



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD COAPA**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA**

**“Evaluación de los efectos de las dietas altas en  
carbohidratos sobre algunos marcadores de estrés  
oxidativo e hipertrofia cardiaca, y en la presión arterial de  
ratas Wistar y SHR recién destetadas”**

Proyecto de Tesis que presenta

**Biól. David Julian Arias Chávez**

Para obtener el Grado de

**Maestro en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica  
Experimental**

Directoras de Tesis: Dra. Guadalupe Bravo

Dra. Norma Leticia Gómez Viquez

Este trabajo se realizó en los laboratorios 2 y 3 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Unidad Coapa, bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Bravo y la Dra. Norma Leticia Gómez Víquez. Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para estudiantes de Maestría. Núm. de becario: 614047.

*“No es el más fuerte ni el más inteligente el que sobrevive, si no el más capaz de adaptarse a los cambios”*  
*- Charles Darwin*

## **Dedicatorias**

*Dedico esta tesis a mis padres Juanita y Julián, con todo mi cariño y mi amor porque hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.*

*A mi abuela Ross quien me siempre ha sido un ejemplo de fortaleza y perseverancia y por ser una segunda mamá para mí, siempre mi eterno agradecimiento.*

*A mi hermano, su esposa y sus tres grandes tesoros, mis sobrinas: Andry, Pame y Pau quienes son parte fundamental de mi vida y quiero con todo mi corazón.*

*A mi familia porque siempre han creído en mí y han estado presente en todo momento.*

*A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, aun sin importar que muchas veces se me complico poder entender a la primera, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí y me dieron su apoyo y consejos.*

*A mis tutoras quienes me guiaron, enseñaron, estudiaron, revisaron y estuvieron pendientes del desarrollo de mi tesis y crecimiento académico en todo momento.*

*A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis. Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.*

## **Agradecimientos Académicos**

Al CINVESTAV IPN y en especial al Departamento de Farmacobiología por la oportunidad de permitirme seguir creciendo académicamente y formarme como Maestro en Ciencias.

A mis tutoras, Dra. Guadalupe Bravo y Dra. Norma L. Gómez, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, transmitirme parte de sus vastos conocimientos y su experiencia científica en mi formación como Maestro en Ciencias, así como darme consejos y apoyarme con su afecto, amistad y confianza que fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Al I.B.O. Patrick Mailloux Salinas por sus valiosas y acertadas aportaciones, sus enseñanzas, sus consejos, amistad y todo su apoyo para la realización de este trabajo y mi formación profesional.

A la Biól. Maritza Mayorga Luna por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo y por su amistad y apoyo para realizar este trabajo.

A la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta y a la Dra. Karla G Carvajal Aguilera por aceptar ser parte de mi jurado de tesis, y por su apoyo, aporte, sugerencias y revisión de la tesis.

## **Agradecimientos Personales**

A los integrantes del laboratorio 3: Heriberto, Valentín y Armando, y del laboratorio 2: Mariana, gracias por TODO SU APOYO, sus consejos, su amistad, su comprensión para poder realizar este proyecto de tesis y compartir tantos y muy buenos momentos conmigo haciendo que los días en el laboratorio y bioterio fueran únicos.

A las biólogas Rocío y Viri por su incondicional amistad y porque juntos iniciamos este proyecto en el CINVESTAV. A mis biólogos favoritos: Dalia, Iliana, Hugo, Marco y Maritza por brindarme su sincera y calurosa amistad, su apoyo incondicional, sus consejos, compartir conmigo tantos y tantos momentos increíbles llenos de locura que solo podrían ser vividos junto a ustedes.

A mis amigos de generación de la Maestría, en especial a Jessy, Dey, Elena, Chris, Angy, Adry, Caro, Grecia, Ernesto, Saúl, Erick, Hernán y Yisus, gracias por todos los buenos y malos momentos que compartieron conmigo.

A mis amigos de Hi Tec Medical: Ana, Jime, Mayra, Jagid, y Héctor; y de Klending: Ixthel y Elena que además de ayudarme a crecer profesionalmente, me brindaron su hermosa amistad y me impulsaron a realizar este proyecto.

A mis mejores amigos Denisse., Flor, Cristian e Ismael por enseñarme a soñar de una manera diferente y creer en mí, por tantos y tantos momentos compartidos, por haberme acogido como parte de su vida y su familia, por 16 años de amistad incondicional y lo que nos falta, a ustedes mis hermanos ¡GRACIAS!

# CONTENIDO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>12</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>14</b>
1. México: Primer lugar en consumo de refrescos y bebidas azucaradas.....	14
1.1 Sacarosa y fructosa como principales azúcares utilizados en la dieta.....	15
1.2.1 Sacarosa.....	16
1.2.2 Fructosa.....	17
1.2 Metabolismo de sacarosa y fructosa.....	18
2. Obesidad.....	19
2.1 Diagnóstico.....	20
2.2 Prevalencia.....	20
2.3 Tipos de Obesidad.....	20
2.3.1 Obesidad normopeso.....	21
2.3.2 Obesidad por malnutrición.....	22
2.4 Obesidad en niños y adolescentes.....	24
2.5 Complicaciones.....	25
3. Resistencia a la Insulina .....	26
3.1 Diagnóstico.....	28
4. Hipertensión Arterial.....	28
4.1 Diagnóstico.....	29
4.2 Prevalencia.....	29
4.3 Tipos de Hipertensión Arterial .....	30
4.4 HA en niños y adolescentes.....	30
4.5 Complicaciones.....	31
5. Hipertrofia Cardíaca.....	31
5.1 Tipos de Hipertrofia Cardíaca.....	32
5.2 Remodelación Cardíaca en la Hipertrofia Cardíaca.....	34
5.3 Hipertrofia Cardíaca en la Hipertensión Arterial.....	36
5.4 Hipertrofia Cardíaca en la Obesidad .....	38
5.5 Bases Moleculares de la Hipertrofia Cardíaca.....	40

6. Estrés oxidativo.....	41
6.1 Producción de ERO en tejido cardiaco.....	41
6.2 Defensa antioxidante.....	42
6.3 Estrés oxidante y obesidad.....	43
7. CaMKII.....	44
7.1 Oxidación de la CaMKII.....	46
7.3 Hipertrofia Cardiaca y CaMKII.....	46
8. Modelos animales experimentales.....	48
8.1 Modelos de Obesidad.....	48
8.2 Modelos de Hipertensión Arterial.....	49
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>III. HIPÓTESIS.....</b>	<b>52</b>
<b>IV. OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
1. Animales de Experimentación.....	54
2. Determinación del Peso Corporal y la Presión Arterial.....	55
3. Preparación de las muestras.....	55
4. Determinación de la Hipertrofia Cardiaca.....	56
4.1. Expresión de proteínas mediante la técnica de Western Blot.....	56
4.2 Histología.....	57
5. Determinación del Estrés Oxidante.....	58
5.1 Nitritos Totales.....	58
5.2 Malondialdehído.....	59
5.3 Superóxido Dismutasa.....	60
6. Determinación del perfil bioquímico.....	60
7. Evaluación de la resistencia a la insulina.....	61
8. Análisis estadístico.....	61
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
1. Peso Corporal y Tejido Adiposo.....	62
2. Perfil Bioquímico.....	64
3. Presión Arterial (PAM, PAS y PAD).....	69
4. Estrés Oxidante (MAD, NOx y SOD).....	72

5. Hipertrofia Cardíaca.....	77
5.1 Marcadores moleculares (ANP y ox-CaMKII $\delta$ ).....	77
5.2 Características morfológicas.....	80
5.3 Histología.....	84
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
<b>VIII. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>101</b>
<b>XIX. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>102</b>
<b>XIX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>103</b>

## ABREVIATURAS

<b>AD</b>	Adrenalina
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AG</b>	Ácidos Grasos
<b>Ang II</b>	Angiotensina II
<b>ANP</b>	Péptido Natriurético Auricular
<b>ATP</b>	Adenosín Trifosfato
<b>BA</b>	Bebidas Azucaradas
<b>BNP</b>	Péptido Natriurético Cerebral
<b>Ca<sup>2+</sup>-CaM</b>	Complejo Calcio-Calmodulina
<b>CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina Proteína quinasa II
<b>CC</b>	Circunferencia de Cintura
<b>CEPAL</b>	Comisión Económica para América Latina y el Caribe
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus 2
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FC</b>	Frecuencia Cardíaca
<b>GC</b>	Gasto Cardíaco
<b>GLUT</b>	Transportador de Glucosa
<b>HA</b>	Hipertensión Arterial
<b>HC</b>	Hipertrofia Cardíaca
<b>HOMA</b>	Evaluación del Modelo de Homeostasis
<b>IC</b>	Insuficiencia Cardíaca
<b>IG</b>	Índice Glucémico
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>INSP</b>	Instituto Nacional de Salud Pública
<b>JMAF</b>	Jarabe de Maíz de Alta Fructosa

<b>LSH</b>	Lipasa Sensible a Hormonas
<b>MAD</b>	Malondialdehído
<b>MAPK</b>	Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos
<b>MLC-2</b>	Miosina de la Cadena Ligera tipo 2
<b>NA</b>	Noradrenalina
<b>NOx</b>	Nitritos Totales
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ON</b>	Óxido Nítrico
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>ox-CaMKII</b>	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulina Proteína quinasa II Oxidada
<b>PA</b>	Presión Arterial
<b>PAD</b>	Presión Arterial Diastólica
<b>PAM</b>	Presión Arterial Media
<b>PAS</b>	Presión Arterial Sistólica
<b>QUICKI</b>	Índice Cuantitativo de Comprobación de Insulina
<b>RI</b>	Resistencia a la Insulina
<b>SHR</b>	Ratas Espontáneamente Hipertensas
<b>SM</b>	Síndrome Metabólico
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>SRAA</b>	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
<b>SSA</b>	Secretaria de Salud
<b>TAG</b>	Triacilgliceroles
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>α-MHC</b>	Cadena Pesada de la Miosina alfa
<b>α-TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa

## RESUMEN

El alto consumo de bebidas azucaradas (BA) por la población infantil mexicana es un problema importante de salud debido a su asociación con el desarrollo de enfermedades metabólicas como la obesidad (OB) y con complicaciones cardiovasculares como la hipertensión arterial (HA), patologías que son cada vez más comunes en niños. La OB es una enfermedad que se caracteriza por la acumulación excesiva de tejido adiposo, y que predispone al desarrollo de dislipidemias y estrés oxidante. Asimismo, la OB guarda una relación causal con la HA y el desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC). La vía de señalización de la cinasa activada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina (CaMKII) en el corazón se ha asociado con el desarrollo de HC tanto en la OB como en la HA, y en la OB, su activación se asoció con el estrés oxidante que es favorecido por esta enfermedad. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de 3 dietas altas en carbohidratos (sacarosa, fructosa y su combinación), azúcares comúnmente utilizados para endulzar refrescos, jugos, etc. Las BA están implicadas en el desarrollo de estrés oxidante, la activación génica de HC, el establecimiento de HA y el nivel de oxidación de CaMKII en corazones de ratas de la cepa Wistar, cepa que no presenta predisposición genética a desarrollar HA, y de la cepa SHR, cepa que presenta la predisposición a desarrollar HA. Los resultados muestran que todas las dietas, pero en especial la dieta combinada, causaron en ambas cepas alteraciones metabólicas relacionadas con la OB como son un aumento en la acumulación de tejido adiposo, hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hiperglucemia, resistencia a la insulina (RI) y estrés oxidante, así como un aumento en la oxidación de CaMKII y en la expresión de marcadores moleculares de HC que se comprobaron con la histología y la morfología de los corazones. En las ratas Wistar, las 3 dietas incrementaron la presión arterial. En las ratas SHR, las dietas no exacerbaron la HA generada por la predisposición genética de esta cepa. Además, los datos muestran que el consumo excesivo de estas dietas, desde edades tempranas, causa malnutrición ya que no incrementa el peso corporal, pero generan un exceso de tejido adiposo. El consumo excesivo de BA desde edades tempranas además de producir OB e HC, desarrolla síndrome metabólico (SM).

## ABSTRACT

The high consumption of sugar-sweetened beverages (SSB) by Mexican children is a major health problem due to its association with the development of metabolic diseases such as obesity (OB) and cardiovascular complications such as hypertension (AH), pathologies that are increasingly common in children. OB is a disease characterized by excessive accumulation of adipose tissue, which predisposes to the development of dyslipidemia and oxidative stress. Likewise, OB has a causal relationship with AH and the development of cardiac hypertrophy (CH). The signaling pathway of the kinase activated by the  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin complex (CaMKII) in the heart has been associated with the development of CH in both OB and AH, and in OB, its activation is associated with oxidative stress which is favored by this disease. In the present work we evaluated the effects of 3 diets high in carbohydrates (sucrose, fructose and its combination), sugars commonly used to sweeten soft drinks, juices, etc. The SSB are involved in the development of oxidative stress, the genetic activation of CH, the establishment of AH and the level of oxidation of CaMKII in rat hearts of the Wistar strain, a strain that does not have a genetic predisposition to develop HA, and of the strain SHR, that presents the predisposition to develop AH. The results show that all diets, but especially the combined diet, caused metabolic alterations related to OB in both strains, such as an increase in adipose tissue accumulation, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia, hyperglycemia, insulin resistance (IR) and oxidant stress, as well as an increase in the oxidation of CaMKII and in the expression of molecular markers of CH that were checked with the histology and morphology of the hearts. In Wistar rats, all 3 diets increased blood pressure. In the SHR rats, the diets did not exacerbate the AH generated by the genetic predisposition of this strain. In addition, the data show that excessive consumption of these diets, from an early age, causes malnutrition since it does not increase body weight, but they generate an excess of adipose tissue. The excessive consumption of SSB from early ages, in addition to producing OB and CH, develops metabolic syndrome (MS).

## **I. INTRODUCCIÓN**

El aumento en el consumo de bebidas azucaradas (BA) ha reemplazado el consumo de agua particularmente en la población infantil y adolescente. En México, el elevado consumo de BA es uno de los principales motivos de preocupación tanto de autoridades sanitarias nacionales como internacionales (SSA, 2017), debido a que presenta una dieta de poca calidad, ya que tiene un contenido elevado de carbohidratos, como sacarosa o fructosa, que contribuyen a tener una excesiva cantidad energética total de la dieta. Las calorías aportadas por las bebidas azucaradas tienen poco valor nutricional y pueden no proporcionar la misma sensación de plenitud que ofrece el alimento sólido. Como resultado, puede aumentar el consumo total de energía, lo que a su vez puede llevar a un aumento malsano de peso que se ve favorecido también por un estilo de vida sedentario (OMS, 2018).

Los niños que tienen un alto consumo de BA tienen un mayor riesgo de padecer problemas de salud graves, como OB, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), incremento de la presión arterial (PA) y desarrollo de HA, problemas respiratorios, trastornos del sueño, hepatopatías y complicaciones cardiovasculares como HC, Insuficiencia Cardíaca (IC), arritmias, entre otras, siendo este tipo de complicaciones la principal causa de muerte a nivel mundial de acuerdo a las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2016.

### **1. México: Primer lugar en consumo de refrescos y bebidas azucaradas**

La OMS y el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) reportaron en 2014 que México es el país con mayor consumo de refrescos y de BA. El estudio estimó que un mexicano consume en promedio 163 litros de refrescos y BA por año, y que, 7 de cada 10 niños mexicanos desayunan con este tipo de BA (refrescos, jugos, néctares, leches saborizadas, etc.). Esto equivale a 466 mL por día, lo que representa uno de los consumos más altos del mundo.

La OMS recomienda que la ingesta calórica diaria de azúcares no debe ser mayor al 10% sin embargo, en 2017, el INSP reportó que el 66% de los mexicanos ingiere 12.5% de azúcares al día, y de este el 70% proviene de bebidas azucaradas que son endulzados principalmente con sacarosa y fructosa.

### **1.1 Sacarosa y Fructosa como principales azúcares utilizados en la dieta**

La ingesta de carbohidratos en la dieta es esencial para nuestra vida diaria, ya que son la fuente principal de energía para llevar a cabo las funciones del cuerpo. Cuando no la obtenemos de la dieta, podemos producirlo de manera endógena (en el hígado) en condiciones de ayuno prolongado (Brown, 2014).

Al mencionar azúcares, se hace referencia a todos los azúcares de la dieta que son principalmente de tipo extrínseco. Entre los que se encuentran: sacarosa, maltosa, lactosa, glucosa y fructosa contenida en alimentos y bebidas (zumos y leche), además de la miel y el jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF), etc. Por otro lado, los azúcares intrínsecos son los que están presentes de forma natural en frutas o leche (OMS, 2013).

Los azúcares son carbohidratos simples que proporcionan 3.75 kcal por gramo. Los podemos encontrar como moléculas simples o monosacáridos: glucosa, fructosa y galactosa; como dos moléculas unidas (disacáridos) como la sacarosa (fructosa y glucosa), lactosa (glucosa y galactosa) o maltosa (dos moléculas de glucosa), o como más de dos moléculas unidas (polisacáridos) siendo el glucógeno y el almidón los más comunes (Aranceta, 2013; OMS, 2013).

A nivel mundial, la sacarosa o azúcar de mesa ha sido ampliamente utilizada en la industria alimenticia como el mayor endulzante en la preparación y/o elaboración de postres y bebidas, papillas, alimentos enlatados, etc. Sin embargo, con su uso excesivo en las últimas décadas y las complicaciones a la salud con las que se la ha relacionado, fue necesario buscar alternativas o sustitutos de la sacarosa. Desde los años 80 la fructosa, principalmente obtenida del JMAF (55% de fructosa), ha ido reemplazando a otros edulcorantes nutritivos; representado en la actualidad más del 40% de la totalidad del consumo a nivel mundial. La fructosa fue considerada

durante mucho tiempo como un “azúcar bueno para los diabéticos” dado que presenta un índice glucémico (IG) de 23, comparado con el de la glucosa que es de 100 (Olguin. *et al.* 2015).

Un estudio publicado por Bray, Nielsen y Popkin (2004) sugiere que el consumo de JMAF, en particular en bebidas sin alcohol como refrescos, podría tener un importante papel en la creciente epidemia de OB en los Estados Unidos y en otros países, como México. Son numerosos los trabajos realizados que reportan que el JMAF tiene los mismos efectos dañinos que la sacarosa como sobrepeso, OB, resistencia a la insulina (RI), DM2, dislipidemias, hiperuricemia, hígado graso no alcohólico, daños renales y recientemente problemas cardiovasculares como HA e HC (Olguin. *et al.* 2015; Maersk, *et al.* 2016 y Federico *et al.* 2017).

Como se mencionó anteriormente, la composición del JMAF es conformado principalmente por 55% de fructosa, 40% de glucosa y otro 5 % de otros azúcares como maltosa o maltotriosa, mientras que la sacarosa por un 50% de fructosa y otro 50% de glucosa. Por lo que, los dos endulzantes mayormente usados a nivel mundial, tienen un porcentaje muy similar de glucosa y fructosa.

Goran *et al* (2013) reportan las complicaciones a la salud por el alto consumo de azúcares en la dieta pero no diferencian los efectos de distintos endulzantes por separado para una o más complicaciones; o bien, las alteraciones que pudieran causar en diferentes etapas del individuo como el desarrollo fetal, periodo neonatal y la infancia ya que en estos periodos de desarrollo es donde se tiene reportado que hay un mayor consumo de productos con un alto contenido de azúcar, favoreciendo que en la edad adulta desarrollaren OB.

### **1.1.1 Sacarosa**

La sacarosa es un disacárido conocido comúnmente como azúcar de mesa, está conformado por una molécula de glucosa y una de fructosa y se obtiene principalmente del azúcar de caña y de la remolacha. El consumo excesivo se debe a su agradable sabor, bajo costo, fácil acceso, y, a un alto “marketing” publicitario de productos altamente azucarados dirigido a la población, principalmente, a la sociedad infantil (Powell *et al.* 2007).

El uso de la sacarosa ha sido fuertemente vinculado con el desarrollo de sobrepeso y OB tanto experimentalmente como clínicamente. En México, las BA como refrescos, jugos, néctares, leche de sabor, bebidas energizantes, licuados y aquellas preparadas en el hogar, son endulzadas principalmente con sacarosa (SSA, 2015).

Una vez que la sacarosa es ingerida y separada en glucosa y fructosa, la elevación de glucosa en sangre promueve que la insulina sea secretada por las células  $\beta$  pancreáticas para llevar a cabo la traslocación de los receptores de glucosa (GLUT), en los órganos sensibles a la insulina: hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, para el ingreso de la glucosa a las células (Lehnniger, 2009). Estos GLUT actúan por difusión facilitada y se distribuyen dependientemente en los tejidos corporales; hasta la fecha se han descrito 14 GLUT, agrupados en 3 clases principales, clase I: GLUT 1 al 4 y 14, clase II: GLUT 5, 7, 9 y 11, clase III: GLUT 6, 8, 10 y 12, y el transportador de mioinositol impulsado por protones o GLUT 13 (Saldoval-Muñiz *et al.* 2016).

### **1.1.2 Fructosa**

La fructosa es un monosacárido también conocido como el azúcar de las frutas, el cual una vez ingerido y a diferencia de la glucosa, no requiere de insulina para su ingreso a las células. Las diferencias entre el metabolismo hepático de la glucosa y el de la fructosa, se encuentran básicamente en las primeras etapas; la mayor afinidad de la fructoquinasa por la fructosa comparada con la de la glucoquinasa por la glucosa, determinan, que cuando se dispone de una alta proporción de fructosa, se promueva una mayor generación de triosafosfatos, para la síntesis de triacilglicérols (TAG), acetil CoA (derivada al ciclo de los ácidos tricarbónicos) y una intensa lipogénesis *de novo* (Feinman, 2013; James *et al.* 2013 y Olguin. *et al* 2015).

El JMAF, a diferencia de la sacarosa, está compuesto de fructosa y glucosa libre, mientras que, en la sacarosa, estos monosacáridos se encuentran unidos por un enlace O-glucosídico. Durante la digestión, este enlace es separado por la acción de la enzima sacarasa (conocida también como invertasa) presente en el borde del

cepillo de las vellosidades del intestino delgado, para su posterior absorción y metabolismo por separado de glucosa y fructosa (Le *et al.* 2012).

## **1.2 Metabolismo de Sacarosa y Fructosa**

### **1.2.1 Sacarosa**

En el hígado, se lleva a cabo la oxidación de la glucosa para obtener energía en forma de ATP y la síntesis de glucógeno como molécula de reserva, esto para mantener la glucemia en los períodos interprandiales y durante el sueño. Sin embargo, cuando hay un excedente de glucosa, ésta es transformada por el hígado en ácidos grasos (AG) a través de un proceso conocido como Lipogénesis, después son esterificados con el glicerol fosfato proveniente de la glucólisis para formar TG y ser enviados a la sangre en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL del inglés very low density lipoprotein) (Saltiel, 2011).

Las VLDL interactúan con las lipoproteínas de alta densidad (HDL del inglés high density lipoprotein), que transportan el exceso de colesterol de los tejidos periféricos hacia el hígado para su degradación. Los TG transportados al tejido adiposo a través del torrente sanguíneo son hidrolizados por acción de la enzima Lipoproteín Lipasa (LPL) en AG y glicerol. El glicerol regresa al hígado, y los AG ingresan a los adipocitos, donde son reesterificados con el glicerol fosfato, producido dentro del adipocito a partir de la glucosa que ha ingresado a través de los GLUT 4 por la acción de la insulina (Kersten, 2014). Así, cuanto mayor sea la ingesta de sacarosa o fructosa, habrá un mayor almacenamiento de TG en el tejido adiposo lo que llevará al desarrollo de sobrepeso y obesidad.

### **1.2.2 Fructosa**

Los TG sintetizados pueden ser transportados al plasma o permanecer como depósito intrahepático, dependiendo de las concentraciones de fructosa (Pagliassotti *et al.* 1996). Así también, este constante consumo excesivo favorece un estado de hígado graso no alcohólico (hígado graso simple), es decir, con presencia de grasa, pero poca o ninguna inflamación o daño en las células del hígado; o bien, evolucionar a un estado de esteatosis hepática donde existe una inflamación y daño en sus células, además de la presencia de grasa. La inflamación

y el daño, alterado su funcionamiento de las células del hígado, pueden causar fibrosis o cicatrización en el mismo (Goran *et al.* 2016).

El JMAF, a diferencia de la sacarosa, está compuesto de fructosa y glucosa libre, mientras que, en la sacarosa, estos monosacáridos se encuentran unidos por un enlace O-glucosídico. Este enlace es separado por la acción de la enzima sacarasa (conocida también como invertasa) (presente en el intestino delgado, en el borde del cepillo de las vellosidades intestinales) durante la digestión, esto facilita la absorción y su posterior metabolismo por separado de glucosa y fructosa (Le *et al.* 2012).

## 2. Obesidad

La OB se define como **una acumulación anormal o excesiva de grasa o tejido adiposo** que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2016). La causa principal de este padecimiento se debe a un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, es decir, hay un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico y una disminución en la actividad física (SSA, 2015).

El acumulo excesivo de tejido adiposo depende de la capacidad de almacenamiento de TG. Esta capacidad depende de factores como la tasa de adipogénesis, lipogénesis, apoptosis y angiogénesis; y genéticamente en función de las posibilidades que tengan los adipocitos de sufrir procesos de hiperplasia e hipertrofia (Karpe, 2015 y Cano, 2017). La adiposidad total, así como la distribución de la grasa corporal pueden aumentar el riesgo de padecer enfermedades metabólicas como diabetes y dislipidemias. Así, la grasa subcutánea de la parte inferior del cuerpo (femoral y glúteo) se asocia a un estado de “salud metabólica” y menor riesgo de alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, mientras que la grasa subcutánea y visceral (abdominal-central), se asocian directamente con un mayor riesgo de DM2 y dislipidemias, debido a que existe un mayor número de receptores adrenérgicos en el compartimiento abdominal y por lo tanto, es más susceptible a la lipólisis (proceso metabólico mediante el cual los lípidos son transformados para producir ácidos grasos y glicerol) (Fried *et al.* 2015).

## **2.1 Diagnóstico**

El índice de masa corporal (IMC) junto con el diámetro o circunferencia de la cintura (CC), son actualmente los criterios más utilizados para el diagnóstico de la OB. El IMC: “peso corporal (Kg)/altura (m)<sup>2</sup>” de  $\geq 30$  se considera obeso (tabla 2). En el caso del diámetro de la cintura, la OMS considera que mayor a 88 cm en mujeres y 102 cm en hombres, son indicadores de OB (OMS, 2016). En animales de laboratorio se considera que al presentar diferencia significativa respecto al grupo control del peso corporal o del tejido adiposo visceral, los animales ya presentan obesidad.

## **2.2 Prevalencia**

México ocupa el primer lugar a nivel mundial en **obesidad infantil y el segundo en obesidad en adultos (UNICEF, 2017)**. La Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) en 2016 estimó en un 71.2% de la población adulta (> 20 años) sobrepeso y OB, en adolescentes entre 12-19 años del 36.3%, y finalmente, en los niños (3-11 años) fue del 33.2%, esto se debe principalmente al estilo de vida sedentario y al consumo de productos con alto contenido de carbohidratos como sacarosa y fructosa, favoreciendo el desarrollo de la OB y en consecuencia el riesgo de complicaciones cardiovasculares (SSA, 2016).

## **2.3 Tipos de Obesidad**

La OMS (2016) clasifica a la OB en adultos de acuerdo al valor de IMC, este proporciona la medida más útil de la OB en la población, siendo la misma para ambos sexos (tabla 1). Sin embargo, se le considerarla como un valor aproximado porque puede no corresponder con el mismo nivel de grosor en diferentes personas. Esta medida no sería útil para personas que tienen gran cantidad de músculo al ser atletas o fisicoculturistas, así como, aquellos con gran cantidad de tejido adiposo pero que tienen un peso normal, a estos recientemente se les ha denominado “**Obesos normopeso**” (Jean *et al.* 2014).

En el caso de los niños, es necesario tener en cuenta la edad y el género al definir el sobrepeso y la OB. Con base en estos criterios la OMS creó tablas de percentiles,

dónde niños menores de 5 años, la OB es el peso para la estatura con más de tres desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS, y, para niños de 5 a 19 años la OB es mayor que dos desviaciones típicas por encima de la mediana establecida en los patrones de crecimiento infantil de la OMS (Figura 1).

Tabla 1. Criterios de la OMS para la obesidad en adultos

IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Clasificación	CC (cm)	Clasificación
< 18.5	Infrapeso	Mujeres: > 88	Obesidad
18.5 – 24.9	Normopeso		
25.0 – 29.9	Sobrepeso		
30.0 – 34.9	Obesidad Tipo 1	Hombres: > 102	
35 – 39.9	Obesidad Tipo 2		
≥ 40	Obesidad Tipo 3 (Mórbida)		
≥ 50	Obesidad Tipo 4 (Súper Obesidad)		

### 2.3.1 Obesidad Normopeso

El concepto de OB normopeso, también conocida como sujetos normopeso metabólicamente obesos, ha ganado atención desde entonces, y varios estudios han aclarado algunos temas importantes relacionados con su prevalencia e impacto en el riesgo cardiovascular (Jean *et al.* 2014). Recientemente los médicos han adoptado esta difusión y, algunos inclusive, sugieren que se considere como otro tipo de OB. Los obesos normopeso son aquellas personas que en apariencia son delgadas y con un IMC de normopeso, pero con un porcentaje de grasa mayor al 30% y que tienen los problemas y complicaciones de salud de un paciente obeso (Corral *et al.* 2010).

