



Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

Departamento de Farmacobiología

“Estudio del sistema cistationina gama liasa/sulfuro de
hidrógeno sobre la disfunción vascular inducida por
resistencia a la insulina en la aorta torácica de ratas Wistar
macho”

Tesis que presenta

Q.F.B. Diana Laura Silva Velasco

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de tesis:

Dr. David Centurión Pacheco

Dr. Enrique Hong Chong



El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco y del Dr. Enrique Hong Chong en el laboratorio 6 y en el laboratorio 1 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca No. 489752.

Asimismo, se contó con el apoyo de los donativos CB-2015-252702 y CB-2015.

Dedicatorias

A DIOS

Por darme salud y permitirme concluir con esta meta.

A MIS PADRES

Esther Velasco Botello y Roberto Silva Martínez
Por todo el apoyo que me han brindado para poder completar mis metas, por estar conmigo siempre que los necesito a pesar de la distancia, por aconsejarme y enseñarme a ser una mejor persona. Los amo.

A MIS HERMANOS

Roberto Carlos Silva Velasco, muchas gracias por escucharme, aconsejarme, por ser además de mi hermano un amigo para mí e impulsarme a realizar nuevas cosas. A mi hermana Yazmín Galilea Silva Velasco, muchas gracias por comprenderme, por tus palabras de aliento y hacer que cada día quiera ser mejor para poder ser tu ejemplo. A ambos los amo y saben que siempre estaré para ustedes.

A MIS TÍAS

Celia Pérez Martínez y María de Jesús Silva Martínez
Por ser parte importante de mi formación académica y por apoyarme.

Agradecimientos

Al Dr. David Centurión por haberme recibido en su laboratorio, apoyarme, brindarme sus conocimientos para desarrollar este trabajo, por confiar en mí y por contarme sus experiencias las cuales me han servido en el transcurso de la maestría.

Al Dr. Enrique Hong por haber aceptado que trabajara en su laboratorio, por impulsarme a confiar en mí, por aconsejarme sobre el proyecto y corregirme para que este fuera mejor.

A mis sinodales el Dr. Francisco Javier López Muñoz y el Dr. Eduardo Ramírez San Juan por el tiempo empleado, así como sus comentarios los cuales fueron un gran apoyo para el mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. Araceli Sánchez López por haberme apoyado desde el inicio en el desarrollo de este trabajo, por sus consejos tanto académicos como personales los cuales han sido acertados y por hacer que todos convivamos en el laboratorio.

A mis amigos del laboratorio 6, Hernán Beltrán, por ser la persona que ha estado desde el inicio del proyecto, por escucharme cuando estaba estresada y por esos momentos que hemos compartido juntos los cuales no terminaría de describir, pero en donde las risas nunca faltaron. Saúl Huerta, por brindarme tu amistad desde que ingrese al laboratorio, por hacerme correcciones de mi trabajo y contribuir en mejorarlo, pero sobre todo por ser un amigo en el quien se puede confiar. Grecia Terol, por convivir conmigo incluso los fines de semana, por compartir juntas gustos en distintas cosas y porque en poco tiempo te has convertido en una gran amiga. Carolina Gomez, por contribuir con tus comentarios a mi trabajo, por las tardes de pláticas y risas en el laboratorio. Adrián Arellano, por ayudarme en los problemas técnicos que siempre tengo y darme ánimos. Francisco Álvarez por alegrar los momentos de trabajo.

A mis amigos “los de siempre” (Daniel, Eduardo, Saúl, Grecia y Erick) que han estado para escucharme pero sobre todo para hacer de esta etapa algo más divertido.

A la generación de maestría en especial a Alejandro, Frida, Daniel, Nancy, Iker, Hernán, Eduardo, Cristina, Crhistopher, por sus comentarios y por soportarme cuando era parte de sus equipos de trabajo. Además, agradezco a Adriana por apoyarme, ser buena amiga y por no dejarme sin comer. A Miriam Gutiérrez por enseñarme la técnica que emplee para el desarrollo de este trabajo y por tu amistad, de igual forma agradezco al laboratorio 1 por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, al personal del bioterio del Cinvestav-Sede sur, por el apoyo durante la realización del trabajo.

A mis amigos Yael, Barbarita, Flor y Nico que a pesar de la distancia siempre han estado para aconsejarme y apoyarme.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|--------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VIII |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | IX |
| ABREVIATURAS..... | X |
| RESUMEN..... | XII |
| ABSTRACT..... | XIII |
| 1. Introducción..... | - 1 - |
| 1.1 Sistema cardiovascular..... | - 1 - |
| 1.2 Componentes del Sistema Cardiovascular..... | - 2 - |
| 1.2.1 El corazón..... | - 2 - |
| 1.2.2 Los vasos sanguíneos..... | - 3 - |
| 1.3 Características y funciones de los vasos sanguíneos..... | - 3 - |
| 1.4 Capas de los vasos sanguíneos..... | - 5 - |
| 1.5 Tono vascular..... | - 6 - |
| 1.6 Disfunción vascular..... | - 6 - |
| 1.7 Resistencia a la insulina..... | - 8 - |
| 1.7.2 Disfunción vascular debido a resistencia a la insulina..... | - 10 - |
| 1.8 Enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina..... | - 11 - |
| 1.8.2 Síndrome metabólico..... | - 11 - |
| 1.8.3 Diabetes Mellitus tipo 2..... | - 12 - |
| 1.8.4 Obesidad..... | - 13 - |
| 2. ANTECEDENTES..... | - 15 - |
| 2.1 Sulfuro de hidrógeno (H_2S)..... | - 15 - |
| 2.1.1 Historia del H_2S | - 15 - |
| 2.1.2 Biosíntesis del H_2S | - 16 - |
| 2.1.3 Metabolismo del H_2S | - 18 - |
| 2.2 Efectos fisiológicos del H_2S y sus donadores..... | - 19 - |
| 2.2.1 Sistema cardiovascular..... | - 19 - |
| 2.2.2 Sistema Nervioso Central..... | - 20 - |
| 2.2.3 Páncreas..... | - 21 - |
| 2.2.4 Inflamación..... | - 21 - |

| | | |
|------|--|--------|
| 2.3 | Donadores de H ₂ S..... | - 21 - |
| 2.4 | Efectos de H ₂ S y secreción de insulina..... | - 21 - |
| 2.5 | Efectos duales del H ₂ S sobre la resistencia a la insulina | - 23 - |
| 2.6 | Modelo de órgano aislado..... | - 24 - |
| 3. | JUSTIFICACIÓN..... | - 26 - |
| 4. | HIPÓTESIS | - 27 - |
| 5. | OBJETIVOS | - 28 - |
| 5.1 | Objetivo general..... | - 28 - |
| 5.2 | Objetivos específicos..... | - 28 - |
| 6.3. | <i>Evaluación de las características metabólicas y hemodinámicas</i> | - 29 - |
| 6.4 | <i>Medición de la presión arterial y frecuencia cardiaca.....</i> | - 30 - |
| 6.5 | <i>Prueba de tolerancia a la glucosa oral.....</i> | - 31 - |
| 6.6 | <i>Modelo de órgano aislado.....</i> | - 31 - |
| 6.7 | <i>Evaluación de respuestas contráctiles y relajantes en la aorta torácica</i> | - 32 - |
| 6.8 | <i>Análisis estadístico.....</i> | - 33 - |
| 6.9 | <i>Compuestos utilizados</i> | - 34 - |
| 7 | RESULTADOS | - 35 - |
| 7.1 | Efecto del tratamiento crónico con fructosa 15% en la prueba de tolerancia a la glucosa oral y sobre las variables metabólicas..... | - 35 - |
| 7.2 | Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre la prueba de tolerancia a la glucosa oral y sobre las variables metabólicas..... | - 36 - |
| 7.3 | Efecto de la resistencia sobre las variables hemodinámicas..... | - 38 - |
| 7.4 | Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las variables hemodinámicas en animales con resistencia a la insulina..... | - 39 - |
| 7.5 | Efecto de la resistencia a la insulina y los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes en la aorta torácica | - 40 - |
| 7.6 | Efecto de la resistencia a la insulina y los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas contráctiles en la aorta torácica..... | - 42 - |
| 7.7 | pEC ₅₀ y E _{máx} de los tratamientos farmacológicos en ratas Wistar macho con resistencia a la insulina | - 43 - |
| 8 | RESUMEN DE RESULTADOS..... | - 44 - |
| 9 | DISCUSIÓN..... | - 46 - |
| 9.1 | Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las variables metabólicas . | - 46 - |
| 9.2 | Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las variables hemodinámicas .. | - 48 - |

| | | |
|-----|---|--------|
| 9.3 | Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes y contráctiles en aorta torácica..... | - 50 - |
| 10 | CONCLUSIONES | - 53 - |
| 11 | PERSPECTIVAS..... | - 54 - |
| 12 | REFERENCIAS..... | - 55 - |
| 13. | ANEXOS..... | - 70 - |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. TIPOS DE VASOS SANGUÍNEOS..... | 3 |
| FIGURA 2. CAPAS DE VASOS SANGUÍNEOS..... | 5 |
| FIGURA 3. RESPUESTAS RELAJANTES DEL ENDOTELIO..... | 8 |
| FIGURA 4. BIOSÍNTESIS DEL H ₂ S..... | 17 |
| FIGURA 5. METABOLISMO DEL H ₂ S..... | 19 |
| FIGURA 6. PARTICIPACIÓN DEL H ₂ S SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA..... | 22 |
| FIGURA 7. DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 30 |
| FIGURA 8. CURSO TEMPORAL..... | 31 |
| FIGURA 9. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN VASCULAR..... | 33 |
| FIGURA 10. ÁREAS BAJO LA CURVA DE LOS VALORES DE GLUCOSA E INSULINA..... | 35 |
| FIGURA 11. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL VEHÍCULO (PBS; 1 mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-CYS (300 mg/kg) Y DL-PPG (10 mg/kg) DURANTE 4 SEMANAS SOBRE LAS ÁREAS BAJO LA CURVA DE LOS VALORES DE GLUCOSA E INSULINA..... | 37 |
| FIGURA 12. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE: (A) FRUCTOSA 15% DURANTE 20 SEMANAS, (B) VEHÍCULO (PBS, 1 mL/kg), (C) NaHS (5.6 mg/kg), (D) L-CYS (300 mg/kg) Y (E) DL-PPG (10 mg/kg) DURANTE 4 SEMANAS, SOBRE LAS RESPUESTAS RELAJANTES INDUCIDAS POR CARBACOL EN RATAS WISTAR MACHO..... | 41 |
| FIGURA 13. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE: (A) FRUCTOSA 15% DURANTE 20 SEMANAS, (B) VEHÍCULO (PBS, 1 mL/kg), (C) NAHS (5.6 mg/kg), (D) L-CYS (300 mg/kg) Y (E) DL-PPG (10 mg/kg) DURANTE 4 SEMANAS, SOBRE LAS RESPUESTAS CONTRÁCTILES INDUCIDAS POR NORADRENALINA EN RATAS WISTAR MACHO..... | 42 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. TAMAÑO Y FUNCIÓN DE LOS DIFERENTES VASOS SANGUÍNEOS EN LA CIRCULACIÓN SISTÉMICA. MODIFICADA DE (KLABUNDE, 2005)..... | 4 |
| TABLA 2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FRUCTOSA 15% DURANTE 16 SEMANAS EN RATAS WISTAR MACHO SOBRE LAS VARIABLES METABÓLICAS | 36 |
| TABLA 3. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL VEHÍCULO (PBS; 1 mL/kg), NAHS (5.6 mg/kg), L-CYS (300 mg/kg) Y DL-PPG (10 mg/kg) DURANTE 4 SEMANAS SOBRE LAS VARIABLES METABÓLICAS..... | 38 |
| TABLA 4. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE FRUCTOSA 15% DURANTE 16 Y 20 SEMANAS EN RATAS WISTAR MACHO SOBRE LAS VARIABLES HEMODINÁMICAS | 38 |
| TABLA 5. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL VEHÍCULO (PBS; 1 mL/kg), NAHS (5.6 mg/kg), L-CYS (300 mg/kg) Y DL-PPG (10 mg/kg) DURANTE 4 SEMANAS SOBRE LAS VARIABLES HEMODINÁMICAS..... | 39 |
| TABLA 6. LOGARITMO NEGATIVO DE LA CONCENTRACIÓN EFECTIVA 50 Y EFECTO MÁXIMO DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS SOBRE LAS RESPUESTAS RELAJANTES Y CONTRÁCTILES..... | 44 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------------------|---|
| 3-MST | 3- mercaptopiruvato sulfurotransferasa |
| ABC | Área bajo la curva |
| AC | Adenilato ciclasa |
| Ach | Acetilcolina |
| ADP | 5'-difosfato de adenosina |
| ADRF | Factor relajante derivado de adipocito |
| AKT | Proteína cinasa B |
| AMPK | Proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina |
| Ang II | Angiotensina II tisular |
| APPL1 | Adiponectina |
| ATP | 5'-trifosfato de adenosina |
| CAT | Cisteína aminotransferasa |
| CBS | Cistationina beta sintetasa |
| CCh | Carbacol |
| cGMP | Monofosfato de guanosina cíclico |
| CO | Monóxido de Carbono |
| CSE | Cistationina gamma liasa |
| CYP 450 | Citocromo P450 |
| DAO | D-aminoácido oxidasa |
| DL-PPG/DL-PAG | DL- propargilglicina |
| DM2 | Diabetes Mellitus tipo 2 |
| ECA | Enzima convertidora de angiotensina |
| EDCF | Factor contráctil derivado del endotelio |
| EDHF | Factor hiperpolarizante derivado del endotelio |
| EDRF | Factor relajante derivado del endotelio |
| EET | Ácidos epoxieicosatrienoicos |
| $E_{máx}$ | Efecto máximo |
| eNOS | Sintasa del óxido nítrico |
| ET | Endotelina |
| FC | Frecuencia cardíaca |
| FE | Fenilefrina |
| FGFb | Factor básico de crecimiento de fibroblastos |
| GCs | Guanilato ciclasa soluble |
| GLUT4 | Transportador de glucosa 4 |
| GMP _c | Monofosfato cíclico de guanosina |
| GPA | Glucosa plasmática en ayuno |
| GRK ₂ | Receptor cinasa 2 acoplado a proteína G |
| GSNO | S-nitrosoglutatión |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| H₂S | Sulfuro de hidrógeno |
| H ₂ SO ₄ | Ácido Sulfúrico |
| HOMA | Evaluación de modelo homeostático |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IKCa | Canales de potasio de conductancia intermedia |
| IPA | Insulina plasmática en ayuno |
| IRS-1 | Sustrato de receptor de insulina tipo 1 |
| K ⁺ _{ATP} | Canales de potasio dependientes de ATP |

| | |
|-----------------------------|---|
| KCl | Cloruro de potasio |
| KCNQ | Canales de potasio tipo M |
| kg | Kilogramo |
| L-Cys | L-Cisteína |
| L-VDCC | Canales de calcio dependientes de voltaje |
| M | Molar |
| Mg | Miligramo |
| MLV | Músculo liso vascular |
| mmHg | Milímetros de mercurio |
| NA | Noradrenalina |
| Na ₂ S | Sulfuro de sodio |
| NaHS | Sulfhidrato de sodio |
| NO | Óxido nítrico |
| O ₂ ⁻ | Aniones superóxido |
| OGTT | Curva oral de tolerancia a la glucosa |
| OH | Hidroxilo |
| PAD | Presión arterial diastólica |
| PAI-1 | Inhibidor del activador del plasminógeno tisular tipo 1 |
| PAM | Presión arterial media |
| PAS | Presión arterial sistólica |
| PDE5 | Fosfodiesterasa 5 |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| pEC ₅₀ | Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 |
| PGH ₂ | Prostaglandina H ₂ |
| PGI ₂ | Prostaciclina |
| PKA | Proteína cinasa A |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PLP | Fosfato de piridoxal-5' |
| PTGO | Prueba de tolerancia a la glucosa oral |
| PVAT | Tejido adiposo perivascular |
| RI | Resistencia a la insulina |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| sHE | Hipóxido hidrolasa soluble |
| SKCa | Canales de potasio de pequeña conductancia |
| SO ₂ | Dióxido de azufre |
| SO ₃ | Trióxido de azufre |
| STZ | Estreptozotocina |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante |
| TLR4 | Receptores Toll tipo 4 |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| t-PA | Activador de plasminógeno tisular |
| TSM | S-metiltransferasa |
| TXA ₂ | Tromboxano A ₂ |
| VASP | Fosfoproteína estimulada por vasodilatación |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |
| VFG | Velocidad de filtración glomerular |
| VLDL | Lipoproteínas de baja densidad |
| \bar{x} GPC | Promedio de la concentración de glucosa plasmática |
| \bar{x} IPC | Promedio de la concentración de insulina plasmática |
| μM | Micromolar |

RESUMEN

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) es un gas incoloro, inflamable y soluble en agua, se caracteriza por su olor peculiar a huevo podrido. El H_2S es un gasotransmisor que se sintetiza a partir del aminoácido L-cisteína (L-Cys) por 3 diferentes vías enzimáticas las cuales son cistationina beta sintasa (CBS), cistationina gama liasa (CSE) y 3-mercaptopiruvato-sulfurotransferasa (3-MST) en conjunto con cisteína aminotransferasa (CAT). El objetivo de este estudio consistió en evaluar el efecto de la administración crónica de sulfhidrato de sodio (NaHS; donador inorgánico de H_2S), L-Cisteína (L-Cys; sustrato enzimático) y DL-propargilglicina (DL-PPG; inhibidor de CSE) sobre la función vascular en aortas de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% p/v. Para cumplirlo, los animales fueron divididos en dos grupos que recibieron durante 20 semanas: (1) agua (grupo control; n=6); (2) fructosa 15% p/v en el agua de beber (n=30). Este último grupo se dividió en 5 subgrupos (n=6 cada uno), los cuales recibieron diariamente durante 4 semanas por vía i.p.: (1) sin tratamiento; (2) vehículo (PBS 1 mL/kg); (3) NaHS (5.6 mg/kg); (4) L-Cys (300 mg/kg) and (5) DL-PPG (10 mg/kg). Después de 16 semanas fueron determinadas las variables metabólicas (tolerancia a la glucosa oral, concentraciones de insulina en plasma, índice HOMA y Matsuda) y las variables hemodinámicas (presión arterial y frecuencia cardíaca) mediante el método pletismográfico en el grupo control y el grupo que recibió fructosa 15% pero no tuvo tratamiento. La función vascular se determinó después de 20 semanas por experimentos *in vitro*. Observamos que la resistencia a la insulina inducida por la fructosa produce: (1) hiperinsulinemia; (2) aumento del índice HOMA; (3) disminución del índice Matsuda; (4) aumento de la presión arterial (sin afectar la frecuencia cardíaca); y (5) una disminución en las respuestas relajantes, sin afectar las respuestas contráctiles, en comparación con el grupo control. De manera interesante, después de 4 semanas de tratamiento, el NaHS y la L-Cys: (1) disminuyeron los valores basales de insulina, el índice HOMA y la presión arterial; (2) restauraron las respuestas vasorrelajantes sin efecto en las respuestas contráctiles, cuando se compararon con el vehículo. Por otro lado, la DL-PAG: (1) disminuyó los valores basales de insulina y el índice HOMA; (2) incrementó el índice Matsuda; (3) aumentó la presión arterial; (4) no modificó las respuestas relajantes ni contráctiles, en comparación con el vehículo. Con estos resultados en conjunto, concluimos que el tratamiento crónico con NaHS y L-Cys revierten la disfunción vascular y la hipertensión generada por la resistencia a la insulina, lo cual podría indicar un posible uso terapéutico.

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H₂S) is a colorless, flammable and water-soluble gas characterized by a peculiar smell of rotten eggs. H₂S is a gasotransmitter synthesized from L-Cysteine by three enzymatic pathways namely cystathionine-β-synthase (CBS), cystathionine-γ-lyase (CSE) and the tandem enzymes cysteine aminotransferase (CAT) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST). CSE predominates in the cardiovascular system, especially the myocardium and vascular smooth muscle cells (VSMCs). The aim of this study was to determine the effect of chronic administration of sodium hydrosulfide (NaHS; inorganic H₂S donor), L-Cysteine (L-Cys; H₂S producing enzymes substrate) and DL-Propargylglycine (DL-PAG; CSE inhibitor) on the vascular function induced by fructose in male Wistar rat thoracic aorta. For that purpose, animals were divided into two main sets that received for 20 weeks: (1) tap water (Control group; n=6); and (2) 15% p/v fructose in drinking water (Fructose group; n=30). Then, the fructose group were divided into 5 subgroups (n=6 each) which received daily i.p. injections during 4 weeks of: (1) no administration; (2) vehicle (PBS, 1 ml/kg); (3) NaHS (5.6 mg/kg); (4) L-Cys (300 mg/kg); (5) DL-PAG (10 mg/kg). After 16 weeks in the control and fructose (no administration) group, metabolic (oral glucose tolerance test, insulin, HOMA and Matsuda index) and hemodynamics variables by tail-cuff method were determined and after 20 weeks vascular function by *in vitro* experiments was determined. We observed that insulin resistance induced by fructose leads to: (1) hyperinsulinemia; (2) an increase in HOMA index; (3) a decrease in Matsuda index; (4) an increase in blood pressure (without affecting heart rate); and (5) a decrease in vasorelaxation responses with no effect on contractile responses compared to control group. Interestingly, after 4 weeks of treatment, NaHS y L-Cys: (1) decreased insulin values, HOMA index and blood pressure and (2) restored vasorelaxation responses with no effect on contractile responses when compared to vehicle. On the other hand, DL-PAG: (1) decreased insulin values and HOMA index; (2) increase Matsuda index; (3) increase blood pressure; (4) any effect on contractile or relaxant responses compared to vehicle. Taken together, these results suggest that chronic treatment with NaHS and L-Cys improve vascular function and blood pressure modified by insulin resistance and may have a potential therapeutic application.

