control o tratados con fructosa y tratados crónicamente con vehículo, metformina o **EGL-6M**. ^aP<0.05 vs control-vehículo, ^bP<0.05 vs fructosa-vehículo. Cada barra representa la media ± error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

7.1.4.4 Efecto de la administración de fructosa o su vehículo sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por acetilcolina, isoprenalina y nitroprusiato de sodio

En la figura 20 se muestran las respuestas vasodepresoras generadas por la acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina de los grupos control y fructosa. Así, la administración de bolos i.v. de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina disminuyeron de manera significativa y dependiente de la dosis la presión arterial diastólica. Además, el tratamiento crónico con fructosa al 15% incrementó de manera significativa las respuestas vasodepresoras a la acetilcolina comparado con el grupo control. En contraste, las respuestas generadas por isoprenalina fueron disminuidas por la fructosa. Además, las respuestas vasodepresoras a nitroprusiato de sodio no fueron modificadas significativamente.

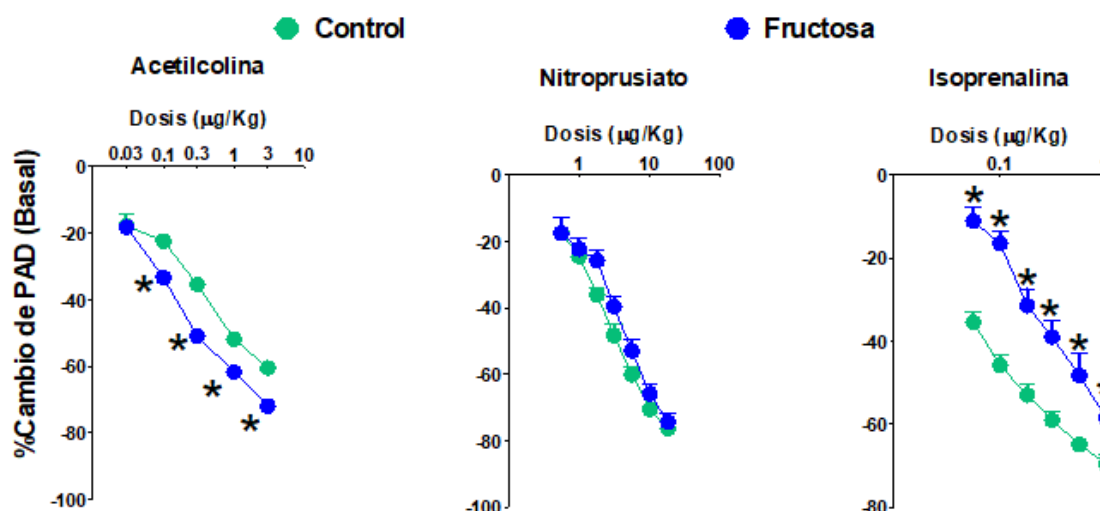


Figura 20. Efecto del tratamiento crónico con fructosa 15 % por 16 semanas sobre las respuestas vasodepresoras generadas por bolos intravenosos de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en los grupos control y fructosa. * P<0.05 vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

7.1.4.5 Efecto de la administración crónica de metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasodepresoras en animales control

Las respuestas vasodepresoras obtenidas de la administración de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina sobre los grupos control que fueron tratados

RESULTADOS

con vehículo, metformina o **EGL-6M** se ilustran en la figura 21. En esta figura se observó que la administración con metformina disminuyó las respuestas vasodepresoras a acetilcolina e isoprenalina, específicamente a la dosis de 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acetilcolina y 0.056-0.18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de isoprenalina. En contraste, el **EGL-6M** no modificó significativamente las respuestas a acetilcolina, isoprenalina o nitroprusiato de sodio.

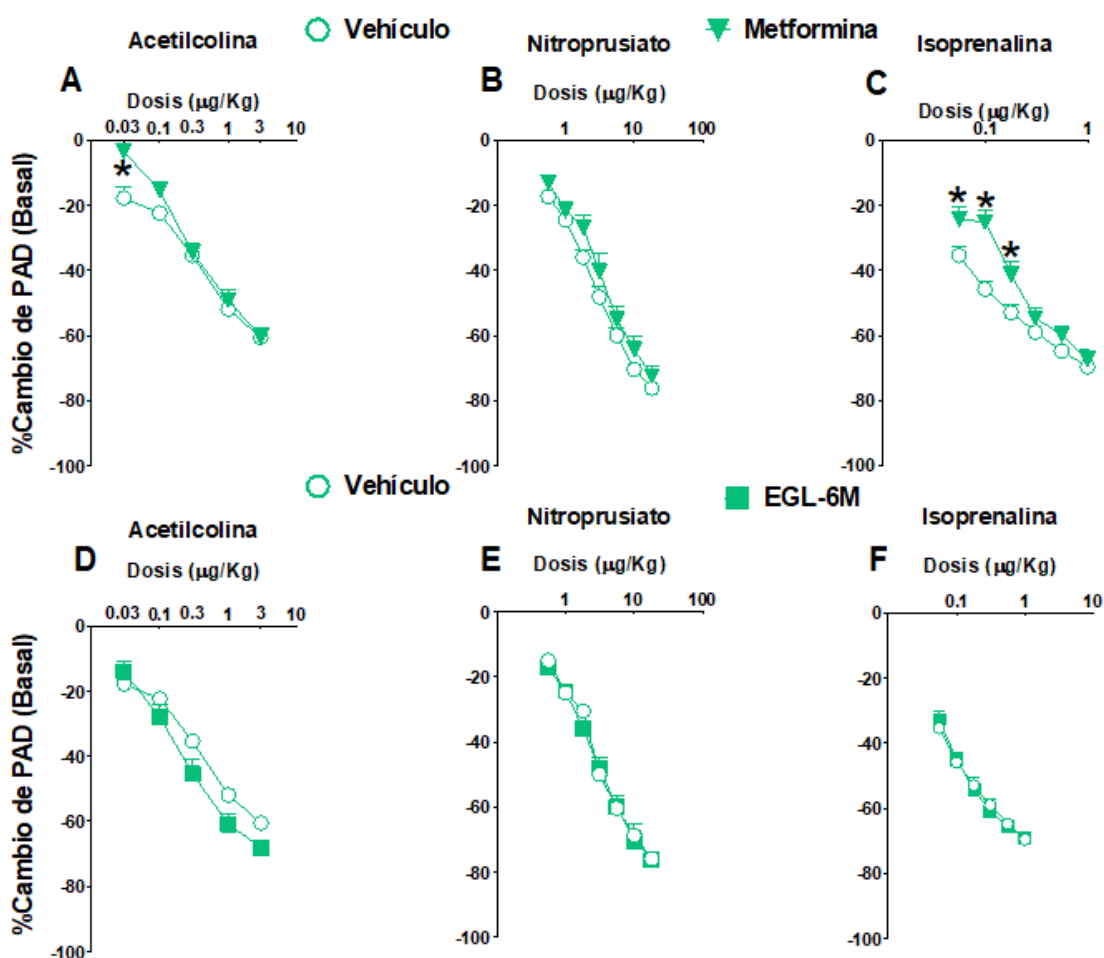


Figura 21. Efecto de la administración crónica de metformina o **EGL-6M** sobre las respuestas vasodepresoras generadas por bolos intravenosos de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en el grupo control. * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

7.1.4.6 Efecto de la administración crónica de metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasodepresoras en animales con resistencia a la insulina

En la figura 22 se muestra el efecto de la metformina o el **EGL-6M** sobre las respuestas vasodepresoras de acetilcolina, nitroprusiato de sodio o isoprenalina en animales tratados con fructosa. Como se puede observar la metformina disminuyó las respuestas vasodepresoras a la acetilcolina comparado con el grupo tratado con el vehículo. Además, la metformina incrementó significativamente las respuestas a isoprenalina. Por otro lado, el tratamiento con el **EGL-6M** no modificó las respuestas a acetilcolina ni a nitroprusiato de sodio, mientras que las respuestas a isoprenalina fueron exacerbadas por el tratamiento con **EGL-6M**.

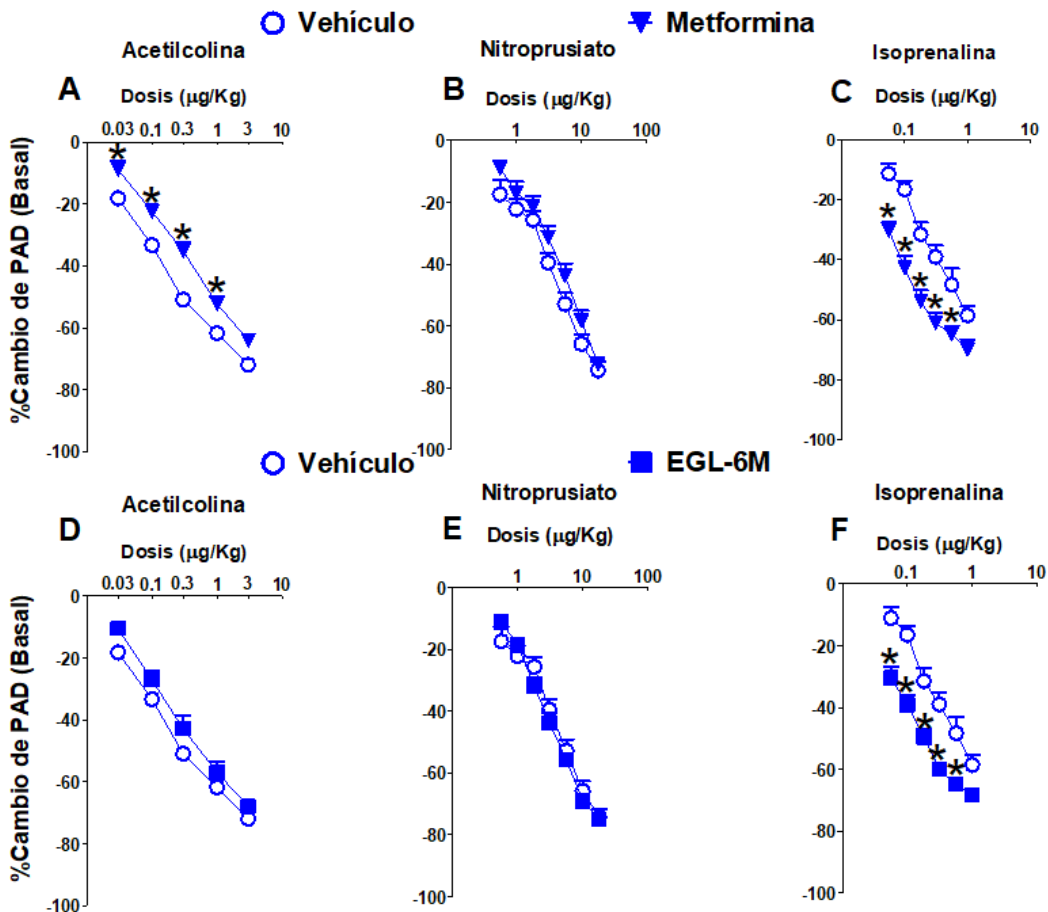


Figura 22. Efecto del tratamiento crónico con metformina, **EGL-6M** o su vehículo sobre las respuestas vasodepresoras generadas por bolos intravenosos de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en los grupos tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

7.1.5 Expresión de los receptores β adrenérgicos y activación de proteínas AMPK, Akt, eNOS

7.1.5.1 Expresión del receptor β_2 adrenérgico y activación de proteínas AMPK, Akt y eNOS en arterias mesentéricas

La figura 23 ilustra la expresión de los receptores β_2 -adrenérgicos y la activación de las enzimas AMPK, AKT, y eNOS en animales con resistencia a la insulina inducida por fructosa y el efecto del tratamiento crónico con: 1) vehículo, 2) metformina y 3) **EGL-6M**.

En la figura 23A se muestra que la resistencia a la insulina incrementó la expresión de los receptores β_2 -adrenérgicos, cuando es comparado con el grupo control. Además, los tratamientos con metformina y **EGL-6M** redujeron dicho incremento de la expresión β_2 , regresando a los niveles de expresión observados en el grupo control ($P > 0.05$).

Por otra parte, en la figura 23B se observa que la resistencia a la insulina inducida por fructosa disminuye la activación de la enzima AMPK (AMPK-p (Thr172)/AMPK total) comparada con el grupo control (control vs fructosa+vehículo). De manera interesante, la administración crónica de metformina y **EGL-6M** incrementó la activación de la enzima AMPK en animales con resistencia a la insulina, cuando se comparó contra el grupo que recibió el vehículo.

La figura 23C ilustra que la resistencia a la insulina inducida por fructosa no modificó la activación de la enzima AKT (AKT-p (Ser473)/AKT total), cuando se comparó contra el grupo control (control vs fructosa+vehículo). Además, en animales con resistencia a la insulina el tratamiento con metformina, pero no con **EGL-6M**, incrementó la activación de AKT, comparado con el grupo tratado con el vehículo.

Por último, en la figura 23D se ilustra la activación de la enzima eNOS (eNOS-p (Ser 1177)/eNOS total) en donde se observa que la resistencia a la insulina inducida por fructosa disminuye la activación, comparado contra el grupo control. Asimismo, en animales con resistencia a la insulina, la metformina, pero no el **EGL-6M**, incrementó la activación de la enzima eNOS comparado contra el vehículo.

RESULTADOS

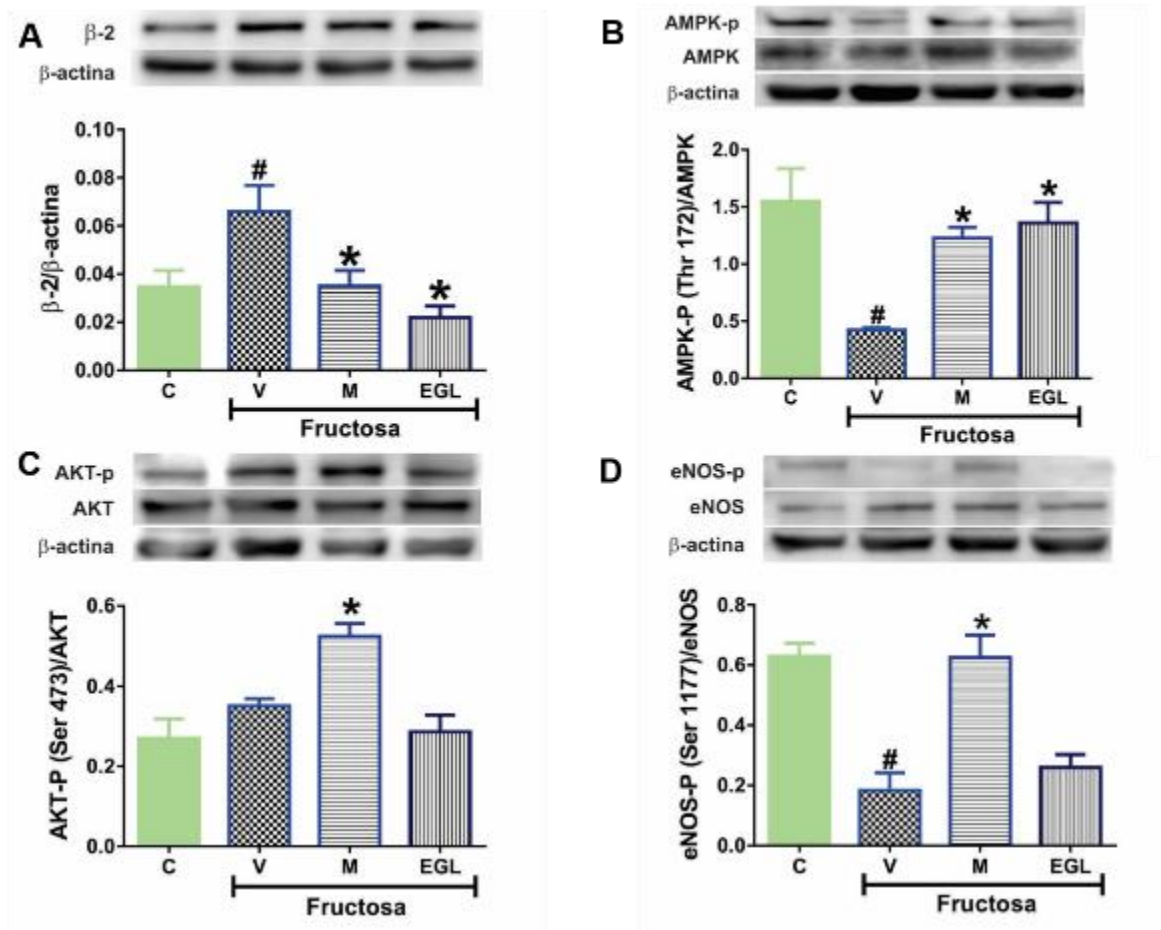


Figura 23. Efecto de la resistencia a la insulina y del tratamiento farmacológico con metformina y **EGL-6M** sobre la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos y activación de las proteínas AMPK, AKT y eNOS en arterias mesentéricas. Grupo control (C), grupos resistentes a la insulina (Fructosa), vehículo (V), Metformina (M), **EGL (EGL-6M)**. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, # $P < 0.05$ vs control, * $P < 0.05$ vs vehículo.

7.1.5.2 Expresión del receptor β_2 adrenérgico y activación de proteínas AMPK, AKT y eNOS en aortas

En la figura 24 se ilustra la expresión de los receptores β_2 -adrenérgicos y la activación de las enzimas AMPK, AKT y eNOS en animales con resistentes a la insulina inducida por la administración de fructosa al 15 % durante 16 semanas y el efecto del tratamiento crónico con: 1) vehículo, 2) metformina y **EGL-6M**.

En la figura 24A se observa que la resistencia a la insulina inducida por fructosa no modificó la expresión de los receptores β_2 -adrenérgicos cuando fue comparada contra el grupo control (control vs fructosa+vehículo). En contraste, los tratamientos con metformina y el **EGL-6M** incrementaron la expresión de estos receptores cuando se comparó contra el grupo que recibió el vehículo.

Por otra parte en la figura 24B se observa que la resistencia a la insulina, al igual que los tratamientos con metformina y **EGL-6M**, no modificó la activación de la enzima AMPK (AMPK-p (Thr172)/AMPK total). De la misma manera, en la figura 23C se muestra que la resistencia a la insulina inducida por fructosa no modificó la activación de la enzima AKT (AKT (Ser473)/AKT total). Asimismo, los tratamientos con metformina y **EGL-6M** no tuvieron efecto sobre la activación de esta enzima.

Por último la figura 24D muestra que la resistencia a la insulina no tuvo efecto sobre la activación de la enzima eNOS (eNOS (Ser1177)/eNOS total) cuando se comparó contra el grupo control. Mientras que los tratamientos crónicos con metformina y **EGL-6M** disminuyeron la activación de esta enzima cuando se compararon contra el grupo que recibió vehículo.

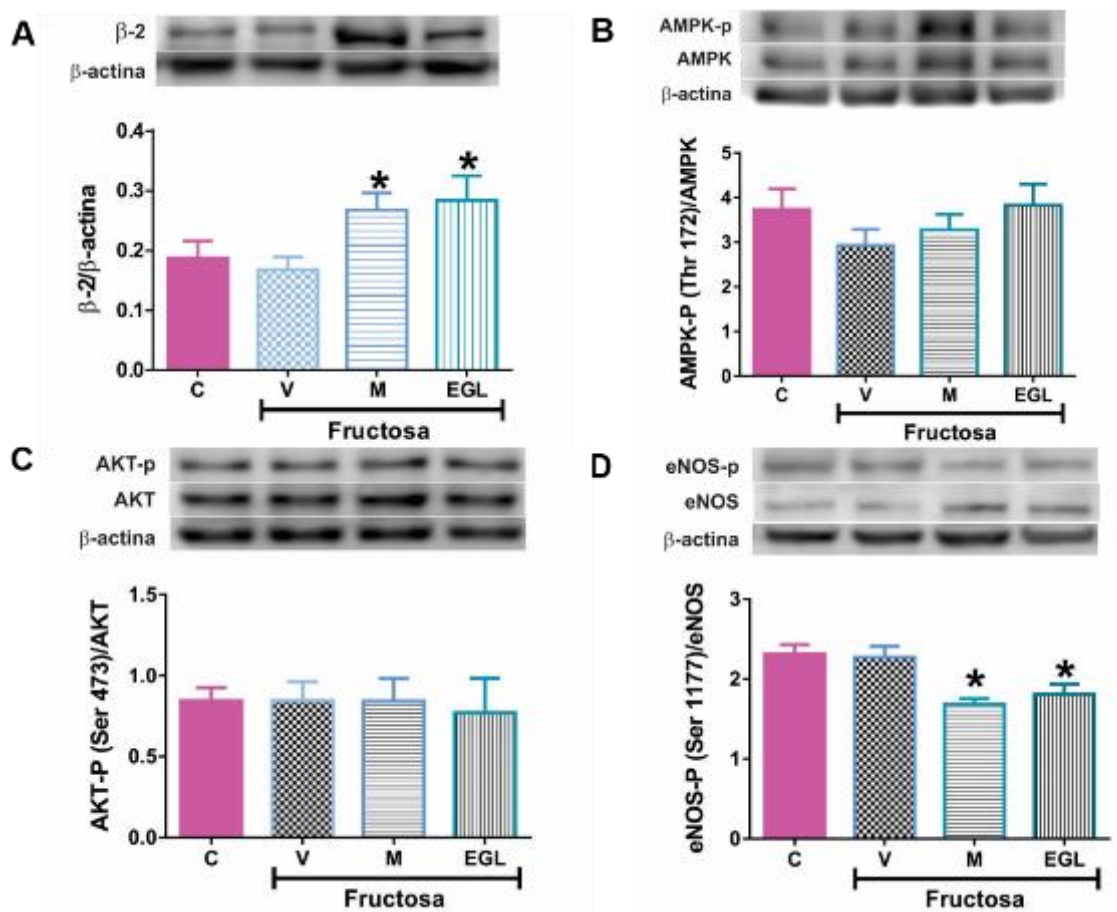


Figura 24. Efecto de la resistencia a la insulina y del tratamiento farmacológico con metformina y **EGL-6M** sobre la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos y activación de las proteínas AMPK, AKT y eNOS en aortas. Grupo control (C), grupos resistentes a la insulina (Fructosa), vehículo (V), Metformina (M), **EGL (EGL-6M)**. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, * $P < 0.05$ vs vehículo.

7.1.5.3 Expresión del receptor β_2 adrenérgico y activación de proteínas AMPK, AKT y eNOS en corazón

En la figura 25 se observa la expresión de los receptores β_1/β_2 -adrenérgicos y la activación de las enzimas AMPK, AKT y eNOS en el corazón. En el primer panel (figura 25A) se observa la expresión de los receptores β_1 ; la expresión no fue modificada en animales resistentes a la insulina (vehículo) comparada contra el grupo control. Sin embargo, en animales con resistencia a la insulina, el tratamiento con el análogo **EGL-6M** disminuyó la expresión de estos receptores. Por otra parte,

RESULTADOS

la expresión de los receptores β_2 no fue afectada por metformina o **EGL-6M** en este órgano (figura 25B).

La activación de la enzima AMPK (AMPK (Thr172)/AMPK total) se muestra en la figura 25C. En esta grafica se observó que la resistencia a la insulina disminuyó su activación (vehículo vs control) y, de manera notable, esta disminución fue restaurada después de la administración con el **EGL-6M**. Además, la metformina tiene una tendencia a incrementar esta activación; sin embargo, esta tendencia no alcanzó una diferencia estadísticamente significativa.

En la figura 25D se observa que la resistencia a la insulina inducida por fructosa disminuyó la activación de la enzima Akt (Akt (Ser473)/Akt total). Adicionalmente, el tratamiento con metformina tuvo una tendencia a incrementar los niveles de activación de la enzima; sin embargo, dicha tendencia no alcanzó la diferencia estadísticamente significativa. Por último, el **EGL-6M** incrementó estos valores de manera estadísticamente significativa cuando se comparó contra el grupo que recibió vehículo ($p=0.0043$, $F=7.202$).

En la figura 25E se puede observar que la resistencia a la insulina incrementó la expresión de la enzima Akt total. Mientras que los tratamientos crónicos con metformina y el análogo no tuvieron efecto sobre la expresión de esta proteína total cuando se compararon contra los animales administrados con vehículo.

Finalmente, en la figura 25F se observa que la resistencia a la insulina no tuvo efecto sobre la activación de la enzima eNOS (eNOS (Ser1177)/eNOS total). De igual manera, los tratamientos crónicos con metformina y el **EGL-6M** no tuvieron efecto sobre la activación de esta enzima comparados contra el vehículo.

