



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Departamento de Farmacobiología

**Estudio de la participación del sistema cistationina gamma liasa/sulfuro
de hidrógeno sobre las alteraciones cardiovasculares y metabólicas
inducidas por una dieta rica en grasas en la rata**

Tesis que presenta

Lic. en Nutrición Carolina Belén Gomez

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en
Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Director de la Tesis: Dr. David Centurión Pacheco

Ciudad de México

Agosto, 2018



Cinvestav



CONACYT

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio 6 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. David Centurión Pacheco.

Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría No. 614040 y del donativo No. CB-2015-01-252702.

Dedicatorias

A mi Familia

Gracias por acompañarme en este camino,
por apoyarme y estar siempre presentes.



Agradecimientos

Al Dr. David Centurión Pacheco, por permitirme formar parte de su equipo de investigación. Por su confianza, apoyo y paciencia durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales: Dra. Norma Leticia Gómez Víquez y Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera, por dedicarme parte de su tiempo, así como por las críticas y comentarios realizados que ayudaron a mejorar el trabajo.

A la Dra. Araceli Sánchez-López, por siempre brindarme su apoyo y darme consejos tanto para la realización de los experimentos como en el día a día.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer más ameno el tiempo que pasamos trabajando y siempre estar dispuestos a ayudar en lo que se necesite. A mis amigos Adrián, Paco y Grecia, por su apoyo y hacer todo más divertido. A Saúl, por ayudarme con el proyecto desde el inicio, por ser un excelente compañero de viaje y aguantar mi estrés.

A Erika Curiel, por siempre estar presente y dándome ánimos. Por escucharme y ayudarme a distraerme en los momentos de estrés.

A los compañeros de generación por sus comentarios y críticas realizadas hacia el proyecto durante los seminarios en clase de presentación de resultados.

Al personal del bioterio del Cinvestav-Unidad Coapa, por el apoyo brindado en el manejo de animales. A la M.B.E.I. María del Pilar Quintero Carrillo por su ayuda en la búsqueda de material bibliográfico. Al Lic. Carlos Pérez por ayudarme a completar los trámites de beca para congreso.

Índice General

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBESIDAD.....	1
1.1.1 <i>Factores que regulan el apetito y la saciedad</i>	2
1.1.1.1 Factores endócrinos	2
1.1.1.2 Factores neuronales	4
1.1.1.2.1 Grelina.....	6
1.1.1.2.2 Leptina	7
1.1.1.2.3 Insulina.....	8
1.1.1 <i>Alteraciones inducidas por la obesidad</i>	10
1.1.1.2 Alteraciones antropométricas	10
1.1.1.1 Alteraciones metabólicas	12
1.1.1.3 Alteraciones cardiovasculares	12
1.1.1.3.1 Hipertensión arterial	13
1.2 SULFURO DE HIDRÓGENO (H ₂ S).....	14
1.2.1 <i>Efecto vasodilatador del H₂S</i>	18
1.2.2 <i>Herramientas farmacológicas para el estudio del H₂S</i>	20
1.2.3 <i>Sulfhidración de proteínas</i>	21
1.2.3.1 S-sulfhidración de canales K _{ATP}	22
1.2.4 <i>Relación del H₂S con las enfermedades metabólicas</i>	23
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
2.1 JUSTIFICACIÓN	27
2.2 HIPÓTESIS	27
2.3 OBJETIVO GENERAL	27

2.3.1	<i>Objetivos particulares</i>	27
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1	ANIMALES	29
3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL	29
3.3	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE HORMONAS Y PRUEBA DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA.	31
3.3.1	<i>Grelina</i>	32
3.3.2	<i>Leptina</i>	32
3.3.3	<i>Insulina</i>	33
3.4	DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL.....	33
3.5	EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR EN RATAS DESCEREBRADAS Y DESMEDULADAS	34
3.6	OBTENCIÓN DE ÓRGANOS.....	35
3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
3.8	COMPUESTOS UTILIZADOS	36
4.	RESULTADOS	37
4.1	VARIABLES ZOOMÉTRICAS	37
4.2	VARIABLES METABÓLICAS	38
4.3	VARIABLES HEMODINÁMICAS.....	40
4.4	EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIOVASCULAR.....	42
5.	DISCUSIÓN	49
5.1	GENERAL.....	49
5.2	EFEECTO DE LA DIETA RICA EN GRASAS Y TRATAMIENTOS CRÓNICOS CON VEHÍCULO, NAHS, L-CISTEÍNA Y DL-PPG SOBRE LAS VARIABLES ZOOMÉTRICAS	50
5.3	EFEECTO DE LA DIETA RICA EN GRASAS Y TRATAMIENTOS CRÓNICOS SOBRE LAS VARIABLES METABÓLICAS	51
5.4	EFEECTO DE LA DIETA RICA EN GRASAS Y TRATAMIENTOS CRÓNICOS SOBRE LAS VARIABLES HEMODINÁMICAS	53
5.5	NAHS Y L-CYS PUEDEN REVERTIR LOS CAMBIOS CARDIOVASCULARES INDUCIDOS POR LA DIETA RICA EN GRASAS	54

6. CONCLUSIÓN.....	58
7. PERSPECTIVAS	59
8. REFERENCIAS	60
9. ANEXOS.....	71
9.1 ACTIVIDADES ACADÉMICAS	71
9.2 CONGRESOS	71
9.3 ARTÍCULOS	72

Índice de figuras

FIGURA 1. CONTROL DEL BALANCE ENERGÉTICO A NIVEL CENTRAL.....	5
FIGURA 2. COMPLICACIONES DE LA OBESIDAD.....	11
FIGURA 3. SÍNTESIS ENDÓGENA DEL H ₂ S.....	16
FIGURA 4. REACCIONES DE LAS ENZIMAS PRODUCTORAS DE H ₂ S.	17
FIGURA 5. RUTAS DE DEGRADACIÓN DEL H ₂ S.	19
FIGURA 6. SEÑALIZACIÓN DEL H ₂ S EN LA RELAJACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR.....	20
FIGURA 7. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.	30
FIGURA 8. CURSO TEMPORAL.	31
FIGURA 9. ÁREA BAJO LA CURVA DE GLUCOSA E INSULINA.	41
FIGURA 10. EFECTO DE LA DIETA RICA EN GRASAS (16 SEMANAS) SOBRE LAS RESPUESTAS VASOPRESORAS INDUCIDAS POR: (A) ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA; (B) NORADRENALINA, LIGANDO ENDÓGENO A-ADRENÉRGICO; (C) METOXAMINA, AGONISTA A1; (D) UK 14,304, AGONISTA A2.	43
FIGURA 11. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON VEHÍCULO (1 ML/KG) SOBRE LAS RESPUESTAS INDUCIDAS POR: (A) ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA; (B) NORADRENALINA; (C) METOXAMINA; Y (D) UK 14,304.	44
FIGURA 12. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON NAHS (5.6 MG/KG) SOBRE LAS RESPUESTAS INDUCIDAS POR: (A) ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA; (B) NORADRENALINA; (C) METOXAMINA; Y (D) UK 14,304.	45
FIGURA 13. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON L-CYS (300 MG/KG) SOBRE LAS RESPUESTAS INDUCIDAS POR: (A) ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA; (B) NORADRENALINA; (C) METOXAMINA; Y (D) UK 14,304.	45
FIGURA 14. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON DL-PPG (1 MG/KG) SOBRE LAS RESPUESTAS INDUCIDAS POR: (A) ESTIMULACIÓN SIMPÁTICA; (B) NORADRENALINA; (C) METOXAMINA; Y (D) UK 14,304.	46
FIGURA 15. EFECTO DE LA DIETA NORMAL (DN) Y LA DIETA RICA EN GRASAS (DRG) SOBRE LAS RESPUESTAS TAQUICÁRDICAS INDUCIDAS POR BOLOS I.V. DE NORADRENALINA.....	47

FIGURA 16. EFECTO DE LAS INYECCIONES I.P. DIARIAS DURANTE 4 SEMANAS DE: (A) VEHÍCULO (1 ML/KG), (B) NAHS (5.6 MG/KG), (C) L-CYS (300 MG/KG) Y (D) DL-PPG (1 MG/KG) SOBRE LAS RESPUESTAS TAQUICÁRDICAS INDUCIDAS POR BOLOS I.V. DE NORADRENALINA EN RATAS CON DIETA RICA EN GRASAS..... 48

Índice de Tablas

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIONES DE LAS HORMONAS LIBERADAS POR EL SISTEMA DIGESTIVO. MODIFICADO DE (MAHAN ET AL., 2013).	3
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL.	13
TABLA 3. EVIDENCIA CONTROVERSIAL SOBRE EL AUMENTO O DISMINUCIÓN DEL H ₂ S DURANTE LA OBESIDAD O RESISTENCIA A LA INSULINA.	25
TABLA 4. COMPOSICIÓN DE LA DIETA NORMAL Y DIETA RICA EN GRASAS.....	30
TABLA 5. EFECTO DE: (1) LA DIETA NORMAL Y LA DIETA RICA EN GRASAS CONTROLES Y (2) LOS TRATAMIENTOS CRÓNICOS DURANTE 4 SEMANAS CON VEHÍCULO (1 ML/KG), NAHS (5.6 MG/KG), L-CYS (300 MG/KG) Y DL-PPG (1 MG/KG) SOBRE ALGUNAS VARIABLES ZOOMÉTRICAS DESPUÉS DE 16 SEMANAS DE DIETA.....	38
TABLA 6. EFECTO DE: (1) LA DIETA NORMAL Y LA DIETA RICA EN GRASAS CONTROLES (12 SEMANAS) Y (2) DE LOS TRATAMIENTOS CRÓNICOS DURANTE 4 SEMANAS CON VEHÍCULO (1 ML/KG), NAHS (5.6 MG/KG), L-CYS (300 MG/KG) Y DL-PPG (1 MG/KG) (16 SEMANAS) SOBRE ALGUNAS VARIABLES METABÓLICAS.....	39
TABLA 7. EFECTO DE: (1) LA DIETA NORMAL Y DIETA RICA EN GRASAS CONTROLES; Y (2) LOS TRATAMIENTOS CRÓNICOS CON VEHÍCULO (1 ML/KG), NAHS (5.6 MG/KG), L-CYS (300 MG/KG) Y DL-PPG (1 MG/KG) SOBRE LAS VARIABLES HEMODINÁMICAS A LAS 12 Y 16 SEMANAS.....	42

Lista de abreviaturas

3-MST	3 mercaptopiruvato sulfurtransferasa
ABC	Área bajo la curva
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AgRP	Péptido relacionado a Agouti
AMPK	Protein cinasa activada por AMP
ATP	Adenosín trifosfato
BCA	β cianoalanina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CART	Transcripto regulado de cocaína y anfetaminas
CAT	Cisteína aminotransferasa
CBS	Cistationina beta sintetasa
CCK	Colecistocinina
cGMP	Guanosín monofosfato cíclico
CO	Monóxido de carbono
CSE	Cistationina gamma liasa
DL-PPG / DL-PAG	DL-propargilglicina
DN	Dieta normal
DRG	Dieta rica en grasas
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FC	Frecuencia cardíaca
GHS-R1a	Receptor de secretagogos de hormona de crecimiento
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GOAT	Grelina o-acetil transferasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Disulfuro de glutación
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HFD	High fat diet
HNO	Anión nitroxilo
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IMC	Índice de masa corporal
IRS	Sustratos del receptor de insulina
Kcal	Kilocalorias
L-Cys	L-Cisteína
LepR	Receptor de leptina
MCR-3/4	Receptor a melanocortina
mm Hg	Milímetros de mercurio
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
α -MSH	Hormona estimulante de alfa-melanocitos
NAC	N-Acetilcisteína

NaHS	Sulfhidrato de sodio
NFD	Normal fat diet
NO	Óxido nítrico
NPY	Neuropéptido Y
OMS	Organización mundial de la salud
PA	Presión arterial
PAD	Presión arterial diastólica
PAM	Presión arterial media
PAS	Presión arterial sistólica
pH	Potencial de hidrógeno
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PIP3	Fosfatodilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína quinasa A
PLP	Piridoxal-5-fosfato
POMC	Pro-opiomelanocortina
PPAR γ	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PTOG	Prueba de tolerancia oral a la glucosa
PVAT	Tejido adiposo perivascular
PVN	Núcleo paraventricular
RI	Resistencia a la insulina
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SNS	Sistema nervioso simpático
SRA	Sistema renina-angiotensina
TAE	Tejido adiposo epididimal
TAV	Tejido adiposo visceral
TSM	Tiol-s-metiltransferasa
Y ₁ R ₁	Receptor de neuropéptido Y

Resumen

El sulfuro de hidrógeno juega un papel importante en la regulación del sistema cardiovascular, secreción de insulina y regulación de la glucosa. El objetivo de este estudio fue examinar los efectos del tratamiento crónico con sulfhidrato de sodio (NaHS), L-Cisteína (L-Cys) y DL-Propargilglicina (DL-PPG) sobre los cambios inducidos por la dieta rica en grasas en las variables zoométricas, hormonales, hemodinámicas, así como en los cambios cardiovasculares, como hipertensión. Para tal propósito, 36 ratas Wistar macho (7-8 semanas) recibieron una dieta normal en grasas (DN, n=6) o dieta rica en grasas (DRG, n=30) durante 12 semanas. Posteriormente, el grupo de DRG se dividió en 5 subgrupos que recibieron inyecciones i.p. diarias durante 4 semanas de: (1) nada; (2) vehículo (PBS, 1 ml/kg); (3) NaHS (5.6 mg/kg); (4) L-Cys (300 mg/kg); (5) DL-PPG (1 mg/kg). Se determinaron niveles de glucosa, insulina, leptina y grelina mediante ELISA. Se midió la presión arterial por el método pletismográfico en animales conscientes y se evaluó la función cardiovascular con el modelo de rata descerebrada y desmedulada. Por último, se obtuvieron y pesaron el corazón, hígado, tejido adiposo visceral y epididimal. La DRG incrementó las variables zoométricas y metabólicas; las primeras fueron revertidas por los tratamientos con NaHS y L-Cys, mientras que las segundas mejoraron con el tratamiento de DL-PPG. Las variables hemodinámicas incrementaron con la DRG, que revirtió el tratamiento con NaHS. En ratas descerebradas y desmeduladas, la DRG indujo un aumento en las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación simpática y metoxamina (agonista selectivo α_1), respuestas que fueron disminuidas por el tratamiento con NaHS y L-Cys. Concluimos que el tratamiento con NaHS y L-Cys son efectivos en mejorar los cambios zoométricos y hemodinámicos inducidos por la DRG; mientras que el tratamiento con DL-PPG revirtió únicamente los cambios metabólicos.

Abstract

Hydrogen sulfide plays an important role in the regulation of the cardiovascular system, insulin secretion and regulation of glucose homeostasis. The aim of the present study was to examine the effects of a chronic treatment with sodium hydrosulfide (NaHS), L-Cysteine (L-Cys) and DL-Propargylglycine (DL-PAG) over the changes induced by a high fat diet in zoometric, hormonal, haemodynamic variables as well as cardiovascular changes in Wistar rats. For this purpose, male Wistar rats received normal fat diet (NFD, n=6) or high fat diet (HFD, n=30) for 12 weeks. Then, HFD rats were divided into 5 subgroups which received daily i.p. injections during 4 weeks of: (1) nothing; (2) vehicle (PBS, 1 ml/kg); (3) NaHS (5.6 mg/kg); (4) L-Cys (300 mg/kg); (5) DL-PAG (1 mg/kg). Oral glucose tolerance test and leptin, ghrelin and insulin hormone assays were determined. Blood pressure was measured by plethysmograph method in conscious animals and the cardiovascular function was evaluated in pithed rats. Then, heart, liver and adipose tissue were weighted. HFD significantly increased zoometric and metabolic variables compared to NFD; the first ones were diminished by NaHS and L-Cys treatments, while the second ones were ameliorated with DL-PAG treatment. HFD significantly increased haemodynamic variables, which were totally reversed by NaHS treatment. In pithed rats, HFD induced an increase in vasopressor responses induced by sympathetic stimulation and methoxamine (α_1 -adrenoceptor agonist) compared to NFD. These responses were significantly decreased by chronic administration of NaHS and L-Cys. Taken together, we concluded that chronic treatments with NaHS and L-Cys are effective in reducing adipose tissue and ameliorating the cardiovascular changes induced by obesity; while DL-PAG treatment reverted metabolic changes.

1. Introducción

1.1 Obesidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la obesidad como: “*una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud*”.

En 2016, a nivel mundial, el 13% de la población mayor de 18 años presentó obesidad y el 39%, sobrepeso (WHO, 2018). Se estima que para el 2020 más del 60% de la población padecerá sobrepeso y obesidad (Blackstone, 2016). En 2016, más de 41 millones de niños menores de 5 años padecían sobrepeso u obesidad (WHO, 2018), los cuales posiblemente padecerán obesidad en su adolescencia y/o adultez.

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2016 (Gutiérrez et al., 2012) reportó que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad en personas mayores de 20 años fue de un 72.5%. Esto de acuerdo con los puntos de corte del Índice de Masa Corporal (IMC) propuestos por la OMS, donde 25-29.9kg/m² indica sobrepeso y ≥ 30 kg/m², obesidad (Gutiérrez et al., 2012). El IMC es una relación entre el peso del individuo en kg sobre la estatura en m².

Las causas de la obesidad son complejas al tratarse de una enfermedad multifactorial, donde se encuentran involucrados diversos factores como: herencia y nutrigenómica, ya que nuestras elecciones nutricionales y estilo de vida pueden influir en la activación o desactivación de genes inductores de obesidad; actividad física inadecuada, inflamación, estrés, patógenos y obesógenos (Mahan et al., 2013). Los obesógenos son compuestos exógenos que alteran el metabolismo normal de los lípidos y almacenamiento de grasas, un ejemplo de estos son el bifenilo A y los ftalatos que se encuentran presentes en los plásticos de envases de alimentos (Mahan et al., 2013).

En relación a la última causa, los malos hábitos de alimentación son importantes para el desarrollo de obesidad, como el consumo excesivo de calorías. Siendo que la etiología de la obesidad es un desequilibrio entre la energía ingerida de los alimentos y el gasto energético, reflejando un balance energético positivo. No sólo es la cantidad de calorías consumidas, sino que también la calidad de las mismas.

Cuando se trata de una dieta rica en grasas, los alimentos tienden a ser energéticamente densos por lo que se presenta una mayor ingesta de calorías. La densidad energética es la cantidad de energía contenida en cierta cantidad de alimento (kcal/g) (Bray, 2004a). Por ejemplo, un alimento con alto contenido de grasa es tiene una mayor densidad energética que un alimento con alto contenido de proteína. Esto debido a que un gramo de grasa aporta 9 kcal, mientras que un gramo de proteína aporta 4 kcal. Se presenta un consumo de grandes cantidades de grasa debido a la alta densidad energética, a que esta puede afectar la sensación de saciedad o a la alta palatabilidad del alimento, ya que la grasa modifica la textura de los alimentos y le da más sabor (Bell et al., 1998).

1.1.1 Factores que regulan el apetito y la saciedad

La alimentación y el control de peso son regulados por muchos factores como puede ser el llenado gástrico, dónde la distensión del tracto gastrointestinal envía señales inhibitorias que disminuyen el deseo por el alimento. Este control también incluye factores endócrinos y neuronales.

1.1.1.1 Factores endócrinos

Al respecto, en la Tabla 1 se muestran las características fisiológicas de algunas hormonas gastrointestinales como incretinas, insulina, leptina, grelina y colecistocinina (CCK).

Tabla 1. Características y funciones de las hormonas liberadas por el sistema digestivo. Modificado de (Mahan et al., 2013).

Hormonas gastrointestinales	Características y función
Incretinas	<p>Son péptidos gastrointestinales que tras la ingesta de alimentos incrementan la cantidad de insulina liberada por las células β-pancreáticas. Ralentizan la velocidad del vaciado gástrico pudiendo reducir la ingesta alimenticia. Las incretinas inhiben la liberación de glucagón por las células α-pancreáticas.</p>
CCK	<p>Es liberada por el tubo digestivo cuando las proteínas y grasas alcanzan el intestino delgado. Estimula la contracción de la vesícula biliar y la secreción de enzimas pancreáticas. Se han encontrado receptores para CCK a nivel de tubo digestivo y cerebral, en este último inhibe la ingesta alimenticia.</p>
Insulina	<p>Esta hormona actúa en el SNC y SNP para modular la ingesta de alimentos. Participa en la síntesis y almacenamiento de grasas. En individuos obesos con RI o deficiencia de esta poseen un sistema de provisión de glucosa alterado. Las concentraciones preprandiales de insulina aumentan de manera proporcional al grado de obesidad, en contraste muchos individuos obesos presentan resistencia a la insulina debido a la falta de respuesta de los receptores.</p>

Hormonas gastrointestinales	Características y función
Leptina	Es una adipocitocina secretada por el tejido adiposo relacionada con el porcentaje de grasa corporal. En la obesidad, pierde la capacidad de inhibir la ingesta y aumentar el gasto energético.
Grelina	Actúa sobre el hipotálamo estimulando el hambre y la ingesta. Su concentración es mayor en individuos delgados y disminuye en individuos obesos.