1. Introducción

1.1 Sistema cardiovascular

Los organismos multicelulares y los mamíferos han desarrollado un sistema sofisticado de vasos sanguíneos que transportan sustancias entre las células y la sangre, y entre esta última y el medio externo. La sangre es impulsada a todos los tejidos a través del corazón (Klabunde, 2012). El sistema cardiovascular debe llegar a todas las células del cuerpo y debe poder responder inmediatamente a cualquier cambio en el ambiente interno para mantener todos los sistemas del cuerpo funcionando con la máxima eficacia. Incluso cuando estamos en reposo, nuestro sistema cardiovascular trabaja constantemente para satisfacer las demandas de los tejidos del cuerpo (Wilmore, 2007).

El sistema cardiovascular tiene la función de transportar los nutrientes hacia los tejidos; asimismo, se encarga de la recolección de los productos de desecho para su posterior eliminación en órganos como el riñón, pulmones, tracto gastrointestinal y piel (Evans, 2013).

Las funciones del sistema circulatorio pueden dividirse en tres áreas principales: transporte, regulación y protección (Fox, 2013):

1. Transporte de sustancias esenciales para el metabolismo celular. En el transporte se encuentran las siguientes funciones:

- Respiratorias: transporte de oxígeno hacia las células.
- Nutritivas: la sangre transporta los productos de la digestión hacia las células del cuerpo.
- Excretoras: esta función es desarrollada por los riñones a los cuales llegan los desechos metabólicos, el agua y los iones excesivos para ser excretados por la orina.

2. Regulación tanto hormonal como de la temperatura. La regulación puede presentarse en dos niveles:

- Hormonal: las hormonas son dirigidas a los tejidos distantes para ejercer sus funciones.

- Temperatura: involucra a los vasos cutáneos más profundos y a los vasos superficiales.
3. Protección contra pérdida de sangre por lesión y contra agentes patógenos. Para realizar esta función se emplean los siguientes procesos:
- Coagulación: mecanismo que se activa cuando hay daño en los vasos.
 - Función inmunitaria: participan células inmunitarias, antígenos y otros mediadores.

1.2 Componentes del Sistema Cardiovascular

El sistema circulatorio transporta fluidos a través del cuerpo; está formado por los sistemas cardiovascular y linfático. El corazón y los vasos sanguíneos configuran la red de transporte de sangre y forman el sistema cardiovascular (Moore, 2009).

1.2.1 El corazón

El corazón es un órgano hueco limitado por paredes, las cuales están constituidas por 3 capas. En primer término, la más interna y delicada, en contacto con la sangre y equivalente al endotelio que recubre los vasos sanguíneos es el endocardio. Sobre ella se coloca una segunda capa, de naturaleza muscular que es el miocardio, esta capa es la encargada de generar la fuerza de contracción en el corazón. La superficie externa del miocardio está cubierta por el epicardio, una capa de células mesoteliales. La última capa es el pericardio, se encuentra cubriendo todo el corazón y es una delgada envoltura o saco de fibras que evita el agrandamiento excesivo. En esta última capa, existe un espacio pericárdico que contiene líquido intersticial como lubricante (Aaronson et al., 2012).

El corazón funciona como una bomba que eyecta sangre tanto a la circulación pulmonar como a la sistémica. La primera se refiere al flujo sanguíneo hacia los pulmones que está involucrada con el intercambio gaseoso; mientras que, la segunda comprende los vasos sanguíneos dentro y fuera de todos los órganos excluyendo a los pulmones.

El corazón consta de cuatro cavidades: dos aurículas (cavidades superiores) y dos ventrículos (cavidades inferiores). El lado derecho del corazón comprende la aurícula y el ventrículo derecho, por otra parte, el lado izquierdo consta de la aurícula y el ventrículo izquierdo. Para iniciar con la regulación de la circulación sanguínea, en la aurícula derecha se recibe la sangre venosa proveniente de la circulación sistémica,

posteriormente la sangre pasa al ventrículo derecho y, por la arteria pulmonar, la sangre se conduce a los pulmones (circulación pulmonar) donde se oxigena. La sangre que sale de los pulmones entra a las venas pulmonares las cuales culminan en la aurícula izquierda del corazón y así la sangre fluye hasta el ventrículo izquierdo y de allí se distribuye por la aorta hacia todos los órganos (Evans, 2013); (Klabunde, 2012).

Entre las funciones del corazón destaca el gasto cardíaco el cual se define como el volumen sanguíneo eyectado por el corazón por minuto. Un regulador importante del gasto cardíaco es la frecuencia cardíaca (FC), que se define como el número de veces que se contrae el corazón por minuto y se controla por influencia cronotrópica sobre la actividad eléctrica espontánea del nodo sinoauricular (Ungerleider et al., 2018).

1.2.2 Los vasos sanguíneos

La sangre se transporta en el cuerpo a través de los vasos sanguíneos, los cuales tienen dimensiones variables y comprenden arterias, venas y capilares (Fig. 1) (Klabunde, 2012).

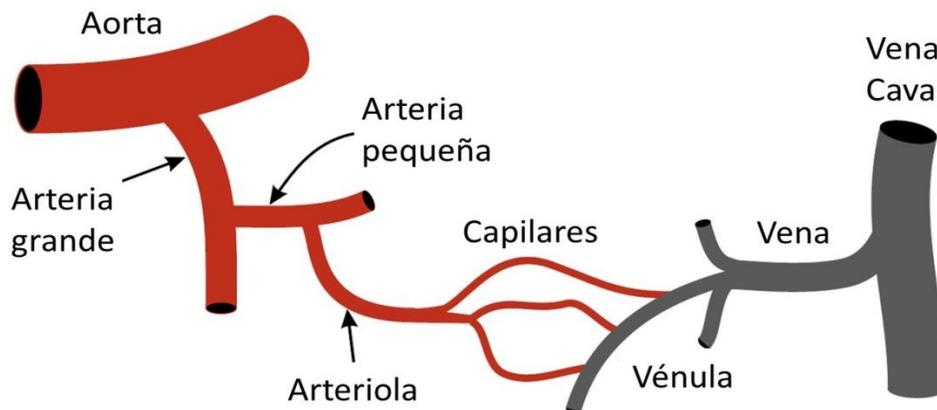


Fig. 1. Tipos de vasos sanguíneos. La aorta se ramifica en vasos más pequeños (arteria grande, arteria pequeña y arteriolas). La ramificación continúa hasta llegar a los capilares donde se intercambian nutrientes y desechos. Los capilares se combinan para formar las vénulas que llevan la sangre a las venas y finalmente la vena cava. Modificado de Klabunde, (2012).

La aorta se considera el principal vaso sanguíneo debido a que su función es distribuir la sangre desde el corazón hacia el sistema circulatorio; conforme se ramifica su diámetro cambia y da lugar a la formación de arterias grandes como lo son las arterias carótida, mesentérica y renal. La finalidad de la variación de diámetro de estos vasos es para que

la sangre pueda distribuirse hacia órganos específicos, al alcanzar un diámetro menor a 200 μm los vasos sanguíneos son denominados arteriolas. Las arteriolas se consideran vasos de resistencia ya que se encargan de la regulación de la presión arterial y del flujo sanguíneo (Klabunde, 2012).

Al contraerse los ventrículos, la presión interna del ventrículo izquierdo cambia a 120 mmHg, la válvula aórtica se abre y se expulsa la sangre hacia la aorta; este período de contracción ventricular se conoce como sístole. La presión máxima que se alcanza durante la sístole se denomina presión arterial sistólica (PAS) y permite la conducción de sangre a través de la aorta y la distensión de la misma. Posteriormente, cuando la válvula aórtica se cierra y el ventrículo izquierdo se relaja comienza a entrar sangre a través de la válvula mitral, este período de relajación y entrada de sangre se conoce como diástole y permite determinar la presión arterial diastólica (PAD). Durante la diástole el flujo sanguíneo y la presión disminuyen (80 mmHg) pero no bajan a cero. La presión arterial media (PAM) es la presión promedio en todo el corazón (Philip, et al., 2012).

Conforme las arteriolas van disminuyendo su diámetro ($<10 \mu\text{m}$) dan lugar a la formación de los capilares, los cuales están formados únicamente de capa endotelial y en ellos se realiza el intercambio de nutrientes y desechos metabólicos (Evans, 2013) (Klabunde, 2012).

Tabla 1. Tamaño y función de los diferentes vasos sanguíneos en la circulación sistémica del humano. Modificada de Klabunde, 2012.

| Tipo de vaso | Diámetro (mm) | Función |
|-------------------|---------------|--|
| Aorta | 25 | Pulso de amortiguación y distribución |
| Arterias grandes | 1.0-4.0 | Distribución |
| Arterias pequeñas | 0.2-1.0 | Distribución y resistencia |
| Arteriolas | 0.01-0.02 | Resistencia (regulación de la presión y flujo) |
| Capilares | 0.006-0.010 | Intercambio |
| Vénulas | 0.01-0.02 | Intercambio, recolección y capacitancia |
| Venas | 0.2-0.5 | Capacitancia (almacén de sangre) |
| Vena cava | 35 | Recolección |

1.4 Capas de los vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos están compuestos por 3 capas: la íntima, la media y la adventicia (Fig. 2).

- Capa íntima

Las células endoteliales constituyen la formación de la capa íntima, por lo que se encuentra en contacto directo con la sangre (Klabunde, 2012).

- Capa media

La capa media está constituida por células del músculo liso vascular, las cuales contribuyen a las actividades mecánicas del vaso y consecuentemente a su reducción de diámetro (Klabunde, 2012).

- Capa adventicia

La lámina elástica externa se encarga de separar la capa media de la capa adventicia. La capa adventicia contiene colágeno, fibroblastos, adipocitos, los vasos sanguíneos de los vasos grandes (*vasa vasorum*), vasos linfáticos y nervios autonómicos (Klabunde, 2012).

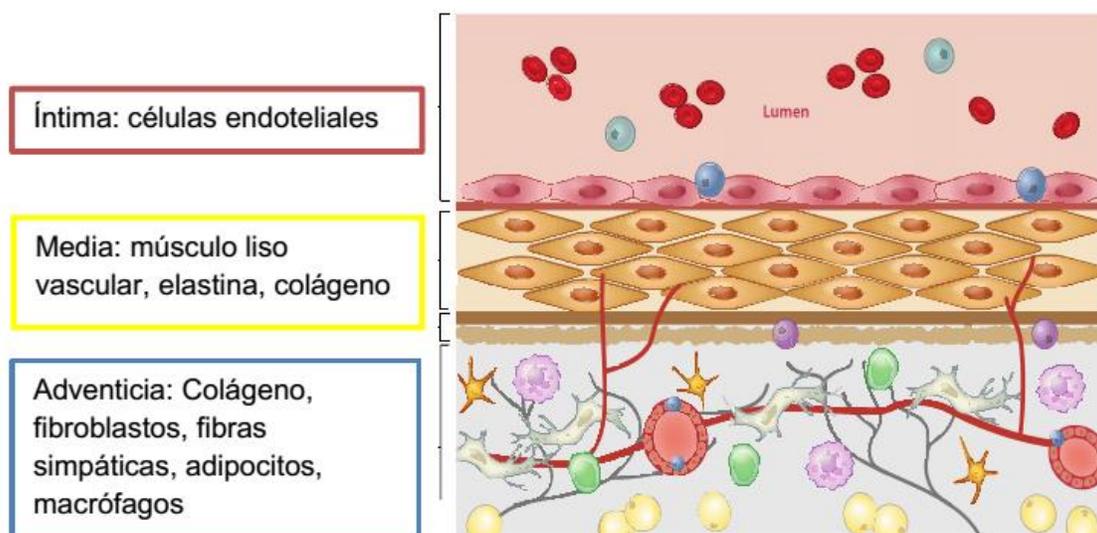


Fig. 2. Capas de vasos sanguíneos. Los vasos sanguíneos están compuestos por 3 capas: la íntima, la media y la adventicia. Modificado de Stenmark et al., (2013).

1.5 Tono vascular

Los vasos sanguíneos se contraen o se relajan para regular la presión arterial, alterar el flujo sanguíneo hacia los órganos, regular el flujo sanguíneo capilar y distribuir el volumen sanguíneo en el organismo.

El grado parcial de contracción de los vasos sanguíneos de resistencia generado por el músculo liso se denomina tono vascular y éste se encuentra regulado por la producción equilibrada de factores contráctiles y relajantes; estos factores se conocen como autacoides e incluyen a las prostaciclina (PGI₂), óxido nítrico (NO), endotelina (ET) y factor hiperpolarizante dependiente del endotelio (EDHF)) (Dvorkin, 2011).

El papel de las células endoteliales sobre la regulación del tono vascular consiste en la contribución con mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores como los mencionados anteriormente, los mediadores vasodilatadores ejercen sus efectos después de la activación de receptores que se encuentran en la membrana de las células endoteliales, estimulando la síntesis de NO y PGI₂ (Lorenzo et al., 2015).

1.6 Disfunción vascular

Hasta hace pocos años se consideraba que el endotelio era solamente un revestimiento. Sin embargo, con el paso de los años y los estudios realizados sobre esta estructura se ha descubierto que tiene más funciones biológicas.

El endotelio es una capa simple de 10-50 µM de espesor y se encuentra formado por células poligonales, orientadas longitudinalmente en dirección al flujo sanguíneo (Aird, 2007). Las células endoteliales vasculares cubren todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta los capilares, entre sus funciones más importantes destaca la regulación del flujo sanguíneo (Rajendran et al., 2013).

Los factores liberados por las células endoteliales son: PGI₂, NO, EDHF, ET, prostaglandina H₂ (PGH₂), tromboxano A₂ (TXA₂), sulfatos heparinoides, factor de crecimiento transformante (TGF-β), factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), activador del plasminógeno tisular (t-PA), inhibidor del activador del plasminógeno tisular tipo 1 (PAI-1), especies de oxígeno reactivas (ROS), como por ejemplo: aniones superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (OH⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂),

interleucinas, quimiocinas, moléculas de adhesión de monocitos y otros (De la Serna, 2010).

Se ha demostrado mediante estudios de bioensayo que, las células endoteliales causan relajación arterial mediante la liberación de sustancias vasoactivas, las cuales a su vez son estimuladas por el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF).

Hace 30 años, se identificó que el EDRF estimula a la guanilato ciclasa soluble (GCs) en las células de músculo liso vascular, aumentando la producción de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) y es inactivado por aniones superóxido (Furchgott, 1988).

El factor relajante más conocido es el óxido nítrico. Sin embargo, no es el único. Entre otros factores relajantes destacan las prostaciclina, adenosinas, metabolitos del ácido araquidónico y factores independientes de óxido nítrico como el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (Fig. 3) (Félétoú & Vanhoutte, 2013).

Además, las células endoteliales pueden liberar factores contráctiles derivados del endotelio (EDCF), incluidos prostanoides, endotelina-1, angiotensina II tisular (Ang II) y tetrafosfato de adenosin uridina (Vanhoutte et al., 2016).

La acetilcolina (ACh) y la trombina tienen acción vasodilatadora o vasoconstrictora dependiendo de la integridad del endotelio. Cuando el endotelio no se encuentra dañado la acción de estas sustancias es vasodilatadora, mientras que la acción es vasoconstrictora cuando el endotelio ha desaparecido o está lesionado (De la Serna, 2010).

El endotelio regula al músculo liso vascular (MLV) a través de la presencia de receptores unidos a la membrana de las células endoteliales. Estos receptores pueden reconocer proteínas, partículas transportadoras de lípidos, metabolitos u hormonas, esto permite la interacción célula-célula y célula-matriz (Rajendran et al., 2013).

Cuando se rompe el equilibrio de producción de factores relajantes y contráctiles se genera la disfunción del endotelio vascular, la cual se presenta en enfermedades como la hipertensión, diabetes, aterosclerosis, enfermedades coronarias y obesidad (Vanhoutte et al., 2016).

capacidad de la célula β para secretar insulina y la sensibilidad de los tejidos a esta hormona (Angulo et al., 2013). Los métodos más usados son: el índice HOMA (Homeostasis Model Assessment) y el índice Matsuda-DeFronzo. El índice HOMA se deriva de la interacción entre la función de la célula β y la sensibilidad a la insulina en un modelo matemático donde se utilizan las concentraciones de glucosa e insulina en ayuno (Tang et al., 2015). El modelo se calibra con una función celular β de 100% y una resistencia a la insulina normal de 1 de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

El índice Matsuda-DeFronzo al igual que el índice HOMA, permite la determinación de la resistencia a la insulina, pero a diferencia del anterior, el índice Matsuda-DeFronzo es más eficiente. Fue propuesto en 1999 por Matsuda y DeFronzo y es un índice de sensibilidad a la insulina que se obtiene a partir de las determinaciones de glucosa e insulina derivadas de una curva de tolerancia a la glucosa oral. Este índice se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$Matsuda - DeFronzo = ISI - \text{compuesto} = \frac{10\ 000}{\sqrt{[(IPA * GPA) * (xGPC * xIPC)]}}$$

Donde IPA es la insulina plasmática en ayuno en $\mu U/mL$, GPA es la glucosa plasmática en ayuno en mg/dL, xGPC es el promedio de la concentración plasmática en todos los puntos de la curva y xIPC es el promedio de la concentración de insulina plasmática en todos los puntos de la curva.

Se considera resistencia a la insulina si el valor del índice HOMA es mayor a 2.5 (Martínez et al., 2011) y si el valor del índice Matsuda es menor a 2.5 (Takahara et al., 2013).

1.7.2 *Disfunción vascular debido a resistencia a la insulina*

La insulina y sus acciones desempeñan un papel importante sobre la función endotelial. Por ejemplo, la producción de óxido nítrico, mientras que la resistencia a la insulina está fuertemente asociada con la disfunción endotelial.

Durante la resistencia a la insulina se produce una disfunción vascular. La disfunción vascular y/o la resistencia a la insulina que acompañan a la obesidad, síndrome metabólico y la diabetes se han atribuido a los siguientes mecanismos:

- 1) Aumento de la producción de ROS por NOX que causa daños en los receptores de insulina (Du et al., 2013).
- 2) Fosforilación incrementada del sustrato del receptor de insulina (IRS-1) en Ser307 (Nemoto et al., 2011).
- 3) Producción reducida de ácidos epoxieicosatrienoicos (EET) por el citocromo P450 (CYP 450) y degradación aumentada de ácidos grasos epoxídicos por la epóxido hidrolasa soluble (sHE) (Abraham et al., 2015) (Roche et al., 2015).
- 4) Regulación incrementada de la cinasa 2 de los receptores acoplados a proteína G (GRK₂) (Taguchi et al., 2014).
- 5) Sobreexpresión de la proteína cinasa C-β (PKCβ) e inducción de la expresión de ET-1 en el endotelio (Liu et al., 2013) (Lu et al., 2011) (Tabit et al., 2013).
- 6) Regulación incrementada del factor de transcripción FOXO-1 (Karki et al., 2015).
- 7) Activación exagerada de los receptores mineralocorticoides endoteliales (MR) por la aldosterona (Schäfer et al., 2013).
- 8) Hipoadiponectinemia que produce una regulación a la baja de la proteína adaptadora que media la señalización de adiponectina (APPL1) (Xing et al., 2013).
- 9) Aumento de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Feher et al., 2013).
- 10) Aumento de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF-α) por el tejido adiposo perivascular (PVAT) (Virdis et al., 2011).
- 11) Activación exagerada de receptores toll tipo 4 (TLR4) (Liang et al., 2013).
- 12) Regulación a la baja en las células del músculo liso vascular de la fosfoproteína estimulada por vasodilatación (VASP) (Cheng et al., 2014).