RESULTADOS

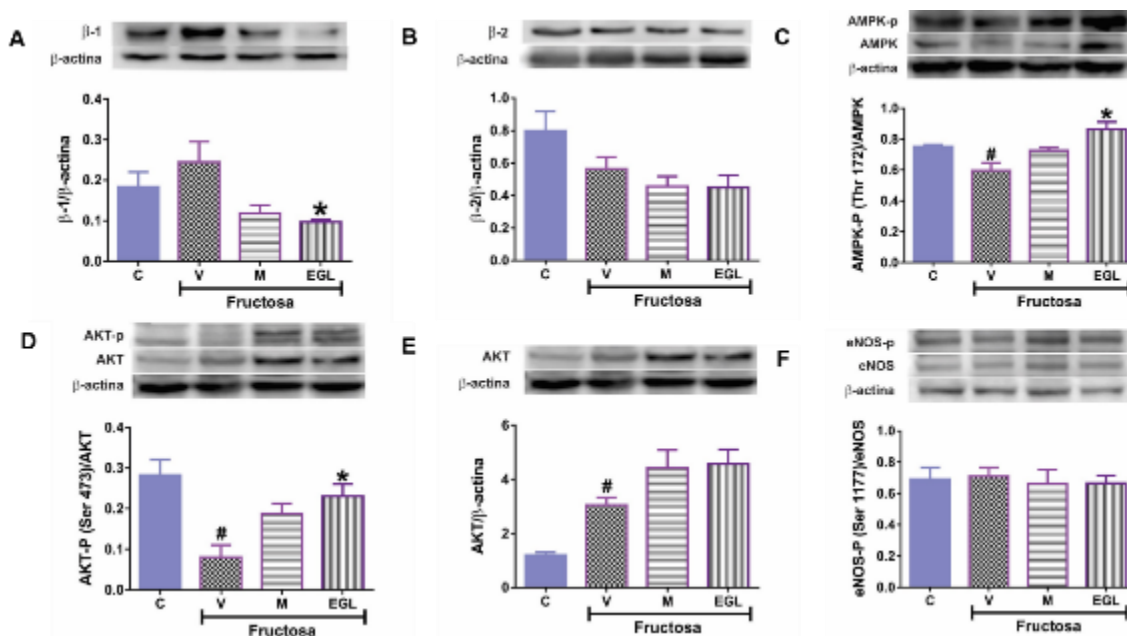


Figura 25. Efecto de la resistencia a la insulina y del tratamiento farmacológico con metformina y **EGL-6M** sobre la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos y activación de las proteínas AMPK, Akt y eNOS en corazón. Grupo control (C), grupos resistentes a la insulina (Fructosa), vehículo (V), Metformina (M), **EGL (EGL-6M)**. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, * $P < 0.05$ vs vehículo.

Por último, los resultados de la expresión y activación de las proteínas se encuentran resumidos en la tabla 8.

Tabla 8. Resumen de la expresión de los receptores β - adrenérgicos y las proteínas AMPK, Akt y eNOS en arterias mesentéricas, aortas y corazón de animales con resistencia a la insulina. R.I. (Resistencia a la insulina), ND (NO Determinado), NC (Ningún cambio), A (aumentó), Disminuyó (D).

Proteína Grupo	β_1	β_2	AMPK-p/AMPK	AKT-p/AKT	eNOS-p/eNOS
Arterias mesentéricas					
R.I. (Vehículo)	ND	A	D	NC	D
Metformina	ND	D	A	A	A
EGL-6M	ND	D	A	NC	NC
Aorta					
R.I. (Vehículo)	ND	NC	NC	NC	NC
Metformina	ND	A	NC	NC	D
EGL-6M	ND	A	NC	NC	D
Corazón					
R.I. (Vehículo)	NC	NC	D	D	NC
Metformina	NC	NC	NC	NC	NC
EGL-6M	D	NC	A	A	NC

7.2 FASE 2. Tratamiento farmacológico con 17-β estradiol

7.2.1 Características metabólicas

En la tabla 9 se muestran algunos parámetros bioquímicos como niveles sanguíneos de glucosa y triglicéridos, niveles plasmáticos de insulina, índice HOMA y peso corporal en ratas hembras falsamente operadas (sham) u ovariectomizadas tratadas con agua de la llave (control) o con fructosa al 15 % durante 23 semanas.

En ratas falsamente operadas, el tratamiento con fructosa incrementó los niveles plasmáticos de insulina e índice HOMA, aunque no fue significativo cuando se comparó contra el grupo control. Además, la fructosa incrementó significativamente los niveles sanguíneos de triglicéridos sin modificar significativamente los niveles de glucosa o el peso corporal.

Por otra parte, en animales ovariectomizadas, el tratamiento con fructosa no modificó significativamente los niveles de glucosa, insulina, HOMA-IR, triglicéridos o peso corporal. Sin embargo, es importante analizar el efecto de la ovariectomía en animales control. Al respecto, la ovariectomía aumentó el índice HOMA-IR y los niveles plasmáticos de insulina, al compararlos con el grupo falsamente operadas (sham).

Tabla 9. Parámetros bioquímicos de los grupos control y de los grupos tratados con fructosa.

Control vs Fructosa						
	Grupo	Glucosa (mmol/L)	Insulina (μUI/mL)	HOMA-IR	Triglicéridos (mg/dL)	Peso corporal (Kg)
	Control	3.82 ± 1.22	3.68 ± 0.46	0.95 ± 0.15	120 ± 21	0.38 ± 0.01
Sham	Fructosa	5.63 ± 0.24	8.57 ± 3.65	2.84 ± 1.02	212 ± 27*	0.43 ± 0.03
Ovx	Control	4.17 ± 1.34	15.27 ± 3.93*	9.14 ± 2.54*	138 ± 26	0.41 ± 0.03
	Fructosa	5.29 ± 0.24	14.34 ± 3.69	3.60 ± 0.95	214 ± 24	0.47 ± 0.03

* P<0.05 vs sham+control. Cada valor representa la media ± error estándar de la media de 6 animales.

En la tabla 10 se muestra el efecto del tratamiento crónico con 17β-estradiol sobre los niveles de glucosa y triglicéridos sanguíneos. Así como los niveles de insulina

RESULTADOS

plasmática, índice HOMA y peso corporal. Los cuales no fueron modificados por el tratamiento con estradiol.

Tabla 10. Efecto del estradiol sobre algunos parámetros bioquímicos y el peso corporal en animales tratados con fructosa.

Control						
	Grupo	Glucosa (mmol/L)	Insulina (μ UI/mL)	HOMA-IR	Triglicéridos (mg/dL)	Peso corporal (Kg)
Sham	Vehículo	3.82 \pm 1.22	3.68 \pm 0.46	0.95 \pm 0.15	120 \pm 21	0.38 \pm 0.01
Ovx	Vehículo	4.17 \pm 1.34	15.27 \pm 3.93*	9.14 \pm 2.54*	138 \pm 26	0.41 \pm 0.03
	Estradiol	3.82 \pm 1.21	13.01 \pm 0.80	3.51 \pm 0.61	179 \pm 16	0.35 \pm 0.01
Fructosa						
Sham	Vehículo	5.63 \pm 0.24	8.57 \pm 3.65	2.84 \pm 1.02	212 \pm 27	0.43 \pm 0.03
Ovx	Vehículo	5.29 \pm 0.24	14.34 \pm 3.69	3.60 \pm 0.95	214 \pm 24	0.47 \pm 0.03
	Estradiol	5.64 \pm 0.22	14.70 \pm 2.38	3.67 \pm 0.61	287 \pm 38	0.40 \pm 0.01

* P<0.05 vs sham+vehículo. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales

7.2.2 Valores hemodinámicos

En la tabla 11 se muestran los valores de frecuencia cardiaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM) por el método pletismográfico en los grupos falsamente operados y ovariectomizados tratados con agua de la llave (control) o con fructosa al 15% .

De manera interesante, en la tabla 10 se observa que el tratamiento con fructosa en ratas falsamente operadas incrementó significativamente estos valores hemodinámicos (FC, PAS, PAD, PAM). En contraste, en las ratas ovx solamente hubo un incremento estadísticamente significativo en el valor de PAS y una tendencia a incrementar los demás valores sin llegar a la diferencia estadística cuando se comparan con el grupo control ovariectomizado. Sin embargo, se puede observar que la ovariectomía produjo un incremento en los parámetros hemodinámicos evaluados al comparar el grupo ovx-control contra el grupo sham-control.

RESULTADOS

Tabla 11. Valores de presión arterial y frecuencia cardiaca obtenidos por el método pletismográfico después del tratamiento con fructosa.

		Control vs Fructosa			
Grupo		FC (lat/min)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
Sham	Control	368 ± 17	105 ± 4	84 ± 5	91 ± 5
	Fructosa	443 ± 6*	137 ± 4*	109 ± 4*	118 ± 4*
Ovx	Control	401 ± 22	131 ± 3*	101 ± 5*	110 ± 4*
	Fructosa	439 ± 7	153 ± 4 ^a	130 ± 4	138 ± 4

*P<0.05 vs sham+control, ^aP<0.05 vs ovx+control. Cada valor representa la media ± error estándar de la media de 6 animales. FC (frecuencia cardiaca), PAS (presión arterial sistólica), PAD (presión arterial diastólica), PAM (presión arterial media).

Por otra parte, la tabla 12 muestra el efecto del 17β-estradiol sobre las variables hemodinámicas. En los animales control ovariectomizados se observó una ligera disminución en los valores de PAS, PAD y PAM tras la administración crónica de estradiol al compararse contra el grupo ovx+vehículo aunque no alcanzó diferencias significativas. Sin embargo, esta reducción alcanzó diferencia significativa en animales con resistencia a la insulina inducida por fructosa al comparar el grupo ovx+vehículo contra ovx+E2.

Tabla 12. Efecto del estradiol o su vehículo sobre los valores de presión arterial y frecuencia cardiaca obtenidos por el método pletismográfico.

		Control			
Grupo		FC (lat/min)	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)	PAM (mmHg)
Sham	Vehículo	368 ± 17	105 ± 4	84 ± 5	91 ± 5
Ovx	Vehículo	401 ± 22	131 ± 3	101 ± 5	110 ± 4
	Estradiol	366 ± 23	118 ± 2	91 ± 3	100 ± 2
		Fructosa			
Sham	Vehículo	443 ± 6	137 ± 4	109 ± 4	118 ± 4
Ovx	Vehículo	439 ± 7	153 ± 4	130 ± 4	138 ± 4
	Estradiol	431 ± 5	123 ± 4 ^a	97 ± 5 ^a	105 ± 4 ^a

*P<0.05 vs Sham+vehículo, ^a P<0.05 vs ovx+vehículo. Cada valor representa la media ± error estándar de la media de 6 animales. FC (frecuencia cardiaca), PAS (presión arterial sistólica), PAD (presión arterial diastólica), PAM (presión arterial media).

7.2.3 Curva de tolerancia a la glucosa

En la figura 26 se observa el área bajo la curva durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral de los niveles obtenidos de glucosa (figura 26A) e insulina (figura 26B) en los grupos control y fructosa durante 23 semanas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en los niveles de glucosa durante la prueba. Sin embargo, se puede observar un incremento de los niveles de insulina obtenidos durante la CTG en los grupos tratados con fructosa así como en el grupo control con ovariectomía.

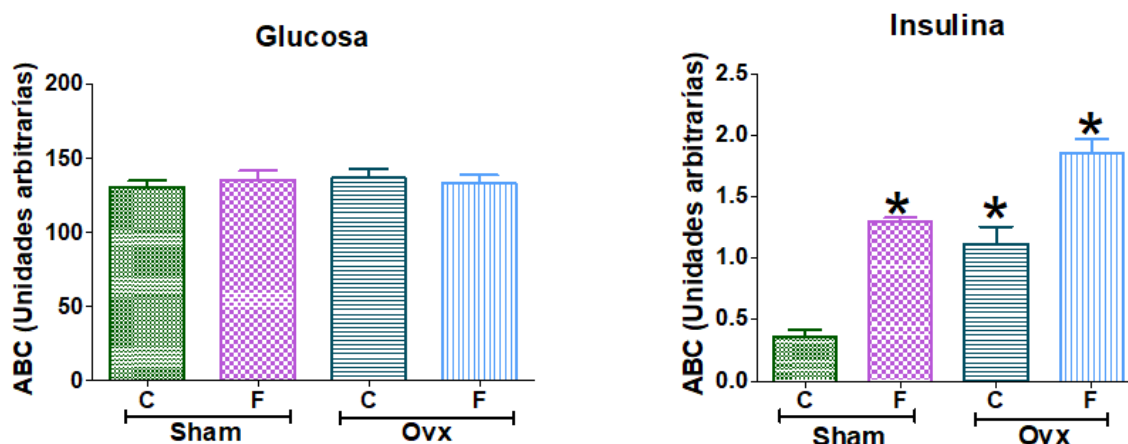


Figura 26. Área bajo la curva de los valores de glucosa e insulina obtenidos durante la curva de tolerancia a la glucosa. Grupo control vs fructosa. Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. * $P < 0.005$ vs sham+control. (C) Control, (F) Fructosa, sham (falsa cirugía) y Ovx (ovariectomía).

Además, en la figura 27 se muestran el curso temporal y el área bajo la curva de los cursos temporales de glucosa e insulina obtenidas durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral de los animales control, después del tratamiento con estradiol (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) o su vehículo durante 5 semanas. Al respecto, el estradiol produjo una pequeña disminución de los valores de glucosa significativa a 60, 90 y 120 minutos (figura 27A). Sin embargo, esta diferencia no fue significativa al momento de calcular el área de bajo la curva (figura 27B). Con respecto a los niveles de insulina durante la curva de tolerancia a la glucosa, la ovariectomía incrementó significativamente el área bajo la curva cuando se comparó con animales

RESULTADOS

falsamente operados. Así mismo, el tratamiento con estradiol redujo significativamente los incrementos del área bajo la curva comparado con los animales ovariectomizados tratados con vehículo (figura 27D).

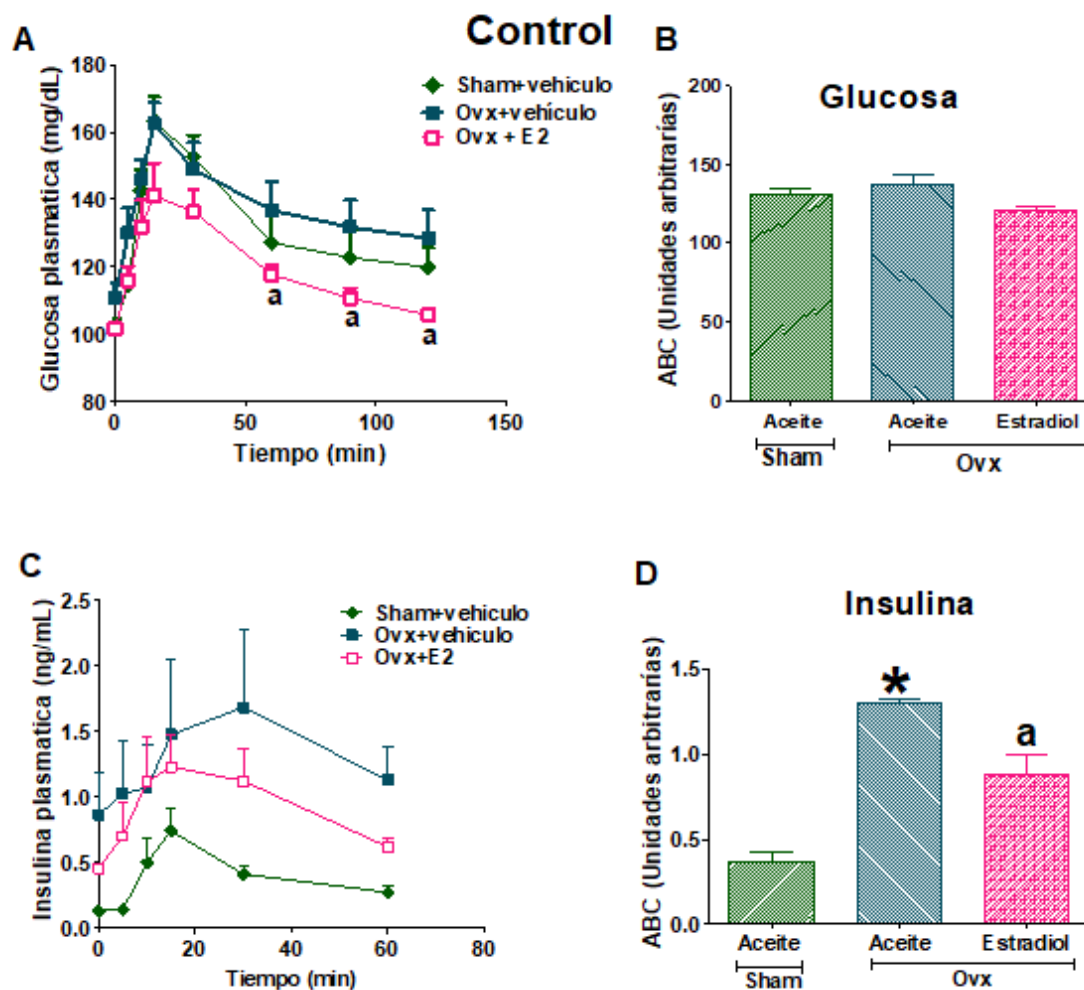


Figura 27. Cursos temporales y área bajo la curva de los valores de glucosa e insulina obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral en animales control después del tratamiento con vehículo (1 ml/kg; i.p.) o estradiol (10 µg/kg) durante 5 semanas. Cada punto o barra representa la media ± error estándar de la media de 6 animales. ^aP<0.05 vs Ovx+vehículo, * P<0.05 vs Sham+vehículo.

RESULTADOS

En la figura 28 se observan el curso temporal y el área bajo la curva de los niveles de glucosa e insulina obtenidas durante el ensayo de tolerancia a la glucosa en animales tratados con fructosa después del tratamiento con estradiol o su vehículo. En el curso temporal (figura 28A) de los animales ovx+E2 se puede observar una disminución de los niveles de glucosa a los tiempos 30 y 60 min, estos resultados son evidentes al realizar las áreas bajo la curva (figura 28B), sugiriendo un efecto benéfico del estradiol sobre el metabolismo de la glucosa, aunque se debe admitir que no existieron diferencias significativas en los tratamientos. Además, en las figuras 28C y 28D se observan los niveles de insulina obtenidos durante la curva de tolerancia a la glucosa, los cuales no fueron modificados con el tratamiento con estradiol.

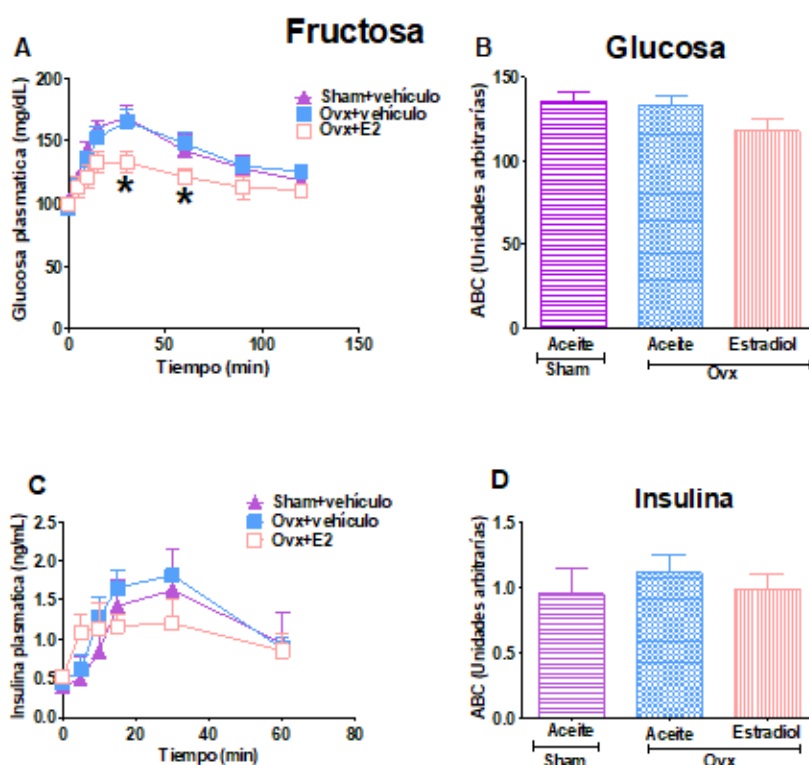


Figura 28. Cursos temporales y áreas bajo la curva de los valores de glucosa e insulina obtenidos durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral en animales resistentes a la insulina. Cada punto o barra representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales. * $P < 0.05$ vs Sham+vehículo.

7.2.4 Respuestas cardiovasculares

7.2.4.1 Respuestas vasopresoras

Las respuestas cardiovasculares generadas por estimulación simpática o compuestos vasopresores (noradrenalina, metoxamina o UK 14,304) fueron determinadas en animales falsamente operados u ovariectomizados.

En la figura 29 se encuentra la comparación del efecto del tratamiento con fructosa o su vehículo. En el panel superior se observan las respuestas de los animales falsamente operados, en el cual se observó que las respuestas generadas por estimulación simpática, noradrenalina y UK 14,304 fueron disminuidas en los animales tratados con fructosa. En el panel inferior se ilustran las respuestas generadas por las ratas ovariectomizadas; el tratamiento con fructosa no produjo diferencias sobre las respuestas vasopresoras a la estimulación simpática o a los agonistas α -adrenérgicos.

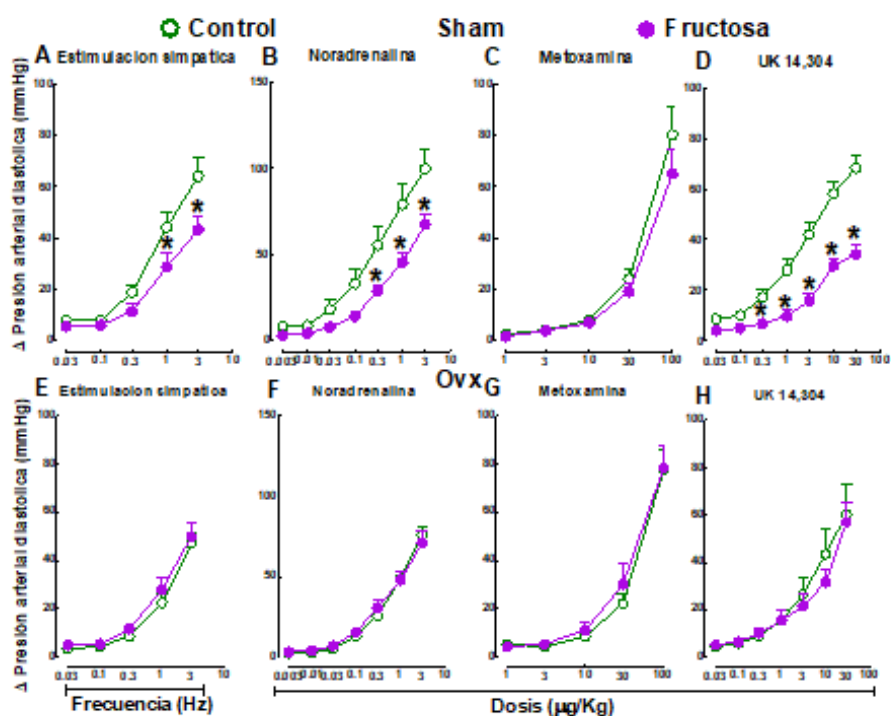


Figura 29. Respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina, metoxamina o UK 14, 304, en animales falsamente operados u ovariectomizados tratados con fructosa o su vehículo. * P<0.05 vs control.

RESULTADOS

Además, el efecto de la ovariectomía sobre las respuestas vasopresoras en animales control (panel superior) o en animales con resistencia a la insulina (panel inferior) se encuentra graficado en la figura 30. En los animales control, las respuestas generadas por la estimulación simpática (figura 3'A) al igual que las producidas por la administración de noradrenalina exógena (figura 30B) fueron disminuidas significativamente, sin modificar las respuestas generadas por metoxamina (figura 30C) y UK 14,304 (figura 30D). En el panel inferior se muestra que en los animales tratados con fructosa, la ovariectomía no produjo cambios estadísticamente significativos sobre las respuestas inducidas por estimulación simpática (figura 30E), noradrenalina (figura 30F), metoxamina (figura 30G) o UK 14,304 (figura 30H), excepto a la dosis más alta de UK 14,304, la cual fue incrementada por la ovariectomía.