1.1.1.2 Factores neuronales

Existen sistemas controladores de corto y largo plazo que regulan tanto la ingesta de alimentos como el almacenamiento y gasto de energía para el mantenimiento adecuado del abastecimiento de energía.

El núcleo arcuato del hipotálamo es la principal región del sistema nervioso central (SNC) involucrado en la regulación del apetito (Qiu et al., 2017). En este sitio actúan muchas hormonas liberadas por el sistema gastrointestinal y el tejido adiposo (ver Tabla 1), que regulan el consumo de alimento y el gasto energético. El hipotálamo recibe: (1) señales del tracto gastrointestinal que provee información sensorial sobre el llenado gástrico; (2) señales químicas de los nutrientes en sangre que indican saciedad; (3) señales de hormonas gastrointestinales y del tejido adiposo; y (4) señales de la corteza cerebral que influyen el comportamiento alimenticio (vista, olfato, gusto) (Hall, 2016).

En la Figura 1 se ilustra que existen dos tipos de neuronas en el núcleo arcuato que regulan el apetito y el gasto de energía: (1) neuronas orexigénicas NPY/AgRP (Neuropéptido Y/ Péptido relacionado a Agouti); y (2) neuronas anorexigénicas

POMC/CART (pro-opiomelanocortina/Transcripto regulado de cocaína y anfetaminas). Estos grupos celulares presentan proyecciones dendríticas hacia la eminencia media, un órgano circunventricular localizado fuera de la barrera hematoencefálica, lo que permite la detección de niveles plasmáticos de leptina, insulina y glucosa (Qiu et al., 2017).

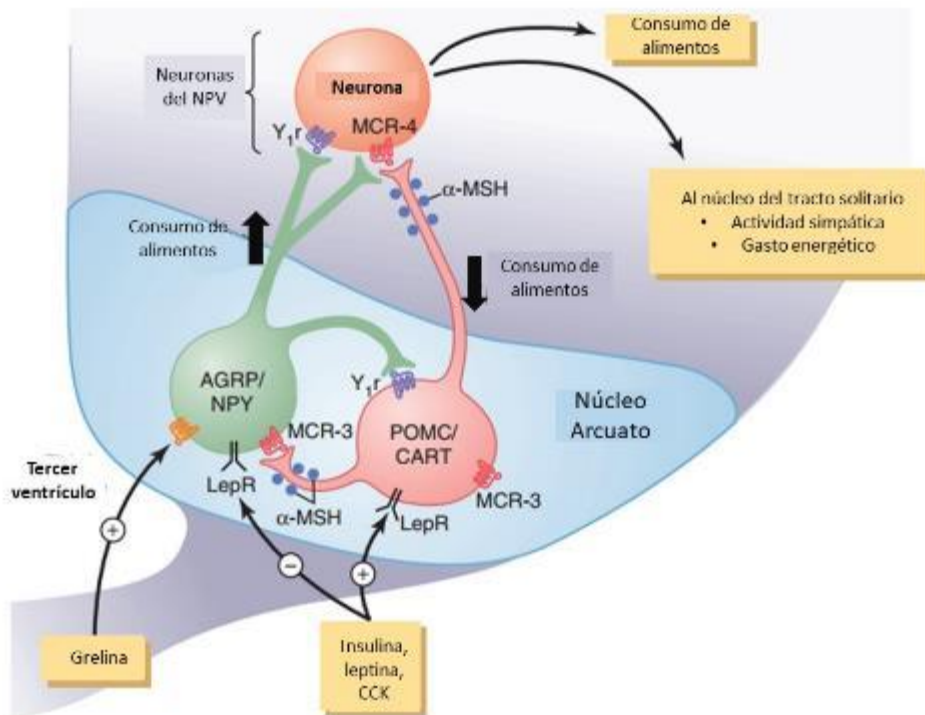


Figura 1. Control del balance energético a nivel central. LepR, receptor de leptina; Y_{1r}, receptor de neuropéptido Y. Tomado de (Hall, 2016).

Las neuronas POMC/CART pueden ser estimuladas por insulina, leptina o CCK y liberan hormona estimulante de α-melanocitos (α-MSH). La α-MSH liberada estimula los receptores MCR-3 y MCR-4 (receptores a melanocortina) localizados en las neuronas del núcleo paraventricular (PVN), los cuales activan redes neuronales que proyectan hacia el núcleo del tracto solitario. La activación de los receptores a melanocortina incrementa la actividad simpática y el gasto energético,

de esta manera disminuye el consumo de alimentos. La insulina, leptina y CCK son hormonas inhibitorias de las neuronas NPY/AgRP (Hall, 2016).

Por el contrario, la grelina activa las neuronas NPY/AgRP. El AgRP es un antagonista natural de MCR-3 y MCR-4, que al unirse con el receptor incrementa el consumo de alimentos al inhibir los efectos de la α -MSH. El NPY inhibe las neuronas POMC/CART e incrementa el consumo de alimentos al unirse a su receptor Y1r en las neuronas del NPV (Hall, 2016).

1.1.1.2.1 Grelina

Kojima et al, en 1999 (Kojima et al., 1999) identificaron a esta hormona peptídica gastrointestinal como un ligando endógeno del receptor de secretagogos de hormona de crecimiento 1a (GHS-R1a). Primeramente la grelina se identificó como un secretagogo endógeno de la hormona de crecimiento (GH), posteriormente, fue identificada como un neuropéptido que promueve el apetito y consumo de alimentos por estimulación del SNC (Collden et al., 2017).

La grelina, un péptido de 28 aminoácidos, es una hormona gastrointestinal liberada principalmente por las células parietales del estómago (Hall, 2016), aunque las células productoras de grelina igualmente se encuentran presentes en intestino, hipotálamo e islotes pancreáticos (Ahima, 2006). Los niveles de grelina aumentan durante el ayuno y disminuyen rápidamente después de la ingesta de alimentos (Hall, 2016).

Para que la grelina ejerza su efecto se requiere de una modificación post-transduccional, conocida como acilación, que se lleva a cabo por la enzima grelina o-acetiltransferasa (GOAT) para la unión y activación del receptor. El receptor está principalmente expresado en cerebro y en menor proporción en órganos periféricos como riñón, bazo, páncreas y glándula adrenal. En las neuronas hipotalámicas NPY/AgRP, la grelina aumenta los niveles intracelulares de AMPK, el cual apaga

las vías de consumo de ATP para activar las vías de generación del mismo (glucosa y oxidación de ácidos grasos) (Collden et al., 2017)

Dentro de las funciones de la grelina, aparte de la estimulación del consumo de alimentos, se encuentran: aumento en la motilidad y secreción de ácido gástrico; modula la sensación de los sabores; estrés y ansiedad; metabolismo de la glucosa; y termogénesis de tejido adiposo pardo. En estudios realizados en animales, la administración de grelina aumenta la ingesta de alimentos, lo que sugiere que se trata de una hormona orexigénica (Hall, 2016).

El uso terapéutico potencial de la grelina es para el tratamiento de la obesidad. Se ha establecido que con un antagonista de grelina, D-Lys-3-GHRP-6, se puede reducir el consumo de alimento, así como, promover la pérdida de peso a corto plazo, en ratones obesos (Collden et al., 2017).

1.1.1.2.2 Leptina

La leptina es secretada predominantemente por adipocitos y en pequeñas cantidades por células epiteliales gástricas y de la placenta (Boyadjieva, 2009). Se encuentra presente en suero en proporción directa a la cantidad de tejido adiposo (Enriori et al., 2006).

La principal función de la leptina es enviar señales de la cantidad de energía almacenada en el cuerpo hacia el SNC. La leptina regula el consumo de alimentos al unirse a receptores en el SNC modulando así la actividad de las neuronas POMC (Enriori et al., 2006). Además de sus efectos ya reportados, la leptina tiene efectos sobre el eje reproductivo, donde es necesaria para su maduración, así mismo está involucrada en el desarrollo cerebral (Rexford y Jeffrey, 2000).

La isoforma larga de los receptores a leptina (LepRb) se encuentra altamente expresada en regiones del hipotálamo que median la homeostasis energética, como

lo son: el núcleo arcuato, núcleo hipotalámico ventromedial y dorsomedial (Elmqvist et al., 1998). La unión del péptido al LepRb activa vías de señalización como JAK2/STAT3 y STAT5 o IRS/PI3K. Esta hormona modula la actividad tanto de las neuronas POMC como de las neuronas AgRP. Tiene la capacidad de reducir la expresión de mRNA NPY/AgRP inhibiendo así la actividad de las neuronas NPY/AgRP. Por lo contrario, la leptina aumenta la expresión de mRNA POMC, promoviendo la liberación de α -MSH (Enriori et al., 2006).

La leptina regula el metabolismo y el peso corporal. Está documentado en la literatura que la obesidad inducida por dieta se debe a un estado de resistencia a la leptina (Handjieva-Darlenska y Boyadjieva, 2009). El término resistencia a la leptina se utiliza para definir un estado de obesidad con hiperleptinemia o cuando se presenta una disminución de los efectos de la leptina incluso cuando esta es producida por el organismo (Crujeiras et al., 2015). Esto se ha atribuido a múltiples factores como el transporte alterado a través de la barrera hematoencefálica, una disrupción en la señalización en el hipotálamo por supresor de la señalización de citosinas 3 (SOCS3), inflamación o estrés del retículo endoplásmico (Park y Ahima, 2014).

1.1.1.2.3 Insulina

Es una hormona peptídica secretada por las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans como respuesta a un aumento en los niveles de glucosa en sangre. Su función principal es mantener dentro del rango normal los niveles de glucosa en sangre. La insulina favorece la entrada de glucosa a las células del músculo y tejido adiposo; además, inhibe la gluconeogénesis hepática (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

El principal estímulo para la liberación de insulina es el aumento en la concentración de glucosa extracelular. Para ello, la glucosa es captada de manera independiente de insulina por el transportador de glucosa 2 (GLUT-2) localizado en las células β -

pancreáticas. Dentro de las células, la glucosa es metabolizada causando un aumento en la proporción de ATP/ADP, lo cual lleva a la inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}). Al inactivarse el canal K_{ATP} la célula se despolariza y activa los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, aumentando así la concentración de Ca^{2+} intracelular. El Ca^{2+} intracelular estimula la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática para que sea liberada (Beltowski et al., 2018).

El péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) inducen la liberación de insulina sobre las células β -pancreáticas. El GIP es secretado por las células K del duodeno y yeyuno tras detectar la presencia de glucosa y lípidos en el duodeno; mientras que el GLP-1 se secreta por las células enterocromafines tipo L por efecto de la glucosa, la cual ingresa por transporte facilitado mediante un transportador sodio (Na)-glucosa. Ambos péptidos se unen a sus receptores en las células β y activan a la adenilato ciclasa (AC), incrementando los niveles de AMPc, lo cual aumenta el Ca^{2+} intracelular, favoreciendo la liberación de insulina (Beltowski et al., 2018).

Otro mecanismo que induce la liberación de insulina es la unión de ácidos grasos de cadena larga a su receptor GPR40, también conocido como FFA1, localizado en las células β . Este receptor acoplado a Gq al ser activado produce un aumento del Ca^{2+} intracelular mediante inositol trifosfato (IP3) para la liberación de insulina (Morgan y Dhayal, 2009).

Los canales K_{ATP} han sido identificados como blancos del sulfuro de hidrógeno (H_2S). Por lo tanto, se sugiere como un mecanismo mediante el cual el H_2S inhibe la secreción de insulina a la activación de los canales K_{ATP} . El H_2S activa los canales K_{ATP} favoreciendo la salida de K^+ de la célula. Esta se hiperpolariza y produce el cierre de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. De esta manera, la concentración de Ca^{2+} intracelular disminuye y se inhibe la liberación de insulina (Beltowski et al., 2018).

El receptor a insulina se encuentra altamente expresado en las neuronas POMC/CART. Al unirse la insulina con su receptor se produce la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina (IRS) llevando a la activación de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K) desencadenando la transcripción de genes, apertura de canales y translocación de proteínas dentro de la neurona POMC/CART (Morton et al., 2006; Qiu et al., 2017) e inhibe el consumo de alimentos (ver figura 1).

1.1.1 Alteraciones inducidas por la obesidad

La obesidad conlleva a un incremento en la adiposidad abdominal, que está asociada con el riesgo de padecer desórdenes como cirrosis, infarto, hipertensión o enfermedad renal, entre otras (Figura 2) (Mahan et al., 2013). Asimismo, las personas con obesidad presentan un mayor riesgo de padecer diferentes comorbilidades como pueden ser: diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial, infertilidad, desarrollo de tumores o accidente cerebrovascular (Williams et al., 2015).

También, el aumento de la adiposidad lleva a cambios endócrinos. Hormonas como la leptina, insulina, cortisol y progesterona se encuentran elevadas. Por el contrario, la hormona de crecimiento, grelina y adiponectina se encuentran disminuidas (Bray, 2004b).

1.1.1.2 Alteraciones antropométricas

La obesidad es un exceso en la acumulación de grasa que alcanza niveles perjudiciales para la salud. La obesidad se clasifica en diferentes categorías basadas en una relación entre el peso del individuo y su estatura, lo que se conoce como índice de masa corporal (IMC). Un IMC de 25 a 29.9 kg/m² indica sobrepeso, mientras que un IMC \geq 30 kg/m² indica obesidad. La grasa almacenada, principalmente de manera de triglicéridos, es la reserva de energía en el tejido

adiposo. El exceso de energía se almacena en los adipocitos, los cuales crecen en tamaño y número.

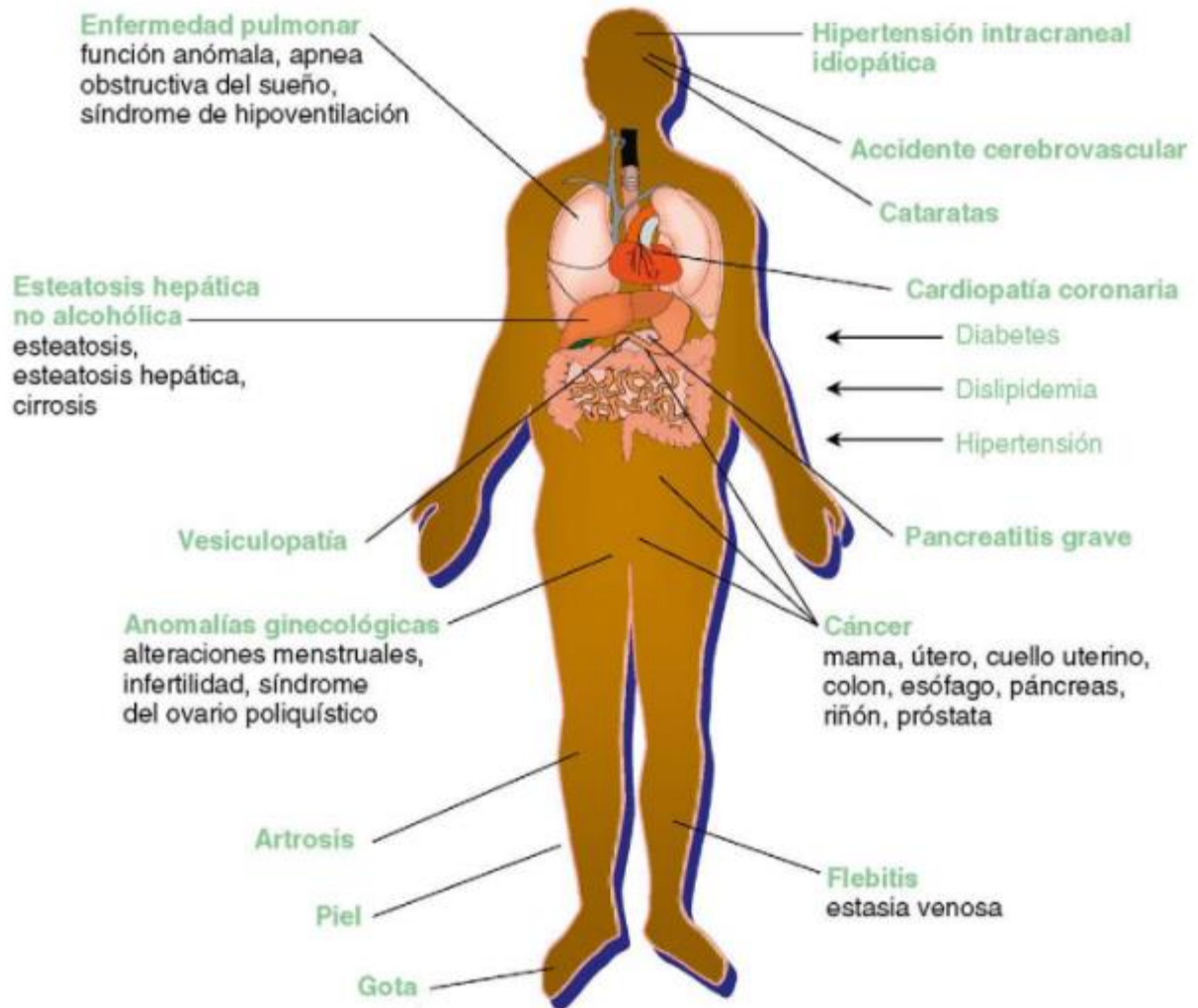


Figura 2. Complicaciones de la obesidad. Tomada de (Mahan et al., 2013).

El tejido adiposo creado a partir del exceso de energía se acumula alrededor de los órganos internos y debajo de la piel, a diferencia de la grasa esencial que se almacena en pequeñas cantidades en corazón, músculos, pulmones, hígado, sistema nervioso y en la médula ósea (Mahan et al., 2013).

1.1.1.1 Alteraciones metabólicas

Durante la obesidad, los niveles de las hormonas reguladoras del apetito como la grelina, leptina e insulina se encuentran en un desbalance. Los niveles de grelina aumentan durante el ayuno y disminuyen después del consumo de alimentos.

Además, cuando los individuos presentan sobrepeso se ha observado que los niveles de grelina se encuentran disminuidos comparados con aquellos de individuos con normopeso (Shiyya et al., 2002).

Por otra parte, los niveles de leptina están relacionados con la cantidad de grasa presente en el cuerpo y refleja su estado energético. Los niveles de leptina varían de acuerdo al ciclo circadiano, disminuyendo en el ayuno y aumentando después del consumo de alimentos. En la obesidad, se produce una resistencia a la leptina induciendo un aumento en los niveles de esta hormona. Se ha demostrado que en la obesidad inducida por dieta la administración de leptina exógena no disminuyó el consumo de alimentos (Crujeiras et al., 2015).

De igual manera, la obesidad está relacionada con la resistencia a la insulina y los elevados niveles de la misma. De hecho se ha propuesto que la resistencia a la insulina puede ser debido a un defecto en la translocación, anclaje o fusión de las vesículas contenedoras del transportador de glucosa 4 (GLUT4) con la membrana plasmática (Kahn y Flier, 2000).

1.1.1.3 Alteraciones cardiovasculares

A nivel mundial, las enfermedades cardiovasculares como el infarto cerebral o el infarto al miocardio relacionadas con el exceso de peso corporal causaron aproximadamente el 41% de las muertes y el 34% de la reducción en la esperanza de vida (Collaborators et al., 2017).

Por lo tanto, la obesidad es un factor de riesgo para sufrir un infarto al miocardio o un evento cerebrovascular. La obesidad induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias del tejido adiposo como leptina, adiponectina y marcadores de inflamación incluyendo IL-6 y TNF α . Además, también se genera resistencia a la insulina, disfunción endotelial y generación de especies reactivas de oxígeno. Todos estos mecanismos pueden contribuir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares durante la obesidad (Van Gaal et al., 2006).

1.1.1.3.1 Hipertensión arterial

Una de las enfermedades cardiovasculares que se desarrolla durante la obesidad es la hipertensión arterial sistémica. Esta es un padecimiento multifactorial que se define por un aumento sostenido de la presión arterial sistólica (la presión durante la fase de contracción del ciclo cardíaco), la presión arterial diastólica (la presión durante la fase de relajación del ciclo cardíaco) o ambas, siendo $\geq 140/90$ mmHg respectivamente (NOM-030-SSA2-2009).