Este término ha empezado a tener relevancia debido a que han incrementado el número de casos clínicos de pacientes delgados pero que no son sanos, debido a que su alimentación no es correcta o no es sana. Esto se debe a que consumen carbohidratos en exceso, productos fritos o altos grasas, además y de no practicar ningún tipo de ejercicio para compensar el exceso calórico (Jean *et al.* 2014). Estos

pacientes, incluyendo adultos, adolescentes y niños han presentado niveles elevados de glucosa, colesterol, insulina y complicaciones cardiovasculares como HA. A diferencia de un obeso “clásico” que tiene más masa corporal, el obeso normopeso no presenta las mismas características físicas de un obeso, pero sí un exceso de tejido adiposo, órganos con mayor grasa y niveles altos de TG y colesterol comparados con un sujeto sano (Álvarez, 2017).

### ***2.3.2 Obesidad por malnutrición***

La Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), la Organización de Naciones Unidas (ONU) y el programa Mundial de Alimentos (WFP del inglés World Food Programme) en su publicación titulada “El costo de la doble carga de la malnutrición” publicada en abril del 2017, menciona que anteriormente los temas de desnutrición y OB eran tratados como asuntos contrarios e independientes. A nivel mundial estiman que 210 millones de niños padecen desnutrición mientras que 41 millones padecen sobrepeso y OB, esta última puede dar lugar a enfermedades como DM2, HA y algunos tipos de cáncer.

La OMS (2016) define a la malnutrición como las carencias, los excesos o los desequilibrios de la ingesta de energía y/o nutrientes de una persona. Tanto la desnutrición como la OB, son problemas derivados de una malnutrición producida por alteraciones bruscas en el estilo de vida marcados por los cambios en la dieta, actividad física, consumo de tabaco, alcohol, drogas, estrés y problemas relacionados con salud mental (Gutiérrez & Guajardo, 2008).



Figura 1. Tablas de la CDC (Control Disease Center) para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad en niños y adolescentes de 2-18 años de edad. Izquierda (color rosa) para el género femenino. Derecha (color azul) para el género masculino.

El término malnutrición puede llevar a los dos tipos afecciones (Figura 2). 1) la desnutrición que comprende el retraso del crecimiento (estatura inferior a la que corresponde a la edad), emaciación (peso inferior al que corresponde a la estatura), insuficiencia ponderal (peso inferior al que corresponde a la edad) y las carencias o insuficiencias de micronutrientes (falta de vitaminas y minerales importantes) y, 2) la OB y su complicaciones que están relacionadas con el régimen alimentario (cardiopatías, accidentes cerebrovasculares, diabetes y cánceres) (OMS, 2016).

Sin embargo, en ambas afecciones esta malnutrición puede deberse a dietas hipercalóricas por lípidos o carbohidratos, que en niños puede favorecer un pobre

desarrollo debido a la falta de macronutrientes (proteínas principalmente) presentando bajo peso e incluso desnutrición, pero a su vez acumulando tejido adiposo en exceso por su tipo de alimentación hipercalórica (obesidad normopeso), a diferencia de los adultos, que se encuentran completamente desarrollados su estilo de vida, y una malnutrición, conduce a una rápida evolución para desarrollar OB (CEPAL, 2017).



Figura 2. Las causas de la malnutrición por un déficit y por un exceso. CEPAL, 2017.

#### **2.4 Obesidad en niños y adolescente**

La alta incidencia de OB en niños y adolescentes constituye un grave problema de salud pública, además de ser un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, metabólicas, psicológicas, etc. (ver tabla 1), tienen un alto riesgo de desarrollar OB mórbida, (la forma más grave del trastorno), al llegar a la edad adulta (OMS, 2015; SSA, 2016).

Por otro lado, el riesgo de que un niño sea OB aumenta cuatro veces la probabilidad de desarrollar OB si uno de sus padres es obeso, y ocho veces más, si ambos progenitores lo son. Sin embargo, no solo interviene la herencia genética (facilidad

para aumentar de peso y/o una inadecuada distribución de la grasa corporal), sino factores ambientales como el estilo de vida de la familia, la preferencia por determinados alimentos que favorecen el rápido acúmulo de tejido adiposo (OMS, 2015).

### **2.5 Complicaciones**

La OB produce un deterioro progresivo y general del organismo, afecta a la salud tanto física como emocional. Las complicaciones que implican el exceso de tejido adiposo se asocian con un aumento en la oxidación y en el envejecimiento celular acelerado. Los pacientes con exceso de grasa, manifiestan un síndrome metabólico (SM), con un aumento de colesterol, triglicéridos y glucosa (Luengo & Beato, 2010). En la tabla 2 se clasifican las enfermedades ocasionadas por la OB de acuerdo al tipo de complicaciones.

Tabla 2. Morbilidades relacionadas con la OB

<b>Complicaciones</b>	<b>Enfermedades</b>
Metabólicas	Diabetes mellitus tipo 2 Síndrome metabólico Dislipidemias Hipercolesterolemia Resistencia a la Insulina Hiperinsulinemia
Cardiovasculares	<b>Hipertensión arterial</b> <b>Hipertrofia cardiaca</b> Insuficiencia cardiaca Aterosclerosis
Psicológicas	Depresión Baja autoestima
Ortopédicos	Epifisiolisis de la cabeza del fémur
Neurológicas	Pseudomotor cerebral
Hepáticas	Esteatohepatitis no alcohólica
Respiratorias	Apnea del sueño
Renal	Proteinuria

### **3. Resistencia a la Insulina**

La RI se define como las concentraciones de insulina en sangre superiores a las fisiológicas para mantener la glucemia en ayuno en concentraciones inferiores a 100 mg/dL (Kahn *et al.* 2006). Sin embargo, durante la OB la capacidad de hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos para almacenar TG inducidos por la insulina se ve alterada. Las vacuolas de lípidos al aumentar excesivamente de tamaño, van desplazando todos los organelos subcelulares del adipocito hasta el punto que ya no hay espacio físico para ellos, evitando que puedan desempeñar sus funciones. Esta situación conduce a la pérdida de grasa del adipocito y de su función; el tejido adiposo se hace resistente a la insulina como respuesta adaptativa a altas concentraciones de TG para evitar un daño celular (Fried *et al.* 2015).

La regulación a la baja de los receptores de insulina en los adipocitos provoca que éstos sean más sensibles a las hormonas contraínsulínicas (CI): glucagón, cortisol, adrenalina, etc., que activan la enzima Lipasa Sensible a Hormonas (LSH) reguladora de la hidrólisis de TG (lipólisis), produciendo un vaciamiento parcial del adipocito de glicerol y ácidos grasos libres hacia la sangre. Por otro lado, cuando los adipocitos sobrepasan su capacidad de almacenamiento, inician una respuesta inflamatoria al segregar citocinas que atraen células del sistema inmunitario como macrófagos que se infiltran en el tejido adiposo). Estos macrófagos producen el factor de necrosis tumoral alfa ( $\alpha$ -TNF) y otras citocinas proinflamatorias como la interleucina 6 (IL-6) que hacen que el estado de RI sea permanente; todas estas sustancias interfieren en la señalización de la insulina e inhiben la acumulación de TG en el adipocito. Para que el adipocito vuelva a almacenar TG es necesario que aumente la liberación de insulina llevando, a estados de hiperinsulinemia para compensar el efecto que ejercen el  $\alpha$ -TNF y la IL-6 sobre la acción de la insulina. (De Luca & Olefsky, 2009; Fernandez *et al.* 2009; Benito, 2014; Lafontan, 2014).

Los AG generados por la lipólisis, actúan sobre las células beta pancreáticas estimulando inicialmente la secreción de insulina, pero a largo plazo producen lipotoxicidad mediante la formación de ceramidas, que activan mecanismos de muerte celular en estas células al liberar citocromo C de la mitocondria, que activa las caspasas responsables de la apoptosis de las células beta pancreáticas. En consecuencia, habrá disminución de la secreción de insulina y se anula la posibilidad de una hiperinsulinemia compensatoria. La disminución en la secreción de insulina, por tanto, incrementa la lipólisis y la concentración de AG en sangre (Boden *et al.* 2002).

En el músculo esquelético se ha postulado que la RI se presenta cuando éste tejido utiliza los AG provenientes de la hidrólisis de TG, y no, a la glucosa proveniente del glucógeno almacenado en el músculo. La oxidación de una molécula de ácido palmítico (el ácido graso más frecuentemente acumulado) proporciona 129 moles de ATP, mientras que la oxidación de una molécula de glucosa proporciona solo 36 moles de ATP. El glucógeno acumulado en el músculo queda prácticamente intacto, situación que se agrava con la falta de actividad física (Coen *et al.* 2010). Si el músculo esquelético permaneciera sensible a la insulina, continuaría captando glucosa (a través de los GLUT4) para sintetizar glucógeno y los depósitos crecerían de forma descontrolada. De esta manera, cuando el músculo se hace resistente a la insulina, la poca o nula captación de glucosa previene la acumulación excesiva de glucógeno que puede ser perjudicial para el mismo tejido (Gutiérrez *et al.* 2017).

Además, otra consecuencia de la RI es por los altos niveles de glucosa en ayuno y postprandial; esto como consecuencia de una disminución de la capacidad del músculo esquelético para seguir captando glucosa sanguínea proveniente de los alimentos, debido a que sus depósitos de glucógeno continúan total o parcialmente a su máxima capacidad (Poitout, 2008). Los niveles elevados de glucosa llevan a estados de glucotoxicidad y a consecuencia a un aumento en la entrada de glucosa por los GLUT2 a la célula beta pancreática que disminuye la síntesis y secreción de insulina al incrementarse la glicosilación de proteínas como las del retículo endoplásmico y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la

oxidación de la glucosa. La glucotoxicidad y la lipotoxicidad de la célula beta pancreática terminan conduciendo a apoptosis de la célula beta, lo que induce la aparición DM2 en pacientes con exceso de tejido adiposo (Cano *et al.* 2017).

### **3.1 Diagnóstico**

Los métodos de diagnóstico para RI se clasifican en indirectos y directos. El método directo más confiable es el Clamp hiperinsulinémico-euglucémico, pero es un método complejo, invasivo y no apropiado en la práctica clínica de rutina, sin embargo, los indirectos como el de evaluación del modelo de homeostasis (HOMA del inglés Homeostasis Model Assessment) es el método mayor utilizado debido a que es más sencillo y no es invasivo, pero tiene la desventaja que en relación al Clamp es moderada su correlación. Por otro lado, el índice cuantitativo de comprobación de insulina (QUICKI del inglés Quantitative Insulin Sensitivity Check Index), a pesar de ser un método indirecto es un método utilizado en niños y adolescentes (García *et al.* 2007).

### **4. Hipertensión Arterial**

Dentro de las complicaciones de la OB, la HA es la enfermedad cardiovascular que se presenta con mayor frecuencia (OMS, 2016). El sistema circulatorio tiene un extenso sistema para el control de la presión arterial; la presión es resultado de dos factores principales: el gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica ( $P = G \times R$ ). Se infiere que la HA puede deberse a la elevación del gasto cardiaco (GC), de la resistencia vascular o de ambos. El gasto cardiaco es controlado por factores que regulan la contractilidad miocárdica, la frecuencia cardiaca (FC), el ritmo y la pre y poscarga. La magnitud de las resistencias vasculares periféricas se relaciona con la viscosidad sanguínea, la elasticidad de las paredes vasculares, el diámetro de su luz y la contracción o tono del músculo liso vascular (Rodríguez-Herrera *et al.* 2009).

La HA también conocida como tensión arterial alta o elevada, es un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta (AHA, 2017). La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos

sanguíneos al ser bombeada por el corazón; cuanto más alta es la tensión, más esfuerzo realiza el corazón para bombear la sangre (ACC, 2017).

#### **4.1 Diagnóstico**

En 2017, el Colegio Americano de Cardiología (ACC del inglés American College of Cardiology) y la Asociación Americana del Corazón (AHA del inglés American Heart Association) definen que la presión arterial sistólica (PAS) normal en adultos, es <120 mm Hg durante la contracción (tensión sistólica) y que la presión arterial diastólica (PAD) es <80 mm Hg durante la relajación (tensión diastólica). Así, cuando PAS es igual o superior a 130 mm Hg y/o la tensión diastólica superior a 90 mm Hg, se considera que un sujeto presenta HA. Una persona con HA no controlada puede presentar infarto de miocardio, ensanchamiento del corazón (hipertrofia cardiaca) y, a largo plazo, una insuficiencia cardiaca (IC) (OMS, 2016; AHA & ACC, 2017).

En México no hay tablas centilares de niños de todas las edades pediátricas por lo que se utilizan las tablas propuestas por la Task Force de los Estados Unidos y por la OMS que se basan en género, edad, y estatura para diagnosticar a un niño y/o adolescente con esta patología. Estas tablas consideran a sujetos de 1 a 17 años de edad. De acuerdo a estos criterios la Task Force (2000) determina que, en una PA normal, la presión sanguínea sistólica (PAS) y diastólica (PAD) deben ser inferiores al centil 90 y que, para ser considerados con HA, la presión debe ser superior al centil 95 (> 140/90 mmHg) para la edad, género y centil de talla en tres mediciones tomadas de cuatro a ocho semanas.

#### **4.2 Prevalencia**

La ENSANUT (2016) estimó que la prevalencia de adultos con HA > 20 años fue de 25.5%, cifras que aumentaron de forma paralela con la presencia de OB. Sin embargo, se menciona también el incremento de esta enfermedad en niños y adolescentes obesos, por otra parte, en niños con padres hipertensos tienen una

predisposición genética de padecer HA desde la infancia o en la edad adulta como suele presentarse (OMS, 2016).

### **4.3 Tipos de HA**

La HA sistémica se clasifica en dos tipos: 1) hipertensión esencial o primaria cuando no se encuentra una causa identificable e 2) hipertensión secundaria cuando se identifica una causa. La HA secundaria se presenta hasta en un 90% de los pacientes pediátricos. La hipertensión esencial es la forma más frecuente de hipertensión en adultos (90%) y es más frecuente en adolescentes que en niños pequeños. Aunque la prevalencia de la hipertensión esencial es más baja en los niños y adolescentes (10 a 15 %) que, en los adultos, hay pruebas de que la hipertensión se inicia desde la infancia (Santamaria & Gadostiri, 2015).

### **4.4 HA en niños y adolescentes**

La HA como un proceso, se inicia desde la concepción, y es detectada desde la infancia y adolescencia. En México su prevalencia varía entre 1 a 5 %, asociándose a factores de riesgo como: desnutrición "in útero", sobrepeso u OB, sedentarismo y alteraciones metabólicas. La edad, eleva la prevalencia, y en México, hay un 10-20 % de afectación a los 20 años, y de 60 % en los cincuenta años (Salcedo-Rocha *et al.*, 2010). Existen diversos factores, como la historia familiar. Los niños de familias hipertensas pueden tener una PA más alta que los de familias normotensas, otros factores que contribuyen a la hipertensión esencial, además de la predisposición genética, se encuentran la reactividad de la musculatura lisa vascular, las alteraciones genéticas del transporte del calcio y del sodio, el sistema renina-angiotensina y la RI (Rodríguez-Herrera *et al.* 2009). El estudio de Bogalusa reportado por Freedman *et al.* (1999), mostró que los niños con OB tenían 4.5 veces más posibilidades de tener cifras elevadas de PAS y 2.4 veces en la PAM. La hipertensión en los obesos inicialmente es de predominio sistólico sin hipertensión diastólica, lo que sería un estadio temprano de hipertensión esencial.

#### 4.5 Complicaciones

El aumento de la presión sanguínea en forma sostenida y sin control terapéutico contribuye en forma importante al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. De los pacientes con HA no tratada, el 50% muere de enfermedad coronaria o falla cardíaca, cerca de un 33% lo hace por enfermedad cerebrovascular y entre un 10 a 15% por falla renal (Pineda-Gómez *et al.* 2007). En la tabla 2 se muestran algunas morbilidades a causa de la HA.

Tabla 2. Morbilidades relacionadas con la HA en niños y adolescentes

Complicaciones	Enfermedades
Cardiacas	<b>Hipertrofia Cardíaca</b> Angina de pecho o Infarto miocárdico Enfermedad coronaria Insuficiencia cardíaca
Vasculares periféricas	Enfermedad vascular de miembros inferiores
Endoteliales	Enfermedad hipertensiva por disfunción endotelial
Renales	Arterioesclerosis arterial aferente y eferente Lesión glomerular
Neurológicas	Retinopatía hipertensiva Infarto cerebral Hemorragia cerebral Encefalopatía hipertensiva
Sexuales	Disfunción eréctil

#### 5. Hipertrofia cardíaca

La OMS en 2015, reportó que **la principal causa de muerte a nivel mundial** fueron las **complicaciones cardiovasculares**, que representa aproximadamente del 30 al 35 % del total de los casos. Las comorbilidades como HA, la RI, la DM2 y otras complicaciones cardiovasculares como la **HC** entre otras, se ven aumentadas considerablemente en pacientes que padecen OB.

La frecuencia de HA entre las personas obesas es entre 2-3 veces mayor que en sujetos con normopeso y a su vez, entre los hipertensos, la frecuencia de obesos es mucho mayor; esta relación conjunta aumenta hasta 4 veces el desarrollo de HC.

(López de Fes *et al.* 2004). Poco se sabe sobre el mecanismo molecular por el cual sujetos con OB y OB-HA desarrollan HC, por lo que es necesario realizar estudios como este que permitan entender el posible mecanismo que lleva a esta patología.

La HC es definida como el aumento de la masa del corazón y es el mayor predictor de enfermedad cardíaca progresiva; se encuentra asociada con HA e IC, las cuales conllevan a un agrandamiento del corazón (Ho YL *et al.* 1998). A nivel macroscópico, la HC se caracteriza por un crecimiento del grosor de la pared, mientras que a nivel microscópico se observa un incremento del tamaño del cardiomiocito, sin incrementar el número de células y con alteraciones en la estructura sarcomérica (Frey, 2004).

El corazón está compuesto de colágeno, vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas y fibroblastos, los cuales liberan factores de crecimiento, citoquinas, proteínas de la matriz extracelular y proteasas. La pérdida del equilibrio entre ellas puede conducir a la HC (Swynghedauw, 1999). El resto de las células del corazón, también llamados miocitos o cardiomiocitos, son células diferenciadas que pierden la capacidad de proliferación después del nacimiento del individuo, sin embargo, tienen la capacidad de responder a estímulos que promueven su crecimiento como, por ejemplo, péptidos vasoactivos, estimulación  $\beta$ -adrenérgica, factores inductores de crecimiento y a un aumento del estrés mecánico por una sobrecarga hemodinámica principalmente.

### **5.1 Tipos de Hipertrofia Cardíaca**

Existen diferentes tipos de HC de acuerdo a diferentes causas: por estímulos mecánicos, hemodinámicos, neurohumorales, hormonales o patológicos. En atletas y mujeres embarazadas, por ejemplo, la constante estimulación mecánica debida a la demanda metabólica, lleva a la hipertrofia fisiológica, ocasionado por un incremento en la expresión de genes sarcoméricos como la cadena pesada  $\alpha$  de la miosina ( $\alpha$ -MHC por sus siglas en inglés), y la  $\alpha$ -actina, entre otros (Rohini, 2010). Este tipo de hipertrofia conocida como fisiológica es de tipo concéntrica y no es

perjudicial para la persona, no deteriora la función cardíaca e incluso puede mejorarla.

Los tipos de hipertrofia patológica son: la concéntrica y la excéntrica (Figura 3), caracterizadas por la activación de genes fetales que llevan a una respuesta de agrandamiento del miocardio. La **concéntrica** ocurre cuando hay un aumento en el grosor de los cardiomiocitos debido a que la incorporación de sarcómeros es en paralelo. Este tipo de hipertrofia presenta una escasa o incluso nula dilatación de la cavidad ventricular debido a que los cardiomiocitos crecen a lo ancho generando un mayor grosor, principalmente en el ventrículo izquierdo. Esta HC se encuentra asociada a estímulos que producen sobrecarga crónica de presión como la HA (Kehat *et al.* 2011; Beatriz, 2012; Keat *et al.* 2015).

Por otro lado, la HC **excéntrica** se caracteriza por aumento en el espesor de la pared ventricular y en el volumen de la cavidad, debido a que la incorporación de los sarcómeros en este tipo de hipertrofia es en serie y no en paralelo, lo que induce a un crecimiento mayor en longitud. Esto se relaciona con una sobrecarga de volumen. En estados de OB el tejido adiposo induce la angiogénesis, así como un aumento de sangre como respuesta a la vascularización (Kehat *et al.* 2011; Beatriz, 2012; Keat *et al.* 2015).

Cabe mencionar, que en todos los tipos de HC patológica existe un aumento de fibrosis, como resultado de una mayor síntesis de colágeno por los fibroblastos. Cuando una persona es obesa y además tiene HA, el gasto y la FC aumentan, es decir, el corazón es sometido a un esfuerzo excesivo resultando un agrandamiento (hipertrofia) (Haider *et al.* 1998; Mathew *et al.* 2001).

La HC patológica presenta un deterioro en la función contráctil que habitualmente evoluciona IC (Beltrami, 2001). En sujetos con una HC por un periodo prolongado y sin diagnóstico de esta, es característico que se presente un remodelamiento cardíaco por la dilatación de los ventrículos, aumento de la fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y reprogramación de la expresión génica. Este proceso empeora a través del tiempo pero desde el inicio conducen a la activación de los genes tempranos (*c-jun*, *c-fos*, *c-myc*) y de los

genes fetales de los péptidos natriuréticos atrial (ANP) y cerebral (BNP), así como a las isoformas fetales de las proteínas contráctiles, la cadena pesada de la miosina  $\beta$  (MCB- $\beta$ ) y  $\alpha$ -actina esquelética, entre otros, que son considerados y utilizados como los marcadores moleculares de la respuesta hipertrófica (Chein, 1993; Carreño *et al.* 2006). El ANP es un péptido secretado por los cardiomiocitos de las aurículas como respuesta al aumento de la PA y/o a la sobrecarga de volumen, y se ha observado que su expresión se encuentra aumentada en corazones con una sobrecarga de presión y/o volumen constante, debido a ello resulta de gran utilidad como marcador genético de HC (Needlman, 1989, Schwartz *et al.* 1990 y Rohibi *et al.* 2010).

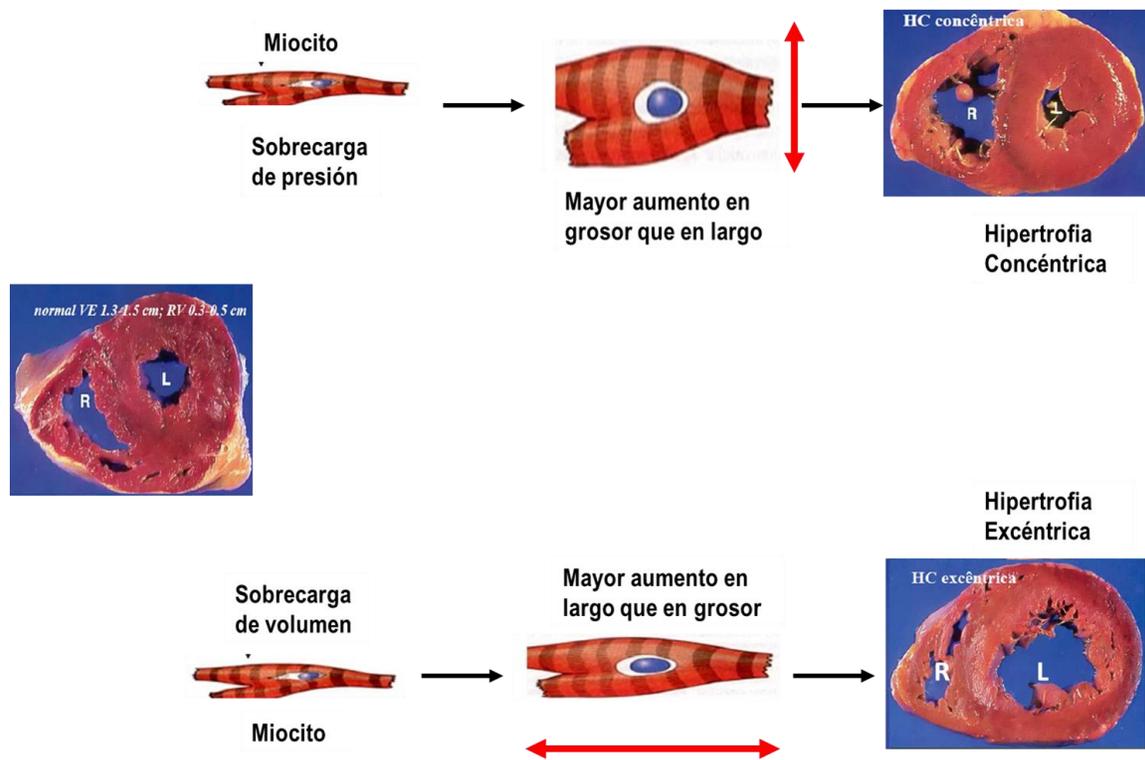


Figura 3. Representación gráfica de los tipos de hipertrofia cardíaca patológica, con imágenes de cortes transversales de corazón.

## 5.2 Remodelación Cardíaca durante la HC

La HC forma parte de un proceso de remodelación que se desarrolla de forma lenta y progresiva que conduce a cambios en el tamaño, forma y función del corazón

hasta hacerlo insuficiente (Swynghedauw,1989). Esta remodelación la podemos dividir en 5 procesos característicos:

- 1) Aumento en el tamaño de los miocitos como consecuencia del incremento en la síntesis de proteínas que conforman los sarcómeros.
- 2) La replicación en paralelo o en serie de los sarcómeros, con crecimiento de los miocitos y aumento en el grosor o en lo largo de la pared ventricular izquierda, la cual contribuye a disminuir el estrés parietal y mantener la función del corazón en la fase de compensación. (hipertrofia concéntrica); o bien, contribuye al aumento del estrés parietal y una fase de descompensación (hipertrofia excéntrica).
- 3) Aumento en el contenido de proteínas contráctiles como la miosina de la cadena ligera tipo 2 (MLC-2).
- 4) La expresión de genes tempranos inmediatos, como c-jun, c-fos, Egr-1 y c-myc.
- 5) Regresión a un fenotipo molecular caracterizado por proteínas expresadas por genes fetales.

Por otro lado, también ocurren modificaciones en la composición y distribución de los componentes de la matriz extracelular del tejido cardiaco, que se caracterizan por el incremento de la colágena I y III que producen fibrosis provocando que el corazón presente un estado rígido durante la diástole contribuyendo a la disfunción diastólica (Brower, 2006). Además, también se ha reportado la aparición de ventrículos dilatados, conocido clínicamente como cardiomiopatía dilatada, caracterizada por una hipertrofia y dilatación progresiva del corazón que disminuye la capacidad del corazón para bombear sangre eficazmente, aunque los mecanismos que generan esta cardiomiopatía aún no están claros. La apoptosis también presente durante el remodelado cardiaco se ha asociado al desarrollo de la IC y a su progresión a estadios terminales causando la pérdida constante de la masa ventricular y el adelgazamiento de la pared ventricular (Condorelli, 1999 y Sanders, 1999). Por último, también se ha visto que durante el remodelado cardiaco ocurre un engrosamiento de la pared vascular de los vasos sanguíneos para aumentar la resistencia vascular. Todos estos cambios patológicos favorecen una

progresiva pérdida de la función diastólica y sistólica del ventrículo que induce a la transición de HC compensada a IC.

Erickson (2011), reporta que las vías de señalización redox (oxidación-reducción) en los procesos subyacentes de HC. Así, en la OB se presenta un aumento de ERO favorecido por el exceso del tejido adiposo, mientras que en la HA ocurre un remodelamiento vascular por el aumento de la presión activando el SNS, desencadenando una sobre activación del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) y de factores de inflamación, que contribuirán con el aumento de ERO y de una disminución del Óxido Nítrico (ON) que generarán una disfunción endotelial. En general, el aumento del estrés oxidativo conduce a la oxidación y daño de macromoléculas, membranas, ADN y enzimas implicadas en la función celular y la homeostasis. Por lo tanto, la activación de los mediadores en la regulación metabólica por ERO, así como la disminución de la actividad de los antioxidantes endógenos lleva al desarrollo de esta patología.

### **5.3 Hipertrofia cardíaca en la hipertensión arterial**

Los cambios hemodinámicos se pueden deber a un aumento de la precarga (hipertrofia por sobrecarga de volumen) o a un aumento de la poscarga (hipertrofia por sobrecarga de presión), (Schillaci, 2000). La HA, como sobrecarga de trabajo *per se* o asociada con estímulos neurohumorales, agonismo  $\beta$ , SRAA, la endotelina-1 (ET-1), o factores de crecimiento insulín-dependientes, actúan sobre receptores de la membrana miocítica generando, en forma directa o indirecta, señales que activan el programa genético de HC y apoptosis (Figura 4). El aumento en la sobrecarga de presión en el corazón promueve un incremento en la FC como respuesta a esta sobrecarga; la liberación de adrenalina (AD), noradrenalina (NA) de angiotensina II (AngII) y ET-1 por los mismos cardiomiocitos, incrementa la concentración intracelular del  $[Ca^{2+}]_i$  para llevar a cabo la contracción cardíaca (Piskors, 2004; De la Sierra, 2010).