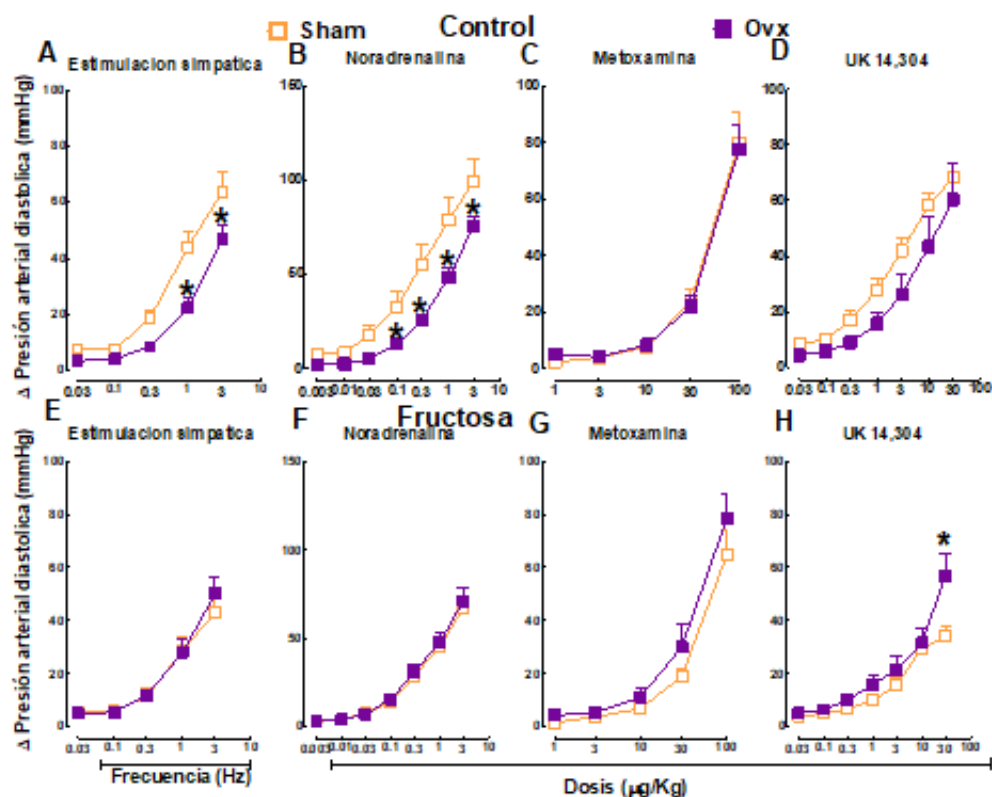


Figura 30. Efecto de la ovariectomía sobre las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina, metoxamina o UK 14,304 en animales control y tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

Por otra parte, en la figura 31 se muestra el efecto del estradiol sobre las diferentes respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática o los diferentes agonistas empleados en los animales control (panel superior) y en animales tratados con fructosa (panel inferior). En el grupo control la administración de estradiol disminuyó las respuestas generadas por noradrenalina si modificar las respuestas generadas por estimulación simpática, metoxamina (a excepción de la dosis más alta, en donde se observó una disminución de la respuesta) o UK 14,304. Mientras que en el grupo de animales resistentes a la insulina el estradiol incrementó las respuestas a la estimulación simpática sin modificar las inducidas por noradrenalina, metoxamina o UK 14,304.

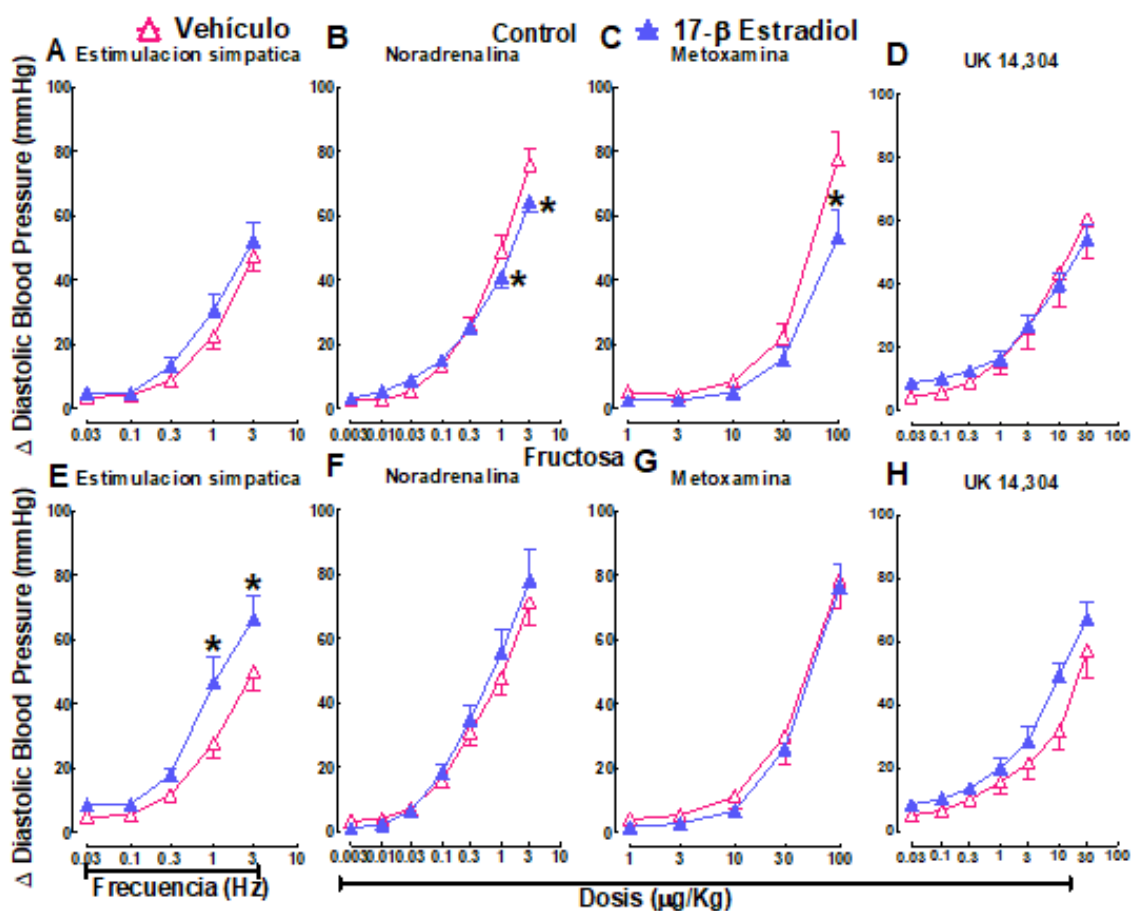


Figura 31. Efecto del tratamiento con estradiol sobre las respuestas vasopresoras generadas por estimulación simpática, noradrenalina, metoxamina o UK 14, 304 en animales control y tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

7.2.4.2 Respuestas vasodepresoras

En la figura 32 se encuentra la comparación de las respuestas vasodepresoras obtenidas de los animales control vs los animales tratados con fructosa en animales falsamente (panel superior) u ovariectomizados (panel inferior). En el primer panel se encuentra el subgrupo falsamente operado en el cual no se observan diferencias entre el tratamiento con fructosa o su vehículo. Sin embargo, en el panel inferior se observan las curvas obtenidas de los animales ovariectomizados. Las respuestas vasodepresoras inducidas por acetilcolina o nitroprusiato de sodio no fueron modificadas por la fructosa. Sin embargo, las respuestas vasodepresoras a isoprenalina fueron reducidas por el tratamiento con fructosa (figura 32F).

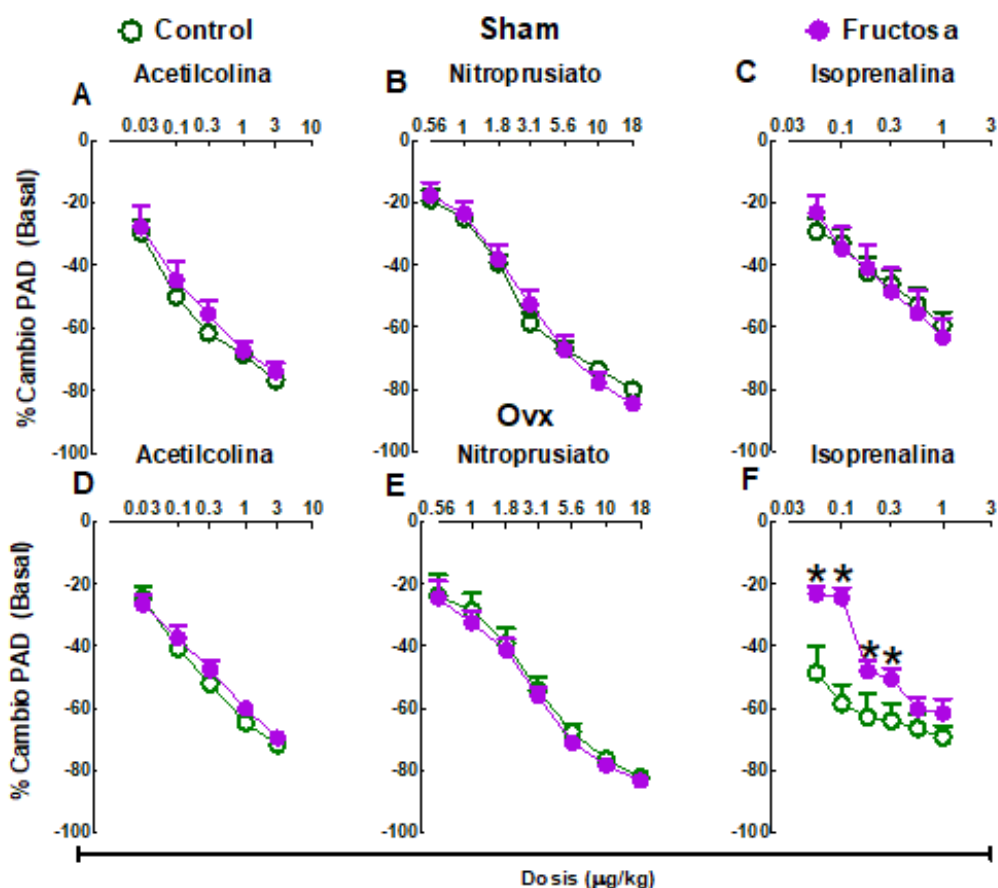


Figura 32. Efecto del tratamiento crónico con fructosa sobre respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en animales falsamente operados (panel superior) y ovariectomizados (panel inferior), * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

RESULTADOS

La figura 33 muestra el efecto de la ovariectomía sobre las respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en animales control (panel superior) y en animales con resistencia a la insulina (panel inferior). En los animales control ovariectomizados las respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina se encuentran disminuidas en las dosis de 0.1 y 0.3 mg/kg (figura 33A). De la misma manera, en la figura 33B se observa que la ovariectomía no tiene efecto sobre las respuestas inducidas por isoprenalina. Mientras que en la figura 33C se ilustra que la ovariectomía incrementa las respuestas a isoprenalina.

En contraste, en los animales resistentes a la insulina (fructosa), la ovariectomía no produjo cambios en las respuestas inducidas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina al compararlos con los animales falsamente operados.

En contraste, los animales tratados con fructosa no se observó cambios en las respuestas vasodepresoras en las ratas a las que se les realizó la extirpación de los ovarios al compararla con las falsamente operadas.

RESULTADOS

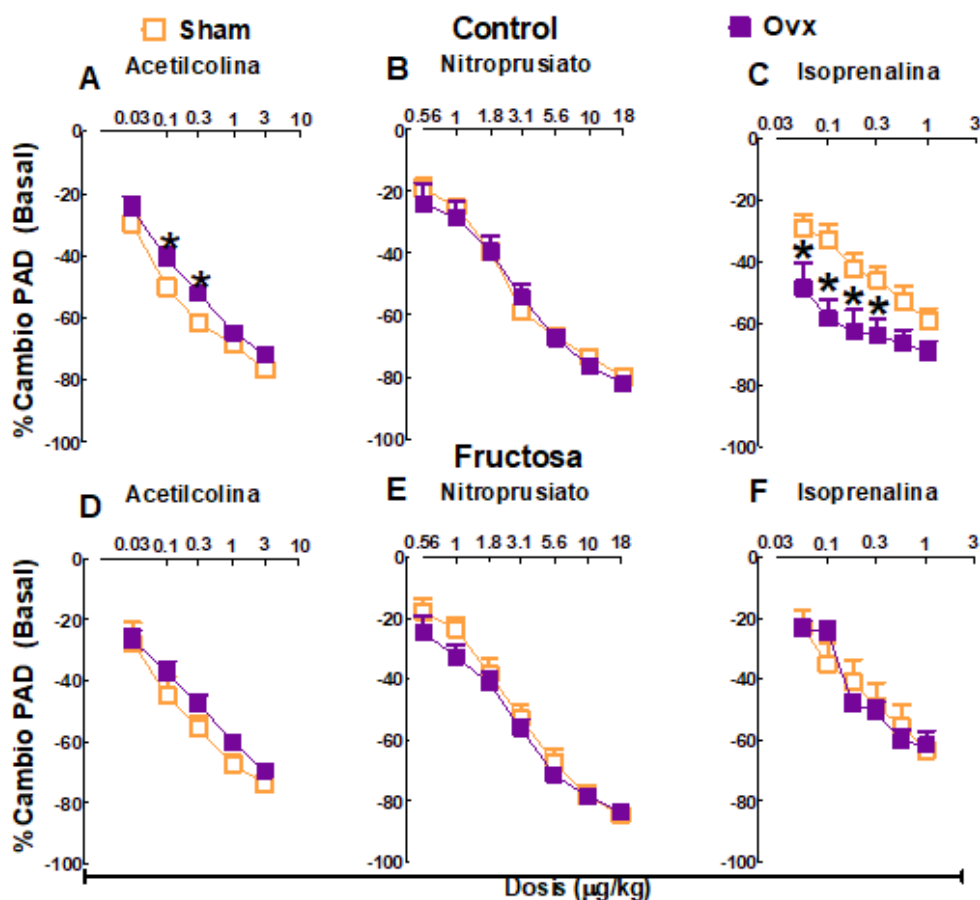


Figura 33. Efecto de la ovariectomía sobre las respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en animales control y tratados con fructosa. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

En la figura 34 se observa el efecto del tratamiento crónico con estradiol sobre las respuestas vasodepresoras generadas por la administración de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en ratas ovariectomizadas. En el panel superior se localizan las respuestas vasodepresoras sobre el grupo control y en el panel inferior en el grupo con fructosa. En el grupo control, la administración de estradiol disminuyó las respuestas a acetilcolina e isoprenalina; mientras que incrementó las respuestas a nitroprusiato.

Por otro lado, en el grupo tratado con fructosa, la administración crónica de estradiol incrementó las respuestas a acetilcolina sin modificar las respuestas generadas por la administración de nitroprusiato e isoprenalina.

RESULTADOS

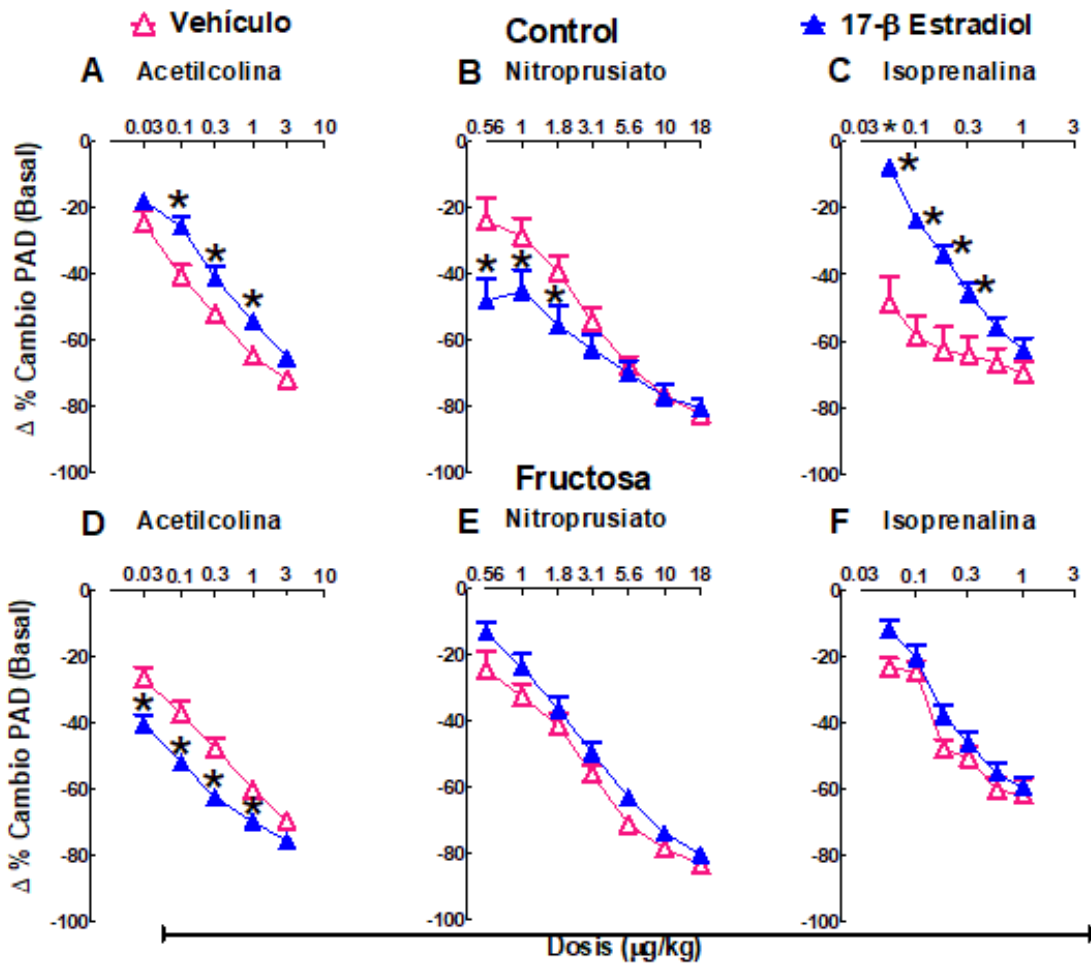


Figura 34. Efecto de la administración de estradiol sobre las respuestas vasodepresoras generadas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina en animales control (panel superior) o fructosa (panel inferior) en ratas ovariectomizadas. * $P < 0.05$ vs control. Cada punto representa la media \pm error estándar de la media de 6 animales.

7.2.5 Activación de la vía Akt/eNOS

La figura 35 muestra la activación de las enzimas Akt y eNOS en arterias mesentéricas y en aortas en animales con resistencia a la insulina inducida por

RESULTADOS

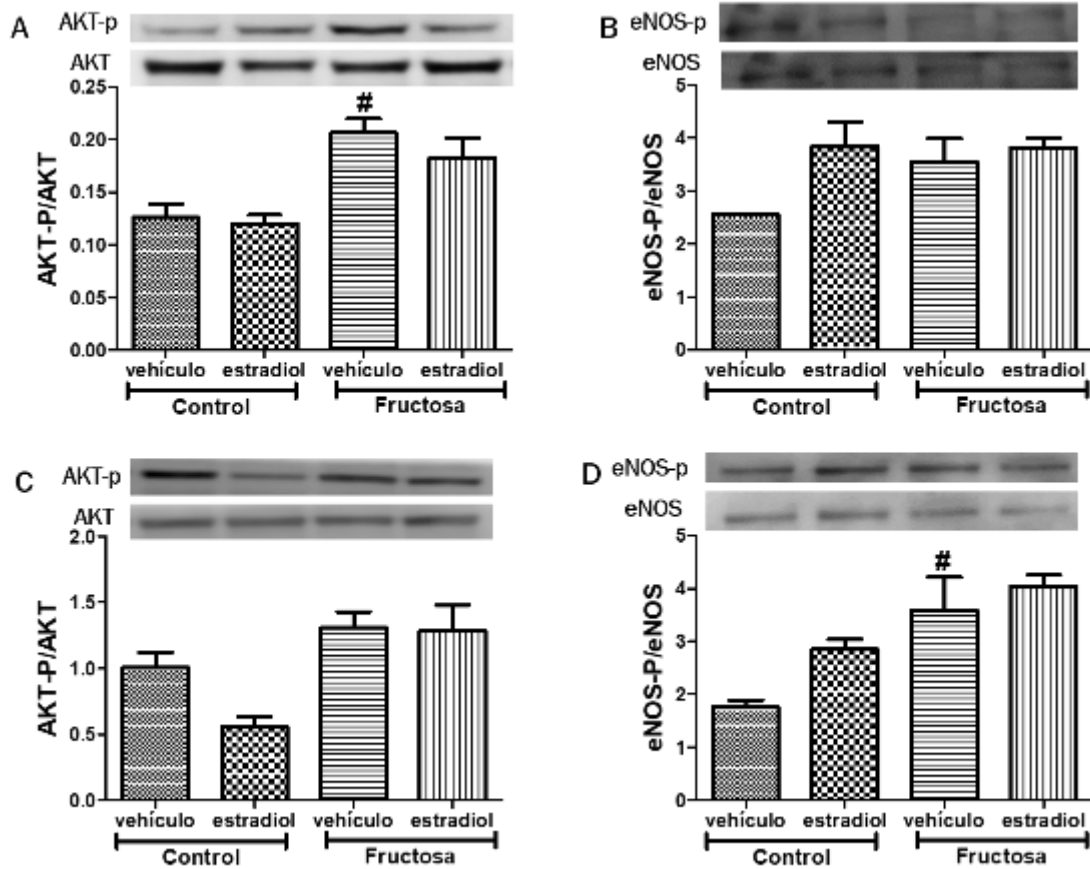
fructosa y ovariectomizados. Así como el efecto del tratamiento crónico con estradiol.

En la figura 35A se observa que la resistencia a la insulina incrementa la activación de la vía Akt (Akt (Ser473)/ Akt total) en arterias mesentéricas cuando se comparan con el grupo control, sin embargo, la administración del estradiol no produjo cambios tanto en el grupo control como en el grupo tratado con fructosa.

La figura 35B muestra la activación de la enzima eNOS (eNOS (Ser1177)/ eNOS total), en la cual no se observan diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los tratamientos.

Por otro lado, en la figura 34C se observa que la resistencia a la insulina (control+vehículo vs fructosa+vehículo) no tiene efecto sobre la activación de la enzima Akt (Akt (Ser473)/ Akt total). La administración crónica de estradiol en animales control disminuyó la activación de la enzima Akt. Sin embargo, en los animales resistentes a la insulina no se observó un efecto. Finalmente, en la figura 34D se observa que la resistencia a la insulina incrementa la activación de la enzima eNOS (eNOS (Ser1177)/eNOS total). Mientras que la administración de estradiol no tiene efecto sobre la activación de esta enzima en animales control o tratados con fructosa.

RESULTADOS



67

Figura 35. Efecto de la resistencia a la insulina y el tratamiento con estradiol en arterias mesentéricas (A y B) y aorta (C y D). Cada barra representa la media \pm error estándar de la media de 3-4 muestras independientes, # $P < 0.05$ vs control, * $P < 0.05$ vs control+vehículo.

CAPITULO 8. DISCUSIÓN

8.1 FASE 1

8.1.1 Efecto de la metformina y EGL-6M sobre las variables metabólicas

Durante la resistencia a la insulina, se observa una etapa de hiperinsulinemia como mecanismo compensatorio (Sesti, 2006). De manera consistente con lo anterior, bajo nuestras condiciones, se observaron niveles altos de insulina en plasma y valores altos de índice HOMA en animales tratados con fructosa en comparación con los animales control. De manera contraria, en ratas con un periodo de ayuno de 12 horas, los niveles de glucosa en sangre disminuyeron ligeramente en comparación con el grupo control (tabla 5). Sin embargo, durante la curva de tolerancia a la glucosa no se observaron cambios en las ratas tratadas con fructosa respecto al grupo control. De la misma manera los niveles de insulina plasmática fueron significativamente mayores en las ratas tratadas con fructosa comparadas con el grupo control (figura 15). Estos resultados sugieren que los animales tratados con fructosa tienen resistencia a la insulina, puesto que se observa una fase de hiperinsulinemia sin alteración en los niveles de glucosa sanguínea probablemente debido a que las células pancreáticas aún pueden secretar insulina suficiente para evitar la hiperglucemia, como ya se ha demostrado previamente (Motta *et al.*, 2017; Ostenson, 2001; Sommese *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2013)

Además, en los animales que continuaron la administración de fructosa y fueron tratados con el vehículo durante 4 semanas, los niveles de insulina en plasma, así como los valores del índice HOMA, aumentaron significativamente en comparación con los valores de los animales control, lo que sugiere que bajo nuestra condición experimental se puede observar una progresión dependiente del tiempo de resistencia a la insulina (tabla 5). En el grupo control, el vehículo, la metformina o **EGL-6M** no modificaron los niveles de glucosa e insulina durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (figura 16) o valores basales (tabla 5). Estos resultados son consistentes con los datos publicados ya que la metformina no disminuyó los niveles de glucosa en sangre durante la euglucemia en los seres humanos

(Wiernsperger *et al.*, 1999). Del mismo modo, **EGL-6M** no produjo ningún efecto, probablemente porque este compuesto es un análogo de la metformina y aún posee la propiedad anti-hiperglucémica de la metformina. En marcado contraste, en el grupo resistente a la insulina (tratado con fructosa), el tratamiento con metformina y **EGL-6M** disminuyó significativamente la glucemia y los niveles plasmáticos de insulina durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa en comparación con el subgrupo de vehículo con fructosa (figura 16). Estos resultados pueden interpretarse en términos de que la metformina y **EGL-6M** aumentaron la absorción de glucosa y disminuyeron la resistencia a la insulina ya que la secreción de insulina fue menor durante la prueba.

8.1.2 Cambios hemodinámicos producidos por los tratamientos farmacológicos

De manera interesante, la resistencia a la insulina inducida por una dieta alta en fructosa aumentó significativamente algunos valores hemodinámicos (tabla 6), incluida la presión arterial. En este sentido, se ha observado una asociación entre la hipertensión y la resistencia a la insulina a través de varios mecanismos que incluyen la disfunción endotelial y la disfunción simpática (Schalkwijk *et al.*, 2005; Thackeray *et al.*, 2011).