Tabla 2. Clasificación de la hipertensión arterial. (Tomada de NOM-030-SSA2-2009).

Categoría	Sistólica mmHg	Diastólica mmHg
Optima	< 120	< 80
Presión arterial normal	120 a 129	80 a 84
Presión arterial fronteriza	130 a 139	85 a 89
Hipertensión grado 1	140 a 159	90 a 99
Hipertensión grado 2	160 a 179	100 a 109
Hipertensión grado 3	≥ 180	≥ 110

La obesidad está altamente relacionada con una actividad simpática incrementada (Bray, 2004a), un incremento del flujo sanguíneo y el gasto cardíaco; así como, un incremento en la reabsorción de sodio renal induciendo hipertensión (Re, R., 2009).

Los principales reguladores de la presión arterial son: (1) el sistema nervioso simpático (SNS) para el control a corto plazo y (2) los riñones para control a largo plazo. Cuando se presenta una disminución en la presión arterial (PA) el SNS libera noradrenalina (NA), la cual actúa sobre los receptores α_1 -adrenérgicos de los vasos sanguíneos para inducir la vasoconstricción, aumentando así la resistencia periférica y elevando la PA. Durante la obesidad se produce una hiperestimulación del SNS, resultando en un aumento de la PA (Mahan L.K., 2013).

Además, durante la obesidad, una mayor cantidad de grasa visceral sintetiza cantidades elevadas de angiotensinógeno, el cual activa el sistema renina-angiotensina (SRA) y eleva la PA. La angiotensina II promueve la hipertrofia y disfunción de adipocitos, que van a producir mayor cantidad de leptina y menos adiponectina. Asimismo, las altas concentraciones de leptina circulantes activan el SNS (Mahan L.K., 2013).

La activación del SNS se ha considerado como una parte importante de la patogénesis de la hipertensión en individuos obesos. Una ingesta alta de calorías incrementa los niveles de NA en tejidos periféricos, debido a que aumenta los niveles basales de NA en plasma, lo cual amplifica el efecto de NA plasmática en respuesta a un estímulo (Seki y Hosono, 2015) . Se ha sugerido que el contenido alto de grasas y carbohidratos en la dieta puede estimular de manera aguda los receptores α_1 - y β - adrenérgicos (Kotsis et al., 2010). Además, en los vasos sanguíneos de resistencia se ha reportado una sobre activación de los nervios simpáticos perivasculares que rodean a los vasos sanguíneos de resistencia (Haddock y Hill, 2011).

1.2 Sulfuro de hidrógeno (H_2S)

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) junto con el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO), conforman la familia de los gasotransmisores (Donald, 2016).

Para que una molécula sea considerada como un gasotransmisor, debe cumplir con la siguiente clasificación (Wang, 2002):

- (1) Debe ser una molécula gaseosa pequeña;
- (2) Que permee libremente las membranas;
- (3) Debe ser producida endógena y enzimáticamente, y su generación debe ser regulada;
- (4) Tener funciones específicas definidas;
- (5) Sus efectos celulares pueden o no estar mediados por segundos mensajeros, pero deben tener blancos moleculares o celulares específicos.

El H₂S es producido endógenamente en el organismo principalmente mediante tres vías enzimáticas (Figura 3):

- (1) Cistationina γ -liasa (CSE);
- (2) Cistationina β -sintetasa (CBS); y
- (3) Cistationina aminotransferasa - 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (CAT - 3-MST).

La CSE y la CBS son enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP) y utilizan a la L-Cisteína como sustrato, mientras que 3-MST es no dependiente de PLP y como sustrato utiliza 3-mercaptopiruvato (Moore y Whiteman, 2015). La enzima CSE se expresa predominantemente en el sistema cardiovascular, especialmente en miocardio y células de músculo liso vascular; mientras que la enzima CBS se expresa preferentemente en sistema nervioso central. La 3-MST es una enzima citosólica y mitocondrial, teniendo mayor presencia en la mitocondria y se expresa en cerebro y endotelio vascular (Yu et al., 2014).

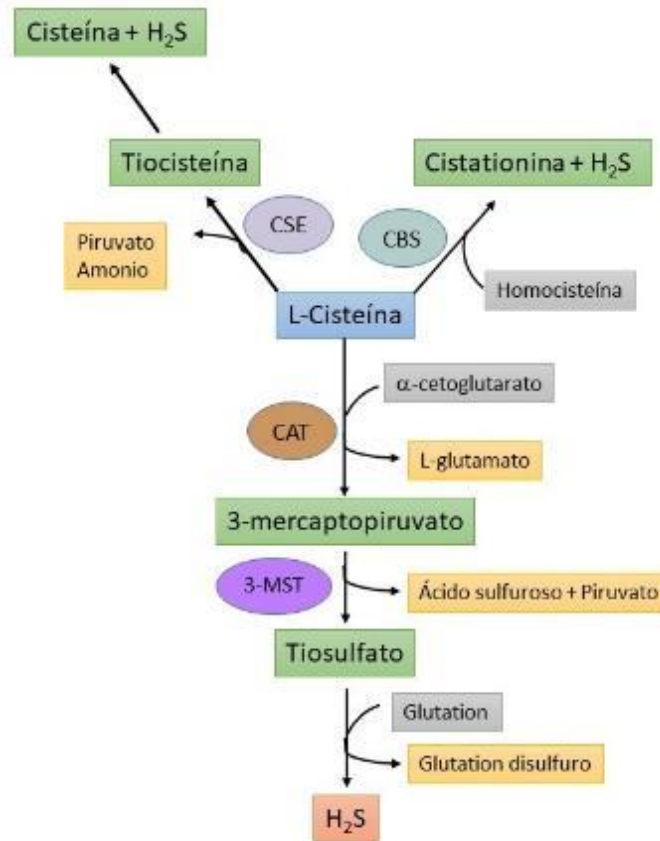


Figura 3. Síntesis endógena del H₂S. El sustrato para la producción de H₂S es L-Cisteína. La generación de H₂S que deriva de la enzima CBS está asociada con la condensación de homocisteína a L-cisteína para producir cistationina y H₂S. La enzima CSE cataliza la transformación de L-cisteína hacia piruvato, amonio y tiocisteína, este último es degradado a cisteína y H₂S. CAT estimula la liberación de 3-mercaptopiruvato y L-glutamato a través de la reacción de L-cisteína a α-cetoglutarato. 3-mercaptopiruvato es finalmente catalizado hacia ácido sulfúrico, piruvato y tiosulfato por la enzima 3-MST. CSE, Cistationina γ-liasa; CBS, Cistationina β-sintetasa; CAT, Cistationina aminotransferasa; 3-MST, 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa. Modificado de (Yu et al., 2014).

Los vasos sanguíneos expresan enzimas productoras de H₂S y responden a esta molécula mediante la relajación. La CBS es necesaria para la transulfhidración de homocisteína para la producción de cistationina y H₂S. A su vez, la CSE es la principal enzima catalizadora en la transformación de L-cisteína hacia H₂S en el sistema cardiovascular, produciendo amonio y piruvato como subproductos. De igual manera, las enzimas CAT y 3-MST, están involucradas en la producción de H₂S en el sistema cardiovascular. La CAT es una enzima que utiliza PLP como

cofactor y se ha detectado en células endoteliales vasculares; mientras que la 3-MST tiene como cofactor al zinc y se ha localizado tanto en células endoteliales como células del músculo liso en aorta torácica de rata (Moore y Whiteman, 2015) (Figura 4).

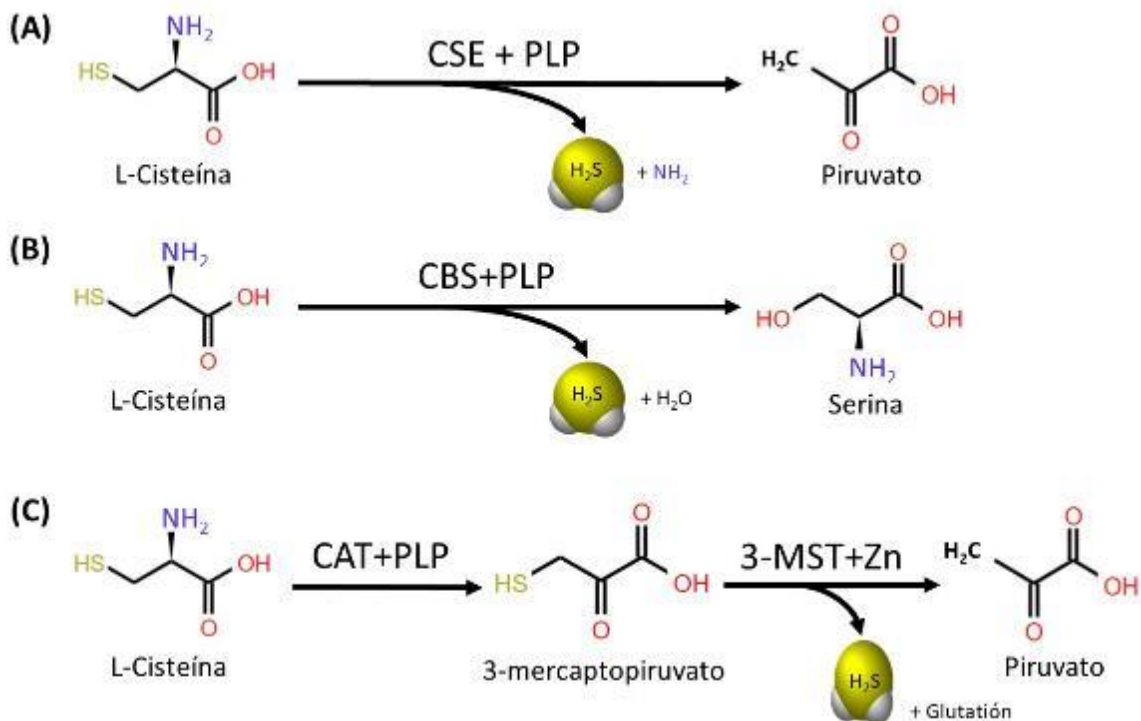


Figura 4. Reacciones de las enzimas productoras de H₂S. (A) Reacción enzimática de la cistationina gamma liasa. (B) Reacción enzimática de la cisteína beta sintetasa. (C) Reacción enzimática de la Cistationina aminotransferasa/3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa. Modificada de Moore y Whiteman, 2015.

La síntesis de H₂S mediante CSE se produce por medio de la activación de receptores muscarínicos por acetilcolina (ACh) en las células endoteliales vasculares, lo cual induce un aumento de Ca²⁺ intracelular. Posteriormente, la calmodulina activada por Ca²⁺ estimula a la CSE para la producción de H₂S. Esta enzima es inhibida por DL-Propargilglicina (DL-PPG) y β-ciano-L-alanina (BCA). Además, la expresión del gen CSE en el sistema cardiovascular puede también inhibirse por insulina (Moore y Whiteman, 2015).

Además de las vías enzimáticas, el H₂S puede ser producido por vías no enzimáticas. El H₂S puede ser sintetizado a partir de glucosa mediante la glucólisis o de fosfogluconato mediante la NADPH oxidasa. La glucosa reacciona con la metionina, homocisteína o cisteína para producir compuestos gaseosos de sulfuro. También el H₂S puede ser producido a través de la reducción directa de glutatión.

Además, la formación de H₂S a partir de tiosulfato resulta de una reacción reductiva que involucra a un donador de hidrógeno, el piruvato (Kolluru et al., 2013). Asimismo, puede ser sintetizado por bacterias reductoras de sulfuro que se encuentran en la microbiota de mamíferos (Tomasova et al., 2016).

Finalmente, el H₂S puede ser oxidado en la mitocondria a tiosulfato y sulfito para ser excretado en la orina en forma de sulfato (Figura 5).

1.2.1 Efecto vasodilatador del H₂S

En los últimos 20 años han surgido estudios demostrando que el H₂S tiene funciones importantes en varios órganos y sistemas (Wang, 2012a). Por ejemplo, es un neuromodulador (Abe y Kimura, 1996) y regula la función cardiovascular (Zhao, W. et al., 2001).

Se ha reportado previamente que concentraciones fisiológicas relevantes de H₂S inducen la relajación de tejido aórtico de rata y una reducción momentánea de la presión arterial. Estos efectos fueron mediados por la estimulación directa de canales K_{ATP} y la subsecuente hiperpolarización de las células de músculo liso vascular (Moore y Whiteman, 2015).

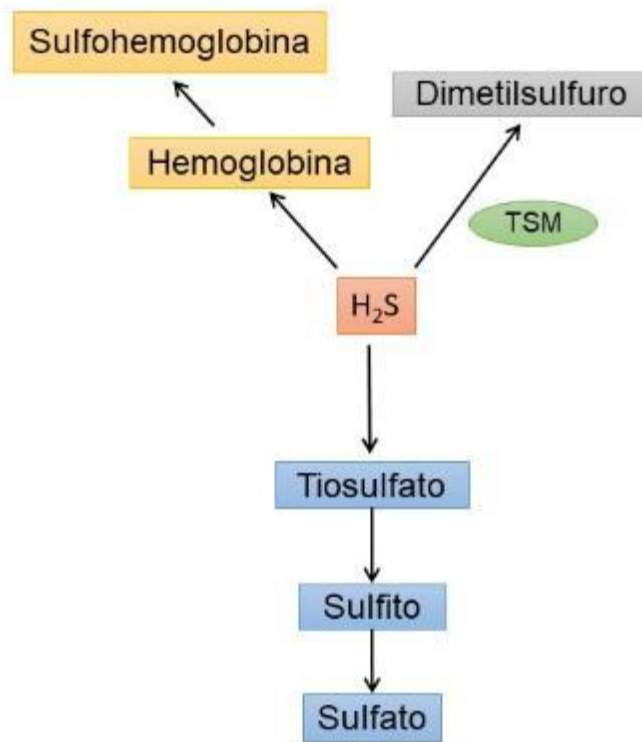


Figura 5. Rutas de degradación del H₂S. El H₂S es oxidado hacia tiosulfato, seguido de la producción de sulfitos, los cuales son convertidos a sulfatos. La tiol-S-metiltransferasa (TSM) cataliza la conversión de H₂S a dimetilsulfuro. Además, el H₂S puede interactuar con hemoglobina para la formación de sulfohemoglobina. Tomado de (Yu et al., 2014).

De esta manera, la relajación de los vasos sanguíneos inducida por H₂S tiene como blanco celular los canales K_{ATP} en las células del músculo liso vascular (Figura 6). La apertura de los canales K_{ATP} induce la hiperpolarización de la célula, cerrando los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje tipo L, lo cual lleva a una disminución de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ llevando así a la relajación celular y por lo tanto, a la dilatación de los vasos sanguíneos (Hermann A., 2012).

Se ha reconocido la importancia fisiológica del H₂S en el sistema cardiovascular y se ha demostrado que el H₂S protege el corazón por medio de acciones antioxidantes, anti-apoptóticas y anti-inflamatorias (Seki y Hosono, 2015).

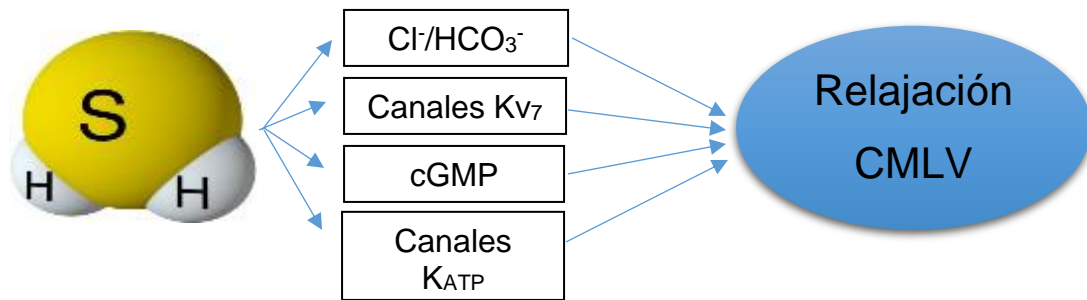


Figura 6. Señalización del H₂S en la relajación de las células de músculo liso vascular (CMLV). Modificado de Moore y Whiteman, 2015.

La CSE es la enzima que mayor cantidad de H₂S produce en el músculo liso y endotelio de los vasos sanguíneos, así como en el tejido adiposo perivascular (PVAT). El H₂S interactúa con el NO y actúa de manera similar al factor relajante derivado de endotelio y al factor hiperpolarizante derivado de endotelio (Moore y Whiteman, 2015), que estimulan los canales K_{ATP} mediante la apertura de canales de potasio activados por Ca²⁺ de pequeña conductancia (Wang, 2012b). Tiene un papel importante en la regulación del tono vascular y presión arterial al causar hiperpolarización y vasorelajación de las células de músculo liso vascular (Hart, 2011).

También se ha demostrado que un bolo i.v. de NaHS provoca una caída momentánea de la presión arterial en ratas anestesiadas (Ali et al., 2006). La administración exógena de H₂S disminuye la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Zhao, X. et al., 2008). A su vez, una sola dosis de GYY4137 mejoró la hipertensión inducida por L-NAME en rata y el tratamiento crónico con GYY4137 satisfactoriamente redujo la presión arterial de ratas SHR (Li et al., 2008).

1.2.2 Herramientas farmacológicas para el estudio del H₂S

Para el estudio de los efectos fisiológicos del H₂S, existen varias herramientas farmacológicas (Papapetropoulos et al., 2015b). Por ejemplo, se encuentran los donadores de H₂S que incluyen a: (1) los donadores inorgánicos como el sulfhidrato

de sodio (NaHS) y el sulfuro de sodio (Na₂S), (2) los donadores orgánicos de origen natural como los dialildisulfuros y trialildisulfuros presentes en algunos vegetales, y (3) los donadores sintéticos como el GYY4137.

La L-cisteína y sus análogos (S-alil cisteína, S-propargil cisteína y N-acetil cisteína) pueden también generar H₂S por la vía CSE/CBS, aunque la cantidad de H₂S producido depende de los niveles endógenos de la enzima presente (Papapetropoulos et al., 2015a).

Además, se han descrito algunos inhibidores de las enzimas como la DL-propargilglicina (inhibidor irreversible de la CSE), el ácido amino oxiacético (inhibidor no selectivo de la CBS); y la hidroxilamina, inhibidor de ambas enzimas, CSE y CBS. Es importante mencionar que, aunque es ampliamente empleada la mezcla racémica de la DL-propargilglicina, únicamente la L-propargilglicina inhibe a la CSE mientras que la D-propargilglicina es un sustrato suicida de la D-amino ácido oxidasa, esto significa que la D-propargilglicina inactiva irreversiblemente a la D-amino ácido oxidasa, produciendo así poliuria, glucosuria y aminoaciduria (Konno et al., 2000).

1.2.3 Sulfhidración de proteínas

Uno de los mecanismos por el cual el H₂S señala es a través de un proceso denominado sulfhidración o persulfidación que funciona de manera análoga a la nitrosilación. Este mecanismo se basa en la modificación de residuos de cisteína en las proteínas blanco (Mustafa et al., 2009). El primer paso es una reacción de oxidación de los residuos de cisteína, ya que el H₂S no puede modificar directamente los residuos reducidos (Paul y Snyder, 2015b).

1.2.3.1 S-sulfhidración de canales K_{ATP}

La vasodilatación inducida por H_2S se debe principalmente a la activación de canales K_{ATP} por medio de la sulfhidración del residuo C34 en la subunidad Kir6.1 en las células de músculo liso. De esta manera, se evita la unión con ATP y se promueve la unión de fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP2). Se induce la apertura de los canales K_{ATP} y por lo tanto, la relajación de las células (Moore y Whiteman, 2015).

Además, otros estudios han demostrado que la vasodilatación inducida por H_2S interacciona con la vía del NO. Este efecto puede ser debido a la inhibición de la fosfodiesterasa 5 y por lo tanto, elevando los niveles de cGMP o por reacción directa con el NO, lo que lleva a la formación de nitroxilo (HNO) activando así la cascada de señalización HNO-TRPA1-CGRP (Eberhardt et al., 2014).

Mientras que el NO tiene como blanco el grupo SH de la L-cisteína para formar -SON, el H_2S media la conversión de -SH a grupos persulfuros -SSH. Este cambio aumenta la reactividad de la L-cisteína para ser modificada mientras que la nitrosilación disminuye la reactividad de la L-cisteína.

El H_2S termodinámicamente no puede reaccionar directamente con el grupo -SH de la L-cisteína, primero debe ser oxidado, posiblemente cuando se generan especies reactivas de oxígeno en respuesta a un estímulo fisiológico (Paul y Snyder, 2015a).