Las vías que se encuentran bien definidas son las que se inician con los receptores de membrana acoplados a proteínas G, en particular las de tipo Gq (GqPCR) cuando se unen a su ligando. Así, cuando la AD, NA, Ang II o la ET-1 se unen al

receptor Gq se activa la fosfolipasa Cβ (PLCβ) para generar diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). El DAG activa a la proteína quinasa C (PKC). El IP<sub>3</sub> interacciona con sus receptores/canales liberadores de Ca<sup>2+</sup> (IP<sub>3</sub>Rs) localizados en los depósitos intracelulares de Ca<sup>2+</sup> causando su liberación y un aumento en la ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>). Esto activa a la PKC dependiente de Ca<sup>2+</sup> y a las vías de señalización de la proteína quinasa activada por el complejo Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (CaMKII) y la de la fosfatasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (calcineurina, CnA) Estas enzimas inician una serie de reacciones de fosforilación y desfosforilación modificando la actividad de diferentes proteínas que regulan la función de los miocitos y la expresión de diferentes genes que llevan a desarrollar HC (Mattiuzzi, 1997; Dorn, 2005 y Wu *et al.* 2006).

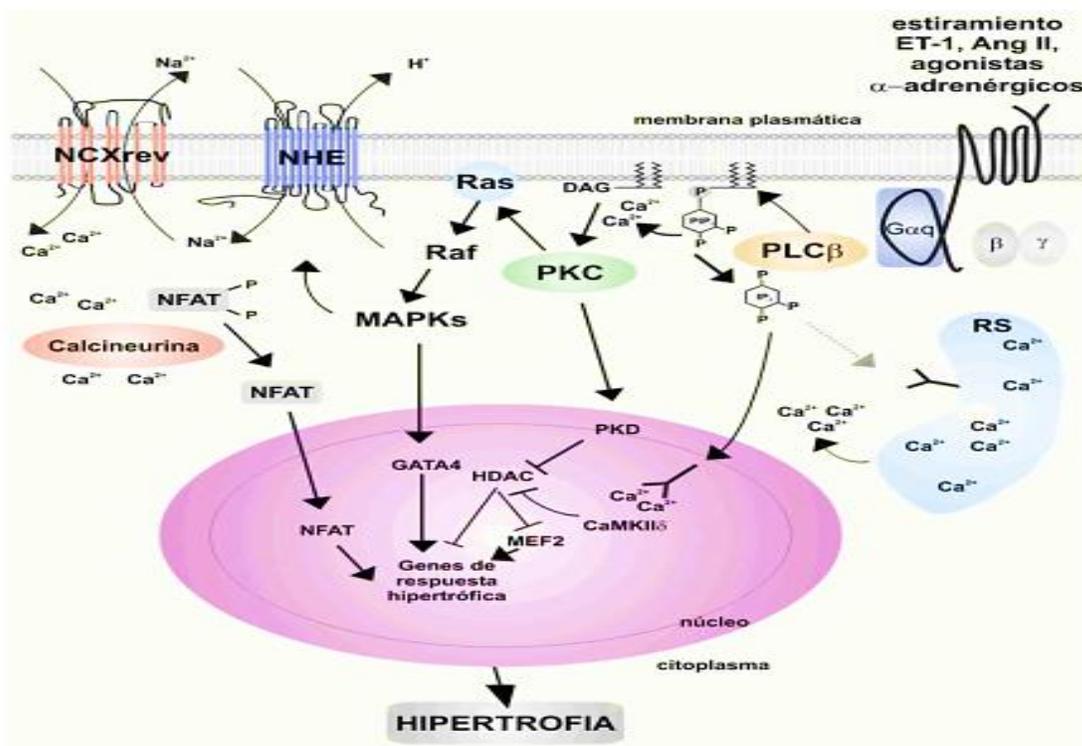


Figura 4. Vías de señalización que causan HC durante la HA. PKC: Proteína quinasa C. PLCβ: Fosfolipasa C beta. MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos. Tomada de Beatriz (2012).

#### **5.4 Hipertrofia cardiaca en la obesidad**

Entre las complicaciones por el exceso de tejido adiposo, las cardiovasculares tienen un alto índice de mortalidad; entre ellas, la HA ha sido la más estudiadas. Sin embargo, poco se conoce sobre cómo la OB *per se* es capaz de desarrollar HC. Alpert *et al.* (2016) reportan que con el aumento de tejido adiposo hay un incremento en la vascularización y por ende del volumen de sangre, incrementando del GC en estos pacientes; estimando que, por cada 100 gr de grasa, el GC incrementa de 2 a 3 L/min.

Brady, (2016) reporta que tanto la OB como la HA han aumentado sustancialmente en los últimos años en niños y adolescentes entre 2 y 19 años. Así mismo ha aumentado la evidencia de que la OB y la HA están implicadas en el desarrollo de daño de órganos, como el corazón, induciendo HC. Tradicionalmente se pensaba que la HC solo ocurría en respuesta al aumento de la poscarga como sucede en la HA, sin embargo, existe evidencia que demuestra que la OB está asociada con la HC independientemente de la PA elevada. Los factores hemodinámicos y no hemodinámicos que contribuyen a la patología del remodelado cardiaco sugieren que la adiposidad y HA tienen un mayor efecto sobre la geometría del corazón si se presentan juntas que si se presentan por separado, es decir, se potencia el efecto de remodelación cardiaca (Abel *et al.*, 2008).

Estudios recientes de metaanálisis, demostraron que en niños hipertensos del 34% al 41% presentaron HC, y que, en niños obesos diagnosticados hipertensos, con un control de su PA, bajo supervisión médica y obesos normotensos también la presentaron, así como, niños y adolescentes (de 2 a 19 años de edad) se demostró una alta proporción de obesos y con HC (Crowley *et al.*, 2011). En la última década la prevalencia de OB infantil ha sido 4 veces mayor y se ha duplicado la HC en niños, influyendo diferentes variables como edad, sexo, raza y el IMC. Por lo tanto, se concluyó que la OB *per se* es capaz de inducir HC con y en ausencia de HA.

La asociación entre la OB e HC no es un concepto nuevo. En un estudio realizado por la universidad de Boston en 1991, a través del proyecto *Framingham Heart Study*

demonstró que, de acuerdo a la edad, PA e IMC se puede predecir si niños obesos son capaces de desarrollar HC en edad adulta. Disan *et al* (2015) mencionan que niños obesos hipertensos y normotensos presentaron HC con un mismo índice de masa ventricular izquierda. Brady (2016) reportó que en adolescentes y adultos se observó lo mismo que en niños, esto soporta la idea de que desde edades muy tempranas los sujetos con OB si bien no tienen HC tienen altas probabilidades de desarrollarla posteriormente.

Abel *et al.* (2008) indican que hay factores hemodinámicos y no hemodinámicos que contribuyen a la remodelación cardíaca asociada con la OB. Entre los factores hemodinámicos destaca que con un aumento en el tejido adiposo hay un mayor requerimiento metabólico, vascularización, volumen de sangre circulante y de GC, lo que trae como resultado un aumento del volumen intravascular y sistólico que lleva un incremento de la precarga, favoreciendo la remodelación cardíaca como respuesta adaptativa y protectora, pero que con el tiempo se vuelve perjudicial.

En un estado de OB hay cambios hemodinámicos como la apnea obstructiva del sueño, altamente prevalente en sujetos obesos, que lleva a la activación del sistema nervioso simpático y a la liberación de catecolaminas, que como respuesta neurohumoral, conducen a HC a través de efectos cardíacos directos e indirectos (aumento de la PA y la contractilidad cardíaca); por su parte el SRAA se mantiene activado, lo que conduce a una vasoconstricción, incrementos de la PA y de la masa del corazón.

Conforme aumenta la masa adiposa, la capacidad de los adipocitos para almacenar combustible se ve dañada debido a un deterioro de la adipogénesis, como resultado, el exceso de TG se almacena en otros tejidos, como el páncreas, el hígado y el corazón. Cuando estos órganos están expuestos a ácidos grasos libres en exceso, las gotas de lípidos se acumulan en el citosol proximal a las mitocondrias, provocando a largo plazo una disfunción en estos órganos que resultan en comorbilidades clínicas como DM2, la esteatohepatitis no alcohólica y la miocardiopatía dilatada (Murdolo, 2015).

La RI y la hiperinsulinemia promueven una HC a través de varios mecanismos interconectados. La glucotoxicidad puede afectar directa e indirectamente al cardiomiocito. La hiperinsulinemia también activa el SNS y conduce a la disfunción del miocardio. Cuando la deposición de grasa visceral afecta al corazón, hay una mayor cantidad de grasa epicárdica; ésta se correlaciona con la gravedad de la HC. El tejido adiposo disfuncional y la hipertrofia de los cardiomiocitos son consecuencia de una excesiva acumulación de ácidos grasos libres y lipotoxicidad, deteriorándose la contractilidad cardíaca y la capacidad dilatadora del ventrículo izquierdo (Lacobellis, 2005).

### **5.5 Bases moleculares de la Hipertrofia Cardíaca**

El proceso de remodelación cardíaca para inducir hipertrofia en los cardiomiocitos es un evento de elevada complejidad, ya que involucra fenómenos de comunicación celular con diferentes estímulos responsables de activar distintas vías de señalización intracelular que conducirán a cambios en la arquitectura y funcionamiento celular. Las distintas vías de transducción para desarrollar HC se entrecruzan unas con otras, permitiendo que la llegada de una señal pueda activar a más de una vía, lo que va a garantizar que la señal logre su efecto (Rohini *et al.* 2011; Keat *et al.* 2015).

La **Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina Proteína quinasa II** (CaMKII) participa en diferentes vías de transducción de señales para el desarrollo de HC, entre las vías que participa directamente se encuentran la histona deacetilasa 5 (HDAC5). Sin embargo, otras vías como la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), proteína Kinasa C (PKC), son activadas en forma indirecta por la CaMKII (Figura 5).

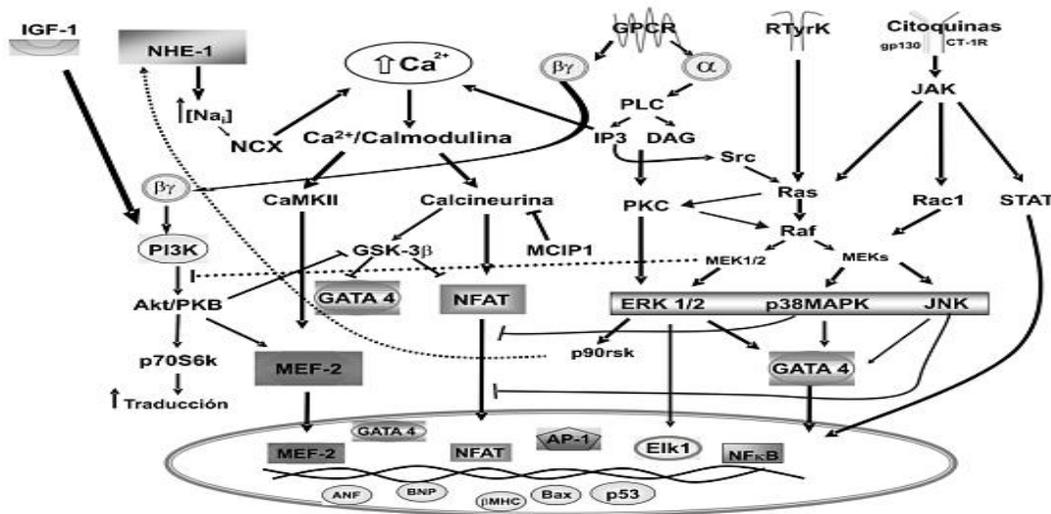


Figura 5. Diferentes vías de señalización que conducen a la hipertrofia cardíaca. GPCR: receptor acoplado a proteína G. PKC: proteína quinasa C. DAG: diacilglicerol. IP3: Inositol trifosfato. PLC: fosfolipasa C. JAK: janus quinasa. Tomado de Beatriz (2016).

## 6. Estrés oxidante

La generación de ERO ocurre de forma fisiológica en las células del organismo, ya que participan en la señalización de diferentes procesos celulares. Sin embargo, la producción excesiva de ERO conduce a un daño irreversible e incluso a la muerte celular. En el estrés oxidante, la cantidad excesiva de ERO no es compensada por los sistemas antioxidantes (Dorado *et al.* 2003).

Las ERO, se producen como intermediarios en las reacciones redox, éstas son entidades químicas reactivas que comprenden dos grupos principales: radicales libres (por ejemplo, superóxido  $[O_2^-]$ , hidroxilo  $[OH^\cdot]$ , óxido nítrico  $[ON^\cdot]$ ) y derivados no radicales de  $O_2$  (ejemplo;  $H_2O_2$ ,  $ONOO^-$ ). Las fuentes principales de ERO en el corazón son: la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH), xantina oxidasa, sintasa del ON desacoplada y la cadena respiratoria mitocondrial (Fridovich, 1997).

### 6.1 Producción de ERO en tejido cardíaco

Son diversos los mecanismos que contribuyen a la producción de ERO tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Una de las principales fuentes de ERO

cardiovascular es la familia Nox (NADPH oxidasas). Mientras que la mayoría de los procesos celulares pro-oxidantes crean ERO como subproductos, las enzimas Nox producen niveles elevados de ERO en forma de superóxido y peróxido de hidrógeno. La actividad endógena de NADPH oxidasa es baja en tejido cardiaco, pero se activa potentemente por una serie de agonistas cardiovasculares, como Ang II, ET-1, trombina y TNF- $\alpha$  cuando se presenta HC. Otra enzima que contribuye como fuente de ERO en el corazón es la xantina oxidasa, la cual se encarga de producir superóxido. La activación de las enzimas Nox y de la xantina oxidasa ocurre en respuesta al estrés mecánico (Kumar, 2012).

Las mitocondrias también son una fuente importante de ERO, ya que juegan un papel crítico en la fisiología cardiaca. El superóxido se genera en varios puntos dentro de la cadena de transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa. La estimulación crónica de la actividad mitocondrial conduce al desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones y a un gran aumento de producción de ERO, que contribuye a la disfunción del miocardio (Veenman, 2006 y Xiao et al. 2010).

La morfología y la composición proteica mitocondrial se encuentran alteradas de manera significativa durante la remodelación cardiaca. El ADN mitocondrial es más susceptible a la oxidación que el ADN nuclear, lo que resulta en un aumento de la producción de ERO y en un daño mitocondrial que puede inducir una lesión celular severa en el miocito (Kumar, 2012).

Varias proteínas cardiacas son funcionalmente sensibles a las condiciones pro-oxidantes. Las MEK, pertenecientes a la familia de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK del inglés Mitogen Activated Protein Kinases) son inhibidas por las ERO mientras que las ERK  $\frac{1}{2}$  (otra familia de la MAPK) son activadas por éstas. Otra proteína que es activada por las ERO es la CaMKII, la cual una vez activa contribuye a la remodelación cardiaca que conlleva a una respuesta hipertrófica ya sea directa o indirectamente (Bueno *et al.* 2000 y Zhang *et al.* 2003).

## **6.2 Defensa antioxidante**

Existen mecanismos de defensa complementarios que se han desarrollado como

respuesta para proteger los componentes celulares del daño irreversible por el estrés oxidativo. Dentro de estos mecanismos de defensa, existen dos mecanismos generales: 1) la conversión de ERO a productos de desecho más inocuos y 2) la reversión de la oxidación biomolecular.

El equilibrio entre las ERO generadas durante los procesos fisiológicos normales y los antioxidantes endógenos presentes en el cuerpo es esencial para la homeostasis redox. Los principales antioxidantes endógenos son el superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), glutatión (GSH) y glutatión peróxido (GPx). Por otro lado, existen otros antioxidantes no enzimáticos, como las vitaminas E, C, el  $\beta$  caroteno, la ubiquinona y el urato (Giordano, 2005 y Gongora *et al.* 2006).

La SOD cataliza la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Hay tres isoformas de SOD, la SOD con manganeso (Mn-SOD), SOD con cobre (Cu-SOD) y SOD con zinc (Zn-SOD) El Mn-SOD presente en las mitocondrias cardíacas es responsable de ~ 70% de la actividad general de SOD en el corazón y ~ 90% de la actividad de los miocitos cardíacos, la Mn-SOD juega un papel importante en el control de la generación de  $O_2$  en las mitocondrias en el miocardio. La CAT, por su parte se encuentra principalmente en los peroxisomas celulares y, en menor cantidad, en el citosol. Su función es catalizar la reacción del  $H_2O_2$  para formar  $H_2O$  y el oxígeno molecular.

Por último, el sistema de glutatión peroxidasa/glutatión; su papel es recoger directamente el radical hidroxilo y el oxígeno singlete, desintoxicando el  $H_2O_2$  y los peróxidos lipídicos mediante la acción catalítica de GPx (Kumar, 2012). Así, en conjunto las SOD y las CAT son en gran parte las responsables de eliminar el estrés oxidativo en las células o tejidos, razón particular por la cual se utilizan como indicativos de un aumento de ERO.

### **6.3 Estrés Oxidante y Obesidad**

La relación entre OB y estrés oxidante se asocia principalmente con una disminución de los agentes antioxidantes endógenos que favorece el incremento de ERO. La OB es considerada como un estado de inflamación crónico debido a la liberación de citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 y 6) como consecuencia del tejido

adiposo en exceso (Figura 6); estas citocinas son un potente estímulo para la producción de ERO por los macrófagos, monocitos, y por la acción del TNF- $\alpha$  al inhibir la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial que incrementa la interacción de electrones con O<sub>2</sub> para generar O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (Higdon y Frei, 2003)

Por otro lado, Martínez *et al.* (2004) mencionan que como consecuencia de una producción excesiva de ERO durante la OB, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> tiene una gran facilidad de reaccionar con el ON y formar peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el cual, al tener propiedades oxidantes se asocia con daño celular, ADN y proteínas. Además, la rápida oxidación del ON favorece que las concentraciones de este en el músculo liso vascular disminuyan rápidamente. Esto conlleva a una insuficiente vasodilatación favoreciendo un estado de HA (Leiva *et al.*; 2000).

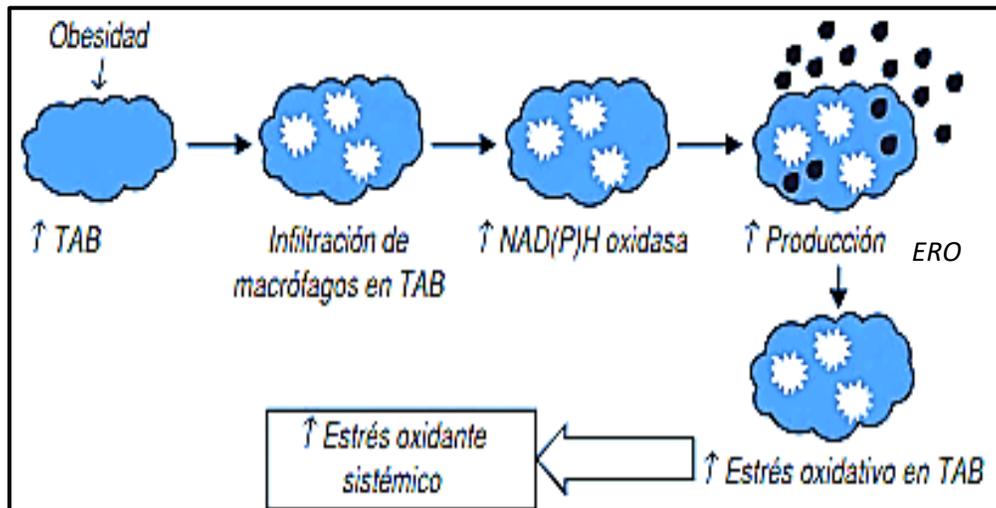


Figura 6. Esquema del aumento de las especies reactivas de oxígeno en la obesidad.

TAB: tejido adiposo blanco. Tomado de Valdecantos *et al.* 2009.

## 7. CaMKII

La CaMKII una serina/treonina quinasa que requiere del complejo Ca<sup>2+</sup>-CaM para ser activada, y una vez activada, participa en la regulación de la excitabilidad de la membrana, la homeostasis celular del Ca<sup>2+</sup>, el metabolismo, la secreción vesicular, la transcripción de genes, el tráfico de proteínas y la supervivencia celular en diversos tipos celulares. Existen 4 isoformas de CaMKII la  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ . Las isoformas

$\alpha$  y  $\beta$  se expresan predominantemente en el tejido neuronal, la  $\gamma$  en el hígado y la  $\delta$  en el corazón.

La CaMKII está conformada por 11 subunidades cada una con tres dominios: el catalítico, el regulatorio y el de asociación. El dominio regulatorio es donde se lleva a cabo la activación por la unión del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, además en esta misma subunidad, específicamente en la treonina 287 se lleva a cabo la fosforilación (autofosforilación) a partir de ATP, lo que le permite a la proteína estar activada sin la necesidad  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (Figura 5). Sin embargo, en los últimos años se descubrió que existen diferentes mecanismos por los cuales la CaMKII puede permanecer activada independientemente del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM (Erickson, 2011).

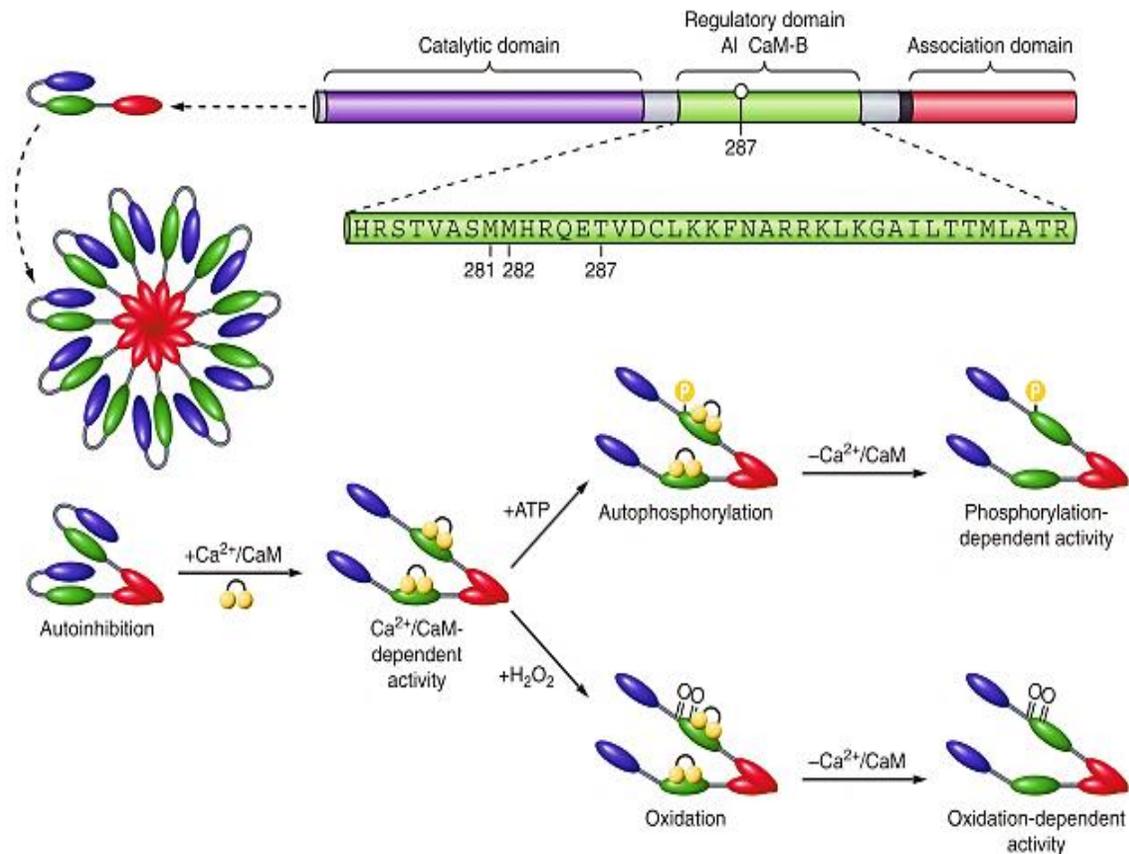


Figura 6. Representación esquemática de la fosforilación y oxidación de la CaMKII.  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM: Complejo calcio-calmodulina. ATP: Adenosín Trifosfato.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de Hidrógeno. M: Metionina. T: Trionina. Tomada de Erickson, 2011.

### **7.1 Oxidación de CaMKII en el corazón**

La activación de CaMKII dependiente de ERO se desencadena por la modificación oxidativa de las Met-281/282 del dominio regulador de la quinasa (Figura 6). La CaMKII está diseñada para coordinar y transducir señales en diferentes vías de señalización, así como de ERO en respuestas fisiológicas y patológicas que tienen implicaciones ampliamente potenciales para la comprensión de la biología cardiovascular.

La CaMKII tiene dos tipos de oxidación en las metioninas. En el primero, la metionina es oxidada por acción de la metionina sulfoxido, reacción que es revertida por la metionina sulfoxido reductasa A (MsrA) para que la proteína quede inactiva y solo pueda ser activada por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM cuando sea requerido por la célula de forma fisiológica. El segundo tipo de oxidación de las metioninas se lleva a cabo por la metionina sulfóxido que, a diferencia de la anterior, esta no puede ser reversible por la MsrA. Este este segundo tipo de oxidación se asocia con niveles altos de ERO en las células que permiten a la CaMKII estar activa por tiempos prolongados causando eventos transduccionales que dan origen a fisiopatologías como la HC (Anderson, 2015).

### **7.2 Hipertrofia cardíaca y CaMKII $\delta$**

La HC es inicialmente una respuesta ante una lesión cardíaca. En ratas SHR, el aumento de la expresión de CaMKII $\delta$  está relacionado con la HC y en la producción de ERO. Se ha reportado de manera experimental que el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ON y los radicales hidroxilos se encuentran aumentados ante una respuesta hipertrófica. Erickson *et al.* (2008) reportó que, en ratones con sobrecarga de presión inducida desarrollaron HC y, ésta disminuyó, cuando se les administró antioxidantes y un, estudio alterno utilizando ratones con sobreexpresión de antioxidante mostraron niveles inferiores de ERO y no hubo desarrollo de HC. De forma *in vitro* este mismo grupo de investigación en 2011, observó que la inhibición de la generación de ERO por las NADPH oxidasas, la ON sintasa y dentro de las mitocondrias se puede reducir significativamente la HC en cultivos de cardiomiocitos de rata. Por otro lado, cuando

utilizaron un antisuero capaz detectar la oxidación de CaMKII en las Met-281/282, observaron que tanto *in vitro* como *in vivo*: 1) la oxidación de CaMKII ocurre en tejido cardíaco y 2) la oxidación está relacionada directamente con los niveles de estrés oxidativo en el corazón, por lo tanto, este último puede ser considerado como un sensor de estrés oxidativo. Una vez activada la CaMKII es capaz de iniciar la expresión del gen hipertrófico a través de la fosforilación de HDAC de la clase I y II y de una posterior activación del factor transcripcional pro-hipertrófico MEF2.

Recientemente, Zhong *et al.* (2017) determinaron en un modelo de ratón obeso, inducido por una dieta alta en grasa, corazones con desarrollo de HC, y en cardiomiocitos aislados de rata, cultivados con 300  $\mu$ M de palmitato, que se habían hipertrofiado, esto, confirmado por la sobreexpresión del ANP, como marcador molecular, y de pruebas de histología e inmunohistoquímica para observar el crecimiento de los cardiomiocitos. También observaron un aumento en la activación de la CaMKII a través de su fosforilación, del TNF- $\alpha$  y la IL-1 como marcadores de inflamación, del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del anión superóxido como marcadores de estrés oxidativo y de la caspasa 9, citocromo C y las proteínas bcl2 como marcadores de apoptosis celular, concluyendo que en estados de OB el tejido adiposo favorece el incremento de ácidos grasos libres, y que estos son capaces de inducir HC a partir de la activación de diferentes vías de señalización (Figura 7).

Además, diferentes grupos de investigación han demostrado de forma experimental tanto *in vitro* como *in vivo* que la activación de CaMKII favorece e induce HC, así como que en animales *knockout* o inhibiendo la quinasa farmacológicamente, no desarrollan HC. Por lo tanto la CaMKII es una proteína que juega un papel fundamental para el desarrollo de HC (Anderson *et al.* 2011, Mattiazzi *et al.* 2015, Ji *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2016 y 2017 y Federico *et al.* 2017).