En el grupo control, el tratamiento con metformina y **EGL-6M** aumentaron significativamente los valores de presión arterial (tabla 7). Aunque en principio estos resultados pueden sugerir un efecto deletéreo, se debe considerar que estos valores todavía se encuentran en el rango fisiológico de las ratas adultas (presión arterial sistólica: 84-134 mmHg, presión arterial diastólica: 60 mmHg) (Wolfensohn *et al.*, 2013). Además, tanto la metformina como el análogo tienen similitudes estructurales con algunos antihipertensivos de acción central (agonistas α_2 adrenérgicos) tales como el guanabenz, la clonidina, y la guanfacina, estos fármacos al ser agonistas alfa adrenérgicos, su primer efecto es el aumento de la presión arterial y el cual se conserva hasta un ajuste correcto de dosis (Oates, 1995). Esto podría explicar el incremento en la presión arterial. Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismo de acción por lo que pudieran ocurrir estos incrementos. Por otro lado,

en los animales resistentes a la insulina, la metformina y **EGL-6M** no modificaron significativamente los valores de la presión arterial en comparación con sus respectivos vehículos. A este respecto, varios estudios han demostrado la capacidad de la metformina para restablecer la función endotelial (Sena *et al.*, 2011). Aunque no tenemos una explicación clara de estos hallazgos, durante la génesis y la progresión de la hipertensión están implicados varios mecanismos (por ejemplo, sobre la activación del tono simpático, el sistema renina-angiotensina, la sobreactivación de la PKC en el músculo liso, entre otros) y posiblemente la metformina y **EGL-6M** podrían no haber revertido por completo estas alteraciones, permitiendo observar estos incrementos.

8.1.3 Efecto de la metformina o EGL-6M sobre las respuestas vasopresoras inducidas por la estimulación del sistema adrenérgico

En esta parte del proyecto se analizó el efecto de la metformina y **EGL-6M** sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación simpática o administraciones i.v. de los agonistas adrenérgicos: noradrenalina (ligando endógeno), metoxamina (α_1 -adrenoceptores) y UK 14, 304 (α_2 -adrenoceptores). Se midió el tono simpático vasopresor indirectamente determinando las respuestas vasopresoras inducidas por la estimulación de las fibras preganglionares que inervan los vasos sanguíneos (T7-T9) además, también se evaluó la administración de los agonistas alfa adrenérgicos estimulando directamente los adrenoceptores α_1 y/o α_2 localizados principalmente en el músculo liso vascular.

Al evaluar las respuestas cardiovasculares, se observó una disminución de las respuestas vasopresoras generadas por la estimulación simpática (figura 16A) en animales con resistencia a la insulina en comparación con el grupo control. Esto sugiere que durante la resistencia a la insulina la neurotransmisión podría verse disminuida. Varios estudios han observado que durante el síndrome metabólico existe un aumento en la actividad del tono simpático (Limberg *et al.*, 2012; Mancía *et al.*, 2007; Masuo *et al.*, 1997). Además, es posible que durante la resistencia a la insulina, se observe una disfunción de la neurotransmisión simpática entre las neuronas preganglionares y postganglionares (Rudchenko *et al.*, 2014) debido a

una disfunción de los receptores postganglionares nicotínicos (Campanucci *et al.*, 2010). Por otro lado, se observó un aumento de las respuestas vasopresoras generadas por la administración exógena de noradrenalina. Sin embargo, debido a que no se encontraron diferencias en las respuestas generadas por la administración de los agonistas α_1 (metoxamina) y α_2 (UK 14,304), concluimos que este efecto es probablemente debido a una mejora significativa del gasto cardíaco debido a un aumento en el taquicardico de las respuestas a la noradrenalina en ratas con resistencia a la insulina. En este sentido, Thackeray *et al.* (2011) demostraron que las concentraciones de noradrenalina en plasma y corazón se encuentran elevadas en modelos de diabetes inducida por estreptozotocina, lo cual es congruente con nuestros resultados.

En animales control, el tratamiento con metformina no produjo cambios en las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación simpática o por bolos i.v. de los diferentes agonistas (figura 17). Por el contrario, en animales conscientes, la metformina aumentó la presión arterial media, diastólica y sistólica (tabla 7). Debemos admitir que no tenemos una explicación irrefutable de estos hallazgos porque varios estudios han demostrado efectos antihipertensivos de la metformina observado que la activación de la AMPK por metformina en los riñones desencadena un aumento de la presión sanguínea por retención de agua (Klein *et al.*, 2016)., 2016) mientras que la eliminación de AMPK provoca pérdida de agua y sal (Lazo-Fernandez *et al.*, 2017). Aun así, estos valores de presión arterial siguen en el rango normal (Wolfensohn *et al.*, 2013). Además, en animales tratados con **EGL-6M**, se observó un aumento en las respuestas inducidas por estimulación simpática (0,3-3 Hz), así como una disminución en las respuestas generadas por UK 14,304 (selectivo agonista α_2 -adrenérgico). Estos resultados sugieren que el **EGL-6M** potencia por sí misma la transmisión simpática, probablemente al disminuir la densidad y/o funcionalidad de los receptores adrenérgicos α_2 preunionales que inhiben la liberación de neurotransmisores (Villamil-Hernández *et al.*, 2013) o los receptores adrenérgicos α_2 posunionales en el músculo liso vascular.

DISCUSIÓN

Por otro lado, en ratas tratadas con fructosa, la administración crónica de metformina disminuyó las respuestas vasopresoras inducidas por inyecciones i.v. de noradrenalina y el efecto de la última dosis de metoxamina (100 µg/kg) sin modificar las respuestas vasopresoras evocadas por estimulación simpática o inyecciones i.v. de UK 14,304 (figura 17). Estos resultados sugieren que la metformina no modificó la neurotransmisión del tono simpático, pero podría modificar la expresión de α_1 y/o α_2 -adrenoceptores, ya que las respuestas a la noradrenalina y la metoxamina se redujeron. De acuerdo con nuestros hallazgos, Majithiya y Balaraman (2006) observaron en aortas aisladas de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina que la administración de altas concentraciones de metformina (1-10 mM) disminuyó las respuestas generadas por la noradrenalina. Por último, **EGL-6M** aumentó las respuestas vasopresoras generadas por la estimulación simpática a altas frecuencias (1 y 3 Hz) en animales con resistencia a la insulina (figura 17A) y en animales control (figura 18A). Estos resultados sugieren que en la resistencia a la insulina inducida por la fructosa, **EGL-6M** aumentó la neurotransmisión simpática por sí misma. Este efecto podría deberse probablemente a: 1) una disminución de la densidad y/o funcionalidad de los α_2 -adrenoceptores preunionales que inhiben la liberación de noradrenalina; 2) aumento de la neurotransmisión preganglionar simpática; o 3) una acción simpaticomimética indirecta de **EGL-6M**, como se sugirió anteriormente con metformina (Lee *et al.*, 2001). De acuerdo con esto, los hallazgos previos mostraron una disfunción de la transmisión de señal presináptica que inhibe la neurotransmisión con la neurona postsináptica en ratas diabéticas inducidas con estreptozocina; en consecuencia, se sugiere una liberación disminuida de noradrenalina (Mundinger *et al.*, 2015). Es cierto que las respuestas vasopresoras inducidas por UK 14, 304 no se modificaron en las ratas tratadas con fructosa (figura 17H), lo que puede sugerir que la funcionalidad de los adrenoceptores α_2 no pudo haber cambiado con **EGL-6M**. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la neurotransmisión simpática incluye fibras preganglionares y posganglionares que **EGL-6M** puede haber potenciado.

8.1.4 Efecto de la resistencia a la insulina sobre las respuestas vasodepresoras inducidas por estimulación del endotelio y musculo liso

Como un efecto de la resistencia a la insulina se observó un incremento en las respuestas a acetilcolina sin modificar la vía de la guanilato cilcasa (figura 20), por lo que pudieran estar implicados otras vías activadas por la unión de acetilcolina a su receptor, como la activación de los canales K^+ , en los cuales se han observado disfunciones en ratas obesas de la cepa Zucker (Yin *et al.*, 2017) o en la síntesis de prostaciclina I₂, se ha observado que una desregulación de esta vía está asociada con el desarrollo de aterosclerosis (Stitham *et al.*, 2016). Así mismo se encontró una disminución de las respuestas a isoprenalina (figura 20C) y una sobre expresión de los receptores β adrenérgicos, lo que indicaría una disrupción en la señalización de los receptores β_2 y no una disminución de la densidad de receptores. De acuerdo con esto se ha observado un polimorfismo de los receptores β adrenérgicos durante la resistencia a la insulina que cambian la vía de señalización común (Bulatova *et al.*, 2015).

8.1.5 Efecto de la administración crónica de metformina y su análogo sobre las respuestas vasodepresoras

En la figura 21C se observa una disminución de las respuestas inducidas por isoprenalina (activación de los receptores β adrenérgicos). Estos datos indican que la metformina por si misma disminuye la función de los receptores β_2 adrenérgicos en animales control posiblemente alterando la densidad y/o las cascadas intracelulares de los receptores β_2 adrenérgicos. En contraste, el **EGL-6M** no modificó las respuestas inducidas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio o isoprenalina sugiriendo que dicho tratamiento farmacológicos no modificó la funcionalidad de los receptores muscarínicos, β adrenérgicos o la vía del óxido nítrico.

Por otro lado en los animales resistentes a la insulina se observó una disminución de las respuestas a acetilcolina (figura 22A) y un incremento en las respuestas inducidas por isoprenalina (figura 22C). Estos resultados sugieren que: 1) la metformina disminuye la función de los receptores muscarínicos asociado a la

estimulación de la vía de óxido nítrico y mejora la función de los receptores β adrenérgicos en animales con resistencia a la insulina; y 2) el **EGL-6M** mejora la función de los receptores β_2 adrenérgicos sin modificar la función de los receptores muscarínicos. Consistente con nuestros hallazgos, en las aortas se observó un incremento en la expresión de los receptores β_2 adrenérgicos después de la administración de metformina y del **EGL-6M** (figura 24).

Durante la resistencia a la insulina se ha observado una disfunción de la señalización de los receptores β adrenérgicos (Mangmool *et al.*, 2017), la cual mejora cuando disminuye la resistencia a la insulina ; así como cuando se encuentra activada la vía de AMPK (Pulinilkunnil *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2010). Esto quizás podría explicar nuestros datos; sin embargo, hasta el momento no hay estudios en donde se haya analizado el efecto directo de la metformina sobre los receptores β adrenérgicos.

8.1.6 Expresión de receptores β -adrenérgicos y activación de enzimas AMPK, AKT y eNOS

Con la finalidad de encontrar un posible mecanismo de acción de los tratamientos crónicos con metformina y el **EGL-6M**, la expresión y activación de algunas proteínas fueron determinadas en algunos tejidos del sistema cardiovascular de animales con resistencia a la insulina y tratados con: 1) vehículo, 2) metformina y 3) **EGL-6M**.

Las figuras 22-24 muestran la activación de las enzimas AMPK, Akt y eNOS, las cuales están implicadas en la síntesis de óxido nítrico a través de la activación del receptor de insulina o en la activación de otras vías implicadas en la mejora de las respuestas cardiovasculares. De la misma manera, la expresión de los receptores β -adrenérgicos (β_1 y β_2) fue evaluada. Los receptores β_2 median relajación en vasos sanguíneos. Además, la activación de los receptores β_1 tiene efectos inotrópicos, cronotrópicos y dromotrópicos positivos en el corazón.

8.1.6.1 Efecto de la administración crónica de metformina, EGL-6M o su vehículo en animales con resistencia a la insulina sobre la expresión del receptor β_2 y la activación de las enzimas AMPK, AKT y eNOS en las arterias mesentéricas

Las complicaciones vasculares durante la diabetes y la resistencia a la insulina pueden clasificarse como microvasculares (retinopatía o nefropatía) o macrovasculares (enfermedad cerebrovascular, coronaria, enfermedad arterial y enfermedad vascular periférica) (Kibel *et al.*, 2017; Lunder *et al.*, 2018).

En este proyecto se utilizaron las arterias mesentéricas. Estos vasos fueron elegidos porque son vasos de calibre pequeño y son considerados vasos de resistencia puesto que un cambio pequeño en el diámetro de dichos vasos producen cambios drásticos en la resistencia al flujo sanguíneo de acuerdo con la Ley de Poiseuille y por lo tanto tiene un impacto grande sobre la presión arterial. Además, estos vasos poseen una gran cantidad de músculo liso.

Así, en las arterias mesentéricas de los animales con resistencia a la insulina se observó un incremento en la expresión de los receptores β_2 (figura 23A). Esta sobreexpresión podría deberse a un mecanismo compensatorio puesto que al evaluar su funcionalidad a través de la administración de isoprenalina (agonista β -adrenérgico), se observó que las respuestas vasodepresoras se encontraron disminuidas (figura 20C). De esta forma, se podría sugerir que la resistencia a la insulina pudiera estar causando un daño en la vía de señalización en este tejido.

Por otro lado, este incremento sobre la expresión de los receptores β_2 fue revertido con los tratamientos crónicos con metformina y el **EGL-6M**. De la misma manera se observó que posterior a estos tratamientos las respuestas generadas por isoprenalina se restauraron (figura 22C y 22F). Estos datos sugieren una vez más que el tratamiento crónico la metformina y el **EGL-6M** muy probablemente restauran la expresión y función de los receptores β_2 .

En la figura 23B se observa una disminución en la activación de la enzima AMPK. La enzima AMPK ha sido identificada como un regulador de varios transportadores

de iones de importancia en fisiología renal. Dentro de los transportadores se incluyen: el regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), el canal de sodio epitelial (ENaC), el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC) y el cotransportador H^+ -ATPasa vacuolar (V-ATPasa) (Davies *et al.*, 2014; DiNuzzo *et al.*, 2013; Hallows *et al.*, 2010). Así, es probable que la disminución de la actividad de esta enzima puede desarrollar complicaciones microvasculares observadas durante la progresión de la diabetes. De la misma manera, la reducción de la actividad de la AMPK en el riñón se asocia con la acumulación renal de triglicéridos y glucógeno, así como en del desarrollo de la patogénesis de la hipertrofia renal diabética (Hallows *et al.*, 2010). De manera interesante, la disminución de la actividad de esta enzima generada por la resistencia a la insulina fue revertida por los tratamientos crónicos con metformina y **EGL-6M**. Por lo tanto, la activación de esta enzima podría estar involucrada con la protección cardiovascular observada bajo nuestras condiciones experimentales. Además, nuestros datos sugieren que es probable que el **EGL-6M** comparta el mismo mecanismo de acción de la metformina, como previamente fue sugerido (Gutierrez-Lara *et al.*, 2017).

Otra de las las vías de señalización afectadas durante la resistencia a la insulina o la diabetes tipo 2 y que se encuentra asociada con la disfunción vascular es la vía AKT/eNOS (Kobayashi *et al.*, 2004). Al respecto, bajo nuestras condiciones experimentales se observó una disminución en la activación de la enzima eNOS en animales resistentes a la insulina sin modificar la activación de la enzima AKT (figura 23C). Esta disminución en la fosforilación en el residuo de Ser1177 podría deberse a una disminución en la actividad AMPK (figura 23B), que es una cinasa capaz de fosforilar y activar a la eNOS en este residuo de aminoácido (Huang, 2009). El tratamiento crónico con metformina (figura 23D), pero no así con el **EGL-6M**, incrementó la activación de la eNOS, indicando así que el análogo no tiene efecto sobre esta enzima. Esta mejora inducida por metformina podría deberse a una disminución de la resistencia a la insulina (tabla 5) o través de la activación directa la vía AKT/eNOS, ya que se ha observado que la metformina puede mejorar las vías

de señalización PI3K/Akt1 en ratas con lesión por isquemia (Ge *et al.*, 2017; Majithiya *et al.*, 2006; Mather *et al.*, 2001).

8.1.6.2 Efecto de la administración crónica de metformina, EGL-6M o su vehículo en animales con resistencia a la insulina sobre la expresión del receptor β_2 y la activación de las enzimas AMPK, AKT y eNOS en la aorta

La aorta es la arteria principal que proviene directamente del ventrículo izquierdo. Esta arteria contiene varias secciones incluyendo el cayado, la sección torácica y abdominal. Además, es el vaso sanguíneo de mayor calibre del organismo. Esta arteria da origen a todas las arterias del sistema circulatorio y su función principal es la de amortiguar el pulso y la de distribuir la sangre. Debido a su gran importancia se decidió analizar algunas de las vías que podrían estar implicadas en los cambios debidos a la resistencia a la insulina observadas en las respuestas cardiovasculares.

En la figura 24A se muestra que la resistencia a la insulina no afectó la expresión de los receptores β_2 en este tejido. Además, el tratamiento con metformina y **EGL-6M** incrementaron la expresión de estos receptores. En congruencia con estos datos, el tratamiento con metformina y **EGL-6M** incrementó las respuestas vasodpressoras inducidas por isoprenalina en los animales con resistencia a la insulina (figuras 22C y 22F). Las diferencias observadas en la expresión de estos receptores en las arterias mesentéricas, en las cuales los tratamientos disminuyeron su expresión (figura 23A) podrían deberse a su funcionalidad más que a un cambio en la expresión de dichos receptores.

En las arterias mesentéricas no se observaron diferencias significativas en la fosforilación de las enzimas AMPK, AKT y eNOS (figuras 24B-D) en animales con resistencia a la insulina. Posiblemente, bajo nuestras condiciones no exista un daño lo suficientemente grande como para ser observado en este tejido, puesto que Kobayashi y col. (2004) observaron una disfunción endotelial en aortas de ratones con diabetes tipo 2 inducido por estreptozotocina en el cual concluyen que esta

disfunción es debida a los niveles altos de glucosa sanguínea y posiblemente a la disrupción de la señalización de la insulina. Ciertamente la estreptozotocina es un agente alquilante del ADN que puede producir daño en células pancreáticas y en otras células.

8.1.6.3 Efecto de la administración crónica de metformina, EGL-6M o su vehículo en animales con resistencia a la insulina sobre la expresión del receptor β_2 y la activación de las enzimas AMPK, AKT y eNOS en el corazón

Uno de los órganos más afectados durante la diabetes es el corazón, a través de la enfermedad coronaria, cardiopatía hipertensiva, miocardiopatía diabética y neuropatía autónoma cardíaca, enfermedades de una alta morbilidad y mortalidad que pueden coexistir en un mismo paciente. En nuestro estudio observamos la expresión de los receptores $\beta_{1/2}$ -adrenérgicos y de las enzimas AMPK, AKT y eNOS que pudieran estar involucradas en el desarrollo de estas enfermedades.

En animales con resistencia a la insulina no observamos cambios en la expresión de los receptores $\beta_{1/2}$ -adrenérgicos (figuras 25A y 25B). Sin embargo, no descarta su implicación en el desarrollo de enfermedades cardíacas, ya que se ha observado que puede existir una desregulación en la vía de señalización en el miocardio de ratas Zucker obesas y diabéticas sin modificar la densidad de los receptores β -adrenérgicos (Jiang *et al.*, 2015). Así mismo, observamos que el tratamiento crónico con metformina y el **EGL-6M** disminuyen la expresión de los receptores β_1 -adrenérgicos.

En ratas resistentes a la insulina se encontró disminuida la activación de la enzima AMPK (figura 25C). La activación de esta enzima en el corazón incrementa la oxidación de ácidos grasos, la captación de glucosa, así como la glicólisis. Por lo que la disminución en la actividad de esta enzima ha sido implicada en el desarrollo de falla cardíaca (Srivastava *et al.*, 2012). El tratamiento crónico con **EGL-6M** incremento la fosforilación de la AMPK en el corazón, esto podría sugerir que el

EGL-6M tendría efectos protectores parecidos a los de metformina (Dziubak *et al.*, 2017; Kinsara *et al.*, 2018).

Por otro lado, la activación de la enzima Akt, medida como la relación entre la cantidad de la proteína fosforilada y la proteína total (Akt-p(Ser473)/Akt) se encontró disminuida en animales con resistencia a la insulina. Sin embargo, se observó un incremento en la expresión de la proteína total (figura 25E). Esta sobreexpresión podría ser un método compensatorio. Sin embargo, al no encontrar un incremento en la cantidad de proteína fosforilada en el residuo de Ser473, podría indicar que no hay una activación de esta vía.

8.2FASE 2

8.2.1 Efecto de la administración crónica de 17 β -estradiol sobre las variables metabólicas

En las ratas falsamente operadas se observó un incremento en los niveles de insulina posterior a la administración de fructosa (tabla 9), además de un ligero incremento en los valores de glucosa sin alcanzar la diferencia. Resultados similares se observaron durante la curva de tolerancia a la glucosa (figura 26). Estos datos en conjunto sugieren que los animales se encuentran en un estado de resistencia a la insulina como previamente ha sido sugerido por Tobey *et al.* (Tobey *et al.*, 1982; Zavaroni *et al.*, 1980).

De manera interesante se observó un incremento en los niveles de insulina e índice HOMA-IR en los animales control a los que se les retiraron los ovarios. Estos hallazgos concuerdan con investigaciones en donde se ha observado un incremento en la resistencia a la insulina y en el deterioro del metabolismo de mujeres postmenopausicas, puesto que estas ratas emularían este estado (Hwu *et al.*, 2017; Marchi *et al.*, 2017). Además, no se observaron diferencias en los niveles de insulina plasmática e índice HOMA-IR entre los animales control y los tratados con fructosa a los que se les retiraron los ovarios.

Después de la administración crónica de estradiol por 5 semanas, no se observaron cambios en los parámetros bioquímicos determinados. Al respecto, Yamabe *et al.*

(2010) encontraron un efecto benéfico de la administración de estradiol sobre la hiperglicemia en un modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina. Aunque en principio nuestros datos difieren a los de Yamabe *et al.* (2010) el modelo de resistencia a la insulina por fructosa no se encontraron elevados (tabla 8). De hecho, esta hipótesis es reforzada durante la curva de tolerancia a la glucosa (figura 28) se observó una ligera tendencia a disminuir los valores de glucosa en los animales tratados con estradiol.

8.2.2 Efecto de la administración crónica de 17 β -estradiol sobre variables hemodinámicas

En la tabla 11 se observa que la resistencia a la insulina incrementó los valores hemodinámicos evaluados, tales como la frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM). Esto fue observado en las ratas falsamente operadas (sham), evidenciando así que el modelo de fructosa induce incrementos en los valores hemodinámicos tanto en hembras como en machos (tabla 7). Además, en los animales control a los que se le removieron los ovarios se observaron incrementos en estos valores hemodinámicos sugiriendo así que la pérdida de las hormonas sexuales afecta las respuestas cardiovasculares, como varios estudios han demostrado que tras la menopausia incrementa el riesgo cardiovascular, así como la prevalencia de hipertensión (July *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Adicional a esto, los valores de PAS incrementaron aún más en animales resistentes a la insulina, lo que sugiere que al perder el efecto protector de las hormonas femeninas los animales se vuelven más susceptibles a desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Tras la administración de estradiol, tanto en los animales control como en los animales resistentes a la insulina, los valores de presión arterial disminuyeron (tabla 12). Esto puede ser por varios mecanismos de acción se ha observado que el estradiol puede mejorar la disfunción endotelial a través de la vía Akt/eNOS (Ishihara *et al.*, 2014; Satake *et al.*, 2008) y puede disminuir el tono simpático (Acosta-Cota *et al.*, 2014). De la misma manera se ha observado que la

administración de estradiol disminuye las respuestas contráctiles inducidas por angiotensina II (Bendale *et al.*, 2013).

8.2.3 Efecto de la resistencia a la insulina sobre las respuestas cardiovasculares inducidas por la activación del sistema nervioso simpático

En ratas hembras falsamente operados se puede observar el efecto de la resistencia a la insulina sobre las respuestas vasopresoras. Así, se observó una disminución de las respuestas a la estimulación simpática, noradrenalina y UK 14,304 sin modificar las de metoxamina (figura 29). Es posible que durante la resistencia a la insulina, se observe una disfunción de la neurotransmisión simpática entre las neuronas preganglionares y postganglionares (Rudchenko *et al.*, 2014). Además, se observaron disminuciones en las respuestas a noradrenalina y UK 14,304 (agonista α_2 adrenérgico). Por lo tanto, es posible que la disminución en las respuestas a noradrenalina sea debido a una disminución en la densidad o funcionalidad de los receptores α_2 adrenérgicos. Efectos similares fueron observados las ratas ovariectomizadas pero no se encontraron diferencias cuando se compararon con los animales control ovariectomizados. Esto nos sugirió que la remoción de los ovarios afecta las respuestas cardiovasculares. Para observar estas diferencias, se compararon los grupos sham vs ovariectomizados (figura 30). De esta manera, se encontró una disminución en las respuestas inducidas por la estimulación de la fibras simpáticas y las generadas por noradrenalina. Estas modificaciones pueden deberse al incremento de los niveles de insulina tras la remoción de los ovarios observados (tabla 9). En congruencia con nuestros resultados, se ha observado que durante la menopausia hay diferencias regionales en la unión a los adrenoceptores (Berman *et al.*, 1998). Se debe admitir que con los datos obtenidos es probables que las las modificaciones se llevan acabo en la transmisión simpática y/o en los receptores adrenérgicos.