El H_2S genera persulfuros cuando reacciona con grupos tiol oxidados y disulfuro. La sulfhidración puede ocurrir en varias formas: (1) ataque nucleofílico del sulfuro sobre los residuos de cisteína oxidados tales como ácidos sulfónicos de cisteína (cys-SOH) o disulfuros de cisteína (-S-S-); (2) a través de la reacción entre especies oxidadas de sulfuro como polisulfuros o cisteína-tioles, y (3) a través de la reacción

del disulfuro de hidrógeno (H_2S_2) con un grupo tiol de cisteína. Además, el H_2S puede generar polisulfuros.

La sulfhidración es una modificación altamente prevalente y participa en una variedad de procesos fisiológicos que incluyen desde la regulación de la presión arterial hasta la función neural.

1.2.4 Relación del H_2S con las enfermedades metabólicas

En la última década se ha descrito que el H_2S interviene en enfermedades metabólicas tales como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y las complicaciones asociadas a estas (Popov, 2013), por lo tanto, existen algunos estudios que han tratado de relacionar el H_2S con estas enfermedades metabólicas. Evidencia reportada por Feng et al. (2009) demostraron que: (1) el tejido adiposo contiene la enzima CSE y produce endógenamente H_2S ; y (2) el H_2S actúa como un factor autócrino e inhibe la recaptura de glucosa en el adipocito posiblemente por la vía PI3K (Feng et al., 2009). En congruencia con estos hallazgos, en las células β pancreáticas, el H_2S inhibe la exocitosis de insulina posiblemente al activar a los canales de potasio K_{ATP} , produciendo una disminución de K^+ intracelular e induciendo la hiperpolarización de la célula, lo que causa una disminución de la conductancia al Ca^{2+} e inhibe la exocitosis de los gránulos de insulina (Untereiner y Wu, 2017). En contraste, otros reportes indican que el H_2S incrementa la recaptura de glucosa en tejido adiposo (Cai et al., 2016; Manna y Jain, 2011) y mejora la resistencia a la insulina (Beltowski et al., 2018). Así, la obesidad y diabetes se han relacionado con la disfunción o con el metabolismo alterado de la vía CSE/ H_2S (Tabla 3).

Además, aún existe controversia en relación al aumento o disminución de los niveles de H_2S durante la obesidad. Por ejemplo, un aumento de la adiposidad induce la disminución de los niveles plasmáticos de H_2S en sujetos con sobrepeso (Whiteman et al., 2010). Además, en pacientes con hipertrigliceridemia se observó una

reducción de H₂S en plasma, mientras que en ratones con una dieta rica en grasas, el tratamiento con NaHS redujo los niveles de triglicéridos posiblemente a través de una vía mediada por AMPK-Tor (Sun et al., 2015). Asimismo, en el ratón, el tratamiento con una dieta rica en grasas por 8 semanas redujo la expresión de las enzimas CSE y 3-MST, así como, la biosíntesis de H₂S en el hígado (Peh et al., 2014). Consistente con estos datos, en ratones obesos se ha reportado una reducción de la biodisponibilidad de H₂S en macrófagos de tejido adiposo. Los macrófagos liberan citocinas pro-inflamatorias y contribuyen a la inflamación observada en la obesidad y el H₂S puede atenuar la producción de estas citocinas (Velmurugan et al., 2015).

Por otra parte, existen estudios que proponen un aumento en los niveles de H₂S durante la obesidad. En ratas diabéticas y obesas de la cepa Zucker se encontró: (1) un incremento del RNAm y de la proteína de la enzima CSE en los islotes pancreáticos; y (2) el tratamiento con un inhibidor de la CSE (propargilglicina; PPG) incrementó la liberación de insulina y disminuyó la hiperglicemia. Con estos resultados, los autores concluyeron que durante la diabetes en ratas Zucker obesas existe una sobre-expresión de CSE y sobreproducción de H₂S que podría contribuir a la fisiopatología de la diabetes (Wu, L. et al., 2009). Asimismo, en adipocitos de ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasas se observó que el H₂S inhibió la lipólisis estimulada por isoproterenol aunque paradójicamente el H₂S mejoró la resistencia a la insulina (Geng et al., 2013). Los autores concluyeron que el H₂S tiene efectos diferentes sobre la función metabólica y endócrina de los adipocitos (Geng et al., 2013). En ratas con resistencia a la insulina inducida por fructosa, la expresión de la enzima CSE y la producción de H₂S fue incrementada en tejido adiposo, sugiriendo que existe una sobre activación del sistema CSE/H₂S en el tejido adiposo con resistencia a la insulina (Feng et al., 2009).

Tabla 3. Evidencia controversial sobre el aumento o disminución del H₂S durante la obesidad o resistencia a la insulina.

	Modelo	Efecto	Referencia
↑ H ₂ S	Ratas Zucker obesas y diabéticas (6-18 semanas de edad)	Sobreexpresión de la enzima CSE y sobreproducción de H ₂ S	(Wu, L. et al., 2009)
	Resistencia a la insulina inducida por fructosa (10%) en ratas durante 12 semanas	Sobreactivación del sistema CSE/H ₂ S en tejido adiposo	(Feng et al., 2009)
	Ratones con dieta rica en grasas (60%) durante 5 semanas	Aumento del mRNA y niveles proteicos de CBS y CSE en hígado. Por lo tanto, aumento de la producción de H ₂ S	(Hwang et al., 2013)
	Ratas con dieta rica en grasas durante 4 semanas	Incremento en la producción de H ₂ S en tejido adiposo perivascular	(Beltowski, 2015)

	Modelo	Efecto	Referencia
↓ H ₂ S	Ratones con dieta rica en grasas (16%) durante 8-16 semanas	Disminución de la expresión de CSE y 3-MST en hígado, así como de la síntesis de H ₂ S en el mismo órgano	(Peh et al., 2014)
	Ratones con dieta rica en grasas (60%) durante 20 semanas	Disminución de la biodisponibilidad del H ₂ S en los macrófagos del tejido adiposo	(Velmurugan et al., 2015)
	Ratas con dieta rica en grasas (57%) durante 18 semanas	Disminución de la actividad de las enzimas CBS y CSE en hígado	(Bravo et al., 2011)

En congruencia con sus efectos benéficos sobre la resistencia a la insulina, en ratones KO-CSE con dieta rica en grasas se observó: (1) intolerancia a la glucosa; (2) hiperglicemia; (3) disminución en la secreción de insulina y (4) aumento de apoptosis en las células β-pancreáticas. Estos datos sugieren que el H₂S protege a las células β-pancreáticas de la glucotoxicidad inducida por una dieta rica en grasas (Okamoto et al., 2013).

2. Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

Los datos presentados sugieren que el sistema CSE/H₂S modula la función cardiovascular y metabólica, en cuanto a niveles hormonales y almacenamiento de lípidos. Sin embargo, hay controversia sobre los efectos de la dieta en la producción de H₂S. Por lo tanto, aún se desconoce el papel del H₂S sobre las alteraciones cardiovasculares y metabólicas que se generan durante la obesidad inducida por dieta rica en grasas.

2.2 Hipótesis

La administración crónica de un donador de H₂S, sulfhidrato de sodio (NaHS), así como del sustrato de las enzimas productoras de H₂S, L-Cisteína, disminuirán las alteraciones cardiovasculares y metabólicas producidas por una dieta rica en grasas. Mientras que la administración crónica de un inhibidor de la enzima CSE, DL-Propargilglicina (DL-PPG), no tendrá efecto o exacerbará las alteraciones producidas por la dieta.

2.3 Objetivo general

Evaluar las alteraciones cardiovasculares y metabólicas producidas por una dieta rica en grasas, así como, los cambios producidos sobre las alteraciones mediante la administración crónica de NaHS, L-Cisteína y DL-Propargilglicina.

2.3.1 Objetivos particulares

- a. Identificar las alteraciones metabólicas y cardiovasculares producidas por la dieta rica en grasas.

- b. Determinar los efectos de los siguientes tratamientos crónicos sobre las alteraciones cardiovasculares y metabólicas:
 - a. Vehículo (PBS),
 - b. NaHS (donador de H₂S),
 - c. L-Cisteína (sustrato de CSE, CBS y 3-MST),
 - d. DL-Propargilglicina (inhibidor de CSE).

3. Materiales y métodos

3.1 Animales

Se utilizaron 36 ratas macho de la cepa Wistar con un rango de peso inicial de 220 a 300 g. Los animales fueron alojados en jaulas de plástico en un cuarto con temperatura y humedad controlada (22 ± 1 °C, 50% HR) con periodos de luz-oscuridad 12/12 h con alimento, de acuerdo con su tratamiento, y agua ad libitum, ubicado en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV Unidad Coapa). Todos los animales, procedimientos y el presente proyecto de investigación fueron realizados bajo los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio en EUA.

3.2 Diseño experimental

Los animales fueron divididos en dos grupos (ver Figura 7). El grupo 1 (n=6) recibió una dieta normal (DN) durante 16 semanas y el grupo 2 (n=30) recibió una dieta rica en grasas (DRG) durante 16 semanas. La dieta rica en grasa se dio por un período inicial de 12 semanas para inducir la obesidad. Posteriormente, sin suspender la DRG, el grupo 2 fue dividido en 5 subgrupos que recibieron por vía intraperitoneal (i.p.) durante 4 semanas tratamiento crónico con: (1) nada (control); (2) PBS (vehículo de NaHS, L-Cys y DL-PPG; 1 ml/kg); (3) NaHS (donador de H₂S; 5.6 mg/kg); (4) DL-PPG (inhibidor de la CSE; 1 mg/kg); y (5) L-Cisteína (sustrato de la enzima CSE; 300 mg/kg). El grupo con dieta normal se mantuvo por el mismo período de tiempo total (16 semanas), pero este no recibió tratamiento farmacológico. El vehículo que se utilizó fue buffer de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4 y una temperatura de 25°C.

La dieta normal consistió en Formulab Diet 5008 y para la dieta rica en grasas, este mismo alimento fue adicionado con manteca de cerdo y Nutella® (300 g y 150 g, respectivamente, por cada 550 g de alimento estándar molido). La composición de la dieta control se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición de la dieta normal y dieta rica en grasas. DN, dieta normal, DRG, dieta rica en grasas; Kcal, kilocalorías.

	100 g DN			100 g DRG		
	%	gramos	kcal	%	gramos	kcal
Carbohidratos	50.3	50.3	201.2	26.37	36	144
Proteínas	23.6	23.6	94.4	10.14	13.8	55.4
Lípidos	6.7	6.7	60.3	63.5	38.5	346.8
Kcal totales			355.9			546.1

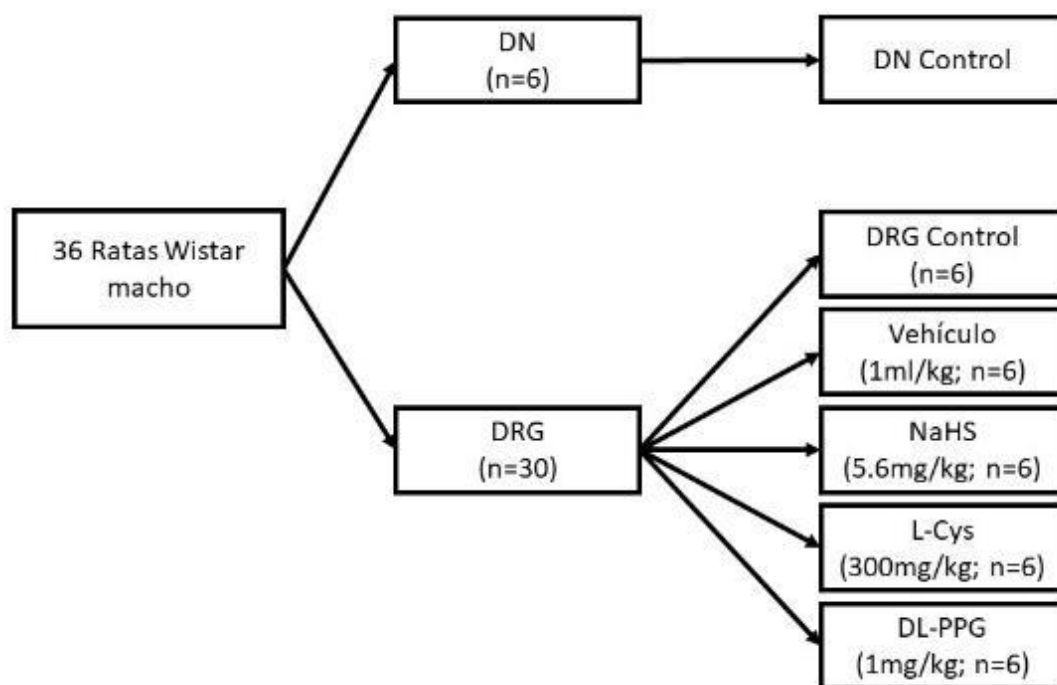


Figura 7. Protocolo experimental. DN, dieta normal; DRG, dieta rica en grasas; NaHS, sulfhidrato de sodio; L-Cys, L-cisteína; DL-PPG, DL-propargilglicina.

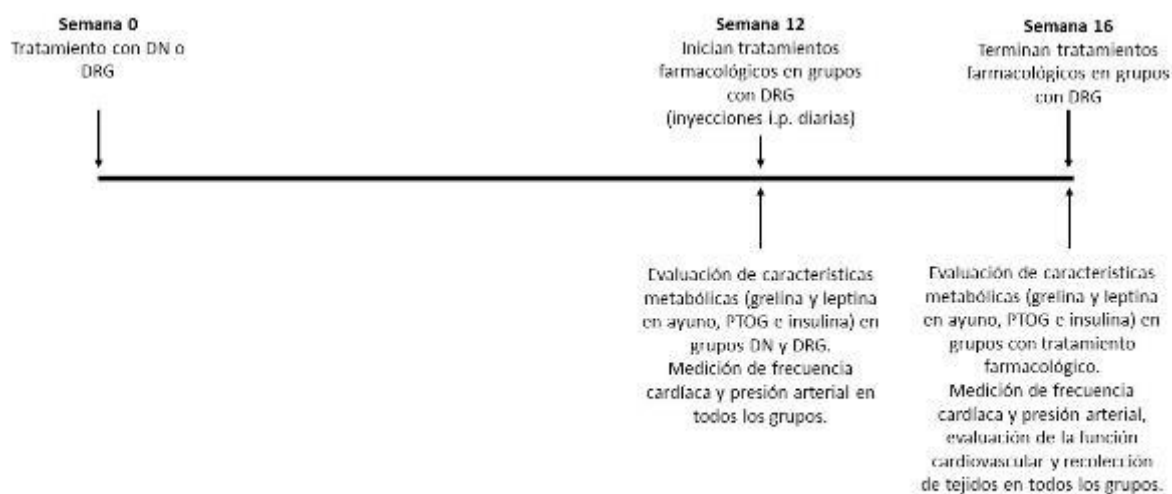


Figura 8. Curso temporal. DN, dieta normal; DRG, dieta rica en grasas; PTOG, prueba de tolerancia oral a la glucosa.

3.3 Determinación de los niveles plasmáticos de hormonas y prueba de tolerancia oral a la glucosa.

Se tomaron muestras de sangre después de 12 horas de ayuno a las 12 semanas (grupos controles) y a las 16 semanas (grupos con tratamiento) (ver figura 8). Las muestras se dejaron coagular siguiendo las instrucciones de los kits correspondientes y fueron centrifugadas. El suero se separó para realizar la medición de los niveles de hormonas, los cuales se hicieron por duplicado mediante un inmunoensayo enzimático específico utilizando kits comerciales: Mouse/Rat Leptin Immunoassay Quantikine® ELISA (R&D systems, USA) y Rat/Mouse Ghrelin (Total) ELISA Kit (Merck, Germany).

Posteriormente, los animales recibieron una carga de glucosa de 1 g/kg de peso para realizar la prueba de tolerancia oral a la glucosa donde se midieron niveles de glucosa e insulina en el tiempo 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. En cada uno de los tiempos se obtuvo una gota de sangre para medir los niveles de glucosa

utilizando un medidor de glucosa Accu-Check Active, Serie GN06854230. También se obtuvieron 1.5 ml de sangre para la medición de los niveles de insulina Rat Insulin ELISA (ALPCO, USA) en cada uno de los tiempos.

3.3.1 Grelina

Las moléculas de grelina son inestables en suero o plasma de rata. Por lo cual, el kit recomienda adicionar Pefabloc y acidificar las muestras para mayor protección de la molécula.

Por lo tanto, se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. La sangre se drenó directamente de la cola del animal en un tubo de 1.5 ml que no contenía anticoagulante.
2. Se dejó coagular durante 30 minutos y posteriormente se centrifugaron las muestras a 2000 – 3000 x g durante 15 minutos.
3. Se separó el suero de las muestras y se añadieron 2.5 μ L de Pefabloc y 11.1 μ L de HCl por cada 100 μ L de suero obtenido.
4. Se guardaron en Revco a -74°C para ser analizadas al día siguiente.
5. Se continuó el protocolo correspondiente a Rat/Mouse Ghrelin (Total) ELISA Kit (Merck, Germany).

3.3.2 Leptina

Las muestras de suero fueron diluidas para el ensayo de leptina. Por lo que se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. La sangre se drenó directamente de la cola del animal en un tubo de 1.5 ml que no contenía anticoagulante.
2. Se dejó coagular la sangre durante 2 horas a temperatura ambiente.
3. Posteriormente se centrifugaron a 2000 x g durante 20 minutos.

4. Se separó el suero y se almacenaron las muestras en el Revco a -74°C para ser analizadas al día siguiente.
5. Las muestras se diluyeron a una concentración 1:10 siguiendo las instrucciones del kit.
6. Posteriormente se siguió el protocolo correspondiente a Mouse/Rat Leptin Immunoassay Quantikine® ELISA (R&D systems, USA)

3.3.3 Insulina

Para la medición de la insulina se utilizó suero, debido a esto, los pasos a seguir fueron:

1. La sangre se drenó directamente de la cola del animal en un tubo de 1.5 ml que no contenía anticoagulante.
2. Se dejó coagular durante 30 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos en refrigeración.
3. Posteriormente se centrifugaron las muestras a $2000 \times g$ durante 15 minutos.
4. Se separó el suero y las muestras se almacenaron en el Revco a -74°C para ser analizadas al día siguiente.
5. Posteriormente se siguió el protocolo correspondiente a Rat Insulin ELISA (ALPCO, USA).

3.4 Determinación de la presión arterial

Esta variable se determinó en ratas conscientes a las 12 semanas (figura 8), antes del inicio del tratamiento, y a las 16 semanas, al final del tratamiento, por el método pletismográfico (Pressure Meter LE5001, Panlab Harvard Apparatus, Cornella, España).

Las ratas se inmovilizaron por un período de tiempo corto en cajas de acrílico y se expuso la cola a una lámpara de calentamiento por 15 minutos. Después, un sensor

óptico se colocó en la cola de las ratas, el cual fue insuflado para detener el flujo sanguíneo. La presión liberada permitió detectar la presión arterial sistólica (PAS) a través del sensor. A partir de la PAS se calcularon los valores de presión arterial diastólica (PAD) y presión arterial media (PAM). Los valores representan el promedio de 3 mediciones por rata.

3.5 Evaluación de la función cardiovascular en ratas descerebradas y desmeduladas

A las 16 semanas, los animales de cada grupo (n=6; cada uno) se anestesiaron con Isoflurano (3%). La tráquea fue canulada y las ratas fueron descerebradas y desmeduladas mediante la inserción de un estilete de acero inoxidable a través de la órbita ocular y el foramen magnum atravesando todo el canal vertebral (Gillespie, J. y Muir, 1967). Posteriormente, se les realizó una traqueostomía para ser ventilados artificialmente con aire ambiental utilizando una bomba de presión positiva (7025 rodent ventilator, Ugo Basile, Comerio, VA, Italy) a 80 respiraciones por minuto con un volumen de 13.6 ml/Kg (Kleinman y Radford, 1964). Después de realizar una vagosimpatectomía bilateral se colocaron cánulas en: (1) la arteria carótida para el registro de la presión arterial y la frecuencia cardíaca por medio de un transductor de señal (P23 XL, Grass Technologies, Warwick, RI, U.S.A.); y (2) la vena femoral derecha para la administración de fármacos. La presión sanguínea y frecuencia cardíaca fueron registrados simultáneamente utilizando una unidad de adquisición de datos (MP150A-CE, Biopac Systems Inc., Goleta, CA) y el software Acqnowledge v3.8.1 (Biopac Systems Inc., Goleta, CA).

