



Cinvestav

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

Sede Sur

Departamento de Farmacobiología

“Efecto del sulfuro de hidrógeno sobre las respuestas vasculares generadas por angiotensina-(1-7) y angiotensina II en modelos experimentales con resistencia a la insulina e hiperglucemia”

T E S I S

Que presenta

M. en C. Diana Laura Silva Velasco

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en

Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directores de tesis:

Dr. David Centurión Pacheco

Dra. María Alicia Sánchez Mendoza



El presente trabajo de investigación se desarrolló bajo la dirección de Dr. David Centurión Pacheco y de Dra. María Alicia Sánchez Mendoza. El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 6 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y en el laboratorio de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología, con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) a través de la beca No. 489752.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por permitirme concluir con esta meta.

A MIS PADRES

Esther Velasco Botello y Roberto Silva Martínez.
Por el apoyo y consejos que me dan día con día, pero sobre todo por enseñarme a ser una mejor persona y darme ánimos a pesar de la distancia. Los amo infinitamente.

A MIS HERMANOS

Roberto Carlos Silva Velasco, por ser parte importante de este proyecto, por haberme impulsado a continuar en la investigación y escucharme en mis momentos de estrés. Yazmín Galilea Silva Velasco, muchas gracias por comprenderme, por ser la hermana menor que alegra mis días con tus historias, mensajes, etc., y hacer que quiera ser un buen ejemplo para ti. A ambos los amo.

AGRADECIMIENTOS

AL CINVESTAV Y CONAHCyT

Por los apoyos proporcionados para desarrollar este proyecto.

AL DR. DAVID CENTURIÓN PACHECO

Por integrarme a su laboratorio y apoyarme en el desarrollo de este proyecto. Por ser una parte fundamental en mi formación académica y por los consejos, estaré siempre agradecida.

A LA DRA. ALICIA SÁNCHEZ

Por haberme recibido en su laboratorio para concluir mi proyecto y hacerme sentir en confianza con su equipo de trabajo. Gracias por las enseñanzas, consejos y convivencias.

A MI COMITÉ SINODAL

Dra. Luz Graciela Cervantes Pérez, Dra. Claudia González Espinosa, Dr. José Alonso Fernández Guasti, Dr. Francisco Javier López Muñoz y Dra. Norma Leticia Gómez Viquez. Por su tiempo, aportaciones y sugerencias para mejorar el presente proyecto, pero principalmente por impulsarme a mejorar.

A PERSONAS MARAVILLOSAS

Francisco Javier. Por ser una persona importante en mi vida, por escucharme una y otra vez, por hacer esta etapa más divertida e impulsarme a dar lo mejor de mí. Siempre estaré muy agradecida contigo.

Hernán Beltrán. Por ser mi hermano, obviamente. Por hacer de estos 6 años una etapa muy divertida llena de risas y por apoyarme en dudas de mi proyecto.

Adriana Álvarez. Por ser una gran amiga, escucharme y permitirme integrarme a tu hogar con las bendiciones.

Alejandro Pluma. Por ser uno de los mejores amigos que he tenido desde la universidad y seguirme apoyando.

Frida Martínez. Por compartir conmigo tus historias y decirme que no me estrese, por los días en los que me alimentabas y por ser una gran amiga.

Jorge Tapia. Por convertirse en un gran amigo y apoyarme en la realización de este proyecto.

Dania Castelo. Por las tardes de los viernes donde me aconsejabas.

Saúl Huerta. Por apoyarme desde que ingrese a la maestría y aconsejarme en todo momento.

Daniel Fonseca, Eduardo Ávila y Grecia Terol. Por brindarme su amistad y hacerme pasar muchos momentos agradables.

Christopher Martínez, Daniel Pérez y Félix López. Por escucharme y apoyarme.

A LOS MIEMBROS DEL LABORATORIO 6

Dra. Araceli Sánchez López. Por el apoyo en la parte técnica y académica de este trabajo, por las historias que nos contaba y por los momentos agradables de convivencia.

Azalia, Karla y Mónica, por sus historias que me hacían reír y ser grandes personas conmigo.

A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE CARDIOLOGÍA

Dra. Luz Ibarra Lara, Dra. María Sánchez Aguilar, Dr. Gustavo Pastelín Hernández, Dra. Margarita del Carmen Ramírez Ortega y Leonardo del Valle Mondragón. Por integrarme a su equipo y apoyarme.

Marco Osciel. Por convertirme en un gran amigo, enseñarme técnicas del laboratorio y apoyarme en mis momentos de estrés.

Montse. Por ser una persona muy amable conmigo y por las pláticas alegres.

AL PERSONAL DEL CINVESTAV SEDE SUR

A Shareny Freyffeldt por el apoyo en la entrega de documentos.

Al Sr. Ramón Martínez y el personal de bioterio por el apoyo con el desarrollo de este proyecto.

Al Lic. Víctor Manuel Mendoza Salas por su ayuda en la proporción del material bibliográfico.

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Insulina	21
1.1.1. Receptor de insulina y mecanismo de señalización	21
1.1.2. Resistencia a la insulina	23
1.2. Diabetes mellitus tipo 2	25
1.3. Complicaciones vasculares en los modelos de RI y DMT2	27
1.4. Factores relajantes y contráctiles	28
1.5. Disfunción vascular	30
1.6. Ang II y Ang-(1-7)	30
1.7. Participación de Ang II y Ang-(1-7) en modelos de RI y DMT2	32
2. Sulfuro de hidrógeno	34
2.1. Generalidades	34
2.2. Síntesis	36
2.3. Persulfuración de proteínas	38
2.4. Catabolismo	39
2.5. Donadores	41
2.6. Efectos fisiológicos del H₂S sobre el sistema cardiovascular	42
2.7. Efectos del H₂S en modelos de RI e hiperglucemia	43
2.8. Relación entre el H₂S y la Ang II/Ang-(1-7)	45
3. JUSTIFICACIÓN	47
4. HIPÓTESIS	48
5. OBJETIVOS	49
6. MATERIALES Y MÉTODOS	50
6.1. Animales	50

6.2. Inducción del modelo de resistencia a la insulina por consumo de fructosa (15% p/v) y administración crónica de tratamientos farmacológicos.....	50
6.3. Inducción de hiperglucemia por STZ y administración crónica de tratamientos farmacológicos.....	53
6.4. Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)	55
6.5. Evaluación de la función vascular en la aorta torácica de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina e hiperglucemia.....	55
6.6. Determinación de los niveles de angiotensina-(1-7) y angiotensina II	57
6.7. Determinación de la expresión de receptores (AT ₁ , AT ₂ y Mas) y enzimas (ECA y ECA2)	57
6.8. Fármacos	60
6.9. Análisis estadístico	60
7. RESULTADOS	61
7.1. Variables metabólicas	61
7.1.1. Efecto de la resistencia a la insulina e hiperglucemia sobre las variables metabólicas	61
7.1.2. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre los niveles de glucosa en el modelo de hiperglucemia	65
7.2. Función vascular	67
7.2.1. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% p/v sobre las respuestas vasculares inducidas por Ang-(1-7) y Ang II en la aorta torácica de la rata	67
7.2.2. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas con resistencia a la insulina	68
7.2.3. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas con resistencia a la insulina	70
7.2.4. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ sobre las respuestas vasculares inducidas por Ang-(1-7) y Ang II en la aorta torácica de la rata	72

7.2.5. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas con hiperglucemia	73
7.2.6. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas con hiperglucemia	75
7.3. Niveles de angiotensinas	78
7.3.1. Efecto de la resistencia a la insulina, hiperglucemia y los tratamientos farmacológicos sobre los niveles de Ang-(1-7) y Ang II en muestras de suero	78
7.4. Western Blot	81
7.4.1. Determinación de la expresión de receptores (AT ₁ , AT ₂ y Mas) y enzimas (ECA y ECA2) por Western blot en aorta torácica de animales con resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y animales con tratamiento farmacológico	81
7.4.2. Determinación de la expresión de receptores (AT ₁ , AT ₂ y Mas) y enzimas (ECA y ECA2) por Western blot en aorta torácica de animales con hiperglucemia inducida por STZ y animales con tratamiento farmacológico	84
8. RESUMEN DE RESULTADOS	87
9. DISCUSIÓN	88
9.1. Efecto de la fructosa y de la estreptozotocina sobre las variables metabólicas	88
9.2. La resistencia a la insulina e hiperglucemia afectan las respuestas vasculares mediadas por el sistema renina-angiotensina en las aortas torácicas	89
9.3. Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas vasculares mediadas por el sistema renina-angiotensina en las aortas torácicas	92
10. CONCLUSIÓN	98
11. PERSPECTIVAS	99
12. REFERENCIAS	100
13. ANEXOS	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mecanismo de señalización del receptor de insulina.....	23
Fig. 2. Esquema representativo de la síntesis de los péptidos del Sistema Renina-Angiotensina.. ..	32
Fig. 3. Síntesis del H₂S.....	37
Fig. 4. Mecanismo de persulfuración del H₂S.. ..	39
Fig. 5. Catabolismo del H₂S.....	40
Fig. 6. Regulación de la liberación de la insulina mediada por H₂S.	45
Fig. 7. (A) Diseño experimental y (B) Curso temporal del modelo de resistencia a la insulina.....	52
Fig. 8. (A) Diseño experimental y B) Curso temporal del modelo de hiperglucemia.	54
Fig. 9. Protocolo experimental para evaluar la función vascular.	56
Fig. 10. Procedimiento experimental de la técnica de Western Blot.....	59
Fig. 11. Área bajo la curva de los valores de: (A) glucosa sanguínea y (B) insulina	62
Fig. 12. Efecto de la administración de vehículo (buffer de citratos) o STZ (70 mg/kg) neonatal sobre: (A) el curso temporal y (B) el área bajo la curva obtenido durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral a las 12 y a las 16 semanas en ratas Wistar macho.	64
Fig. 13. Efecto de la administración de los tratamientos farmacológicos sobre: (A) el curso temporal; (B) el área bajo la curva obtenido durante la PTGO y (C) glucosa espontánea.. ..	66
Fig. 14. Efecto de la administración crónica de fructosa 15% p/v (grupo RI) o de agua (control) durante 20 semanas sobre: (A) las respuestas relajantes	

inducidas por Ang-(1-7), y (B) las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho..... 67

Fig. 15. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina..... 69

Fig. 16. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS, (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina..... 71

Fig. 17. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ sobre: (A) las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) y (B) las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho. 72

Fig. 18. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas Wistar macho con hiperglucemia..... 74

Fig. 19. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS, (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho con hiperglucemia..... 76

Fig. 20. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre: (A) los niveles de Ang-(1-7) y (B) sobre los niveles de Ang II en suero.. 79

Fig. 21. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ neonatal y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre: (A) los niveles de Ang-(1-7) y (B) sobre los niveles de Ang II en suero.. 80

Fig. 22. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos

farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA2 y Mas en la aorta torácica..... 82

Fig. 23. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA, AT₁ y AT₂ en la aorta torácica..... 83

Fig. 24. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ neonatal y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA2 y Mas en la aorta torácica..... 85

Fig. 25. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ neonatal y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA, AT₁ y AT₂ en la aorta torácica..... 86

Fig. 26. Resumen de resultados y posibles mecanismos involucrados en el modelo de resistencia a la insulina..... 96

Fig. 27. Resumen de resultados y posibles mecanismos involucrados en el modelo de hiperglucemia..... 97

ÌNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores relajantes y contráctiles liberados por el endotelio.	29
Tabla 2. Estudios que muestran los efectos de modelos metabólicos como la RI y la diabetes sobre la expresión de ECA/ECA2 y receptores AT₁, AT₂ y Mas.....	34
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del H₂S.	35
Tabla 4. Estudios que muestran la relación del H₂S y Ang-(1-7) /Ang II	46
Tabla 5. Efecto de la administración crónica de fructosa 15% p/v durante 16 semanas sobre los niveles de glucosa e insulina basales, así como el índice HOMA y Matsuda-DeFronzo en ratas Wistar macho.	63
Tabla 6. Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pEC₅₀) y efecto máximo (E_{máx}) de las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) y las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en animales con RI y HG, así como la administración de vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas), NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) y DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas).....	77

ABREVIATURAS

3-MST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa
ABC	Área bajo la curva
ACh	Acetilcolina
AKT	Proteína cinasa B
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
Ang-(1-7)	Angiotensina-(1-7)
Ang-(1-9)	Angiotensina-(1-9)
ANOVA	Análisis de varianza
APA	Aminopeptidasa A
AT ₁	Receptor tipo 1 de angiotensina II
AT ₂	Receptor tipo 2 de angiotensina II
ATP	Adenosín trifosfato
CaS	Sulfuro de Calcio
CAT	Cistationina-amino transferasa
CBS	Cistationina-β-sintetasa
CCh	Carbacol
CO	Monóxido de carbono
CPA3	Carboxipeptidasa A3
CSE	Cistationina-γ-liasa
CTSA	Catepsina A
CYP450	Citocromo P450
DADS	Dialil disulfuro
DAS	Dialil sulfuro

DATS	Dialil trisulfuro
DL-PPG	DL-Propargilglicina
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP3	Dipeptidil peptidasa 3
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECA2	Enzima Convertidora de Angiotensina tipo 2
Emáx	Efecto máximo
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
ERK	Cinasas activadas por señales extracelulares
ET-1	Endotelina tipo 1
FGFb	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
FID	Federación Internacional de Diabetes
GLUT	Transportador de glucosa
GLUT4	Transportador de glucosa tipo 4
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPA	Glucosa plasmática en ayunas
Grb2	Proteína tipo 2 unida al factor de crecimiento
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno
HbA1c	Hemoglobina glucosilada
HG	Hiperglucemia
HNO	Nitroxilo
HOMA	Evaluación del modelo homeostático
HSNO	Ácido trionitroso
IKCa	Canales de conductancia intermedia
IPA	Insulina plasmática en ayuno
IRS	Sustrato del receptor de insulina

K ⁺ _{ATP}	Canales de potasio dependientes de ATP
KCl	Cloruro de potasio
L-VDCC	Canales de calcio dependientes de voltaje
Mas	Receptor Mas
MEK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MME	Metallo-endopeptidasa de membrana
MrgD	Receptor D acoplado a proteína G relacionado con Mas
NA	Noradrenalina
Na ₂ S	Sulfuro de sodio
NaHS	Sulfhidrato de sodio
NEP	Endopeptidasa neutra
NLM	Neurolisina
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno tisular tipo 1
PBS	Buffer de fosfatos salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
pEC ₅₀	Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinasa
PNC	Péptido natriurético tipo C
PrCP	Prolilcarboxipeptidasa
PREP	Prolilendopeptidasa
PTGO	Prueba de tolerancia a la glucosa oral
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno

SGLT2	Cotransportador de sodio y glucosa tipo 2
SKCa	Canales de potasio de conductancia baja
SRA	Sistema renina-angiotensina
STZ	Estreptozotocina
TGF- β	Factor de crecimiento transformador-beta
THOP1	Thimet oligopeptidasa 1
t-PA	Activador de plasminógeno tisular
TSM	S-metiltransferasa
TXA2	Tromboxano A2
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

La resistencia a la insulina (RI) es definida como una condición metabólica en la que las funciones fisiológicas de la insulina se encuentran dañadas y representa un paso previo a la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2). La DMT2 se caracteriza por un estado de hiperglucemia (HG), cuando no es controlada pueden aparecer complicaciones vasculares como la disfunción vascular en la cual se encuentra involucrado el sistema renina-angiotensina. En el sistema cardiovascular se ha estudiado un gasotransmisor conocido como sulfuro de hidrógeno (H_2S), el cual se caracteriza por sus efectos relajantes. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la administración durante 4 semanas de sulfhidrato de sodio (NaHS; donador inorgánico de H_2S) y DL-propargilglicina [DL-PPG; inhibidor de la cistationina— γ -liasa (CSE)] sobre las respuestas vasculares reguladas por el sistema renina-angiotensina (SRA) en la aorta torácica de ratas con RI y ratas con HG. En este trabajo se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar (7 semanas de edad) y 60 ratas macho de la cepa Wistar en etapa neonatal. Las ratas de 7 semanas de edad se dividieron en dos grupos: 1) control (agua filtrada del grifo, $n=12$) y 2) fructosa 15% p/v ($n=48$, grupo RI). Las ratas neonatas se dividieron en dos grupos que recibieron: 1) buffer de citratos ($n=12$) y 2) estreptozotocina (STZ, 70 mg/kg, i.p.; $n=48$, grupo HG). Después de 16 semanas (ratas con RI) y 12 semanas (ratas con HG), el grupo principal se dividió en 4 subgrupos ($n=12$ cada uno), los cuales no recibieron ningún tratamiento (grupo 1) o una inyección diaria (i.p.), durante 4 semanas, de: vehículo (PBS, 1 mL/kg, grupo 2), NaHS (5.6 mg/kg, grupo 3) o DL-PPG (10 mg/kg, grupo 4). Al finalizar el tiempo de los tratamientos farmacológicos, los niveles de glucosa en sangre, los niveles de angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] y angiotensina II (Ang II) en suero, así como las respuestas vasculares a Ang-(1-7), Ang II y la expresión en la aorta torácica de ECA, ECA2, receptores AT_1 , AT_2 y Mas fueron evaluados. Los resultados mostraron que el consumo de fructosa generó: 1) hiperinsulinemia, 2) aumento del índice HOMA, y 3) decremento del índice Matsuda en ratas del grupo de RI. Por otro lado, la administración de STZ provocó hiperglucemia. Al evaluar las respuestas vasculares relacionadas con el SRA, encontramos que el modelo de RI y el modelo de HG produjeron: 1)

disminución en las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7), 2) aumento en la expresión del receptor AT_1 y 3) disminución en la expresión de ECA2 y de los receptores Mas y AT_2 . Estos modelos presentaron cambios en las respuestas contráctiles inducidas por Ang II: el modelo de RI incrementó esas respuestas mientras que el modelo de HG las disminuyó. De manera interesante, el tratamiento con NaHS reestableció estas respuestas a niveles similares al control en ambos modelos metabólicos. Incluso en el modelo de RI, el NaHS disminuyó las respuestas contráctiles inducidas por Ang II y en el modelo de HG, el NaHS incrementó las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) al compararse ambos contra su grupo control. Finalmente, el tratamiento con DL-PPG sólo presentó efectos en el modelo de RI, en donde se observó una ligera disminución en las respuestas contráctiles inducidas por Ang II y una expresión disminuida del receptor AT_1 . Por lo tanto, estos resultados indican que el NaHS puede mejorar la función vascular durante la RI y la HG a través de la regulación del SRA.

ABSTRACT

Insulin resistance (IR) is a metabolic condition in which the physiological functions of insulin are damaged and represents a step prior to the appearance of Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). T2DM is characterized by a state of hyperglycemia (HG). When it is not controlled, vascular complications may appear, such as vascular dysfunction in which the renin-angiotensin system is involved. A gasotransmitter known as hydrogen sulfide (H₂S) has been studied in the cardiovascular system, which is characterized by its relaxing effects. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of chronic administration of sodium hydrosulfide (NaHS; inorganic H₂S donor) and DL- propargylglycine [DL-PPG; cystathionine-γ-lyase (CSE)] inhibitor on renin-angiotensin system (RAS)-regulated vascular responses in the thoracic aorta of IR and HG rats. In this work, 60 male Wistar rats (7 weeks old) and 60 neonatal male Wistar rats were used. The 7-week-old rats were divided into two groups: 1) control (filtered tap water, n=12) and 2) 15% w/v fructose (n=48, IR group). Neonatal rats were divided into two groups that received: 1) citrate buffer (n=12) and 2) streptozotocin (STZ, 70 mg/kg, i.p.; n=48, HG group). After 16 weeks and 12 weeks, the IR group, and the HG group, respectively, were divided into 4 subgroups (n=12 each), which received i.p. injections for 4 weeks of: 1) no treatment, 2) vehicle (PBS, 1 mL /kg), 3) NaHS (5.6 mg/kg), and 4) DL-PPG (10 mg/kg). At the end of the pharmacological treatment, blood glucose levels, serum angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] and angiotensin II (Ang II) levels, as well as vascular responses to Ang-(1-7), Ang II and the expression in the thoracic aorta of ACE, ACE2, AT₁, AT₂ and Mas receptors were evaluated. The results showed that fructose consumption generated: 1) hyperinsulinemia, 2) increase in the HOMA index, and 3) decrease of the Matsuda index. On the other hand, the administration of STZ caused hyperglycemia. When evaluating the vascular responses related to the RAS, we found that the IR model and the HG model produced: 1) decrease in the relaxant responses induced by Ang-(1-7), 2) increased expression of the AT₁ receptor, 3) decrease Ang-(1-7) levels and expression of ACE2 and Mas and AT₂ receptors. These models presented changes in the contractile responses induced by Ang II; the IR model increased those responses while the HG model decreased them.

Interestingly, NaHS treatment restored these responses to levels like control in both metabolic models. In the IR model, NaHS decreased contractile responses induced by Ang II, while in the HG model, NaHS increased the relaxing responses induced by Ang-(1-7). Finally, treatment with DL-PPG only showed effects in the IR model, where a slight decrease in the contractile responses induced by Ang II and decreased expression of the AT₁ receptor was observed. Taking these results together, we conclude that NaHS can improve vascular function during IR and HG through regulation of the RAS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas. Está compuesta por 51 aminoácidos, los cuales se encuentran distribuidos en dos cadenas: 1) cadena A que tiene 21 aminoácidos y 2) cadena B compuesta por 30 aminoácidos. La cadena A y B se encuentran unidas por tres puentes disulfuro (Tofteng et al., 2008). La insulina tiene funciones importantes en el metabolismo humano, principalmente manteniendo normales los niveles de glucosa en sangre (De Meyts, 2000). Para mantener la homeostasis de la glucosa, la insulina puede: 1) inhibir la producción hepática de glucosa, lo cual puede ser de manera directa cuando la insulina actúa sobre su receptor hepático originando la disminución de la glucogenólisis (Edgerton et al., 2006) o de manera indirecta a través de la reducción de los ácidos grasos libres circulantes (Perry et al., 2015), inhibición de la lipólisis o por supresión de la secreción de glucagón (Lewis et al., 1997); 2) promover la captación de glucosa por el tejido muscular esquelético y el tejido adiposo, generalmente por un aumento en la translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana plasmática, lo que mejora el transporte de glucosa a los miocitos y la fosforilación de glucosa intracelular (Wasserman & Ayala, 2005); 3) favorecer la síntesis de triglicéridos en los adipocitos, lo cual se produce porque la insulina puede regular de manera negativa la vía lipolítica (Czech et al., 2013).