Por otro lado en las ratas falsamente operadas el tratamiento con fructosa no modificó las respuestas vasodepresoras generadas por la administración de acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina (figura 32). Esto podría sugerir que las hormonas sexuales femeninas tienen un efecto protector sobre el endotelio y el

musculo liso. Ishihara et al.(2014) demostraron una mejoría en la vía Akt tras la administración crónica de estradiol. Además, se ha observado que a largo plazo la administración de estradiol incrementa la cantidad de óxido nítrico así como la expresión de eNOS (Duckles *et al.*, 2010). Mientras que en las ratas ovariectomizadas el tratamiento con fructosa disminuyó las respuestas generadas por la administración de isoprenalina. Esto también se observó en las ratas macho (figura 20).

Al notar estas diferencias se compararon las respuestas vasodepresoras entre las ratas falsamente operadas y las ovariectomizadas. En los animales a las que se les removieron los ovarios sin resistencia a la insulina se observaron incrementos en las respuestas generadas por isoprenalina (figura 33). Al respecto es posible que el estradiol sea capaz de cambiar la densidad y/o afinidad del receptor β_2 adrenérgico, como se demostró para el receptor β_3 adrenérgico en adipocitos (Wu *et al.*, 2008).

8.2.4 Efecto de la administración de 17 β -estradiol sobre las respuestas cardiovasculares inducidas por acetilcolina, nitroprusiato de sodio e isoprenalina

En el grupo control la administración de estradiol disminuyó las respuestas generadas por la administración i.v. de noradrenalina. García-Villalón et al. (1996) demostraron que la relación de noradrenalina disminuye tras la administración de estradiol en diferentes segmentos de aortas. Por otro lado en las ratas resistentes a la insulina la administración de estradiol incrementó las respuestas generadas por la estimulación simpática revirtiendo los efectos de la resistencia a la insulina (figura 31).

Por otro lado, la administración crónica de estradiol modificó las respuestas vasodrepositoras inducidas por acetilcolina en animales control hubo un decremento mientras que en las ratas resistentes a la insulina estas respuestas aumentaron. Esto puede deberse a varios mecanismos de acción involucrados en la estimulación de los receptores en las células endoteliales. White et al. (1995) observaron un efecto relajante en arterias mediada por la apertura de los canales BKCa a través

de la activación de la guanilato ciclasa tras la administración de estradiol. Otro mecanismo que podría estar involucrado en estos cambios es la apertura de los canales K_{ATP} . Se ha observado que la interrupción de los canales de K_{ATP} disminuye la protección mediada por estrógenos en modelo isquemia (Gao *et al.*, 2014).

8.2.5 Activación de la vía Akt/eNOS

Existen varios reportes en los que la administración de estradiol incrementa la expresión y la activación de Akt y eNOS (Ishihara *et al.*, 2014; Satake *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2017); sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales no observamos cambios en la activación de la vía Akt/eNOS. Esto sugiere que las modificaciones que observamos en las respuestas cardiovasculares son debidas a otros mecanismos como pueden ser la expresión de los receptores α o β adrenérgicos o en la implicación de otros mecanismos que regulan la presión arterial (El-Mas *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2014; He *et al.*, 1998).

CAPITULO 9. CONCLUSIONES

9.1 FASE 1

La metformina y el análogo de metformina (**EGL-6M**) tienen un efecto benéfico sobre la resistencia a la insulina, puesto que los valores de índice HOMA, así como los niveles de insulina en ayuno los cuales disminuyeron después del tratamiento.

La metformina y su análogo modifican las respuestas vasopresoras inducidas por la estimulación simpática, lo que puede llevar a pensar que mejoran la transmisión del tono simpático.

Mientras que se puede observar que el tratamiento con la metformina y su análogo disminuyen las respuestas a isoprenalina; este compuesto tiene efecto sobre los receptores β , lo que sugiere que existe una modificación en estos receptores. Sin embargo, estas respuestas incrementan después de los tratamientos con metformina o con **EGL-6M**.

En vasos pequeños (arterias mesentéricas) se observan mayores cambios sobre la expresión y activación de proteínas involucradas con las respuestas cardiovasculares, las cuales son restauradas después del tratamiento crónico con metformina.

Uno de los posibles mecanismos involucrados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares durante la resistencia a la insulina es la interrupción de la vía de señalización de los receptores β_2 .

9.2 FASE 2

El estradiol pierde sus efectos benéficos sobre las respuestas cardiovasculares en el modelo de resistencia a la insulina inducida por fructosa.

La administración crónica de estradiol restaura la transmisión simpática pero no las respuestas directas sobre los vasos sanguíneos. En animales control, la administración del estradiol disminuye las respuestas vasopresoras generadas por la administración de noradrenalina.

CONCLUSIONES

La administración crónica de estradiol disminuye los valores de glucosa durante la curva de tolerancia a la glucosa.

CAPITULO 10. PERSPECTIVAS

- Elucidar posibles mecanismos de acción del análogo (**EGL-6M**) sobre las respuestas cardiovasculares, utilizando bloqueadores y antagonistas.
- Corroborar las diferencias en las respuestas cardiovasculares en el modelo de resistencia a la insulina entre machos y hembras.
- Incrementar la dosis de metformina y **EGL-6M** y observar sus efectos.
- Observar si existen diferencias en las respuestas cardiovasculares entre machos y hembras.
- Evaluar posibles modificaciones de los receptores de estradiol durante la resistencia a la insulina.

CAPITULO 11. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Cota SJ, Sánchez-López A, Molina-Muñoz T, Gómez-Viquez NL, Centurión D (2014). Evidence that chronic administration of 17 β -oestradiol decreases the vasopressor responses to adrenergic system stimulation in streptozotocin-diabetic female rats. *Steroids* **83**: 1-9.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2006). Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet. Med.* **23**(5): 469-480.

Anagnostis P, Tarlatzis BC, Kauffman RP (2017). Polycystic ovarian syndrome (PCOS): Long-term metabolic consequences. *Metabolism*.

Arunachalam G, Samuel SM, Marei I, Ding H, Triggle CR (2014). Metformin modulates hyperglycaemia-induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1. *Br. J. Pharmacol.* **171**(2): 523-535.

Bazotte RB, Silva LG, Schiavon FP (2014). Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin? *Cell cycle* **13**(16): 2494-2500.

Bellver J, Rodriguez-Tabernero L, Robles A, Munoz E, Martinez F, Landeras J, *et al.* (2017). Polycystic ovary syndrome throughout a woman's life. *J. Assist. Reprod. Genet.*

Bendale DS, Karpe PA, Chhabra R, Shete SP, Shah H, Tikoo K (2013). 17-beta Oestradiol prevents cardiovascular dysfunction in post-menopausal metabolic syndrome by affecting SIRT1/AMPK/H3 acetylation. *Br. J. Pharmacol.* **170**(4): 779-795.

Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, *et al.* (2017). Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*.

Berman DM, Nicklas BJ, Rogus EM, Dennis KE, Goldberg AP (1998). Regional differences in adrenoceptor binding and fat cell lipolysis in obese, postmenopausal women. *Metabolism*. **47**(4): 467-473.

BIBLIOGRAFÍA

Bessesen DH, Cox-York KA, Hernandez TL, Erickson CB, Wang H, Jackman MR, *et al.* (2015). Postprandial triglycerides and adipose tissue storage of dietary fatty acids: impact of menopause and estradiol. *Obesity* **23**(1): 145-153.

Bulatova IA, Shchekotova AP, Krivtsov AV, Shchekotov VV, Nasibullina NI, Suzdal'tseva KN, *et al.* (2015). [Metabolic disorder and polymorphism of the genes encoding for beta-2-adrenergic receptor and apolipoproteins B in chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver diseases]. *Klin. Med. (Mosk)*. **93**(1): 35-41.

Cabezas-Cerrato J, Araujo D (2003). Resistencia a la acción de la insulina. Evolución histórica del concepto. Técnicas para el estudio in vivo en humanos. *Endocrinología y Nutrición* **50**(12): 396-406.

Cairrao E, Alvarez E, Carvas JM, Santos-Silva AJ, Verde I (2012). Non-genomic vasorelaxant effects of 17beta-estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca²⁺ current inhibition. *Acta pharmacologica Sinica* **33**(5): 615-624.

Campanucci V, Krishnaswamy A, Cooper E (2010). Diabetes depresses synaptic transmission in sympathetic ganglia by inactivating nAChRs through a conserved intracellular cysteine residue. *Neuron* **66**(6): 827-834.

Dampney RA (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol.Rev.* **74**(2): 323-364.

Davies M, Fraser SA, Galic S, Choy SW, Katerelos M, Gleich K, *et al.* (2014). Novel mechanisms of Na⁺ retention in obesity: phosphorylation of NKCC2 and regulation of SPAK/OSR1 by AMPK. *Am J Physiol Renal Physiol* **307**(1): F96-F106.

DiNuzzo M, Mangia S, Maraviglia B, Giove F (2013). Regulatory mechanisms for glycogenolysis and K⁺ uptake in brain astrocytes. *Neurochem. Int.* **63**(5): 458-464.

Duckles SP (1986). Effects of capsaicin on vascular smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **333**(1): 59-64.

Duckles SP, Miller VM (2010). Hormonal modulation of endothelial NO production. *Pflugers Arch.* **459**(6): 841-851.

BIBLIOGRAFÍA

Dunaif A (1997). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr. Rev.* **18**(6): 774-800.

Dziubak A, Wojcicka G (2017). The pathophysiological basis of the protective effects of metformin in heart failure. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **71**(1): 773-787.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* **365**(9468): 1415-1428.

El-Mas MM, Abdel-Rahman AA (2004). Differential modulation by estrogen of alpha2-adrenergic and I1-imidazoline receptor-mediated hypotension in female rats. *J. Appl. Physiol.* **97**(4): 1237-1244.

Eringa EC, Serne EH, Meijer RI, Schalkwijk CG, Houben AJ, Stehouwer CD, *et al.* (2013). Endothelial dysfunction in (pre)diabetes: characteristics, causative mechanisms and pathogenic role in type 2 diabetes. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **14**(1): 39-48.

Ewart MA, Kennedy S (2011). AMPK and vasculoprotection. *Pharmacol. Ther.* **131**(2): 242-253.

Forlivesi S, Micheletti N, Tomelleri G, Bovi P, Cappellari M (2017). Association of hyperglycemia, systolic and diastolic hypertension, and hyperthermia relative to baseline in the acute phase of stroke with poor outcome after intravenous thrombolysis. *Blood Coagul. Fibrinolysis.*

Gao J, Xu D, Sabat G, Valdivia H, Xu W, Shi NQ (2014). Disrupting KATP channels diminishes the estrogen-mediated protection in female mutant mice during ischemia-reperfusion. *Clinical proteomics* **11**(1): 19.

Garcia-Villalon AL, Buchholz JN, Krause DN, Duckles SP (1996). Sex differences in the effects of 17 β -estradiol on vascular adrenergic responses. *Eur. J. Pharmacol.* **314**(3): 339-345.

Ge XH, Zhu GJ, Geng DQ, Zhang HZ, He JM, Guo AZ, *et al.* (2017). Metformin protects the brain against ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt1/JNK3 signaling pathways in rats. *Physiol. Behav.* **170**: 115-123.

BIBLIOGRAFÍA

Gillespie JS, MacLaren A, Pollock D (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *Br. J. Pharmacol.* **40**(2): 257-267.

Gonzalez Jimenez E (2013). Obesity: etiologic and pathophysiological analysis. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición* **60**(1): 17-24.

Gutierrez-Lara E, Mart, #xed, nez-Conde C, Rosales-Ortega E, Ram, *et al.* (2017). Synthesis and In Vitro AMPK Activation of Cycloalkyl/Alkarylbiguanides with Robust In Vivo Antihyperglycemic Action. *Journal of Chemistry* **2017**: 8.

Gutierrez-Lara EJ Caracterización química y farmacodinámica de análogos cíclicos y aromáticos de Metformina. Master Master, Universidad Autónoma del Estado de Morelos México, 2014.

Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews. Neuroscience* **7**(5): 335-346.

Hall JE (2011). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica* 12 edn. Elsevier Health Sciences.

Hallows KR, Mount PF, Pastor-Soler NM, Power DA (2010). Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**(5): F1067-1077.

Han Y, Li X, Zhou S, Meng G, Xiao Y, Zhang W, *et al.* (2012). 17 β -estradiol antagonizes the down-regulation of ER α /NOS-3 signaling in vascular endothelial dysfunction of female diabetic rats. *PLoS one* **7**(11): e50402.

He XR, Wang W, Crofton JT, Share L (1998). Effects of 17 β -estradiol on sympathetic activity and pressor response to phenylephrine in ovariectomized rats. *Am. J. Physiol* **275**(4 Pt 2): R1202-R1208.

Himsworth HP (2011). Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *Diabet. Med.* **28**(12): 1440-1444.

BIBLIOGRAFÍA

Ho WS (2013). Modulation by 17 β -estradiol of anandamide vasorelaxation in normotensive and hypertensive rats: A role for TRPV1 but not fatty acid amide hydrolase. *Eur. J. Pharmacol.* **701**(1-3): 49-56.

Huang PL (2009). eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **20**(6): 295-302.

Hwu CM, Lin YC, Lin KH (2017). beta-Cell function in postmenopausal women with isolated post-challenge hyperglycemia. *Journal of diabetes.*

Ishihara Y, Fujitani N, Kawami T, Adachi C, Ishida A, Yamazaki T (2014). Suppressive effects of 17beta-estradiol on tributyltin-induced neuronal injury via Akt activation and subsequent attenuation of oxidative stress. *Life Sci.* **99**(1-2): 24-30.

Jiang C, Carillion A, Na N, De Jong A, Feldman S, Lacorte JM, *et al.* (2015). Modification of the beta-Adrenoceptor Stimulation Pathway in Zucker Obese and Obese Diabetic Rat Myocardium. *Crit. Care Med.* **43**(7): e241-249.

Johnson AM, Olefsky JM (2013). The origins and drivers of insulin resistance. *Cell* **152**(4): 673-684.

July M, Faiz S, Yaqub A, Santhanam P, Douglas J, Stanek R, *et al.* (2017). Role of adipokines and inflammatory markers in postmenopausal hypertension. *Minerva Endocrinol.*

Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig M, Miller AW (2000). Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. *Hypertension* **35**(1 Pt 1): 108-112.

Kibel A, Selthofer-Relatic K, Drenjancevic I, Bacun T, Bosnjak I, Kibel D, *et al.* (2017). Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus. *J. Int. Med. Res.* **45**(6): 1901-1929.

Kinsara AJ, Ismail YM (2018). Metformin in heart failure patients. *Indian Heart J.* **70**(1): 175-176.

Klabunde R (2012). *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2° edn.

BIBLIOGRAFÍA

Klein JD, Wang Y, Blount MA, Molina PA, LaRocque LM, Ruiz JA, *et al.* (2016). Metformin, an AMPK activator, stimulates the phosphorylation of aquaporin 2 and urea transporter A1 in inner medullary collecting ducts. *Am J Physiol Renal Physiol* **310**(10): F1008-1012.

Kleinman LI, Radford EP, Jr. (1964). Ventilation standards for small mammals. *J. Appl. Physiol.* **19**: 360-362.

Kobayashi T, Taguchi K, Yasuhiro T, Matsumoto T, Kamata K (2004). Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. *Hypertension* **44**(6): 956-962.

Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP (2010). Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome--causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* **126**(2): 159-172.

Lazo-Fernandez Y, Baile G, Meade P, Torcal P, Martinez L, Ibanez C, *et al.* (2017). Kidney-specific genetic deletion of both AMPK alpha-subunits causes salt and water wasting. *Am J Physiol Renal Physiol* **312**(2): F352-F365.

Lee JM, Peuler JD (2001). A possible indirect sympathomimetic action of metformin in the arterial vessel wall of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* **69**(9): 1085-1092.

Limberg JK, Morgan BJ, Sebranek JJ, Proctor LT, Walker BJ, Eldridge MW, *et al.* (2012). Altered neurovascular control of the resting circulation in human metabolic syndrome. *The Journal of physiology* **590**(23): 6109-6119.

Lobato NS, Filgueira FP, Hagihara GN, Akamine EH, Pariz JR, Tostes RC, *et al.* (2012). Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. *Life Sci.* **90**(5-6): 228-235.

Lunder M, Janic M, Sabovic M (2018). Prevention of vascular complications in diabetes mellitus patients: focus on the arterial wall. *Current vascular pharmacology.*

Majithiya JB, Balaraman R (2006). Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* **78**(22): 2615-2624.

BIBLIOGRAFÍA

Mancia G, Bousquet P, Elghozi JL, Esler M, Grassi G, Julius S, *et al.* (2007). The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J. Hypertens.* **25**(5): 909-920.

Mangmool S, Denkaew T, Parichatikanond W, Kurose H (2017). beta-Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart. *Biomolecules & therapeutics* **25**(1): 44-56.

Marchi R, Dell'Agnolo CM, Lopes TCR, Gravena AAF, Demitto MO, Brischiliari SCR, *et al.* (2017). Prevalence of metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. *Archives of endocrinology and metabolism* **61**(2): 160-166.

Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML (1997). Sympathetic nerve hyperactivity precedes hyperinsulinemia and blood pressure elevation in a young, nonobese Japanese population. *Am. J. Hypertens.* **10**(1): 77-83.

Mather KJ, Verma S, Anderson TJ (2001). Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**(5): 1344-1350.

Matsumoto T, Noguchi E, Ishida K, Kobayashi T, Yamada N, Kamata K (2008). Metformin normalizes endothelial function by suppressing vasoconstrictor prostanoids in mesenteric arteries from OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**(3): H1165-H1176.

Matsumoto T, Wakabayashi K, Kobayashi T, Kamata K (2004). Alterations in vascular endothelial function in the aorta and mesenteric artery in type II diabetic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **82**(3): 175-182.

McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN, Kontos HA (1999). Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* **30**(10): 2186-2190.

Mercurio V, Carlomagno G, Fazio V, Fazio S (2012). Insulin resistance: Is it time for primary prevention? *World journal of cardiology* **4**(1): 1-7.

Milligan G, Shimpukade B, Ulven T, Hudson BD (2017). Complex Pharmacology of Free Fatty Acid Receptors. *Chem. Rev.* **117**(1): 67-110.

BIBLIOGRAFÍA

Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M (2007). Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin. Chim. Acta* **375**(1-2): 20-35.

Morrow VA, Fougere F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP (2003). Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**(34): 31629-31639.

Motta VF, Bargut TL, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA (2017). Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue and skeletal muscle. *J Appl Physiol (1985)*: jap 00154 02017.

Mundinger TO, Cooper E, Coleman MP, Taborsky GJ, Jr. (2015). Short-term diabetic hyperglycemia suppresses celiac ganglia neurotransmission, thereby impairing sympathetically mediated glucagon responses. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **309**(3): E246-255.

Nakamura K, Fuster JJ, Walsh K (2014). Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J. Cardiol.* **63**(4): 250-259.

Oates JA (1995). Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension. In: Hardman JG, Limbird L (ed) (eds). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edn. New York: McGrawHill. p^pp 780-808.

Ostenson CG (2001). The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol. Scand.* **171**(3): 241-247.

Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Legrand A, Beaudoux JL (2005). Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism.* **54**(6): 829-834.

Palastanga N, Field D, Soames R (2007). *Anatomía y movimiento humano. Estructura y funcionamiento.* edn.

Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F (2013). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur. Heart J.* **34**(31): 2436-2443.

Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, *et al.* (2005). The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* **67**(4): 604-612.

Pulinilkunnil T, He H, Kong D, Asakura K, Peroni OD, Lee A, *et al.* (2011). Adrenergic regulation of AMP-activated protein kinase in brown adipose tissue in vivo. *J. Biol. Chem.* **286**(11): 8798-8809.

Puyo AM, Borroni JS, Boudou S, Santander Y, Carranza A, Donoso AS, *et al.* (2012). Metformin reduces vascular production of vasoconstrictor prostanoids in fructose overloaded rats. *Auton Autacoid Pharmacol* **32**(1 Pt 2): 9-14.

Rasquin Leon LI, Mayrin JV (2017). Polycystic Ovarian Disease (Stein-Leventhal Syndrome). In: (ed)^(eds). *StatPearls*, edn. Treasure Island (FL). p^pp.

Reaven GM (1993). Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu. Rev. Med.* **44**: 121-131.

Regensteiner JG, Golden S, Huebschmann AG, Barrett-Connor E, Chang AY, Chyun D, *et al.* (2015). Sex Differences in the Cardiovascular Consequences of Diabetes Mellitus: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **132**(25): 2424-2447.

Reslan OM, Yin Z, do Nascimento GR, Khalil RA (2013). Subtype-specific estrogen receptor-mediated vasodilator activity in the cephalic, thoracic, and abdominal vasculature of female rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **62**(1): 26-40.

Rochette L, Lorin J, Zeller M, Guillard JC, Lorgis L, Cottin Y, *et al.* (2013). Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? *Pharmacol. Ther.*

Rudchenko A, Akude E, Cooper E (2014). Synapses on sympathetic neurons and parasympathetic neurons differ in their vulnerability to diabetes. *J. Neurosci.* **34**(26): 8865-8874.

Samuel VT, Shulman GI (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**(5): 852-871.

BIBLIOGRAFÍA

Sartoretto JL, Melo GA, Carvalho MH, Nigro D, Passaglia RT, Scavone C, *et al.* (2005). Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sci.* **77**(21): 2676-2689.

Satake A, Takaoka M, Nishikawa M, Yuba M, Shibata Y, Okumura K, *et al.* (2008). Protective effect of 17beta-estradiol on ischemic acute renal failure through the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Kidney Int.* **73**(3): 308-317.

Schalkwijk CG, Stehouwer CD (2005). Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin. Sci. (Lond.)* **109**(2): 143-159.

Scheen AJ (2003). Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin. Belg.* **58**(6): 335-341.

Sena CM, Matafome P, Louro T, Nunes E, Fernandes R, Seica RM (2011). Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* **163**(2): 424-437.

Seok YM, Jang EJ, Reiser O, Hager M, Kim IK (2012). 17 β -Estradiol induces vasorelaxation in a G-protein-coupled receptor 30-independent manner. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **385**(9): 945-948.

Sesti G (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **20**(4): 665-679.

Sharma N, Lee J, Youssef I, Salifu MO, McFarlane SI (2017). Obesity, Cardiovascular Disease and Sleep Disorders: Insights into the Rising Epidemic. *Journal of sleep disorders & therapy* **6**(1).

Shibley RE, Tilden JH (1947). A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **64**: 453-455.

Silverthorn DU (2008). *Fisiología Humana. Un enfoque integrado*. 4to edn.

Sommese L, Valverde CA, Blanco P, Castro MC, Rueda OV, Kaetzel M, *et al.* (2016). Ryanodine receptor phosphorylation by CaMKII promotes spontaneous Ca(2+)

release events in a rodent model of early stage diabetes: The arrhythmogenic substrate. *Int. J. Cardiol.* **202**: 394-406.

Srivastava RA, Pinkosky SL, Filippov S, Hanselman JC, Cramer CT, Newton RS (2012). AMP-activated protein kinase: an emerging drug target to regulate imbalances in lipid and carbohydrate metabolism to treat cardio-metabolic diseases. *J. Lipid Res.* **53**(12): 2490-2514.

Stitham J, Hwa J (2016). Prostacyclin, Atherothrombosis and Diabetes Mellitus: Physiologic and Clinical Considerations. *Current molecular medicine* **16**(4): 328-342.

Taguchi K, Kobayashi T, Takenouchi Y, Matsumoto T, Kamata K (2011). Angiotensin II causes endothelial dysfunction via the GRK2/Akt/eNOS pathway in aortas from a murine type 2 diabetic model. *Pharmacol. Res.* **64**(5): 535-546.

Taguchi K, Morishige A, Matsumoto T, Kamata K, Kobayashi T (2012). Enhanced estradiol-induced vasorelaxation in aortas from type 2 diabetic mice may reflect a compensatory role of p38 MAPK-mediated eNOS activation. *Pflugers Arch.* **464**(2): 205-215.

Tang Q, Li X, Song P, Xu L (2015). Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug discoveries & therapeutics* **9**(6): 380-385.

Thackeray JT, Radziuk J, Harper ME, Suuronen EJ, Asch KJ, Beanlands RS, *et al.* (2011). Sympathetic nervous dysregulation in the absence of systolic left ventricular dysfunction in a rat model of insulin resistance with hyperglycemia. *Cardiovascular diabetology* **10**: 75.

Tiano JP, Mauvais-Jarvis F (2012). Importance of oestrogen receptors to preserve functional beta-cell mass in diabetes. *Nature reviews. Endocrinology* **8**(6): 342-351.

Tobey TA, Mondon CE, Zavaroni I, Reaven GM (1982). Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Metabolism.* **31**(6): 608-612.