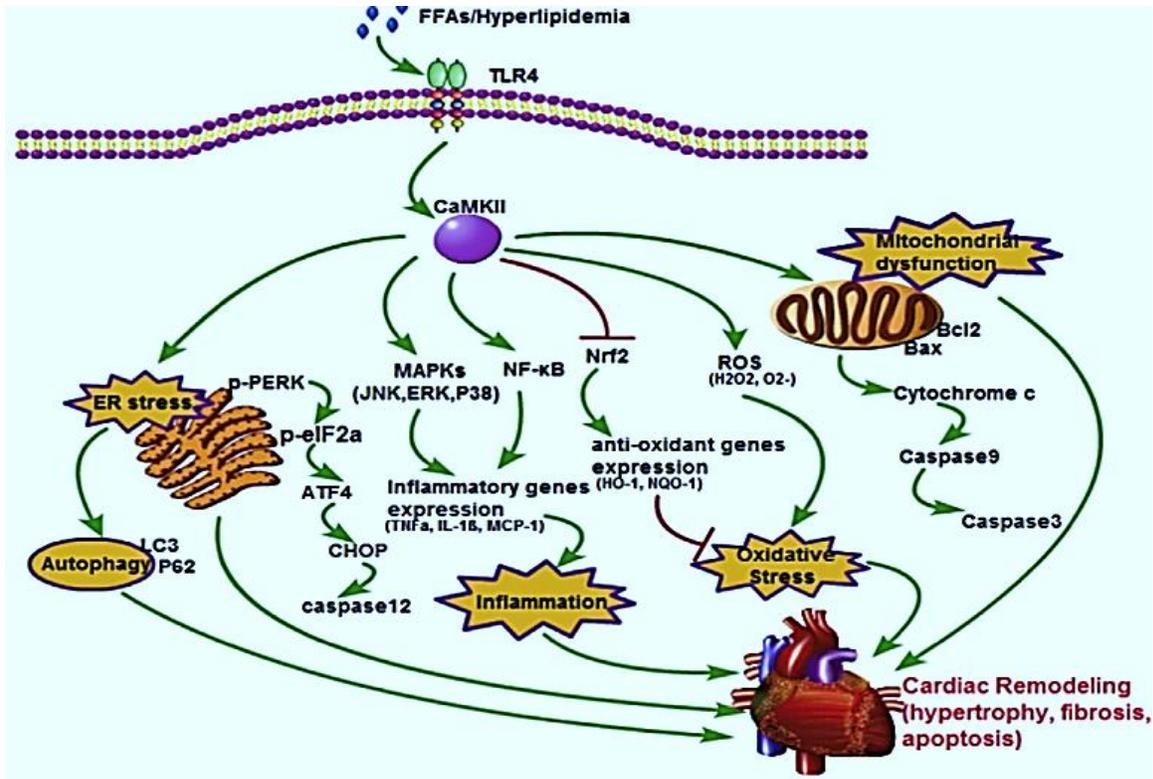


Figura 7. Posible mecanismo por el cual ácidos grasos libres activan la CaMKII y se promueven hipertrofia cardíaca. ER: retículo endoplásmico. ROS: especies reactivas de oxígeno. Tomada de Zhang. *et al.* 2017.

## 8. Modelos animales experimentales

Los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a las enfermedades, sus características histológicas y ensayo de nuevas terapias. La rata albina derivada de la rata noruega (*Rattus norvegicus*) ha sido y sigue siendo uno de los animales más usados en la investigación científica debido a su fácil manejo, los costos en su mantenimiento, su rápida reproducción y su fisiología que puede ser extrapolable con la fisiología del humano (Rodríguez, 2007).

### 8.1 Modelos de Obesidad

La OB como una enfermedad de etiología múltiple con numerosos y variables factores que la desencadenan, hace que en la actualidad no exista un modelo

experimental único para OB, si no un amplio número de modelos animales que están adecuados para estudiar diferentes alteraciones causados por la OB, así como sus consecuencias y complicaciones. En términos generales, la constante ingesta alimentaria alta en carbohidratos y grasas son la principal causa que conlleva al exceso de tejido adiposo. Desde el punto de vista etiológico los modelos experimentales de OB se clasifican en: 1) Sistema Nervioso Central, 2) Genético, 3) Nutricional, 4) Endócrina, 5) Farmacología, 6) Ambiental, 7) Estacional y 8) Otros. El modelo nutricional es uno de los modelos más empleados en la investigación; en este modelo la OB depende de la dieta y se utilizan tres tipos de dietas, alta en grasas, alta en carbohidratos y de cafetería o supermercado (Escofet, 1994).

Un modelo animal utilizado para estudiar OB, es el inducido con una dieta alta en carbohidratos con una solución de sacarosa al 30% en ratas de la cepa Wistar. El grupo de investigación bajo la dirección de la Dra. Bravo, reporta que es capaz de inducir OB en aproximadamente 3 meses de dieta (Colado-Velázquez *et al.* 2015). Por otro lado, el uso de dietas con fructosa ha tenido un gran auge; diferentes autores como Sommense *et al.* (2015) y Federico y *et al.* (2017) han establecido que una dieta de fructosa 10% en el agua es suficiente para que en un periodo de 2 a 3 meses los animales incrementen significativamente los niveles de TG y se presenten distintas complicaciones cardiovasculares como HC, arritmias, apoptosis en cardiomiocitos o bien, desarrollo de esteatosis hepática, entre otras.

## **8.2 Modelos de HA**

En el año de 1963, en la Universidad de Kyoto, Okamoto y Aoki, tras medir la presión sanguínea de una colonia de ratas Wistar (en las ratas Wistar es en promedio de 120/84 mm Hg), por medio de una técnica de pletismógrafo sin anestesia, detectaron un macho con presión sistólica de entre 145-175 mm Hg y una hembra entre 130-140 mm Hg, los cuales fueron seleccionados para el apareamiento. Las generaciones de la cruce entre estas ratas y las cruces entre hermanos, establecieron un modelo de HA por presentar las lesiones típicas de la hipertensión

esencial humana (presión sanguínea más elevada conforme avanza la edad, HC, dilatación y falla cardíaca congestiva, hemorragias cerebrales, nefroesclerosis con deterioro de la función renal, entre otros), a partir de los 3 meses de edad. Finalmente, la cepa fue obtenida en octubre de 1969, con una presión sanguínea por encima de 150 mmHg dando origen a la rata espontáneamente hipertensa (SHR del inglés Spontaneously Hypertensive Rat), siendo su control la rata Wistar Kyoto (WKY) con una presión de 120/84 mm Hg (Louis & Itowes, 1990; Rivera *et al.* 2013).

Dentro de las características más importantes de la cepa SHR, es que a partir de la tercera semana de edad la PAS aumenta y se asocia a un engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos, a partir de las 10 semanas su presión está por encima de 150 mm Hg y es más severa en machos que en las hembras. La hipertensión alcanza valores máximos (180 mmHg o más) alrededor de las 12 semanas de edad. En ratas SHR menores de 16 semanas de edad, el creciente estímulo baroreceptor inhibe la actividad nerviosa simpática con la misma sensibilidad que se encuentra en las ratas WKY (George, 2000).

## **II. Justificación**

- El consumo excesivo de BA endulzadas con sacarosa y fructosa, desde edades tempranas en México, ha favorecido el incremento de OB, y como consecuencia el incremento de ERO y la aparición de complicaciones cardiovasculares como HA e HC, además de su exacerbación en el caso de tener una predisposición genética a éstas.
- Por lo tanto, es importante conocer los efectos de las dietas altas en carbohidratos consumidas desde edades tempranas sobre los mecanismos fisiopatológicos que contribuyen al desarrollo de HA e HC.

### III. Hipótesis

La ingesta crónica de sacarosa al 30% y de fructosa al 10% en ratas Wistar y SHR recién destetadas durante 5 meses:

- Generarán alteraciones en el peso corporal, la acumulación de tejido adiposo y el perfil bioquímico relacionados con el desarrollo de OB.
- Incrementarán la producción de ERO y la oxidación de CaMKII $\delta$  que correlacionará con la sobreexpresión del marcador molecular de HC, el ANP.
- Causará un aumento de la PA o su exacerbación.
- Tendrá un efecto mayor en estos parámetros si se consumen en combinación, que los producidos de forma individual.

#### **IV. Objetivo General:**

Evaluar los efectos de las dietas altas en carbohidratos en los marcadores de estrés oxidativo e HC (ANP y CaMKII $\delta$ -ox) y en la PA de ratas Wistar y SHR recién destetadas después de 5 meses dieta.

##### **➤ Objetivos Particulares:**

*Determinar si el consumo de las diferentes dietas altas en carbohidratos durante 5 meses en ratas Wistar y SHR recién destetadas:*

- 1) Incrementan significativamente el peso corporal y el tejido adiposo
- 2) Alteran de forma diferente el perfil bioquímico (glucosa, triglicéridos y colesterol total) y de insulina.
- 3) Aumentan o exacerban el aumento de la PA y el peso del corazón.
- 4) Incrementan el estrés oxidante medido a partir de las concentraciones de Malondialdehído (MAD), Nitritos Totales (NOx) y Superóxido Dismutasa (SOD) en tejido cardíaco y suero.
- 5) Inducen hipertrofia cardíaca confirmada a través de los marcadores moleculares cuantificados por la sobreexpresión de las proteínas ANP y CaMKII $\delta$  y de la histología de los corazones.

## V. Material y Métodos

Los procedimientos y el protocolo No. 449-008 del presente trabajo fueron aprobados por el comité de ética de nuestra institución (CICUAL-CINVESTAV-IPN); así como se siguieron las recomendaciones de la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) para las especificaciones de las técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### 1. Animales de Experimentación

Se utilizaron 96 ratas (*Rattus norvegicus*) macho de 3 semanas de edad (**recién destetadas**) provenientes de las cepas Wistar y SHR. Los animales fueron obtenidos y mantenidos bajo las condiciones del Bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Coapa con temperaturas entre 18 y 22 °C y ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. Luego del destete (a los 21 días) se los colocó en cajas de acrílico cristal de 6mm y con medidas de 43x53x20 cm, con lecho de viruta esterilizada y tapa tipo reja de acero inoxidable. Cada cepa tuvo una n = 48, que fueron divididas en cuatro grupos n=12 cada uno). Se mantuvieron durante 5 meses con una alimentación estándar (LabDiet 5001) y con el siguiente esquema de administración de las dietas ricas en carbohidratos en el agua de beber:

1. Grupo control (n=12). Con agua potable *ad libitum*. (0 Kcal)
2. Grupo sacarosa (n=12). Con solución de sacarosa al 30% p/v *ad libitum*. (1197 Kcal)
3. Grupo fructosa (n=12). Con solución de fructosa al 10% p/v *ad libitum*. (399 Kcal)
4. Grupo combinada (n=12). Con solución de sacarosa al 30% y fructosa al 10% p/v *ad libitum*. (798 Kcal)

Al finalizar los 5 meses de dieta, se sacrificaron los animales mediante decapitación. Se extrajo: sangre troncal, corazón y tejido adiposo retroperitoneal.

## **2. Determinación del Peso Corporal y Presión Arterial**

### **2.1 Peso Corporal**

Los animales fueron pesados en una balanza granataria al inicio y al final del tratamiento con las dietas hipercalóricas para determinar el aumento del peso respecto al grupo control. Igualmente se pesó el tejido adiposo retroperitoneal. Para determinar el peso relativo se realizó una división del peso del tejido adiposo sobre el peso corporal de cada rata.

### **2.2 Presión Arterial**

Para la medición de este parámetro se empleó la técnica plestimográfica utilizando un equipo medidor de Presión LE 5007, Marca Pb Panlab s.l. La técnica consistió en ocluir el flujo sanguíneo a través de un brazalete o manguito colocado en la cola de cada rata junto con un transductor para detectar y medir la presión de oclusión. Cada rata tuvo de 5 a 6 mediciones de entrenamiento antes de la lectura final. Se registró la PAS, PAD y la presión arterial media (PAM).

## **3. Preparación de las muestras**

Una vez extraído el corazón se pesó y se procedió a lavarlo con solución Tyrode (139 mM NaCl, 3 mM KCl, 3mM CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 12 mM glucosa) y heparina (2mg/mL) para retirar toda la sangre y proceder a su macerado con nitrógeno líquido y posteriormente congelados a -70 °C.

Para la técnica de Western Blot (WB) se prepararon homogenados de la siguiente manera: se pesaron 50 mg de tejido cardiaco macerado y se le agregó 1 mL de buffer de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, NP-40 al 1% y C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>4</sub> al 25%) con un cóctel de inhibidores de fosfatasa y de proteasas (Aprotinina (2 µg/mL), Leupeptina (2 µg/mL), Pepstatina (1 µg/mL), 0.1 mM PMSF, 50 mM NaF y 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Para la técnica de estrés oxidativo se pesaron 100 mg de homogenado de corazón a los cuales se les agregaron 1 mL de buffer de fosfato salino (PBS) (0.0027 M KCl, 0.002 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.137 NaCl y 0.01 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

#### **4. Determinación de la HC**

Para la determinación de la HC se emplearon las técnicas de Histología y WB para determinar la expresión del ANP y de la oxidación de la CaMKII $\delta$  como marcadores moleculares. Así mismo, se midió la expresión de la CaMKII $\delta$  total, usando como proteína constitutiva a la proteína GAPDH.

##### **4.1 Expresión de proteínas mediante la técnica de Western Blot**

Previo a la realización de la técnica se procedió a la cuantificación de proteínas para cada muestra mediante del método estandarizado de Bradford, para que cada una de ellas tuviera una cantidad de 50 mg de proteína. Se tomó un volumen de 15 mL de homogenado al que se le adicionaron 15 mL de buffer de carga 2X (SDS al 4%, 0.125 M Tris-HCl, 0.192 M Glicerol y 25% 2- $\beta$ -mercaptol) colocando un volumen total de 30 mL por cada pozo y un volumen total de 10 mL para el marcador de peso molecular marca Bio-Rad®. Para llevar a cabo la técnica de WB se utilizó un Mini Trans-Blot® Cell and Criterion™ Blotter.

Electroforesis: Para la separación de proteínas mediante su gradiente electroquímico, se utilizaron geles de SDS-Page de policrilamida al 16% que se colocó en buffer de electroforesis (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glicina, SDS al 1%). La corrida electroforética se realizó a 120V y a temperatura ambiente durante 3 horas, suministrados por una fuente de poder PowerPac™ Universal.

Transferencia: Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Se utilizó buffer de transferencia (Tris base, Glicina, SDS, Metanol y Agua MQ). Las membranas fueron activadas con metanol y posteriormente se llevó a cabo el armado del “sándwich” (en el siguiente orden: esponja, papel filtro, membrana, gel, papel filtro, esponja) en baño de hielo a 70V durante 1 hora suministrados por una fuente de poder PowerPac™ Universal. Para determinar la correcta transferencia se realizó una tinción reversible con Rojo de Ponceau y posteriormente se lavó con T-TBS (20 mM Tris base, 150 mM NaCl y 1% de Tween).

Bloqueo: Para el bloqueo, las membranas se colocaron en solución en T-TBS de leche en polvo descremada (Svelty) al 5% durante 24 hrs en un agitador orbital a 4°C.

Incubación con anticuerpo primario específico: Después de 3 lavados de 15 minutos con T-TBS de la solución de bloqueo, se incubaron las membranas con 5 mL de la dilución correspondiente de anticuerpo primario, 1:1000 para el ANP (Santa Cruz Biotechnology), 1:1000 para CaMKII $\delta$  total (Abcam), 1:1000 para CaMKII $\delta$ -ox (Merck) y 1:1500 para GAPDH (Santa Cruz Biotechnology) Este procedimiento se realizó por 2 horas (ANP, CaMKII $\delta$  total y GAPDH) a temperatura ambiente o 24 horas (CaMKII $\delta$ -ox) a 4°C, en ambos casos con agitación orbital.

Incubación con anticuerpo secundario: Una vez retirada la solución con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de 15 minutos con T-TBS, se incubaron con el anticuerpo secundario, Anti-Mouse 1:1000 para el ANP y la CaMKII $\delta$  y Anti-Rabbit 1:1000 para GAPDH y 1:3000 para CaMKII $\delta$ -ox, durante 2 horas a temperatura ambiente y con agitación orbital.

Revelado: Se realizaron 3 lavados de 15 minutos con T-TBS, y posteriormente se colocó 1mL de Immobilon-Millipore® para la detección de las proteínas por quimioluminiscencia que fueron reveladas en un cuarto oscuro utilizando Placas Radiográficas Kodak®.

Cuantificación: se cuantificó la intensidad de las bandas por densitometría utilizando el programa Image Studio Lite Versión 5.2.

## **4.2 Histología**

El análisis de histología se realizó a partir de una porción de los tejidos previamente almacenados en formalina-PBS al 10% después del sacrificio de los animales. El procedimiento consistió en realizar cortes transversales de corazón para después deshidratarlos en diferentes concentraciones de etanol (70%, 80% y 96%) e incluirlos en parafina para facilitar su corte de 6  $\mu$ m de espesor en el micrótopo; posteriormente se realizó el tren de tinciones de hematoxilina-eosina para su análisis en el microscopio óptico (Carl Zeiss modelo 63300) equipado con una cámara digital Tucsen de 9 megapíxeles y el software TSview 7.1.

Las mediciones morfológicas se realizaron el programa ImageJ Fiji. El diagnóstico de HC se realizó con la verificación del Dr. Alberto Aranda Fraustro. Jefe del departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

## **5. Determinación del estrés oxidante**

### **5.1 Nitritos Totales**

Los productos de degradación del óxido nítrico (NO<sup>•</sup>), se midieron en homogenados de corazón utilizando un método basado en la reacción de Griess, en la cual se forma un compuesto coloreado detectable a 450 nm al reaccionar el reactivo de Griess (n-naftil-etilendiamina y sulfanilamida) con los nitritos presentes en la muestra formando una sal de diazonio.

El procedimiento para el ensayo realizado fue el siguiente:

- Preparar stock de NaNO<sub>2</sub> 200 mM disolviendo 0.345 mg de NaNO<sub>2</sub> en 25 mL de agua.
- Preparar solución stock de sulfanilamida (SULF) 2% en HCl 1M: Disolver 1g de SULF en 25 mL de agua destilada. Añadir lentamente y resbalando por las paredes 4.1 mL de HCl y aforar a 50 mL con agua destilada.
- Preparar solución stock de n-naftil-etilendiamida (NEDD) 0.2%: Disolver 0.01g de NEDD en 50 mL de agua destilada. La solución es estable durante 4 meses almacenada a 4°C.
- Preparar solución saturada de VCl<sub>3</sub> en HCl 1M: Disolver 4.1 mL de HCl concentrado en 25 mL de agua destilada; añadir 1 g de VCl<sub>3</sub> y aforar a 50 mL.

La solución debe mantenerse en oscuridad dado que es fotosensible y es estable por 4 meses almacenada a 4°C.

- Se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 mL o 200 µl de muestra (homogenado desproteinizado de corazón), 200 µl de sol. saturada de VCl<sub>3</sub>, 100 µl de SULF 2% en HCl 1M y 100 µl de NEDD 0.1%.
- Se incuban los tubos de 30-45 min a 37°C y una vez terminada la incubación se leen en un espectrofotómetro a 540 nm por triplicado, primero realizando la lectura del estándar y posteriormente la de las muestras. Los valores obtenidos se

extrapolaron en la curva de calibración para determinar la concentración de nitritos de la muestra.

## **5.2 Malondialdehído**

Se midió la peroxidación lipídica utilizando el método de formación de un aducto detectable a 532 nm al hacer reaccionar el malondialdehído (MDA) presente en la muestra con ácido tiobarbitúrico (TBA). La reacción es afectada enormemente por el pH, por lo que se utiliza ácido acético para ajustarlo a 3.5.

El procedimiento para el ensayo realizado fue el siguiente:

- Preparación de solución stock de ácido acético: Se tomaron 20 ml de ácido acético glacial y se disuelven en 50 ml de agua destilada agregando el ácido lentamente por las paredes hasta incorporarlo completamente, la mezcla se agita y se afora a 100 ml con agua destilada.
- Preparación de solución stock de ácido tiobarbitúrico 0.8%: Se pesan 0.8 g de ácido tiobarbitúrico y se disuelven en 100 ml de agua utilizando un agitador magnético a una temperatura de 60°C para facilitar su disolución. La solución es estable por 6 meses manteniéndose en refrigeración a 4°C.
- Preparación de solución stock de cloruro de potasio (KCl) 2%: Se pesan 2 g de KCl y se disuelven en 100 ml de agua destilada.
- Preparación de solución 15:1 butanol/piridina: Se miden 6.25 ml de piridina y se disuelven en 93.75 ml de n-butanol.
- Se colocan en tubos de ensayo: 200 µl de muestra (homogenado desproteinizado de corazón), 750 µl de ácido acético 20%, 750 µl de ácido tiobarbitúrico 0.8% y 600 µl de agua destilada.
- Los tubos se incuban a 95°C por 1 hora y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se añade: 500 µl de KCl 2% y 2.5 µL de butanol/piridina 15:1 (v/v).
- Se realiza el mezclado del contenido de los tubos en vortex y se centrifuga a 3000 rpm por 10 min. Se toma el sobrenadante (fase orgánica) y se lee en un espectrofotómetro a 532 nm.

### **5.3 Super óxido dismutasa**

Para la determinación de esta enzima se utilizó la técnica enzimática colorimétrica utilizando un kit de la marca Sigma-Aldrich® (No.19160). Esta se fundamenta en la reacción de los superóxidos con el reactivo WST-1 para formar WST-1 formazan que es detectable a 425 nm. En este ensayo, la eliminación de superóxidos por acción de la SOD presente en los tejidos disminuirá la producción de WST-1 formazan con respecto del tiempo de incubación; el ensayo utiliza xantina oxidasa para reciclar el oxígeno producto de la reacción entre los superóxidos y WST-1 para lograr una reacción completa.

Se realizó la incubación de la muestra con WST-1 y xantina oxidasa por 20 min a 37°C y posteriormente se evaluó la actividad de SOD midiendo la absorbancia a 450 nm usando un lector de microplacas. mediciones cada 30 segundos por 5 minutos en un espectrofotómetro a 425 nm y calculando el % de inactivación de aniones superóxidos por la acción de la superóxido dismutasa presente en el homogenado mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad SOD} = \frac{(A \text{ blanco 1} - A \text{ blanco 3}) - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco 2})}{(A \text{ blanco 1} - A \text{ blanco 3})} \times 100$$

Dónde:

A = Absorbancia

## **6. Determinación del perfil bioquímico**

Se midieron las concentraciones séricas de glucosa, TG y Colesterol total por medio de Kits comerciales marca Sipinreact, siguiendo las instrucciones de cada uno. Las absorbancias fueron obtenidas utilizando un espectrofotómetro Eppendor BioPhotometer®. El fundamento de la técnica consiste en oxidar a cada molécula a estudiar para generar entre otras moléculas, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), el cual en presencia de peroxidasa (POD) oxida el cromógeno 4-aminoantipirina / fenol convirtiéndolo en un compuesto de color rojo que absorbe entre 492 y 550 nm, con un pico de máxima absorbancia a 500 nm. (La absorbancia y el compuesto que da

el color depende del compuesto a estudiar y del tipo de kit). La concentración del color y su absorbancia será directamente proporcional a la concentración de compuesto de interés.

## 7. Evaluación de la resistencia a la insulina

Los niveles séricos de insulina se midieron por el ensayo inmuno-enzimático (ELISA) a partir del Kit comercial Millipore (USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando un espectrofotómetro Eppendor BioPhotometer® a 450 nm. Los índices *Homeostasis Model Assessment* (HOMA) y *Quantitative Insulin Sensitivity Check Index* (QUICKI) fueron calculados para determinar la RI.

El índice HOMA se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA} = \frac{\text{glucosa en ayuno (mmol/L)} \times \text{insulina en ayuno (\mu UI/L)}}{22.5}$$

El índice QUICKI se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{(\log \text{ insulina ayuno (\mu U/mL)} + \log \text{ glucosa en ayunas (mg/dL)})}$$

## 8. Análisis estadístico

Determinación a partir de un ANOVA de una vía y una prueba *post hoc Tukey* para verificar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los controles y las dietas y entre las dietas mismas. Se tomaron como resultados significativos aquellos con una  $p < 0.05$ .

## VI. Resultados

### 1. Peso corporal y Tejido Adiposo

La medición final del peso corporal durante 5 meses de dietas hipercalóricas mostró que no hubo un incremento de peso significativo en los grupos de la cepa Wistar y SHR. Los grupos que presentaron diferencia significativa fue el de sacarosa 30% para la cepa Wistar debido a que disminuyó significativamente el peso corporal respecto al grupo control y al grupo fructosa. Para la cepa SHR, la dieta combinada fue quien tuvo diferencia significativa con respecto al control y a las otras dos dietas, con el mismo comportamiento de la cepa Wistar. La Cepa SHR respecto a la cepa Wistar presenta un menor peso corporal debido a las características propias de la cepa. Figura 9).

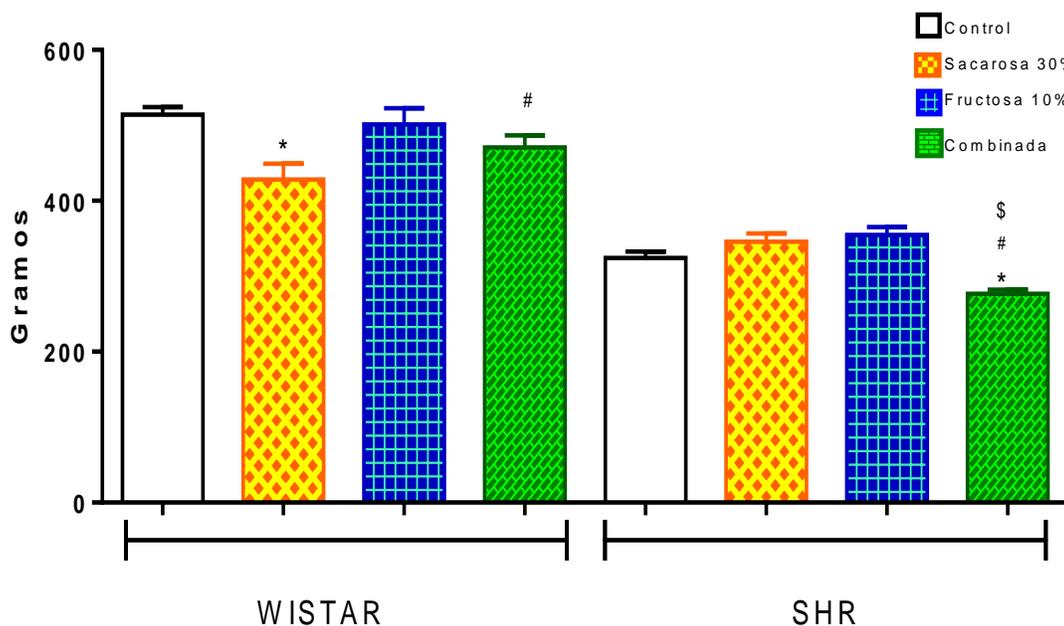


Figura 9. Peso corporal después de 5 meses con dietas. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey.  $n=12$ .

La relación del peso del tejido adiposo retroperitoneal-peso corporal mostró un incremento estadísticamente significativo en los tres grupos de dieta respecto al control en ambas cepas: de sacarosa, seguido del grupo de dieta combinada y por último, el de fructosa. Estos datos son consistentes con los que se ha reportado previamente en el laboratorio y en la literatura, que indican que las dietas de 30% de sacarosa y de fructosa favorecen el acúmulo de tejido adiposo (Figura 10).

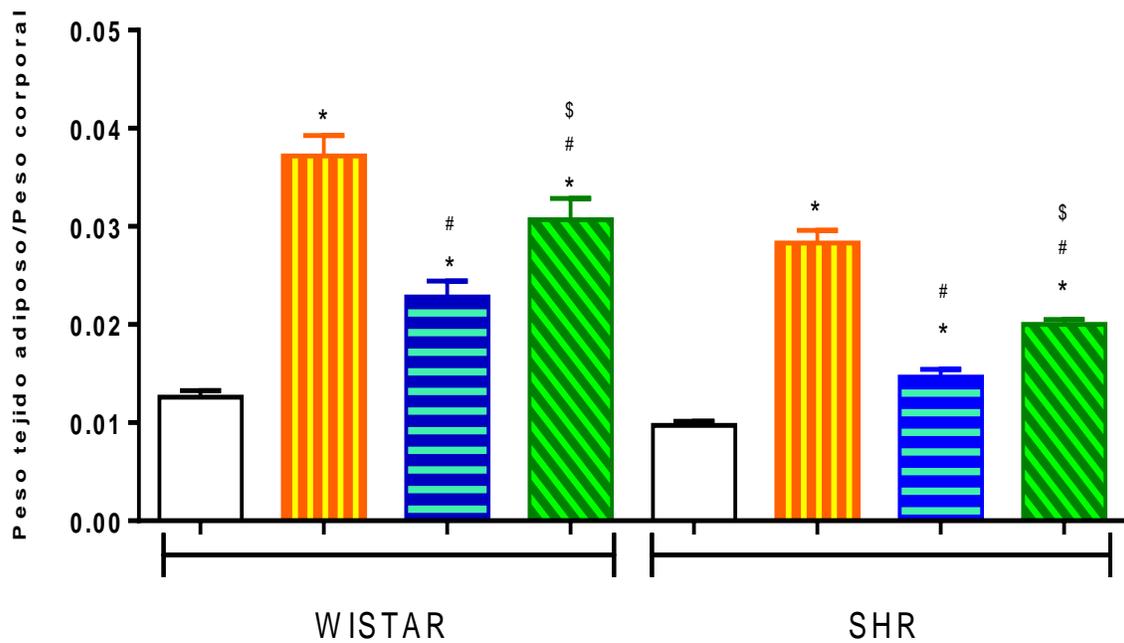


Figura 10. Relación del peso del tejido adiposo respecto al peso corporal. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey.  $n=12$ .