1.1.1. Receptor de insulina y mecanismo de señalización

La activación del receptor de insulina desencadena una señalización de múltiples vías que están relacionadas con el metabolismo y crecimiento celular. Los receptores de insulina son receptores con actividad de cinasa de tirosina, es decir, se activan mediante procesos de dimerización seguidos de fosforilación en dominios de cinasa de tirosina (Zhao et al., 2023). Una vez que la insulina se une al receptor de insulina (IR), se favorece la fosforilación de uno de los sustratos del receptor de insulina (IRS1, IRS2 e IRS4), esto produce la activación del fosfatidilinositol-3-

cinasa (PI3K) y la producción del fosfatidilinositol 3,4-5 trifosfato (PIP3). PI3K es una de las enzimas clave en la función de la insulina debido a que su activación contribuye a que la cinasa tipo 1 dependiente de PIP3 (PDK1) pueda activar a la proteína cinasa B, la cual es conocida como Akt (Boucher et al., 2014). Akt influye en: 1) la inhibición de la lipólisis y la gluconeogénesis (Du et al., 2018); 2) la activación de la síntesis de proteínas a través de mTOR, el cual, a su vez regula respuestas del factor de crecimiento, privación de nutrientes y estrés celular (Duvel et al., 2010); 3) la síntesis de glucógeno a través de la inhibición de la enzima glucógeno cinasa-3 beta (GSK-3) (Kim et al., 2004); y 4) la inhibición de factores relacionados con procesos de la apoptosis como Bcl, FoxO, GSK-3 y MST1 (Tzivion et al., 2011). De acuerdo con los estudios realizados para conocer la estructura de Akt, se ha reportado que existen tres isoformas, las cuales tienen un dominio que puede ser reconocido por PI3P y así Akt pueda ejercer sus efectos. De las tres isoformas reportadas, la isoforma tipo 2 (Akt2) es la más abundante en los órganos insulino dependientes regulando los procesos metabólicos y, es por esta razón que es la isoforma más estudiada en modelos metabólicos (Cho et al., 2001; Schultze et al., 2011).

La activación de la vía PI3K/Akt también participa en el sistema cardiovascular, debido a que se produce una unión entre Akt y la enzima sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), ayudando a generar óxido nítrico (NO) (Mustapha et al., 2022). La vía de señalización de la insulina también está relacionada con procesos de crecimiento, supervivencia y diferenciación celular dependientes de esta hormona. Esto sucede cuando el IRS activa el complejo GRB2/SOS que desencadena la activación de la cascada Ras/Raf/MAPK (Boucher et al., 2014).

Debido a que la insulina ejerce sus efectos principalmente sobre 3 órganos (hígado, tejido adiposo y músculo esquelético), se ha descrito que la activación de esta vía permite la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, lo cual contribuye a la captación de glucosa en el músculo y adipocitos principalmente (Rowland et al., 2011). Por otro lado, en el hígado también se ha reportado que al activarse el receptor de insulina se induce la activación de la proteína de unión al elemento regulado por esteroides (SREBP), la cual incrementa la oxidación de glucosa y la

síntesis de ácidos grasos en el hígado. En apoyo a esto último, la activación de USF y LXR también contribuye a la síntesis de ácidos grasos (Fritsche et al., 2008; Shao & Espenshade, 2012).

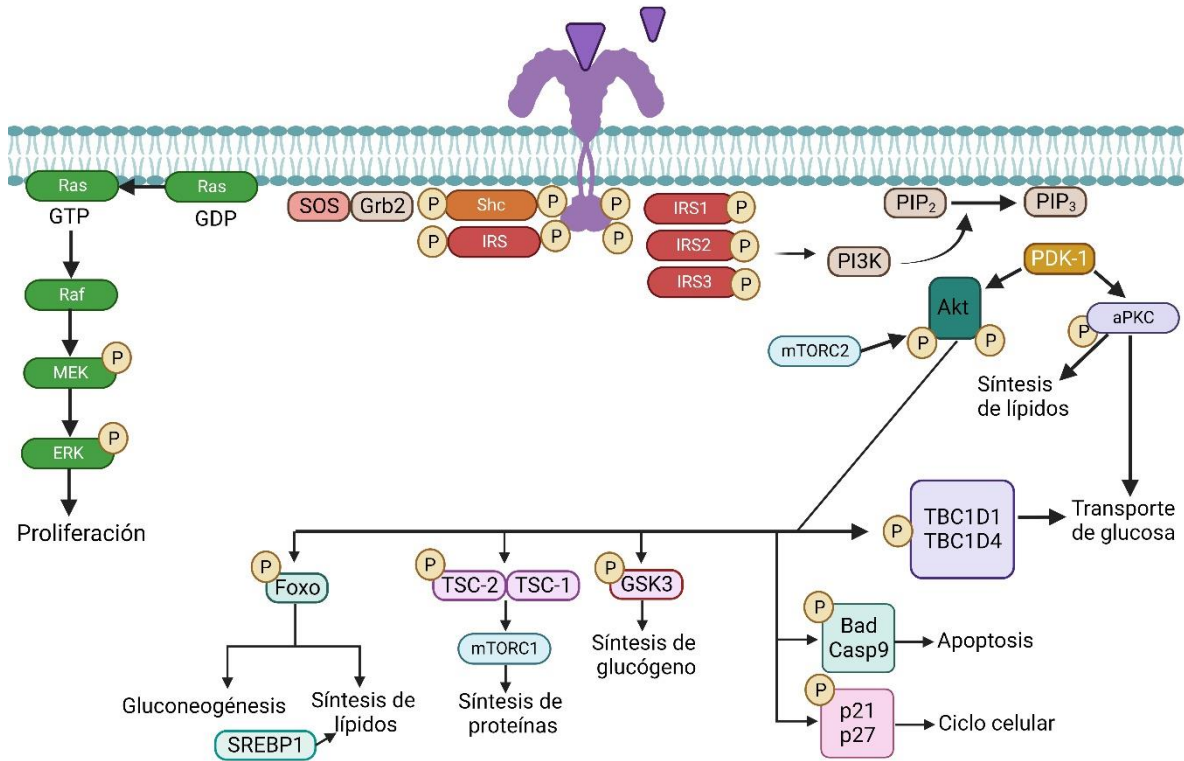


Fig. 1. Mecanismo de señalización del receptor de insulina. Al unirse la insulina a su receptor se activan múltiples vías de señalización, pero las principales son la vía PI3K/AKT y la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos. Sustrato del receptor de insulina, (IRS); proteína tipo 2 unida al factor de crecimiento, (Grb2); fosfatidilinositol 3-cinasa, (PI3K); proteína cinasa B, (AKT); proteína cinasa activada por mitógenos (MEK); cinasas activadas por señales extracelulares (ERK). Figura creada con Biorender.com.

1.1.2. Resistencia a la insulina

La resistencia a la acción de la insulina se presenta cuando los tejidos sensibles a la insulina (tejido adiposo, hígado y músculo esquelético) no responden a los niveles circulantes normales de insulina. Para compensar esta respuesta inadecuada, las células β pancreáticas aumentan la producción de insulina que conduce a hiperinsulinemia. Sin embargo, los niveles de glucosa en sangre se mantienen normales (Mercurio et al., 2012). La hiperinsulinemia es una característica de los

pacientes con resistencia a la insulina y se presenta particularmente después de una comida rica en carbohidratos. La resistencia a la insulina también se relaciona con defectos en las vías de señalización. Al respecto se ha reportado que el IRS es un nodo importante para que se pueda generar una vía de señalización correcta y de ser dañado se podría presentar resistencia a la insulina (James et al., 2021). La resistencia a la insulina es un estado metabólico catalogado como el principal contribuyente a la aparición y progresión de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (DeFronzo & Tripathy, 2009), debido a que conforme progresa, la insulina comienza a perder sus efectos y ya no puede regular el metabolismo de la glucosa, lo que genera que la glucosa no pueda ser utilizada por los tejidos sensibles a la insulina y procesos como la gluconeogénesis hepática aumentan, induciendo un incremento en los niveles de glucosa (Bazotte et al., 2014).

La mayoría de las ocasiones las personas desconocen que tienen resistencia a la insulina o DMT2. En este sentido, las pruebas para conocer los niveles de glucosa e insulina son importantes. La RI se puede determinar a través de la sensibilidad periférica a la insulina *in vivo*, para lo cual se puede emplear el clamp hiperinsulinémico-euglucémico, este método es de los más empleados debido a su alta sensibilidad para evaluar la captación de glucosa. Sin embargo, una de sus principales desventajas es que es difícil de realizar. En la clínica se utilizan métodos menos invasivos como por ejemplo la prueba de insulina en ayunas, la prueba de liberación de insulina y la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO) (Sharma et al., 2020). También se suelen aplicar índices para conocer la existencia de RI, tal es el caso del índice HOMA (Evaluación del Modelo Homeostático) y el índice Matsuda-DeFronzo. El índice HOMA es utilizado para la evaluación de la función de las células β y la sensibilidad a la insulina, para realizar esto el índice HOMA considera los niveles de glucosa e insulina en ayuno (Tang et al., 2015). Este índice necesita de una calibración previa que considera la función de las células β en un 100% y una resistencia a la insulina normal de 1 considerando la siguiente fórmula:

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

Otro parámetro que es utilizado para la determinación de la resistencia a la insulina es el índice Matsuda-DeFronzo. Este índice fue descrito por Matsuda y DeFronzo en 1999 (Matsuda & DeFronzo, 1999). Para obtener el índice Matsuda-DeFronzo se realiza una curva de tolerancia a la glucosa oral y con base en los valores obtenidos de glucosa e insulina se utiliza la siguiente fórmula:

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

De acuerdo con la fórmula:

IPA= insulina plasmática en ayuno ($\mu\text{U/mL}$)

GPA= glucosa plasmática en ayuno (mg/dL)

xGPC= promedio de la concentración plasmática

xIPC= promedio de la concentración de insulina plasmática

Los puntos de corte para determinar la existencia de resistencia a la insulina se presentan cuando el índice HOMA es mayor a 2.5 (Martínez Basila et al., 2011) y cuando el índice Matsuda es menor a 2.5 (Takahara et al., 2013).

1.2. Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 se define como un trastorno metabólico complejo que se caracteriza por un estado de hiperglucemia (HG) crónica que es mediada por una disminución en la producción o en la función de la insulina (ElSayed et al., 2023). En el año 2019 la DMT2 afectó a 463 millones de pacientes en todo el mundo y se estima que para el año 2030 está cifra incrementa a 578 millones (Saeedi et al., 2019). La Federación Internacional de Diabetes (FID) reportó que de los pacientes que presentan diabetes, un 87-91% de los pacientes están clasificados con DMT2, mientras que de 4-12% pertenecen a pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y del 1-3% entran en la clasificación de diferentes tipos de diabetes (International Diabetes Federation, 2019).

A la DMT2 también se le conoce como diabetes no insulino-dependiente o diabetes de inicio en la edad adulta. Como se mencionaba en apartados anteriores, aparece posterior a la resistencia a la insulina (Tan et al., 2019).

Existen distintas pruebas y parámetros para poder diagnosticar diabetes, por ejemplo:

- Glucosa Plasmática en Ayunas (GPA). Cuando una persona se encuentra en ayuno, el glucagón es el encargado de liberar glucosa del hígado hacia el torrente sanguíneo, mientras que la insulina estará regulando estos niveles de glucosa, sin embargo, cuando la persona es diabética, la insulina no podrá regular los niveles de glucosa y aparecerá la hiperglucemia (Debra, 2021). En esta prueba se considera que el paciente no es diabético si los niveles de glucosa sanguínea en ayunas son menores de 100 mg/dL (5.6 mmol/L), sin embargo, si los niveles son iguales a 126 mg/dL o mayores, se considera que el paciente es diabético (EISayed et al., 2023).
- PTGO: Evalúa la capacidad del cuerpo para metabolizar la glucosa, por lo que, para realizar esta prueba, se toman valores previo y posterior a un consumo de glucosa, en adultos generalmente son 75 g de glucosa y en niños se calcula la cantidad de glucosa a administrarse con base en su peso (Close, 2021). De acuerdo con los valores de glucosa obtenidos a las 2 horas, un nivel de glucosa sanguínea inferior a 140 mg/dL (7.8 mmol/L) se considera normal, mientras que un nivel de glucosa de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) o mayor indica diabetes (EISayed et al., 2023).
- Examen aleatorio de glucosa: Está prueba se realiza a cualquier hora del día, cuando los niveles de glucosa sanguínea sean de 200 mg/dL (11.1 mmol/L) indican la existencia de Diabetes (EISayed et al., 2023).
- Hemoglobina glucosilada (HbA1c): Está prueba da a conocer los niveles de glucosa en sangre durante los últimos 2 a 3 meses. Esto quiere decir, que la prueba de HbA1c mide el porcentaje de glucosa que se encuentra unida a la hemoglobina (Close, 2021). Cuando los niveles son menores de 5.7% se consideran normales y niveles de 6.5% o mayores indican que el paciente presenta diabetes (EISayed et al., 2023).