Verma S, Yao L, Dumont AS, McNeill JH (2000). Metformin treatment corrects vascular insulin resistance in hypertension. *J. Hypertens.* **18**(10): 1445-1450.

Villamil-Hernández MT, Alcántara-Vázquez O, Sánchez-López A, Centurión D (2013). The α_2 -adrenoceptors mediating inhibition of the vasopressor sympathetic outflow in pithed rats: pharmacological correlation with α_{2A} , α_{2B} and α_{2C} subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* **718**(1-3): 245-252.

White RE, Darkow DJ, Lang JL (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ. Res.* **77**(5): 936-942.

Wiernsperger NF, Bailey CJ (1999). The Antihyperglycaemic Effect of Metformin. *Drugs* **58**(1): 31-39.

Wilson PW, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB (2002). Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch. Intern. Med.* **162**(16): 1867-1872.

Wolfensohn S, Lloyd M, (2013). *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. 4th edn. Wiley-Blackwell: Oxford, UK.

Wong WT, Tian XY, Huang Y (2013). Endothelial dysfunction in diabetes and hypertension: cross talk in RAS, BMP4, and ROS-dependent COX-2-derived prostanoids. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **61**(3): 204-214.

Wu C, Yan D, Lu D, Han T, Zhao B (2017). Alteration of the PI3K/Akt signaling pathway by swainsonine affects 17 β -Estradiol secretion in ovary cells. *Theriogenology* **103**: 123-129.

Wu Q, Zhao Z, Sun H, Hao YL, Yan CD, Gu SL (2008). Oestrogen changed cardiomyocyte contraction and beta-adrenoceptor expression in rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Exp. Physiol.* **93**(9): 1034-1043.

Xu Q, Si LY (2010). Protective effects of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**(11): 2604-2613.

Yamabe N, Kang KS, Zhu BT (2010). Beneficial effect of 17 β -estradiol on hyperglycemia and islet beta-cell functions in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **249**(1): 76-85.

BIBLIOGRAFÍA

Yang L, Lin L, Kartsonaki C, Guo Y, Chen Y, Bian Z, *et al.* (2017). Menopause Characteristics, Total Reproductive Years, and Risk of Cardiovascular Disease Among Chinese Women. *Circulation. Cardiovascular quality and outcomes* **10**(11).

Yin D, Wang Q, Zhou X, Li Y (2017). Endothelial dysfunction in renal arcuate arteries of obese Zucker rats: The roles of nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factors, and calcium-activated K⁺ channels. *PloS one* **12**(8): e0183124.

Yin QQ, Pei JJ, Xu S, Luo DZ, Dong SQ, Sun MH, *et al.* (2013). Pioglitazone improves cognitive function via increasing insulin sensitivity and strengthening antioxidant defense system in fructose-drinking insulin resistance rats. *PloS one* **8**(3): e59313.

Zavaroni I, Sander S, Scott S, Reaven GM (1980). Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism*. **29**(10): 970-973.

Zhang Y, Davidge ST (1999). Effect of estrogen replacement on vasoconstrictor responses in rat mesenteric arteries. *Hypertension* **34**(5): 1117-1122.

Zipes Douglas P., Libby Peter BRO, Mann Douglas L., Tomaselli Gordon F *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. 11th edn.

CAPITULO 12. ARTÍCULO DERIVADO DEL PROYECTO

European Journal of Pharmacology 814 (2017) 313–323



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Cardiovascular pharmacology

Pharmacological evaluation of metformin and *N*-benzylbiguanide, a novel analogue of metformin, on the vasopressor responses to adrenergic system stimulation in pithed rats with fructose-induced insulin resistanceErika J. Gutiérrez-Lara^a, Gabriel Navarrete-Vázquez^b, Araceli Sánchez-López^a, David Centurión^{a,*}^a Departamento de Farmacobiología, Cinvestav Unidad Coapa, Czada. de los Tenorios 235, Col. Granjas-Coapa, Deleg. Tlalpan, C.P. 14330 México City, Mexico^b Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209 Cuernavaca Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Galamine triethiodide (Pub Chem CID: 6172)

UK 14,304 (Pub Chem CID: 2435)

(±) Noradrenaline birtartrate salt (Pub Chem

CID: 5813)

Methoxamine hydrochloride (Pub Chem CID:

6081)

Metformin hydrochloride (Pub Chem CID:

14219)

Keywords:

Metformin

Vasopressor responses

Insulin resistance

ABSTRACT

Metformin has been associated with cardioprotection, vasorelaxation and normalization of endothelial function during type 2 Diabetes Mellitus. However, few studies have analysed its effects on vascular adrenergic system. Our study has evaluated the vasopressor responses induced by sympathetic stimulation or by i.v. bolus injections of the agonists noradrenaline ($\alpha_{1/2}$), methoxamine (α_1) and UK 14,304 (α_2) in rats with fructose-induced insulin resistance chronically pretreated with either metformin or EGL-6M (*N*-benzylbiguanide), a novel analogue of metformin. Rats were treated with fructose (15%) or tap water (control) during 16 weeks. Next, both groups were treated daily during 4 weeks with: (1) vehicle; (2) metformin (50 mg/kg); or (3) EGL-6M (50 mg/kg). Blood glucose and plasma insulin were determined before and after administration of glucose during oral glucose tolerance test. Animals treated with fructose showed hyperinsulinemia and insulin resistance, which were decreased by metformin and EGL-6M. In animals treated with fructose, the vasopressor responses induced by: (1) sympathetic stimulation were decreased; (2) noradrenaline were increased; and (3) methoxamine and UK 14,304 remained unaffected compared with control group. In control animals, metformin failed to modify the vasopressor responses analysed, while EGL-6M increased the vasopressor responses to sympathetic stimulation. In rats treated with fructose, metformin decreased vasopressor response to noradrenaline but did not modify the sympathetic stimulation responses. EGL-6M increased the vasopressor responses to sympathetic stimulation without modifying those to noradrenaline, methoxamine or UK 14,304. Collectively, these data suggest that EGL-6M is capable to increase insulin sensitivity and the vasopressor sympathetic outflow in rats.

1. Introduction

Diabetes Mellitus is a strong risk factor to the development of cardiovascular diseases including hypertension, myocardial infarct and stroke (Benjamin et al., 2017). Insulin resistance is a metabolic condition in which the physiological effects of insulin are diminished. Insulin resistance is offset by an increase in the secretion by pancreatic beta cells (hyperinsulinemia) (Mercurio et al., 2012; Sesti, 2006) and normal blood glucose levels. During insulin resistance and hyperinsulinemia, insulin is not high enough to regulate the glucose metabolism. For that reason, glucose cannot be used by peripheral tissues and hepatic gluconeogenesis is increased. In consequence, it causes increases in plasma levels of glucose (Bazotte et al., 2014). Insulin resistance plays an important role in the beginning and development of several diseases such as obesity, dyslipidemia, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus

and cardiovascular diseases (Sesti, 2006).

The sympathetic nervous system is also altered during insulin resistance and metabolic syndrome (Lambert et al., 2010). In streptozotocin-diabetic rats, an increase of noradrenaline concentrations in plasma and cardiomyocytes has been demonstrated (Thackeray et al., 2013). Furthermore, Tran et al. (2014) demonstrated that activation of α_1 -adrenoceptor was necessary for the development of hypertension in fructose-induced insulin resistance.

Despite metformin is the most used antidiabetic drug and improves cardiovascular function, the mechanisms underlying the cardiovascular effects have received limited attention in comparison to its anti-diabetic effect. In this respect, several studies have suggested that metformin modifies the sympathetic nervous system: (1) metformin decreased renal sympathetic nerve activity and blood pressure in spontaneous hypertensive rats (Petersen and DiBona, 1996) which may imply

* Corresponding author.

E-mail address: dcenturi@cinvestav.mx (D. Centurión).URL: <http://farmacobiologia.cinvestav.mx/PersonalAcad%C3%A9mico/DrDavidCenturi%C3%B3nPacheco> (D. Centurión).<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.08.044>

Received 26 June 2017; Received in revised form 24 August 2017; Accepted 25 August 2017

Available online 07 September 2017

0014-2999/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

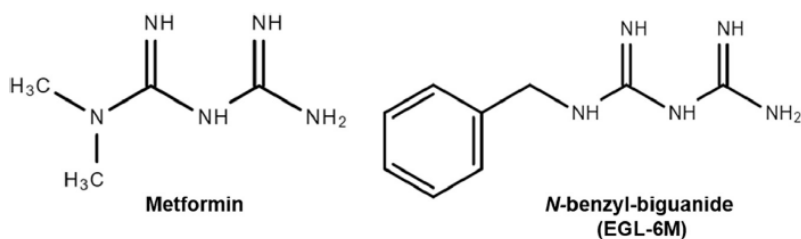


Fig. 1. Chemical structures of metformin and EGL-6M.

inhibition of ganglionic neurotransmission (Petersen et al., 1997); (2) acute i.v. administration of metformin increased plasma concentrations of adrenaline and noradrenaline (Peuler, 1999); (3) metformin has a sympathomimetic action in SHR isolated tail artery (Lee and Peuler, 2001); (4) Muntzel et al. (1997) demonstrated that metformin decreased mean blood pressure which is sensitive to phentolamine ($\alpha_{1/2}$ -adrenoceptor antagonist); and (5) metformin significantly diminished noradrenaline-induced contraction in rat aorta (Majithiya et al., 2006).

Currently, metformin is the unique anti-hyperglycemic biguanide available in the market for the treatment of type 2 diabetes mellitus since phenformin and buformin were withdrawn due to high risk of lactic acidosis. For this reason, novel biguanides better tolerated that activate the same mechanisms of action with lesser adverse effects are needed.

Considering the above findings, this study investigated the effect of chronic administration of a novel analogue of metformin, *N*-benzylbiguanide (EGL-6M; Fig. 1), and metformin, on the vasopressor responses induced by stimulation of the vasopressor sympathetic outflow or stimulation of α_1 - and α_2 -adrenoceptors by using several adrenergic related drugs in pithed rats with insulin resistance induced by fructose. A preliminary account of this investigation was presented at 2016 Experimental Biology Meeting (Gutiérrez-Lara et al., 2016).

2. Material and methods

2.1. Animals

36 (200–220 g) and 12 (250–300 g) male Wistar rats were housed in plastic cages and maintained under standardized condition ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 50% humidity and 12/12-h light-dark cycle) and provided with food and water ad libitum. All animal procedures and the protocols of the present study were approved by our Institutional Ethics Committee (Cicual-Cinvestav) following the regulations established by the Mexican Official Norm for the Use and Welfare of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999), in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in U.S.A. (2016).

2.2. Induction of insulin resistance and administration of vehicle, metformin or EGL-6M

36 animals were randomly selected and divided into two groups (Group 1 and Group 2). Group 1 ($n = 18$) was fed with a regular diet and filtered tap water ad libitum for 16 weeks while Group 2 ($n = 18$) was fed with regular diet and fructose solution (15% w/v) during 16 weeks. Next, both groups were subdivided into three subgroups ($n = 6$ each) which received p.o. administration during four weeks of: (i) vehicle (distilled water; 1 ml/kg-day); (ii) metformin (50 mg/kg-day) or (iii) EGL-6M (50 mg/kg-day) (see Fig. 2B).

2.3. Biochemical measurements

Fasting blood glucose and triglycerides levels were determined at the 16 and 20 weeks, i.e., before and after treatment with metformin, EGL-6M or vehicle (see Fig. 2A) through glucometer (AccuCheck® and Accutrend® Plus; Roche of Mexico). Plasma insulin levels were

measured after administration of glucose (1 g/kg, p.o.) with rat insulin ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) kit from ALPCO (Salem, NH, USA). Absorbance of enzymatic reaction was quantified at 450 nm. All determinations were performed by duplicate and a standard curve was included in each experiment as suggested by the provider.

2.4. Oral glucose tolerance test

After 16 weeks of treatment with fructose or water, animals were fasted for 12 h. Subsequently, tail blood samples were collected at 0 min (before) and 5, 10, 15, 30, 60 min after administration of glucose (1 g/kg, p.o.) for insulin plasma levels. Blood samples were collected at the same time for blood glucose levels including 90, 120 and 150 min. This procedure was repeated after treatment with vehicle, metformin or EGL-6M (week 20) (see Fig. 2A).

2.5. Measurement of arterial blood pressure and heart rate in conscious animals

Heart rate and arterial blood pressure were measured by a tail-cuff method using a LE 5001 automatic blood pressure recorder (Leticia1, PanLab, Barcelona, Spain). Measurements were performed before (week 16) and after (week 20) treatment with vehicle, metformin or EGL-6M (see Fig. 2A).

2.6. Evaluation of the vasopressor responses in pithed rats

At the end of the pharmacological treatment with metformin, EGL-6M or vehicle, rats were anesthetized with isoflurane (3%) and a tracheostomy was performed. The central nervous system was destroyed by inserting a stainless-steel rod in the brain through the ocular orbit until *foramen magnum* and into the *vertebral foramen* (Villamil-Hernández et al., 2013). Then, the rats were ventilated artificially with a positive pressure pump (7025 rodent ventilator, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy) at 56 strokes/min and a stroke volume of 20 ml/kg (Kleinman and Radford, 1964).

After bilateral cervical vagosympathectomy, catheters were placed in: (1) left and right femoral veins for administration of drugs or compounds; and (2) left carotid artery. This catheter was connected to a pressure transducer (P23 XL, Grass Technologies, Warwick, RI, U.S.A.) to measure the arterial blood pressure and heart rate. These parameters were recorded simultaneously using a data acquisition unit (MP150A-CE, Biopac Systems Inc., Goleta, CA) and Acknowledge software v3.8.1 (Biopac Systems Inc., Goleta, CA). Diastolic blood pressure was determined because this is the blood pressure when the left ventricle is relaxed and thus could indirectly represent the systemic vascular resistance that regulates arterial blood pressure and blood flow within organs.

2.6.1. Stimulation of the vasopressor sympathetic outflow

After surgical intervention, the hemodynamic variables were stabilized and the stainless-steel rod was replaced by an enamelled electrode except for 1 cm long section 9 cm from the tip. The uncovered segment was situated at the T₇-T₉ region of the spinal cord to allow for selective stimulation of the sympathetic vasopressor outflow (Gillespie and Muir,

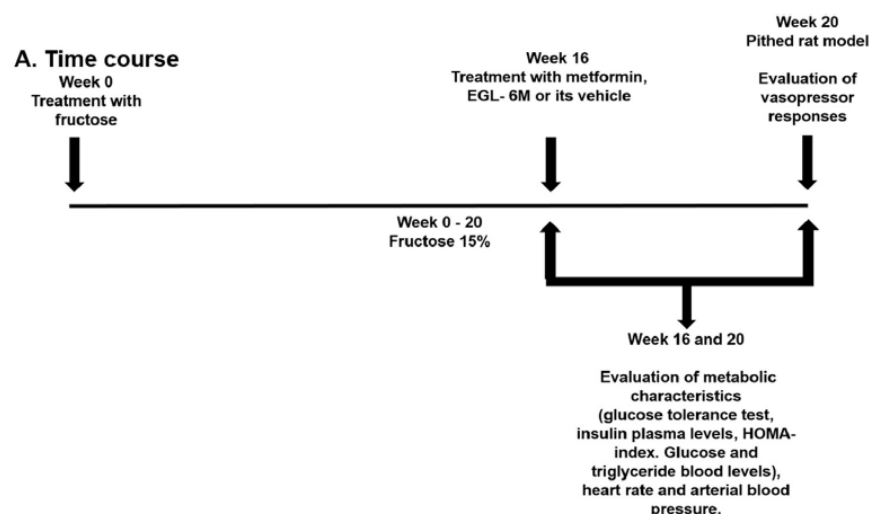


Fig. 2. (A) Time course. (B) Experimental protocol in pithed rats.

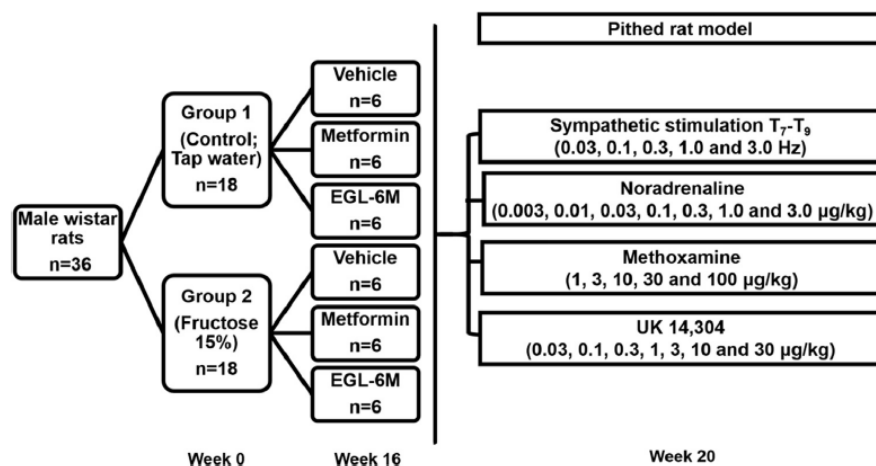
B. Experimental protocol

Table 1
Effect of vehicle (tap water, control) or fructose 15% (16 weeks) on biochemical parameters and body weight.

Group	Week 16				
	Glucose (mmol/l)	Insulin (µU/ml)	HOMA-index	Triglycerides (mg/dl)	Body weight (kg)
Control	5.52 ± 0.15	7.59 ± 0.89	1.77 ± 0.23	142 ± 7	0.46 ± 0.01
Fructose	4.79 ± 0.12 ^a	17.27 ± 2.66 ^a	5.25 ± 1.6 ^a	177 ± 6 ^a	0.54 ± 0.02 ^a

^a P < 0.05 vs control.

1967). Before electrical stimulation, the rats received gallamine (25 mg/kg, i.v.) to avoid twitches induced by electrical stimulation. 30 min after surgery the hemodynamic conditions stabilized and baseline values of diastolic pressure and heart rate were determined. Next, the preganglionic vasopressor sympathetic outflow was stimulated with a S88X square pulse stimulator (Grass Technologies, Warwick, RI, U.S.A.) by applying 10 s trains of monophasic, rectangular pulses (2 ms, 60 V), at increasing frequencies of stimulation (0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 Hz). An SIU-V isolation unit (Grass Technologies, Warwick, RI, U.S.A.) was used to minimize artefacts resulting from the stimuli. When blood pressure returned to baseline levels, the next frequency was applied; this procedure was performed systematically until the stimulus-response curve was completed (about 30 min).

2.7. Experimental protocol

The vasopressor responses induced by sympathetic stimulation (as described above) or i.v. bolus injections of the adrenoceptor agonists: (1) exogenous noradrenaline (endogenous ligand; 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 µg/kg), (2) methoxamine (α_1 -adrenoceptor; 1, 3, 10, 30 and 100 µg/kg) and (3) UK 14,304 (α_2 -adrenoceptor; 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 and 30 µg/kg) were determined in all groups (Fig. 2B).

2.8. Anesthetized rats

For this protocol 12 male Wistar rats (250–300 g) were used. Animals were anesthetized with ketamine (37.5 mg/kg) and xylazine

Table 2

Effect of p.o. administration of vehicle (1 ml/kg/day), metformin (50 mg/kg/day) or EGL-6M (50 mg/kg/day) during 4 weeks in animals treated with either tap water (group 1) or fructose 15% (group 2) on blood glucose, insulin plasma, HOMA-index, triglycerides and body weight.

	Glucose (mmol/l)	Insulin (μ UI/ml)	HOMA-index	Triglycerides (mg/dl)	Body weight (kg)
			Group 1 (Control)		
Vehicle	5.09 \pm 0.31	6.81 \pm 1.41	1.63 \pm 0.71	145 \pm 5	0.48 \pm 0.02
Metformin	5.26 \pm 0.19	7.43 \pm 1.00	1.64 \pm 0.32	136 \pm 4	0.47 \pm 0.02
EGL-6M	5.76 \pm 0.21	7.43 \pm 1.52	1.94 \pm 0.45	131 \pm 12	0.45 \pm 0.02
			Group 2 (Fructose)		
Vehicle	5.52 \pm 0.31	34.64 \pm 4.13 ^a	8.21 \pm 1.00 ^a	143 \pm 15	0.55 \pm 0.02
Metformin	4.53 \pm 0.92	4.53 \pm 0.92 ^b	0.95 \pm 0.16 ^b	164 \pm 13	0.57 \pm 0.05
EGL-6M	5.00 \pm 0.21	16.93 \pm 3.07 ^b	3.81 \pm 1.06 ^b	176 \pm 15	0.56 \pm 0.04

^a P < 0.05 vs control-vehicle.

^b P < 0.05 vs fructose-vehicle.

Table 3

Effect of fructose 15% (16 weeks) on hemodynamic variables. Heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP) and mean blood pressure (MBP).

Week 16				
Group	HR (BPM)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	MBP (mmHg)
Control	418 \pm 10	113 \pm 2	86 \pm 3	95 \pm 2
Fructose	431 \pm 8	134 \pm 3 ^a	109 \pm 2 ^a	117 \pm 2 ^a

^a P < 0.05 vs control.

Table 4

Effect of p.o. administration of vehicle (1 ml/kg/day), metformin (50 mg/kg/day) or EGL-6M (50 mg/kg/day) during 4 weeks in animals treated with either tap water (group 1) or fructose 15% (16 weeks; group 2) on hemodynamic variables.

Week 20				
	HR (BPM)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	MBP (mmHg)
			Group 1 (Control)	
Vehicle	438 \pm 10	108 \pm 3	74 \pm 3	83 \pm 3
Metformin	447 \pm 10	116 \pm 2 ^a	90 \pm 3 ^a	97 \pm 2 ^a
EGL-6M	401 \pm 13 ^a	124 \pm 5 ^a	84 \pm 4 ^a	97 \pm 4 ^a
			Group 2 (Fructose)	
Vehicle	382 \pm 12	130 \pm 7	108 \pm 5	115 \pm 6
Metformin	394 \pm 22	145 \pm 9	118 \pm 6	127 \pm 7
EGL-6M	405 \pm 14	147 \pm 5 ^b	121 \pm 5	129 \pm 5

^a P < 0.05 vs group 1 + vehicle.

^b P < 0.05 vs group 2 + vehicle.

(5 mg/kg). The state of anaesthesia was monitored regularly by evaluating withdrawal response to a noxious stimulus (tail pinch). The trachea was cannulated to ventilated artificially with a positive pressure pump at 56 strokes/min and a stroke volume of 20 ml/kg (Kleinman and Radford, 1964). Two catheters were placed in: 1) carotid artery to measure blood pressure and cardiac frequency and 2) femoral vein for drug or compounds administration. Next, the cardiovascular responses induced by i.v. bolus injections of metformin and EGL-6M (1, 3, 10, 30, 100 and 300 mg/kg) were evaluated.

2.9. Drugs or compounds

In addition to the anaesthetics isoflurane (Fluriso™, Vet One®, Boise, ID, USA), ketamine (Anesket®, PiSA®, Hgo., Mexico) and xylazine (Procin®, PiSA®, Hgo., Mexico) the following compounds were used in this study: gallamine triethiodide, (\pm)-noradrenaline bitartrate, methoxamine hydrochloride, 5-Bromo-N-(2-imidazolyl)-6-quinoloxalinamine (UK 14,304), 1,1-dimethylbiguanide hydrochloride (metformin) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), crystalline fructose (KRYSTAR®, Tate and Lyle). N-benzylbiguanide (EGL-6M) was synthesized and chemically characterized at the Laboratory of Medicinal Chemistry, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del

Estado de Morelos (Gutiérrez-Lara, 2014) (Fig. 1).

All compounds were dissolved in saline solution except for UK 14,304, which was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) 10%. This vehicle had no significant effect on hemodynamic variables (data not shown).

2.10. Statistical analysis

All results are presented as mean \pm S.E.M. The maximum change in diastolic blood pressure generated by sympathetic stimulation or by i.v. bolus injections of the adrenoceptor agonists were determined. Statistical significance was calculated using Tukey's test, once two-way repeated measures analysis of variance (randomized block design) had revealed that the samples represent different populations (Steel and Torrie, 1980). Moreover, the area under the curve (AUC) was calculated by using the trapezoid rule and the comparison was evaluated with a student's t-test (two-tailed). Statistical significance was accepted at P < 0.05 (two-tailed).

3. Results

3.1. Metabolic and hemodynamic characteristics

As shown in Table 1, treatment with fructose 15% during 16 weeks significantly decreased blood glucose levels, compared with its corresponding control (group 1). In marked contrast, treatment with fructose significantly increased plasma insulin levels, HOMA-index, blood triglycerides and body weight.

In addition, Table 2 shows the effect of p.o. daily administration of vehicle, metformin or EGL-6M during 4 weeks on biochemical parameters and body weight in groups 1 (control) and 2 (fructose). In group 1, administration of vehicle (1 ml/kg/day), metformin (50 mg/kg/day) or EGL-6M (50 mg/kg/day) during 4 weeks produced no effect on the parameters evaluated. In marked contrast, in animals treated with fructose, (group 2), metformin or EGL-6M significantly reduced plasma insulin plasma concentrations and HOMA-index, without significant changes in blood glucose and body weight, when compared with the corresponding subgroup treated with vehicle.