Para conocer si el endotelio se encuentra intacto o está dañado, se han realizado estudios donde las respuestas de agentes como la sustancia P, bradicinina, 5'-trifosfato de adenosina (ATP), 5'-pirofosfato adenosina (ADP), histamina y el ionóforo A2187 de Ca²⁺

los cuales dependen de la integridad del endotelio. La sustancia más empleada para conocer la integridad del endotelio y su respuesta relajante es la ACh. Estas respuestas en órgano aislado se evalúan después de realizar una contracción inducida por noradrenalina (NA), fenilefrina (FE) o altas concentraciones de K⁺ (Nurgali et al., 2018).

Además de la ACh, también se ha empleado el uso de carbacol (CCh) el cual es un éster de colina sintético y un compuesto de amonio cuaternario que posee carga positiva. El CCh es un agente parasimpaticomimético de la ACh, es decir, imita sus efectos actuando sobre receptores muscarínicos (William, 2013).

En el trabajo realizado por El-Bassossy et al. (2014), en 4 grupos de ratas Wistar macho (6-8 animales cada grupo), se indujo síndrome metabólico por administración de fructosa durante 6, 9 y 12 semanas. En los estudios de función vascular en la aorta torácica se demostró una contractilidad exagerada cuando se administró fenilefrina y cloruro de potasio (KCl), y una disminución en las respuestas relajantes a la ACh (El-Bassossy et al., 2014).

En otro estudio realizado por Mahmoud et al. (2012) en ratas Wistar macho, la resistencia a la insulina fue inducida por la administración de fructosa 10% durante 8 semanas. Transcurrido el tiempo se evaluó la función vascular. Los resultados mostraron un incremento en las respuestas contráctiles cuando se administró fenilefrina y KCl, por otro lado, las respuestas relajantes a ACh disminuyeron (Mahmoud et al., 2012).

Con base en estos estudios reportados, se tiene conocimiento que la resistencia a la insulina inducida por fructosa incrementa las respuestas contráctiles y disminuye las respuestas relajantes evidenciando una disfunción vascular.

1.8 Enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es una condición metabólica en la que los efectos fisiológicos de la insulina disminuyen. Debido a esto, la secreción de insulina por parte de las células beta pancreáticas no es la adecuada, es decir, los procesos están en desequilibrio y esto contribuye a que se presenten problemas clínicos.

1.8.2 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un conjunto de trastornos metabólicos que afecta aproximadamente al 44% de los adultos en México e incrementa el riesgo de padecer diabetes, accidente cerebrovascular, enfermedades cardiovasculares y enfermedades

relacionadas con la acumulación de la grasa en las paredes arteriales. Las causas subyacentes del síndrome metabólico incluyen el sobrepeso, la obesidad, la inactividad física, los factores genéticos y el envejecimiento (American Heart Association, 2016).

El síndrome metabólico se presenta cuando una persona tiene tres o más de las siguientes medidas (American Heart Association, 2016):

- Obesidad abdominal (perímetro de la cintura ≥ 94 cm en los hombres y ≥ 88 cm en las mujeres)
- Nivel de triglicéridos mayores a 150 mg/dL
- Colesterol HDL < 40 mg/dL en hombres o < 50 mg/dL en mujeres
- Presión arterial sistólica ≥ 130 mmHg o presión arterial diastólica ≥ 85 mmHg en personas mayores a 16 años
- Glucosa en ayunas de ≥ 100 mg/dL
- Colesterol LDL < 100 mg/dL

1.8.3 *Diabetes Mellitus tipo 2*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) como un trastorno metabólico de múltiple etiología caracterizado por hiperglucemia crónica con trastornos en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas como resultado de los defectos en la secreción de insulina, en su acción o en ambas. La DM2 actualmente ha comenzado a ser considerada como una pandemia (Sesti, 2006).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 encontró que la prevalencia de diabetes en el país pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016. Además, reportó que es mayormente observada en hombres de 60 a 69 años (27.7%) y en mujeres de este mismo rango de edad (32.7%) (ENSANUT 2016).

La DM2 se debe principalmente a factores de estilo de vida y factores genéticos. Se sabe que una serie de factores del estilo de vida son importantes para el desarrollo de la DM2. Estos son la inactividad física, el estilo de vida sedentario, fumar cigarrillos y el consumo excesivo de alcohol (Olokoba et al., 2012).

En la dieta es común el consumo de hidratos de carbono, de los cuales existen tres tipos (simples, complejos y refinados). Los carbohidratos refinados como el pan blanco o los dulces, se caracterizan por convertirse rápidamente en glucosa y, por lo tanto, causan un aumento rápido en los niveles de azúcar en la sangre. Las bebidas endulzadas con

fructosa como los refrescos, jugos, bebidas deportivas, etc., son fuente principal de azúcar en la dieta. En promedio estas bebidas aportan aproximadamente el 7% de las calorías diarias y el 50% de los azúcares agregados en la dieta (Kit et al., 2013). Otra causa del desarrollo de DM2 son las dietas ricas en grasa, particularmente la grasa saturada y los ácidos grasos trans; este tipo de grasas ejercen sus efectos sobre la composición lipídica de las membranas (Bray et al., 2002).

La DM2 se caracteriza por la insensibilidad a la insulina como resultado de la resistencia a la insulina, la disminución de la producción de insulina y la eventual falla de las células β pancreáticas. La resistencia a la insulina afecta tanto al músculo estriado como al hígado. El músculo esquelético es responsable de la mayor parte del metabolismo de la glucosa. Esto convierte al músculo en un blanco importante para el desarrollo de resistencia a insulina, ya que en pacientes con este trastorno se ha observado una reducción en la expresión del transportador de glucosa sensible a la insulina tipo 4 (GLUT4), y en la captación de glucosa y, seguidamente una disminución en el metabolismo no oxidativo de la glucosa y en la síntesis de glucógeno (Lorenzo, 2009). En estado basal, el hígado también representa un sitio importante para la resistencia a la insulina y esto se refleja en la sobreproducción de glucosa a pesar de la presencia de hiperinsulinemia en ayunas. Esta sobreproducción de glucosa genera niveles elevados de la misma en el plasma durante el ayuno, lo cual es un parámetro característico de los pacientes con DM2 (Cersosimo et al, 2018).

1.8.4 Obesidad

La obesidad es el aumento del tejido adiposo, especialmente en la deposición de la parte superior del cuerpo. Fue asociado por primera vez con diabetes y enfermedad vascular por el endocrinólogo francés Jean Vague en 1956 (Vague, 1956).

En México, el sobrepeso y la obesidad aumentaron en zonas rurales en la población masculina adulta (de 61.1% en 2012 a 67.5% en 2016) y en zonas urbanas se mantuvo en el mismo nivel (69.9%) (ENSANUT 2016).

En esta enfermedad, la resistencia a la insulina aumenta al incrementarse el índice de masa corporal, la circunferencia de la cintura y en particular, la relación cintura-cadera, todo esto produce niveles aumentados de tejido adiposo visceral (Aronne and Segal 2002). El tejido adiposo visceral es más activo metabólicamente con respecto al flujo de ácidos grasos libres, por lo que promueve la resistencia a la insulina a nivel celular y

aumenta la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Giorgino et al., 2005).

Además, el tejido adiposo produce una serie de citocinas que se han asociado con resistencia a la insulina incluidas aquellas con actividad proinflamatoria, por ejemplo, $TNF\alpha$, interleucinas y PAI-1 (Piemonti et al., 2003).

Se cree que la resistencia a la insulina observada en la obesidad afecta principalmente al músculo y al hígado, con un aumento de los ácidos grasos libres derivados de los adipocitos que promueven la acumulación de triglicéridos en estos tejidos (Piemonti et al., 2003). Es importante destacar que existen diferencias individuales en estos efectos. El aumento de peso empeora la adiposidad y consecuentemente la presencia de resistencia a la insulina. Por otro lado, la pérdida de peso es un factor que disminuye el desarrollo de resistencia a insulina en individuos con dicho trastorno.

2. ANTECEDENTES

2.1 Sulfuro de hidrógeno (H_2S)

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) se reconoció como un gas tóxico desde el siglo XVIII (Szabo, 2018). Sin embargo, a partir de 1996 se propuso como un gas que interviene en funciones fisiológicas importantes en el organismo (Abe y Kimura, 1996) y actualmente se reconoce como el tercer miembro de la familia de los gasotransmisores. El H_2S es un gas incoloro, inflamable y presenta un olor característico a huevo podrido (Szabo, 2012).

Se considera que el H_2S es un gasotransmisor por cumplir con los siguientes criterios (Wang, 2002) (Wang, 2014):

- 1.- H_2S es una pequeña molécula de gas.
- 2.- H_2S es permeable a la membrana plasmática y a las membranas de los organelos intracelulares.
- 3.- H_2S es generado endógenamente en las células de los mamíferos bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.
- 4.- H_2S tiene funciones bien definidas.
- 5.- La administración de donadores de H_2S ha mostrado efectos similares a los que genera el H_2S de manera endógena en diferentes sistemas biológicos.
- 6.- H_2S está involucrado en la transducción de señales y tiene sitios de acción específicos.

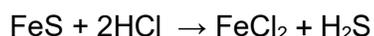
Hace muchos años se consideraba que este gas era tóxico y que causaba daños al medio ambiente. Sin embargo, con el paso de los años y los avances en diversos estudios se ha demostrado que las enzimas encargadas de la producción endógena del H_2S se expresan en tejidos de mamíferos permitiendo la regulación de funciones fisiológicas importantes; estas funciones incluyen principalmente la neurotransmisión y vasorrelajación (Kimura, 2010) (Wang, 2012).

2.1.1 Historia del H_2S

En 1713, el médico italiano Bernardino Ramazzini describió el efecto toxicológico del H_2S . Sus observaciones fueron publicadas en el libro "Enfermedades de los Trabajadores" (*De Morbis Artificum Diatriba*). En este libro se describe una enfermedad que se centraba en

la inflamación de los ojos, infección y ceguera por la exposición a un ácido volátil en trabajadores que se dedicaban a limpiar retretes y alcantarillas. En el año 1777 en París se presentaron casos de inflamación de mucosas y asfixia por emanaciones de gas del drenaje, estos signos clínicos coincidían con lo descrito por Ramazzini (Wang, 2012).

En 1750 Carl Wilhelm Scheele realizó una reacción química en la que el sulfuro ferroso (pirita) reaccionó con ácido mineral, el producto generó un ácido con olor característico a huevo podrido, el cual es actualmente conocido como sulfuro de hidrógeno (Wang, 2012). La reacción descrita se presenta a continuación:



El azufre forma parte de la composición química del H_2S . Está presente en la mayoría de las proteínas y es uno de los elementos esenciales para las plantas y animales. Este elemento se encuentra principalmente en los volcanes donde se produce dióxido de azufre (SO_2) y H_2S ; también se puede encontrar en el mar en forma de dimetilsulfuro. A diferencia del ciclo del nitrógeno y del carbono, el ciclo del azufre es más complejo debido a los diferentes estados redox que se presentan.

Los compuestos SO_2 , H_2S y dimetilsulfuro, pueden reaccionar con el oxígeno y generar trióxido de azufre (SO_3) que reacciona con el agua y forma ácido sulfúrico (H_2SO_4), la precipitación permite la producción de lluvia, posteriormente los sulfatos llegan a la tierra y esto permite que sean asimilados por las plantas y animales, de esta forma es como el azufre ingresa a los organismos (Yamasaki and Cohen, 2016).

2.1.2 Biosíntesis del H_2S

El H_2S es un potente agente reductor que se produce de manera endógena y enzimática a partir del aminoácido L-Cisteína por 3 diferentes vías enzimáticas: (1) cistationina β sintasa (CBS), (2) cistationina- γ -liasa (CSE) y (3) 3-mercaptopiruvato-sulfurotransferasa (3-MST) (Fig. 4) (Beltowski et al., 2018). Las enzimas CBS y CSE son dependientes de fosfato de piridoxal-5' (PLP). La enzima CBS se expresa principalmente en el sistema nervioso central, aunque también puede encontrarse en hígado y riñón. La enzima CSE se expresa principalmente en el sistema vascular, aorta torácica, arterias como la mesentérica y pulmonar, vena porta y también en órganos como el hígado, riñón, intestino delgado y páncreas (Zhao et al., 2001; Kimura, 2014).

La enzima 3-MST produce H₂S a través de una vía mitocondrial donde se requiere la acción de 3-mercaptopiruvato (3-MP); a su vez esta enzima requiere la participación de las enzimas cisteína aminotransferasa (CAT) y d-aminoácido oxidasa (DAO) provenientes a partir de L-cisteína y D-cisteína respectivamente (Kimura, 2014).

Por otro lado, existen inhibidores de la enzima CSE, el principal inhibidor es la DL-propargilglicina (DL-PPG) el cual es un inhibidor irreversible. Se ha comprobado que la DL-PPG inhibe la producción de H₂S en preparaciones de hígado de rata en concentraciones inhibitoras 50 (IC₅₀) de 55 μM (Mok et al., 2004). En dosis que oscilan entre 25-100 mg/kg, la DL-PPG puede reducir la inflamación asociada a H₂S en modelos de roedores con pancreatitis, edema y endotoxemia (Bhatia et al., 2008).

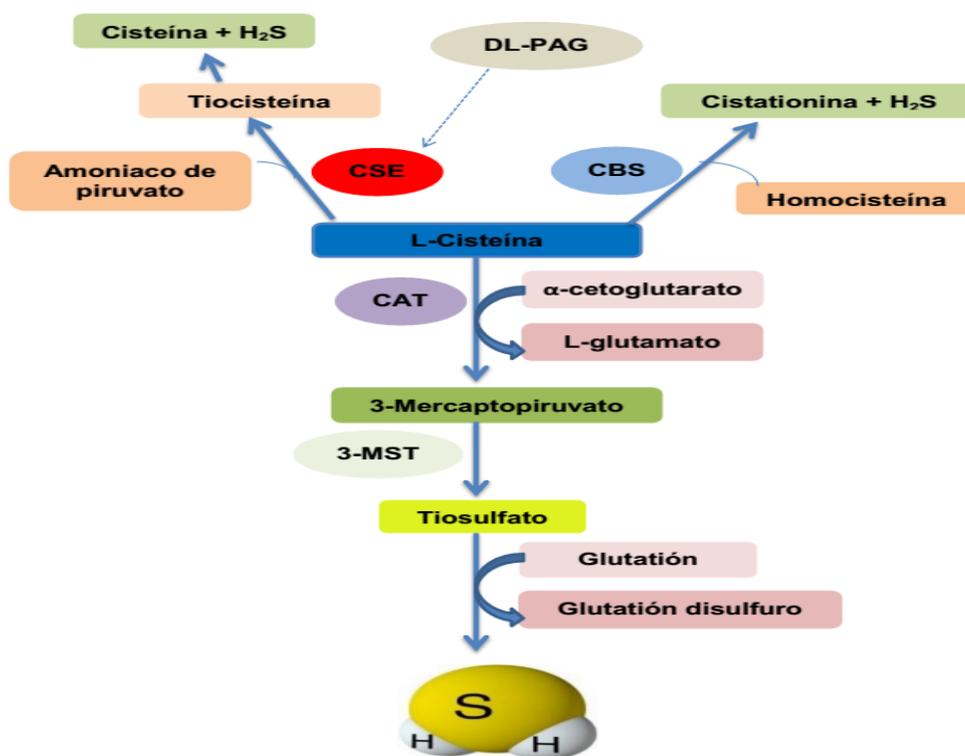


Fig. 4. Biosíntesis del H₂S. Existen 3 enzimas involucradas en la producción del H₂S: (1) cistationina beta sintasa (CBS), (2) cistationina- γ- liasa (CSE) y (3) 3-mercaptopiruvato- sulfotransferasa (3-MST) combinada con cisteína aminotransferasa (CAT). Modificado de Yu et al., (2014).

2.1.3 Metabolismo del H₂S

El H₂S tiene un peso molecular de 34.08 g/mol y una densidad de 1.19 g/L; estas características hacen que sea más pesado que el aire. En solución acuosa, el H₂S es un ácido débil que tiende a disociarse en H⁺ y HS⁻, con un pKa₁ de 7 a 37°C, este último compuesto se disocia en H⁺ y S²⁻ la cual tiene un pKa₂ de 17, como se representa en la siguiente reacción química:



El tiempo de vida media del H₂S es de segundos a minutos. En solución acuosa aproximadamente un 20% del sulfuro de hidrógeno se encuentra en su forma no disociada, mientras que el 80% se encuentra en forma de anión HS⁻. Generalmente esto se presenta bajo ciertas condiciones como una temperatura de 37°C y pH de 7.4 (Wang, 2012).

En estudios recientes se ha propuesto que el H₂S ejerce sus efectos biológicos a través de modificaciones postraduccionales, es decir, mediante la modificación de proteínas. Esta modificación se realiza en los residuos de cisteína donde se agrega un grupo tiol (-SH); este proceso se conoce como sulfuración o persulfuración (Filipovic et al., 2015; Mustafa et al., 2009 respectivamente) y funciona de una manera análoga a la nitrosilación. Por lo tanto, la sulfidación consiste en la modificación de los residuos de cisteína que tienen el grupo -SH a hidropersulfuros (-SSH). Los hidropersulfuros tienen una capacidad nucleofílica más potente lo que genera una mayor reactividad química (Zhang et al., 2017) (Paul and Synder, 2015). Además, se ha demostrado que la sulfidación contribuye a la protección del sistema cardiovascular, debido a que disminuye la disfunción endotelial, el estrés oxidativo, la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) y el daño del DNA (Li et al., 2018).

Una vez que el H₂S ejerce su acción debe mantenerse un equilibrio fisiológico, por lo que, los procesos metabólicos para su eliminación siguen 3 rutas (Fig. 5). La primera ruta es la canónica incluye: la oxidación del sulfuro a persulfuro a través del sulfuro cinaona oxido-reductasa, el cual es transferido al glutatión para formar glutatión persulfuro. Este último puede ser oxidado a sulfito con la enzima persulfuro dioxigenasa o puede formar tiosulfato con la enzima rodanasa (Mishanina et al., 2015). La segunda ruta consiste en procesos de metilación citosólica a través de la enzima S-metiltransferasa (TSM) para formar dimetilsulfuro. La última ruta se presenta cuando el H₂S se une a la hemoglobina y se forma el compuesto sulfohemoglobina (Yu et al., 2014).

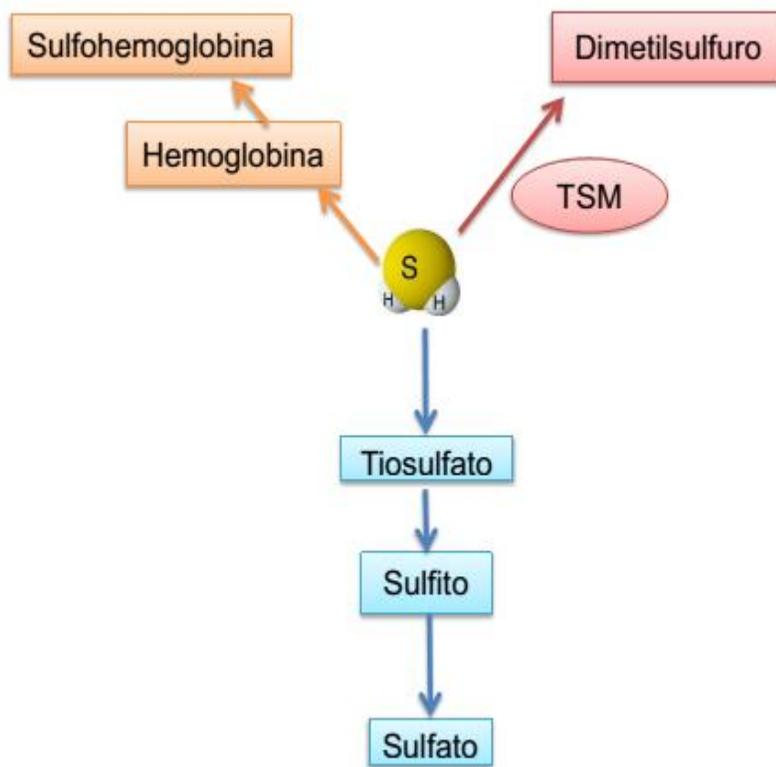


Fig.5. Metabolismo del H_2S . Los procesos metabólicos del H_2S siguen tres diferentes rutas: modificación oxidativa mitocondrial, metilación citosólica y unión a hemoglobina. Modificado de Yu et al., (2014).

2.2 Efectos fisiológicos del H_2S y sus donadores

2.2.1 Sistema cardiovascular

En los vasos sanguíneos, la enzima CSE se encarga de producir H_2S en el músculo liso, endotelio y tejido adiposo periadventicial.

En las células del músculo liso, el H_2S regula la apoptosis celular, el cambio fenotípico, la relajación, la contracción y la calcificación. En las células endoteliales, el H_2S controla la proliferación celular, la senescencia celular, el estrés oxidativo, la inflamación, etc. El H_2S interactúa con el óxido nítrico y funciona como un factor relajante derivado del endotelio y un factor hiperpolarizante derivado del endotelio. El H_2S generado a partir de tejidos

adiposos periadventiciales actúa como un factor relajante derivado de los adipocitos y modula el tono vascular (Yang, et al., 2015).