Con respecto a los tratamientos para DMT2, estos son diferentes para cada paciente ya que depende de sus niveles de glucosa y de las complicaciones que presente. Los medicamentos más conocidos para tratar DMT2 son: metformina, sulfonilureas, tiazolidinedionas, inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV, agonistas del receptor del péptido similar a glucagon tipo 1, inhibidores del cotransportador de sodio y glucosa tipo 2 (SGLT2) (ElSayed et al., 2023).

1.3. Complicaciones vasculares en los modelos de RI y DMT2

Como se mencionó en el apartado 1.1.1, la activación del receptor de insulina puede desencadenar diferentes vías de señalización. Una de estas vías involucra la activación de AKT, que está relacionada con la liberación de NO, un gasotransmisor esencial para inducir respuestas relajantes en el sistema cardiovascular (Zeng et al., 2000). Por lo tanto, la insulina desempeña un papel importante sobre la función vascular. Sin embargo, cuando se presenta RI se produce un daño en la vía de señalización de la insulina lo cual puede llegar a afectar la producción de NO y consecuentemente modificar sus efectos provocando disfunción vascular (Du et al., 2013). En apoyo a esto, en el trabajo realizado por Mahmoud et al. (2012) se reportó que las respuestas contráctiles inducidas por fenilefrina y cloruro de potasio, así como las respuestas relajantes inducidas por acetilcolina, incrementaron y disminuyeron, respectivamente. Estos efectos fueron observados en ratas Wistar macho con RI inducida por el consumo de fructosa 10% por 8 semanas (Mahmoud et al., 2012). Similar a estos resultados, en un modelo de RI inducido por el consumo de fructosa 10% en el agua de beber durante 8 semanas, en ratas macho Sprague-Dawley, se observó un incremento en la presión arterial, colesterol y triglicéridos, además de un decremento en las respuestas relajantes a acetilcolina en la aorta torácica (S et al., 2021). Efectos similares se han presentado en modelos de DMT2 debido a que la hiperglucemia es un factor de riesgo importante para la función vascular. De hecho, la disfunción vascular es un parámetro descrito con frecuencia en modelos de DMT2 (Melo et al., 2021). En este sentido, en un modelo de DMT2 inducido por un consumo rico en grasa y la administración de estreptozotocina (STZ)

se reportó disfunción vascular y daños en mediadores inflamatorios, principalmente en el receptor de la proteína 3 (NLRP3) y el factor nuclear NF- κ B (He et al., 2021). Otras complicaciones vasculares que se pueden presentar en un paciente diabético son: 1) enfermedad de la arteria coronaria, que, representa una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La enfermedad de la arteria coronaria es una afección en la que el suministro de sangre y oxígeno al miocardio es inadecuado, debido a la oclusión de las arterias coronarias (Dalen et al., 2014); 2) enfermedad arterial periférica, la cual es generalmente causada por aterosclerosis (Aysert Yildiz et al., 2018); y, 3) enfermedad cerebrovascular, que, se caracteriza por afectar los vasos sanguíneos del cerebro, incluyendo isquemia-reperfusión o hemorragia (Writing Group et al., 2016).

1.4. Factores relajantes y contráctiles

El endotelio funciona como barrera entre la sangre y los tejidos, pero además, tiene funciones metabólicas y endócrinas (Godo & Shimokawa, 2017). Entre las funciones principales del endotelio se encuentra el sintetizar y liberar factores que contribuyen al mantenimiento del tono vascular que se define como la contracción de los vasos sanguíneos de forma parcial inducido por el músculo liso. El tono vascular esta mediado por diferentes mecanismos como neuronales, hormonales y metabólicos que pueden regularse a nivel del sistema nervioso central y local. A su vez, estos mecanismos se modulan por los factores liberados por el endotelio; los cuales pueden ser factores relajantes o contráctiles (Vanhoutte et al., 2017).

El principal factor relajante derivado del endotelio es el NO, el cual se produce a partir del aminoácido L-arginina y la participación de la eNOS. El NO liberado del endotelio puede atravesar músculo liso y desencadenar vías de señalización que contribuyen a la obtención de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) y finalmente vasorrelajación (Vanhoutte et al., 2017). También un factor relajante importante es la prostaciclina (PGI₂), que es producida a partir del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (Baber et al., 2005). Otros factores relajantes son: péptidos del sistema renina-angiotensina (SRA) como angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)], peróxido de hidrógeno (H₂O₂), monóxido de carbono (CO), sulfuro de hidrógeno

(H₂S), productos del citocromo P450 (CYP450) como los ácidos epoxieicosatrienoincos (EETs) y péptidos vasodilatadores como el péptido natriurético tipo C (PNC) (Triggle et al., 2012) (Tabla 1).

Asimismo, las células endoteliales son capaces de liberar factores contráctiles como por ejemplo las endotelinas que son los agentes vasoconstrictores más conocidos, siendo la isoforma tipo 1 (ET-1) la más abundante en el endotelio y por lo tanto a la que principalmente se le atribuyen los efectos contráctiles del endotelio. Un péptido clave en la regulación del tono vascular, es la angiotensina II (Ang II), que produce sus efectos contráctiles a través de la unión al receptor tipo I de angiotensina II (AT₁). Los tromboxanos A₂ (TXA₂) son otros factores que contribuyen a las respuestas contráctiles.

La integridad del endotelio también es importante para la función de estos factores ya que se ha reportado que la acetilcolina (ACh) y la trombina pueden ejercer efectos relajantes o contráctiles dependiendo de la condición del endotelio, es decir, cuando el endotelio está dañado el efecto relajante, la mayoría de las veces, se pierde (De la Serna, 2010).

Además de estos factores, las células endoteliales pueden liberar: sulfatos heparinoides, factor de crecimiento transformador-beta (TGF-β), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor activador de plasminógeno tisular (t-PAF), inhibidor del factor activador de plasminógeno tisular tipo 1 (PAI-1), especies reactivas de oxígeno (ROS), interleucinas, quimiocinas, moléculas de adhesión de monocitos, entre otras (De la Serna, 2010).

Tabla 1. Factores relajantes y contráctiles liberados por el endotelio.

Factores relajantes	Factores contráctiles
NO, CO, H ₂ S	Ang II
PGI ₂	TXA ₂
PNC	ET-1
Adrenomedulina	
Ang-(1-7)	
EETs	

1.5. Disfunción vascular

En el apartado 1.3 se mencionó que una de las complicaciones más importantes durante la RI y la DMT2 es la disfunción vascular, la cual es definida como el desequilibrio en la producción de factores contráctiles y factores relajantes. Además de presentarse durante la RI y DMT2, la disfunción vascular también puede presentarse en: 1) complicaciones microvasculares como retinopatía diabética, neuropatía y nefropatía diabéticas; y, 2) complicaciones macrovasculares como enfermedad coronaria, evento cerebrovascular, enfermedad arterial periférica (van den Born et al., 2016; Vanhoutte et al., 2017).

1.6. Ang II y Ang-(1-7)

El SRA tiene péptidos que ejercen efectos relajantes y contráctiles que contribuyen en la regulación del tono vascular, evitando que aparezca la disfunción vascular. La Ang II puede: 1) inhibir mecanismos vasodilatadores; 2) producir vasoconstricción *per se* (Patel et al., 2023); y 3) activar al sistema vasoconstrictor de la endotelina (Lin et al., 2014). Se ha propuesto que una mayor actividad del SRA produce un aumento del estrés oxidante y formación de especies reactivas de oxígeno, que a su vez afectan la utilización de la glucosa y la presión arterial en un contexto de hipertensión arterial y diabetes (Ahmad et al., 2014). De manera similar, también se ha reportado que el SRA puede incrementar la actividad del sistema nervioso simpático (Tran, Yuen, et al., 2009). El SRA no sólo produce Ang II, también incluye la formación de otros péptidos como la Ang-(1-7) que tiene efectos contrarios a Ang II y podría, por lo tanto, mantener un equilibrio en las respuestas (Dominici et al., 2020).

La actividad del SRA está determinada por la renina, una enzima producida y secretada por el riñón. Esta enzima escinde al angiotensinógeno en angiotensina I (Ang I) y, posteriormente, mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA), se genera Ang II, el principal péptido efector del sistema. La Ang I puede ser metabolizada por la ECA tipo 2 (ECA2) produciendo a la angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)]. Además, sobre la Ang II puede actuar la neprilisina o endopeptidasa neutra (NEP) y favorecer la formación de Ang-(1-7). Adicionalmente, la ECA2 convierte a la Ang II en Ang-(1-7); al que se le han atribuido una variedad de acciones

fisiológicas contrarias a las producidas por la Ang II. La Ang II es sustrato de otras enzimas como: la glutamil aminopeptidasa (Aminopeptidasa A o APA) y la dipeptidil peptidasa 3 (DPP3) que generan angiotensina III (Ang III) y angiotensina IV (Ang IV), respectivamente. La Ang I también puede ser sustrato de la carboxipeptidasa A3 (CPA3) y de la catepsina A (CTSA) dando como producto a la Ang-(1-9) o de enzimas como la prolil endopeptidasa (PREP), thimet oligopeptidasa 1 (THOP1), metalo-endopeptidasa de membrana (MME), neurolisina (NLM) y prolilcarboxipeptidasa (PrCP) produciendo a la Ang-(1-7) (Fig. 2) (Mirabito Colafella et al., 2019; Paz Ocaranza et al., 2020).

La Ang II ejerce sus efectos a través de la activación del receptor AT_1 y receptor de angiotensina tipo 2 (AT_2), los cuales ejercen sus funciones a través de la activación de las proteínas G_q y G_i , respectivamente. La unión de Ang II al receptor AT_1 promueve la vasoconstricción, fibrosis, crecimiento y migración celular, incremento del estrés oxidante e inflamación. Por otro lado, cuando la Ang II se une al receptor AT_2 ejerce los efectos contrarios, principalmente vasorrelajación (Hunyady & Catt, 2006; Steckelings et al., 2022). Los efectos de Ang-(1-7) son ejercidos a través de su unión al receptor Mas que está acoplado a una proteína G y posee acciones contrarias a Ang II. Se ha reportado que Ang-(1-7) favorece la liberación de NO para lo cual se requiere la fosforilación/desfosforilación de eNOS (Sampaio et al., 2007).