El estilete de acero inoxidable fue reemplazado por un electrodo esmaltado excepto 1 cm localizado a 9 cm de la punta a la altura de las vértebras torácicas T₇-T₉ para estimular selectivamente los nervios simpáticos de los vasos sanguíneos (Gillespie et al., 1970). Antes de la estimulación, los animales recibieron un bolo i.v. de galamina (25 mg/Kg) para evitar los espasmos musculares inducidos eléctricamente. El tono simpático vasopresor fue estimulado con un estimulador de

pulsos cuadrados S88X (Grass Technologies, Warwick, RI, U.S.A.) aplicando trenes monofásicos de 10 s de pulsos cuadrados (2 ms, 60 V), a frecuencias de estimulación crecientes: (1) 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz.

A cada animal se le realizó el protocolo de descerebración y desmedulación anteriormente descrito. Después de dicho procedimiento, a cada animal se le realizaron 4 curvas de respuestas vasopresoras inducidas por: (1) estimulación selectiva del tono simpático vasopresor (0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 Hz); (2) bolos i.v. de noradrenalina exógena (ligando endógeno; 0.03, 0.1, 0.3, 1, y 3 µg/Kg); (3) bolos i.v. de metoxamina (agonista α_1 ; 1, 3, 10, 30 y 100 µg/Kg); y (4) bolos i.v. de UK 14,340 (agonista α_2 ; 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 y 30 µg/Kg).

3.6 Obtención de órganos

Al término de la evaluación de la función cardiovascular se sacrificaron los animales para obtener los siguientes órganos: corazón, hígado y tejido adiposo (visceral y epididimal).

Para lo cual, se realizó una incisión abdominal para exponer la cavidad abdominal. Posteriormente se abrió el peritoneo para obtener el tejido adiposo visceral, tejido adiposo epididimal e hígado. Por último, se abrió la cavidad torácica para obtener el corazón. Los órganos fueron pesados inmediatamente después de su recolección y posteriormente desechados.

3.7 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan como la media \pm e.e.m. de 6 animales. Las diferencias de los cambios de peso, presión arterial y niveles hormonales entre el grupo de NFD y HFD a las 12 semanas fueron evaluadas por t-test una vez que los datos hayan pasado la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk); en caso contrario, fueron evaluados por una prueba no paramétrica como la de U-Mann-Whitney. Las diferencias de los

cambios en la curva de tolerancia a la glucosa oral y curva de insulina fueron evaluadas por una prueba post-hoc de Tukey's, una vez que el análisis de varianza de dos vías de medidas repetidas (Two-Way RM ANOVA) haya revelado diferencias entre las poblaciones. La significancia estadística fue aceptada cuando $P < 0.05$.

3.8 Compuestos utilizados

Además del anestésico Isoflorano (Fluriso™, Vet Ones, Boise, ID, U.S.A.), los compuestos utilizados en este estudio fueron: sulfhidrato de sodio monohidratado (NaHS), L-cisteína, DL-Propargilglicina, galamina, bitartrato de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304. Todos los compuestos se obtuvieron de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.).

La noradrenalina, metoxamina, UK 14,304 y galamina se disolvieron en solución salina fisiológica. NaHS, L-cisteína y DL-propargilglicina se disolvieron en buffer de fosfatos (PBS), pH 7.4 y 25°C; se prepararon soluciones nuevas todos los días.

4. Resultados

4.1 Variables zoométricas

Se midieron variables zoométricas como lo son el peso corporal de los animales, el peso del corazón, hígado y tejido adiposo visceral y epididimal. En la Tabla 5 se muestran los cambios en las variables zoométricas inducidos por la dieta rica en grasas y por los tratamientos farmacológicos. La dieta rica en grasas produjo un aumento significativo del peso corporal y del hígado, así como del tejido adiposo visceral y epididimal. Por el contrario, la dieta rica en grasas no produjo cambios en el peso del corazón, cuando se comparó con el grupo de dieta normal.

De manera interesante, el tratamiento crónico con NaHS y L-Cys produjo un incremento de peso menor comparado con el grupo de dieta rica en grasas control. Mientras que el tratamiento con DL-PPG no logró cambiar esta variable. Adicionalmente, el peso del hígado fue significativamente disminuido por el tratamiento crónico con NaHS, L-Cys y DL-PPG cuando se comparó con el vehículo y dieta rica en grasas control. Todos los tratamientos crónicos disminuyeron significativamente tejido adiposo visceral cuando se compararon contra la dieta rica en grasas control. Mientras que el tratamiento crónico con NaHS y L-Cys disminuyeron significativamente esta misma variable comparado con el grupo que recibió vehículo. El tejido adiposo epididimal fue disminuido de manera significativa por el tratamiento con NaHS. De manera controversial, esta variable fue significativamente incrementada por el tratamiento con DL-PPG cuando fue comparado con vehículo. Por último, ningún tratamiento produjo cambios sobre el peso del corazón.

Tabla 5. Efecto de: (1) la dieta normal y la dieta rica en grasas controles y (2) los tratamientos crónicos durante 4 semanas con vehículo (1 ml/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (1 mg/kg) sobre algunas variables zoométricas después de 16 semanas de dieta.

<i>Variables zoométricas</i>					
Grupo	Peso	Corazón	Hígado	TAV	TAE
DN control	492.7±17.1	1.8±0.08	17.8±1	6.8±0.6	7.3±0.4
DRG control	568.3±24.4 ^a	1.8±0.1	20.1±1.5 ^a	26.2±4.04 ^a	16.7±2.1 ^a
DRG+ Vehículo	552.9±23.9	2±0.1	19.4±1.5	17.03±2.1 ^b	15.02±1.6
DRG+ NaHS	490.7±10.5 ^b	1.9±0.1	17.5±0.8 ^{b,c}	14.8±2.3 ^{b,c}	11.9±1.1 ^b
DRG+ L-Cys	490.3±27.9 ^b	2±0.2	17.2±0.8 ^{b,c}	10.2±1.5 ^{b,c}	12.1±1.7
DRG+ DL-PPG	501.7±49.7	2.03±0.1	14.5±0.6 ^{b,c}	18.8±2.1 ^b	20±1.9 ^b

Cada valor representa la media ± e.e.m de 6 animales. ^a, P<0.05 vs DN control; ^b, P<0.05 vs DRG control; ^c, P<0.05 vs Vehículo. DN, dieta normal; DRG, dieta rica en grasas; TAV, tejido adiposo visceral; TAE, tejido adiposo epididimal.

4.2 Variables metabólicas

Las variables metabólicas que se midieron en este estudio fueron los niveles plasmáticos en ayuno de grelina, leptina, insulina y glucosa. También se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa y con estos datos se calcularon el índice HOMA e índice Matsuda.

Como se muestra en la Tabla 6, la dieta rica en grasas: (1) redujo de manera significativa los niveles de grelina total e índice Matsuda; y (2) incrementó

significativamente los niveles de leptina, insulina y glucosa en ayuno, así como del índice HOMA cuando se comparó con la dieta normal en grasas. Es importante resaltar que estas variables se midieron después de 12 semanas de recibir una dieta normal o dieta rica en grasas.

Tabla 6. Efecto de: (1) la dieta normal y la dieta rica en grasas controles (12 semanas) y (2) de los tratamientos crónicos durante 4 semanas con vehículo (1 ml/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (1 mg/kg) (16 semanas) sobre algunas variables metabólicas.

	DN	DRG	DRG			
	Control	Control	Vehículo	NaHS	L-Cys	DL-PPG
Variables metabólicas						
Grelina (ng/ml)	2.8±0.2	0.89±0.1 ^a	1.04±0.1	1.07±0.06	0.94±0.09	0.92±0.15
Leptina (ng/ml)	687.8 ±137.1	7,969.9 ±876.8 ^a	6,969.1 ±1197.2	4,329.5 ±679.3 ^{b,c}	4456.8 ±632.9 ^b	4063 ±803.6 ^{b,c}
Insulina (ng/ml)	0.31±0.03	0.9±0.6 ^a	0.94±0.18	1.3±0.3	0.8±0.1	0.52±0.3
Glucosa (mg/dl)	80.3±4.5	111.2±5.5 ^a	117.7±5.9	102.2±4.5	115.5±5.7	95.5±5.5 ^c
Índice HOMA	1.9±0.1	6.9±2.1 ^a	7.8±1.5	9.5±2.9	11.215±4.5	1.4±0.3 ^{b,c}
Índice Matsuda	5.1±0.7	2.4±0.7 ^a	1.6±0.2	1.5±0.3	1.5±0.4	6.2±1.2 ^{b,c}

Cada dato representa la media ± e.e.m. de 6 animales. ^a, P<0.05 vs DN control; ^b, P<0.05 vs DRG control; ^c, P<0.05 vs Vehículo.

Todos los tratamientos, a excepción del vehículo, indujeron una reducción parcial y significativa de los niveles de leptina en ayuno comparado con vehículo o dieta rica en grasas control. De manera sorprendente, el tratamiento crónico con DL-PPG disminuyó significativamente los niveles de glucosa en ayuno y el índice HOMA, y aumentó el índice Matsuda. Por otra parte, el tratamiento crónico con NaHS o L-cys

no modificó las demás variables metabólicas. En el caso de los tratamientos crónicos, las variables se midieron a las 16 semanas, cuando se finalizaron los tratamientos.

La Figura 9 muestra el área bajo la curva (ABC) del efecto de la dieta normal y dieta rica en grasas (panel superior), así como de los tratamientos crónicos (panel inferior) sobre los niveles de glucosa e insulina plasmática durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). Después de las 12 semanas, la alimentación con dieta rica en grasas incrementó significativamente los niveles de glucosa sanguínea (Figura 9A) y los niveles de insulina plasmáticos (Figura 9B) durante la PTOG comparado con la dieta normal en grasas. En contraste, el tratamiento crónico durante 4 semanas con vehículo, NaHS, L-Cys o DL-PPG en ratas con dieta rica en grasas no modificaron los niveles de glucosa sanguínea (Figura 9C) o de insulina plasmática (Figura 9D) cuando se comparó con vehículo.

4.1 Variables hemodinámicas

En la Tabla 7 se muestra el efecto de la dieta normal, DRG y los tratamientos crónicos (vehículo, NaHS, L-Cys y DL-PPG) en diferentes variables hemodinámicas medidas a las 12 y 16 semanas en animales conscientes. Estas variables fueron la frecuencia cardíaca (FC), presión arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM).

Después de 12 semanas de alimentación con una dieta rica en grasas, se presentó un aumento significativo en todas las variables hemodinámicas en el grupo de DRG control cuando se comparó con el grupo de dieta normal en grasas. Dicho incremento se mantuvo hasta las 16 semanas de alimentación con DRG.

Centrándonos en los tratamientos farmacológicos, las comparaciones se realizaron entre los valores obtenidos antes y después del tratamiento crónico. De manera interesante, el tratamiento con NaHS significativamente disminuyó todas las

variables hemodinámicas cuando se comparó con los resultados obtenidos a las 12 semanas. Notablemente, estos valores obtenidos a las 16 semanas fueron similares a los obtenidos en el grupo de dieta normal en grasas a las 16 semanas. El tratamiento crónico con L-Cys significativamente disminuyó la presión arterial sistólica y media, mientras que el DL-PPG significativamente incrementó la frecuencia cardíaca comparado con los mismos tratamientos a las 12 semanas.

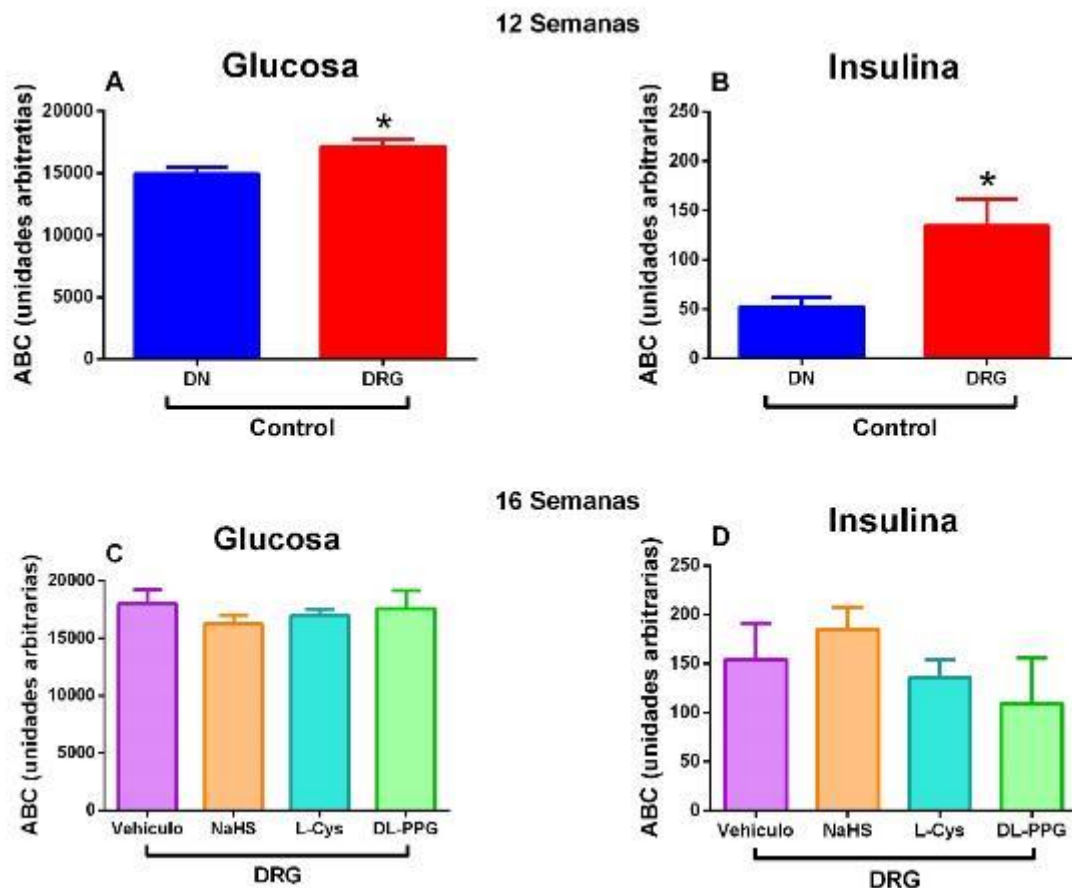


Figura 9. Área bajo la curva de glucosa e insulina. Área bajo la curva del efecto de: (1) dieta rica en grasas (panel superior); y (2) administraciones i.p. diarias durante 4 semanas de vehículo (1 ml/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (1 mg/kg) en ratas con dieta rica en grasas (panel inferior) sobre los niveles de glucosa e insulina durante la PTOG. *, $P < 0.05$ vs DN control.

Tabla 7. Efecto de: (1) la dieta normal y dieta rica en grasas controles; y (2) los tratamientos crónicos con vehículo (1 ml/kg), NaHS (5.6 mg/kg), L-Cys (300 mg/kg) y DL-PPG (1 mg/kg) sobre las variables hemodinámicas a las 12 y 16 semanas.

	12 semanas				16 semanas			
	FC (ppm)	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	PAM (mm Hg)	FC (ppm)	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	PAM (mm Hg)
DN Control	382±18	103±3	81±0.9	87±2	355±10	113±3	81±0.5	91±1
DRG Control	423±15 ^a	160±4 ^a	131±6 ^a	140±5 ^a	416±10 ^a	164±6 ^a	130±4 ^a	141±5 ^a
	DRG				Tratamiento farmacológico			
DRG + Vehículo	399±30	159±4	126±3	137±3	419±20	165±2	117±3	132±2
DRG + NaHS	411±19	146±2	115±2	125±2	336±20 ^b	113±2 ^b	81±0.8 ^b	92±1 ^b
DRG + L-Cys	390±12	164±3	121±4	135±4	364±15	142±5 ^b	109±5	119±5 ^b
DRG + DL-PPG	353±5	165±2	117±3	132±2	394±12 ^b	159±3	119±1	132±1

Cada valor representa la media ± e.e.m. de 6 animales. ^a, P<0.05 vs DN; ^b, P<0.05 vs 12 semanas del mismo tratamiento. FC, frecuencia cardíaca; PAS, presión arterial sistólica; PAM, presión arterial media; PAD, presión arterial diastólica.

4.1 Evaluación de la función cardiovascular

En la Figura 10 se puede observar el efecto de la DRG sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación del sistema nervioso simpático y bolos i.v. de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304. En ratas alimentadas con dieta normal en grasa durante 16 semanas, la estimulación eléctrica del tono simpático o la administración i.v. de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 producen incrementos en la presión arterial diastólica dependientes de la frecuencia o dependientes de la dosis, según corresponda.

De manera interesante, la DRG durante 16 semanas incrementó significativamente las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica (1 y 3 Hz) y por

metoxamina (100 µg/kg), sin generar cambios significativos en las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina o UK 14,304 cuando se comparó con el grupo de dieta normal.

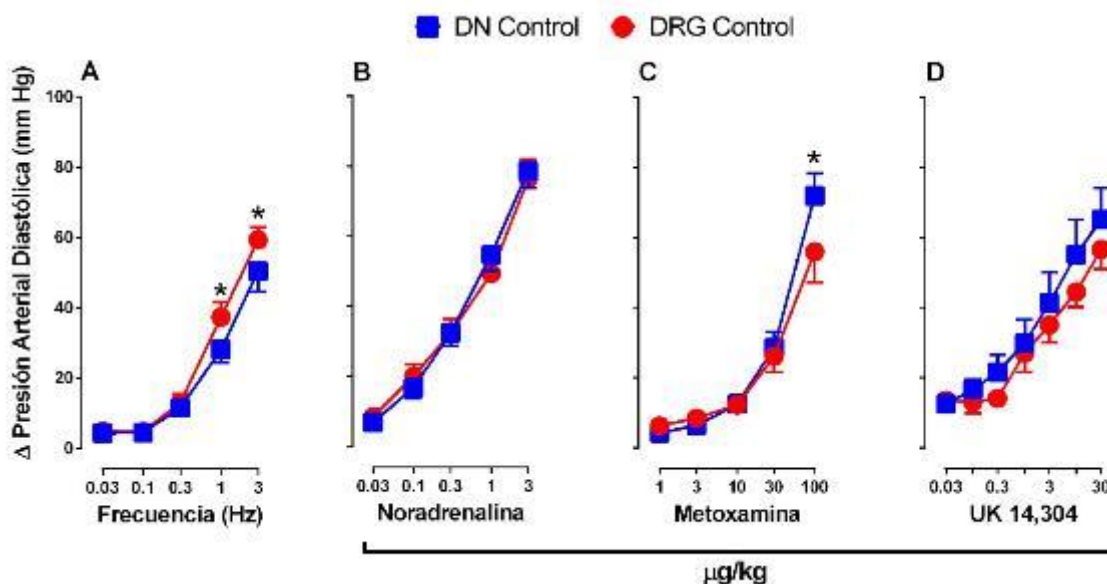


Figura 10. Efecto de la dieta rica en grasas (16 semanas) sobre las respuestas vasopresoras inducidas por: (A) estimulación simpática; (B) noradrenalina, ligando endógeno α -adrenérgico; (C) metoxamina, agonista α_1 ; (D) UK 14,304, agonista α_2 . Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs DN.

Los efectos de inyecciones i.p. diarias de vehículo, NaHS, L-Cys y DL-PPG, durante 4 semanas, sobre las respuestas cardiovasculares inducidas por estimulación simpática y administraciones de bolos i.v. de noradrenalina, metoxamina y UK 14,304 en ratas alimentadas con DRG, se muestra en las figuras 11-14.

Como se observa en la Figura 11, la administración crónica de vehículo (PBS) no afectó de manera significativa las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación simpática o administraciones de bolos i.v. de metoxamina, noradrenalina o UK 14,304 cuando se comparó con las respuestas obtenidas del grupo de dieta rica en grasas control.