Por otra parte, existe evidencia que demuestra que el H₂S produce inhibición de la función cardíaca (Geng et al., 2004). En el corazón aislado de rata, el NaHS (donador inorgánico de H₂S) induce respuestas cronotrópicas e inotrópicas negativas (Geng et al., 2004; Porokhya et al., 2012). En corazón aislado perfundido con la técnica de Langendorff, el NaHS produjo: (1) disminución del (±)-LV dp/dtmax a 10⁻⁶-10⁻⁹ mol/L, lo que sugiere una respuesta inotrópica negativa (Geng et al., 2004); (2) lusitropismo negativo (Mazza et al., 2013); y (3) cronotropismo negativo a concentraciones de NaHS de 10⁻³ mol/L (Geng et al., 2004).

En el trabajo realizado por Köhn et al. (2012) se demostró que el H₂S modula el tono vascular de las aortas de rata de una manera dependiente de PVAT. Además, la inhibición de CSE disminuyó fuertemente el efecto anti-contráctil del tejido adiposo perivascular y se demostró que el H₂S exógeno indujo vasorrelajación en aortas de rata; este efecto fue bloqueado mediante la inhibición de los canales de potasio tipo M (KCNQ) y los canales de potasio dependientes de ATP (K⁺_{ATP}). Por lo tanto, el H₂S podría actuar como un factor relajante derivado de adipocito en aortas de rata (Köhn et al., 2012).

El H₂S ejerce efectos antihipertensivos mediante vasorrelajación que implica la apertura de los canales de K⁺_{ATP}, los canales de conductancia intermedia (IKCa) y canales de potasio de conductancia baja (SKCa), así como la supresión de la inflamación vascular y / o aumento de la liberación de renina (Köhn et al., 2012).

2.2.2 Sistema Nervioso Central

En el Sistema Nervioso Central (SNC) la enzima CBS predomina principalmente en el cerebelo e hipocampo; por lo tanto, se puede producir H₂S y desarrollar funciones importantes a través de la regulación de la neurotransmisión y neuromodulación (Kimura, 2010). Uno de los neurotransmisores excitadores importantes en el SNC es el glutamato; el H₂S interviene en la estimulación de este neurotransmisor por medio de la participación de los receptores NMDA (Partlo et al., 2001). Por otro lado, el H₂S interviene en la inhibición del neurotransmisor GABA el cual tiene función inhibitoria en el SNC (Han et al., 2005).

El H₂S tiene efectos pronociceptivos y antinociceptivos debido a que se ha reportado que la activación de los canales de calcio tipo L puede generar los efectos pronociceptivos,

mientras que la activación de los canales K^+_{ATP} producen antinocicepción (Distrutti et al., 2010).

2.2.3 Páncreas

En órganos como el páncreas, el H_2S participa en la inhibición de la liberación de la insulina mientras que en el riñón desempeña una función vascular e incrementa la velocidad de filtración glomerular (VFG) (Yang et al., 2005).

2.2.4 Inflamación

Una de las áreas donde el H_2S tiene un papel dual es sobre su participación en la regulación de la inflamación, ya que se ha reportado que un incremento en la expresión de CSE puede tener efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios (Nagai et al., 2004).

2.3 Donadores de H_2S

Con base en los estudios que han reportado los efectos fisiológicos del H_2S , se han diseñado donadores de H_2S que contribuyen en su liberación y consecuentemente una posible participación en procesos patológicos (Szabo y Papapetropoulos, 2017). La primera clase de donadores del H_2S está representada por las sales del sulfuro, como el sulfhidrato de sodio (NaHS) y el sulfuro de sodio (Na_2S) que al estar en solución acuosa promueven la liberación del H_2S (Szabo, 2018). Otro donador de H_2S es el profármaco sintético SG-1002, un polisulfonato de sodio, que entre sus constituyentes se encuentra el sulfato de sodio. El SG-1002 se ha estudiado en voluntarios sanos y sujetos con insuficiencia cardíaca congestiva, este ensayo en fase I es el primero que se ha realizado en individuos y sus resultados fueron satisfactorios, sin embargo, aún se requieren más estudios (Polhemus et al., 2015).

El GYY4137 también es un donador de H_2S , pero se diferencia de los otros por producir una liberación lenta del H_2S . Una modificación del GYY4137 son los donadores JK, su mecanismo de liberación de H_2S consiste en la ciclación intracelular que a su vez es dependiente del pH; en condiciones ácidas la liberación es mayor, contrario a lo que sucede en condiciones neutras donde la liberación es lenta o similar a la liberación producida por el GYY4137 (Kang et al., 2016).

2.4 Efectos de H_2S y secreción de insulina

El incremento extracelular de glucosa es el primer estímulo para la secreción de insulina. La glucosa se transporta al interior de las células β pancreáticas a través de los transportadores de glucosa (GLUT) y su metabolismo eleva los niveles de ATP/ADP, lo

cual resulta en la inhibición de los canales de K^+_{ATP} . La inhibición de estos canales genera una despolarización de la membrana y consecuentemente la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (L-VDCC), permitiendo que el calcio entre a la célula y se produzca la liberación de la insulina almacenada en vesículas.

Muchos otros mecanismos también modulan la secreción de insulina, incluyendo la activación de fosfolipasas, las incretinas, la activación de la adenilato ciclasa (AC) de la proteína cinasa A (PKA) de la célula β , la ACh liberada de las terminales parasimpáticas que estimula a los receptores muscarínicos (M_3), entre otros (Beltowski et al., 2018).

Existe evidencia que demuestra la participación del H_2S sobre la función de las células β del páncreas, así como también en la disfunción endotelial inducida por la elevación de la glucosa extracelular. La disfunción endotelial subyace a las complicaciones diabéticas (Szabo, 2012). Las enzimas CSE y CBS se encuentran en los islotes pancreáticos. Sin embargo, se ha demostrado que la CSE se encuentra en mayor proporción y cuando se produce H_2S en grandes cantidades se reduce la liberación de la insulina. Además, en los trabajos donde la expresión de la CSE es inhibida por la DL-PPG se ha observado que la liberación de insulina se incrementa (Yang et al., 2005).

El mecanismo a través del cual el H_2S ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina es complejo. En uno de los primeros estudios donde se evaluaron efectos vasculares se observó la participación de los canales de K^+_{ATP} , por lo que se considera que el H_2S actúa sobre estos canales (Fig. 6) (Beltowski et al., 2018).

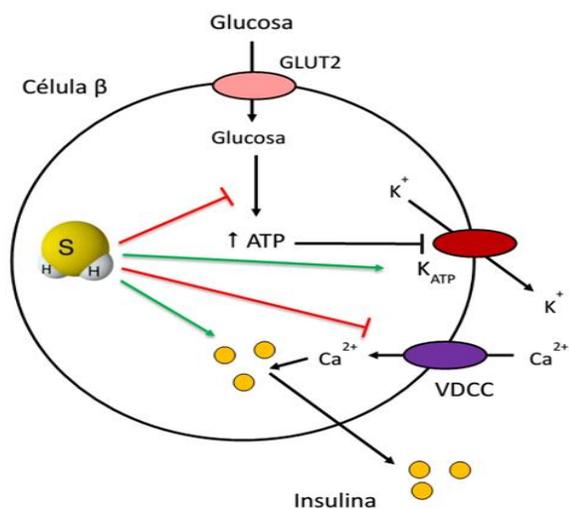


Fig.6. Participación del H_2S sobre la secreción de insulina. El mecanismo por el que el H_2S regula la secreción de insulina no está completamente establecido, pero se atribuye principalmente a los canales de K^+_{ATP} . Modificado de Beltowski et al., (2018).

Además de los canales de K^+_{ATP} se ha sugerido que también se produce disminución de los niveles de ATP celular y regulación de la concentración intracelular de calcio (Fig. 6) (Beltowski et al., 2018).

En el trabajo reportado por Feng *et al.* (2009), en ratas Sprague Dawley se indujo resistencia a la insulina por la administración de fructosa 10% durante 12 semanas, posterior a esto se determinó la acción *in vivo* del H_2S . Los resultados en la prueba de tolerancia a la glucosa mostraron un alto nivel de glucosa en sangre y concentración de insulina en plasma incrementada comparada con la concentración observada en los controles. Además, se presentó un incremento en el índice HOMA. Por otro lado, se detectó el nivel de H_2S en el tejido adiposo, se observó que éste se encontraba incrementado. Estos datos *in vivo* sugieren que el H_2S generado por los tejidos adiposos podría regular la sensibilidad a la insulina (Feng, et al., 2009).

Cuando las células endoteliales se encuentran en condiciones normales, la producción fisiológica de H_2S protege contra el estrés oxidativo generado por las mitocondrias. Las ROS que son generadas en las mitocondrias no se extienden al citosol ni al núcleo. Sin embargo, cuando los niveles de glucosa de la célula aumentan, el H_2S pierde su función protectora y las ROS ingresan al citosol y al núcleo produciéndose disfunción endotelial y complicaciones vasculares diabética (Szabo, 2012).

Denizalti *et al.* (2011) estudiaron el efecto de la inducción de diabetes por estreptozotocina (STZ) sobre los efectos relajantes del H_2S en las arterias aorta torácica, mesentérica y pulmonar. Los resultados indicaron que las respuestas relajantes inducidas por 0.1-1 mM de NaHS después de 4 y 12 semanas de haber presentado diabetes fueron incrementadas comparadas con el grupo control, es decir, el NaHS contribuía al mejoramiento de las respuestas relajantes en los grupos que presentaron diabetes (Denizalti, et al., 2011).

Estos estudios sugieren un posible papel del H_2S sobre la resistencia a la insulina.

2.5 Efectos duales del H_2S sobre la resistencia a la insulina

El H_2S cumple con las características de ser un gasotransmisor y de manera similar al NO y monóxido de carbono (CO), muchas respuestas biológicas del H_2S son bifásicas. Por ejemplo, sus efectos fisiológicos pueden ser citoprotectores (cuando se emplea a bajas concentraciones) o pueden ser citotóxicos (cuando se emplea a concentraciones altas) (Szabo, 2010).

En el trabajo de Untereiner *et al* (2017) se describe como el NaHS al ser empleado en una concentración de 100 μ M en ratas Wistar macho, inhibió la liberación de insulina en las células HIT-T15 (Untereiner *et al.*, 2017). Por otro lado, se esperaría que el inhibidor DL-PPG incrementa la secreción de insulina, debido a que, como se mencionó anteriormente es un inhibidor de la enzima CSE. Sin embargo, se ha encontrado en un estudio realizado por Gen *et al.*, (2013) que la administración de PAG (30 mg/kg) por vía i.p. en ratones obesos revierte la resistencia a la insulina; este mismo efecto se observa cuando se administra GYY4137 (200 mg/kg) vía i.p.. Este estudio es un claro ejemplo de los efectos duales que puede tener el H₂S.

Con base en los estudios encontrados donde el H₂S influye en la liberación de insulina, se consideró estudiar su relación con la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Al respecto, Okamoto *et al* (2013) demostraron en su trabajo que en ratones CSE-KO que recibieron una dieta rica en grasa durante 8 semanas, los niveles de glucosa en sangre fueron incrementados y los niveles de insulina fueron reducidos. Además, cuando se administró NaHS, los niveles de glucosa e insulina eran contrarios a lo observado antes de la administración. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren posibles aplicaciones del NaHS para la DM2 (Okamoto *et al.*, 2013).

Además, existen alimentos donde se encuentra directa o indirectamente el H₂S y así se desarrollan sus efectos en el organismo. Un ejemplo es el ajo. Padiya *et al* (2011) administraron durante 8 semanas una dieta de ajo (250 mg/kg/día) en ratas macho Sprague-Dawley a las que se les indujo diabetes por el consumo de fructosa 65% (8 semanas). Este grupo fue comparado contra un grupo de ratas diabéticas que no recibió ajo y los resultados indicaron que los niveles de glucosa e insulina fueron reducidos en el grupo tratado con ajo (Padiya *et al.*, 2011).

2.6 Modelo de órgano aislado

Para el estudio de la farmacología inicialmente se requería el uso de animales intactos. Sin embargo, posteriormente se utilizaron pruebas que requieren de sus tejidos u órganos aislados. Estos modelos experimentales siguen siendo esenciales sobre todo cuando se quiere probar a una sustancia como posible fármaco con utilidad terapéutica.

Un ejemplo de modelo experimental empleado en la farmacología es el "órgano aislado". Cuando se inició el desarrollo de técnicas farmacológicas, se encontró que un órgano o tejido aislado mantenía su funcionamiento durante varias horas en un baño de solución

fisiológica de sales. El modelo de órgano aislado se usa actualmente como estándar para experimentos farmacodinámicos de dosis-respuesta *in vitro* que involucran la suspensión de una sección aislada de órgano/tejido en una solución controlada con sensores para medir la contracción o relajación del tejido cuando se agregan diferentes fármacos (Padmanabhan, 2014).

Henrick Magnus (1802-1870) fue el primer investigador en emplear el modelo de órgano aislado en una tira de intestino delgado. Así, las respuestas contráctiles y relajantes se transmitían de manera mecánica a un estilete que se encontraba sobre un tambor cubierto con papel ahumado y a su vez giraba a una velocidad constante. Este equipo se conoce como quimógrafo y su función es inscribir de manera gráfica el movimiento o la presión. El registro gráfico permite visualizar y cuantificar el efecto del fármaco a lo largo del tiempo. Posterior a los estudios realizados por Henrick Magnus, el investigador Jean-Francois Heymans (1904) experimentó en el corazón de un mamífero y Claude Bernard realizó estudios en preparaciones aisladas de nervios y músculos. En la actualidad los movimientos de órganos y tejidos se leen en un sistema computarizado que emite un registro digital (Scheindlin, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a la insulina es un mecanismo subyacente a enfermedades metabólicas como la Diabetes Mellitus tipo 2, la cual puede llegar a provocar disminución de la producción de insulina e hiperglucemia. Se ha reportado que durante la resistencia a la insulina se presentan cambios en la función vascular, particularmente en las respuestas relajantes y contráctiles (disfunción vascular). La Diabetes Mellitus tipo 2 es hoy en día un problema creciente de salud. Actualmente se conoce que la principal función del H₂S son los efectos relajantes que ejerce sobre el sistema cardiovascular. Por lo que es necesario investigar los efectos del H₂S sobre la disfunción vascular que acompaña a la resistencia a la insulina, lo cual podría indicar un posible uso terapéutico.

4. HIPÓTESIS

La administración crónica de NaHS y L-cisteína revertirán la disfunción vascular inducida por la resistencia a la insulina en la aorta torácica de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina inducida por fructosa, mientras que la inhibición de la enzima CSE con DL-propargilglicina producirá el efecto opuesto.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración crónica de NaHS, L-Cys y DL-propargilglicina sobre la función vascular en aortas aisladas de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina inducida por fructosa.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar en ratas resistentes a la insulina inducidas por fructosa (15% p/v):
 - Las características metabólicas (curva de tolerancia a la glucosa, niveles de insulina en plasma, índice HOMA y Matsuda).
 - Las características hemodinámicas (presión arterial y frecuencia cardíaca).
 - Las respuestas contráctiles a noradrenalina y relajantes a carbachol en aorta torácica.

2. Determinar en ratas resistentes a la insulina inducidas por fructosa (15% p/v) el efecto de la administración crónica de vehículo (PBS), NaHS, L-Cys y DL- propargilglicina sobre:
 - Las características metabólicas (curva de tolerancia a la glucosa, niveles de insulina en plasma, índice HOMA y Matsuda).
 - Las características hemodinámicas (presión arterial y frecuencia cardíaca).
 - Las respuestas contráctiles a noradrenalina y relajantes a carbachol en aorta torácica.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Animales*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, las cuales fueron alojadas en jaulas de plástico, en un cuarto con condiciones estandarizadas (22 ± 2 ° C, 50% de humedad y ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h), además fueron provistas de comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos en animales siguieron los lineamientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Bienestar de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), en congruencia con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en Estados Unidos de América y con el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL).

6.2. *Inducción del modelo de resistencia a insulina por tratamiento con fructosa 15% p/v*

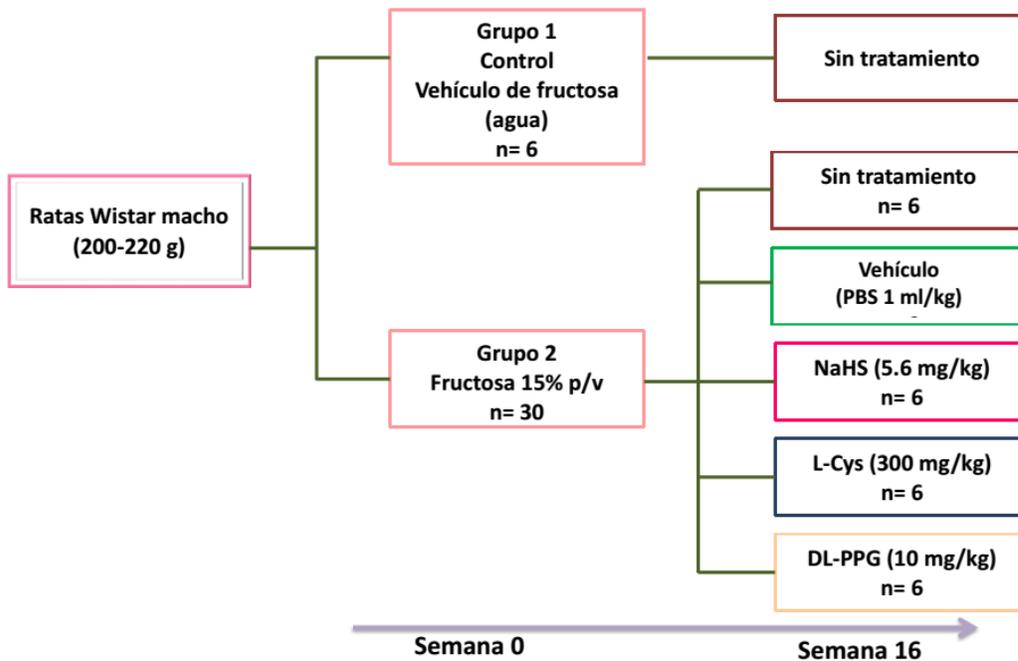
Los animales fueron seleccionados al azar y divididos en dos grupos. El grupo 1 fue utilizado como control (n=6) y fue alimentado con una dieta regular y agua a voluntad, filtrada del grifo, durante 20 semanas. El grupo 2 (n=30) fue alimentado con una dieta regular y con una solución de fructosa (15% p/v) durante 20 semanas (Fig. 7).

6.3. *Evaluación de las características metabólicas y hemodinámicas*

A la semana 16, el grupo 2 de fructosa 15% se subdividió en 5 grupos (n=6 cada uno) a los cuales se les administró diariamente durante 4 semanas por vía intraperitoneal los siguientes compuestos: (1) sin tratamiento (grupo control de fructosa); (2) vehículo (PBS 1 ml/kg); (3) NaHS (5.6 mg/kg); (4) L-Cys (300 mg/kg) y (5) DL-PPG (10 mg/kg) (Fig. 7).

Posterior al tratamiento crónico, se determinaron las características hemodinámicas en todos los grupos a las 16 y 20 semanas. Las características metabólicas fueron determinadas a las 16 semanas (grupo control y fructosa 15% sin tratamiento) y a las 20 semanas (después del tratamiento crónico).

Fig.7. Diseño experimental.