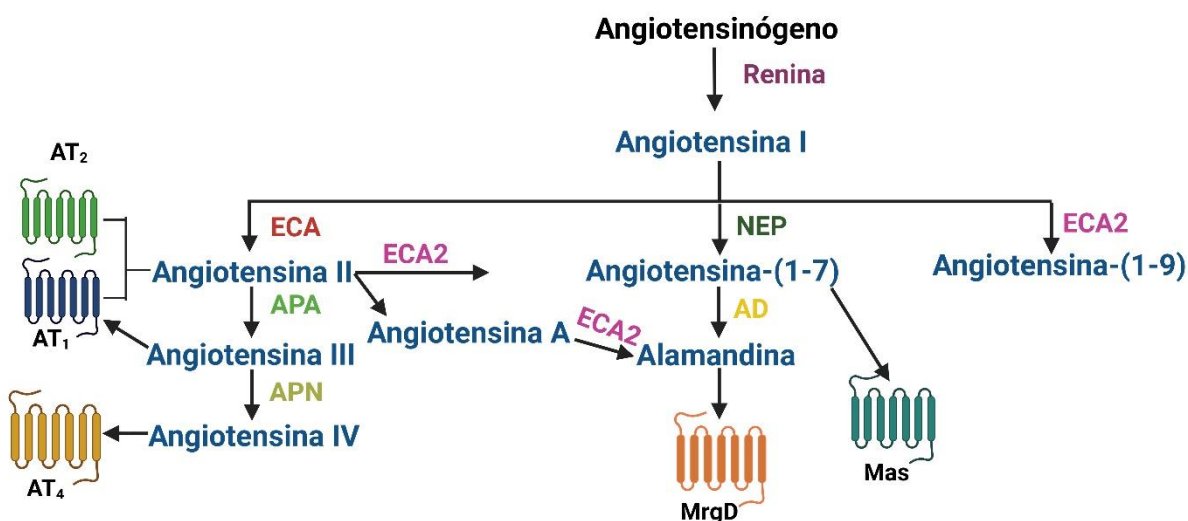


Fig. 2. Esquema representativo de la síntesis de los péptidos del Sistema Renina-Angiotensina. Enzima convertidora de angiotensina, (ECA); ECA tipo 2, (ECA2); receptor de angiotensina II tipo 1 (AT₁); receptor de angiotensina II tipo 2 (AT₂); receptor de angiotensina IV, (AT₄); receptor Mas, (Mas); receptor D acoplado a proteína G relacionado con Mas, (MrgD); aminopeptidasa A, (APA); aminopeptidasa N, (APN); endopeptidasa neutra, (NEP); aspartato descarboxilasa, (AD). Figura creada con Biorender.com.

1.7. Participación de Ang II y Ang-(1-7) en modelos de RI y DMT2

Como se mencionó en el apartado anterior, el SRA está implicado en la regulación de las respuestas contráctiles y relajantes, principalmente los péptidos Ang II y Ang-(1-7), por lo que un defecto en la expresión de estos receptores puede contribuir al daño de la función vascular (Vanhoutte et al., 2017). En apoyo a esto, existe evidencia de la influencia que tienen los péptidos Ang II y Ang-(1-7) en modelos metabólicos. Se ha reportado que estos péptidos pueden interferir en la vía de señalización de la insulina en los órganos insulino-dependientes (Dominici et al., 2014).

En el sentido de la función vascular, en ratas Sprague-Dawley se ha demostrado que la RI producida por la administración de fructosa durante 8 semanas (Shinozaki et al., 2004), así como la inducción de síndrome metabólico, por el consumo de una dieta rica en grasas durante 4 semanas (Ghatta & Ramarao, 2004), incrementaron las respuestas contráctiles inducidas por Ang II cuando se comparó contra el grupo control. En marcado contraste, se ha reportado que en ratas Wistar macho a las

cuales se les indujo DMT1 por la administración de STZ (65 mg/kg), las respuestas contráctiles inducidas por Ang II no se modificaron al compararse contra el grupo control (Kobayashi et al., 2006). Una posible explicación de los efectos ejercidos por Ang II en modelos de RI y DMT2 es la diferencia en la densidad de los receptores y la expresión de ECA (Graus-Nunes & Souza-Mello, 2019; Lee et al., 2008).

También hay evidencia de los efectos de Ang-(1-7) en modelos de RI y diabetes. En este sentido, en anillos aórticos de ratas Sprague-Dawley machos con RI, la cual fue producida por el consumo durante 12 semanas de una dieta rica en grasas, las respuestas relajantes a la Ang-(1-7) fueron menores en comparación con el grupo control (Karpe & Tikoo, 2014), lo cual es similar a las respuestas observadas en anillos de arteria carótida de ratas Wistar macho que recibieron STZ (55 mg/kg) para la inducción de DMT1. De acuerdo con lo descrito en la bibliografía, los autores relacionaron estos efectos con la disminución en la expresión del sistema Mas/ECA2 (Pernomian et al., 2014).

Otros receptores que no se descartan en estos modelos metabólicos son los receptores AT₂ de Ang II. Al respecto, en un modelo de obesidad en ratas Zucker, se reportó que al activarse el receptor AT₂ se produjo una atenuación del receptor AT₁ y un aumento en la actividad del eje ECA2/Ang-(1-7) /Mas (Ali et al., 2013). De manera interesante, en un modelo de ratones hembra diabéticos, la activación del receptor AT₂ previno los daños ocasionados por la diabetes a través de mecanismos que implican la participación del NO (Dominici et al., 2020).

Tabla 2. Estudios que muestran los efectos de modelos metabólicos como la RI y la diabetes sobre la expresión de ECA/ECA2 y receptores AT₁, AT₂ y Mas.

Modelo	Efecto	Referencias
Ratas con resistencia a la insulina inducida por dieta rica en grasas	Disminución en las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7), expresión de ECA2 y receptor Mas	(Karpe & Tikoo, 2014)
Ratas con diabetes mellitus tipo 1 inducida por STZ (60 mg/kg, i.p.)	Incremento en los niveles de Ang II, expresión de ECA y receptor AT ₁ . Disminución en niveles de Ang-(1-7), expresión de ECA2 y receptor Mas	(Qiao et al., 2015)
Ratas con resistencia a la insulina inducida por el consumo de fructosa al 60% durante 8 semanas	Incremento en las respuestas contráctiles inducidas por Ang II y del receptor AT ₁	(Shinozaki et al., 2004)
Ratas con diabetes inducida por STZ (65 mg/kg, i.p.)	Disminución en la expresión de ECA2	(Shin et al., 2017)

2. Sulfuro de hidrógeno

2.1. Generalidades

El H₂S es un gasotransmisor incoloro, inflamable y con un olor particular a huevo podrido (Szabo, 2012). En la tabla 3 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del H₂S (Filipovic et al., 2018). Se considera al H₂S como un gasotransmisor porque cumple los siguientes criterios (Wang, 2014):

- ❖ Es una molécula pequeña de gas.

- ❖ Es permeable a las membranas celulares.
- ❖ En células puede ser generado endógenamente durante situaciones fisiológicas y patológicas.
- ❖ Tiene funciones determinadas a concentraciones fisiológicas, por lo cual, se pueden observar efectos en diferentes sistemas.
- ❖ Está implicado en la transducción de señales debido a que presenta sitios de acción específicos.
- ❖ La administración de donadores de H₂S ha sido utilizada para estudiar su función y se ha observado que estos donadores inducen respuestas que son semejantes a los que produce el H₂S endógenamente.

Debido a estas características, es considerado como el tercer gasotransmisor, junto al NO y al monóxido de carbono (CO) (Vandiver & Snyder, 2012).

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas y termodinámicas del H₂S.

Propiedades fisicoquímicas y termodinámicas básicas del H₂S	
Temperatura de ebullición	-60 °C
Solubilidad en H₂O	110 Mm/atm, 25 °C
	210 Mm/atm, 0 °C
Densidad (25°C, 1 atm)	1.36 kg/m ³
Dosis letal	>500 ppm

Los estudios sobre el H₂S inician en el año 1713, cuando se describieron sus efectos toxicológicos por el médico Bernardino Ramazzini en su libro “Enfermedades de los Trabajadores” (*De Morbis Artificum Diatriba*). El médico describió que la enfermedad que presentaban los trabajadores del alcantarillado se caracterizaba por inflamación de los ojos, infección y ceguera, estas características se asociaron con el “gas” que se encontraba en las alcantarillas (Felton, 1997). En el año 1770 en París, se empezaron a presentar casos de inflamación de mucosas y asfixias que eran similares a lo descrito por el médico Bernardino. Posteriormente en 1775 se realizó un experimento en el que se combinó sulfuro ferroso (pirita) con ácido mineral, generando el H₂S (Nicholls & Kim, 1981). Sin embargo, no fue hasta el año 1806 cuando se confirmó que este era el gas que se encontraba en el alcantarillado. A partir de estos estudios se empezó a considerar al H₂S como un gas tóxico y los

estudios siempre estuvieron basados en la toxicología (Beauchamp et al., 1984; Szabo, 2018). Dentro de los estudios toxicológicos, se encontraron concentraciones importantes de H₂S en cerebro de seres humanos (Goodwin et al., 1989) y de animales (Warenycia et al., 1989).

En 1996 se expuso al H₂S como un gas presente en funciones fisiológicas del organismo. Efectivamente, Abe y Kimura reportaron los efectos electrofisiológicos del H₂S sobre la neurotransmisión glutamatérgica en hipocampo. Asimismo, encontraron la expresión de la enzima cistationina-β-sintetasa (CBS) en tejido cerebral (Abe & Kimura, 1996). Una vez que se encontró la expresión de esta enzima en tejido cerebral, se decidió continuar investigando otras enzimas que pudieran producir H₂S y se encontró que la enzima cistationina—γ-liasa (CSE) era la encargada de producir H₂S en algunos órganos como hígado, riñón, aorta e ileón de cobayo y que además esa enzima podía producir efectos relajantes (Dombkowski et al., 2004; Finkelstein, 1990; Ishii et al., 2004). Finalmente se encontraron las enzimas 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa (3-MST) y cistationina-amino transferasa (CAT) en homogenados de cerebro de ratones que presentaban una delección para la enzima CBS. Por lo tanto, estas dos enzimas también son responsables de la producción de H₂S y actualmente son también estudiadas (Cooper, 1983; Shibuya et al., 2009; Taniguchi & Kimura, 1974).

2.2. Síntesis

El H₂S es sintetizado a partir del aminoácido L-Cisteína de manera endógena y enzimática por medio de 3 enzimas: 1) CSE, 2) CBS y 3) 3-MST en conjunto con CAT (Fig. 3) (Zaorska et al., 2020). Se ha descrito, que las enzimas CBS y CSE necesitan de fosfato de piridoxal-5' (PLP). Con respecto a su expresión, CBS se expresa especialmente en sistema nervioso central, pero también se ha encontrado en hígado y riñón, mientras que la enzima CSE se ha reportado que se expresa importantemente en el sistema cardiovascular, aorta torácica, arterias como la mesentérica y pulmonar, vena porta (Bucci et al., 2012). Aunque también se ha llegado a describir en órganos como el hígado, riñón, intestino delgado y páncreas (Kimura, 2014). Por otro lado, la enzima 3-MST es regulada por calcio y puede

inhibirse por aspartato. Con respecto a su expresión, ésta se encuentra en el epitelio tubular proximal del riñón, hepatocitos, células cardíacas y neurogliales (Huang & Moore, 2015).

Otra vía por la cual se puede producir H_2S es la vía no enzimática (Fig. 3), la cual puede presentarse por diferentes mecanismos: 1) la reducción química del azufre de sulfatos (Cao et al., 2019), 2) a partir de la microbiota, debido a que ciertas bacterias utilizan los polisulfuros orgánicos como el ajo y la cebolla para la liberación de H_2S (Wallace et al., 2018) y 3) a partir de los eritrocitos, los cuales pueden convertir el azufre en iones sulfhidrilo, HS^- (Yang et al., 2019).