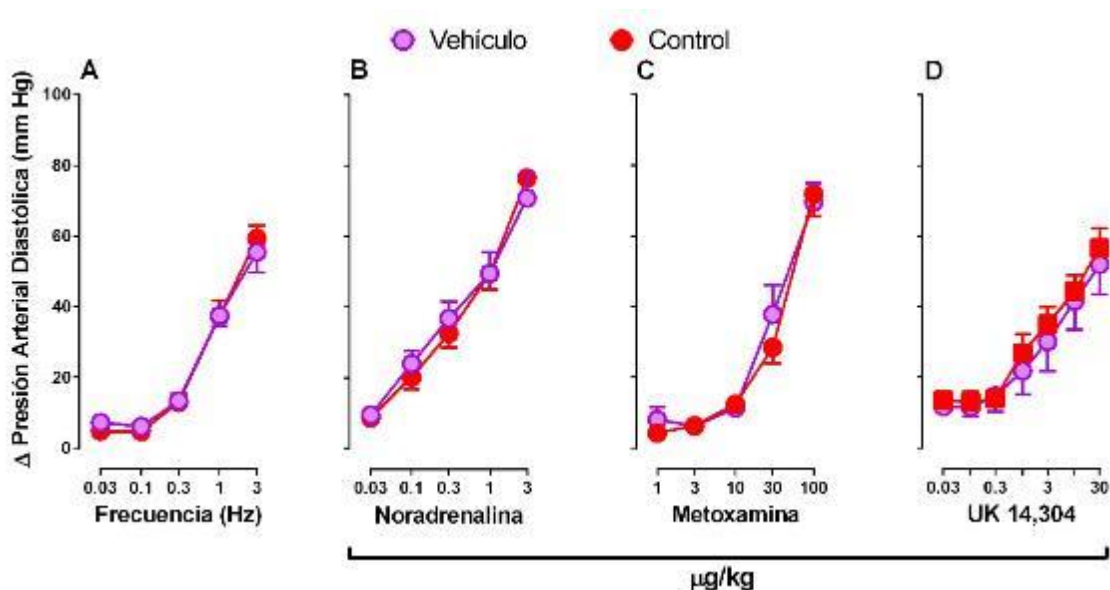


Figura 11. Efecto del tratamiento crónico con vehículo (1 ml/kg) sobre las respuestas inducidas por: (A) estimulación simpática; (B) noradrenalina; (C) metoxamina; y (D) UK 14,304. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales.

En la Figura 12 se muestra el efecto crónico del tratamiento con NaHS (5.6 mg/kg) sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación del sistema nervioso simpático. De manera interesante, la administración crónica de NaHS: (1) redujo de manera significativa las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica a las frecuencias de 1 y 3 Hz; (2) redujo de manera significativa las respuestas vasopresoras inducidas por 0.3 μ g/kg de noradrenalina y 30 μ g/kg de metoxamina; y (3) no modificó las respuestas inducidas por UK 14,304, cuando se comparó con el vehículo.

Asimismo, la Figura 13 muestra el efecto del tratamiento crónico con L-Cys (300 mg/kg) sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación del sistema nervioso simpático. L-Cys disminuyó significativamente las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación eléctrica a 1 y 3 Hz, y aquellas inducidas por 30 μ g/kg de metoxamina, cuando se compara con el vehículo. En contraste, L-Cys no produjo cambios significativos en las respuestas vasopresoras inducidas por noradrenalina o UK 14,304.

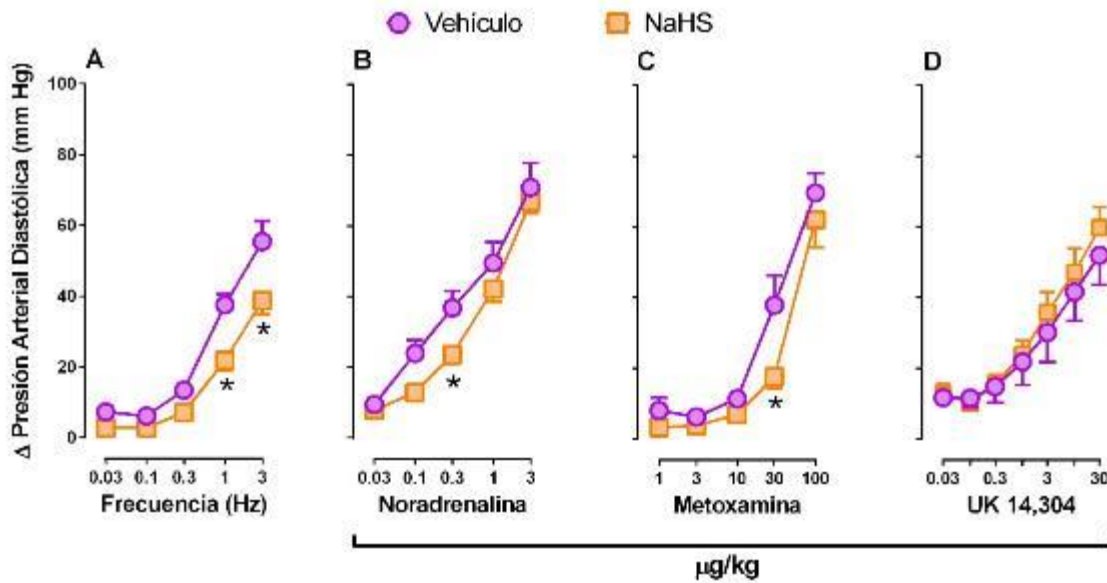


Figura 12. Efecto del tratamiento crónico con NaHS (5.6 mg/kg) sobre las respuestas inducidas por: (A) estimulación simpática; (B) noradrenalina; (C) metoxamina; y (D) UK 14,304. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs vehículo.

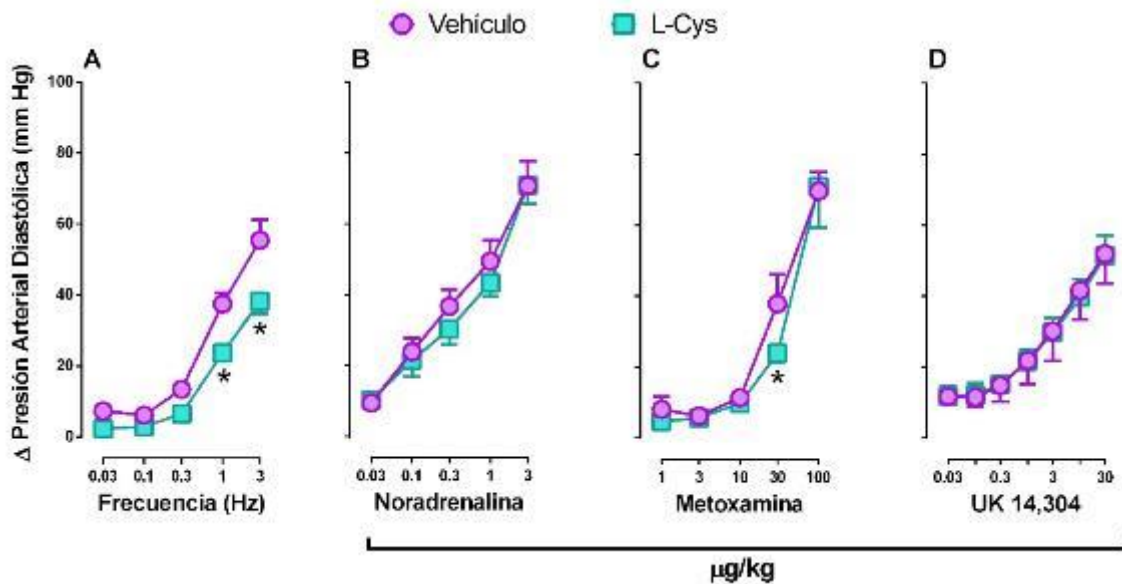


Figura 13. Efecto del tratamiento crónico con L-Cys (300 mg/kg) sobre las respuestas inducidas por: (A) estimulación simpática; (B) noradrenalina; (C) metoxamina; y (D) UK 14,304. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs vehículo.

La Figura 14 muestra el efecto de la administración crónica de DL-PPG (1 mg/kg) sobre las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación del sistema nervioso simpático. DL-PPG disminuyó de manera significativa las respuestas vasopresoras inducidas por 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de metoxamina comparado con el vehículo. Además, este inhibidor no modificó las respuestas inducidas por estimulación eléctrica o administraciones i.v. de noradrenalina y UK 14,304.

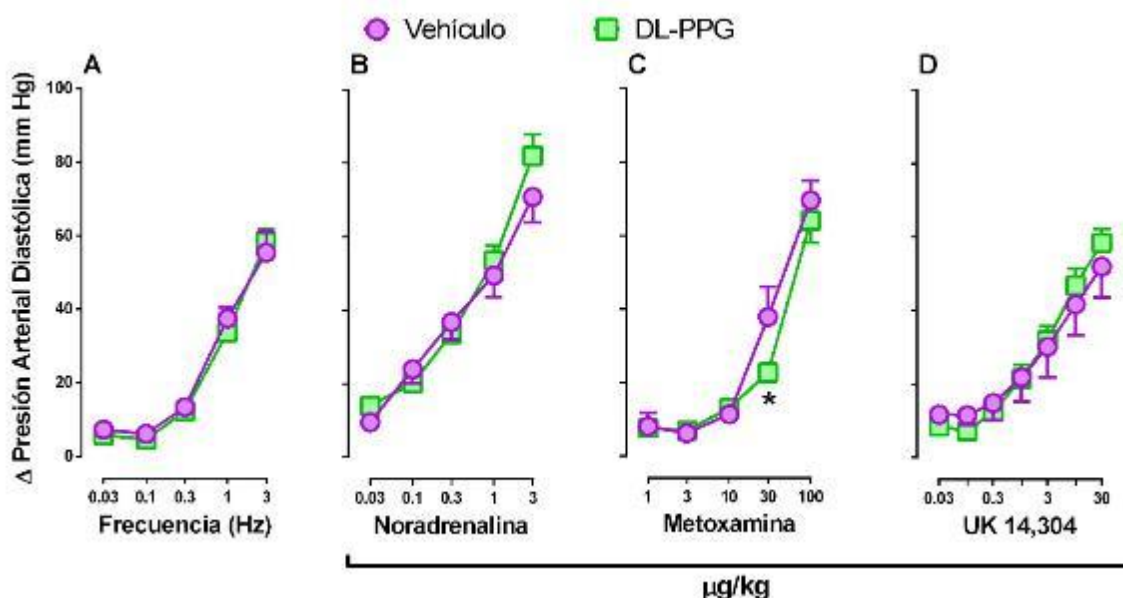


Figura 14. Efecto del tratamiento crónico con DL-PPG (1 mg/kg) sobre las respuestas inducidas por: (A) estimulación simpática; (B) noradrenalina; (C) metoxamina; y (D) UK 14,304. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs vehículo.

Por último, las respuestas taquicárdicas inducidas por administraciones i.v. de noradrenalina se representan en la figura 15-16. La dieta rica en grasas indujo un incremento en las respuestas taquicárdicas a 0.3-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de noradrenalina comparado con la dieta normal (Figura 15). De manera interesante, el tratamiento crónico con vehículo indujo una disminución significativa en la frecuencia cardíaca a 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de noradrenalina comparado con el grupo de dieta rica en grasas control y el tratamiento crónico con L-Cys (300 mg/kg) disminuyó significativamente las respuestas taquicárdicas inducidas por 1-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de noradrenalina mientras que el

tratamiento crónico con NaHS o DL-PPG no tuvieron efecto sobre estas respuestas (figura 16).

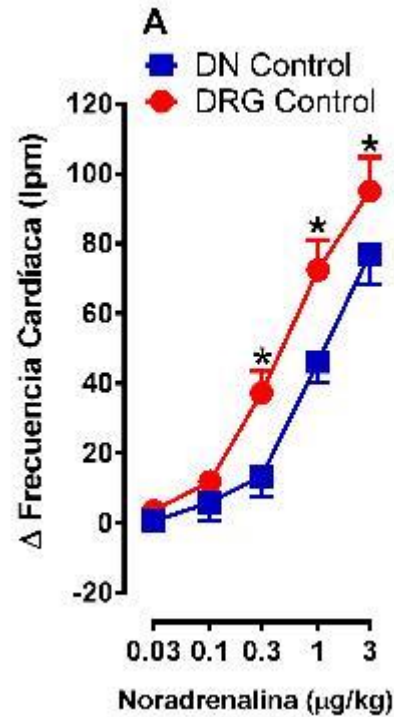


Figura 15. Efecto de la dieta normal (DN) y la dieta rica en grasas (DRG) sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por bolos i.v. de noradrenalina. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de 6 animales. *, $P < 0.05$ vs. DN control. DN, dieta normal; DRG, dieta rica en grasas.

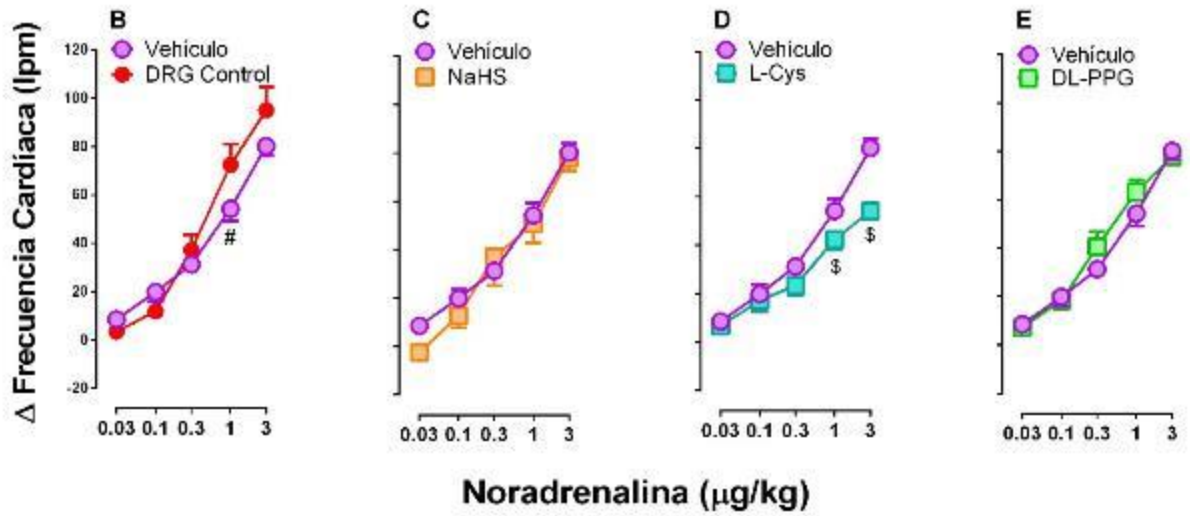


Figura 16. Efecto de las inyecciones i.p. diarias durante 4 semanas de: (A) Vehículo (1 ml/kg), (B) NaHS (5.6 mg/kg), (C) L-Cys (300 mg/kg) y (D) DL-PPG (1 mg/kg) sobre las respuestas taquicárdicas inducidas por bolos i.v. de noradrenalina en ratas con dieta rica en grasas. Cada punto representa la media \pm E.E.M. de 6 animales. #, $P < 0.05$ vs. DRG control; §, $P < 0.05$ vs. Vehículo. DRG, dieta rica en grasas.

5. Discusión

5.1 General

El sulfuro de hidrógeno (H_2S) fue identificado químicamente desde hace más de 300 años como un gas que generaba intoxicación en trabajadores de las alcantarillas de París en el siglo XVIII. En los últimos años se ha generado información creciente del papel fisiológico del sulfuro de hidrógeno en varios órganos y sistemas incluyendo el sistema cardiovascular. Desde los años 80s se sospechaba de su posible función fisiológica (Toohey, 1989) aunque fue en 1996 cuando Abe y Kimura reportaron que el H_2S incrementó la potenciación a largo plazo (LTP) en neuronas de hipocampo, un evento involucrado en la memoria. El primer reporte que evidenciaba su función vascular fue reportado por Hosoki et al (1997) en la que demuestran que el NaHS produce relajación de manera dependiente de la concentración en la vena porta y en la aorta torácica. Además, Zhao et al. (2001) sugirieron que en la rata anestesiada, el H_2S produjo relajación de la arteria. Esta relajación fue sensible a la glibenclamida, un bloqueador de los canales de potasio dependientes de ATP (K_{ATP}); lo cual indica que en presencia de glibenclamida el H_2S no indujo relajación en la arteria. De manera interesante, se ha propuesto que el H_2S puede tener efectos cardioprotectores ya que atenúa el daño al miocardio inducido por isquemia/reperfusión (Elrod et al., 2007). Estos hallazgos en animales han sido trasladados a pacientes con insuficiencia cardiaca porque el SG-1002 (una prodroga de H_2S de larga duración), a dosis de 200, 400 y 800 mg/día durante 7 días mejoraron algunos marcadores moleculares de daño por insuficiencia cardiaca en seres humanos (Polhemus et al., 2015).

Hay evidencia que sugiere un rol del H_2S en enfermedades cardiovasculares como lo son el daño por isquemia-reperfusión (Elrod et al., 2007; Zhu et al., 2007), infarto (Qu et al., 2008) e hipertensión (Meng et al., 2015; Yang et al., 2008). Recientemente, se ha sugerido una relación entre el H_2S y las enfermedades metabólicas incluyendo la resistencia a la insulina, diabetes mellitus y obesidad

(Brancaleone et al., 2008). Uno de los primeros estudios que relacionan el H₂S con la diabetes fue realizado por Brancaleone et al. (2008), donde observó una reducción progresiva de los niveles plasmáticos de H₂S, un incremento en el RNAm de las enzimas CBS y CSE y una reducción de las respuestas relajantes de la L-Cys, pero no sobre las inducidas por el NaHS, en ratones diabéticos no obesos. Además, los efectos de la dieta rica en grasas en la producción de H₂S y la expresión de las enzimas sintetizadoras en diferentes tejidos han sido recientemente revisados (Beltowski et al., 2018). Así, una dieta rica en grasas (35% grasas) en ratas Wistar macho durante 18 semanas produjo una regulación a la baja de las enzimas CBS y CSE en el hígado (Bravo et al., 2011); mientras que una dieta rica en grasas (16%) dada a ratones durante 16 semanas disminuyó la expresión de la enzima CSE así como la producción de H₂S en hígado, riñón y pulmón (Peh et al., 2014). Estos resultados sugieren una regulación a la baja del sistema CSE/CBS y una reducción en la producción de H₂S en animales alimentados con una dieta rica en grasas. Debido a que nuestro modelo de dieta rica en grasas tuvo una duración de 16 semanas y debido a los datos obtenidos, se relaciona con los datos obtenidos en los estudios mencionados anteriormente, donde se encontró una disminución de la expresión de las enzimas productoras de H₂S.

5.2 Efecto de la dieta rica en grasas y tratamientos crónicos con vehículo, NaHS, L-cisteína y DL-PPG sobre las variables zoométricas

Notablemente, nuestros resultados demuestran que la administración crónica de NaHS durante 4 semanas redujo el peso corporal de los animales alimentados con dieta rica en grasas (Tabla 5). Con esto a consideración, Wu et al. (2006) demostró que 4 semanas de tratamiento crónico con NaHS (50 μ mol/kg equivalentes a 2.8 mg/kg) en ratones con dieta rica en grasas significativamente disminuyó el peso corporal y los niveles de triglicéridos renales, lo que sugiere un papel importante del H₂S en el metabolismo de lípidos (Wu, D. et al., 2016). Este hallazgo podría explicar la pérdida de peso y de tejido adiposo en nuestro modelo experimental después de la administración crónica de NaHS y L-Cys. También podría estar explicando la

disminución del peso del hígado. Sin embargo, no fue posible medir los niveles de triglicéridos en sangre. Al finalizar las 12 semanas de dieta rica en grasas, se pusieron a los animales en ayuno durante 12 horas para medir triglicéridos mediante tiras para triglicéridos Accutrend® Triglycerides (Roche) para Accutrend® Plus (Roche), pero el medidor indicaba niveles bajos de triglicéridos sin dar un número (en pantalla indicaba “Low”), por lo tanto se tuvo que dejar esta variable de lado.

Desafortunadamente, el mecanismo exacto por el cual el H₂S regula el metabolismo de los lípidos necesita más investigación (Wu, D. et al., 2016). Sin embargo, se han planteado diferentes hipótesis sobre el efecto del H₂S en los adipocitos: (1) incrementos en PIP3 y el metabolismo de la glucosa (Manna y Jain, 2011), (2) incremento en la actividad de PPAR γ por sulfhidración directa en el sitio C139 (Cai et al., 2016); (3) una disminución en la activación de la metaloproteinasa ADAM17 inducida por alta concentración de glucosa (Hu et al., 2017); y (4) estimulación de la lipólisis dependiente de cAMP-PKA (Beltowski y Jamroz-Wisniewska, 2016). Estos efectos estarían aumentando el metabolismo de lípidos, por lo cual nosotros encontramos una disminución en la cantidad de tejido adiposo visceral. Sin embargo, debe estudiarse más a fondo el mecanismo por el cual el tratamiento crónico con NaHS está induciendo esta disminución, y si es mediante los efectos mencionados anteriormente.

5.3 Efecto de la dieta rica en grasas y tratamientos crónicos sobre las variables metabólicas

Bajo nuestras condiciones experimentales, nuestros resultados demostraron que tras 12 semanas de alimentación con una dieta rica en grasas, los animales desarrollaron obesidad, hiperglicemia, hiperleptinemia y resistencia a la insulina (Tabla 6).