Table 3 shows the effect of fructose or its vehicle (tap water) on heart rate and systolic, diastolic and mean blood pressure, after 16 weeks of treatment with either tap water (control) or fructose. Interestingly, treatment with fructose significantly increased systolic, diastolic and mean blood pressure compared with the control group but had no effect on heart rate (Wolfensohn and Lloyd, 2013).

Lastly, Table 4 shows the effect of administration of vehicle, metformin or EGL-6M on heart rate and arterial blood pressure in both groups. In group 1 (control), administration of metformin significantly increased systolic, diastolic and mean arterial blood pressure. However, the treatment with EGL-6M produced an increase in these parameters but decreased heart rate values compared with its respective vehicle. In

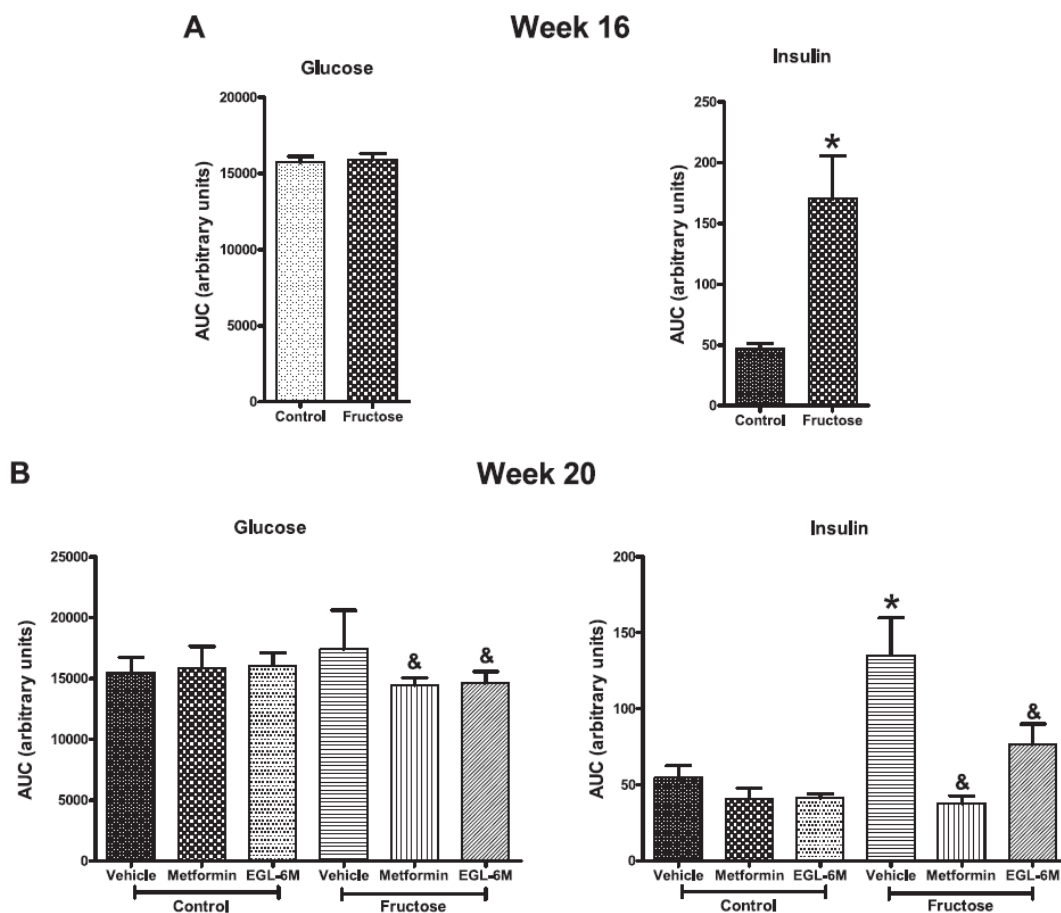


Fig. 3. Area under the curve (AUC) of blood glucose and plasma insulin values obtained during oral glucose tolerance test (A) before (week 16) and (B) after (week 20) of p.o. administration of vehicle (1 ml/kg/day), metformin (50 mg/kg/day) or EGL-6M (50 mg/kg/day). * $P < 0.05$ vs control, & $P < 0.05$ vs fructose-vehicle.

group 2, treatment with EGL-6M significantly increased systolic arterial pressure without significant changes in the other variables measured when compared with the respective vehicle.

3.2. Blood glucose and plasma insulin during oral glucose tolerance test

After 16 weeks of treatment with either fructose (group 2) or tap water (group 1), blood glucose and plasma insulin were determined during oral glucose tolerance test in both groups. Area under the curve of time course are shown in Fig. 3. Blood glucose levels were similar during oral glucose tolerance test in both groups. Nonetheless, insulin plasma levels were significantly higher in the group 2 (fructose) when compared to the group 1 (control) (Fig. 3A).

In the control group (that received tap water), p.o. administration of vehicle, metformin or EGL-6M during 4 weeks produced no effect on blood glucose and plasma insulin levels during oral glucose tolerance test. Meanwhile, in the group 2 (fructose), metformin and EGL-6M significantly decreased plasma insulin levels and blood glucose, when compared with the subgroup treated with the corresponding vehicle (fructose + vehicle) (Fig. 3B).

3.3. Effect of fructose on the vasopressor responses induced by sympathetic stimulation or i.v. injections of several α -adrenoceptor agonists

As shown in Fig. 4, electrical stimulation of the vasopressor sympathetic outflow or i.v. bolus injection of noradrenaline, methoxamine and UK 14,304 produced frequency or dose-dependent increases in

diastolic blood pressure in both groups 1 (control) and 2 (fructose). Interestingly, the vasopressor responses to sympathetic stimulation were significantly smaller in the group treated with fructose than the control group, specifically at the frequency of 3 Hz ($F_{(1,4)} = 28$, $P < 0.001$; Fig. 4A). On the other hand, the vasopressor responses to noradrenaline were significantly increased in the fructose group compared with control group, at the doses of 0.1, 0.3 and 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($F_{(1,4)} = 28$, $P < 0.05$). In addition, these vasopressor responses were accompanied with dose-dependent increases in heart rate, at the doses of noradrenaline tested (0.003–3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), in control animals (-1.3 ± 1.3 , 1.3 ± 1.6 , 4.0 ± 0.5 , 8.7 ± 2.5 , 20.0 ± 5.2 , 59.8 ± 5.5 , 80.5 ± 7.8 beats/min) or in fructose (-0.7 ± 3.2 , 4.9 ± 5.4 , 15.5 ± 3.8 , $31.7 \pm 8.6^*$, $54.9 \pm 9.3^*$, $92.8 \pm 9.4^*$, $113.7 \pm 11.3^*$ beats/min; *, $P < 0.05$ vs. control animals). Interestingly, the tachycardic responses were significantly enhanced ($F_{(1,4)} = 8.7$, $P = 0.03$) in animals treated with fructose, compared with the animals treated with tap water. The vasopressor responses to methoxamine and UK 14,304 were not significantly modified by the treatment with fructose.

3.4. Effect of metformin or EGL-6M on the vasopressor responses induced by sympathetic stimulation or i.v. injections of several α -adrenoceptor agonists in control animals (tap water)

Fig. 5 shows the vasopressor responses in control group after four weeks of treatment with of vehicle, metformin or EGL-6M. In control animals, metformin did not modify the vasopressor responses induced by sympathetic stimulation, noradrenaline, methoxamine or UK

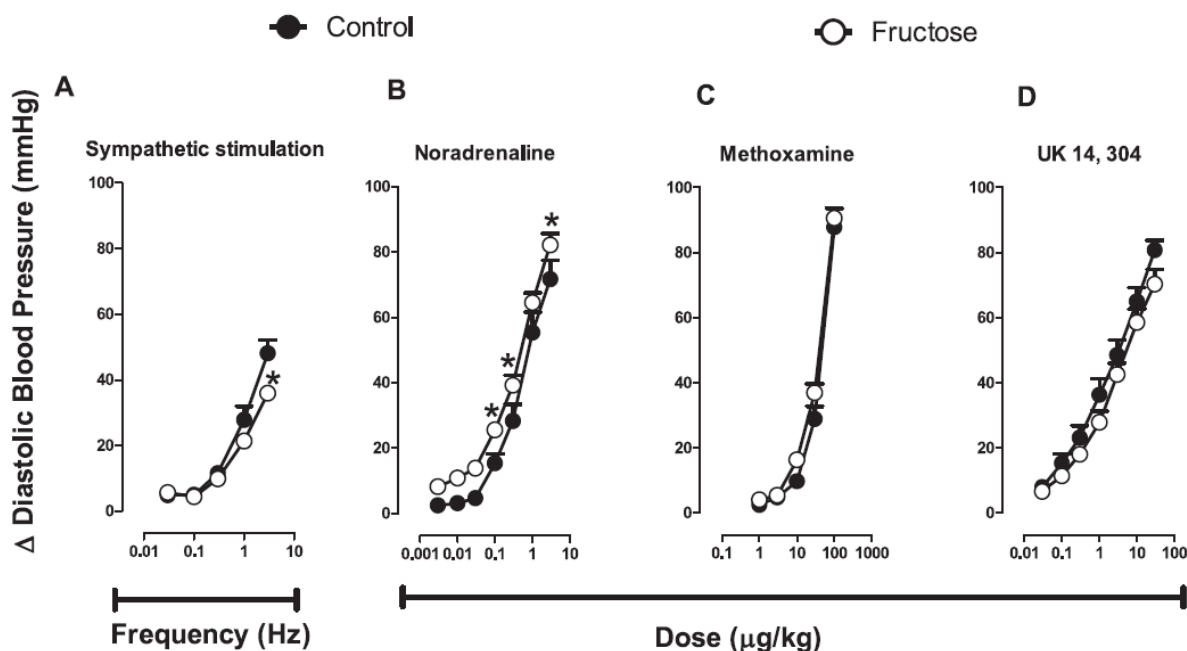


Fig. 4. Effect of fructose 15% (16 weeks) on vasopressor responses induced by sympathetic stimulation (0.03–3 Hz) or i.v. bolus injections of noradrenaline (0.003–3 µg/kg), methoxamine (1–100 µg/kg) or UK 14,304 (0.03–30 µg/kg). * $P < 0.05$ vs control.

14,304. Meanwhile, treatment with EGL-6M significantly increased the responses induced by sympathetic stimulation at the frequencies of 0.3–3 Hz ($F_{(1,4)} = 49$, $P < 0.001$) and significantly decreased the vasopressor responses generated by UK 14,304 at 3–30 µg/kg ($F_{(1,4)} = 9$, $P < 0.023$). The vasopressor responses induced by methoxamine ($F_{(1,4)} = 0.06$, $P = 0.8$) and noradrenaline ($F_{(1,4)} = 1.221$, $P = 0.3$) were not significantly modified.

3.5. Effect of metformin or EGL-6M on the vasopressor responses induced by sympathetic stimulation or i.v. injections of several α -adrenoceptor agonists in animals treated with fructose

The vasopressor responses in the group 2 treated with fructose are shown in Fig. 6. Treatment with metformin significantly decreased the vasopressor responses induced by noradrenaline at the doses of 0.3–3 µg/kg ($F_{(1,4)} = 43$, $P = 0.001$), as well as the vasopressor response generated by 100 µg/kg methoxamine ($F_{(1,4)} = 3$, $P = 0.045$). In contrast, metformin did not significantly modify the vasopressor responses to sympathetic stimulation ($F_{(1,4)} = 28$, $P = 1.00$) or UK 14,304 ($F_{(1,4)} = 3.58$, $P = 0.99$).

In addition, chronic treatment with EGL-6M in animals treated with fructose significantly increased the vasopressor responses induced by sympathetic stimulation at the frequencies of 1 and 3 Hz (Fig. 6E), ($F_{(1,4)} = 28$, $P = 0.02$) and significantly decreased the vasopressor responses to methoxamine only at the highest dose (100 µg/kg) (Fig. 6G), ($F_{(1,4)} = 2.68$, $P < 0.001$). Further, the vasopressor responses to noradrenaline ($F_{(1,4)} = 8.72$, $P = 0.99$) and UK 14,304 ($F_{(1,4)} = 3.58$, $P = 1.00$) remained unchanged (Fig. 6F and H). All these changes can be represented as AUC in Fig. 7.

3.6. Effect of metformin or EGL-6M on blood pressure and heart rate in anaesthetized rats

In anaesthetized rats, metformin (Fig. 8A) produced non-dose-dependent vasopressor responses at 1–300 mg/kg (-11.55 ± 4.02 , -9.47 ± 1.88 , -14.76 ± 2.94 , -14.49 ± 1.97 , -11.48 ± 2.29 and -13.57 ± 2.22). In contrast, EGL-6M (Fig. 8B) produced a biphasic

response. Firstly, EGL-6M produced non-dependent vasodepressor responses (-12.91 ± 3.99 , -17.72 ± 6.09 , -18.69 ± 4.72 , -21.96 ± 3.98 , -30.01 ± 4.02 and -25.45 ± 4.78) and secondly a dose-dependent vasopressor response (9.36 ± 2.16 , 8.48 ± 1.89 , 14.02 ± 4.71 , 22.34 ± 4.80 , 34.15 ± 5.71 and 39.19 ± 5.56).

4. Discussion

One of the main regulators of the cardiovascular system is the sympathetic nervous system. Thus, our study has analysed the effect of chronic administration of metformin and its analogue, *N*-benzylbiguanide (EGL-6M) on the cardiovascular responses induced by the adrenergic system stimulation in rats with fructose-induced insulin resistance.

4.1. Effect of metformin and EGL-6M on metabolic variables

During insulin resistance, hyperinsulinemia is observed as a compensatory mechanism (Sesti, 2006). In congruence with the above, under our conditions, high plasma insulin levels and high HOMA-index values were seen in animals treated with fructose compared with control animals. In contrast, in fasting rats, blood glucose levels were slightly decreased compared with control group (Table 1). However, during tolerance glucose curve no changes were observed in both control and fructose-treated rats. Plasma insulin levels were significantly higher in rats treated with fructose (Fig. 3) than in control rats. These results suggest that in animals treated with fructose, hyperinsulinemia and insulin resistance were observed without alteration in blood glucose probably due to pancreatic cells are able to secrete enough insulin to avoid hyperglycemia, as previously demonstrated (Motta et al., 2017; Ostenson, 2001; Sommese et al., 2016; Yin et al., 2013). Interestingly, in animals treated with fructose and vehicle of metformin during 4 weeks, plasma insulin levels, as well as HOMA-index values, significantly increased compared with control animals, which suggest that under our experimental condition the time-dependent progression of insulin resistance can be observed (Table 2). In group 1, vehicle, metformin or EGL-6M did not modify glucose and

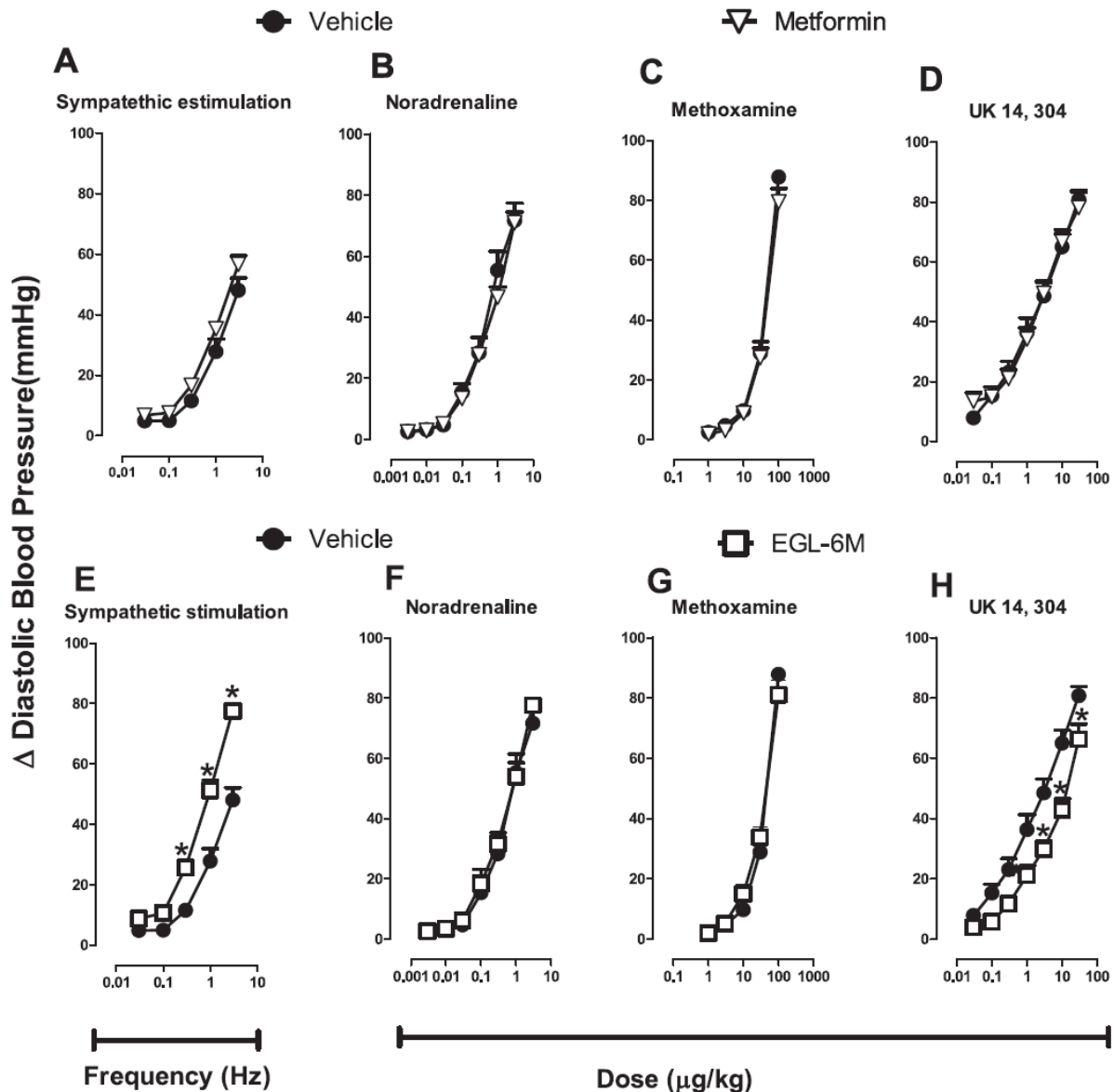


Fig. 5. Vasopressor response induced by sympathetic stimulation or i.v. bolus injections of noradrenaline, methoxamine or UK 14,304 in control groups (tap water) after p.o. administration of vehicle (1 ml/kg/day), metformin (50 mg/kg/day) or EGL-6M (50 mg/kg/day). * $P < 0.05$ vs vehicle.

insulin levels during oral glucose tolerance test (Fig. 3) or basal values (Table 2). These results are consistent with data published since metformin did not decrease blood glucose levels during euglycaemia in human beings (Wiernsperger and Bailey, 1999). Similarly, EGL-6M produced no effect probably because this compound is an analogue of metformin and still own the anti-hyperglycemic property of metformin. In marked contrast, in the group 2 (treated with fructose), treatment with metformin and EGL-6M significantly diminished blood glucose and insulin plasmatic levels during oral glucose tolerance test compared to fructose-vehicle subgroup (Fig. 3). These results can be interpreted in terms that metformin and EGL-6M augmented uptake of glucose and decreased insulin resistance since insulin secretion was less during the test.

4.2. Hemodynamic changes produced by the pharmacological treatments

Interestingly, treatment with fructose significantly increased some

hemodynamic values (Table 3) including blood pressure. In this regard, an association between hypertension and insulin resistance has been observed through several mechanisms including endothelial dysfunction and sympathetic dysfunction (Schalkwijk and Stehouwer, 2005; Thackeray et al., 2011).

In control animals, metformin and EGL-6M significantly increased blood pressure values (Table 4). Although in principle these results may suggest a deleterious effect, it should be considered that these values are still in the physiological order for adult rats (systolic blood pressure: 84–134 mmHg; diastolic blood pressure: 60 mmHg) (Wolfensohn and Lloyd, 2013). On the other hand, in animals treated with fructose, metformin and EGL-6M did not significantly modify arterial blood pressure values compared with their respective vehicle. In this respect, several studies have demonstrated the ability of metformin to restore endothelial function (Sena et al., 2011). Although we have no clear-cut explanation of these findings, during the genesis and progression of hypertension, several mechanisms are involved (for example, activation

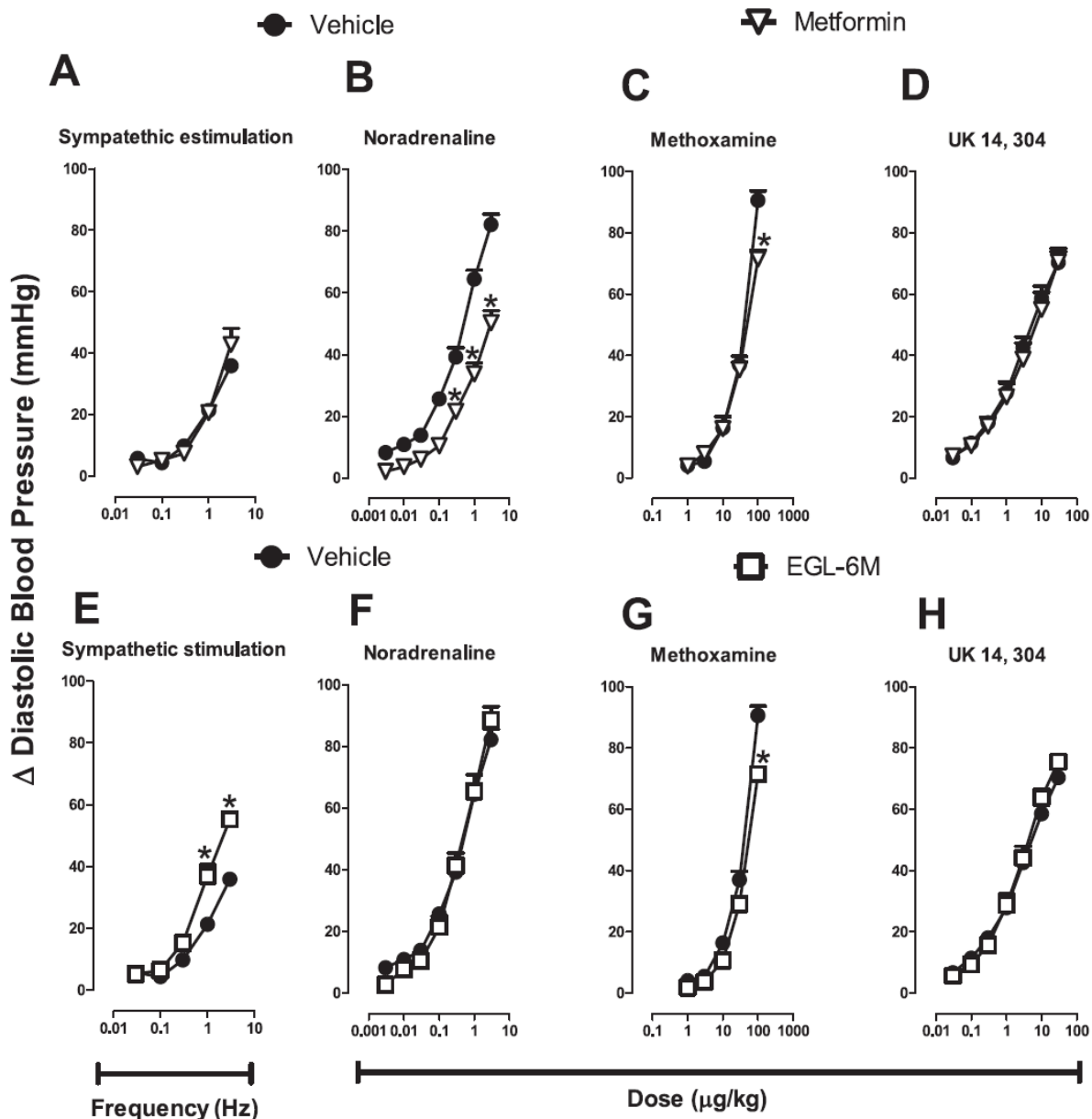


Fig. 6. Vasopressor response induced by sympathetic stimulation or i.v. bolus injections of noradrenaline, methoxamine or UK 14,304 in the group with fructose 15% (16 weeks) after p.o. administration of vehicle (1 ml/kg/day), metformin (50 mg/kg/day) or EGL-6M (50 mg/kg/day). * $P < 0.05$ vs vehicle.

of sympathetic outflow, the renin-angiotensin system, overactivation of PKC in smooth muscle, among others) and possibly metformin and EGL-6M might not have been completely reversed these alterations.