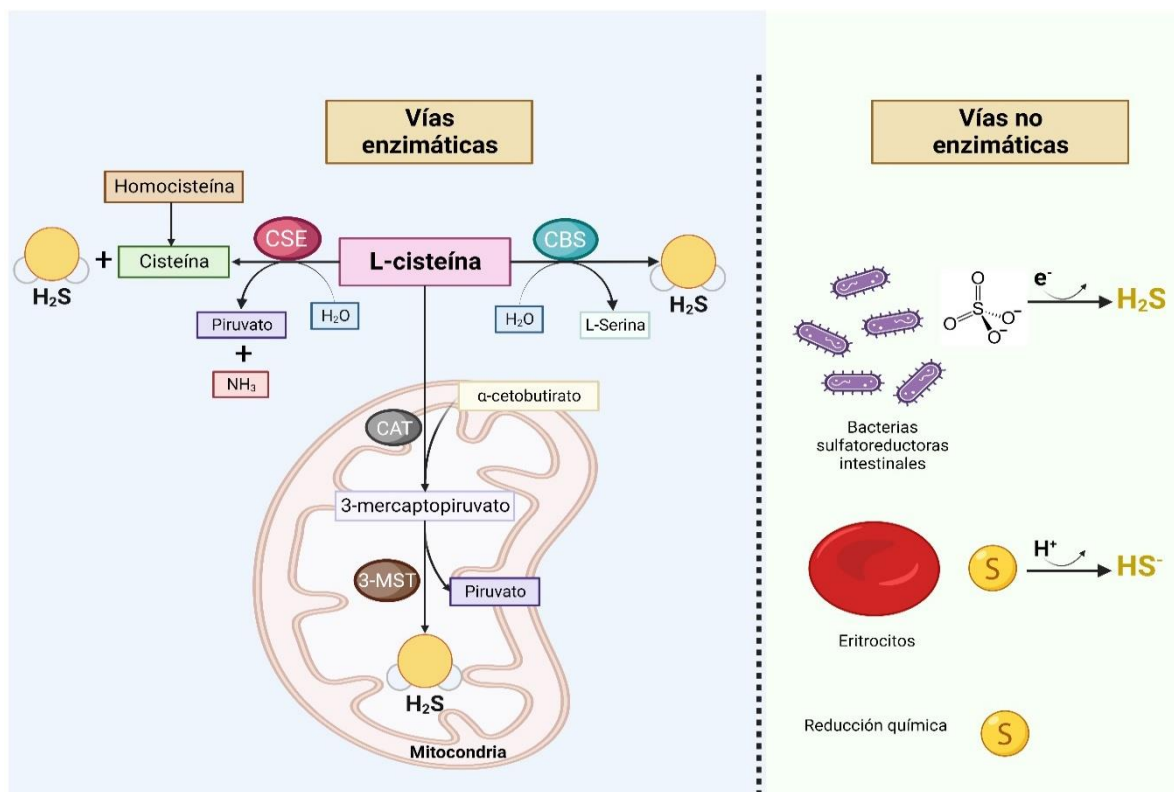


Fig. 3. Síntesis del H_2S . El H_2S puede producirse a través de dos vías: la enzimática y la no enzimática. Cuando se produce por vía enzimática, su precursor es el aminoácido L-cisteína sobre el cual actúan diferentes enzimas como la CBS, la CSE y la 3-MST junto con CAT. Por otro lado, en la vía no enzimática el H_2S se produce a través de: 1) bacterias sulfatoreductoras; 2) eritrocitos que convierten el azufre en HS^- ; y 3) reacciones químicas del azufre. Sulfuro de hidrógeno (H_2S); Cistationina—γ-liasa, (CSE); cistationina-β-sintetasa, (CBS); 3-mercaptopiruvato sulfurtransferasa, (3-MST); cistationina-amino transferasa, (CAT). Figura modificada de (Huerta de la Cruz et al., 2023). Figura creada con Biorender.com

2.3. Persulfuración de proteínas

Se ha descrito que el H₂S puede ejercer sus efectos a través de un mecanismo conocido como persulfuración. La persulfuración es una modificación postraducciona de las proteínas sobre los residuos de cisteína oxidados (Filipovic et al., 2018). La persulfuración puede ocurrir de diferentes maneras como se muestra en la figura 4. Sin embargo, termodinámicamente, el H₂S no reacciona de manera directa con los grupos tioles de las proteínas (Fig. 4A). A diferencia de esto, el H₂S sí puede reaccionar con: los ácidos sulfónicos (Fig. 4B), cisteínas S-nitrosadas dando lugar a la formación de ácido tionitroso (HSNO) o nitroxilo (HNO) (Fig. 4C), con disulfuros de cisteína (Fig. 4D) y con persulfuros, los cuales realizan una reacción de desplazamiento (Fig. 4E) (Zhang et al., 2017). De esta manera, el grupo tiol de la cisteína debe estar oxidado para que se lleve a cabo la persulfuración de proteínas (Filipovic et al., 2018).

Recientemente se reportó la existencia de unas 1591 proteínas en las células endoteliales que sufren de persulfuración y a las cuales se les denominó sulfhidroma (Bibli et al., 2021).

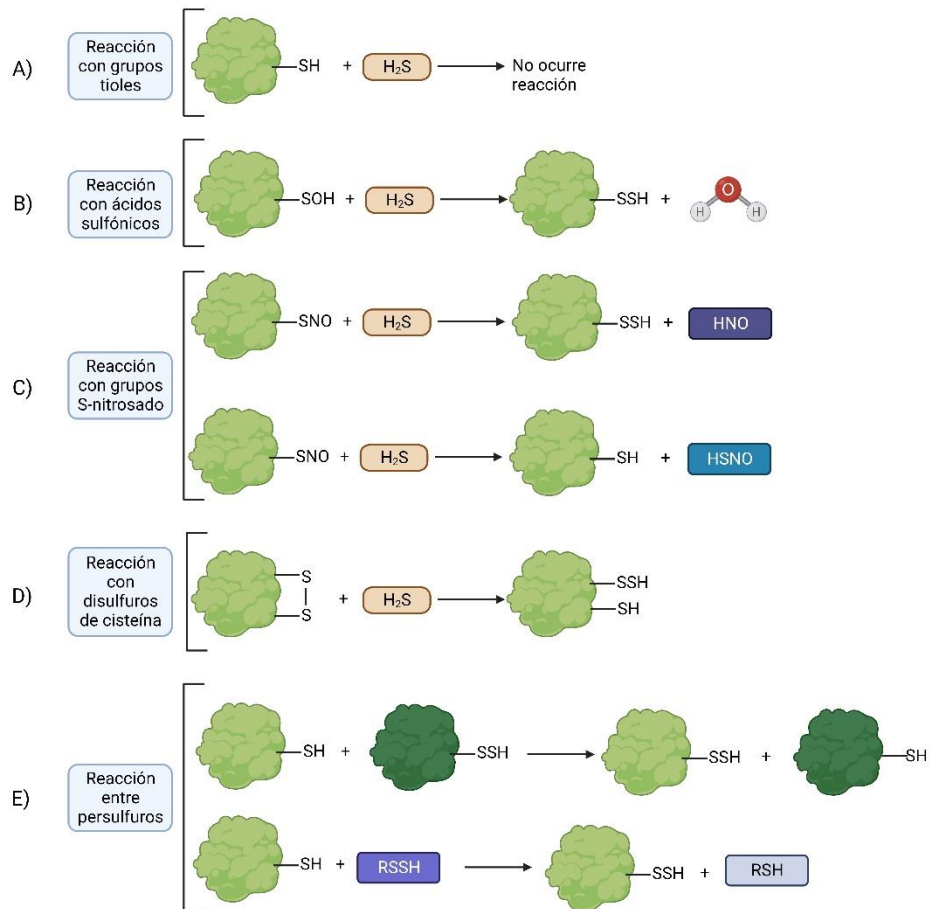
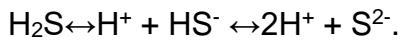


Fig. 4. Mecanismo de persulfuración del H₂S. La persulfuración es un mecanismo propuesto para explicar los efectos que ejerce el H₂S, esta reacción puede ocurrir entre: ausencia de grupos tioles (A), ácidos sulfónicos (B), grupos S-nitrosados (C), disulfuros de cisteína (D) y entre persulfuros (E). Figura modificada de (Zhang et al., 2017). Figura creada con Biorender.com.

2.4. Catabolismo

El tiempo de vida media del H₂S puede ser desde segundos a minutos. Cuando el H₂S se encuentra en solución acuosa, el 20% es H₂S no disociado, mientras que el 80% es el anión HS⁻. Para que esto suceda tiene que tenerse un pH de 7.4 y una temperatura de 37°C. El H₂S es un ácido débil que puede disociarse en H⁺ y HS⁻, esta reacción tiene un pK_{a1} de 7 a 37°C. A su vez el HS⁻ se disocia en H⁺ y S²⁻, este

proceso tiene un pK_{a2} de 17, lo cual se puede observar en la siguiente reacción (Wang, 2012):



El H_2S pasa por un proceso de catabolismo una vez que ejerce sus efectos fisiológicos y ya no es necesario para el organismo. Estos procesos de catabolismo se pueden dar por 3 vías (Fig. 5): 1) por oxidación mitocondrial, en la cual el H_2S es convertido a tiosulfato, consecutivamente este producto se transforma en sulfito y al final se forma sulfato (Mishanina et al., 2015), 2) por procesos de metilación citosólica, lo cual es realizado por la enzima S-metiltransferasa (TSM) que induce a la formación de dimetilsulfuro y 3) por la unión a hemoglobina, formándose un compuesto llamado sulfohemoglobina (Yu et al., 2014).

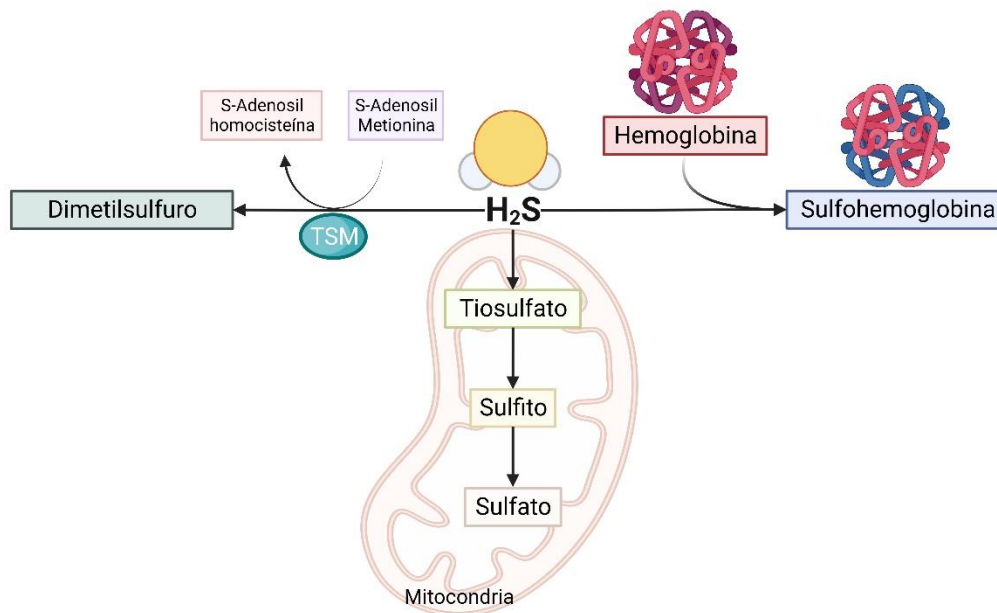


Fig. 5. Catabolismo del H_2S . El H_2S se metaboliza por tres vías: 1) por formación de sulfato; 2) por formación de dimetilsulfuro; y 3) por formación sulfohemoglobina. Sulfuro de hidrógeno, (H_2S); S-metiltransferasa (TSM). Figura modificada de (Huerta de la Cruz et al., 2023). Figura creada con Biorender.com

2.5. Donadores

Para el estudio de los efectos biológicos del H₂S se han empleado donadores de H₂S. Los donadores de H₂S son compuestos que liberan H₂S y se han estado utilizando en estudios de investigación en los cuales se ha demostrado sus efectos fisiológicos.