Además, nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico con NaHS y L-Cys durante 4 semanas disminuyó significativamente los niveles de leptina en

ayuno. Ciertamente nuestros datos no permiten sugerir un mecanismo. Sin embargo, en un modelo de ratón $Cdo1^{-/-}$ (cisteína dioxigenasa; una enzima necesaria para catabolizar la L-Cys a ácido sulfínico de L-Cys y que constituye el primer paso del catabolismo de la L-Cys) se ha sugerido que los niveles elevados de cisteína promueven el metabolismo de la cisteína hacia la desulfhidración, lo que lleva a una mayor producción de H_2S . Este incremento en los niveles de H_2S puede ser la causa de la disminución en los niveles de leptina mediante la eliminación de la expresión de leptina (Ng et al., 2017). Adicionalmente, otro estudio midió la expresión de la leptina y de su receptor en un cultivo celular hiperglucémico tratado con $400 \mu M$ ($29.6 \mu g/ml$) de NaHS por 30 minutos. De manera interesante, el NaHS redujo tanto la expresión de la leptina como de su receptor (Zhuang et al., 2014) demostrando así el efecto del H_2S sobre la leptina; sin embargo, el mecanismo exacto mediante el cual el H_2S está ejerciendo este efecto aún es desconocido.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Geng et al (Geng et al., 2013), el tratamiento con DL-PPG disminuyó la glucosa en ayuno y niveles de insulina, así como el índice HOMA posiblemente activando la vía de AMPK (Geng et al., 2013).

En la literatura se ha propuesto un aumento significativo en la sensibilidad a la insulina por el H_2S en el tejido adiposo blanco en un modelo de resistencia a la insulina inducido por fructosa (Feng et al., 2009; Geng et al., 2013) mientras que una alteración en la utilización de glucosa se ha sugerido en los hepatocitos (Zhang et al., 2013). En contraste, bajo nuestras condiciones experimentales, el tratamiento crónico con NaHS o L-Cys no modificó el índice HOMA o los niveles de insulina plasmática (Tabla 6). Por lo tanto, el efecto del H_2S sobre la resistencia a la insulina puede variar dependiendo de las condiciones experimentales, ya que en nuestro estudio no se observaron modificaciones en las curvas de tolerancia a la glucosa.

5.4 Efecto de la dieta rica en grasas y tratamientos crónicos sobre las variables hemodinámicas

Los valores normales de frecuencia cardíaca, presión arterial sistólica y diastólica en una rata adulta, son: 350-450 lpm (FC), 84-134 mmHg (PAS) y 60 mm Hg (PAD) (Wolfensohn y Lloyd, 2003). Basado en los datos anteriores, la dieta rica en grasas produjo hipertensión después de las 12 semanas, la cual se mantuvo, con un ligero aumento, hasta las 16 semanas (Tabla 7).

Consistente con nuestros resultados, se ha reportado que las dietas que contienen mayor cantidad de ácidos grasos saturados elevan la presión arterial y exacerban la hipertensión espontánea (Aguila y Mandarim-de-Lacerda, 2003). Además, la obesidad está asociada con disfunción endotelial, excitación simpática e hipertensión (Gheibi et al., 2018).

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento crónico con NaHS durante 4 semanas revirtió la hipertensión arterial y el incremento en la frecuencia cardíaca inducido por la dieta rica en grasas (Tabla 7). Recientemente, se ha sugerido que el tratamiento crónico con NaHS reduce el estrés oxidativo y disminuye la disfunción endotelial en un modelo experimental de diabetes inducida por estreptozotocina en ratones (Gheibi et al., 2018). Además, la administración de donadores de H₂S redujo la presión arterial en diferentes modelos animales (Gheibi et al., 2018), como son: (1) ratas espontáneamente hipertensas (Zhao, X. et al., 2008), (2) ratas Dahl sensibles a la sal (Huang et al., 2015) y (3) hipertensión inducida por la administración de L-NAME, un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (Zhong et al., 2003). A su vez, consistente con nuestros hallazgos, se observó hipertensión en un modelo de ratón knock-out de CSE que cuando se inyectan bolos i.v. de NaHS, induce decrementos transitorios en la presión arterial sistólica dependientes de la dosis en ratones anestesiados (Yang et al., 2008).

También observamos que tras el tratamiento crónico con L-Cys, la presión arterial sistólica y media disminuyó significativamente (Tabla 7). Asimismo, otros estudios han demostrado que la administración diaria de N-acetilcisteína (NAC), un análogo estable de cisteína, disminuyó la presión arterial en diferentes modelos experimentales de hipertensión (Vasdev et al., 2009). En SHR, se ha demostrado el efecto antihipertensivo de NAC (Vasdev et al., 2009). Además, el tratamiento oral durante dos semanas con NAC en el agua de beber (4 g/kg de peso corporal al día) redujo la presión arterial sistólica (Cabassia et al., 2001) y este mismo tratamiento durante cuatro semanas redujo la presión arterial media (Girouard et al., 2003). Una posible explicación del efecto antihipertensivo de la L-Cisteína se ha propuesto en la vía de relajación dependiente de endotelio mediante la reducción en la relación GSSG/GSH (Cabassia et al., 2001). Sin embargo, también es probable que el NAC aumente los niveles de H₂S porque NAC es un análogo de cisteína que es transformado directamente a cisteína. Por lo tanto, los resultados anteriores se pueden correlacionar a los efectos obtenidos en nuestro modelo al término del tratamiento crónico con L-Cisteína (Vasdev et al., 2009).

Como se esperaba, contrario a NaHS, DL-PPG incrementó la frecuencia cardíaca aunque no modificó significativamente la presión arterial.

5.5 NaHS y L-Cys pueden revertir los cambios cardiovasculares inducidos por la dieta rica en grasas

Se ha propuesto que durante la obesidad hay una depleción de H₂S en los vasos sanguíneos pequeños (Candela et al., 2016) y una reducción en la producción de H₂S (Katsouda et al., 2017).

Nuestros resultados indican que las respuestas vasopresoras inducidas por la estimulación simpática (1 y 3 Hz) y la metoxamina (100 µg/kg) fueron incrementadas significativamente en animales tratados con una dieta rica en grasa (Figura 10). Estos resultados en principio podrían indicar que en animales que recibieron una

dieta rica en grasas, las respuestas contráctiles fueron exacerbadas sugiriendo que probablemente se presenta un aumento del tono simpático y/o un aumento de las respuestas contráctiles mediadas por los receptores α_1 -adrenérgicos (Jiang et al., 2016).

De manera interesante, la administración crónica de NaHS (Figura 12) o L-Cys (Figura 13) durante 4 semanas revirtió el incremento de las respuestas vasopresoras inducidas por estimulación simpática, noradrenalina exógena o metoxamina. La interpretación más sencilla de estos resultados es que ambos tratamientos son capaces de revertir las respuestas exacerbadas inducidas por la estimulación del sistema nervioso simpático en animales con una dieta rica en grasas. En este punto, se debe admitir que nuestros datos no nos permiten sugerir algún posible mecanismo por el cual sucede esta reversión. Sin embargo, es posible especular que el NaHS o la L-Cys incrementa los niveles de H_2S y que éste gasotransmisor produzca cambios que pueden incluir: (1) una disminución del tono simpático como previamente ha sido reportado (Centurion et al., 2016); (2) una reducción de la expresión de los receptores α_1 -adrenérgicos; o (3) una reducción en el mecanismo de señalización intracelular de los receptores α_1 -adrenérgicos.

Al respecto, nuestro grupo de investigación encontró evidencia de que la administración aguda de NaHS inhibe el tono simpático vasopresor en un modelo de rata descerebrada y desmedulada, cuando las respuestas vasopresoras son inducidas con estimulación eléctrica (Centurion et al., 2016). Sin embargo, es importante mencionar que el sulfuro de hidrógeno genera mecanismos de señalización intracelular a través de: (1) la sulfhidración de proteínas; (2) la generación de polisulfuros; o (3) la sulfactación de los complejos mitocondriales (Centurion et al., 2016).

Por otra parte, nuestros resultados también indican que las respuestas taquicárdicas inducidas por la noradrenalina exógena fueron exacerbadas por la dieta rica en grasas (Figura 15) probablemente por un incremento en el tono simpático cardíaco inducido por la leptina (Kuo et al., 2003; Re, R. N., 2009). De manera interesante,

estos incrementos en el ritmo cardiaco inducido por la obesidad fueron reducidos por la administración crónica de NaHS (Figura 16B) o L-Cys (Figura 16C) sugiriendo que probablemente el tratamiento crónico de estos compuestos genera H₂S y que reduzca las respuestas taquicárdicas. La L-Cys es el sustrato de las enzimas productoras de sulfuro CBS, CSE y 3-MST (Courtney-Martin y Pencharz, 2016). En un estudio realizado en hepatocitos aislados se sugirió que una alta biodisponibilidad de cisteína favorece el catabolismo de la L-Cys hacia sulfato (Stipanuk et al., 1992). Por lo tanto, la dosis de L-Cys (300 mg/kg) podría favorecer el catabolismo hacia H₂S, explicando así por qué obtuvimos resultados similares entre los tratamientos crónicos con NaHS (Figuras 12 y 16B) y L-Cys (Figuras 13 y 16C) sobre la estimulación del sistema nervioso simpático.

Se debe admitir que el DL-PPG produjo el mismo efecto, es decir una reducción de las respuestas taquicárdicas a la noradrenalina. Ciertamente no tenemos una explicación clara de este efecto ya que se esperaba una exacerbación de las respuestas vasopresoras a estimulación simpática o sobre las respuestas taquicárdicas a noradrenalina. Al respecto, el efecto vasodilatador del H₂S se ha sido estudiado en anillos aórticos aislado de rata con tejido adiposo perivascular. Así, los anillos pretratados con H₂S mostraron una menor contracción cuando se administraron concentraciones crecientes de fenilefrina. Por otra parte, PPG (100 mmol/l) revirtió la reducción de la tensión vascular de los anillos estimulados con fenilefrina. A pesar de que no se vieron diferencias entre el tratamiento con DL-PPG (Figura 16D) y vehículo, la dosis elegida pudo no ser suficiente para producir el efecto esperado (Fang et al., 2009). Así, no se puede descartar categóricamente que la dosis de PPG no haya sido suficiente para inhibir por completo a la enzima CSE. Otros estudios han reportado la dosis de 30 mg/kg de DL-PPG para inhibir a la enzima CSE (Geng et al., 2013; Oosterhuis et al., 2015; Wu, L. et al., 2009). Sin embargo, en estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio encontramos que esta dosis fue letal después de 5 días de tratamiento. Al respecto, algunos autores reportan que 10-15 mg/kg es suficiente para inhibir a dicha enzima en

condiciones in vivo (Marcin Magierowski y Tomasz Brzozowski, Comunicación personal).

6. Conclusión

El H₂S revierte los cambios zoométricos y hemodinámicos inducidos por la dieta rica en grasas, sugiriendo un papel importante de este gasotransmisor sobre la regulación del metabolismo y del sistema cardiovascular durante la obesidad.

7. Perspectivas

- Determinar mediante Western Blot la expresión de las enzimas productoras de H₂S:
 - A tiempo basal,
 - A las 12 semanas de dieta normal y dieta rica en grasas,
 - Al término de los tratamientos crónicos con NaHS, L-Cys y DL-PPG.
- Elucidar el mecanismo mediante el cual el tratamiento con H₂S disminuye el tejido adiposo.
- Identificar cómo el tratamiento crónico con NaHS puede disminuir la presión arterial, ya que puede ser debido a diferentes situaciones:
 - Disminución del tejido adiposo. Por lo tanto hay una menor liberación de leptina, la cual activa al SNS.
 - Regulación a la baja de la expresión de leptina. Por lo tanto se revierte la resistencia a la leptina, induce una pérdida de peso y ese puede ser el motivo en la disminución de la hipertensión arterial.
 - Sulfhidración de proteínas a nivel SNS preunional.

8. Referencias

- Abe, K. y Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*, 16(3), 1066-1071.
- Aguila, M. B. y Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2003). Heart and blood pressure adaptations in Wistar rats fed with different high-fat diets for 18 months. *Nutrition*, 19(4), 347-352.
- Ahima, R. S. (2006). Ghrelin-a new player in glucose homeostasis? *Cell Metab*, 3(5), 301-302.
- Ali, M. Y., Ping, C. Y., Mok, Y. Y., Ling, L., Whiteman, M., Bhatia, M., y Moore, P. K. (2006). Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol*, 149(6), 625-634.
- Bell, E. A., Castellanos, V. H., Pelkman, C. L., Thorwart, M. L., y Rolls, B. J. (1998). Energy density of foods affects energy intake in normal-weight women. *Am J Clin Nutr*, 67, 412-420.
- Beltowski, J. (2015). High fat diet-induced obesity augments H₂S in perivascular adipose tissue by cannabinoid-mediated decrease in mitochondrial biogenesis. *Atherosclerosis*, 241(1).
- Beltowski, J. y Jamroz-Wisniewska, A. (2016). Hydrogen Sulfide in the Adipose Tissue-Physiology, Pathology and a Target for Pharmacotherapy. *Molecules*, 22(1).
- Beltowski, J., Wojcicka, G., y Jamroz-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.
- Blackstone, R. P. (2016). *Obesity*. Springer International Publishing.
- Boyadjieva, T. H.-D. a. N. (2009). The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Physiol Biochem*, 65, 157-164.
- Brancaleone, V., Roviezzo, F., Vellecco, V., De Gruttola, L., Bucci, M., y Cirino, G. (2008). Biosynthesis of H₂S is impaired in non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Pharmacol*, 155(5), 673-680.

- Bravo, E., Palleschi, S., Aspichueta, P., Buque, X., Rossi, B., Cano, A., Napolitano, M., Ochoa, B., y Botham, K. M. (2011). High fat diet-induced non alcoholic fatty liver disease in rats is associated with hyperhomocysteinemia caused by down regulation of the transsulphuration pathway. *Lipids Health Dis*, 10, 60.
- Bray, G. A. (2004a). Costs, Pathology, and Health Risks of Obesity and the Metabolic Syndrome. In G. A. Bray (Ed.), *The Metabolic Syndrome and Obesity* (2004/01/02 ed., Vol. 104, pp. 86-89): Humana Press, Inc.
- Bray, G. A. (2004b). Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6), 2583-2589.
- Cabassia, A., Dumont, E. C., Girouard, H., Bouchard, J.-F., Le Jossec, M., Lamontagne, D., Besner, J.-G., y de Champlain, J. (2001). Effects of chronic N-acetylcysteine treatment on the actions of peroxynitrite on aortic vascular reactivity in hypertensive rats. *Journal of Hypertension*(19), 1233-1244.
- Cai, J., Shi, X., Wang, H., Fan, J., Feng, Y., Lin, X., Yang, J., Cui, Q., Tang, C., Xu, G., y Geng, B. (2016). Cystathionine gamma lyase-hydrogen sulfide increases peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by sulfhydration at C139 site thereby promoting glucose uptake and lipid storage in adipocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1861(5), 419-429.
- Candela, J., Velmurugan, G. V., y White, C. (2016). Hydrogen sulfide depletion contributes to microvascular remodeling in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 310(9), H1071-1080.
- Centurion, D., De la Cruz, S. H., Gutierrez-Lara, E. J., Beltran-Ornelas, J. H., y Sanchez-Lopez, A. (2016). Pharmacological evidence that NaHS inhibits the vasopressor responses induced by stimulation of the preganglionic sympathetic outflow in pithed rats. *Eur J Pharmacol*, 770, 40-45.
- Collaborators, G. B. D. O.Afshin, A.Forouzanfar, M. H.Reitsma, M. B.Sur, P.Estep, K.Lee, A.Marczak, L.Mokdad, A. H.Moradi-Lakeh, M.Naghavi, M.Salama, J. S.Vos, T.Abate, K. H.Abbafati, C.Ahmed, M. B.Al-Aly, Z.Alkerwi, A.Al-Raddadi, R.Amare, A. T.Amberbir, A.Amegah, A. K.Amini, E.Amrock, S. M.Anjana, R. M.Arnlov, J.Asayesh, H.Banerjee, A.Barac, A.Baye, E.Bennett, D. A.Beyene, A. S.Biadgilign, S.Biryukov, S.Bjertness, E.Boneya, D.

- J.Campos-Nonato, I.Carrero, J. J.Cecilio, P.Cercy, K.Ciobanu, L. G.Cornaby, L.Damtew, S. A.Dandona, L.Dandona, R.Dharmaratne, S. D.Duncan, B. B.Eshrati, B.Esteghamati, A.Feigin, V. L.Fernandes, J. C.Furst, T.Gebrehiwot, T. T.Gold, A.Gona, P. N.Goto, A.Habtewold, T. D.Hadush, K. T.Hafezi-Nejad, N.Hay, S. I.Horino, M.Islami, F.Kamal, R.Kasaeian, A.Katikireddi, S. V.Kengne, A. P.Kesavachandran, C. N.Khader, Y. S.Khang, Y. H.Khubchandani, J.Kim, D.Kim, Y. J.Kinfu, Y.Kosen, S.Ku, T.Defo, B. K.Kumar, G. A.Larson, H. J.Leinsalu, M.Liang, X.Lim, S. S.Liu, P.Lopez, A. D.Lozano, R.Majeed, A.Malekzadeh, R.Malta, D. C.Mazidi, M.McAlinden, C.McGarvey, S. T.Mengistu, D. T.Mensah, G. A.Mensink, G. B. M.Mezgebe, H. B.Mirрахimov, E. M.Mueller, U. O.Noubiap, J. J.Obermeyer, C. M.Ogbo, F. A.Owolabi, M. O.Patton, G. C.Pourmalek, F.Qorbani, M.Rafay, A.Rai, R. K.Ranabhat, C. L.Reinig, N.Safiri, S.Salomon, J. A.Sanabria, J. R.Santos, I. S.Sartorius, B.Sawhney, M.Schmidhuber, J.Schutte, A. E.Schmidt, M. I.Sepanlou, S. G.Shamsizadeh, M.Sheikhabaei, S.Shin, M. J.Shiri, R.Shive, I.Roba, H. S.Silva, D. A. S.Silverberg, J. I.Singh, J. A.Stranges, S.Swaminathan, S.Tabares-Seisdedos, R.Tadese, F.Tedla, B. A.Tegegne, B. S.Terkawi, A. S.Thakur, J. S.Tonelli, M.Topor-Madry, R.Tyrovolas, S.Ukwaja, K. N.Uthman, O. A.Vaezghasemi, M.Vasankari, T.Vlassov, V. V.Vollset, S. E.Weiderpass, E.Werdecker, A.Wesana, J.Westerman, R.Yano, Y.Yonemoto, N.Yonga, G.Zaidi, Z.Zenebe, Z. M.Zipkin, B. y Murray, C. J. L. (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*, 377(1), 13-27.
- Collden, G., Tschop, M. H., y Muller, T. D. (2017). Therapeutic Potential of Targeting the Ghrelin Pathway. *Int J Mol Sci*, 18(4).
- Courtney-Martin, G. y Pencharz, P. B. (2016). Sulfur Amino Acids Metabolism From Protein Synthesis to Glutathione. In *The Molecular Nutrition of Amino Acids and Proteins* (pp. 265-286).
- Crujeiras, A. B., Carreira, M. C., Cobia, B., Andrade, S., Amil, M., y Casanueva, F. F. (2015). Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sci*, 140, 57-63.

- Donald, J. A. (2016). Gasotransmitter Family. In *Handbook of Hormones* (pp. 601-602).
- Eberhardt, M., Dux, M., Namer, B., Miljkovic, J., Cordasic, N., Will, C., Kichko, T. I., de la Roche, J., Fischer, M., Suarez, S. A., Bikiel, D., Dorsch, K., Leffler, A., Babes, A., Lampert, A., Lennerz, J. K., Jacobi, J., Marti, M. A., Doctorovich, F., Hogestatt, E. D., Zygmunt, P. M., Ivanovic-Burmazovic, I., Messlinger, K., Reeh, P., y Filipovic, M. R. (2014). H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun*, 5, 4381.
- Elmqvist, J. K., Bjørbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., y Saper, C. B. (1998). Distributions of Leptin Receptor mRNA Isoforms in the Rat Brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 395, 535-547.
- Elrod, J. W., Calvert, J. W., Morrison, J., Doeller, J. E., Kraus, D. W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C. W., y Lefer, D. J. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(39), 15560-15565.
- Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P., y Cowley, M. A. (2006). Leptin resistance and obesity. *Obesity*, 14.
- Fang, L., Zhao, J., Chen, Y., Ma, T., Xu, G., Tang, C., Liu, X., y Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide derived from periaortic adipose tissue is a vasodilator. *J Hypertens*, 27(11), 2174-2185.
- Feng, X., Chen, Y., Zhao, J., Tang, C., Jiang, Z., y Geng, B. (2009). Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator. *Biochem Biophys Res Commun*, 380(1), 153-159.
- Geng, B., Cai, B., Liao, F., Zheng, Y., Zeng, Q., Fan, X., Gong, Y., Yang, J., Cui, Q. H., Tang, C., y Xu, G. H. (2013). Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice. *PLoS One*, 8(9), e73892.

- Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., y Ghasemi, A. (2018). Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochem Pharmacol.*
- Gillespie, Maclaren, A., y Pollock, D. (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed cat and rat. *br J Pharmac*, 40(2), 257-267.
- Gillespie, J. y Muir, T. (1967). A method of stimulating the complete sympathetic outflow from the spinal cord to blood vessels in the pithed rat. *Br. J. Pharmac. Chemother.*, 30, 78-87.
- Girouard, H., Chulak, C., Wu, L., Lejossec, M., y 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.
- Gutiérrez, J. P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martinez, M., y Hernández-Ávila, M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales., from Instituto Nacional de Salud Pública
- Haddock, R. E. y Hill, C. E. (2011). Sympathetic overdrive in obesity involves purinergic hyperactivity in the resistance vasculature. *J Physiol*, 589(Pt 13), 3289-3307.
- Hall, J. E. (2016). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology* (13 ed.).
- Handjieva-Darlenska, T. y Boyadjieva, N. (2009). The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Physiol Biochem*, 65(2), 157-164.
- Hermann A., S. G. F., Weiger T. (2012). *Gasotransmitters: physiology and pathophysiology*: Springer.
- Hu, T. X., Wang, G., Wu, W., Gao, L., Tan, Q. Y., y Wang, J. (2017). Hydrogen Sulfide Inhibits High Glucose-Induced sFlt-1 Production via Decreasing ADAM17 Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *Int J Endocrinol*, 2017, 9501792.
- Huang, P., Chen, S., Wang, Y., Liu, J., Yao, Q., Huang, Y., Li, H., Zhu, M., Wang, S., Li, L., Tang, C., Tao, Y., Yang, G., Du, J., y Jin, H. (2015). Down-regulated

- CBS/H₂S pathway is involved in high-salt-induced hypertension in Dahl rats. *Nitric Oxide*, 46, 192-203.
- Hwang, S. Y., Sarna, L. K., Siow, Y. L., y O, K. (2013). High-fat diet stimulates hepatic cystathionine beta-synthase and cystathionine gamma-lyase expression. *Can J Physiol Pharmacol*, 91(11), 913-919.
- Jiang, S. Z., Lu, W., Zong, X. F., Ruan, H. Y., y Liu, Y. (2016). Obesity and hypertension. *Exp Ther Med*, 12(4), 2395-2399.
- Kahn, B. y Flier, J. (2000). Obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(473-481).
- Katsouda, A., Szabo, C., y Papapetropoulos, A. (2017). Reduced adipose tissue H₂S in obesity. *Pharmacol Res*.
- Kleinman, L. y Radford, E. (1964). Ventilation standards for small mammals. *J. Appl. Physiol*, 19(2), 360-362.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., y Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402, 656-660.
- Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., y Kevil, C. G. (2013). Hydrogen sulfide chemical biology: pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*, 35, 5-20.
- Konno, R., Ikeda, M., Yamaguchi, K., Ueda, Y., y Niwa, A. (2000). Nephrotoxicity of D -propargylglycine in mice. *Archives of Toxicology*, 74(8), 473-479.
- Kotsis, V., Stabouli, S., Papakatsika, S., Rizos, Z., y Parati, G. (2010). Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res*, 33(5), 386-393.
- Kuo, J. J., Barret Jones, O., y Hall, J. E. (2003). Chronic cardiovascular and renal actions of leptin during hyperinsulinemia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*, 284, R1037-R1042.
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C. H., y Moore, P. K. (2008). Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. *Circulation*, 117(18), 2351-2360.
- Mahan L.K., E.-S. S., Raymond J.L. (2013). *Krause Dietoterapia* (Elseiver Ed. 13th ed.).

- Mahan, L. K., Escott-Stump, S., y Raymond, J. L. (2013). *Krause Dietoterapia*. Spain: Elseiver.
- Manna, P. y Jain, S. K. (2011). Hydrogen sulfide and L-cysteine increase phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) and glucose utilization by inhibiting phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein and activating phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/serine/threonine protein kinase (AKT)/protein kinase C ζ /lambda (PKC ζ /lambda) in 3T3L1 adipocytes. *J Biol Chem*, 286(46), 39848-39859.
- Meng, G., Ma, Y., Xie, L., Ferro, A., y Ji, Y. (2015). Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases. *Br J Pharmacol*, 172(23), 5501-5511.
- Moore y Whiteman. (2015). *Chemistry, biochemistry and pharmacology of hydrogen sulfide* (Vol. 230): Springer.
- Morgan, N. G. y Dhayal, S. (2009). G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell. *Biochem Pharmacol*, 78(12), 1419-1427.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., y Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443(7109), 289-295.
- Mustafa, A. K., Gadalla, M. M., Sen, N., Kim, S., Mu, W., Gazi, S. K., Barrow, R. K., Yang, G., Wang, R., y Snyder, S. H. (2009). H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*, 2(96), ra72.
- Ng, H. H., Yildiz, G. S., Ku, J. M., Miller, A. A., Woodman, O. L., y Hart, J. L. (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., y 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.

- Olivares-Reyes, J. A. y Arellano-Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9-18.
- Oosterhuis, N. R., Frenay, A. R., Wesseling, S., Snijder, P. M., Slaats, G. G., Yazdani, S., Fernandez, B. O., Feelisch, M., Giles, R. H., Verhaar, M. C., Joles, J. A., y van Goor, H. (2015). DL-propargylglycine reduces blood pressure and renal injury but increases kidney weight in angiotensin-II infused rats. *Nitric Oxide*, 49, 56-66.
- Papapetropoulos, A., Whiteman, M., y Cirino, G. (2015a). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br J Pharmacol* 172(6).
- Papapetropoulos, A., Whiteman, M., y Cirino, G. (2015b). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br J Pharmacol*, 172(6), 1633-1637.
- Park, H. K. y Ahima, R. S. (2014). Leptin signaling. *F1000Prime Rep*, 6, 73.
- Paul, B. D. y Snyder, S. H. (2015a). H₂S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydration. *Trends Biochem Sci*, 40(11), 687-700.
- Paul, B. D. y Snyder, S. H. (2015b). Protein sulfhydration. *Methods Enzymol*, 555, 79-90.
- Peh, M. T., Anwar, A. B., Ng, D. S., Atan, M. S., Kumar, S. D., y Moore, P. K. (2014). Effect of feeding a high fat diet on hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in the mouse. *Nitric Oxide*, 41, 138-145.
- Polhemus, D. J., Li, Z., Pattillo, C. B., Gojon, G., Sr., Gojon, G., Jr., Giordano, T., y 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.
- Popov, D. (2013). An outlook on vascular hydrogen sulphide effects, signalling, and therapeutic potential. *Arch Physiol Biochem*, 119(5), 189-194.
- Qiu, J., Wagner, E. J., Ronnekleiv, O. K., y Kelly, M. J. (2017). Insulin and Leptin Excite Anorexigenic Proopiomelanocortin Neurons via Activation of TRPC5 Channels. *J Neuroendocrinol*.

- Qu, K., Lee, S. W., Bian, J. S., Low, C. M., y Wong, P. T. (2008). Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int*, 52(1-2), 155-165.
- Re, R. (2009). Obesity-Related Hypertension. *The Ochsner Journal*, 9, 133-136.
- Re, R. N. (2009). Obesity-Related Hypertension. *The Ochsner Journal*, 9, 133-136.
- Rexford, S. A. y Jeffrey, S. F. (2000). Leptin. *Annual Review of Physiology*, 62(1), 413-437.
- Seki, T. y Hosono, T. (2015). Prevention of Cardiovascular Diseases by Garlic-Derived Sulfur Compounds. *J Nutr Sci Vitaminol*, 61, 83-85.
- Shiiba, T., Nakazato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M., Tanaka, M., Nozoe, S., Hosoda, H., Kangawa, K., y Matsukura, S. (2002). Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(1), 240-244.
- Stipanuk, M. H., Coloso, R. M., Garcia, R. A., y Banks, M. F. (1992). Cysteine concentration regulates cysteine metabolism to glutathione, sulfate and taurine in rat hepatocytes. *J Nutr*, 122(3), 420-427.
- Sun, L., Zhang, S., Yu, C., Pan, Z., Liu, Y., Zhao, J., Wang, X., Yun, F., Zhao, H., Yan, S., Yuan, Y., Wang, D., Ding, X., Liu, G., Li, W., Zhao, X., Liu, Z., y Li, Y. (2015). Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309(11), E925-935.
- Tomasova, L., Konopelski, P., y Ufnal, M. (2016). Gut Bacteria and Hydrogen Sulfide: The New Old Players in Circulatory System Homeostasis. *Molecules*, 21(11).
- Toohey, J. (1989). Sulphane sulphur in biological systems: a possible regulatory role. *Biochem J*, 264, 625-632.
- Untereiner, A. y Wu, L. (2017). Hydrogen Sulfide and Glucose Homeostasis: A Tale of Sweet and the Stink. *Antioxid Redox Signal*.
- Van Gaal, L. F., Mertens, I. L., y De Block, C. E. (2006). Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*, 444(7121), 875-880.
- Vasdev, S., Singal, P., y Gill, V. (2009). The antihypertensive effect of cysteine. *Int J Angiol*, 1(18), 7-21.

- Velmurugan, G. V., Huang, H., Sun, H., Candela, J., Jaiswal, M. K., Beaman, K. D., Yamashita, M., Prakriya, M., y White, C. (2015). Depletion of H₂S during obesity enhances store-operated Ca²⁺ entry in adipose tissue macrophages to increase cytokine production. *Sci Signal*, 8(407), ra128.
- Wang, R. (2002). Two's company, three's a crowd-can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. *The FASEB Journal*, 16(13), 1792-1798.
- Wang, R. (2012a). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, 92(2), 791-896.
- Wang, R. (2012b). Shared signaling pathways among gasotransmitters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(23), 8801-8802.
- Whiteman, M., Gooding, K. M., Whatmore, J. L., Ball, C. I., Mawson, D., Skinner, K., Tooke, J. E., y Shore, A. C. (2010). Adiposity is a major determinant of plasma levels of the novel vasodilator hydrogen sulphide. *Diabetologia*, 53(8), 1722-1726.
- WHO. (2018, February 2018). Obesity and overweight. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Williams, E. P., Mesidor, M., Winters, K., Dubbert, P. M., y Wyatt, S. B. (2015). Overweight and Obesity: Prevalence, Consequences, and Causes of a Growing Public Health Problem. *Curr Obes Rep*, 4(3), 363-370.
- Wolfensohn, S. y Lloyd, M. (2003). Small Laboratory Animals. In *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare* (pp. 233-271): Blackwell Publishing Ltd.
- Wu, D., Gao, B., Li, M., Yao, L., Wang, S., Chen, M., Li, H., Ma, C., Ji, A., y Li, Y. (2016). Hydrogen Sulfide Mitigates Kidney Injury in High Fat Diet-Induced Obese Mice. *Oxid Med Cell Longev*, 2, 715-718.
- Wu, L., Yang, W., Jia, X., Yang, G., Duridanova, D., Cao, K., y Wang, R. (2009). Pancreatic islet overproduction of H₂S and suppressed insulin release in Zucker diabetic rats. *Lab Invest*, 89(1), 59-67.
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., y Wang, R. (2008). H₂S as a physiologic

- vasorelaxant - hypertension in mice with deletion of CSE. *Science*, 322(5901), 587-590.
- Yu, X. H., Cui, L. B., Wu, K., Zheng, X. L., Cayabyab, F. S., Chen, Z. W., y Tang, C. K. (2014). Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clin Chim Acta*, 437, 78-87.
- Zhang, L., Yang, G., Untereiner, A., Ju, Y., Wu, L., y Wang, R. (2013). Hydrogen sulfide impairs glucose utilization and increases gluconeogenesis in hepatocytes. *Endocrinology*, 154(1), 114-126.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., y Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{atp} channel opener. *The EMBO Journal*, 20(21), 6008-6016.
- Zhao, X., Zhang, L., Zhang, C., Zeng, X., Yan, H., Jin, H., y Tang, C. (2008). Regulatory effect of hydrogen sulfide on vascular collagen content in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research*, 31, 1619–1630.
- Zhong, G., Chen, F., Cheng, Y., Tang, C., y Du, J. (2003). The role of hydrogen sulfide generation in the pathogenesis of hypertension in rats induced by inhibition of nitric oxide synthase. *J Hypertens*, 21(10), 1879-1885.
- Zhu, Y. Z., Wang, Z. J., Ho, P., Loke, Y. Y., Zhu, Y. C., Huang, S. H., Tan, C. S., Whiteman, M., Lu, J., y Moore, P. K. (2007). Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. *J Appl Physiol (1985)*, 102(1), 261-268.
- Zhuang, X. D., Hu, X., Long, M., Dong, X. B., Liu, D. H., y Liao, X. X. (2014). Exogenous hydrogen sulfide alleviates high glucose-induced cardiotoxicity via inhibition of leptin signaling in H9c2 cells. *Mol Cell Biochem*, 391(1-2), 147-155.

9. Anexos

9.1 Actividades académicas

- Curso “El Cerebro Adolescente”. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Ciudad de México, México. 2017.
- Curso Pre-Congreso: Homeóstasis energética. LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Monterrey, Nuevo León, México. 2017.
- Curso Pre-Congreso: “Nutrición aplicada a la actividad física y el ejercicio”. I Congreso Internacional del Colegio Mexicano de Nutriólogos, A.C. “La Nutriología: De la Ciencia a la Práctica”. Ciudad de México, México. 2017.

9.2 Congresos

- LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. Monterrey, Nuevo León, México. 2017.
- I Congreso Internacional del Colegio Mexicano de Nutriólogos, A.C. “La Nutriología: De la Ciencia a la Práctica”. Ciudad de México, México. 2017.
- 47th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington, DC, USA. 2017.
- 5th World Congress on Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine. Toronto, Canadá. 2018.

9.3 Artículos

- Apoyo en el Proyecto de verano: “Pharmacological evidence that metformin blocks the vasopressor responses mediated by stimulation of α 1- and α 2-adrenoceptors in pithed rats.”



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL I. P. N.**

EI DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGIA OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

A

Gómez Carolina Belén

**POR SU ASISTENCIA AL CURSO "EI CEREBRO ADOLESCENTE"
IMPARTIDO LOS DÍAS 27 Y 28 DE ENERO DEL 2017, CON UNA
DURACIÓN TOTAL DE 12 HORAS**

Dra. Carolina López Rubalcava
Coordinadora del curso

Ciudad de México 28 de Enero del 2017



SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Carolina Belén Gómez

Quien asistió al curso Pre-Congreso
Homeostasis energética

En el LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas
del 12 al 13 de agosto en la ciudad de Monterrey, Nuevo León

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza

Dr. Benjamín Florán Garduño

Dr. Jesús Hernández Falcón

Dr. Rodolfo Delgado Lezama



IBERO
Ciudad de México • Tijuana

Colegio Mexicano de Nutriólogos A.C.

Con registro ante la Dirección General de Profesiones No. F252

Otorga el presente reconocimiento a:

Carolina Belén Gómez

Por su participación como asistente al Taller:

"Nutrición aplicada a la actividad física y el ejercicio"

en el I Congreso Internacional del Colegio Mexicano de Nutriólogos, A.C.

"La Nutriología: De la Ciencia a la Práctica"

Ciudad de México, 12 de octubre de 2017

Valor curricular 4 horas

Dra. Edna Judith Nava González NC
Presidente

Consejo Directivo 2017 - 2019

Mtra. Aracely Suverza Fernández NC
Coordinadora LNCA

Universidad Iberoamericana Campus Santa Fe



SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

a:

Carolina Belén Gómez

Por su asistencia y participación durante el LX Congreso Nacional
de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas
del 13 al 17 de agosto de 2017 en la ciudad de Monterrey, Nuevo León

Atentamente
Por el Comité Organizador

Dr. Benjamin Florán Garduño

Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza

Dr. Jesús Hernández Falcón

Dr. Rodolfo Delgado Lezama



IBERO
Ciudad de México • Tijuana

Colegio Mexicano de Nutriólogos A.C.

Con registro ante la Dirección General de Profesiones No. F252

Otorga el presente reconocimiento a:

Carolina B. Gómez

Por su participación como **trabajo libre en cartel** en el
I Congreso Internacional del Colegio Mexicano de Nutriólogos, A.C.
"La Nutriología: De la Ciencia a la Práctica"
Ciudad de México, 12, 13 y 14 de octubre de 2017

Dra. Edna Judith Nava González NC
Presidente
Consejo Directivo 2017 - 2019

Mtra. Aracely Suverza Fernández NC
Coordinadora LNCA
Universidad Iberoamericana Campus Santa Fe



**SOCIETY for
NEUROSCIENCE**

1121 14th Street NW
Suite 1010
Washington, DC 20005

Phone (202) 962-4000
Fax (202) 962-4641
Web SfN.org

*Neuroscience 2017
November 11 - 15
Washington, DC*

Please let this serve to certify that

Carolina Gomez

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

Session Type: Poster

Session Title: Cardiovascular Regulation I

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

Presentation Number: 506.2

Presentation Title: Analysis of the vasodepressor responses induced by NaHS, sodium nitroprusside and acetylcholine in rats treated with high fat diet

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

Sincerely,

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'Kyle Hayden'.

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

Date: November 14, 2017







Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

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

Cardiovascular pharmacology

Pharmacological evidence that metformin blocks the vasopressor responses mediated by stimulation of α_1 - and α_2 -adrenoceptors in pithed rats



Saúl Huerta de la Cruz, Grecia J. Medina-Terol, Jesús H. Beltrán-Ornelas, Carolina B. Gomez, Yaltzir Morato-Valderrama, Araceli Sánchez-López, David Centurión^{a,1}

^aDepartamento de Farmacobiología, Cinvestav Unidad Coapa, Cda. de los Tenorios 235, Col. Granjas-Coapa, Del. Tlalpan, C.P. 14330 México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Gallamine triethiodide (PubChem ID: 6172)

Methoxamine hydrochloride (PubChem ID: 6081)

(\pm)-noradrenaline bitartrate (PubChem ID: 297812)

5-Bromo-N-(2-imidazolín-2-yl)-6-quinoxalinamine, 5-Bromo-N-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-yl)-6-quinoxalinamine (UK 14,304, brimonidine) (PubChem ID: 2435)

1,1-dimethyl biguanide hydrochloride (metformin) (PubChem ID: 14219)

Keywords:

$\alpha_{1,2}$ -adrenoceptors

Blood pressure

Cardiovascular

Hypotension

Metformin

ABSTRACT

It has been reported that metformin reduces blood pressure although the mechanisms have not been described. Indeed, several mechanisms could be implicated including the interaction with α -adrenoceptors or inhibition of sympathetic outflow. Therefore, this study was designed to determine the capability of metformin to block the vasopressor responses induced by $\alpha_{1,2}$ -adrenoceptor agonists or selective electrical stimulation of sympathetic outflow. For this purpose, Wistar male rats were anesthetized, pithed and cannulated for selective preganglionic stimulation of the vasopressor sympathetic outflow or drugs administration. The effect of i.v. bolus injection of metformin (180 and 310 mg/kg) or its vehicle (bidistilled water) was studied on the vasopressor responses induced by: (1) selective sympathetic stimulation (0.03–3 Hz); (2) exogenous noradrenaline (0.03–3 μ g/kg); (3) methoxamine (1–100 μ g/kg); and (4) UK 14,304 (0.1–30 μ g/kg). The tachycardic responses to noradrenaline were also investigated in presence of metformin. The vasopressor responses induced by selective electrical stimulation of sympathetic outflow were diminished by metformin (180 and 310 mg/kg) and remained unchanged in presence of vehicle. Moreover, the vasopressor responses induced by exogenous noradrenaline, methoxamine and UK 14,304 were dose-dependently inhibited by i.v. bolus injections of metformin (180 and 310 mg/kg) and were not affected by vehicle. Metformin practically did not block the tachycardic responses to noradrenaline except at the dose of 3 μ g/kg. Taken together, these results demonstrate that metformin is capable to block vascular $\alpha_{1,2}$ -adrenoceptors but not cardiac β -adrenoceptors. Thus, this mechanism could contribute, at least in part, on the hypotensive responses induced by metformin.