## 2. Perfil Bioquímico

Lo valores en ayuno de la glucosa mostraron que, para ambas cepas, las dietas incrementaron estos valores por encima de los valores de referencia con una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales y su control, respectivamente. Los grupos que presentaron niveles mayores de glucosa fueron los grupos de dieta combinada y sacarosa. La hiperglucemia fue significativamente en la cepa SHR. De acuerdo a los valores de referencia, los grupos experimentales en ambas cepas, son consideradas como diabéticas. (Figura 11).

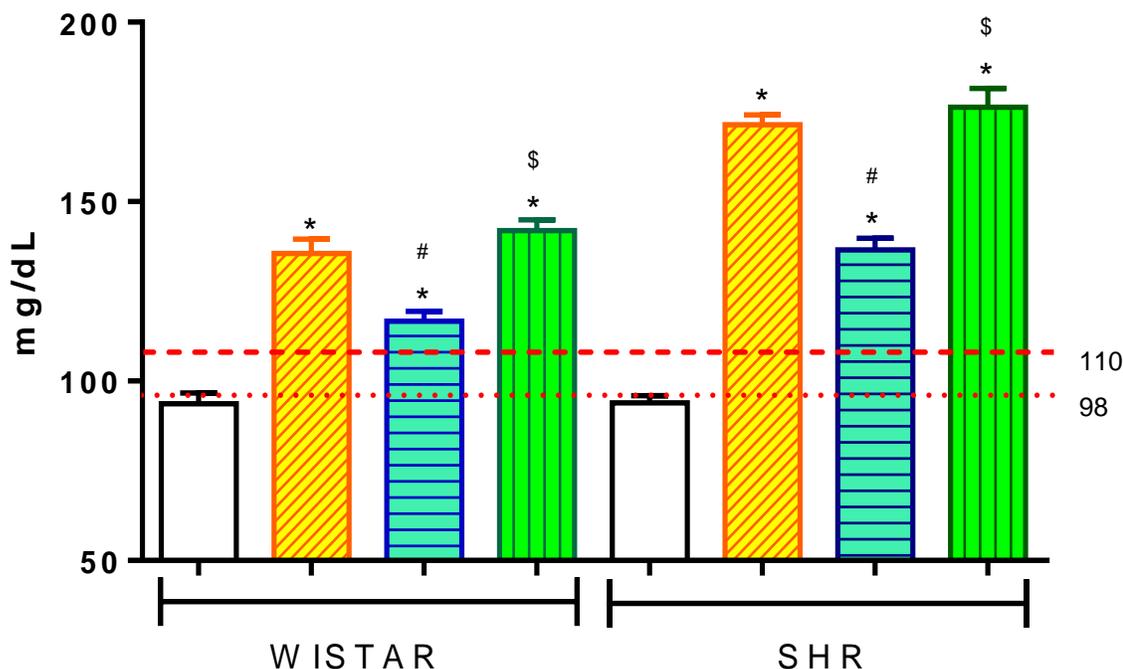


Figura 11. Niveles séricos de glucosa en ayuno. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia para cepa Wistar 110 mg/dL y 98 mg/dL para SHR.  $n=12$ .

Se observó que los valores de insulina tuvieron la misma tendencia que los de glucosa, siendo significativamente mayor en las dietas de sacarosa y combinada con valores mayores en la cepa SHR versus la Wistar. Las tres dietas produjeron un aumento significativo respecto al control y por encima del valor de referencia. Cabe destacar, que el grupo control SHR tuvo una hiperinsulinemia. Este dato es consistente con lo reportado por la literatura, que al ser una cepa con predisposición genética presenta esta característica (Figura 11).

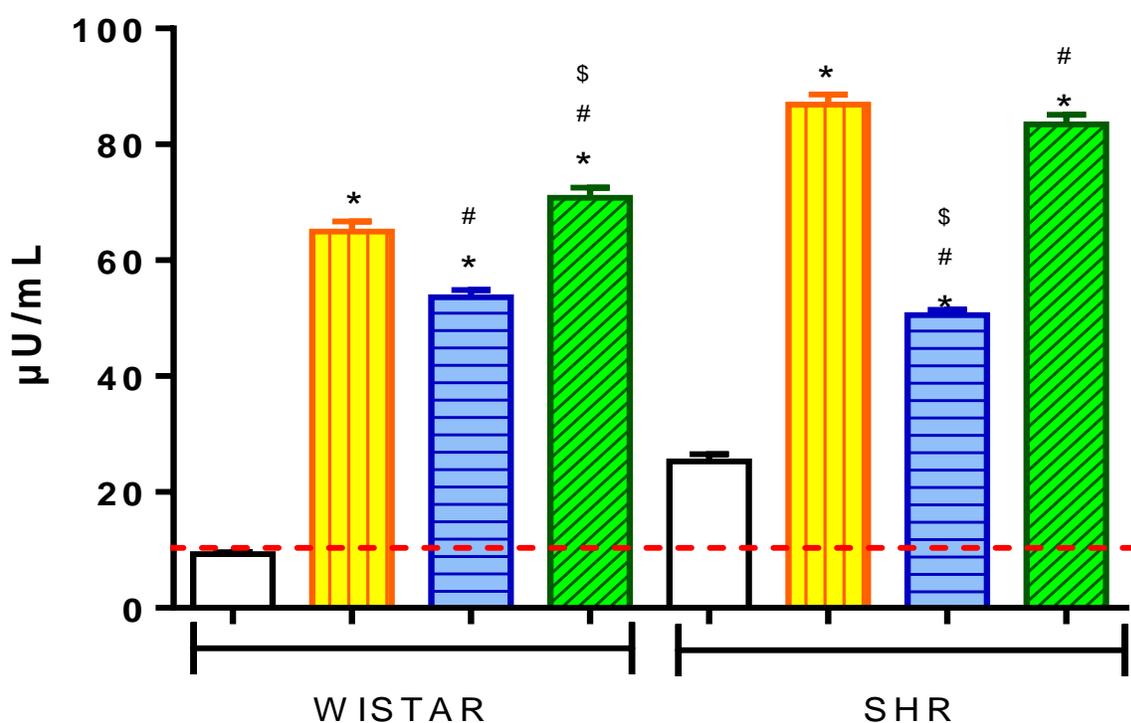


Figura 11. Valores séricos de insulina en ayuno. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 12.2  $\mu$ U/mL. n=12.

El índice HOMA y QUICKI, mostraron una evidente RI causada por las dietas hipercalóricas. Todas las dietas tuvieron diferencia significativa respecto al grupo control y un valor de referencia mayor a 3 que indica RI. Para el caso del índice HOMA en la cepa Wistar, la dieta combinada tuvo diferencia significativa, seguido de la sacarosa y último, la fructosa, mientras que la cepa SHR no tuvo diferencia entre los grupos de sacarosa y combinada, pero sí con fructosa. Además, como lo reporta la literatura, el grupo control de SHR también presentó RI (Figura 12).

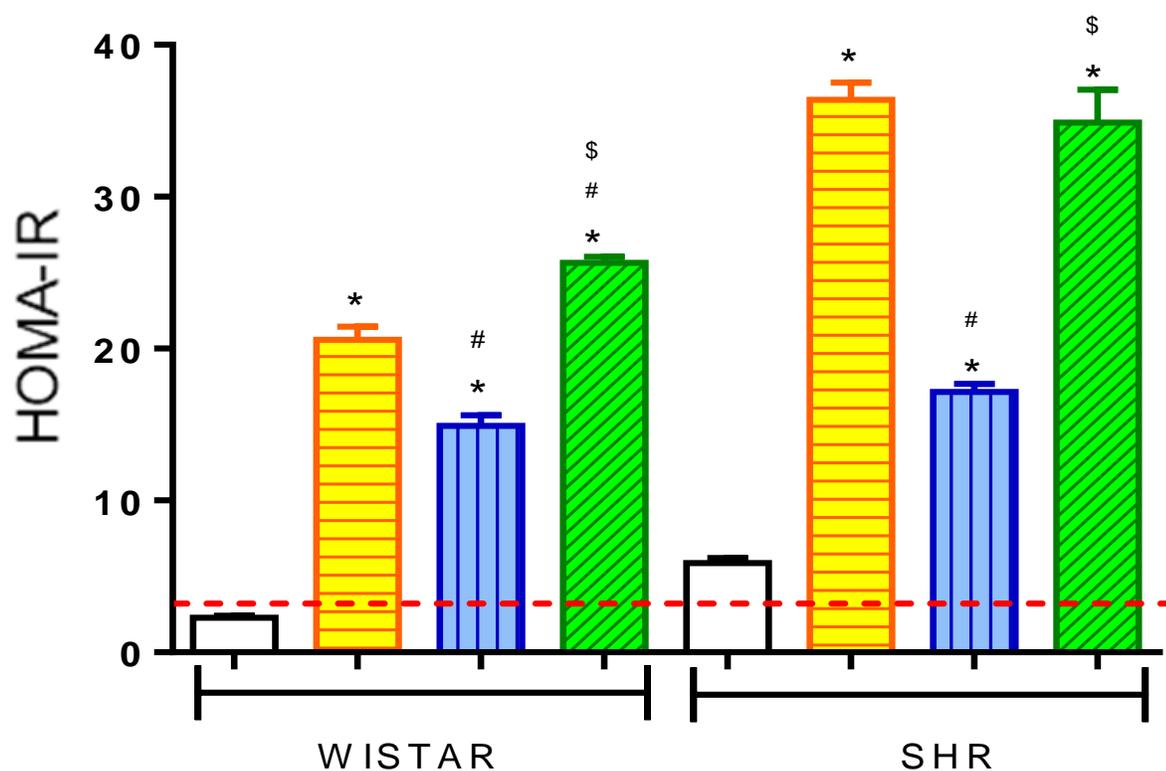


Figura 12. Índice HOMA para resistencia a la insulina. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia  $>3$ .  $n=12$ .

Por otro lado, el índice QUICKI para todas las dietas tuvo un valor menor a 0.6, lo que indica RI inducida por las dietas de azúcares. Al igual que con el índice HOMA, los grupos experimentales tuvieron una diferencia estadísticamente significativa respecto al control (Figura 13).

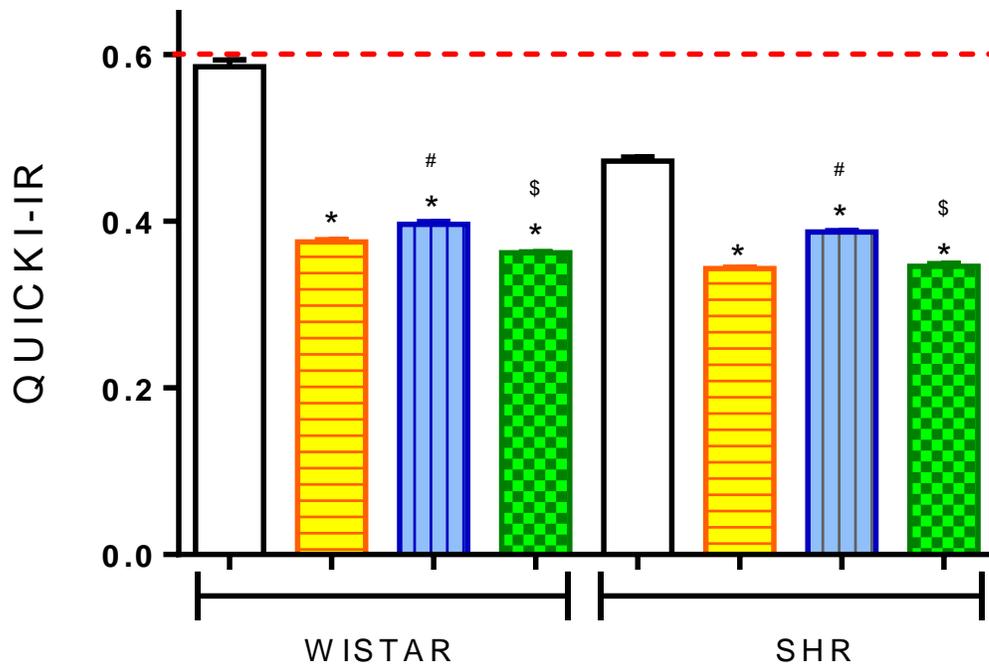


Figura 13. Índice QUICKI para resistencia a la insulina. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 12.2  $\mu$ U/mL para SHR. n=12.

La concentración de TG se incrementó con las dietas de forma significativa respecto al grupo control en ambas cepas. La tendencia en el aumento de este parámetro fue muy similar en Wistar y SHR. La dieta combinada presentó mayores niveles de TG en suero, seguido de la fructosa y por último la dieta combinada. (Figura 14).

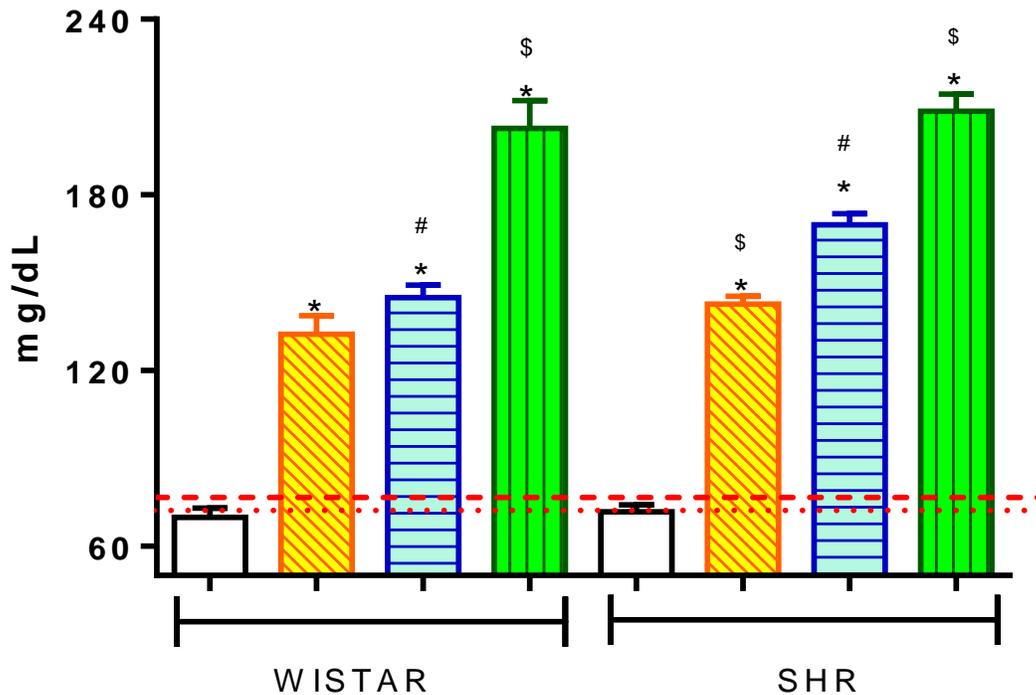


Figura 14. Niveles séricos de triglicéridos en ayuno. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 85 mg/dL para Wistar y 70 mg/dL para SHR.  $n=12$ .

Para el caso del colesterol total se observó que al igual que los TG, la dieta combinada en ambas cepas produjo niveles mayores de este parámetro. Los grupos experimentales presentaron diferencia significativa respecto al grupo control, pero no entre los grupos de sacarosa y fructosa, lo que nos indica que su combinación tiene un mayor efecto. Las dietas de carbohidratos tuvieron mayor impacto en la cepa SHR comparado con su valor de referencia (45 mg/dL); con un valor duplicado aproximadamente (Figura 15).

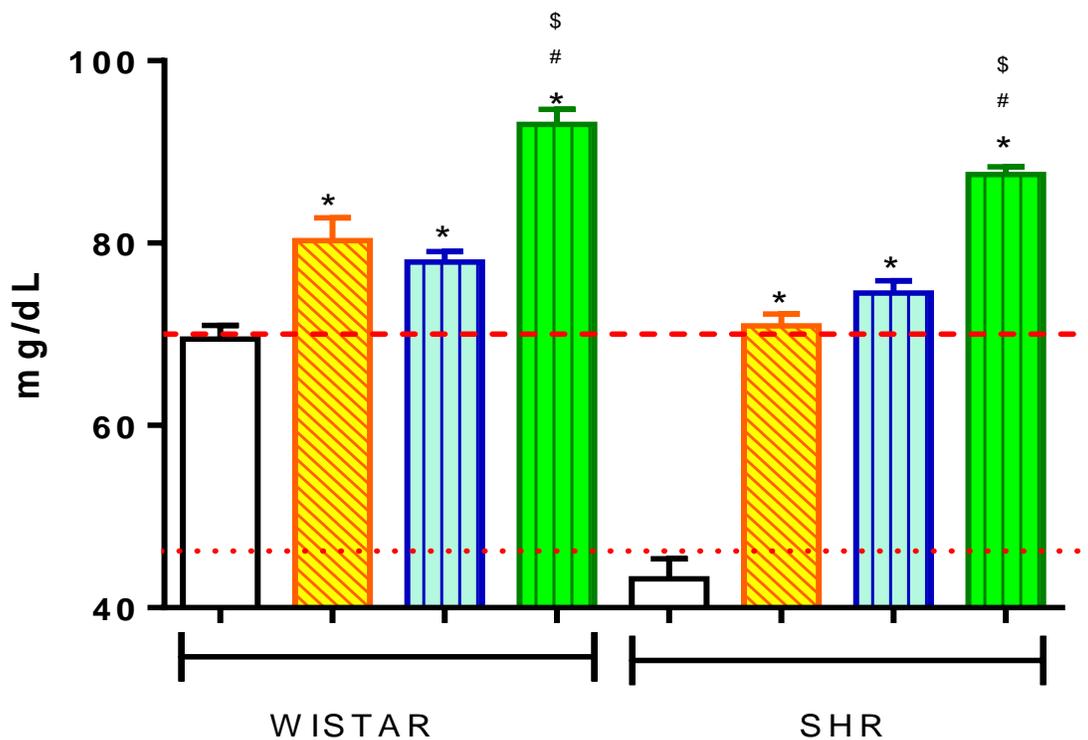


Figura 15. Niveles séricos de colesterol total en ayuno. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 70 mg/dL para Wistar y 45 mg/dL para SHR. n=12.

### 3. Presión arterial (PAM, PAS y PAD)

Para la cepa SHR, la PAM estuvo por encima del valor de referencia, no se observó aumento por las dietas. Se comprobó que la cepa desarrolló HA *per se* a partir de los 3 meses de edad independientemente de la dieta. En la PAM de la cepa Wistar se observó que con 3 meses de tratamiento con las dietas presentaron diferencia significativa respecto al control, estando por arriba del valor de referencia (Figura 16).

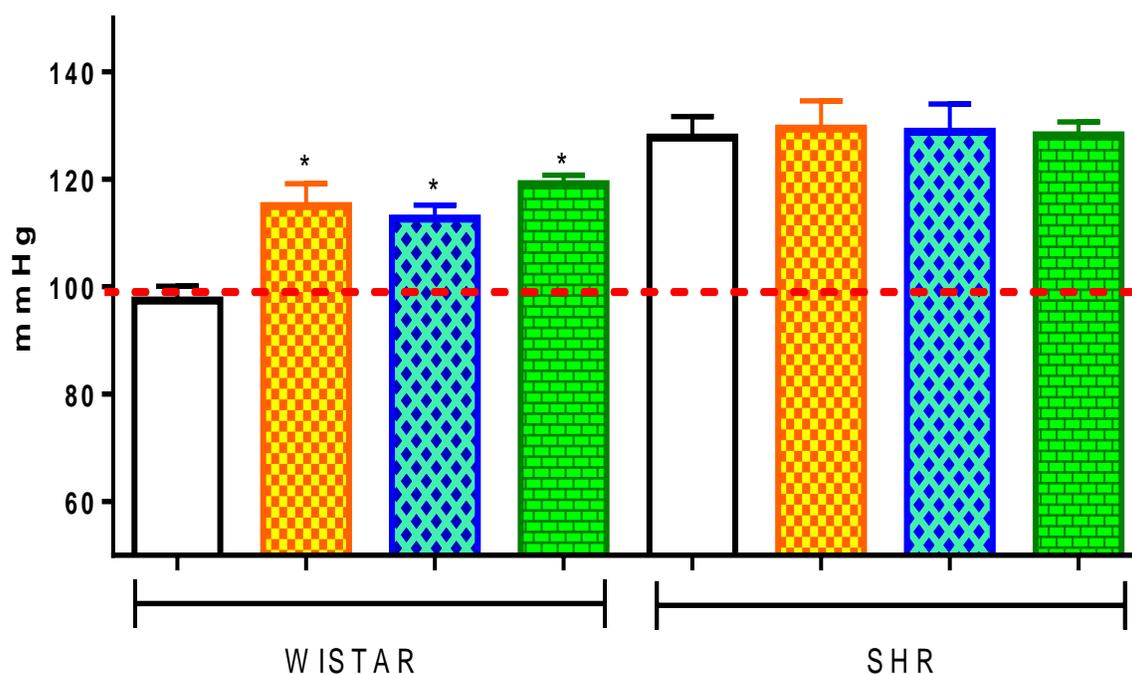


Figura 16. Presión arterial media. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 98 mm Hg.  $n=12$ .

Con respecto a la PAS, en la cepa Wistar no se observó diferencia significativa en los grupos de sacarosa y fructosa respecto al control. Caso contrario la dieta combinada sí presentó diferencia significativa. Para la cepa SHR después de los 3 meses de dieta no se vio un aumento significativo en la PAS respecto a su grupo control, sin embargo, los valores estuvieron por encima del valor de referencia, lo que indica que los animales presentaron HA, y que las dietas no exacerbaron estos valores (Figura 17).

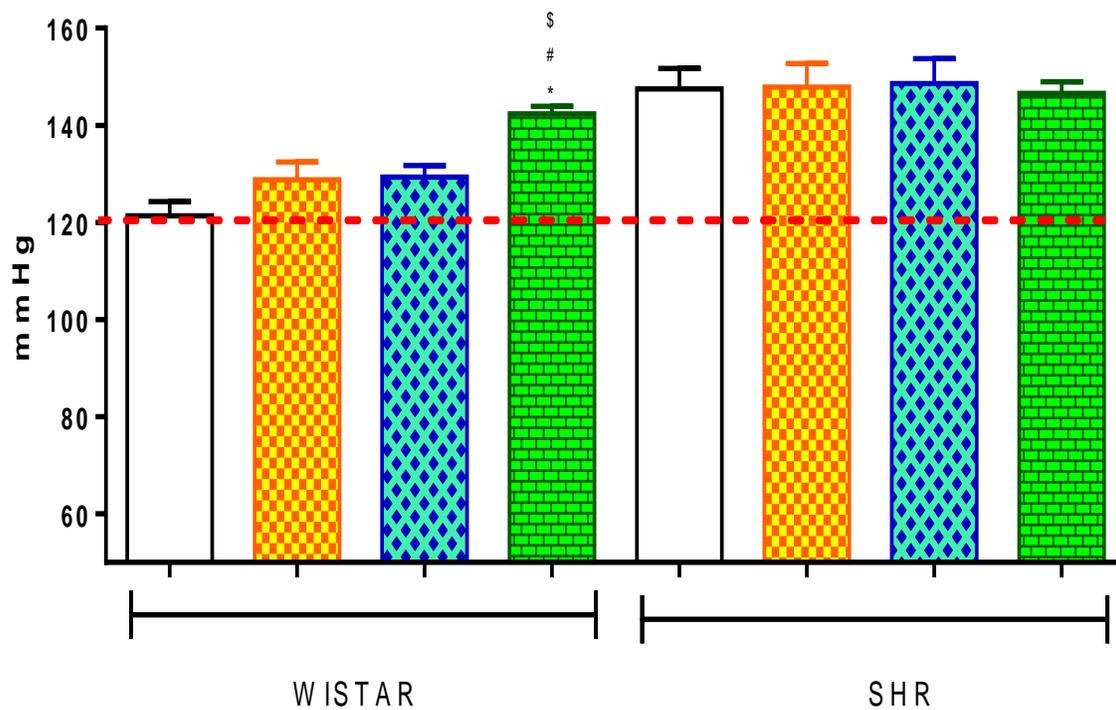


Figura 17. Presión arterial sistólica. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 120 mm Hg. n=12.

Por último, la PAD, en la cepa Wistar con las tres dietas si presento diferencia significativa con respecto a su propio control. A diferencia de las SHR, en las que no hubo diferencia en los datos obtenidos para los diferentes grupos, pero en todos los grupos los valores de PAD estuvieron por encima del valor de referencia, lo que confirma el desarrollo de HA (Figura 18).

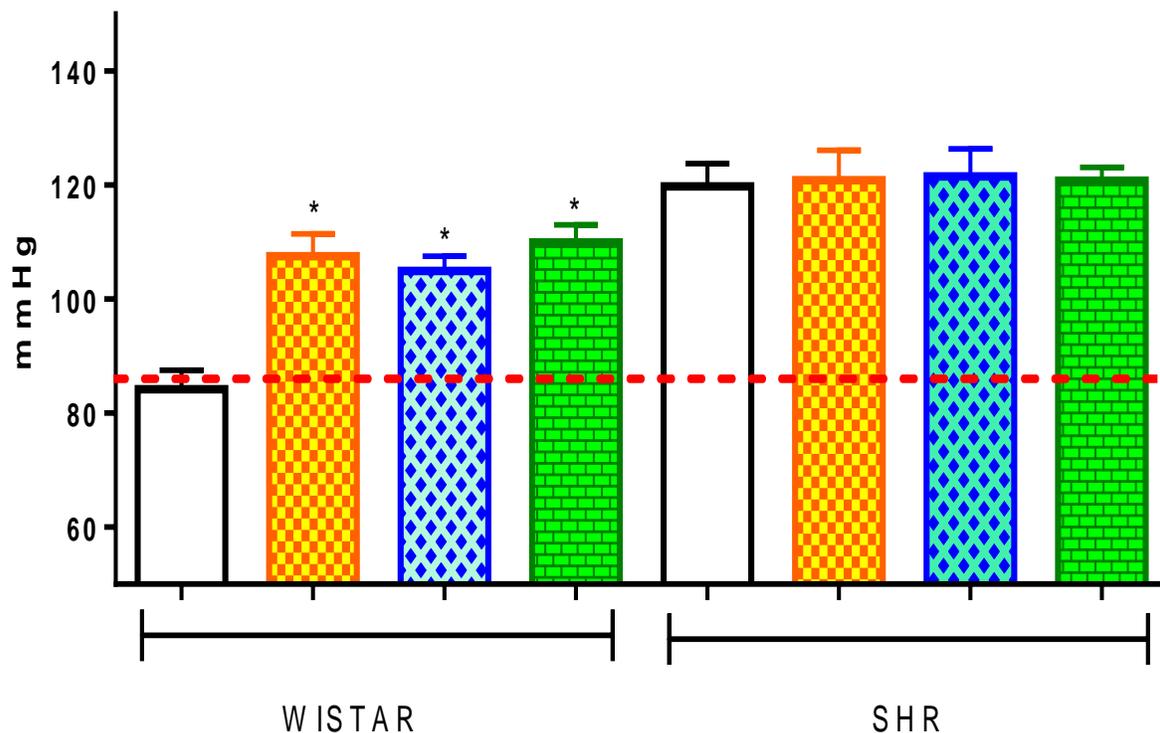


Figura 18. Presión arterial diastólica. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 89 mm Hg. n=12.

#### 4. Estrés Oxidante (MAD, NOx y SOD)

Las dietas hipercalóricas generaron un aumento en los niveles de MAD en el tejido cardiaco y en el suero de las dos cepas de ratas, respecto a su respectivo grupo control. Éste aumento fue mayor en los grupos de las dietas combinadas. Estos resultados indican que las dietas causaron un aumento en las ERO lo que favoreció la peroxidación lipídica, y coinciden con estudios previos realizados en el laboratorio (Figura 19).