Los donadores de H₂S contienen principalmente dos grupos: 1) donadores inorgánicos, y 2) donadores orgánicos (Papapetropoulos et al., 2015). En el grupo de los donadores inorgánicos se encuentran las sales como el sulfhidrato de sodio (NaHS), el sulfuro de sodio (Na₂S) y el sulfuro de calcio (CaS), los cuales al estar en disolución acuosa provocan la liberación del H₂S. Una de sus ventajas es que el H₂S se produce rápidamente y no hay formación de otros productos que puedan interferir, por lo que estas sales son de las más utilizadas en la investigación. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran: 1) dificultad para determinar la concentración exacta de H₂S que hay en disolución y 2) la volatilidad al estar preparado por lo que se debe usar de manera inmediata (Yang et al., 2022).

Por otro lado, el grupo de donadores orgánicos puede ser dividido en compuestos de origen natural y compuestos de origen sintético (Papapetropoulos et al., 2015). Algunos compuestos naturales que liberan H₂S son el ajo y la cebolla debido a que contienen alicina que al entrar en procesos de digestión la alicina se descompone en dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS) y dialil trisulfuro (DATS), los cuales son los responsables de la liberación de H₂S. Una de las grandes desventajas de estos donadores es la formación de otros productos, es decir, al estar en disolución acuosa no se produce únicamente H₂S, lo cual hace muy difícil saber si los efectos observados son debidos a H₂S u otros compuestos (Abe et al., 2020).

Los donadores orgánicos sintéticos incluyen: 1) generadores espontáneos como el reactivo de Lawesson, 2) GYY4137 y otros derivados del fosfoinodiotiato, 3) donadores híbridos NO/H₂S y 4) polímeros y formulaciones farmacéuticas especiales (geles) (Szabo & Papapetropoulos, 2017).

El GYY4137 es un donador de H₂S utilizado en la investigación, pero a diferencia de las sales este compuesto puede liberar H₂S por más tiempo (horas), es decir, los procesos de hidrólisis del H₂S se dan de manera lenta (L. Li et al., 2008; Martelli et

al., 2014). Este compuesto ha sido empleado en algunos modelos de enfermedades cardiovasculares, por ejemplo, en un modelo de isquemia-reperfusión. De manera interesante, se observó que el GYY4137 disminuyó los infartos, la apoptosis y el estrés oxidante (Qiu et al., 2018), y se han evaluado sus efectos sobre la aterosclerosis (Liu et al., 2013), fibrosis miocárdica (Meng et al., 2015), entre otros. Un donador producido por la modificación de GYY4137 es el donador JK. Para que este donador pueda liberar H₂S tiene que realizar una ciclación intracelular la cual depende del pH. La liberación es mayor cuando se encuentra en un medio ácido, mientras que en medios con condiciones neutras la liberación será lenta o similar a GYY4137 (Kang et al., 2016).

Finalmente, el SG-1002 es un profármaco sintético que libera H₂S y se ha estudiado en enfermedades como la insuficiencia cardíaca congestiva mostrando efectos benéficos (Polhemus et al., 2015).

2.6. Efectos fisiológicos del H₂S sobre el sistema cardiovascular

El H₂S tiene funciones muy importantes en diferentes sistemas, pero uno de los sistemas más estudiados es el sistema cardiovascular (Zhao et al., 2001). La regulación de la angiogénesis es un ejemplo de la influencia que tiene el H₂S en el sistema cardiovascular (Papapetropoulos et al., 2009). Así, se ha reportado que la inhibición de CSE puede atenuar los procesos de proliferación y migración de las células endoteliales (Coletta et al., 2012).

Con respecto a la relación que existe entre el H₂S y algunas enfermedades del sistema cardiovascular, muchos estudios han descrito una disminución de los niveles de H₂S en modelos animales de aterosclerosis (Zhang et al., 2020). Además, en pacientes con enfermedad arterial coronaria se han encontrado niveles bajos de H₂S y niveles altos de cistationina, la cual indica que la actividad de CSE es baja (Dhar et al., 2018). En el corazón aislado de rata, el NaHS produce respuestas cronotrópicas e inotrópicas negativas (Geng et al., 2013).

Al H₂S se le ha considerado como un factor relajante (Yang et al., 2008), debido a que puede disminuir la presión arterial (efectos antihipertensivos) y relajar vasos sanguíneos como la aorta a través de la apertura de los canales de potasio

dependientes de ATP (K^+_{ATP}) (Sitdikova et al., 2011), los canales de conductancia intermedia (IKCa) (Centeno et al., 2019) y canales de potasio de conductancia baja (SKCa) (Mustafa et al., 2011), así como la supresión de la inflamación vascular o la liberación de renina (Kohn et al., 2012). Estudios más recientes han intentado demostrar los efectos del H_2S en el sistema linfático, encontrando que, en vasos linfáticos de bovinos y toros, el NaHS indujo relajación la cual era inhibida cuando se eliminó el endotelio. Los autores reportan que el efecto observado en respuesta al NaHS involucra vías que activan a la enzima eNOS y los canales de K^+_{ATP} (Lobov, 2020a, 2020b).

2.7. Efectos del H_2S en modelos de RI e hiperglucemia

El primer estímulo para que las células β del páncreas secreten insulina es el incremento de glucosa extracelular. En condiciones fisiológicas normales, está glucosa extracelular será transportada dentro de las células β a través de los glucotransportadores o transportadores de glucosa (GLUT). Una vez dentro se desencadenan mecanismos relacionados con el incremento en los niveles de adenosín trifosfato (ATP), lo cual resultará en la inhibición de los canales de K^+_{ATP} . Esta inhibición induce una despolarización de la membrana lo cual a su vez activa a los canales de calcio dependientes de voltaje (L-VDCC) generando la entrada de calcio a la célula y finalmente la liberación de insulina almacenada en vesículas (Beltowski et al., 2018).

De acuerdo con la literatura, se cree que el H_2S podría estar involucrado en la regulación de la liberación de insulina en las células β a través de los canales de K^+_{ATP} , aunque el mecanismo no es completamente claro. Se ha sugerido que el H_2S podría estar inhibiendo estos canales a través de los procesos de S-sulfhidración lo cual generaría el cierre de los L-VDCC y la disminución en la liberación de insulina (Fig. 6) (Beltowski et al., 2018).

En ratas Sprague-Dawley con RI inducida por el consumo de fructosa 10% durante 12 semanas, se presentó un incremento en los niveles de H_2S en el tejido adiposo de los animales control y un decremento de estos niveles en los animales con RI. Adicional a estos resultados, se ha reportado que el H_2S disminuyó la RI e

incrementó los niveles de fosforilación de proteínas implicadas en la señalización de esta hormona en un modelo celular de RI inducido por ácido palmítico (Chen et al., 2017). En este sentido, se consideró estudiar la relación entre el H₂S y la insulina, así como su influencia en modelos con características similares a la diabetes. Al respecto, en ratones macho C57BL6/J con diabetes inducida por STZ (60 mg/kg/día durante 2 semanas), la administración de sulfhidrato de sodio (NaHS 100 μM/kg/día), durante 4 semanas, demostró que revierte la disfunción vascular inducida por la diabetes (Ng et al., 2017). Además, Okamoto et al. (2013) expusieron en su trabajo que, en ratones CSE-KO alimentados con dieta rica en grasa durante 8 semanas, los niveles de glucosa en sangre incrementaron y los niveles de insulina se redujeron. Asimismo, cuando los animales fueron tratados con NaHS, los valores de glucosa e insulina fueron distintos a los que se presentaron previo al tratamiento. Por lo que, estos datos sugieren posibles aplicaciones del NaHS sobre el incremento en los niveles de glucosa lo cual podría favorecer el desarrollo de DMT2 (Okamoto et al., 2013).

En el trabajo realizado en la tesis de maestría (Silva-Velasco, 2019), se observó que la RI inducida por fructosa (15%) generó hipertensión arterial y disminución en las respuestas relajantes inducidas por carbacol (CCh). De manera interesante, la hipertensión arterial y la disminución en las respuestas relajantes fueron disminuidas por el tratamiento crónico con NaHS. Sin embargo, las respuestas contráctiles inducidas por noradrenalina no fueron modificadas. Este último hallazgo, sugiere que probablemente otros mecanismos como el SRA estén involucrados.

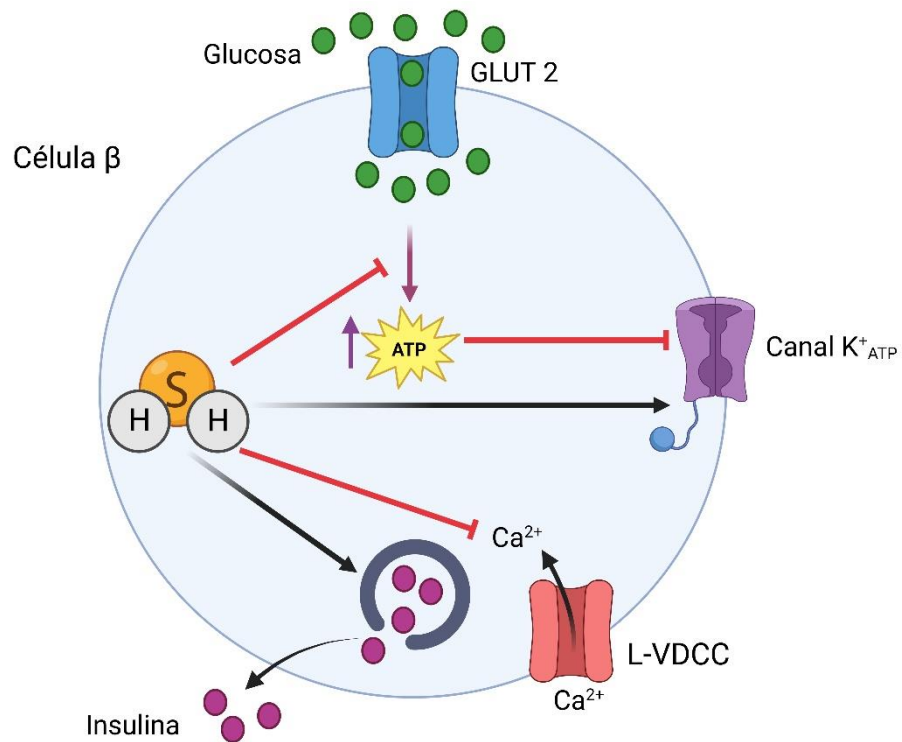


Fig. 6. Regulación de la liberación de la insulina mediada por H₂S. Se ha descrito que el H₂S puede regular la liberación de insulina a través de la apertura de los canales K^{ATP}, lo cual hace que los canales L-VDCC se cierren y ocurra una disminución en los niveles de insulina extracelular. Glucotransportador tipo 2, (GLUT 2); canal de potasio dependiente de ATP, (K^{ATP}); canales de calcio dependientes de voltaje, (L-VDCC); calcio (Ca²⁺); adenosín trifosfato, (ATP). Las flechas negras indican la realización del mecanismo, mientras que las flechas rojas indican su inhibición. Figura modificada de (Beltowski et al., 2018). Figura creada con Biorender.com.