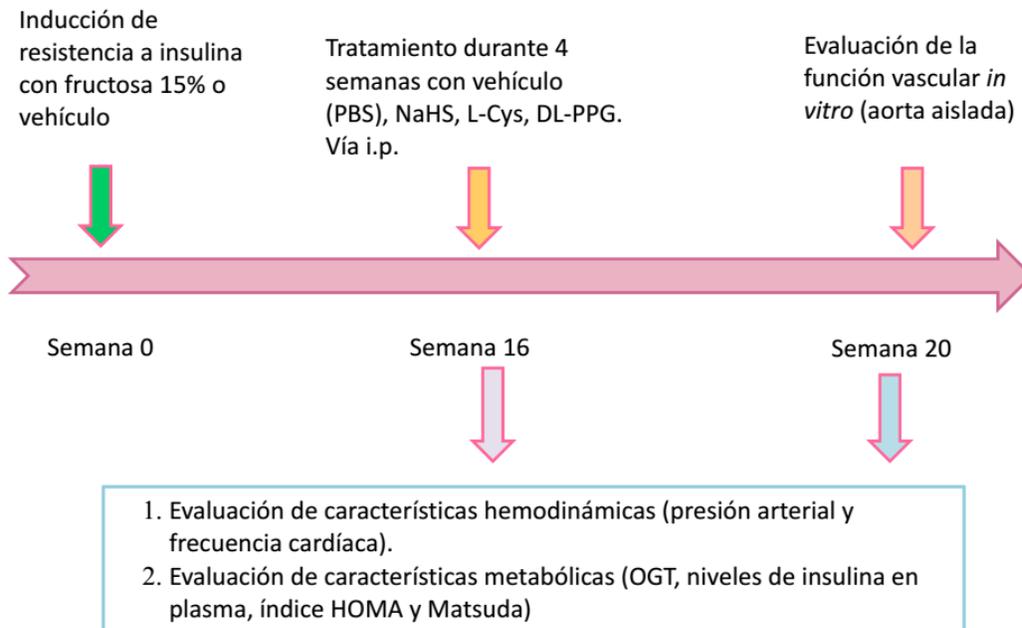
6.4 Medición de la presión arterial y frecuencia cardíaca

La presión arterial y frecuencia cardíaca fueron determinadas utilizando el método pletismógrafo (Gutiérrez-Lara, 2016), con un registrador automático de presión arterial LE 5001 (Letica1, PanLab, Barcelona, España). Los animales fueron colocados en jaulas acrílicas y su cola mantenida expuesta a una lámpara durante aproximadamente 15 minutos. Posteriormente, fue colocado en la cola un sensor óptico para detectar la presión y un anillo que fue insuflado con la finalidad de detener el flujo sanguíneo. Al soltar el anillo se induce a una liberación lenta de la tensión, la cual permitió la determinación de la presión arterial sistólica (PAS) a través del sensor y a partir de esta presión se pudo determinar la presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca. Las mediciones fueron realizadas antes (semana 16) y después del tratamiento crónico (semana 20), con la finalidad de evaluar los cambios al inicio y al final del tratamiento crónico como se muestra en la figura 2. Los valores representan el promedio de 3 mediciones por rata.

6.5 Prueba de tolerancia a la glucosa oral

Después de 16 y 20 semanas de tratamiento con fructosa o agua, los animales fueron puestos en ayuno durante 12 h antes de realizar la prueba oral de tolerancia a la glucosa (PTGO). Para la prueba, los niveles de glucosa se obtuvieron de muestras de sangre de la vena de la cola a los 0, 15, 30, 60, 90 y 120 min después de la administración por vía oral de una carga de glucosa (2 g/kg) con un glucómetro (AccuCheck®, Roche of México). Al mismo tiempo se recolectó 1.5 mL de sangre en tubos eppendorf para determinar los niveles de insulina con el kit de ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) de ALPCO (Salem, NH, EE. UU.) (Gutiérrez - Lara et al., 2017) (Figura 8).

Fig. 8. Curso temporal



6.6 Modelo de órgano aislado

Para evaluar el efecto de la administración crónica de los tratamientos farmacológicos sobre la función vascular, en aortas aisladas de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina inducida por fructosa, se utilizó el modelo de órgano aislado, el cual se usa habitualmente para realizar curvas dosis-respuesta de músculo liso vascular *in vitro*.

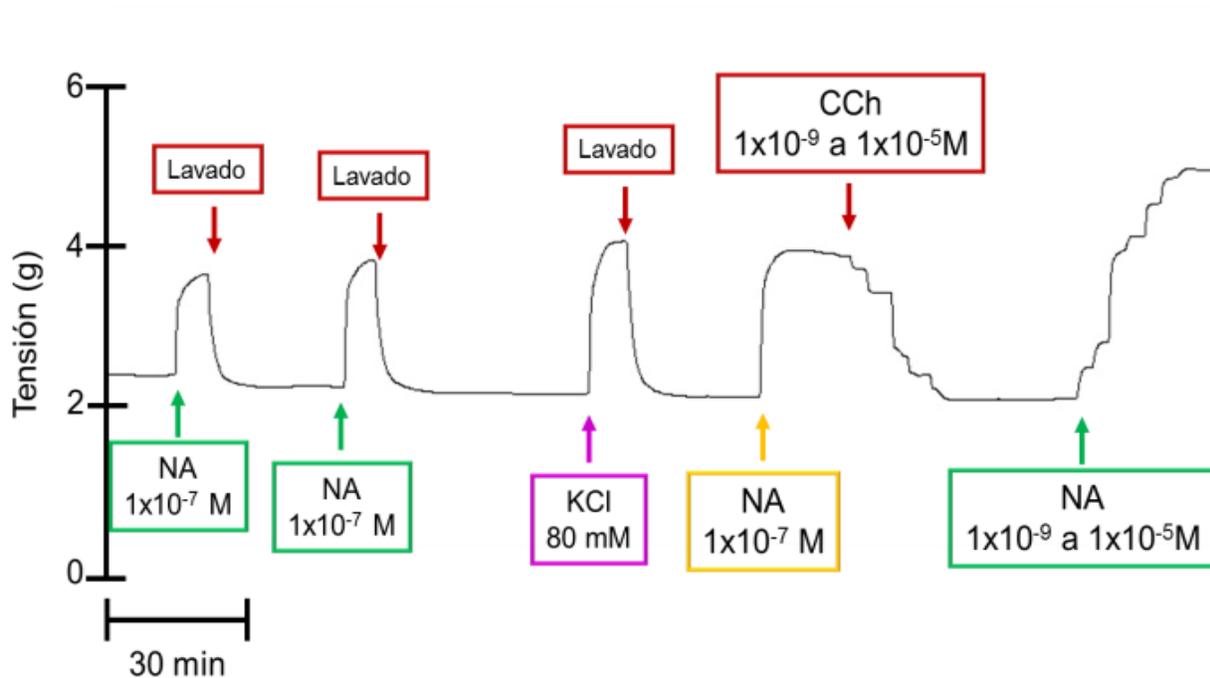
6.7 Evaluación de respuestas contráctiles y relajantes en la aorta torácica

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Posteriormente, la aorta torácica se extrajo y se limpió de tejido conectivo, cortando anillos de aproximadamente 3 mm de longitud. Los anillos se colocaron en cámaras para órgano aislado que contienen una solución de Krebs-Ringer de la siguiente composición (mM): NaCl 119.5, dextrosa 12, NaHCO₃ 24.9, KCl 4.74, MgSO₄ 7H₂O 1.18, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 2H₂O 2.5, EDTA 0.026). Las condiciones en que se mantuvieron los anillos en las cámaras fueron las siguientes: temperatura de 37°C, pH 7.4 y burbujeo constante con una mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Cada anillo arterial se colocó en dos ganchos de Nikrom; uno de estos ganchos se mantuvo fijo a la preparación del fondo de la cámara y el otro gancho a un transductor de tensión (Grass, modelo FTO3, Grass Inst., USA), el cual se conectó a un sistema de adquisición de datos (Biopac Systems, Inc. Modelo MP 100) para registrar los cambios en la tensión isométrica desarrollados por los anillos arteriales (Álvarez-Cámara, et al., 2019).

El protocolo para la evaluación de las respuestas contráctiles y relajantes consistió en una estabilización de la tensión (2-2.5 g) durante 30 minutos. Posteriormente los anillos fueron estimulados con noradrenalina (NA) (1×10^{-7} M); una vez que la respuesta alcanzó la meseta, se procedió a realizar lavados con la finalidad de que la respuesta regresara al estado basal y proceder a una segunda estimulación con NA (1×10^{-7} M), nuevamente se realizaron lavados y la tercera estimulación se realizó con KCl 80mM.

Para la evaluación de las respuestas relajantes, se desarrolló una curva concentración – respuesta a carbacol con incrementos de medios logaritmos (1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M) iniciando de manera acumulativa de la menor concentración a la mayor. Cuando la respuesta regresó a su estado basal se realizó la evaluación de las respuestas contráctiles por medio de una curva concentración-respuesta a NA igualmente que la curva anterior, las concentraciones fueron colocadas de manera acumulativa de la menor concentración a la mayor (1×10^{-9} M a 1×10^{-5} M) (Fig. 9).

Fig. 9. Evaluación de la función vascular



6.8 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media \pm e.e.m. Se realizó un análisis de varianza bifactorial de medidas repetidas (Two-Way ANOVA RM) para comparar los resultados obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa oral y curva de insulina, una vez que este análisis reveló diferencias significativas, los resultados fueron analizados con la prueba *post-hoc* de Tukey. La comparación de los resultados de frecuencia cardíaca y presión arterial fue realizada utilizando una prueba t de Student. Además, fue calculado el pEC_{50} y $E_{m\acute{a}x}$ de cada uno de los tratamientos mediante una regresión no lineal de una curva logística de 4 parámetros de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

Asimismo, el área bajo la curva de los cursos temporales de los niveles de glucosa e insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral fue calculada mediante el método de los trapecoides y se comparó el área bajo la curva de los grupos utilizando un análisis de varianza de una vía. Se consideró un cambio estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$.

6.9 *Compuestos utilizados*

Los compuestos utilizados en este estudio fueron: sulfhidrato de sodio monohidratado (NaHS), L-cisteína, DL-Propargilglicina, bitartrato de noradrenalina y carbacol. Todos los compuestos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.). El bitartrato de noradrenalina y carbacol fue disuelto en solución salina fisiológica 9%. Los compuestos NaHS, L-cisteína y DL-Propargilglicina fueron disueltos en amortiguador de fosfatos (PBS), estas soluciones tuvieron un pH de 7.4 y se mantuvieron a 25°C; además fueron preparadas diariamente.

7 RESULTADOS

7.1 Efecto del tratamiento crónico con fructosa 15% en la prueba de tolerancia a la glucosa oral y sobre las variables metabólicas

La Fig. 10 presenta los resultados obtenidos en área bajo la curva (ABC) de los niveles de glucosa e insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) en animales control y en animales tratados con fructosa 15% durante 16 semanas. El tratamiento crónico con fructosa 15% no modificó significativamente los valores de glucosa durante la PTGO en comparación con el grupo control (Fig. 10A). En marcado contraste, los valores de insulina obtenidos en la PTGO presentaron un incremento estadísticamente significativo del ABC entre el grupo control y el de fructosa 15% después de 16 semanas, lo cual indica la existencia de hiperinsulinemia en este último grupo (Fig. 10B).

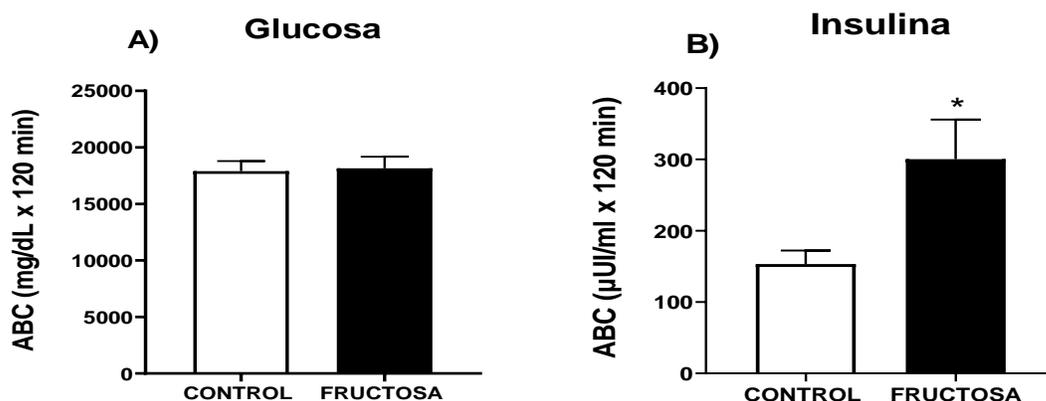


Figura 10. Áreas bajo la curva de los valores de glucosa e insulina. Las ABC de los valores de glucosa (A) e insulina (B) se determinaron en ratas Wistar macho control y ratas Wistar macho con fructosa 15% durante 16 semanas. Prueba ANOVA de una vía. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 5 animales. *, $P < 0.05$ vs control.

La tabla 2 muestra los niveles de insulina y glucosa, así como los valores del índice HOMA e índice Matsuda. De manera consistente con los resultados obtenidos en los cursos temporales y el ABC, el tratamiento con fructosa: (1) incrementó significativamente los niveles basales de insulina y el índice HOMA; y (2) disminuyó el índice Matsuda de manera significativa con respecto al grupo control. La determinación de estos parámetros

indica la existencia de resistencia a la insulina en el grupo que recibió fructosa 15% durante 16 semanas.

| | Insulina (μ UL/ml) | Glucosa (mg/dL) | Índice HOMA | Índice Matsuda |
|----------|----------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| Control | 8.4 \pm 1.4 | 82.8 \pm 4.3 | 1.7 \pm 0.3 | 3.3 \pm 0.6 |
| Fructosa | 24.7 \pm 3.5** | 89 \pm 4.8 | 5.3 \pm 0.5** | 1.3 \pm 0.1* |

Tabla 2. Efecto de la administración de fructosa 15% durante 16 semanas en ratas Wistar macho sobre los niveles de glucosa e insulina; valores de índice HOMA y Matsuda. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 5 animales. Prueba t de Student. *, P< 0.05; **, P< 0.01 vs control.

7.2 Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre la prueba de tolerancia a la glucosa oral y sobre las variables metabólicas

La Fig. 11 presenta los resultados de la prueba de tolerancia a la glucosa oral sobre las concentraciones de glucosa e insulina después de la administración de vehículo (1 ml/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) durante 4 semanas. Los resultados obtenidos se representan gráficamente como el área bajo la curva (ABC) para la comprobación de las diferencias estadísticas y del comportamiento de los grupos. Así, la Fig. 11A muestra que la administración de NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) durante 4 semanas no modificaron el ABC de los valores de glucosa con respecto al grupo que recibió vehículo. Además, el tratamiento crónico con L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) disminuyeron de manera estadísticamente significativa los niveles de insulina con respecto al grupo que recibió vehículo (Fig. 11B).

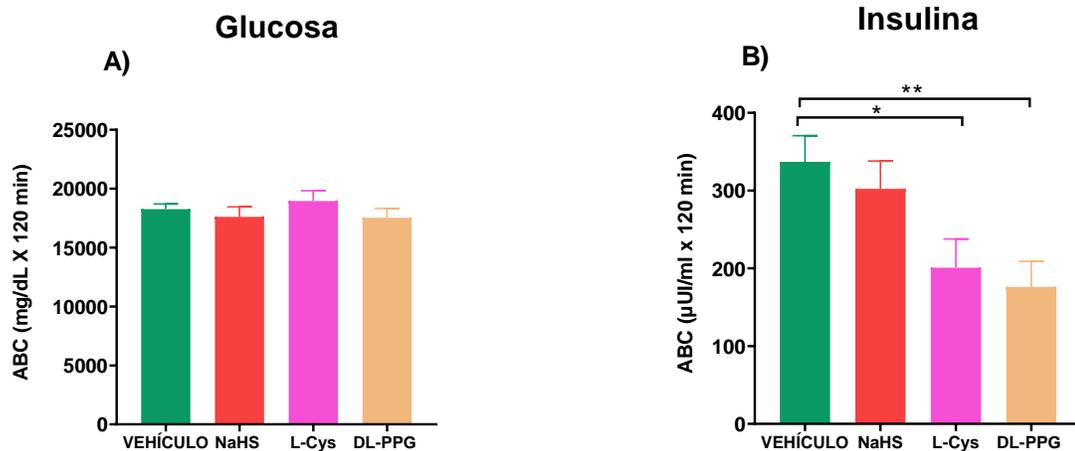


Figura 11. Efecto de la administración del vehículo (PBS; 1 mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) durante 4 semanas sobre las áreas bajo la curva de los valores de glucosa e insulina. Prueba ANOVA de una vía. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 5 animales. *, $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs vehículo.

En la tabla 3 se ilustra el efecto en los grupos: (1) sin tratamiento (fructosa); (2) vehículo; (3) NaHS; (4) L-Cys y (5) DL-PPG, sobre los valores de insulina, glucosa, índice HOMA e índice Matsuda en ratas con resistencia a la insulina inducida por fructosa.

La administración de NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) disminuyó de manera estadísticamente significativa los niveles de glucosa basales y el valor del índice HOMA cuando se comparó contra el grupo de fructosa 15%.

El tratamiento con L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) no modificó los valores de las variables metabólicas con respecto al grupo que recibió fructosa 15%. Finalmente, la administración de DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) disminuyó de manera estadísticamente significativa los niveles basales de insulina y el valor del índice HOMA cuando se comparó contra el grupo de fructosa 15%.

| | Insulina (μ UL/ml) | Glucosa (mg/dL) | Índice HOMA | Índice Matsuda |
|---------------------|----------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|
| Fructosa + Vehículo | 44 \pm 8.4 | 89.2 \pm 7.7 | 10.2 \pm 2.6 | 0.97 \pm 0.3 |
| Fructosa + NaHS | 21.2 \pm 1.4* | 75.4 \pm 1.8 | 3.9 \pm 0.2* | 1.5 \pm 0.1 |
| Fructosa + L-Cys | 16.5 \pm 3.2** | 94.2 \pm 2.8 | 3.9 \pm 0.8* | 1.4 \pm 0.2 |
| Fructosa + DL-PPG | 12 \pm 1.3** | 73.8 \pm 5.8 | 2.2 \pm 0.4** | 2.6 \pm 0.5* |

Tabla 3. Efecto de la administración del vehículo (PBS; 1 mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) durante 4 semanas sobre los valores de glucosa e insulina basal, índice HOMA y Matsuda en animales con resistencia a la insulina. Prueba ANOVA de una vía, * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001 vs vehículo.

7.3 Efecto de la resistencia sobre las variables hemodinámicas

La tabla 4 muestra las variables hemodinámicas (frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y presión arterial media) determinadas a las 16 y 20 semanas. El tratamiento con fructosa 15% durante 16 semanas incrementó significativamente los valores de la presión arterial sistólica, diastólica y media, comparado con el grupo control. Este incremento se mantuvo hasta la semana 20. Por otro lado, la frecuencia cardíaca no presentó cambios significativos.

| | 16 semanas | | | | 20 semanas | | | |
|-----------------|-------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|----------------|----------------|
| | FC (lpm) | PAS (mm Hg) | PAD (mm Hg) | PAM (mm Hg) | FC (lpm) | PAS (mm Hg) | PAD (mm Hg) | PAM (mm Hg) |
| Control | 335 \pm 1 | 125 \pm 3 | 82 \pm 0.6 | 95.6 \pm 1 | 348 \pm 9 | 123 \pm 2 | 88 \pm 4 | 99 \pm 3 |
| Fructosa 15% | 341 \pm 5 | 141 \pm 2*** | 111 \pm 2*** | 118 \pm 2*** | 355 \pm 12 | 149 \pm 3*** | 109 \pm 3** | 122 \pm 3*** |

Tabla 4. Efecto de la administración de fructosa 15% durante 16 y 20 semanas en ratas Wistar macho sobre los valores de frecuencia arterial (FC); presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM). Lpm, latidos por minuto. Prueba t de Student. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. **, P<0.01; ***, P<0.001 vs control.

7.4 Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las variables hemodinámicas en animales con resistencia a la insulina

En la tabla 5 se presentan las variables hemodinámicas obtenidas antes (16 semanas) y después (20 semanas) de la administración de los tratamientos (PBS, NaHS, L-Cys y DL-PPG). De esta forma, la administración de vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas) no modificó significativamente estas variables. En marcado contraste, la administración de NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) y L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) disminuyó significativamente los valores de presión arterial sistólica, diastólica y media, sin modificar significativamente la frecuencia cardíaca. Mientras que la administración de DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) incrementó significativamente los valores de presión arterial sistólica, diastólica y media, sin modificar significativamente la frecuencia cardíaca.

| | 16 semanas | | | | 20 semanas | | | |
|---------------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------------------|----------------------|---------------------|
| | FC (lpm) | PAS (mm Hg) | PAD (mm Hg) | PAM (mm Hg) | FC (lpm) | PAS (mm Hg) | PAD (mm Hg) | PAM (mm Hg) |
| Fructosa + Vehículo | 352±6 | 146±2 | 109±2 | 119±2 | 357±11 | 147±3 | 109±3 | 120±3 |
| Fructosa + NaHS | 354±8 | 150±3 | 109±3 | 122±2 | 357±15 | 141±3 [#] | 93±4 ^{##} | 109±3 ^{##} |
| Fructosa + L-Cys | 387±15 | 140±4 | 98±4 | 112±4 | 373±13 | 125±0.7 ^{###} | 84±2 ^{##} | 97±1 ^{##} |
| Fructosa + DL-PPG | 355±4 | 141±3 | 104±1 | 116±2 | 365±9 | 153±2 ^{##} | 115±2 ^{###} | 127±2 ^{##} |

Tabla 5. Efecto de: (1) vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas), (2) NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas), (3) L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) y (4) DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) en ratas Wistar macho sobre los valores de frecuencia arterial (FC); presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM). Lpm, latidos por minuto. Prueba t de Student. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6 animales. #, P<0.05; ##, P< 0.01; ###, P<0.001 vs el valor respectivo a las 16 semanas.