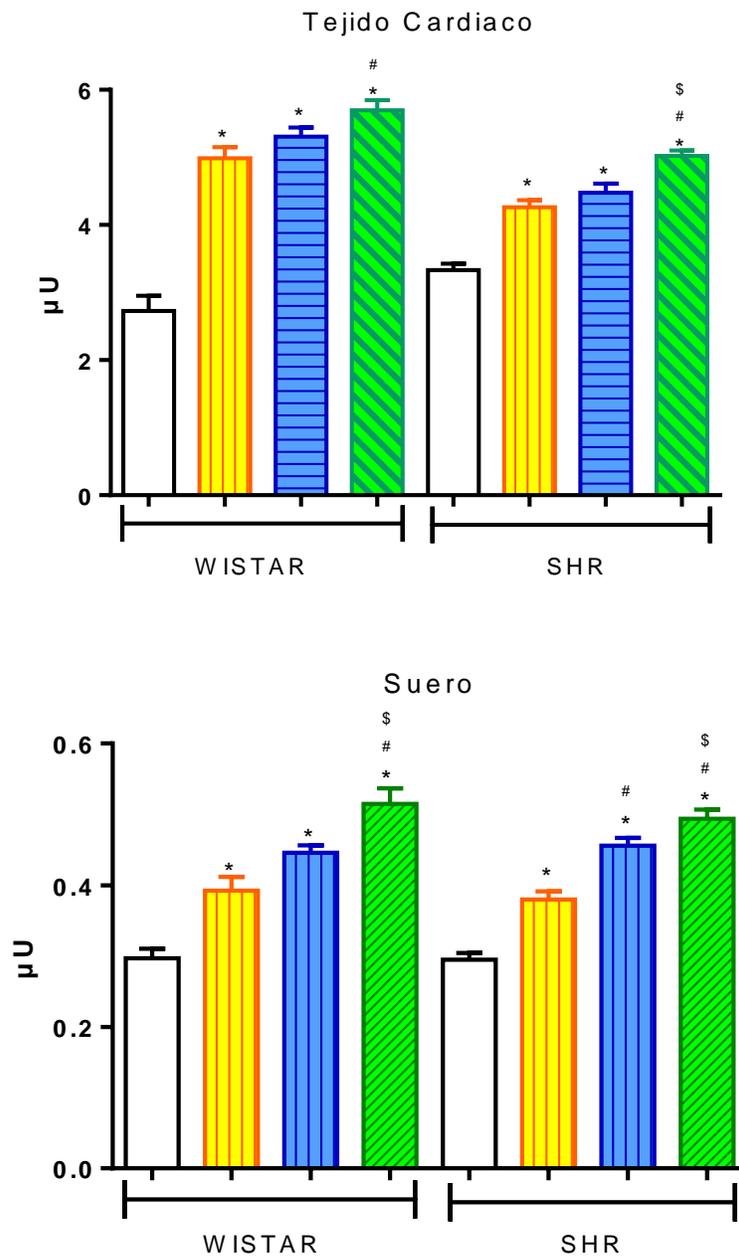


Figura 19. Efecto de las dietas altas en carbohidratos en los niveles de Malondialdehído en homogenado de tejido cardíaco y sueros. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 85 mg/dL para Wistar y 70 mg/dL para SHR.  $n=8$ .

El tratamiento con dietas hipercalóricas incrementó de manera significativa los nitritos totales detectables en el tejido cardíaco y en el suero de las ratas de ambas cepas, en comparación con su respectivo grupo control. La dieta combinada fue la que generó una mayor cantidad de NOx tanto en el tejido cardíaco como en el suero de la cepa Wistar, así como en el suero de la cepa SHR (Figura 20).

La actividad de la principal enzima antioxidante (SOD) se encontró disminuida de manera significativa respecto al control en ambas cepas. El exceso de ERO inducido por la OB y las dietas disminuyó de una manera importante la actividad antioxidante de SOD en el tejido cardíaco. Sin embargo, a nivel sérico en ambas cepas las concentraciones de SOD estuvieron por encima del control, pero sin presentar diferencias entre las dietas. Posiblemente por la capacidad de SOD para tratar de compensar la homeostasis entre ERO y antioxidantes. Estos resultados son consistentes con datos previos del laboratorio (Figura 21).

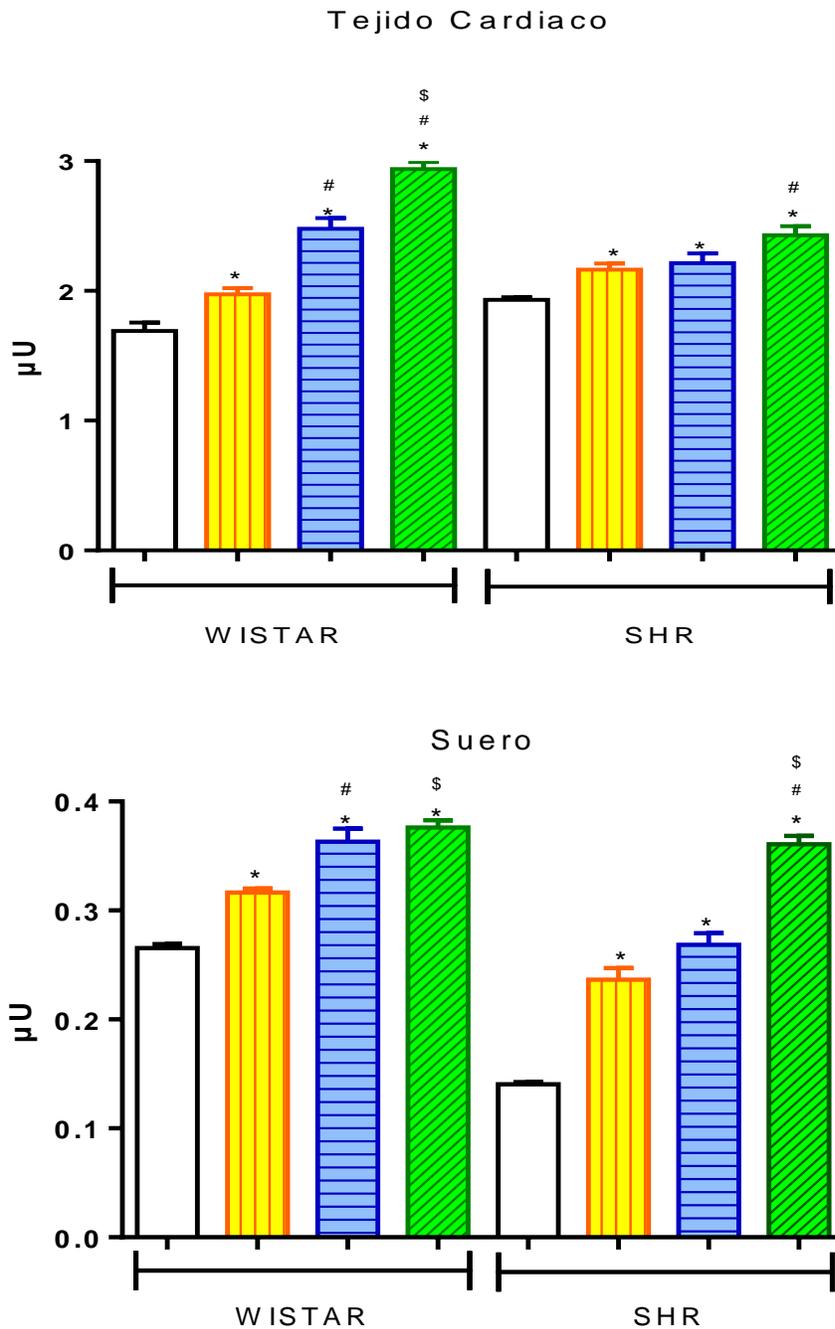


Figura 20. Efecto de las dietas altas en carbohidratos en los niveles de Nitritos totales en homogenado de tejido cardíaco y sueros. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 85 mg/dL para Wistar y 70 mg/dL para SHR.  $n=8$ .

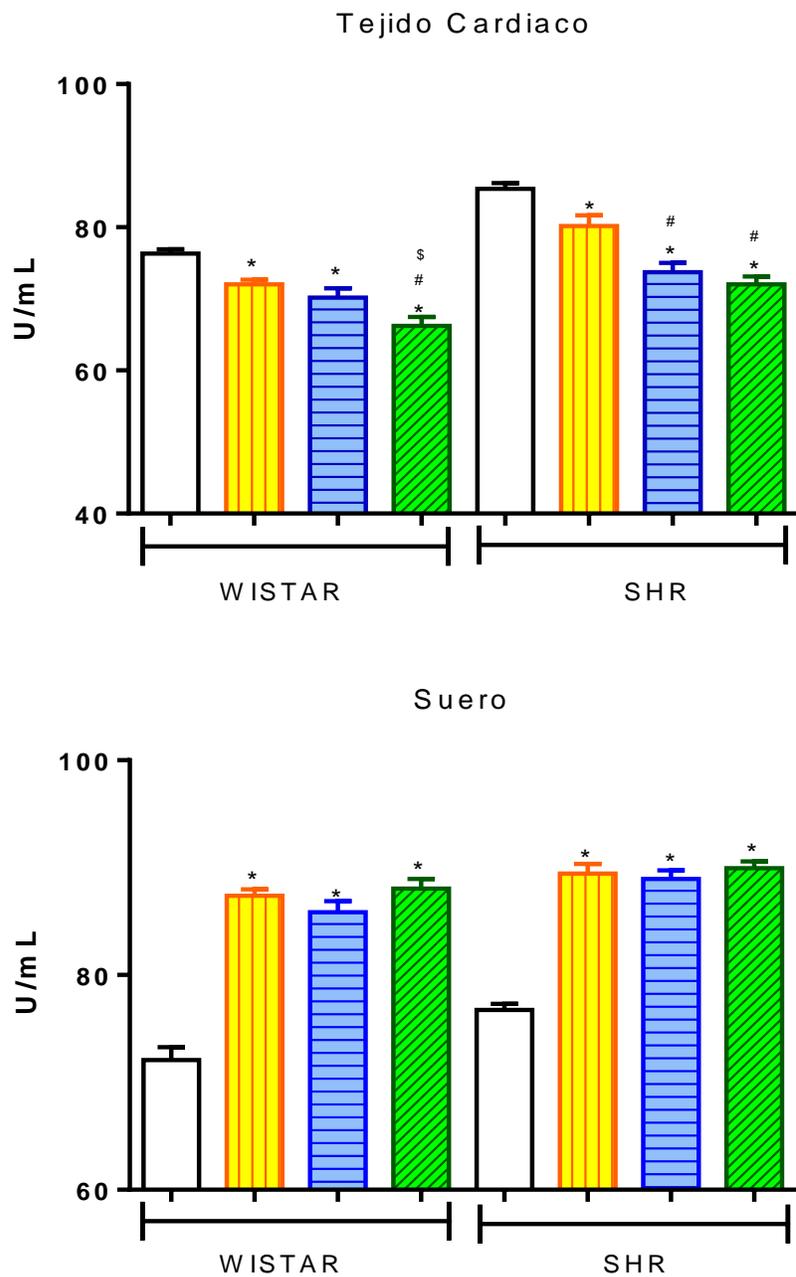


Figura 21. Efecto de las dietas altas en carbohidratos en los niveles de la enzima superóxido dismutasa en homogenado de tejido cardíaco y sueros. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 85 mg/dL para Wistar y 70 mg/dL para SHR.  $n=8$ .

## 5. Hipertrofia Cardiaca

### a. Marcadores Moleculares (ANP, CaMKII total y CaMKII-ox)

En la parte superior de la Figura 22 se muestran los inmunoblots representativos de la expresión de ANP obtenidos para los diferentes tratamientos en las cepas Wistar y SHR. Como se puede apreciar en la parte inferior de la Figura 23, en ambas cepas, las dietas generaron un aumento significativo en la expresión del ANP, pero este aumento fue mayor en el caso de la dieta combinada.

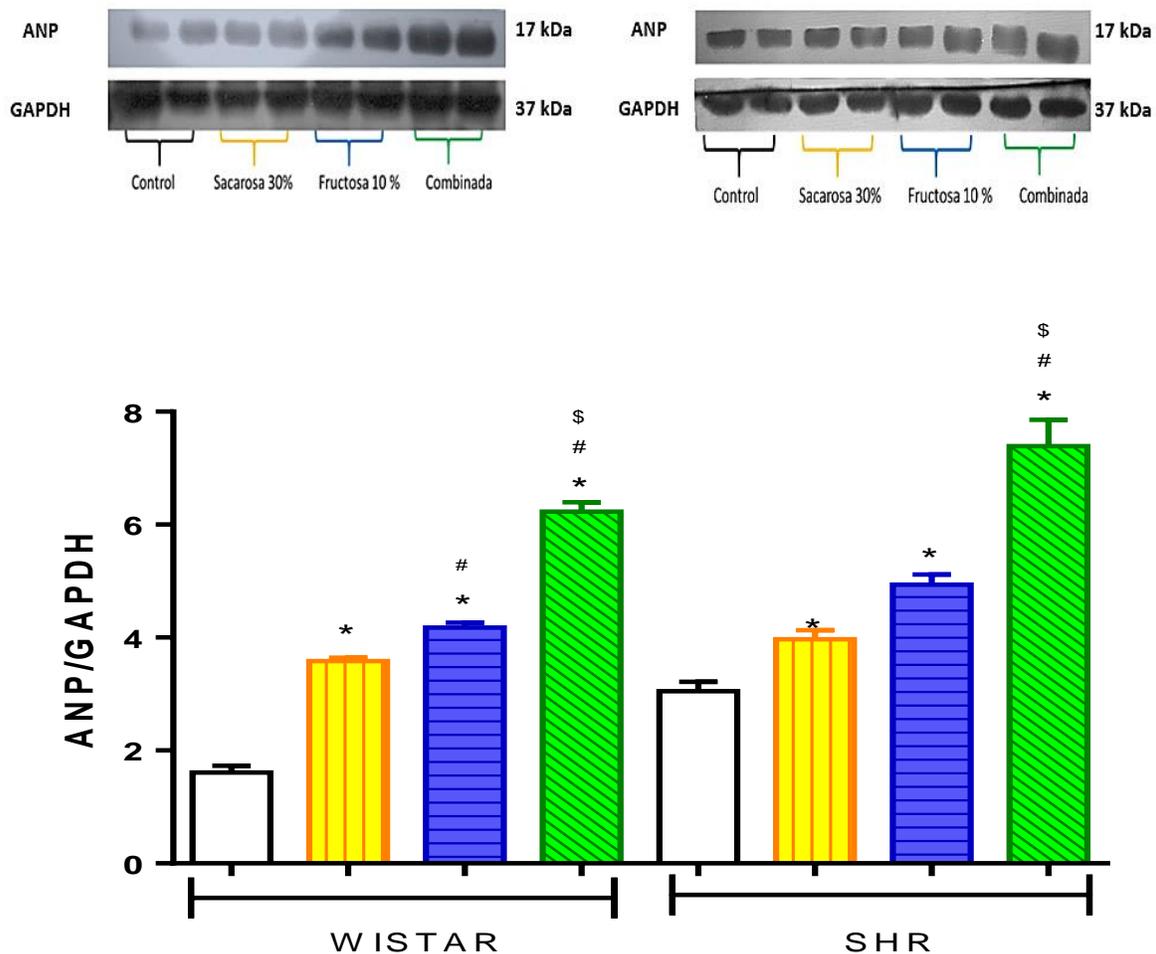


Figura 22. Relación del ANP respecto a GAPDH. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey.  $n=4$ .

En la Figura 23 se muestran los inmunoblots representativos de la expresión de CaMKII $\delta$  obtenidos para las cepas Wistar y SHR y para las diferentes dietas. En la gráfica se puede apreciar que la expresión basal de esta proteína no se vio modificada por ninguna de las dietas, en ambas cepas.

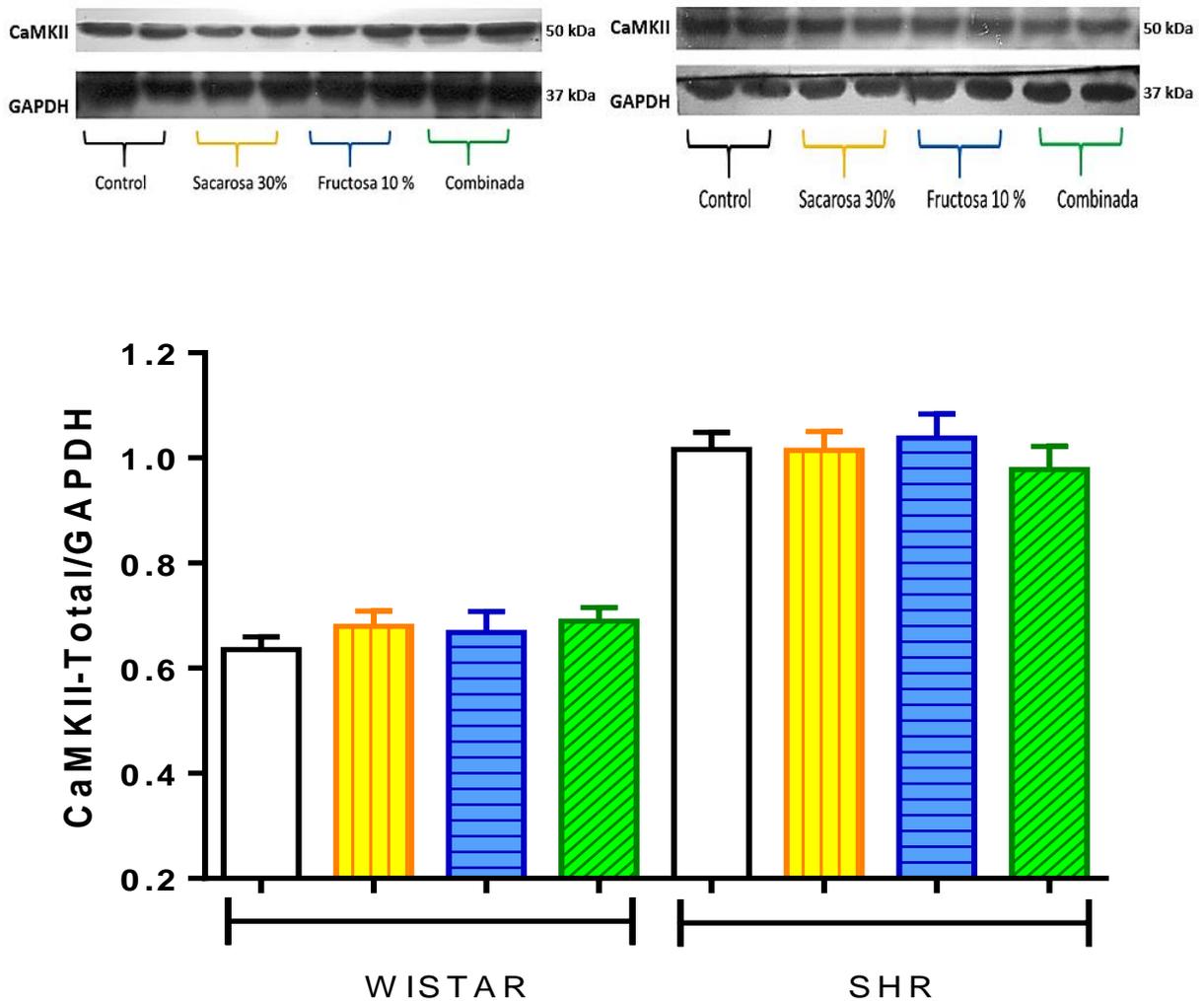


Figura 23. Relación de CaMKII-total respecto a GAPDH. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc*.  $n=4$ .

A diferencia de la proteína total, el nivel de oxidación de esta enzima si se vio incrementado por las dietas tanto en la cepa Wistar como en la SHR, lo que sugiere que las dietas favorecieron la activación de esta enzima. En el caso de las ratas Wistar, el nivel de oxidación de CaMKII fue mayor con la dieta combinada, seguida por la fructosa y en último lugar la sacarosa, mientras que en la cepa SHR, si aumento la oxidación de la cinasa respecto al control en las tres dietas, y no se observó diferencia entre ellas (Figura 24).

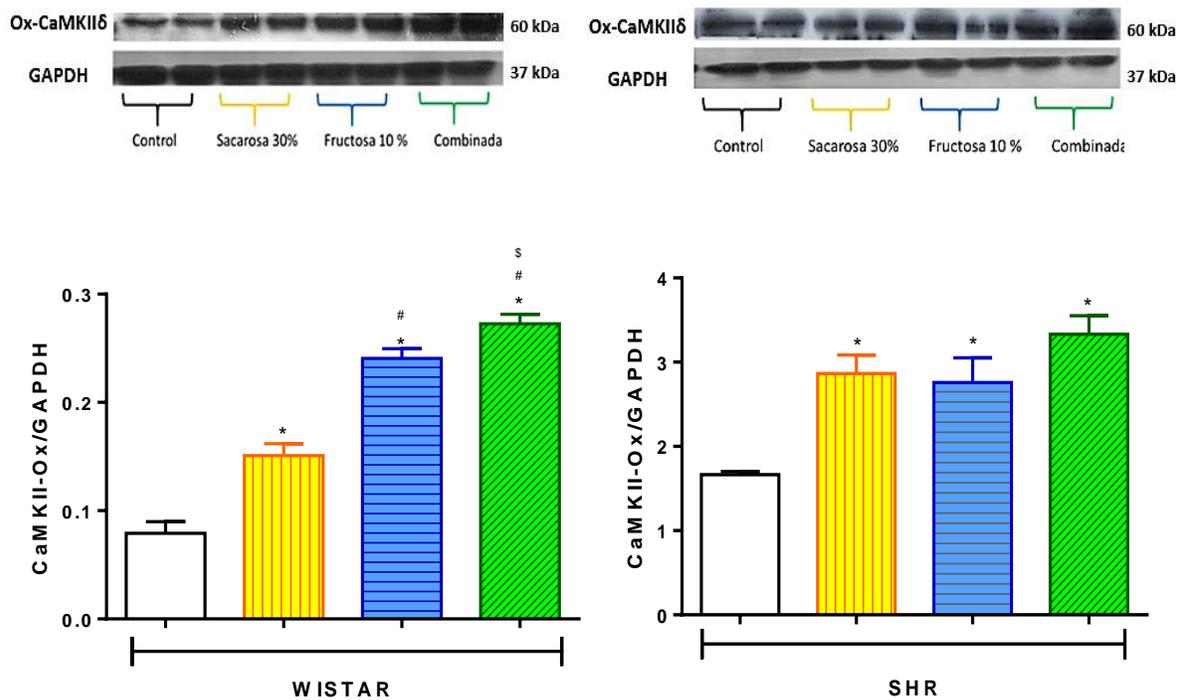


Figura 24. Relación de CaMKII-ox respecto a GAPDH. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc*.  $n=4$ .

## b. Características morfológicas de la HC

### 1. Índice de masa cardíaca

En la Figura 25 se muestra el índice de masa cardíaca (IMCa), el cual se obtuvo de la relación entre el peso del corazón respecto al peso corporal, para cada cepa y para las diferentes dietas. Al comparar los grupos control de cada cepa, se puede notar que este índice es mayor en la cepa SHR, lo que sugiere el desarrollo de HC en estos animales. En las ratas Wistar, el tratamiento de las dietas de sacarosa o fructosa no causó un incremento significativo de este cociente, y en contraste a lo que se esperaba, la dieta combinada generó una reducción significativa del cociente. En la cepa SHR, la dieta combinada fue la única que generó un incremento mayor en el valor del cociente, respecto a su grupo control.

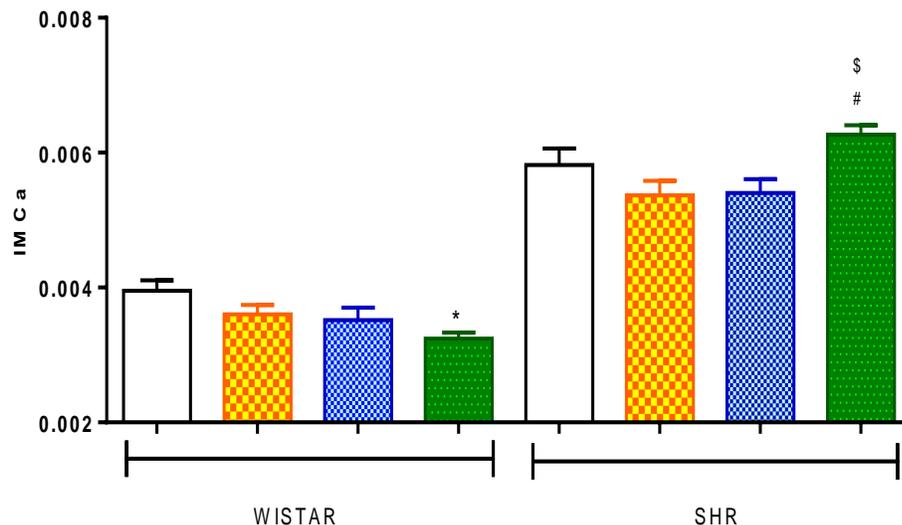


Figura 25. Relación peso del corazón respecto al peso final con 5 meses de dieta. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey. Valor de referencia 85 mg/dL para Wistar y 70 mg/dL para SHR. n=12.

## **2. Espesor de la pared de los ventrículos**

Una de las formas más comunes de comprobar la presencia de HC es con la medición del grosor de la pared del ventrículo izquierdo (VI). En la figura 26 se observa del lado derecho la forma en la que se obtuvo la medición del espesor de la pared del VI. Como se puede observar, en la cepa Wistar hubo un aumento estadísticamente significativo de la pared respecto al grupo control, pero no hubo diferencia entre las dietas. Lo mismo sucedió con la cepa SHR. Además, se puede notar que respecto a la cepa Wistar, la cepa SHR con 5 meses ya presenta HC aun sin tratamiento y el espesor de la pared del grupo control de la SHR es muy parecido a los de las dietas de la cepa Wistar. Por lo tanto, se confirma que la cepa SHR *per se* desarrolla HC y que las dietas incrementan el espesor, así como también que las dietas generan HC en la cepa Wistar con 5 meses de consumo.

Generalmente no se considera el espesor de la pared del ventrículo derecho (VD), debido a que la HC se ve mayormente en el VI. Esto se debe a que tiene la porción con mayor cantidad de tejido muscular del corazón, y tiene la función de impulsar la sangre hacia la arteria aorta para ser transportada a todo el organismo. Sin embargo, en el presente trabajo se muestran los valores tanto de del espesor de la pared como del área del VD que fueron medidos de la misma manera que VI. De acuerdo a los resultados, en la cepa Wistar solo se observó un incremento significativo con las dietas fructosa y combinada respecto al grupo control, y fue la dieta combinada la que presentó este mayor aumento del espesor respecto a las otras dietas. Para la cepa SHR, además de tener un mayor espesor que la cepa Wistar, también se presentó un incremento significativo del espesor solo en las dietas de fructosa y combinada respecto al grupo control y a la dieta sacarosa que no tuvo diferencia significativa respecto al control (Figura 27).

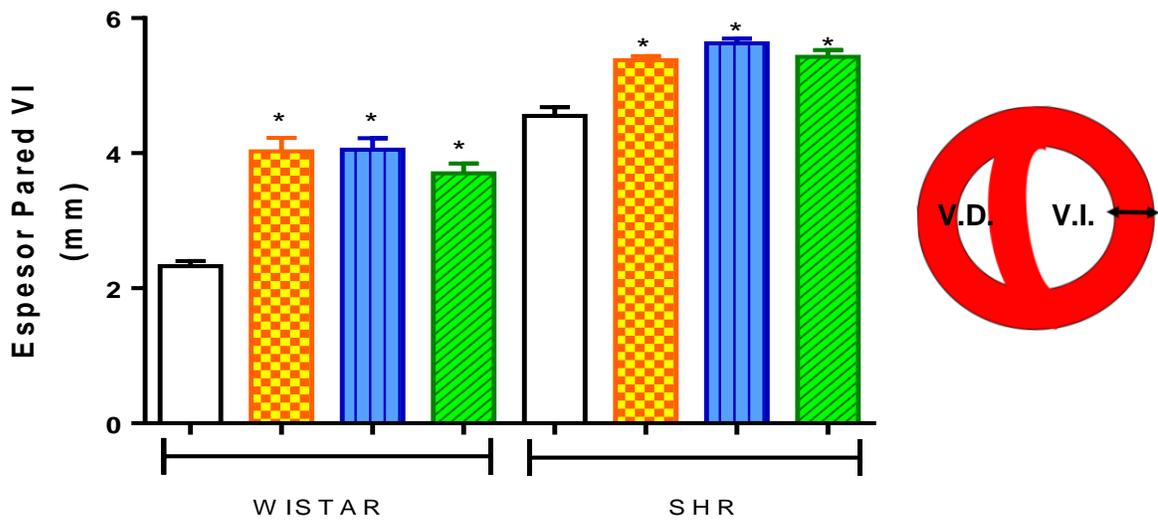


Figura 26. Espesor de la pared del ventrículo izquierdo. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #. *Post hoc* Tukey.  $n=4$ .

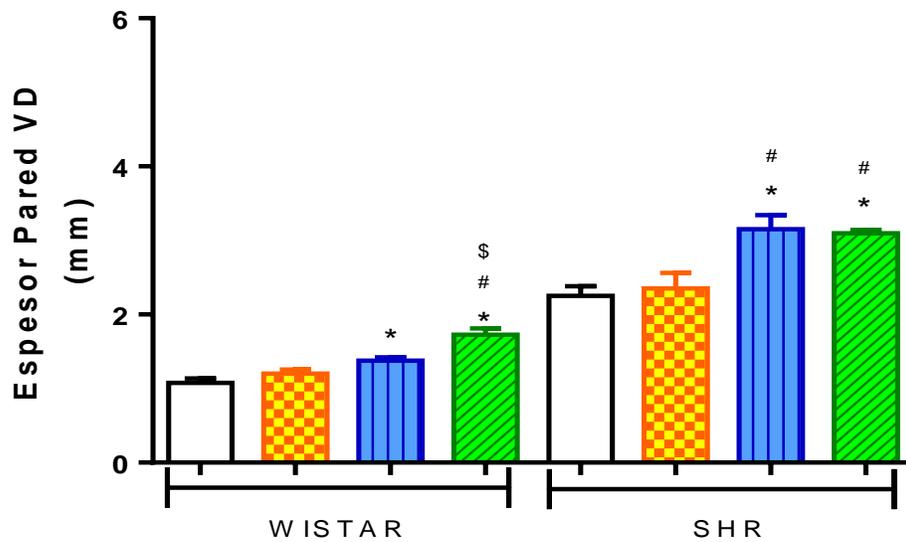


Figura 27. Espesor de la pared del ventrículo derecho. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey.  $n=4$ .