4.3. Effect of metformin or EGL-6M on the vasopressor responses induced by stimulation of the adrenergic system

Our study analysed the effect of metformin and EGL-6M on vasopressor responses induced by sympathetic stimulation or i.v. administration of agonists noradrenaline (endogenous ligand), methoxamine (α_1 -adrenoceptors) and UK 14,304 (α_2 -adrenoceptors). Admittedly, the vasopressor sympathetic outflow was measured indirectly by measuring vasopressor responses induced by preganglionic fibres, while the administration of the agonists directly stimulated α_1 - and/or α_2 -adrenoceptors mainly located in vascular smooth muscle.

When evaluating cardiovascular responses, a decrease of the vasopressor responses to sympathetic stimulation (Fig. 4A) was observed in insulin resistance animals compared to the control group. This suggests that during insulin resistance neurotransmission could be diminished. Several studies have observed that during metabolic syndrome there is an increase in the sympathetic tone activity (Limberg et al., 2012; Mancía et al., 2007; Masuo et al., 1997). Furthermore, it is possible that during insulin resistance, a dysfunction of sympathetic neurotransmission between preganglionic and postganglionic neurons (Rudchenko et al., 2014) could be observed due to a dysfunction of ganglionic nicotinic receptors (Campanucci et al., 2010). On the other hand, an increase of vasopressor responses generated by exogenous administration of noradrenaline was observed. Nevertheless, because no differences were found in the responses generated by administration of the agonists α_1 (methoxamine) and α_2 (UK 14,304), we concluded that this effect is

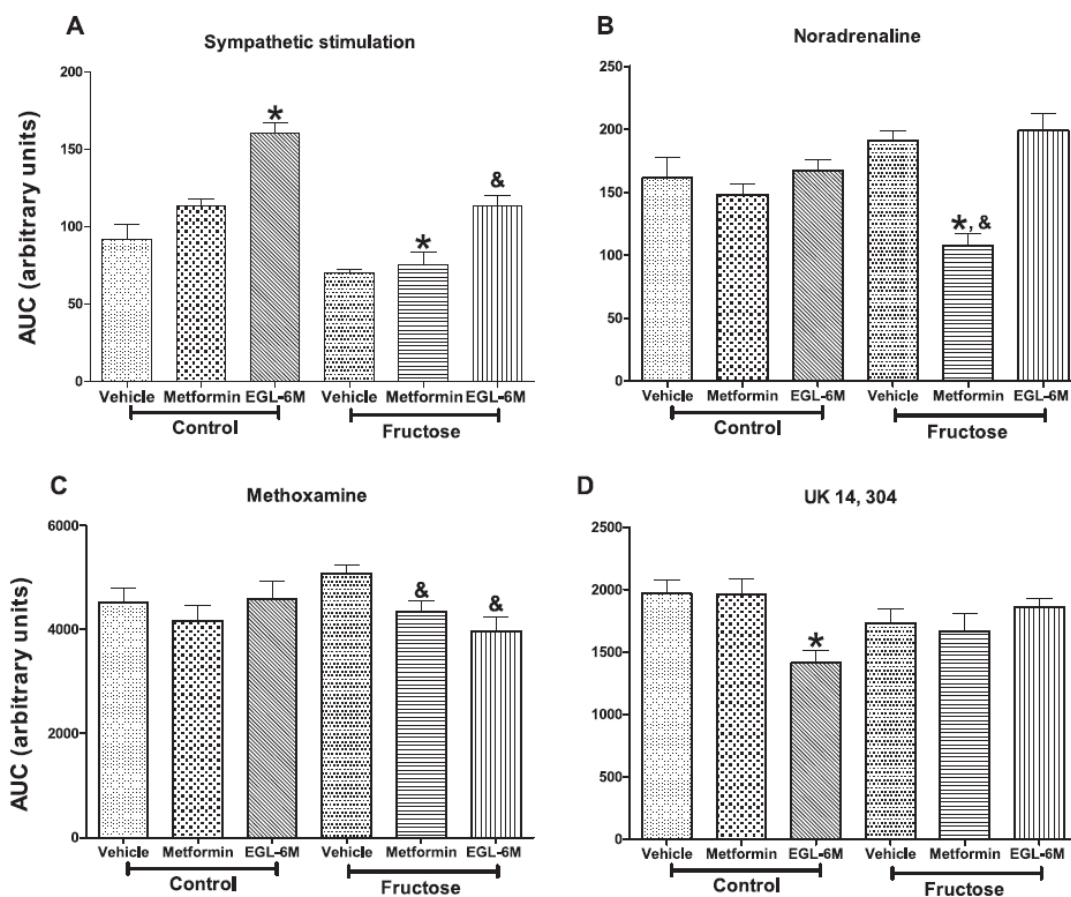


Fig. 7. Area under the curve (AUC) of the curves doses-response generate by sympathetic stimulation or i.v. bolus injections of noradrenaline, methoxamine, UK 14,304 in both groups (control or fructose) after p.o. administration of vehicle (1 ml/kg/day), metformin (50 mg/kg/day) or EGL-6M (50 mg/kg/day). * $P < 0.05$ vs control-vehicle, & $P < 0.05$ vs fructose-vehicle.

probably due to a significant enhancement of the cardiac output because of an increase in the tachycardic responses to noradrenaline in rats with fructose (see results). Thackeray et al. (2011) demonstrated that noradrenaline concentration in plasma and heart was elevated in streptozotocin-induced diabetes, which is congruent with our results.

In control animals, treatment with metformin did not produce changes in the vasopressor responses induced by sympathetic stimulation or by i.v. bolus injections of different agonists (Fig. 5). In contrast, in conscious animals, metformin increased mean, diastolic and systolic blood pressure when compared with vehicle (Table 4). We should admit that we do not have an irrefutable explanation of these findings because several studies have demonstrated anti-hypertensive effects of metformin (Forouzandeh et al., 2014; Petersen and DiBona, 1996). However, it has been observed that activation of AMPK by metformin in kidneys triggers a rise of blood pressure by retention of water (Klein et al., 2016) while AMPK deletion causes salt and water wasting (Lazo-Fernandez et al., 2017). In any case, these values of blood pressure are still in the normal rank (Wolfensohn and Lloyd, 2013). Furthermore, in animals treated with EGL-6M, an increase in the responses induced by sympathetic stimulation (0.3–3 Hz), as well as a decreased in the responses generated by UK 14,304 (α_2 agonist selective) was observed. These results suggest that EGL-6M enhances by itself sympathetic transmission probably by decreasing density and/or functionality of prejunctional α_2 -adrenoceptors that inhibit the release of neurotransmitters (Villamil-Hernández et al., 2013) or postjunctional α_2 -adrenoceptors in vascular smooth muscle cells.

On the other hand, in fructose-treated rats, chronic administration

of metformin decreased the vasopressor responses induced by i.v. injections of noradrenaline, and in the last dose of methoxamine (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) without modifying the vasopressor responses elicited by sympathetic stimulation or i.v. injections of UK 14,304 (Fig. 6). These results suggest that metformin did not modify the neurotransmission in sympathetic tone, but could modify the expression of α_1 -adrenoceptors, as responses to noradrenaline and methoxamine were decreased. Consistent with our findings, Majithiya and Balaraman (2006) observed in isolated aortas from streptozotocin-induced diabetic rats that administration of high concentrations of metformin (1–10 mM) decreased the responses generated by noradrenaline. Lastly, EGL-6M increased the vasopressor responses generated by sympathetic stimulation at high frequencies (1 and 3 Hz) in insulin resistance animals (Fig. 6A) and in control animals (Fig. 5A). These results suggest that in fructose-induced insulin resistance, EGL-6M increased sympathetic neurotransmission by itself. This effect could be probably due to: (1) a decrease of density and/or functionality of prejunctional α_2 -adrenoceptors that inhibits noradrenaline release; (2) increase of the sympathetic preganglionic neurotransmission; or (3) an indirect sympathomimetic action of EGL-6M, as previously suggested with metformin (Lee and Peuler, 2001). Consistent with this view, previous findings have reported a dysfunction of presynaptic signal transmission that inhibits the neurotransmission with the postsynaptic neuron in streptozotocin-diabetic rats; in consequence, a diminished release of noradrenaline was suggested (Munding et al., 2015). Admittedly, the vasopressor responses induced by UK 14,304 were not modified in fructose-treated rats (Fig. 6H), which may suggest that functionality of α_2 -adrenoceptors

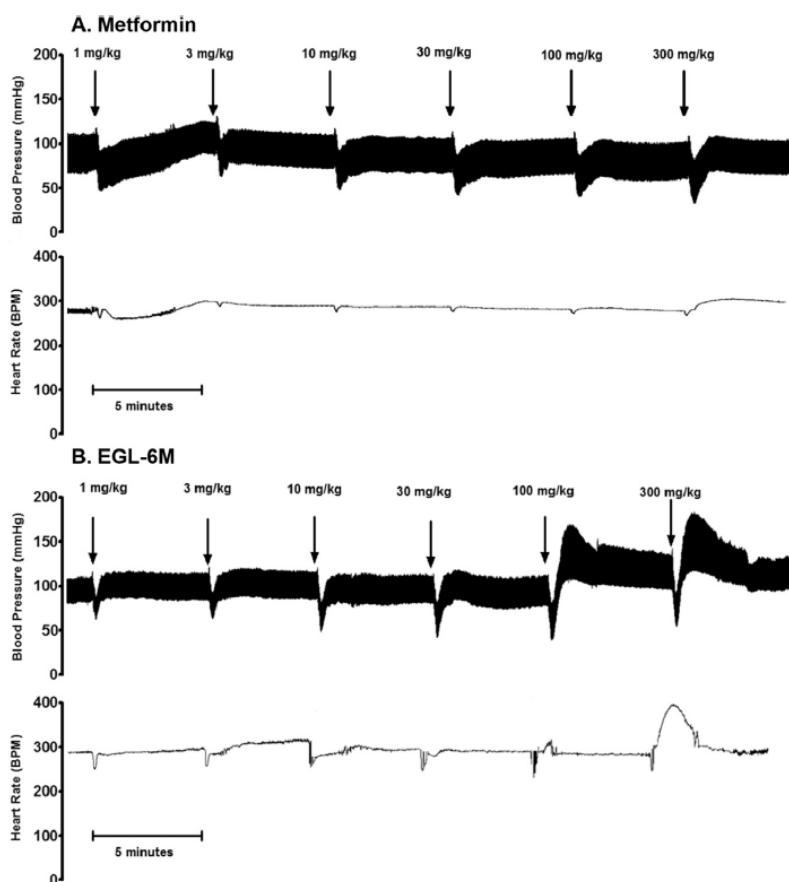


Fig. 8. Original tracings showing the effect of i.v. administration of: (A) metformin or (B) EGL-6M, at the doses of 1–300 mg/kg, on blood pressure and heart rate in anesthetized rats.

may not have changed with EGL-6M. However, it should be kept in mind that sympathetic neurotransmission includes preganglionic and postganglionic fibres that EGL-6M may have enhanced.

4.4. Effect of administration of metformin and EGL-6M in anesthetized rats

In pithed rats, we found that pretreatment with EGL-6M increased vasopressor responses generated by sympathetic stimulation (Figs. 5–7), while pretreatment with metformin did not lead any change. Considering these results, we evaluated the effect of these compounds in an experimental model where the central nervous system is preserved, such as anesthetized rats (Fig. 8).

Interestingly, i.v. bolus administration of metformin induced non-dose-dependent vasodepressor responses. These results were consistent with the study of Petersen and DiBona (1996) in SHR, in which metformin produced hypotension and sympatho-inhibition. In contrast, the administration of EGL-6M induced a biphasic cardiovascular response, i.e. vasodepressor and then vasopressor responses. These results indicate that EGL-6M could activate several mechanisms, in addition to those that are activated by metformin. The investigation of these mechanisms falls beyond the scope of the present study.

5. Conclusions

These results demonstrate that in fructose-treated rats: (1) insulin resistance decreased the vasopressor responses inhibiting sympathetic tone probably as a compensation mechanism by increasing density and/or functionality of cardiovascular α - or β -adrenoceptors; (2) metformin decreased responses to noradrenaline; and (3) EGL-6M increased the

vasopressor responses to sympathetic stimulation probably due to an increase in the sympathetic neurotransmission. To the best of our knowledge, this is the first study demonstrating the cardiovascular effects of metformin and its analogue, EGL-6M, on sympathetic neurotransmission in pithed rats with fructose-induced insulin resistance.

Acknowledgements

The authors thank Conacyt, Mexico (Grant No. 252702) for their financial support.

References

- Bazotte, R.B., Silva, L.G., Schiavon, F.P., 2014. Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle* 13, 2494–2500.
- Benjamin, E.J., Blaha, M.J., Chiuve, S.E., Cushman, M., Das, S.R., Deo, R., de Ferranti, S.D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jimenez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Mackey, R.H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M.E., Nasir, K., Neumar, R.W., Palaniappan, L., Pandey, D.K., Thiagarajan, R.R., Reeves, M.J., Ritchey, M., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C.W., Turner, M.B., Virani, S.S., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P., American Heart Association Statistics, C., Stroke Statistics, S., 2017. heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American heart association. *Circulation*.
- Campanucci, V., Krishnaswamy, A., Cooper, E., 2010. Diabetes depresses synaptic transmission in sympathetic ganglia by inactivating nAChRs through a conserved intracellular cysteine residue. *Neuron* 66, 827–834.
- Forouzandeh, F., Salazar, G., Patrushev, N., Xiong, S., Hilenski, L., Fei, B., Alexander, R.W., 2014. Metformin beyond diabetes: pleiotropic benefits of metformin in attenuation of atherosclerosis. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e001202.
- Gillespie, J.S., Muir, T.C., 1967. A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br. J. Pharmacol.* 30, 78–87.

- Gutiérrez-Lara, E.J., 2014. Caracterización química y farmacodinámica de análogos cíclicos y aromáticos de Metformina. Facultad de Farmacia Universidad Autónoma del Estado de Morelos México.
- Gutiérrez-Lara, E.J., Sánchez-López, A., Navarrete-Vázquez, G., Centurión, D., 2016. Evaluation of vasopressor responses of metformin and one analogue of metformin in insulin resistance rats. *FASEB J.* 30, 1270 (1275).
- Klein, J.D., Wang, Y., Blount, M.A., Molina, P.A., LaRocque, L.M., Ruiz, J.A., Sands, J.M., 2016. Metformin, an AMPK activator, stimulates the phosphorylation of aquaporin 2 and urea transporter A1 in inner medullary collecting ducts. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 310, F1008–F1012.
- Kleinman, L.I., Radford Jr., E.P., 1964. Ventilation standards for small mammals. *J. Appl. Physiol.* 19, 360–362.
- Lambert, G.W., Straznicki, N.E., Lambert, E.A., Dixon, J.B., Schlaich, M.P., 2010. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome—causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* 126, 159–172.
- Lazo-Fernandez, Y., Baile, G., Meade, P., Torcal, P., Martínez, L., Ibanez, C., Bernal, M.L., Viollet, B., Gimenez, I., 2017. Kidney-specific genetic deletion of both AMPK alpha-subunits causes salt and water wasting. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 312, F352–F365.
- Lee, J.M., Peuler, J.D., 2001. A possible indirect sympathomimetic action of metformin in the arterial vessel wall of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 69, 1085–1092.
- Limberg, J.K., Morgan, B.J., Sebranek, J.J., Proctor, L.T., Walker, B.J., Eldridge, M.W., Schrage, W.G., 2012. Altered neurovascular control of the resting circulation in human metabolic syndrome. *J. Physiol.* 590, 6109–6119.
- Majithiya, J.B., Balaraman, R., 2006. Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 78, 2615–2624.
- Mancia, G., Bousquet, P., Elghozi, J.L., Esler, M., Grassi, G., Julius, S., Reid, J., Van Zwieten, P.A., 2007. The sympathetic nervous system and the metabolic syndrome. *J. Hypertens.* 25, 909–920.
- Masuo, K., Mikami, H., Ogihara, T., Tuck, M.L., 1997. Sympathetic nerve hyperactivity precedes hyperinsulinemia and blood pressure elevation in a young, nonobese Japanese population. *Am. J. Hypertens.* 10, 77–83.
- Mercurio, V., Carlomagno, G., Fazio, V., Fazio, S., 2012. Insulin resistance: is it time for primary prevention? *World J. Cardiol.* 4, 1–7.
- Motta, V.F., Bargut, T.L., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., 2017. Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol* (1985) (jap 00154 02017).
- Mundinger, T.O., Cooper, E., Coleman, M.P., Taborsky Jr., G.J., 2015. Short-term diabetic hyperglycemia suppresses celiac ganglia neurotransmission, thereby impairing sympathetically mediated glucagon responses. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 309, E246–E255.
- Muntzel, M.S., Abe, A., Petersen, J.S., 1997. Effects of adrenergic, cholinergic and ganglionic blockade on acute depressor responses to metformin in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 618–623.
- Ostenson, C.G., 2001. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiol. Scand.* 171, 241–247.
- Petersen, J.S., DiBona, G.F., 1996. Acute sympathoinhibitory actions of metformin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 27, 619–625.
- Petersen, J.S., Liu, W., Kapusta, D.R., Varner, K.J., 1997. Metformin inhibits ganglionic neurotransmission in renal nerves. *Hypertension* 29, 1173–1177.
- Peuler, J.D., 1999. Opposing adrenergic actions of intravenous metformin on arterial pressure in female spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 43, 237–247.
- Rudchenko, A., Akude, E., Cooper, E., 2014. Synapses on sympathetic neurons and parasympathetic neurons differ in their vulnerability to diabetes. *J. Neurosci.* 34, 8865–8874.
- Schalkwijk, C.G., Stehouwer, C.D., 2005. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin. Sci.* 109, 143–159.
- Sena, C.M., Matafome, P., Louro, T., Nunes, E., Fernandes, R., Seica, R.M., 2011. Metformin restores endothelial function in aorta of diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 163, 424–437.
- Sesti, G., 2006. Pathophysiology of insulin resistance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20, 665–679.
- Sommese, L., Valverde, C.A., Blanco, P., Castro, M.C., Rueda, O.V., Kaetzel, M., Dedman, J., Anderson, M.E., Mattiazzi, A., Palomeque, J., 2016. Ryanodine receptor phosphorylation by CaMKII promotes spontaneous Ca(2+) release events in a rodent model of early stage diabetes: the arrhythmogenic substrate. *Int. J. Cardiol.* 202, 394–406.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biomedical Approach, 2nd ed. McGraw-Hill, Tokio.
- Thackeray, J.T., Radziuk, J., Harper, M.E., Suuronen, E.J., Ascah, K.J., Beanlands, R.S., Dasilva, J.N., 2011. Sympathetic nervous dysregulation in the absence of systolic left ventricular dysfunction in a rat model of insulin resistance with hyperglycemia. *Cardiovasc. Diabetol.* 10, 75.
- Thackeray, J.T., deKemp, R.A., Beanlands, R.S., DaSilva, J.N., 2013. Insulin restores myocardial presynaptic sympathetic neuronal integrity in insulin-resistant diabetic rats. *J. Nucl. Cardiol.* 20, 845–856.
- The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, 2016. ILAR J 57, NP.
- Tran, L.T., MacLeod, K.M., McNeill, J.H., 2014. Selective alpha(1)-adrenoceptor blockade prevents fructose-induced hypertension. *Mol. Cell Biochem.* 392, 205–211.
- Villamil-Hernández, M.T., Alcántara-Vázquez, O., Sánchez-López, A., Centurión, D., 2013. The α_2 -adrenoceptors mediating inhibition of the vasopressor sympathetic outflow in pithed rats: pharmacological correlation with α_{2A} , α_{2B} and α_{2C} subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 718, 245–252.
- Wiemsperger, N.F., Bailey, C.J., 1999. The antihyperglycaemic effect of metformin. *Drugs* 58, 31–39.
- Wolfensohn, S., Lloyd, M., 2013. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, 4th ed. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Yin, Q.Q., Pei, J.J., Xu, S., Luo, D.Z., Dong, S.Q., Sun, M.H., You, L., Sun, Z.J., Liu, X.P., 2013. Pioglitazone improves cognitive function via increasing insulin sensitivity and strengthening antioxidant defense system in fructose-drinking insulin resistance rats. *PLoS One* 8, e59313.



**SOCIETY for
NEUROSCIENCE**

1121 14th Street NW
Suite 1010
Washington, DC 20005

Phone (202) 962-4000
Fax (202) 962-4941
Web SfN.org

*Neuroscience 2015
October 17 - 21, 2015
Chicago, IL*

Please let this serve to certify that

Erika Gutierrez, MS

has attended Neuroscience 2015, the 45th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at the McCormick Convention Center, Chicago, IL. Additionally, this attendee has participated in the following scientific session(s) listed below:

Session Type: Poster

Session Title: Cardiovascular Regulation

Session Date/Time: 10/19/2015 13:00

Presentation Number: 432.01

Presentation Title: Evaluation of metformin and one analogue of metformin on the vasopressor responses induced by adrenergic stimulation in rats with insulin resistance

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

Kyle Hayden, CMP
Assistant Director of Annual Meeting Programs
Society for Neuroscience

Date: October 19, 2015



April 2 – 6, 2016
San Diego, CA

Annual Meeting of:

American Association
of Anatomists (AAA)

The American
Physiological Society
(APS)

American Society for
Biochemistry and
Molecular Biology
(ASBMB)
in Insulin Resistance Rats
American Society for
Investigative Pathology
(ASIP)

American Society for
Nutrition (ASN)

American Society for
Pharmacology and
Experimental
Therapeutics (ASPET)

Guest Societies

Future Meetings

Chicago, IL
April 22 – 26, 2017

San Diego, CA
April 21 – 25, 2018

Orlando, FL
April 6 – 10, 2019

San Diego, CA
April 4 – 8, 2020

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

Erika J Gutiérrez-Lara

**This certifies that the following person participated and attended the
Experimental Biology (EB) Meeting at the San Diego Convention Center in
San Diego, CA over the dates of April 2 - 6, 2016.**

Session Type: Poster

Session Title: (1270.5) Diabetes II

Session Date/Time: 04/06/2016 - 9:00 AM

Presentation Number: 1270

Presentation Title: Evaluation of the Vasopressor Responses of Metformin and One Analogue of Metformin

Experimental Biology is a multidisciplinary, scientific meeting features plenary and award lectures, pre-meeting workshops, oral and posters sessions, on-site career services and exhibits of an array of equipment, supplies and publications required for research labs and experimental study.

Experimental Biology is an annual meeting comprised of over 14,000 scientists and exhibitors representing six sponsoring societies and multiple guest societies.

Marcella Jackson, CMP
Director
FASEB Scientific Meetings and Conferences



9650 Rockville Pike • Bethesda, MD 20814-3998
(t) 301-634-7010 • (f) 301-634-7014 • www.experimentalbiology.org
Email: management@experimentalbiology.org



**SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.**

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Erika Joana Gutiérrez Lara

Quien asistió y presentó el trabajo

Efecto de la administración crónica de metformina y EGL-6M sobre vasculatura sistémica

Por:

Erika Joana Gutiérrez Lara, Gabriel Navarrete Vazqu ez, Araceli S anchez L opez, David Centur on Pacheco

En la modalidad de presentación oral durante el LIX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas del 14 al 18 de agosto de 2016 en la Ciudad de Campeche, Camp.

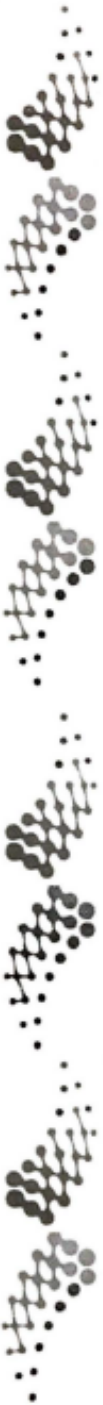
Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. Miguel Angel Morales Mendoza

Dr. Jesús Hernández Falcón

Dr. Benjamín Flor n Garduño

Dr. Rodolfo Delgado Lezama





**SOCIETY for
NEUROSCIENCE**

1121 14th Street NW
Suite 1010
Washington, DC 20005

Phone (202) 962-4000
Fax (202) 962-4941
Web SfN.org

*Neuroscience 2017
November 11 - 15
Washington, DC*

Please let this serve to certify that

Erika Gutiérrez-Lara, MS

has attended Neuroscience 2017, the 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience at the Walter E. Washington Convention Center in Washington, DC. The person listed above has participated in the presentation listed below:

Session Type: Poster

Session Title: Cardiovascular Regulation I

Session Date/Time: 11/14/2017 8:00

Presentation Number: 506.22

Presentation Title: Effect of chronic administration of estradiol on the vasopressor responses induced by the sympathetic nervous system in rats with fructose induced insulin resistance

The Society for Neuroscience (SfN) is a nonprofit membership organization of basic scientists and physicians who study the brain and nervous system. The Society's primary goal is to promote the exchange of information among researchers. For this purpose, SfN holds a prestigious annual meeting, attended by scientists and researchers from around the globe. It is considered the most important annual forum for the neuroscience research community, offering attendees the opportunity to learn about the latest advances in brain research and to meet and network with their colleagues at top destinations throughout the United States.

Sincerely,

Kyle Hayden, CMP
Director, Meeting Programs and Attendee Services
Society for Neuroscience

Date: November 15, 2017