7.5 Efecto de la resistencia a la insulina y los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes en la aorta torácica

La figura 12 muestra los efectos de: (1) la administración de fructosa 15% durante 20 semanas; (2) el vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas); (3) el NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas); (4) L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) y (5) DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) sobre las respuestas relajantes inducidas por carbacol en la aorta torácica. Estas respuestas fueron evaluadas por concentraciones acumulativas de carbacol con respecto a la respuesta máxima obtenida con noradrenalina (eje de las abscisas). La relajación del grupo control fue del 90%. Por otro lado, el tratamiento con fructosa 15% disminuyó de manera estadísticamente significativa las respuestas relajantes inducidas por el carbacol al compararlas con el grupo control (Fig. 12A).

La administración del vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas) no modificó significativamente las respuestas relajantes cuando se comparó contra fructosa 15% (Fig. 12B). De manera interesante, el tratamiento con NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) y el tratamiento con L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) incrementaron las respuestas relajantes a un 80% cuando se comparó contra el vehículo (Fig. 12C y Fig. 12D). Por último, el tratamiento con DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) no modificó las respuestas relajantes generadas por la administración de vehículo.

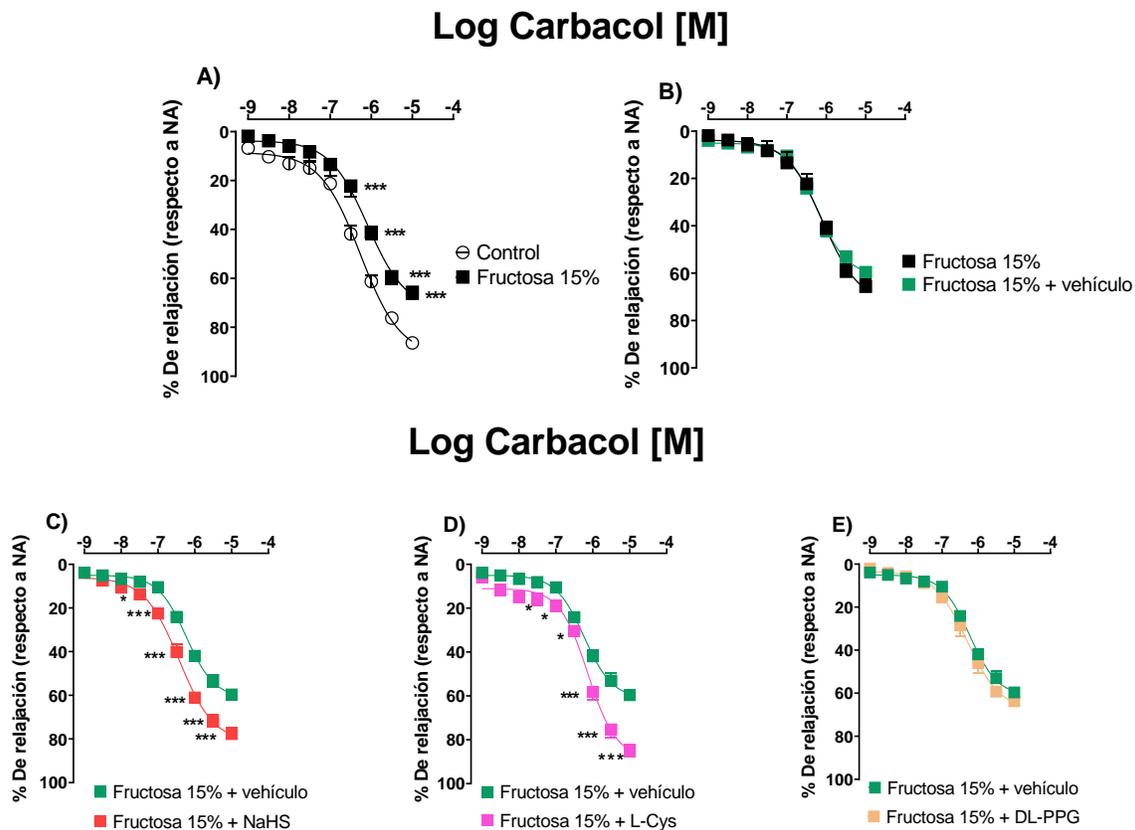


Figura 12. Efecto de la administración de: (A) fructosa 15% durante 20 semanas, (B) vehículo (PBS, 1 mL/kg durante 4 semanas), (C) NaHS (5.6 mg/kg, durante 4 semanas), (D) L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) y (E) DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) sobre las respuestas relajantes inducidas por carbacol en ratas Wistar macho. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Prueba two way anova RM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

7.6 Efecto de la resistencia a la insulina y los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas contráctiles en la aorta torácica

La figura 13 muestra los efectos de: (1) la administración de fructosa 15% durante 20 semanas; (2) el vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas); (3) el NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas); (4) L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) y (5) DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) sobre las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina en la aorta torácica. Estas respuestas fueron evaluadas por concentraciones acumulativas de noradrenalina y graficadas en porcentaje de respuesta. De esta forma, la administración de fructosa 15% durante 20 semanas no modificó las respuestas contráctiles al compararlas con el grupo control (Fig. 13A). Este mismo comportamiento de las respuestas a noradrenalina fue observado después de la administración durante 4 semanas de los tratamientos de NaHS, L-Cys y DL-PPG, al compararlos con el grupo que recibió vehículo (Fig. 13B-13E).

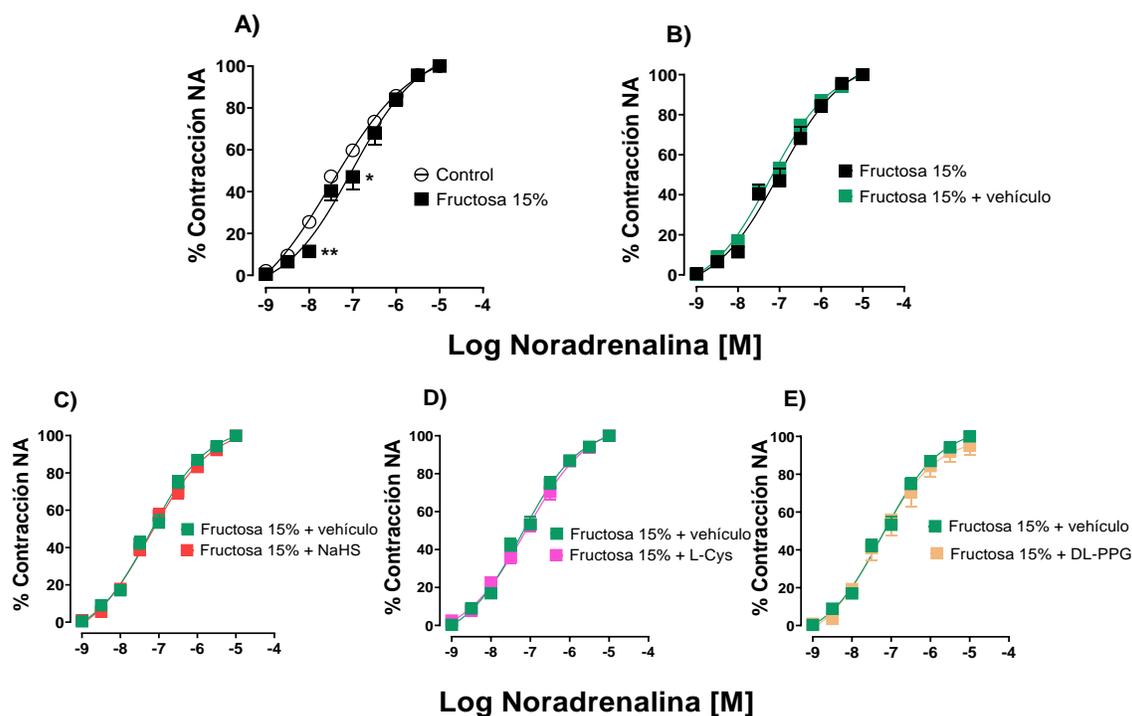


Figura 13. Efecto de la administración de: (A) fructosa 15% durante 20 semanas, (B) vehículo (PBS, 1 mL/kg durante 4 semanas), (C) NaHS (5.6 mg/kg, durante 4 semanas), (D) L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) y (E) DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) sobre las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina en ratas Wistar macho. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Prueba two way anova RM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

7.7 pEC₅₀ y E_{máx} de los tratamientos farmacológicos en ratas Wistar macho con resistencia a la insulina

En la tabla 6 son mostrados los resultados obtenidos en el logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pEC₅₀) y la eficacia máxima (E_{máx}) después de la administración de fructosa 15% durante 20 semanas, así como el efecto del tratamiento del vehículo (PBS 1mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) durante 4 semanas. Estos resultados coinciden con los mostrados en las figuras 12 y 13.

En la evaluación de las respuestas relajantes al carbacol, la pEC₅₀ del efecto relajante en animales tratados con NaHS (5.6 mg/kg) fue incrementado significativamente (6.43 ± 0.06) cuando se comparó contra la pEC₅₀ del carbacol en animales tratados con el vehículo (6.23 ± 0.06). En la evaluación de las respuestas contráctiles a noradrenalina, la pEC₅₀ del efecto contráctil en animales tratados con fructosa al 15% durante 20 semanas fue disminuido significativamente (7.01 ± 0.12) cuando se comparó contra la pEC₅₀ de noradrenalina en animales control (7.5 ± 0.20).

La E_{máx} del grupo de fructosa 15% durante 20 semanas, sobre las respuestas relajantes, disminuyó de manera estadísticamente significativa ($72.70\% \pm 6.65$) cuando se comparó contra el grupo control ($91.58\% \pm 4.26$). En contraste, el tratamiento con NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) y con L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) incrementó significativamente la E_{máx} ($81.45\% \pm 3.13$ y $88.27\% \pm 4.4$ respectivamente) cuando se comparó contra el vehículo ($61.30\% \pm 2.43$).

Por otra parte, la E_{máx} de las respuestas contráctiles del grupo de fructosa 15% durante 20 semanas no presentó cambios estadísticamente significativos cuando se comparó contra el grupo control, este mismo comportamiento fue observado cuando los tratamientos farmacológicos se compararon contra el grupo que recibió vehículo por medio de una curva logística de 4 parámetros.

| Respuestas relajantes | | |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| | pEC₅₀ | E_{máx} (%) |
| Control | 6.26 ± 0.07 | 91.58 ± 4.26 |
| Fructosa 15% | 6.09 ± 0.13 | 72.70 ± 6.65* |
| Fructosa + Vehículo | 6.23 ± 0.06 | 61.30 ± 2.43 |
| Fructosa + NaHS | 6.43 ± 0.06 [#] | 81.45 ± 3.13 ^{###} |
| Fructosa + L-Cys | 6.13 ± 0.07 | 88.27 ± 4.4 ^{###} |
| Fructosa + DL-PPG | 6.30 ± 0.09 | 67.99 ± 4.4 |
| Respuestas contráctiles | | |
| | pEC₅₀ | E_{máx} (%) |
| Control | 7.50 ± 0.20 | 108.9 ± 7.9 |
| Fructosa 15% | 7.01 ± 0.12* | 109.3 ± 7.6 |
| Fructosa + Vehículo | 7.20 ± 0.09 | 105.1 ± 4.3 |
| Fructosa + NaHS | 7.25 ± 0.09 | 105.5 ± 4.6 |
| Fructosa + L-Cys | 7.10 ± 0.08 | 107.9 ± 4.9 |
| Fructosa + DL-PPG | 7.30 ± 0.19 | 99.6 ± 7.8 |

Tabla 6. Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pEC₅₀) y eficacia máxima (E_{máx}) de las respuestas relajantes y contráctiles en animales tratados con: (1) fructosa 15% durante 20 semanas; (2) fructosa + vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas); (3) fructosa + NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas); (4) fructosa + L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas); (5) fructosa + DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) sobre las respuestas relajantes inducidas por carbacol y las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina. Cada punto representa la media ± e.e.m. de 6 animales. *, P<0.05 vs control; #, P<0.05; ###, P<0.001 vs vehículo.

8 RESUMEN DE RESULTADOS

8.1 El consumo de fructosa 15% durante 16 semanas en ratas Wistar macho: (1) no cambió los niveles de glucosa; (2) incrementaron significativamente los niveles de insulina y el índice HOMA; (3) disminuyó el índice Matsuda; (4) incrementó los valores de presión arterial; (5) redujo las respuestas vasorrelajantes a carbacol; y (6) incrementó las respuestas contráctiles a noradrenalina.

- 8.2 El tratamiento crónico con NaHS y L-Cisteína en ratas Wistar macho: (1) no modificó los niveles de glucosa; (2) disminuyó los niveles de insulina y el índice HOMA; (3) disminuyó los valores de presión arterial; y (4) incrementó las respuestas relajantes a carbacol sin modificar las respuestas contráctiles a noradrenalina, en la arteria torácica de la rata con resistencia a la insulina inducida por fructosa.
- 8.3 El tratamiento crónico con DL-PPG en ratas Wistar macho: (1) No cambió los niveles de glucosa; (2) disminuyó los niveles de insulina y el índice HOMA; (3) incrementó el índice Matsuda y los valores de presión arterial; (5) no modificó las respuestas relajantes a carbacol y las respuestas contráctiles a noradrenalina en la arteria torácica de la rata con resistencia a la insulina inducida por fructosa.

9 DISCUSIÓN

Existen diversas líneas de investigación que demuestran la relación entre el H₂S y algunas enfermedades metabólicas, como la resistencia a la insulina, la obesidad y la Diabetes Mellitus tipo 2. Con base en estos hallazgos, se han estudiado modelos de RI inducida por fructosa los cuales se centran en la evaluación de los cambios metabólicos, disfunción endotelial y mecanismos fisiopatológicos. Así, se ha demostrado que el consumo de fructosa al 15% durante 16 semanas tiene efectos sobre las variables metabólicas, hemodinámicas y las respuestas del tono simpático vasopresor (Gutiérrez et al., 2016). Por otro lado, el consumo de fructosa al 10% durante 8 semanas produce efectos sobre el tejido adiposo perivascular y el endotelio (Huang et al., 2010). Los mecanismos por los cuales el H₂S ejerce sus efectos siguen siendo controversiales, pero con el paso del tiempo se ha prestado gran interés en emplearlo como posible tratamiento para enfermedades cardiovasculares, en las que se incluyen la lesión por isquemia-reperusión (Zhu et al., 2007; Elrod et al., 2007), accidente cerebrovascular e hipertensión (Meng et al., 2015).

9.1 Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las variables metabólicas

Nuestros resultados demuestran que el consumo de fructosa al 15% durante 16 semanas, no modificó los niveles de glucosa durante la PTGO. El análisis del índice HOMA, que indica la resistencia a la insulina en condiciones de ayuno, reveló un incremento en los niveles de insulina y se observó un decremento en el índice Matsuda-DeFronzo cuando se comparó contra el grupo control (Tabla 2). Estos resultados indican que el consumo de fructosa 15% genera hiperinsulinemia y resistencia a la insulina sin cambios en los niveles de glucosa en sangre. Al respecto se ha reportado que la alimentación con alto contenido de fructosa induce hiperinsulinemia (Hannou et al., 2018), la cual a su vez actúa como un mecanismo compensador durante la resistencia a la insulina (Sesti, 2006). Por otro lado, como se ha demostrado anteriormente, la probable explicación a la ausencia de cambios en los niveles de glucosa en sangre se debe a que existe suficiente secreción de insulina por las células pancreáticas para evitar la hiperglucemia (Motta et al., 2017; Sommese et al., 2016; Yin et al., 2013).

La resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% durante 16 semanas probablemente se deba a que la fructosa está influyendo sobre la vía de señalización de la insulina, debido a que el consumo de fructosa incrementa los niveles de triglicéridos (Gutiérrez-Lara et al., 2016). Estos a su vez favorecen la formación de ceramidas y activan a la enzima fosfatasa 2A (PP2A) que desfosforila a la proteína cinasa B (AKT); esto genera un bloqueo en la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática. Otro mecanismo que podría estar involucrado es la liberación de ácidos grasos libres ya que la fructosa estimula su liberación y éstos pueden activar los receptores tipo toll TLR4 que activan a las cinasas JNK. Las cinasas actúan sobre el sustrato de insulina y también conducen a la activación de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α (Kim et al., 2012).

Por otro lado, la administración crónica de los tratamientos farmacológicos durante 4 semanas no modificó los niveles de glucosa en sangre (tabla 3). En contraste la administración de NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) produjo una disminución parcial de los valores basales de insulina y del índice HOMA, lo cual indica su posible participación en la regulación de la secreción de insulina. Esto se ha observado en estudios donde tras incubar células de músculo esquelético de ratón con NaHS (50 μ M por 30 minutos) la resistencia a la insulina disminuye. Efecto que podría estar mediado por las vías Ca^{2+} /CaMKK2/AMPK y PI3K/AKT (Chen et al., 2017).

Además, la administración con L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) disminuyeron de manera estadísticamente significativa los niveles de insulina basales cuando se compararon contra el grupo que recibió vehículo (PBS 1 mL/kg) (Fig. 11). Estudios en animales han demostrado que la administración de L-Cys mejora el metabolismo de la glucosa (Jain et al., 2009). La cisteína tiene una acción similar a la insulina, promoviendo la entrada de glucosa en los adipocitos, mediada por su grupo SH libre (Jain et al., 2009; Blouet et al., 2007). Se han propuesto algunos mecanismos para estudiar los efectos del H_2S sobre la secreción de la insulina. Uno de los más estudiados se basa en la activación de los canales de K^+_{ATP} en las células β pancreáticas (Beltowski et al., 2018). La administración crónica durante 4 semanas de DL-PPG (10 mg/kg) disminuyó los niveles basales de insulina, el índice HOMA e incrementó el índice Matsuda (tabla 3). Nuestros resultados son congruentes con los datos publicados por Geng et al. (2013) donde la administración de DL-PPG genera una disminución en los niveles de insulina, así como el índice HOMA por la vía de la proteína cinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Geng et al., 2013). AMPK tiene un papel esencial en la vía de señalización de la

insulina, debido a que fosforila directamente al IRS-1 y así contribuye a la sensibilidad a la insulina.

9.2 Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las variables hemodinámicas

De acuerdo a lo reportado por la literatura, los valores normales de frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica y diastólica en una rata adulta, son: 350-450 lpm, 84-134 mm Hg y 60 mm Hg respectivamente (Wolfensohn y Lloyd, 2003). El consumo de fructosa 15% generó hipertensión a partir de la semana 16 y se mantuvo hasta la semana 20 sin modificar los valores de frecuencia cardíaca (tabla 4). Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios previos (Gutiérrez-Lara et al., 2016; Huang et al., 2010). La explicación a esto se debe a la influencia de la resistencia a la insulina y los mecanismos asociados con disfunción endotelial ya que durante la resistencia a la insulina la producción de NO se encuentra disminuida y esto produce un aumento en la presión arterial (Vanhoutte et al., 2016). Estos cambios son generados principalmente a nivel de vasos sanguíneos, por lo que no se modifican los valores de frecuencia cardíaca (Thackerary et al., 2011; Vanhoutte et al., 2016).

Por otro lado, la administración de NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) y L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) disminuyó significativamente los valores de presión arterial sistólica, diastólica y media (tabla 5). Nuestros resultados son congruentes con lo observado en otros estudios, en los que se han reportado las propiedades antihipertensivas de donadores de H₂S en modelos animales de hipertensión (Ahmad et al., 2014; Huang et al., 2015). En ratones KO para la enzima CSE se ha observado hipertensión y disminución en las respuestas relajantes dependientes de endotelio, lo que sugiere un papel fisiológico importante del sulfuro de hidrógeno en la regulación del tono vascular y la presión arterial. Por otro lado, se ha descrito que en animales con Diabetes Mellitus tipo 2, la administración de NaHS disminuye la presión arterial sistólica (Gheibi et al., 2019). Además, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), el contenido de H₂S en plasma y la expresión de la enzima CSE se encuentran notablemente disminuidos. De manera interesante, cuando se administra NaHS los efectos anteriormente mencionados fueron revertidos parcialmente (Sun et al., 2015). Nuevamente la explicación a su efecto antihipertensivo está relacionado con la apertura de los canales K⁺_{ATP} (Beltowski et al., 2018).