### 3. Relación entre el espesor de la pared del ventrículo izquierdo y el radio de la cavidad (E/R)

La relación E/R es una forma de evaluar el espesor parietal relativo. En la figura 28, en la parte derecha se muestra esquemáticamente como se midieron los parámetros “E” y “R” en un corte transversal de corazón. Los resultados muestran un aumento significativo en la relación E/R con las tres dietas para la Cepa Wistar, con respecto a su control. Esto confirma también la HC, y, además para el caso de las dietas fructosa y combinada un tipo de HC excéntrica respecto a la concéntrica de la sacarosa. Para la cepa SHR, además de la HC en el grupo control en comparación con el grupo control de la cepa Wistar, se observa un aumento significativo en los grupos de sacarosa y fructosa evidenciando un tipo de HC concéntrica, mientras que la disminución significativa de la relación E/R en el grupo de dieta combinada respecto al grupo control confirma de esta manera una reducción en la HC concéntrica del VI. Por lo tanto, el desarrollo de HC excéntrica indica que hubo una descompensación y un remodelado cardiaco que condujo a una dilatación ventricular.

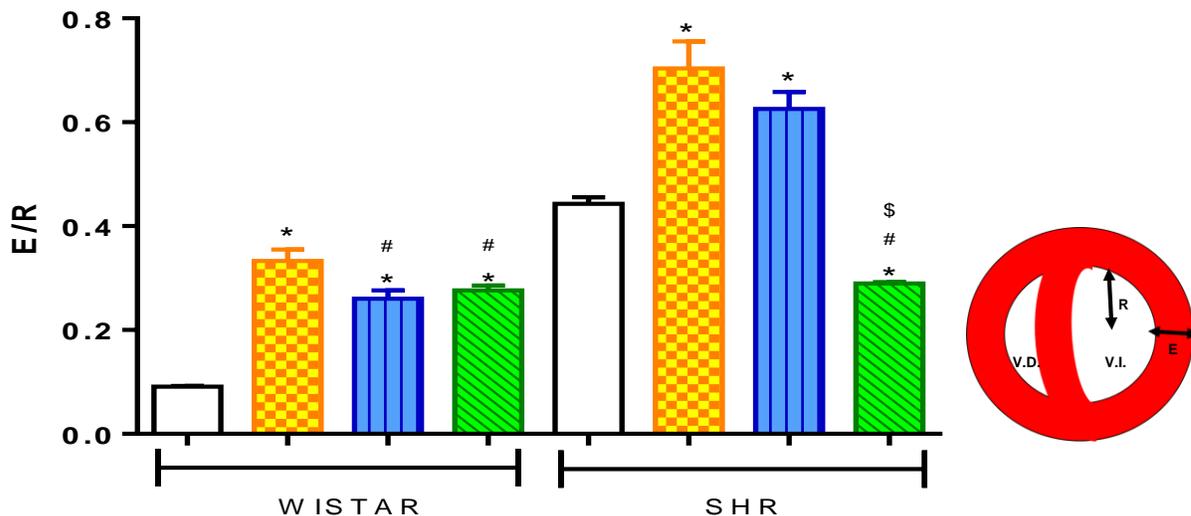


Figura 28. Relación E/R. Barra blanca: control; barra amarilla: sacarosa 30%; barra azul: fructosa 10%; barra verde: combinada. Representados como media  $\pm$  e.e. ANOVA de un factor. \* $p \leq 0.05$  vs Control. #  $p \leq 0.05$  vs Grupo sacarosa 30%. \$  $p \leq 0.05$  vs Grupo Fructosa. *Post hoc* Tukey.  $n=4$ .

### ***c. Histología***

Se muestran cortes transversales representativos de corazones para cada grupo (Control, Sacarosa 30%, Fructosa 10% y Combinada). En los corazones de la cepa Wistar se observa un ensanchamiento en el grosor de la pared ventricular izquierda, y un aumento del tamaño celular en los acercamientos a 100X, en los 3 grupos de dieta comparados con el control, esto confirma de manera visual la HC concéntrica que coincide con la relación E/R aumentada. Los corazones de los grupos de sacarosa y combinada presentaron menor tamaño, no así el de fructosa, comparados al grupo control posiblemente por la mal nutrición y pobre desarrollo que presentaron estos grupos en particular de acuerdo a su peso corporal. Sin embargo, a pesar del bajo peso y tamaño ambos presentaron HC confirmada por los marcadores moleculares y morfológicos (Figura 29). Por otro lado, los corazones de la cepa SHR tanto en el grupo control como con las dietas presentan HC. De manera visual son corazones más grandes que los de la cepa Wistar y además de la HC concéntrica en el grupo control y de sacarosa, en el grupo de fructosa se puede observar una dilatación del VI y del VD siendo muy notoria en la dieta combinada. La cual además de la clara HC se confirma de manera visual la dilatación de ambos ventrículos y que coincide con la disminución significativa de la relación de E/R y con una clara dilatación en ambos ventrículos. (Figura 30).

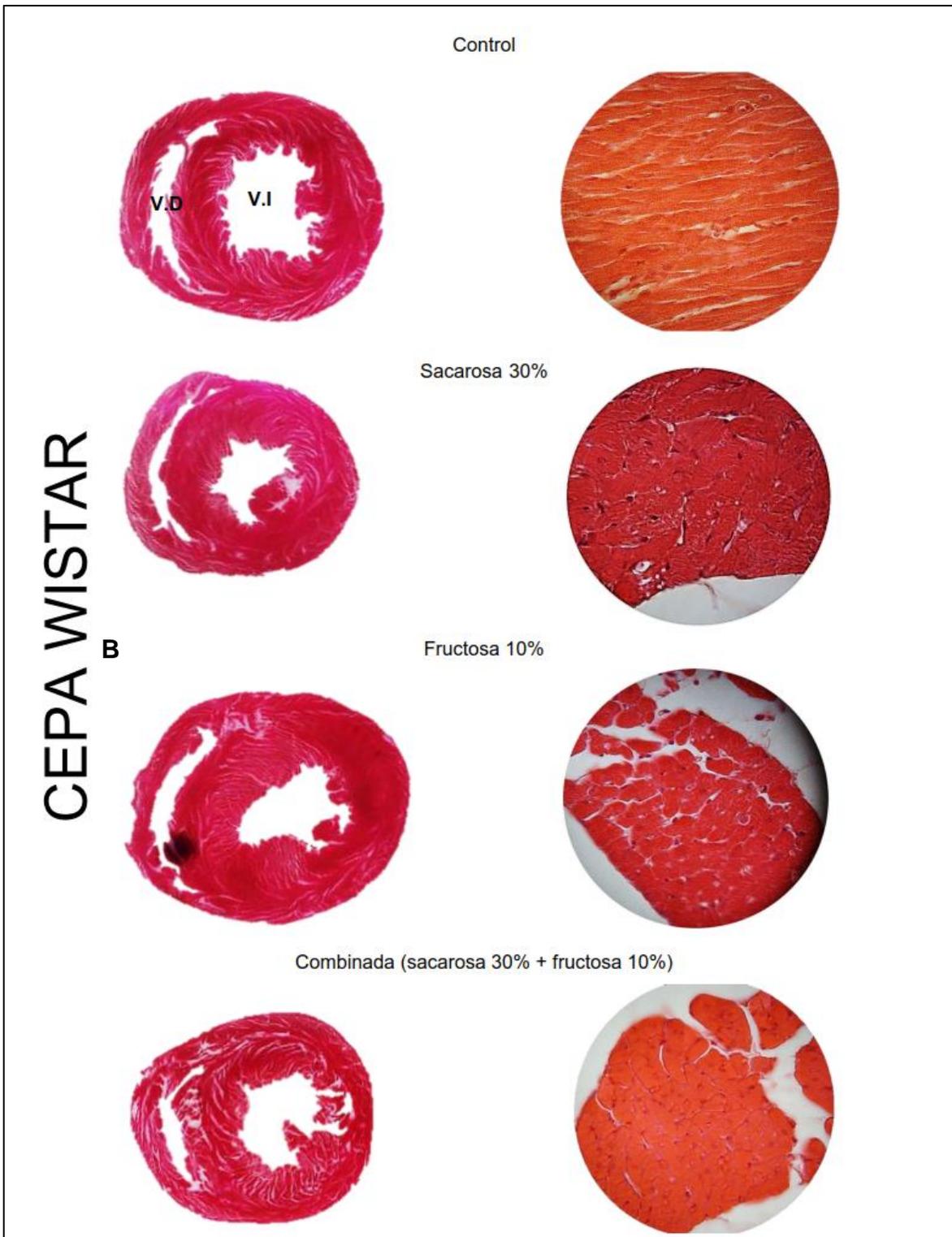


Figura 29. Cortes transversales de corazón de la cepa Wistar de los 4 grupos experimentales. Izquierda: corte transversal; derecha: acercamiento a 100 X de la pared del ventrículo izquierdo. Tinción Hematoxilina-Eosina.

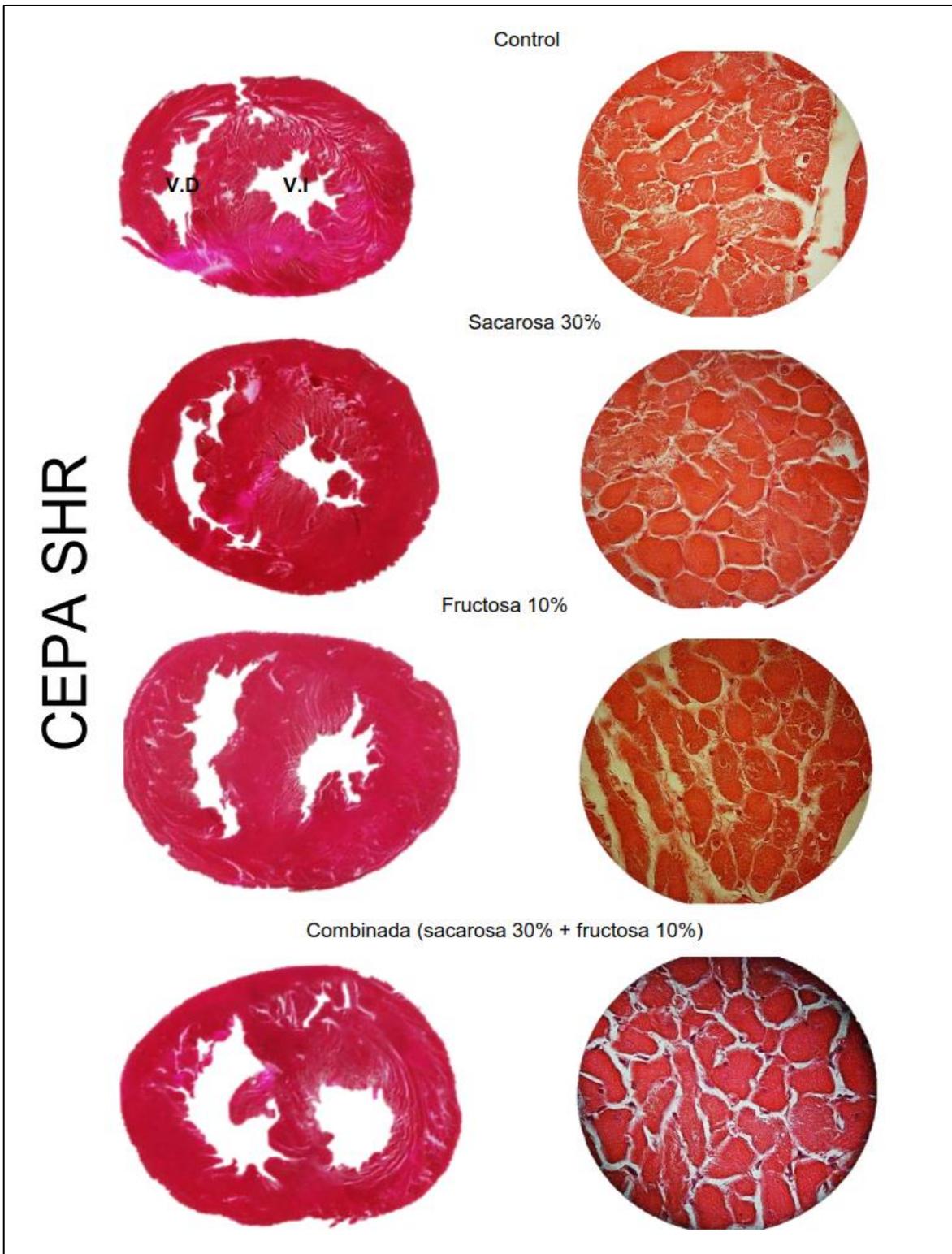


Figura 30. Cortes transversales de corazón de la cepa SHR de los 4 grupos experimentales. Izquierda: corte transversal; derecha: acercamiento a 100 X de la pared del ventrículo izquierdo. Tinción Hematoxilina-Eosina.

## VII. Discusión

El consumo excesivo de carbohidratos en la dieta diaria se asocia con el desarrollo de diversas complicaciones cardiovasculares y metabólicas relacionadas con la OB. Este factor aunado con la predisposición genética que presenta la población mexicana para desarrollar OB, HA o ambas enfermedades desde edades tempranas, puede explicar la alta prevalencia que han alcanzado estas enfermedades en los últimos años (ENSANUT 2016). En el caso de la OB, ésta ha alcanzado niveles pandémicos, y la OMS (2017) ha estimado que alrededor de 2.8 millones de personas mueren a causa de este padecimiento a nivel mundial.

Las dietas de alto valor energético generan diferentes alteraciones metabólicas. En estudios experimentales con roedores se ha reportado que las dietas altas en carbohidratos producen alteraciones metabólicas relacionadas con la OB, como son la RI, intolerancia a la glucosa, estrés oxidativo, dislipidemias, inflamación, aumento de la presión arterial, esteatosis hepática, entre otros (Frazier *et al.* 2008; Baños *et al.* 2015; Sullivan *et al.* 2015; Balderas, 2016). Sin embargo, son muy pocos los estudios experimentales en los cuales se han comparado los efectos deletéreos que tienen sobre la salud las dietas hipercalóricas basadas en el consumo de carbohidratos, sobre todo en niños (Martins *et al.* 2015). En este sentido, se sabe que, en México, los niños, desde edades muy tempranas, consumen una gran cantidad de BA. El INSP (2014) reportó que 7 de cada 10 niños en comunidades rurales desayunan con un refresco o una bebida azucarada. Y los principales endulzantes de estas bebidas son la sacarosa y la fructosa.

En este estudio se evaluaron los efectos del consumo de sacarosa, fructosa y su combinación en ratas Wistar y SHR recién destetadas. La cepa Wistar nos permitió conocer el daño perjudicial que tienen en la salud los diferentes azúcares utilizados para endulzar este tipo de bebidas, cuando los animales no presentan ninguna predisposición genética a padecer una enfermedad asociada con la OB.

Mientras que la cepa SHR, la cual tiene una predisposición genética a desarrollar HA, HC y RI a partir de los 3 meses de edad (Rivera *et al.*2013), nos permitió conocer los efectos del consumo excesivo de azúcares cuando, al igual que en muchos infantes y niños, la carga genética favorece que los daños a la salud puedan presentarse con mayor impacto.

### ***7.1 Efecto de las dietas ricas en carbohidratos en el peso corporal y la acumulación de tejido adiposo de ratas Wistar y SHR recién destetadas***

El aumento del peso corporal es el criterio más utilizado para evidenciar la OB. Sin embargo, los resultados de peso corporal obtenidos en la presente investigación, no tuvieron esta característica, ya que el peso corporal no se vio incrementado por las dietas en ninguna de las cepas estudiadas, y de hecho más bien se observó una reducción en su valor con la dieta de sacarosa para la cepa Wistar, y con la dieta combinada para la cepa SHR. Esto nos indica que la edad de inicio de tratamiento juega un papel importante para poder ver los cambios físicos característicos de la OB. Considerando, sin embargo, que la OB se define como “una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud” de acuerdo con la OMS (2016), entonces se puede tomar la acumulación de tejido adiposo como una de las principales características de la OB. Con este criterio, los resultados obtenidos para el cociente del peso del tejido adiposo retroperitoneal/peso corporal nos confirman que para ambas cepas y con las 3 dietas, los animales tuvieron una mayor acumulación de tejido adiposo respecto a su grupo control, siendo la dieta de sacarosa la que indujo una mayor acumulación del tejido adiposo en ambas cepas, seguida de la dieta combinada y por último de la fructosa. Esto nos indica que el grado de acumulación de grasa depende del tipo de azúcar, y que la sacarosa es el azúcar que produce la mayor adiposidad, y por lo tanto es probable que la acumulación de grasa promovida por la dieta combinada se deba principalmente a la sacarosa y en menor medida a la fructosa.

En un estudio previo, Martínez *et al.* (2015) reportaron también el aumento significativo en el peso del tejido adiposo de ratas macho Wistar neonatas que fueron alimentadas con sacarosa al 35% durante 18 semanas. Por otro lado, Baños *et al.* (2005) utilizando ratas Wistar macho de 28 días de edad observaron que después de una dieta con sacarosa al 30% por 8 meses, los animales no presentan un incremento significativo en el peso, aunque este tiende a ser mayor a partir del sexto mes con la dieta. En el caso de la fructosa, Lê *et al.* (2006) reportó que la administración de fructosa (1.5 g/Kg) por 4 semanas no cambió el peso corporal, pero sí causó alteraciones metabólicas asociadas con la OB como un incremento significativo de TG y glucosa en suero, y lo mismo fue reportado por Dornas *et al.* (2015).

Resulta interesante que, a pesar del aumento en la acumulación de tejido graso, el peso corporal tanto en las ratas Wistar como en las SHR se vio modificado a la baja con las dietas de sacarosa y combinada, respectivamente. Si bien, el alto consumo calórico está relacionado con el desarrollo de la OB y el aumento de la masa corporal en población adulta, en los niños el consumo excesivo de grasas o carbohidratos se ha relacionado con un estado de malnutrición que puede tener consecuencias irreversibles y permanentes en su desarrollo, como son un crecimiento físico menor, deficiencia en el desarrollo cognitivo, déficit en el sistema inmunológico, entre otros (CEPAL, 2017). Comparando los valores de peso corporal obtenidos en nuestro estudio con las tablas de referencia de peso corporal para ratas Wistar macho elaboradas por Cossio y Bolaños (2013), encontramos que en la cepa Wistar, la reducción del peso corporal promovido por la dieta de sacarosa corresponde a un estado de desnutrición, mientras que los valores de peso corporal obtenidos con la dieta combinada corresponden a un estado de delgadez, y los de fructosa corresponden a un estado de normopeso. Por lo tanto, la malnutrición promovida por las dietas hipercalóricas fue mayor con la dieta de sacarosa. En el caso de las ratas SHR, la predisposición genética de estas ratas favorece que tengan un peso corporal menor en comparación con la cepa Wistar (de la cual fueron obtenidas) (Rivera

*et al.* 2013), lo que se confirmó en el presente estudio. Sin embargo, para la cepa SHR no hay tablas de referencia que correlacionen su estado de nutrición con su peso corporal, por lo que no es posible establecer si la disminución en el peso corporal promovido por la dieta combinada se relaciona con una desnutrición.

Aunque en nuestro estudio no queda clara la razón por la cual no hubo una ganancia del peso corporal promovido por las dietas de sacarosa en el caso de las ratas Wistar, y por la dieta combinada en el caso de la cepa SHR, es probable que esto se deba a un menor aporte en el consumo de proteína. El aporte de proteínas durante la infancia y la niñez es indispensable para el correcto desarrollo y crecimiento. Las proteínas son las encargadas de que haya un correcto funcionamiento celular, formación de anticuerpos y de aumentar la masa corporal, entre otras muchas funciones (Lehninger, 2009). Y hay evidencia de que, ante la presencia de una dieta líquida rica en carbohidratos, basada en sacarosa o en JMAF al 11%, las ratas machos Sprague-Dawley prefieren consumir las dietas líquidas, reduciendo el consumo de agua y del alimento sólido (Ackroff y Sclafani, 2011). Además, las ratas prefirieron consumir más sacarosa que JMAF. Por otro lado, a pesar de que estos antecedentes fueron probados en ratas adultas se sabe que la preferencia por sabores dulces es mayor durante la infancia y la niñez, lo que se ve reflejado con un mayor consumo de bebidas y alimentos azucarados (INSP, 2014; CEPAL, 2017). Así, es probable que el alto consumo de carbohidratos en el agua de bebida, sobre todo por la presencia de sacarosa, favoreció la falta de nutrientes en el grupo de sacarosa de las ratas Wistar y en el grupo de la dieta combinada en las ratas SHR.

## ***7.2 Efecto de las dietas ricas en carbohidratos en el perfil bioquímico de ratas Wistar y SHR recién destetadas***

Como se mencionó anteriormente, el alto consumo de carbohidratos se asocia con un aumento en los valores de glucemia e insulina, así como con el desarrollo de dislipidemias y RI. La evaluación del perfil bioquímico en las ratas Wistar y

SHR recién destetadas mostró que las dietas de sacarosa, fructosa y combinada producen un incremento significativo en los niveles de glucosa, insulina y TG en ambas cepas. Asimismo, estas dietas incrementan el índice HOMA y reducen el índice QUICKI, demostrando con ello el desarrollo de RI. Llama la atención, sin embargo, que, en el caso de la glucosa y la insulina, los efectos de la sacarosa y la dieta combinada fueron más pronunciados que los efectos de la fructuosa. Mientras que la producción de TG fue mayor en los grupos de fructosa y con la dieta combinada, comparados con los efectos de la sacarosa.

El metabolismo de la sacarosa y la fructosa es distinto. Por un lado, la sacarosa requiere ser separada en las dos moléculas que la componen (glucosa y fructosa). Por su parte, la fructosa una vez que es absorbida en el intestino, llega al torrente sanguíneo es transportada por GLUT 5 para poder ser introducida en el hígado, en donde dará lugar a la producción de más glucosa y de TG (Aranceta, 2013). Así, a mayor cantidad de fructosa consumida mayor producción de glucosa hepática y de TG, que inducirán mayor secreción de insulina para tratar de restaurar la homeostasis de la glucosa, y promoverán un mayor aumento en el almacenamiento de TG en el tejido adiposo. De forma distinta la glucosa requiere de los transportadores GLUT para poder ingresar a las células hepáticas. Considerando esto, es probable que en el caso de la sacarosa se genere una mayor cantidad de glucosa debido al rompimiento de su molécula en glucosa y fructuosa, y a que el metabolismo hepático de la fructosa generara más glucosa. Esto podría por lo tanto explicar porque las dietas con sacarosa y la combinada generan un aumento mayor en los niveles séricos de glucosa que la dieta con fructosa sola (Olguin. *et al.* 2015. Maersk, *et al.* 2016; Federico *et al.* 2017).

La RI es una respuesta adaptativa y protectora para los tejidos insulino dependientes, que no tiene un buen pronóstico en el organismo, ya que, como mecanismo compensatorio, la RI y la hiperglucemia sostenida promueven un aumento en la proliferación de células  $\beta$  en el páncreas, con el propósito de

producir más insulina y compensar la glucosa excesiva en la sangre, pero también promueven la activación de otros procesos como la inflamación y la sobre producción de ERO. Los resultados del presente trabajo mostraron una hiperinsulinemia en los tres grupos de dieta respecto al grupo control de ambas cepas, siendo aún mayor en la cepa SHR, donde también su control presentó valores por encima del valor de referencia para la insulina en ayuno. Esto se debe a que en las ratas SHR la predisposición genética induce RI, lo que provoca la sobre-activación del SNS (liberación de noradrenalina), y tiene efectos renales debido al aumento de las concentraciones de aldosterona y angiotensina II por la activación del SRAA, que conlleva a un aumento en la reabsorción renal de  $\text{Na}^+$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , un aumento de las respuestas presoras, mayor acumulación intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , alteraciones en la vasodilatación, un aumento de secreción de ET-1, lo que en conjunto induce HA en estos animales (Krinke, 2000; López de Fez *et al.* 2004; Oliveiro *et al.* 2008).

Para el caso del colesterol total, es un parámetro que nos indica la cantidad total de los dos tipos principales: el LDL y el HDL. La función de las LDL es transportar el colesterol a diferentes tejidos, sus niveles aumentan en condiciones en los que hay un incremento de TG, debido a que las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad, por sus siglas en inglés) son necesarias para transportar los TG desde el hígado hasta los adipocitos y otros órganos. A partir de la lipólisis de las VLDL se producen lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y a partir de éstas se producen las LDL. Por otro lado, la función de las HDL es extraer el colesterol sobrante de las células y transportarlo al hígado para su eliminación en forma de ácidos biliares y colesterol en las heces (Carvajal, 2014). En estado de OB el valor de colesterol total elevado es indicativo de un aumento de las LDL más que de las HDL (AHA, 2016). Nuestros datos muestran la correlación entre el aumento en los niveles de TG y los niveles de colesterol que fueron producidos por las diferentes dietas tanto en las ratas Wistar como en las SHR.

### **7.3 Efecto de las dietas ricas en carbohidratos en la presión arterial de ratas Wistar y SHR recién destetadas**

Como se esperaba, las ratas SHR presentaron valores de PAM, PAD y PAS elevados con respecto a los valores obtenidos en las ratas Wistar e incluso por arriba de los valores de referencia reportados para esta especie, lo que confirma el desarrollo de HA en esta cepa. La HA en las ratas SHR se presenta de manera espontánea a partir de la quinta semana de edad con valores de PAS entre 150 mmHg y 180 mmHg, y se estabilizan alrededor de la semana 12. Conforme avanza la edad, estas ratas pierden la capacidad de inhibir la actividad SNS, lo que favorece que padezcan HA el resto de su vida (Rivera *et al.* 2013). Después de los 5 meses de consumo de las dietas altas en carbohidratos, se observó que en las ratas Wistar, las dietas causaron un aumento significativo tanto en la PAM como en la PAD, y solo la dieta combinada generó un aumento en la PAS. Por el contrario, ninguna de las dietas generó un aumento mayor de la PAM, PAD y PAS con respecto a los valores que ya presentan de manera basal en las ratas SHR. De acuerdo con los criterios de la OMS y considerando que los valores de PA normales en rata son los mismos para humanos, pudimos comprobar que las dietas de sacarosa, fructosa y su combinación son capaces de aumentar la PA en las ratas Wistar, viéndose principalmente alterada la PAD. Mientras que en las ratas SHR, las dietas ya no exacerbaban el incremento en la presión arterial.

Balderas *et al.* (2014) reportaron que el tratamiento de las ratas Wistar macho adultas con una dieta de sacarosa al 30% por 3 meses, no causó un cambio significativo en la PAS, mientras que Baños *et al.* (2005) reportaron que esta misma dieta produce un incremento en la PAS de ratas Wistar después de 5 meses de tratamiento. Sin embargo, en estos trabajos no se evaluó la PAD, y los experimentos se iniciaron con ratas de mayor edad. En este sentido, Franklin *et al.* (2007 y 2009) realizaron un estudio con pacientes con sobrepeso y síndrome metabólico de edades entre 25 y 74 años, y observaron que el aumento en la PAD se ve favorecida a edades menores, y que conforme avanza la edad

se empieza a mostrar un aumento en la PAS. Estos datos pueden explicar porque en nuestras ratas Wistar jóvenes se ve favorecido el incremento en la PAD y por lo tanto en la PAM, después de los 5 meses de alimentación con las dietas altas en carbohidratos.

#### **7.4 Efecto de las dietas ricas en carbohidratos en los marcadores de estrés oxidante en ratas Wistar y SHR recién destetadas**

El desbalance entre la producción de ERO y la actividad de agentes antioxidantes endógenos en personas con OB se ha relacionado fuertemente con el desarrollo de diferentes comorbilidades como las patologías cardiovasculares. Yang *et al.* (2009) comprobaron de manera experimental que en animales obesos se presentó un aumento del 200% en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, una disminución del 35% en la GPx mitocondrial y 43% en la citosólica, mientras que los niveles séricos de SOD y CAT aumentaron 170% y 153%, respectivamente. Boudina *et al.* (2007) obtuvo resultados similares, y además midió de manera indirecta el aumento de ERO a través de la peroxidación lipídica utilizando la técnica de MAD. Furukawa *et al.* (2004) demostraron de manera experimental que en la OB ocurre un aumento significativo en la expresión de la NADPH oxidasa en el tejido adiposo y en sus niveles plasmáticos, por lo que concluyeron que el tejido adiposo es la principal fuente de ERO. Por otro lado, Zhang *et al.* (2016) recientemente comprobaron que en ratones C57BL/6 tratados con una dieta de fructosa al 10% durante 20 semanas y en cardiomiocitos ventriculares de rata cultivados con 25 mM de fructosa ocurre un aumento considerable de ERO mitocondrial, además de presentarse HC, evaluada de forma indirecta por marcadores moleculares como en el ANP y directamente por ecocardiograma e histología. En este trabajo Zhang *et al.* (2016) concluyeron que la fructosa *per se* es capaz de inducir la producción de ERO mitocondrial en cantidades considerables, lo que se asocia con el desarrollo de HC en cardiomiocitos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Nuestros datos muestran que las diferentes dietas causaron un incremento significativo en la cantidad de MAD, tanto en la cepa Wistar como en la SHR, lo que indica que hubo una mayor peroxidación lipídica, y por lo tanto el desarrollo de estrés oxidativo. Estos efectos fueron más acentuados con la dieta combinada en ambas cepas, lo que sugiere que esta dieta es la que lleva a una mayor producción de ERO tanto en el tejido adiposo como de manera local en el corazón, lo que se vio reflejado en los niveles de MAD en suero y tejido cardiaco, respectivamente. Además, para el caso de los valores de SOD en suero, se observó que todas las dietas incrementaron sus valores en ambas cepas. Estos datos coinciden con lo reportando por Yang *et al* (2004). Por lo tanto, estos datos pueden interpretarse en el sentido de que SOD está siendo producida en grandes cantidades para mantener la homeóstasis entre ERO y antioxidantes. Esta situación no ocurrió de manera local en el corazón. En este caso lo que observamos es que las dietas llevaron a una reducción en la concentración de SOD, probablemente debido al exceso de ERO en este tejido.