De manera similar, existe evidencia sobre los efectos antihipertensivos del aminoácido L-cisteína (precursor de H₂S), principalmente de su análogo N-acetilcisteína del cual se ha demostrado que previene o atenúa el incremento de los valores de presión en modelos animales y humanos (Vasdev et al., 2009). La administración oral de N-acetilcisteína, en una dosis de 4 g/kg/día en el agua de beber durante 2 semanas (Cabassia et al., 2001) y 4 semanas (Girouard et al., 2003) redujo la presión arterial sistólica y presión arterial media, respectivamente. Hasta el momento no hay suficientes estudios que demuestren su actividad en humanos, pero de acuerdo a lo reportado en la bibliografía, en un estudio realizado a 6 sujetos hipertensos, la administración de N-acetilcisteína en una dosis de 1.2 g/día durante una semana disminuyó de manera estadísticamente significativa la presión arterial sistólica y diastólica (Suarez et al., 1995). El mecanismo que emplea la cisteína para reducir la hipertensión está relacionado con sus efectos antioxidantes. Se sabe que el estrés oxidativo se incrementa durante la hipertensión. Por lo tanto, la cisteína puede actuar de dos formas: (1) directamente sobre especies oxidantes como el dióxido de nitrógeno (NO₂) y ácidos hipohalosos (HOX) (Aldini et al., 2018); (2) indirectamente por medio del glutatión para reducir el estrés oxidativo, en este mecanismo intervienen los pares redox GSH/GSSG que incrementan las respuestas antioxidantes (Girouard et al., 2003). En nuestro estudio, los animales que recibieron tratamiento con L-cisteína presentaron resistencia a la insulina, el cual es un factor que contribuye al incremento de la presión arterial. Como se mencionó anteriormente el tratamiento con L-cisteína durante 4 semanas disminuyó la hiperinsulinemia y la hipertensión arterial. De manera interesante, se ha reportado que el sistema CSE/H₂S ejerce sus propiedades antihipertensivas a través de la vasodilatación aórtica en la que intervienen mecanismos como: (1) estimulación directa de los canales K⁺_{ATP} de las células del músculo liso vascular, (2) inducción de la vía MAPK y (3) reducción de la acumulación de homocisteína (Huang et al., 2015).

La administración de DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) incrementó significativamente los valores de presión arterial sistólica, diastólica y media (tabla 5). En un estudio realizado en ratas anestesiadas, se ha reportado que la DL-PPG incrementa la actividad del nervio simpático renal (Guo et al., 2016). El efecto de la DL-PPG, el cual es contrario a lo observado con NaHS y L-Cys, probablemente es debido a la disminución de la producción de H₂S endógeno al inhibir la CSE e involucre un aumento en la actividad del tono simpático.

9.3 Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes y contráctiles en aorta torácica

Nuestro estudio analizó las respuestas vasorrelajantes y vasocontráctiles generadas por la administración intraperitoneal de vehículo (PBS; 1 mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) durante 4 semanas sobre la aorta torácica de ratas con resistencia a la insulina.

De acuerdo a lo observado en los resultados, el consumo de fructosa 15% durante 20 semanas disminuyó de manera estadísticamente significativa las respuestas relajantes generadas por carbacol (Fig. 12A; tabla 6) cuando se comparó contra el grupo control. Estos resultados son similares con lo reportado en otros estudios en donde el consumo de fructosa 10% durante 8 semanas (Mahmoud et al., 2011) y 12 semanas (El-Bassossy et al., 2014) disminuyó las respuestas relajantes inducidas por ACh. Este efecto en la respuesta se basa principalmente en la integridad del endotelio y la producción de factores relajantes y contráctiles (Fernández, 2010). El consumo de fructosa genera resistencia a la insulina la cual a su vez es el mecanismo subyacente a la disfunción endotelial (Vanhouette et al., 2016). Así, la disminución de la respuesta vasorrelajante en el grupo que consumió fructosa 15% durante 20 semanas podría ser debida a: (1) menor producción de NO e incremento en la expresión de factores contráctiles; (2) producción de peroxinitritos; (3) aumento de ROS; (4) liberación de ácidos grasos y (5) producción de factores que están involucrados en la inflamación crónica como el TNF- α .

Por otro lado, en el presente trabajo se demostró que la administración de NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) incrementó las respuestas vasorrelajantes de la aorta torácica cuando se comparó contra el grupo que recibió vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas) (Fig. 12C; tabla 6). Al respecto se ha propuesto que el H₂S es un factor hiperpolarizante derivado del endotelio y factor relajante derivado de adipocito (ADRF). Además su principal función se basa en la relajación y los mecanismos propuestos para explicar tal efecto son: (1) la activación de canales K⁺_{ATP}, IK_{Ca} y Kv (Centeno et al., 2019); (2) inhibición de la fosfodiesterasa 5 (PDE5) (Bucci et al., 2010); (3) disminución en el estrés oxidativo (Dongo et al., 2018); (4) inhibición de la citocromo oxidasa C (Gheibi et al., 2018); (5) inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial (Dongo et al., 2018); (6) liberación de CGRP (Eberhardt et al., 2014; Hanja et al., 2016; White et al., 2013).

Los efectos del consumo de fructosa 15% durante 20 semanas sobre las respuestas relajantes probablemente hayan sido revertidos debido a que la administración de NaHS:

(1) disminuya la producción de especies de oxígeno reactivas; (2) disminuya la producción de factores inflamatorios como el TNF- α ; (3) incremente la actividad de NO y/o (4) active los canales K^+_{ATP} .

Nuestros resultados concuerdan con lo demostrado en un modelo experimental de diabetes inducido por estreptozotocina en ratones en el cual se observó que la administración crónica de NaHS reduce el estrés oxidativo, incrementa las respuestas vasorrelajantes y disminuye la disfunción endotelial (Ng et al., 2017). Además, se ha reportado que el H_2S puede interactuar con el NO. Al respecto, un estudio sobre la aorta torácica de rata y anillos de la arteria mesentérica demostró que la administración exógena de Na_2S (sulfuro de sodio, donador de H_2S) junto con S-nitrosoglutatión (GSNO) produjo relajación vascular de forma más pronunciada y rápida que la administración *per se* de Na_2S y GSNO (Berenyiova et al., 2015). Además, existe evidencia que demuestra que, en presencia de NO, el H_2S actúa como una molécula moduladora, pero en ausencia de NO, se convierte en una molécula vasodilatadora compensadora (Kuo et al., 2016). De esta evidencia, es posible que la administración de NaHS en nuestro trabajo esté actuando como molécula compensadora y favoreciendo el incremento de las respuestas relajantes.

De manera interesante, la administración de L-Cys (300 mg/kg durante 4 semanas) también incrementó las respuestas relajantes en los animales que presentaban resistencia a la insulina (Fig. 12D; tabla 6) cuando se comparó contra el grupo que recibió vehículo. Como se mencionó anteriormente, la cisteína es el aminoácido precursor de la síntesis de H_2S , por lo que probablemente la administración exógena de este aminoácido esté favoreciendo: (1) el funcionamiento del sistema CSE/ H_2S ; (2) la producción de H_2S ; (3) la disminución del estrés oxidativo. Existe evidencia donde cultivos de células de aorta torácica de ratas cultivadas con N-acetilcisteína presentan un incremento en las respuestas relajantes, atribuido principalmente a la activación de los canales K^+_{ATP} (Vezir et al., 2017). Además, la vía CSE/ H_2S desempeña una función importante en la angiogénesis, en particular en el aumento del crecimiento, migración de las células endoteliales y longitud de la red vascular (Huang et al., 2015).

En contraste, la administración del inhibidor DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas) no modificó las respuestas relajantes cuando se comparó contra el grupo que recibió vehículo (Fig. 12E). Este inhibidor podría estar actuando sobre la enzima CSE bloqueando su actividad y deteniendo la producción de H_2S . Sin embargo, también es

probable que la hipertensión disminuya la enzima CSE y al inhibir con DL-PPG ya no se observe un efecto sobre las respuestas relajantes (Dongo, et al., 2017).

Las respuestas observadas con el tratamiento de L-Cys y DL-PPG concuerdan con lo reportado en un estudio de tiras musculares. En este estudio la administración de L-Cys disminuyó las respuestas contráctiles, mientras que, la administración de DL-PPG revirtió el efecto obtenido con L-Cys (Nalli et al., 2017).

Por otra parte, al evaluar las respuestas contráctiles a noradrenalina se observó que el consumo de fructosa 15% durante 20 semanas y la administración de los tratamientos durante 4 semanas no afectaron las respuestas contráctiles a noradrenalina (agonista $\alpha_{1/2}$ adrenérgico), lo que podría indicar que no se presentó efecto sobre las respuestas adrenérgicas.

Este efecto probablemente sea debido al tiempo de consumo de fructosa. En este sentido, existe evidencia donde se demuestra que los efectos de la alimentación con fructosa dependen de la concentración y del tiempo. Por otro lado, en estudios realizados en ratas con diabetes inducida por STZ se encontró una atenuación en los receptores α_1 adrenérgicos (Leung et al., 2010). La variación de las respuestas vasoconstrictoras que se han reportado puede reflejar diferencias en el diseño experimental, la cepa de rata utilizada, la duración de la administración con fructosa, la forma en la que se midieron las respuestas vasculares o el tejido vascular utilizado en estudios *in vitro*.

10 CONCLUSIONES

El H₂S revierte la hipertensión y la disfunción vascular presentes en la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15%, sugiriendo que el H₂S influye en la regulación del metabolismo y del sistema cardiovascular. Estos hallazgos podrían tener un potencial uso terapéutico.

11 PERSPECTIVAS

- 11.1 Investigar como el tratamiento crónico con NaHS disminuye parcialmente la resistencia a la insulina y está implicado en la disminución de variables hemodinámicas como la presión arterial.
- 11.2 Elucidar el mecanismo mediante el cual el tratamiento con H₂S revierte las respuestas producidas por el consumo de fructosa en la función vascular.
- 11.3 Identificar la expresión de la enzima CSE en aorta torácica en ratas sin tratamiento y ratas con resistencia a insulina (tratamiento con fructosa).
- 11.4 Evaluar la participación de canales iónicos que podrían probablemente estar involucrados en los mecanismos de H₂S.

12 REFERENCIAS

- Aaronson, P., Ward, J., Connolly, M. (2012). *The Cardiovascular System at a Glance*. Wiley-Blackwell. 4ª edición.
- Abe, K. and Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J. Neurosci.*, 16(3), 1066-1071.
- Abraham, N.G., Abraham, N.G., Sodhi, K., Silvis, A.M., Vanella, L., Favero, G., Rezzani, R., Lee, C., Zeldin, D.C., Schwartzman, M.L. (2015). CYP2J2 targeting to endothelial cells attenuates adiposity and vascular dysfunction in mice fed a high-fat diet by reprogramming adipocyte phenotype. *Hypertension.*, 64(6), 1352–1361.
- Air, WC. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function and mechanism. *Circ Res.*, 100(2), 158-173.
- Ahmad, FU., Sattar, MA., Rathore, HA., Tan, YC., Akhtar, S., Jin, OH (2014). Hydrogen sulphide and tempol treatments improve the blood pressure and renal excretory responses in spontaneously hypertensive rats. *Ren. Fail.*, 36(4), 598–605.
- Aldini, G., Altomare, A., Baron, G., Vistoli, G., Carini, M., Borsani, L., Sergio, F. (2018). N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res.*, 52(7), 751-762.
- Álvarez-Cámara, J., Ramírez-Rosas, M., Medina-Terol, G., Silva-Velasco, D., Velazco-Paz, A., Sánchez-López, A., Guzmán-Priego, C., Osuna-Martínez, U., Centurión, D. (2019). Potential vascular α 1-adrenoreceptor blocking properties of metformin in rat aorta and tail artery. *Eur. J. Pharmacol.*
- Angulo, N., Barbella de Szarvas, S., Mathison, Y., Hadad, E., González, D., Hernández, A., Guevara, H. (2013). Diagnosis of insulin resistance by indirect methods in obese school children. *Redalyc.*, 54(2),149-160.

Referencias

- Aronne, L., Segal, K. (2002). Adiposity and Fat Distribution Outcome Measures: Assessment and Clinical Implications. *Obes. Res.*, 1, 14S-21S.
- Bazotte, R.B., Silva, L.G., Schiavon, F.P., (2014). Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin? *Cell. Cycle.*, 13(16), 2494 –2500.
- Beltowski, J., Wójcicka, G., Wisniewska, A. (2018). Hydrogen sulfide in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity: Implications for the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *Biochem. Pharmacol.*, 149, 60-76.
- Berenyiova, A., Grman, M., Mijuskovic, A., Stasko, A., Misak, A., Nagy, P., Ondriasova, E., Cacanyiova, S., Brezova, V., Feelisch, M., Ondrias, K. (2015). The reaction products of sulfide and S-nitrosoglutathione are potent vasorelaxants. *Nitric Oxide.*, 46,123-30.
- Bhatia, M., Sidhapuriwala, J., Wei, S., Tamizhselvi, R., Moochhala, S. (2008). Pro-inflammatory effects of hydrogen sulphide on substance P in caerulein-induced acute pancreatitis. *J. Cell. Mol. Med.*, 12(2), 580-590.
- Blouet, C., Mariotti, F., Mikogami, T., Tomé, D., Huneau, J. (2007). Meal cysteine improves postprandial glucose control in rats fed a high-sucrose meal. *J. Nutr. Biochem.*, 18(8), 519-24.
- Blouet, C., Mariotti, F., Azzout-Marniche, D., Mathé, V., Mikogami, T., Tomé, D., Huneau, J. (2007). Dietary cysteine alleviates sucrose-induced oxidative stress and insulin resistance. *Free. Radic. Biol. Med.*, 42(7), 1089-97.
- Bray, G., Lovejoy, J., Smith, S., DeLany, J., Lefevre, M., Hwang, D., Ryan, D., York, D. (2002). The Influence of Different Fats and Fatty Acids on Obesity, Insulin Resistance and Inflammation. *J. Nutr.*, 132(9), 2488-2491.
- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., Cirino, G. (2010). Hydrogen Sulfide Is an Endogenous Inhibitor of Phosphodiesterase Activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 30(10), 1998–2004.

- Cabassia, A., Dumont, EC., Girouard, H., Bouchard, J-F., Le Jossec, M., Lamontagne, D., Besner, J-G., de Champlain, J. (2001) Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 19(7), 1233-1244.
- Centeno, J., López-Morales, M., Aliena-Valero, A., Jover-Mengual, T., Burguete, M., Castelló-Ruiz, M., Miranda, F. (2019). Potassium channels contribute to the increased sensitivity of the rabbit carotid artery to hydrogen sulfide in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.*, 853, 33-40.
- Cersosimo, E., Triplitt, C., Solis-Herrera, C., Mandarino, L., DeFronzo, R. (2018). Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279115/>.
- Chen, X., Zhao, X., Lan, F., Zhou, T., Cai, H., Sun, H., Kong, W., Kong, W. (2017). Hydrogen Sulphide Treatment Increases Insulin Sensitivity and Improves Oxidant Metabolism through the CaMKKbeta-AMPK Pathway in PA-Induced IR C2C12 Cells. *Sci. Rep.*, 1-13.
- Cheng, A.M., Rizzo-DeLeon, N., Wilson, C.L., Lee, W.J., Tateya, S., Clowes, A.W., Schwartz, M.W. & Kim, F. (2014). Vasodilator-stimulated phosphoprotein protects against vascular inflammation and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 307,571 –579.
- De la Serna, F. (2010). Endotelio. Retrieved from https://nanopdf.com/download/endotelio-5b09ccfe4f7ed_pdf.
- Denizalti, M., Bozkurt, T., Akpulat, U., Sahin-Erdemli, I., Abacioglu, N. (2011). The vasorelaxant effect of hydrogen sulfide is enhanced in streptozotocin-induced diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 383(5), 509-517.

Referencias

- Distrutti E, Cipriani S, Renga B, Mencarelli A, Migliorati M, Cianetti S, Fiorucci S. (2010). Hydrogen sulphide induces opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. *Mol. Pain.*, 6, 36, 2-16.
- Du, J., Fan, L.M., Mai, A. & Li, J.M. (2013). Crucial roles of Nox2-derived oxidative stress in deteriorating the function of insulin receptors and endothelium in dietary obesity of middle-aged mice. *Br. J. Pharmacol.*, 170(5), 1064 –1077.
- Dongo, E., Beliczai-Marosi, G., Dybvig, A., Kiss, L. (2018). The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric oxide*. 81: 75-87.
- Dvorkin, M.A., Cardinali, D. (2011). Bases fisiológicas de la Práctica Médica. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, TI., de la Roche, J., Fischer, M., Suárez, SA., Bikiel, D., Dorsch, K., Leffler, A., Babes, A., Lampert, A., Lennerz, JK., Jacobi, J., Martí, MA., Doctorovich, F., Högestätt, ED., Zygmunt, PM., Ivanovic-Burmazovic, I., Messlinger, K., Reeh, P., Filipovic, MR. (2014). H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat. Commun.*, 5, 4381.
- El-Bassossy, H., Dsokey, N., Fahmy, A. (2014). Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic syndrome. *Toxicol. Mech. Methods.*, 24(8), 536-543.
- Elrod, J., Calvert, J., Morrison, J., Doeller, J., Kraus, D., Tao, L. Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C., Lefer, D. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104(39), 15560-15565.
- Evans, J. (2013). Lo esencial en sistema cardiovascular. Elsevier España.

Referencias

- Feher, A., Cassuto, J., Szabo, A., Patel, V., Vinayak Kamath, M. & Bagi, Z. (2013). Increased Tissue angiotensin-converting enzyme activity impairs bradykinin induced dilation of coronary arterioles in obesity. *Circ. J.*, 77 (7), 1867–1876.
- Félétou, M., Vanhoutte, P.M. (2013). Endothelium-dependent hyperpolarization. *J Cardiovasc. Pharmacol.*, 61(2), 91 –92.
- Feng, X., Chen, Y., Zhao, J., Tang, C., Jiang, Z., Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380(1), 153-159.
- Furchgott, R.F. (1988). Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: P.M. Vanhoutte (ed.) *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium*, 401 –414. Raven Press, New York, NY.
- Geng, B., Cai, B., Liao, F., Zheng, Y., Zeng, Q., Fan, X., Gong, Y., Yang, J., Cui, QH., Tang, C., Xu, GH. (2013). Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. *PLoS One* 8, e73892.
- Geng, B., Yang, J., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J., & Tang, C. (2004). H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(2), 362–8.
- Giorgino F., Laviola L., Eriksson, JW. (2005). Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta. Physiol. Scand.*, 183(1),13–30.
- Gutiérrez-Lara, E., Navarrete-Vázquez, G., Sánchez-López, A., Centurión, D. (2017). Pharmacological evaluation of metformin and N-benzylbiguanide, a novel analogue of metformin, on the vasopressor responses to adrenergic system stimulation in

- pithed rats with fructose-induced insulin resistance. *Eur. J. Pharmacol.*, 814,313-323.
- Girouard, H., Chulak, C., Wu, L., Lejossec, M., de Champlain, J. (2003) N-acetylcysteine improves nitric oxide and alpha-adrenergic pathways in mesenteric beds of spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens.*, 16(7), 577-584.
- Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., Ghasemi, A. (2018). Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem. Pharmacol.*, 149, 42-59.
- Guo, Q., Wu, Y., Xue, H., Xiao, L., Jin, S., Wang, R. (2016). Perfusion of Isolated Carotid Sinus With Hydrogen Sulfide Attenuated the Renal Sympathetic Nerve Activity in Anesthetized Male Rats. *Physiol. Research.*, 65(3), 413-423.
- Hajna, Z., Saghy, .., Payrits, M., Aubdool, A. A., Szoke, .., Pozsgai, G., Pinter, E. (2016). Capsaicin-Sensitive Sensory Nerves Mediate the Cellular and Microvascular Effects of H₂S via TRPA1 Receptor Activation and Neuropeptide Release. *J. Mol. Neurosci.*, 60(2), 157–170.
- Han, Y., Qin, J., Chang, X., Yang, Z., Tang, X., Du, J. (2005). Hydrogen sulfide may improve the hippocampal damage induced by recurrent febrile seizures in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327(2), 431– 436.
- Hannou, SA., Haslam, DE., McKeown, NM., Herman, MA. (2018). Fructose metabolism and metabolic disease. *J. C. Invest.*, 128(2), 545-555.
- Hong, E., Medina, J., Silva-Arzave, A. (2016). Antihyperglycemic Effect of 5-HT₂ Receptor Stimulation Induced by indorenate, a serotonin analog. *The FASEB Journal*.
- Huang, S., Li, H., Ge, J. (2015) A cardioprotective insight of the cystathionine γ -lyase/hydrogen sulfide pathway. *Int. J. Cardiol. Heart. Vasc.*, 7, 51-57.