Uno de los mecanismos que relacionan a la OB y la HA es la disfunción endotelial, la cual está asociada con la disminución de NO endotelial de los vasos sanguíneos. En estados de OB y por lo tanto de estrés oxidante, ocurre un mayor aumento de  $O_2^{\bullet-}$ , este radical libre es altamente reactivo e inestable como el NO, de tal manera que reaccionan rápidamente formando  $OONO^{\bullet-}$ . Esta reacción es la responsable de la disminución del NO y del incremento del anión  $OONO^{\bullet-}$ , que en conjunto contribuyen a la disfunción endotelial. Nuestros datos muestran que, en ambas cepas, las dietas generaron un incremento en los valores de NOx, lo que correlaciona con el aumento en la PA promovido por las dietas principalmente en las ratas Wistar.

### **7.5 Efecto de las dietas ricas en carbohidratos en el desarrollo de HC de ratas Wistar y SHR recién destetadas.**

La HC vista como un mecanismo de adaptación del corazón ante una sobrecarga de trabajo constante es el indicativo previo de la IC (Abel *et al.* 2008), y es una de las complicaciones comunes de la HA y de la OB. Existen diferentes métodos para el diagnóstico de la HC, que pueden ser directos o indirectos, y entre ellos el más utilizado es la ecocardiografía. La influencia de las dietas sobre los problemas cardiovasculares ha sido abordada en la última década, sin embargo, un estudio comparativo de diferentes dietas con un consumo desde edades tempranas no se había realizado hasta el momento. Brady (2016) en su estudio de metaanálisis demuestra que niños con edad promedio de 14 años con OB y OB con HA tenían HC, indicativo de que la HC no solo se presentaba en edades adultas, sino también en edades tempranas, y que su desarrollo se ve favorecido no solo por la HA, sino también por la OB.

Dentro de los marcadores moleculares de HC se encuentran el cociente del peso del corazón normalizado con el peso corporal, así como el aumento en la expresión de ANP y en la actividad de CaMKII (Erickson, 2011). Por lo tanto, para definir el desarrollo de HC, se determinaron los efectos de las dietas sobre estos parámetros tanto en ratas Wistar como en SHR. Nuestros resultados muestran que el valor de este cociente es mayor en las ratas SHR comparado con las ratas Wistar, lo que sugiere que la HC ya se encuentra presente en estas ratas, en ausencia de las dietas, y que es por lo tanto consecuencia de la HA *per se*.

En cuanto a los efectos de las dietas, se observó que en las ratas Wistar, a pesar del aumento en la PAD generado por todas las dietas, los valores del cociente no fueron mayores a su grupo control, y de hecho, en el caso de la dieta combinada, en la cual se observó un incremento tanto de la PAD como de la PAS, se encontró que el valor del cociente fue significativamente menor. A pesar de esto, al evaluar la expresión de ANP y la activación de CaMKII a través de su

nivel de oxidación, observamos que estos se encuentran elevados en todas las dietas, y de hecho que el aumento en ambos parámetros fue mayor en el grupo de la dieta combinada. Zhang *et al.* (2016) reportaron que el tratamiento de los cardiomiocitos de ratas con palmitato (300  $\mu$ M), simulando condiciones de OB, lleva a un aumento de su tamaño, lo que indica el desarrollo de hipertrofia. Sin embargo, también se observó que este tratamiento induce apoptosis, comprobado por la expresión de los marcadores de apoptosis (Caspasas 3 y 9, Citocromo C, Bax y Bcl2). Los efectos del palmitato en la HC y la apoptosis fueron revertidos por la inhibición de CaMKII, lo que sugiere la participación de esta enzima en ambos procesos. Los mismos resultados se obtuvieron utilizando ratones C57BL/6. Considerando lo anterior, es probable que la ausencia de un aumento en el cociente, a pesar del aumento en la expresión de ANP y la activación de CaMKII, se deban a que el proceso de HC ya se inició a nivel molecular pero aún no se refleja en una ganancia de peso del corazón, o a que, como podría explicarse con la dieta combinada, no ocurra un aumento en el peso del corazón por la activación de un proceso de apoptosis. Nuestros estudios no nos permiten llegar a una conclusión al respecto y es claro que se tienen que hacer otros estudios para comprobar esta hipótesis.

En el caso de las ratas SHR, se tiene establecido el desarrollo de HC a partir de los 3 meses de edad (Rivera *et al.* 2013), por lo tanto, nuestros resultados en cuanto al valor del cociente, la expresión de ANP y la activación de CaMKII son los esperados. No obstante, nuestros datos muestran que, si bien la dieta con sacarosa o fructuosa incrementaron la expresión de ANP y la oxidación de CaMKII, esto no se reflejó en un cociente de mayor valor comparado con su grupo control. Por el contrario, la dieta combinada indujo un incremento mayor de ANP comparado con las otras dietas, y esto se acompañó también de un incremento mayor del cociente. En conjunto estos datos muestran la predisposición genética que tienen las ratas SHR en comparación con las Wistar a desarrollar HC.

La CaMKII es una proteína que de manera fisiológica tiene funciones esenciales para la salud, su activación implica que participe en diferentes vías de señalización, pero, cuando esta cinasa permanece activa de forma crónica puede causar daños patológicos (Erickson, 2014). Su oxidación como una activación independiente del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM está implicada en el desarrollo de HC como lo menciona Erickson *et al.* (2011). Esta sobre activación que podemos ver en nuestros resultados correlaciona fuertemente con nuestros resultados de los marcadores de estrés oxidativo, de esta manera, los grupos que tuvieron mayor estrés oxidativo tuvieron mayor expresión de la ox-CaMKII siendo la dieta combinada de la cepa Wistar quien tuvo mayor expresión respecto a las dietas por separado y al grupo control, mientras que para la cepa SHR no hubo diferencia entre las diferentes dietas pero si fueron diferentes significativamente con el control, situación que correlaciona con que hayan tenido mayor tejido adiposo y mayor cantidad de ERO. Anderson *et al.* 2011 Erickson *et al.* 2011 y 2015; Mattiazzi *et al.* 2015; Ji *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016; Federico *et al.* 2017 y Zhong *et al.* 2017 han establecido y comprobado que CaMKII induce HC por la activación de genes fetales, de esta manera nuestros resultados de la expresión de ox-CaMKII apoyan los resultados del ANP, comprobando la activación del programa genético de hipertrofia en respuesta a las diferentes dietas. Cabe mencionar que también medimos la cantidad de CaMKII total para conocer si las dietas modificaban su expresión, pero nuestros resultados al igual que los de Zhong *et al.* (2017) no mostraron cambios en su expresión, por lo que el aumento en su actividad se relaciona directamente con un aumento en su oxidación.

Por último, para comprobar de manera directa la HC, realizamos cortes transversales de los corazones, teñidos con Hematoxilina-Eosina. Los resultados nos confirmaron el desarrollo de HC a través del espesor de la pared del VI, así como el tipo de ésta de acuerdo a la relación E/R, que además también concuerda con la morfología característica de cada tipo de HC. Además, a pesar de la desnutrición del grupo sacarosa y el bajo peso de las ratas de la dieta combinada de la cepa Wistar, el consumo en exceso de estos carbohidratos

permitió el desarrollo de HC. Para el caso particular de la fructosa, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zhang *et al* (2016). Sin embargo, para el caso de la cepa SHR confirmamos el desarrollo de HC, aunque la dieta con sacarosa no presentó diferencia significativa respecto al grupo control, la dieta de fructosa y combinada aumentaron el grosor de la pared del VI, lo que nos indica que, a pesar del daño producido por la predisposición de la cepa, se puede agravar a un más la HC con este tipo de dietas e incluso llevar a un estado más crítico de cardiomiopatías como la IC.

En situaciones donde la HC no fue diagnosticada a tiempo, el remodelamiento del corazón se agrava generando una HC descompensada e IC (Keat *et al.* 2015). Este remodelamiento se caracteriza por una dilatación de uno o ambos ventrículos, disfunción cardíaca, apoptosis, cambios electrofisiológicos, fibrosis en exceso, angiogénesis inadecuada, entre otras. Esto, relacionado con un incremento de la expresión y activación de proteínas como CaMKII $\delta$ , PKC $\alpha$  y  $\beta$ , así como de miRNAs fetales y otras vías de señalización implicadas en este remodelamiento (Ather *et al.* 2013). Por otro lado, el exceso de ERO se han atribuido al desarrollo de HC y su evolución a IC tanto en modelos animales como en humanos. Estudios experimentales han demostrado que una vez que se desarrolla HC, el corazón de forma compensatoria libera Ang II, ET-1 y algunas catecolaminas y citocinas que causan el incremento de ERO en los cardiomiocitos (Liu *et al.* 2004; Laskowski *et al.* 2006). Lo anterior además de atribuir a la oxidación de la CaMKII $\delta$ , puede activar otras vías de señalización de HC como la de ERK1/2 y del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Takimoto & Kass 2007). Por lo tanto, las ERO favorecidas por la OB más las producidas por los cardiomiocitos en estados de HC, favorecen un desarrollo más prematuro de IC.

Por otro lado, en situaciones cuando existe un remodelamiento cardíaco que se ve reflejado en la dilatación de uno o ambos ventrículos y acompañado de una disfunción del ventrículo izquierdo, a causa de la HC, esta se denomina

miocardiopatía dilatada (MCD) (Gómez-Barrero, 2012). Esta dilatación ventricular que se observó en los corazones que recibieron dieta combinada en la cepa SHR, es la característica principal de MCD y probablemente de una IC. Esta dilatación causa que el corazón pase a ser insuficiente e incapaz bombear la suficiente sangre a todo el cuerpo, situación que es irreversible y puede llevar a muerte súbita (MS), por taquicardia ventricular (TV) y/o fibrilación ventricular (FV) (Valero, 2007).

En resumen, los resultados muestran que el consumo excesivo de carbohidratos, como sacarosa y fructosa, inducen una acumulación excesiva tejido adiposo, HA, estrés oxidante, HC, RI e hiperglucemia, y que su combinación, tiene efectos mayores. Por otro lado, a pesar de que el incremento de peso no fue significativo e incluso estuvo por debajo del peso normal, nuestros resultados comprueban la hipótesis de los falsos delgados u obesos normopeso, donde el peso corporal no es un indicador de la OB clásica, pero que presentan todas las complicaciones a la salud asociadas a la acumulación de tejido adiposo.

## **VIII. Conclusión**

Este trabajo es el primero en comparar y demostrar de manera experimental, algunos de los daños que pueden generar el consumo excesivo de diferentes dietas de carbohidratos en dos tipos de cepas a partir de su destete. Las dietas de sacarosa 30% y fructosa 10%, y en especial la combinación de éstas, produjo alteraciones significativas en la mayoría de los parámetros (como el perfil bioquímico, PA, estrés oxidante y la oxidación de la CaMKII $\delta$ ) respecto a las dietas individuales. El consumo excesivo de estos azúcares desde edades tempranas durante 5 meses, causó, además de la HC, una malnutrición, disminución del peso corporal, exceso de tejido adiposo (obesidad), aumento de la PA, RI y DM2 asociados con problemas metabólicos y cardiovasculares como síndrome metabólico.

## **XIX. Perspectivas**

- 1) Investigar otros posibles mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de HC relacionados con OB o en combinación con la HA.
- 2) Profundizar en las alteraciones cardiovasculares a causa de la HC no controlada.
- 3) Realizar un estudio con una dieta rica en antioxidantes exógenos para determinar si es posible evitar el desarrollo de HC por la ox-CaMKII.

## X. Bibliografía

- Alpert. (2006). Effect of Obesity on Cardiovascular Hemodynamics Cardiac Morphology and Ventricular Fuction. *Curr Obes Rep* 5:424-434.
- American College of Cardiology (ACC). (2017). Página web: <https://www.acc.org>
- American Heart Association (AHA). (2017). Página web: <https://www.heart.org>
- Anderson. M. (2011). CAMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 51 (4): 468-473.
- Ather S, Respress JL, Li N; Wehrens XHT (2013). Alterations in ryanodine receptors and related proteins in heart failure. *Biochim Biophys Acta (BBA) Mol Basis Dis* 12:2425–2431.
- Beatriz M. (2012). Hipertrofia cardiaca patológica: Estudio experimental de su modificación con el ejercicio de señalización intracelular involucrados. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP.
- Beatriz M. (2012). Hipertrofia cardiaca patológica: Estudio Experimental de su modificación con el ejercicio, vías de señalización intracelular involucradas. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, Silvestri F, Leri A, Beltrami CA, Anversa P. (2001). Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*; 344(23):1750-1757.
- Benito M (2014) Patologías asociadas a la obesidad. Síndrome metabólico y diabetes melitus tipo 2. En Primer curso Avanzado sobre Obesidad (eds M Cascales, F Sánchez Muniz y B Ribas). Monografía XXXVIII de la RANF. Madrid. pp 128 – 148
- Boden G, Shulman GI. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*; 32:14-23. 20.

- Brady. T. (2016). The Role of Obesity in the Development of Left Ventricular Hypertrophy Among Children and Adolescents. *Curr Hypertens Rep.* 18(1) :3.
- Brower GL. Gardner JD. Forman MF. Murray DB. Voloshenyuk T. Levick SP (2006). The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardithorac Sur*; 30: 604-610.
- Brown JE. (2014). *Nutrición en las diferentes etapas de la vida.* 5ta edición. Edit. McGrawHill. México. pp 608.
- Carreño J.E.; F. Apoblaza. M. Ocaranza. J. Jorge. (2006). Hipertrofia Cardíaca: eventos moleculares y celulares. *Revista Española de Cardiología*; 59(5):473-86.
- Castrejón, Vicente & Carbó, Roxana & Martínez, Martín. (2007). Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Gac Med Mex*; 152:547-57.
- Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van-Bilsen M, O'Brien TX, Evans SM. (1993) Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annual review of physiology* 1993; 55:77-95.
- Chien KR. Knowlton KU. Zhu H. & Chien S. (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*; 5:3037-3046.
- Coen PM, Dubé JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Ferrell RE, Toledo FG, Goodpaster BH. (2010). Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. *Diabetes*; 59:80-88.
- Colado-Velázquez J III, Mailloux-Salinas P, Medina-Contreras J, Cruz-Robles D, Bravo G. (2015) Effect of *Serenoa Repens* on Oxidative Stress, Inflammatory and Growth Factors in Obese Wistar Rats with Benign Prostatic Hyperplasia. *Phytother Res*; 29(10):1525-31
- Committee on the care and use of Spontaneously hypertensive rats (SHR): Guidelines for Breeding, Care and Use. *ILAR News* 1976; XIX:G3-G18.
- Condorelli C, Morisco C, Stassi G, Notte A, Farias F. Sgaramella G. de Rienzo A. Roncarati R. Trimarco B, Lembo G. (1999). Increased cardiomyocyte

apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat. *Circulation*; 99: 3071-7874.

- Cossio-Bolaños M; R Gómez; R Vargas, R Hochmuller; M de Arruda. (2013). Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas macho Wistar. *Nutr Hosp*; 28(6):2151-2156.
- Crowley DI, Khoury PR, Urbina EM, Ippisch HM, Kimball TR. (2011) Cardiovascular impact of the pediatric obesity epidemic: higher left ventricular mass is related to higher body mass index. *J Pediatr*; 158:709–14.
- De Luca C y Olefsky JM (2009) Inflammation and insulin resistance. *FEBS* 582, 97- 105.
- Dorado C. Concepción R, Selva R. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev. Fac. Med. UNAM*; 46 (6): 229-233.
- Dorn II GW & Force T. 2005. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*; 115:527-37.
- Dvorkin. M. Best & Taylor. (2010) Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. 14va edición. Edit, Médica Panamericana. Argentina.
- Encuesta Nacional de Salud (ENSANUT) de la Secretaría de Salud. Publicada el 31 de octubre del 2016.
- Erickson J. (2011). CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev*. 91:889-915.
- Erickson JR, Joiner ML, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AJ, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. (2008) A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*; 133:462–474.
- Erickson, J. R. (2014). Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 59.
- Fenster C, Weinsier R, Darley-Usmar V, Patel RP. Obesity, aerobic exercise and vascular disease: the role of oxidant stress. *Obes Res* 2002; 10: 964-968.

- Fernandez-Veledo,S, Nieto-Vazquez,I, Vila-Bedmar,R, Garcia-Guerra,L, AlonsoChamorro,M, Lorenzo,M (2009) Molecular mechanisms involved in obesityassociated insulin resistance: therapeutical approach. Arch Physiol Biochem 115, 227-239.
- Frazier CRM, Mason P, Zhuang X, Beeler JA. (2008). Sucrose Exposure in Early Life Alters Adult Motivation and Weight Gain. PLoS ONE 3 (9): e3221.
- Fried SK, Lee MJ, Karastergiou K. (2015). Shaping fat distribution: New insights into the molecular determinants of depot- and sex-dependent adipose biology. Obesity (Silver Spring); 23:1345-1352.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwai M, Yamada Y, Nakajima Y. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest; 114:1752-61.
- García Cuartero, B & García Lacalle, C & Jiménez Lobo, C & González Vergaz, A & Calvo, Cristina & J. Alcázar Villar, M & Díaz Martínez, E. (2007). Índice HOMA y QUICKI, insulina y péptido C en niños sanos. Puntos de corte de riesgo cardiovascular. Anales de Pediatría. 66. 10.1157/13102513.
- George A. Bray, Samara Joy Nielsen, Barry M. Popkin (2004) Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. Am J Clin Nutr; 79(4): 537–54
- Gómez-Navarro, C., & Bonilla, A., & Benítez, J. (2012). ¿Cómo estratificamos el riesgo en las miocardiopatías? Miocardiopatía dilatada e hipertrófica como paradigmas. Cardiacore, 47 (1), 8-11.
- Gutiérrez Delgado, C. y V. Guajardo Barón (2008): Impacto financiero de la obesidad en la salud de la población Mexicana. Versión preliminar al 30 de septiembre del 2008
- Gutiérrez-Rodelo C, Roura-Guiberna A, Olivares-Reyes JA. (2017). Mecanismos Moleculares de la Resistencia a la Insulina: Una Actualización. Gac Med Mex; 153:214-28
- Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. (1998). Increased left ventricular mass and hypertrophy are associated with increased risk for sudden death. Journal of the American College of Cardiology; 32(5):1454-1459.

- Higdon J, Frei B. (2003) Obesity and oxidative stress. A direct link to CVD? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23: 365-367.
- Ho YL, Wu CC, Lin LC, Huang CH, Chen WJ, Chen MF, Liau CS, Lee YT. (1998). Assessment of the coronary artery disease and systolic dysfunction in hypertensive patients with the dobutamine-atropine stress echocardiography: effect of the left ventricular hypertrophy. *Cardiology*; 89(1):52-58.
- Hock J, Gendall P (2006). Advertising and obesity: a behavioral perspective. *Journal Health Commun* 11:409-423.
- Iacobellis G, Corradi D, Sharma AM. (2005). Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*; 2:536–43.
- Instituto Nacional De Salud Pública (INSP). 2014. Página Web: <https://www.insp.mx/>
- Jean N, Somers VK, Sochor O, Medina-Inojosa J, Llano EM, Lopez-Jimenez F. (2014). Normal-Weight Obesity: Implications for Cardiovascular Health. *Curr Atheroscler Rep*; 16:464
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*; 444:840-846.
- Karpe F, Pinnick KE. (2015) Biology of upper-body and lower body adipose tissue-link to whole-body phenotypes. *NatRev Endocrinol*;11:90-100.
- Keat Y.K; Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. (2015). Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch. Toxicol.* 89:1401-1438.
- Kehat, I. Jennifer Davis, Malte Tiburcy, Federica Accornero, Marc K. Saba-Ei-Leil, Marjorie Maillat, Allen J. York, John N. Lorenz, Wolfram H. Zimmermann, Sylvain Meloche, and Jeffery D. Molkentin (2012). ERK ½ regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ. Res*; 108(2):176-183.
- Kersten S. Physiological regulation of lipoprotein lipase. (2014) *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*; 1841:919-933.
- KRINKE GEORGE; (2000) *The Laboratory Rat; The Handbook of Experimental Animals*; Academic Press; 352.

- Kumar. S. (2012). Oxidative Stress and Cardiac Hypertrophy: A Review. *Toxicology Mechanism and Methods*. 22 (5): 359-366.
- Kuret J, Schulmn H. (1985). Mechanims of autophosphoryltion of the multifactorial Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*; 260: 6427-33.
- Lafontan M. (2014) Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab*; 40:16-28.
- Laskowski A, Woodman OL, Cao AH et al (2006) Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*; 72(1):112–123
- Le MT, et al. (2012) Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and haemodynamic responses in healthy subjects. *Metabolims*. 61:641-651.
- Lehninger, Albert L. (2009) *Principios de bioquímica*. 5ta. ed. Barcelona (ES): Omega.
- Liu JC, Chan P, Chen JJ et al (2004) The inhibitory effect of trilinolein on norepinephrine-induced beta-myosin heavy chain promoter activity, reactive oxygen species generation, and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Biomed Sci* 11(1):11–18.
- López de Fez C.M, M.T. Gaztelu, T. Rubio, A. Castaño (2009). Mechamims of hypetension in obesity. *Rev An Sanit Navar*; 27(2):211-219.
- López. C.M. (2004). Mecanismos de hipertensión en obesidad. *An. Sist. Sanit. Navar*. 27 (2): 211-219.
- Louis WJ & Howes LG. (1990). Genealogy of the Spontaneously Hypertension and Wistar Kyoto Rat Strain: Implications for studies of inherited hypertension. *Journal of Cardiovascular. Pharmacology*; 16(7): S2-S3.
- Lu M, Wan M, Leavens KF, Chu Q, Monks BR, Fernandez S, Birnbaum MJ. (2012) Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat Med*; 18:388-395.

- Luengo Pérez, L., & Beato Víbora, P. (2010). Obesidad y sus complicaciones: resistencia insulínica y diabete mellitus tipo 2. *Nutrición Hospitalaria*, 3 (1), 51-61.
- Malik VS, Schulze MB, Hu FB. (2006). Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *Am J Clin Nutr*; 84:274-88.
- Marques-Vidal P, Poud A, Hayoz D, Paccaud F, Mooser V, Waeber G, et al. (2010). Normal weight obesity: relationship with lipids, glycaemic status, liver enzymes and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*;20:669–75.
- Martínez Abundis, Eduardo, Sánchez Rodríguez, Martha A., El Hafidi Bentlakder, Mohammed. (2005) Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica*; 30:82-89.
- Martínez Rosas, Martín. (2006). Remodelación cardíaca e inflamación. *Archivos de cardiología de México*, 76(Supl. 4), 58-66
- Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, Bosch J, Sussex B, Probstfield J, Yusuf S. (2001) Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation*; 104(14):1615-1621.
- Mattiazzi A. (1997) Positive inotropic effect of angiotensin II. Increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> or changes in myofilament Ca<sup>2+</sup> responsiveness? *Journal of pharmacological and toxicological methods*; 37(4):205-214.
- McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. (2002) Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet*; 359:46-47. 17.
- Mohan. A. et. al. (2012). CaMKII inhibition in vascular smooth muscle improves angiotensin II–hypertension. *The FASEB Journal* vol. 26 no. 1 Supplement Ib599.
- Murdolo G, Angeli F, Reboldi G, Di Giacomo L, Aita A, Bartolini C. (2015) Left ventricular hypertrophy and obesity: only a matter of fat? *High Blood Press Cardiovasc Prev*; 22:29–41.
- Murdolo G, Angeli F, Reboldi G, Di Giacomo L, Aita A, Bartolini C. (2015) Left ventricular hypertrophy and obesity: only a matter of fat? *High Blood Press Cardiovasc Prev*; 22:29–41.

- Needleman P, Blaine EH, Greenwald JE, Michener ML, Saper CB, Stockmann PT, Tolunay HE. (1989) The biochemical pharmacology of atrial peptides. *Annual review of pharmacology and toxicology*; 29:23-54.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015, 2016 y 2017. Página web: <http://www.who.int>
- Ouwens, D.M., Boer, C., Fodor, M. (2005) Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats *Diabetologia*. 48: 1229
- Piskorz D. (2004) ¿Por qué se hipertrofia el ventrículo izquierdo en la hipertensión arterial? Argentina. Bioingeniería UNER ©1994-2004 CETIFAC.
- Poitout V. Robertson RP. Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008;29:351- 366.
- Powell LM, Szczypka G, Chaloupka FJ, Braunschweig GL. (2007). Television food content and television food advertisements seen by children and adolescents in the United States. *Pediatrics*. 120:576-583.
- Rippe JM, Theodore A. (2013) Sucrose, High-Fructose Corn Syrup, and Fructose, Their Metabolism and Potential Health Effects: What Do WE Really Know?. *American Society for Nutrition. Adv. Nutr.* 4:236-245.
- Rivera C; R. Hernandez; Haidé M. (2013). Manejo reproductivo de las colonias de Rata Espontáneamente Hipertensa (SHR) y su control Normotenso Wistar Kyoto (WKY) en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. *REDVET - Revista electrónica de Veterinaria*. Volumen 14 N° 11B.
- Rodríguez E. (2007). Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta Bioethica*. 13(1).
- Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. (2010). Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res*; 61(4):269-280.
- Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, Korenfeld Y, Boarin S, Korinek J, et al. (2010). Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. *Eur Heart J*; 31:737–46.

- Sadoshima J. & Izumo S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*; 59: 551-171.
- Salcedo-Rocha, A., & García de Alba, J., & Contreras-Marmolejo, M. (2010). Presión arterial en adolescentes mexicanos: clasificación, factores de riesgo e importancia. *Revista de Salud Pública*, 12 (4), 612-622.
- Saltiel AR, Kahn CR. (2011) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*; 414:799-806.
- Sanders PN, Koval OM, Jaffer OA, Prasad AM, Businga TR, Scott JA. (2013). CaMKII is essential for the proasthmatic effects of oxidation. *Sci Transl Med*; 5:195-97.
- Sanders WR. (1999) Apoptosis and heart failure. *N Engl J Med*; 341: 759-760.
- Santamaria R. & Gorostodi. (2015). Hipertensión arterial secundaria y como se debe investigarse. *Rev Nefro Plus*; 7(1):11-21.
- Schwartz JC, Gros C, Lecomte JM, Bralet J. (1990) Enkephalinase (EC 3.4.24.11) inhibitors: protection of endogenous ANF against inactivation and potential therapeutic applications. *Life sciences*; 47(15):1279-1297.
- Secretaría de Salud. (SSA). 2015 y 2017. Página web: <https://www.gob.mx/salud/>
- Sullivan, J. S., Le, M. T., Pan, Z., Ricard, C., Love-Osborne, K., Robbins, K., Sundaram, S. S. (2015). Oral Fructose Absorption in Obese Children with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Pediatric Obesity*, 10(3), 188–195.
- Swynghedauw B. (1989). Remodelling of the heart in response to chronic mechanical overload. *Eur Heart J*; 10: 935-943.
- Takimoto E, Champion HC, Li M et al (2005) Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 11(2):214–222.
- Fondo de las Naciones Unidas para la infancia (UNICEF). Salud y nutrición en México (2017). Página web consultada en 07 de feb del 2018. [https://www.unicef.org/mexico/spanish/17047\\_17494.html](https://www.unicef.org/mexico/spanish/17047_17494.html)
- Unger RH. (2003) Lipid overload and overÀow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab*; 14:398–403.

- Valdecantos MP; P Pérez; JA Martínez. (2009). Obesidad y estrés oxidante: papel de la suplementación con antioxidantes de la dieta. *Revista de Investigación Clínica*; 61 (2):127-139.
- Valero, E., & Pesce, R. (2007). Riesgo de muerte y miocardiopatía dilatada. *Insuficiencia Cardíaca*, 2 (4), 153-158.
- Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH, Bers DM. (2006) Local InsP3-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *The Journal of clinical investigation*; 125 116(3):675-682.
- Zhang, Y.-B., Meng, Y.-H., Chang, S., Zhang, R.-Y., & Shi, C. (2016). High fructose causes cardiac hypertrophy via mitochondrial signaling pathway. *American Journal of Translational Research*, 8(11), 4869–4880.
- Zhong. P. (2017). Role of CaMKII in free fatty acid/hyperlipidemia-induced cardiac remodeling both in vitro and in vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 109 (2017) 1–16.