Referencias

- Huang, F., Lezama, M., Pérez, J., Bravo, G., Villafaña, S., Estela del Rio-Navarro, B., Hong, E. (2010). Effect of Losartan on Vascular Function in Fructose-Fed Rats: The Role of Perivascular Adipose Tissue. *Clin. Exp. Hypertens.*, 32(2), 98-104.
- Jain, SK., Velusamy, T., Croad, JL., Rains, JL., Bull, R. (2009). L-cysteine supplementation lowers blood glucose, glycated hemoglobin, CRP, MCP-1, and oxidative stress and inhibits NF-kappaB activation in the livers of Zucker diabetic rats. *Free. Radic. Biol. Med.*, 46(12), 1633-16388.
- Kang, J., Li, Z., Organ, CL., Park, CM., Yang, CT., Pacheco, A., Wang, D., Lefer, DJ., Xian, M. (2016). pH-controlled hydrogen sulfide release for myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Chem. Soc.*, 138(20), 6336–6339.
- Karki, S., Farb, MG., Ngo, DTM., Myers, S., Puri, V., Hamburg, NM., Carmine, B., Hess, DT., Gokce, N. (2015). Forkhead box O-1 modulation improves endothelial insulin resistance in human obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 35(6), 1498 –1506.
- Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide: its production and functions. *Amino. Acids.*, 41(1), 113-121.
- Kimura, H. (2010). Hydrogen Sulfide: From Brain to Gut. *Antioxid. Redox. Signal.* 12(9), 1111-1123.
- Kimura, H. (2014). The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric. oxide.*, 41, 4-10.
- Klabunde, RE. (2012). *Cardiovascular Physiology Concepts*. (B. Sun, Ed.) (2nd ed.). Lippincott Williams & Wilkins. Indianapolis, Indiana.
- Köhn, C., Schleifenbaum, J., Szigártó, I., Markó, L., Dubrovská, G, Huang, Y., Gollasch, M. (2012). Differential Effects of Cystathionine- γ – lyase- dependent Vasodilatory H₂S in Periadventitial Vasoregulation of Rat and Mouse Aortas. *PLoS One.*, 7(8), 1-9.

Referencias

- Kuo, MM., Kim, DH., Jandu, S., Bergman, Y., Tan, S., Wang, H., Pandey, H., Abraham, TP., Shoukas, AA., Berkowitz, DE., Santhanam, L. (2016). MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 310(1), H71-H79.
- Leung, J., Kwok, E., Liu, G., Pang, C. (2010). Attenuated α -adrenoceptor-mediated arterial and venous constrictions in rat models of diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 642(1-3), 128-133.
- Li, Z., Polhemus, D., Lefer, D. (2018). Evolution of Hydrogen Sulfide Therapeutics to Treat Cardiovascular Disease. *Circ. Res.*, 123(5), 590-600.
- Liang, C.F., Liu, J.T., Wang, Y., Xu, A., Vanhoutte, P.M. (2013). Toll-like receptor 4 mutation protects obese mice against endothelial dysfunction by decreasing NADPH oxidase isoforms 1 and 4. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 33(4), 777 – 784.
- Liu, HB., Zhang, J., Xin, SY., Liu, C., Wang, CY., Zhao, D., Zhang, ZR. (2013). Mechanosensitive properties in the endothelium and their roles in the regulation of endothelial function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 61(6), 461 –470.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro, M.A., Portolés, A. (2015). *Farmacología Básica y Clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires.*
- Lu, C., Zhao, AX., Gao, YJ., Lee, RM. (2011). Modulation of vein function by perivascular adipose tissue. *Eur. J. Pharmacol.*, 657(1-3), 111 –116.
- Mahmoud, M.F., El-Nagar, M., El-Bassossy, H. (2012). Anti-inflammatory Effect of Atorvastatin on Vascular Reactivity and Insulin Resistance in Fructose Fed Rats. *Arch. Pharm. Res.*, 35(1), 155-162.
- Martínez, A., Hernández, J., Alarcón, M. (2011). Diagnostic methods of insulin resistance in a pediatric population. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 68(5), 367-373.

Referencias

- Mazza, R., Pasqua, T., Cerra, M. C., Angelone, T., Gattuso, A. (2013). Akt/eNOS signaling and PLN S-sulfhydration are involved in H₂S-dependent cardiac effects in frog and rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 305(4), R443-451.
- Mercurio, V., Carlomagno, G., Fazio, V., Fazio, S., (2012). Insulin resistance: is it time for primary prevention?. *World. J. Cardiol.*, 4(1), 1 –7.
- Meng, G., Ma, Y., Xie, L., Ferro, A., Ji, Y. (2015). Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases. *Br. J. Pharmacol.*, 172(23), 5501-5511.
- Mishanina, TV., Libiad, M., Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat. Chem. Biol.*, 11(7), 457-464.
- Mok, P., Atan, M., Ping, C., Jing, W., Bhatia, M., Mochhala, S., Moore, P. (2004). Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: Protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. *Br. J. Pharmacol.*, 143(7), 881-889.
- Motta, VF., Bargut, TL., Aguila, MB., Mandarim, CA. (2017). Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue and skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 123(4), 699-709.
- Mustafa, A., Sikka, G., Gazi, S., Stepphan, J., Jung, S., Bhunia, A., Barodka, V., Gazi, F., Barrow, R., Wang, R., Amzel, L., Berkowitz, D., Snyder, S. (2011). Hydrogen Sulfide as Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor Sulfhydrates Potassium Channels. *Circ. Res.*, 109(11), 1259-1268.
- Nagai, Y., Tsugane, M., Oka, J., Kimura, H. (2004). Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *The FASEB Journal.*, 18(3), 557-559.
- Nalli, A., Bhattacharya, S., Wang, H., Kending, D., Grider, J., Murthy, K. (2017). Augmentation of cGMP/PKG pathway and colonic motility by hydrogen sulfide. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver.*, 13(4), G330-G341.

Referencias

- Nemoto, S., Kobayashi, T., Taguchi, K., Matsumoto, T., Kamata, K. (2011). Losartan improves aortic endothelium dependent relaxation via proline-rich tyrosine kinase 2/Src/ Akt pathway in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 301(6), H2383 –H2394.
- Ng HH, Yildiz GS, Ku JM, Miller AA, Woodman OL and Hart JL (2017). Chronic NaHS treatment decreases oxidative stress and improves endothelial function in diabetic mice. *Diab. Vasc. Dis. Res.*, 14(3), 246-253.
- Okamoto, M., Yamaoka, M., Takei, M., Ando, T., Taniguchi, S., Ishii, I., Tohya, K., Ishizaki, T., Niki, I., Kimura, T. (2013). Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 442(3-4), 227-233.
- Olokoba, A., Obateru, O., Olokoba, L. (2012). Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman. Med. J.*, 27(4), 269-273.
- Padiya, R., Khatua, T., Bagul, P., Kuncha, M., Banerjee, S. (2011). Garlic improves insulin sensitivity and associated metabolic syndromes in fructose fed rats. *Nutr. Metab.*, 27, 1-8.
- Padmanabhan, S. (2014). Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Sandosh Padmanabhan. *Academic Press.*, London., 365-366.
- Partlo, LA., Sainsbury, RS., Roth, SH. (2001). Effects of repeated hydrogen sulfide (H₂S) exposure on learning and memory in the adult rat. *Neurotoxicology.*, 22(2), 177-189.
- Paul, B., Snyder, S. (2015). Modes of Physiologic H₂S Signaling in the Brain and Peripheral Tissues. *Antioxid. Redox. Signal.*, 22(5), 411-423.
- Philip, B., Venkatesh, A. (2012). *Hypertension and Stroke. Pathophysiology and Management.* Springer Science & Business Media. U.S.A.

- Polhemus, DJ., Li, Z., Pattillo, CB., Gojon, G Sr., Gojon, G Jr., Giordano, T., Krum, H. (2015). A novel hydrogen sulfide prodrug, SG1002, promotes hydrogen sulfide and nitric oxide bioavailability in heart failure patients. *Cardiovasc. Ther.*, 33(4), 216–226.
- Polhemus, D., Lefer, D. (2014). Emergence of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Gaseous Signaling Molecular in Cardiovascular Disease. *Circ. Res.*, 114(4), 730-737.
- Porokhya, M. V, Abramochkin, D. V, Abramov, A. A., Kuzmin, V. S., & Sukhova, G. S. (2012). Inotropic effects of gaseous transmitters in isolated rat heart preparation. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 153(6), 855–7.
- Roche, C., Besnier, M., Cassel, R., Harouki, N., Coquerel, D., Guerrot, D., Nicol, L., Loizon, E., Remy-Jouet, I., Morisseau, C., Mulder, P., Ouvrard-Pascaud, A., Madec, A.M., Richard, V., Bellien, J. (2015). Soluble epoxide hydrolase inhibition improves coronary endothelial function and prevents the development of cardiac alterations in obese insulin-resistant mice. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 308(9), 1020 –1029.
- Sánchez-García, G., Del Bosque-Plata, L., Hong, E. (2018). Postnatal overnutrition affects metabolic and vascular function reflected by physiological and histological changes in the aorta of adult Wistar rats. *Clin. Exp. Hypertens.*, 40(5), 452-460.
- Schäfer, N., Lohmann, C., Winnik, S., van Tits, LJ., Miranda, MX., Vergopoulos, A., Ruschitzka, F., Nussberger, J., Berger, S., Luscher, TF., Verrey, F., Matter, CM. (2013). Endothelial mineralocorticoid receptor activation mediates endothelial dysfunction in diet-induced obesity. *Eur. Heart. J.*, 34(45), 3515 –3524.
- Scheindlin, S. (2001). A brief history of pharmacology. *Modern Drug Discovery*. Retrieved from <http://pubs.acs.org/subscribe/archive/mdd/v04/i05/html/05timeline.html#auth>.
- Sesti, G., (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20(4), 665 –679.

- Sommese, L., Valverde, CA., Blanco, P., Castro, MC., Rueda, OV., Kaetzel, M., Dedman, J., Anderson, ME., Mattiazzi, A., Palomeque, J. (2016). Ryanodine receptor phosphorylation by CaMKII promotes spontaneous Ca⁽²⁺⁾ release events in a rodent model of early stage diabetes: the arrhythmogenic substrate. *Int. J. Cardiol.*, 202,394–406.
- Stenmark, KR., Yeager, ME., El Kasmi, KC., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, EV., Li, M., Riddle, SR., Frid, MG. (2013). The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.*, 75(1), 23-47.
- Suárez, C., del Arco, C., Lahera, V., Ruilope, LM. (1995). N-acetylcysteine potentiates the antihypertensive effect of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Am. J. Hypertens.* 8(8), 859.
- Sun, L., Jin, H., Sun, L., Chen, S., Huang, Y., Liu, J., Li, Z., Zhao, M., Sun Y., Tang, C., Zhao, B., Du, J. (2015). Hydrogen Sulfide Alleviates Myocardial Collagen Remodeling in Association with Inhibition of TGF- β /Smad Signaling Pathway in Spontaneously Hypertensive Rats. *Mol. Medicine.*, 20,503-515.
- Szabo C. (2018). A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: from environmental toxin to biological mediator. *Biochem. Pharmacol.*, 149,5–19.
- Szabo, C. (2012). Roles of Hydrogen Sulfide in the Pathogenesis of Diabetes Mellitus and Its Complications. *Antioxid. Redox. Signal.*, 17(1),68-80.
- Szabo, C., Papapetropoulos, A. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol. Rev.*, 69(4), 497-564.
- Tabit, CE., Shenouda, SM., Holbrook, M., Fetterman, JL., Kiani, S., Frame, AA., Kluge, MA., Held, A., Dohadwala, MM., Gokce, N., Farb, MG., Rosenzweig, J., Ruderman, N., Vita, JA., Hamburg, NM. (2013). Protein kinase C β contributes to impaired

Referencias

- endothelial insulin signaling in humans with diabetes mellitus. *Circulation.*, 127(1), 86 –95.
- Taguchi, K., Sakata, K., Ohashi, W., Imaizumi, T., Imura, J., Hattori, Y. (2014). Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyperglycemia with high insulin levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 349(2), 199 –208.
- Takahara, M., Katakami, N., Kaneto, H., Noguchi, M., Shimomura, I. (2013). Distribution of the Matsuda Index in Japanese healthy subjects. *J. Diabetes Investig.*, 4(4), 369-371.
- Tang, Q., Li, X., Song, P., Xu, L. (2015). Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and prediabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug. Discov. Ther.*, 9(6), 380-385.
- Thackeray, JT., Radziuk, J., Harper, ME., Suuronen, EJ., Ascah, KJ., Beanlands, RS., Dasilva, JN. (2011). Sympathetic nervous dysregulation in the absence of systolic left ventricular dysfunction in a rat model of insulin resistance with hyperglycemia. *Cardiovasc. Diabetol.*, 10, 75.
- Untereiner, A., Wu, L. (2017). Hydrogen Sulfide and Glucose Homeostasis: A Tale of Sweet and the Stink. *Antioxid. Redox. Signal.*, 28(16), 1463-1482.
- Urgerleider, R., Nelson, K., Cooper, D., Meliones, J., Jacobs, J. (2018). *Critical Heart Disease in Infants and Children*. 3ª edición. Elsevier. Madrid.
- Vague, J. (1956). The Degree of Masculine Differentiation of Obesities: A Factor Determining Predisposition to Diabetes, Atherosclerosis, Gout, and Uric Calculous Disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 4(1), 20-34.
- Vanhoutte, P.M., Shimokawa, H., Félétou, M., Tang, E. (2016). Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta. Physiol.* 219(1), 22-96.

- Vasdev, S., Singal, P., Gill, V. (2009) The antihypertensive effect of cysteine. *Int. J. Angiol.*, 18(1),7-21.
- Veziroglu, O., Comelekoglu, U., Sucu, N., Yalin, A., Necat, S., Yalin, S., Sogut, F., Yaman, S., Kibar, K., Akkapulu, M., Ilkay, M., Secer, D. (2017). N-Acetylcysteine-induced vasodilatation is modulated by KATP channels, Na⁺/K⁺-ATPase activity and intracellular calcium concentration: An in vitro study. *Pharmacol. Rep.*, 69(4), 738-745.
- Viridis, A., Santini, F., Colucci, R., Duranti, E., Salvetti, G., Rugani, I., Bruno, R.M., Bernini, G., Taddei, S. (2011). Vascular generation of tumor necrosis factor- α reduces nitric oxide availability in small arteries from visceral fat of obese patients. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 58(3), 238–247.
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.*, 16(13), 1792–1798.
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol. Rev.*, 92(2), 791–896.
- Wang, R. (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends. Biochem. Sci.*, 39(5), 227–32.
- White, B.J., Smith, P.A., Dunn, W.R. (2013). Hydrogen sulphide-mediated vasodilatation involves the release of neurotransmitters from sensory nerves in pressurized mesenteric small arteries isolated from rats. *Br. J. Pharmacol.*, 168(4), 785–93.
- William, A. (2013). *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*. Tercera edición. Elsevier. India.
- Wilmore, J., Costill, D. (2007). *Fisiología del esfuerzo y del deporte*. Paidotribo. España.
- Wolfensohn, S., Lloyd, M. (2003). Small Laboratory Animals. In *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare* (pp. 233-271): Blackwell Publishing Ltd.

- Xing, W., Yan, W., Liu, P., Ji, L., Li, Y., Sun, L., Tao, L., Zhang, H. & Gao, F. (2013). A novel mechanism for vascular insulin resistance in normotensive young SHR: hypoadiponectinemia and resultant APPL1 downregulation. *Hypertension.*, 61(5), 1028 –1035.
- Yamasaki, H., Cohen, MF. (2016). Biological consilience of hydrogen sulfide and nitric oxide in plants: Gases of primordial earth linking plant, microbial and animal physiologies. *Nitric oxide.*, 55-56, 91-100.
- Yang W, Yang G, Jia X, Wu L, Wang R. (2005). Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying. *J. Physiol.*, 569, 519.531.
- Yang, G., Wang, R. (2015). H₂S and Blood Vessels: An Overview. *Handbook of Experimental Pharmacology.*, 230, 85-110.
- Yin, QQ., Pei, JJ., Xu, S., Luo, DZ., Dong, SQ., Sun, MH., You, L., Sun, ZJ., Liu, XP. (2013). Pioglitazone improves cognitive function via increasing insulin sensitivity and strengthening antioxidant defense system in fructose-drinking insulin resistance rats. *PLoS One* 8, e59313.
- Yu, XH., Cui, LB., Wu, K., Zheng, XL., Cayabyab, F., Chen, ZW., Tang CK. (2014). Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clin. Chim. Acta.*, 437, 78-87.
- Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y., Jin H. (2017). H₂S-Induced Sulfhydration: Biological Function and Detection Methodology. *Front. Pharmacol.*, 8, 1-13.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.*, 20(21), 6008-6016.
- Zhu, Y., Wang, Z., Ho, P., Loke, Y., Zhu, Y., Huang, S. Tan, C., Whiteman, M., Lu, J., Moore, P. (2007). Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J. Appl. Physiol.* 102(1), 261-268.

13. ANEXOS

13.1 Actividad académica

- Simposio “El Desafío de las Neurociencias en Latinoamérica”. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Ciudad de México, México. 2018.

13.2 Congreso

- Congress on Experimental Biology. Orlando, Florida. 2019.

13.3 Artículo

- Apoyo en el Proyecto de Servicio Social: “Potential vascular α 1-adrenoceptor blocking properties of metformin in rat aorta and tail artery.”



**INTERNATIONAL BRAIN
IBRO
RESEARCH ORGANIZATION**

Cinvestav

SIGN
Student Interest Group in Neurology

Otorgan la presente
CONSTANCIA
a:
Diana Laura Silva Velasco
Quien asistió al simposio:

“El Desafío de las Neurociencias en Latinoamérica”

Realizado en la Unidad Coapa del CINVESTAV el día
17 de agosto del 2018


Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta
Organizadora


Med. Daniel Pérez Pérez
Coord. Gral. del SIGN-UNAM



CERTIFICATE OF PARTICIPATION

Diana Laura Silva Velasco

April 6-8, 2019
Orlando, FL, USA

Annual Meeting of:

American
Association
of Anatomists (AAA)

The American
Physiological
Society (APS)

American Society
for Biochemistry
and Molecular
Biology (ASBMB)

American Society
for Investigative
Pathology (ASIP)

American Society
for Pharmacology
and Experimental
Therapeutics
(ASPET)

Guest Societies

This certifies that the following person participated and attended the
Experimental Biology (EB) Meeting at the Orange County Convention Center in
Orlando, FL, over the dates of April 6 - 9, 2019.

Session Type: Poster

Session Title: Diabetes and Vascular Damage

Session Date/Time: 04/07/2019 - 9:00 AM

Presentation Number: 512

Presentation Title: Effect of Cystathionine-Gamma-Lyase/Hydrogen
Sulfide System Modulation on Vascular Dysfunction Induced by Insulin
Resistance in Male Wistar Rat Thoracic Aorta

Experimental Biology is an annual meeting of five societies comprise of more than
12,000 scientists and 25 guest societies in one interdisciplinary community. Primary
focus areas include anatomy, biochemistry and molecular biology, investigative
pathology, pharmacology and physiology.

This multidisciplinary, scientific meeting features plenary lectures, workshops,
symposia, posters presentations, on-site career services and exhibits spotlighting
products and services integral to this professional community.

Next Meeting:

San Diego, CA
April 4 - 7, 2020

Michael McDonnell, CMP, CMM
EB Meeting Manager

9660 Rockville Pike • Bethesda, MD 20814-3898
(t) 301-834-7840 • (f) 301-634-7014 • www.experimentalbiology.org
Email: management@experimentalbiology.org



April 6-9, 2019
Orlando, FL, USA

Annual Meeting of:

American
Association
of Anatomists (AAA)

The American
Physiological
Society (APS)

American Society
for Biochemistry
and Molecular
Biology (ASBMB)

American Society
for Investigative
Pathology (ASIP)

American Society
for Pharmacology
and Experimental
Therapeutics
(ASPET)

Guest Societies

Next Meeting:

San Diego, CA
April 4 - 7, 2020

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

Diana Laura Silva Velasco

This certifies that the following person participated and attended the
Experimental Biology (EB) Meeting at the Orange County Convention Center in
Orlando, FL over the dates of April 6 - 9, 2019.

Session Type: Poster

Session Title: Brain and Cardiovascular Function

Session Date/Time: 04/07/2019 - 9:00 AM

Presentation Number: 511

Presentation Title: Pharmacological Effect of Hydrogen Sulfide on the
Vasopressor Responses in Male Wistar Rats with Insulin Resistance

Experimental Biology is an annual meeting of five societies comprise of more than
12,000 scientists and 25 guest societies in one interdisciplinary community. Primary
focus areas include anatomy, biochemistry and molecular biology, investigative
pathology, pharmacology and physiology.

This multidisciplinary, scientific meeting features plenary lectures, workshops,
symposia, posters presentations, on-site career services and exhibits spotlighting
products and services integral to this professional community.

Michael McDermott, CMP, CMM
EB Meeting Manager

8650 Rockville Pike • Bethesda, MD 20814-3998
(t) 301-634-7840 • (f) 301-634-7014 • www.experimentalbiology.org
Email: management@experimentalbiology.org

Accepted Manuscript

Potential vascular α_1 -adrenoceptor blocking properties of metformin in rat aorta and tail artery

José F. Álvarez-Cámara, Martha B. Ramírez-Rosas, Grecia J. Medina-Terol, Diana L. Silva-Velasco, Andrea Velazco-Paz, Araceli Sánchez-López, Crystell G. Guzman-Priego, Ulises Osuna-Martínez, David Centurión

PII: S0014-2999(19)30450-9

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172498>

Article Number: 172498

Reference: EJP 172498

To appear in: *European Journal of Pharmacology*

Received Date: 7 May 2019

Accepted Date: 21 June 2019