2.8. Relación entre el H₂S y la Ang II/Ang-(1-7)

La información sobre la relación que tiene el H₂S con la Ang II y la Ang-(1-7) es escasa. Sin embargo, hay algunos reportes que demuestran la influencia del H₂S sobre las respuestas ejercidas por Ang II y Ang-(1-7). En ratones C57B16/J machos, que recibieron durante 2 semanas una infusión de Ang II (0.7 mg/kg/día) por medio de una bomba osmótica implantada subcutáneamente, se presentó un incremento en la presión arterial sistólica y una disminución en las respuestas relajantes inducidas por ACh cuando se comparó contra un grupo control. De manera

interesante, en los animales que recibieron NaHS se revirtieron los efectos generados por Ang II (Al-Magableh et al., 2015). Además, se ha reportado que en un modelo de ratas con hipertensión renovascular, los cambios generados por la Ang II tales como la producción de ROS, el incremento en la presión arterial sistólica y el incremento en la expresión de los receptores AT₁ fueron revertidos por la administración de NaHS (56 micromol/kg/día), lo cual indicaría la participación del H₂S sobre la Ang II e incluso sobre los receptores de este péptido (Xue et al., 2015). Contrario a estos efectos inhibitorios del NaHS sobre la acción de la Ang II, se ha descrito que la administración de este donador puede inducir un incremento en la expresión de ECA2 y en la producción de Ang-(1-7) en arterias carótidas de ratones con aterosclerosis (Lin et al., 2017). Sin embargo, aún no se ha estudiado a fondo si el H₂S puede alterar las respuestas relajantes a la Ang-(1-7) o las respuestas contráctiles a la Ang II.

Tabla 4. Estudios que muestran la relación del H₂S y Ang-(1-7) /Ang II

Modelo	Dosis de donador de sulfuro	Efecto	Referencias
Ratones macho con hipertensión y estrés oxidante inducido por Ang II (0.7 mg/kg/día por 2 semanas)	NaHS 10 µM/kg/día	Reduce presión arterial, estrés oxidante, daño endotelial y protege biodisponibilidad de óxido nítrico	(Al-Magableh et al., 2015)
Ratones macho con aterosclerosis inducida por ligadura parcial y dieta rica en grasas	NaHS 1 mg/kg/día	Incremento en la expresión de ECA2 y Ang-(1-7) en arteria carótida	(Lin et al., 2017)

3. JUSTIFICACIÓN

Cuando la resistencia a la insulina no es controlada puede evolucionar a diabetes mellitus tipo 2, la cual es una enfermedad metabólica que representa un serio problema de salud pública a nivel mundial. La angiotensina-(1-7), así como la angiotensina II, están involucradas en patologías cardiovasculares (hipertensión arterial, aterosclerosis, etc.) y metabólicas (resistencia a la insulina, síndrome metabólico, diabetes, etc.).

Estudios recientes han atribuido al sulfuro de hidrógeno efectos cardiovasculares. Sin embargo, no existe evidencia del papel que ese gas tiene sobre los efectos de angiotensina-(1-7) y angiotensina II en modelos de resistencia a la insulina e hiperglucemia. Por lo que, indagar en la relación de estas moléculas podría proporcionar nuevos blancos terapéuticos para enfermedades metabólicas principalmente.

4. HIPÓTESIS

La administración crónica de NaHS disminuirá la disfunción vascular de tal manera que inhibirá:

- 1) La disminución en las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) y el incremento en las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en el modelo de RI y en el modelo de HG.
- 2) La disminución en la expresión de ECA2 y receptores AT₂ y Mas en el modelo de RI y en el modelo de HG.
- 3) El incremento en la expresión de ECA y el receptor AT₁ en el modelo de RI y en el modelo de HG.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar los efectos de la administración crónica de NaHS sobre las respuestas vasculares generadas por angiotensina-(1-7) y angiotensina II, así como la expresión de ECA, ECA2 y de los receptores AT₁, AT₂ y Mas durante la RI y la HG.

5.2. Objetivos específicos

5.2.1. Determinar en la aorta torácica de ratas control, ratas con RI inducida por fructosa (15% p/v) y en ratas con HG inducida por STZ:

- Las respuestas vasculares generadas por concentraciones acumulativas de angiotensina-(1-7) y angiotensina II.
- Los niveles de angiotensina-(1-7) y angiotensina II en muestras de suero.
- La expresión de receptores AT₁, AT₂ y Mas y enzimas ECA y ECA2.

5.2.2. Determinar en aorta torácica de ratas con RI inducida por fructosa (15% p/v) y en ratas con HG inducida por STZ el efecto de la administración crónica de vehículo (PBS), NaHS y DL-PPG sobre:

- Las respuestas vasculares generadas por concentraciones acumulativas de angiotensina-(1-7) y angiotensina II.
- Los niveles de angiotensina-(1-7) y angiotensina II en muestras de suero.
- La expresión de receptores AT₁, AT₂ y Mas y enzimas ECA y ECA2.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales

Para el modelo de resistencia a la insulina se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar (7 semanas de edad) y para el modelo de hiperglucemia se utilizaron 60 ratas macho de la cepa Wistar en etapa neonatal (3-4 días de nacidas). Las ratas de ambos modelos experimentales se mantuvieron en jaulas de plástico, dentro de un cuarto bajo condiciones de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (50%) ya estandarizadas. Además, se les reguló el ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h y fueron provistas de comida (LabDiet 5010) y agua *ad libitum*. Los neonatos se mantuvieron con la madre hasta los 21 días y después de este tiempo se realizó el destete.

El protocolo realizado en este proyecto siguió lo establecido por la Norma Oficial Mexicana para el Uso y Bienestar de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), en congruencia con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de Estados Unidos de América y con el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (National Research Council Committee for the Update of the Guide for the & Use of Laboratory, 2011). Este trabajo fue financiado por Conacyt México (No. 252702).

6.2. Inducción del modelo de resistencia a la insulina por consumo de fructosa (15% p/v) y administración crónica de tratamientos farmacológicos

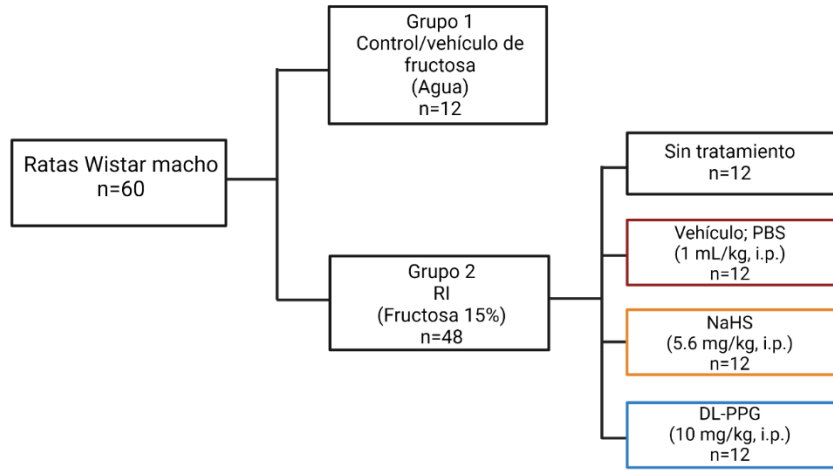
Los animales fueron seleccionados aleatoriamente y se dividieron en dos grupos. El grupo 1 se utilizó como control (n=12) y recibió una dieta regular (alimento LabDiet 5010) y agua del grifo a voluntad, durante 20 semanas. El grupo 2 (n=48) fue alimentado con alimento regular (alimento LabDiet 5010) y con una solución de fructosa 15% p/v durante 20 semanas (Fig. 7A).

En la semana 16, el grupo tratado con fructosa 15% p/v se subdividió en 4 subgrupos (n=12 cada uno) a los cuales se les administró todos los días, durante 4 semanas, por vía intraperitoneal (i.p.) los siguientes compuestos: 1) sin tratamiento (grupo control de fructosa), 2) vehículo (PBS 1 mL/kg), 3) NaHS (5.6 mg/kg) o 4) DL-PPG (10 mg/kg) (Fig. 7A y 7B). Las dosis de NaHS y DL-PPG empleadas en

este trabajo han mostrado efectos benéficos en el sistema cardiovascular en diferentes modelos experimentales (Al-Magableh et al., 2015; Gomez et al., 2019; Huerta de la Cruz et al., 2022).

Este modelo fue previamente estandarizado en el laboratorio, por lo que la determinación de las variables metabólicas (niveles de glucosa e insulina en suero, índice HOMA y Matsuda-DeFronzo) únicamente se realizaron en el grupo control sin fructosa y en el grupo control con fructosa a las 16 semanas con la finalidad de comprobar la existencia de resistencia a la insulina y poder iniciar con los tratamientos farmacológicos en ese tiempo.

A) Diseño experimental



B) Curso temporal modelo Resistencia a la insulina

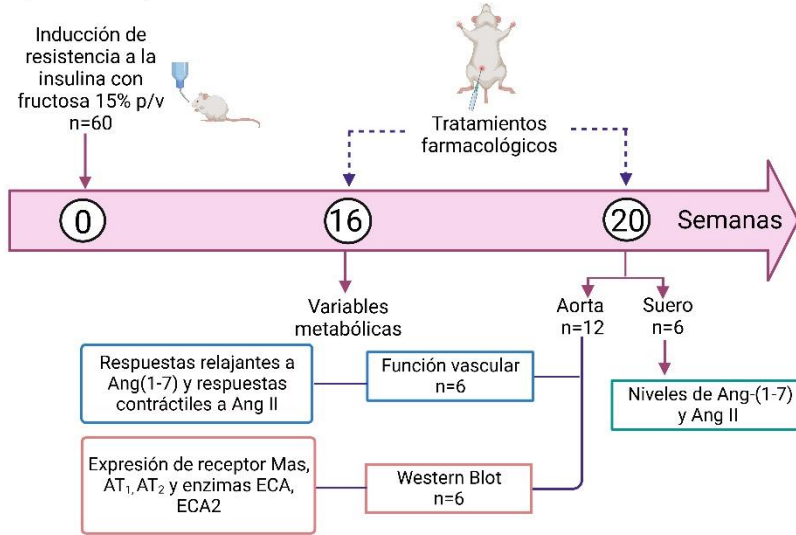


Fig. 7. (A) Diseño experimental y (B) Curso temporal del modelo de resistencia a la insulina.

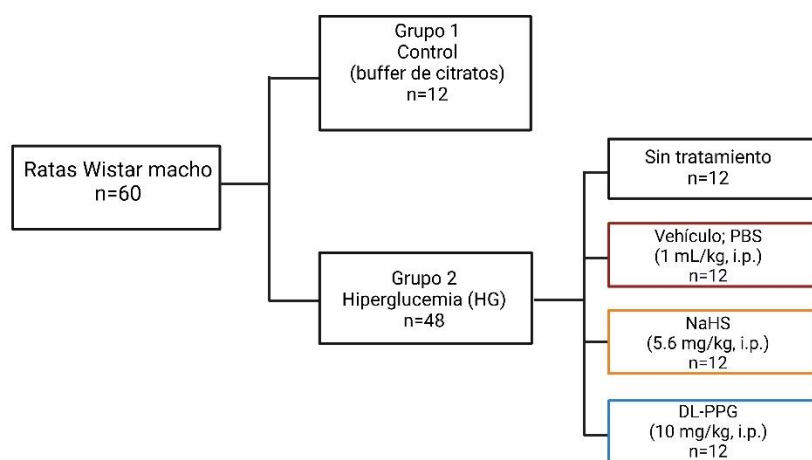
Los animales consumieron fructosa 15% p/v en el agua de beber durante 16 semanas, posterior a este tiempo se determinaron las variables metabólicas y los animales se dividieron en diferentes grupos para la administración de los tratamientos farmacológicos durante 4 semanas. Al término de los tratamientos farmacológicos, los animales fueron sacrificados y los niveles de angiotensinas fueron determinados en muestras de suero. Además, se obtuvo la aorta torácica para determinar la función vascular y la expresión de proteínas. Buffer de fosfatos salino (PBS, 1 mL/kg, i.p.); sulfhidrato de sodio (NaHS, 5.6 mg/kg, i.p.); DL-propargilglicina (DL-PPG 10 mg/kg, i.p.); resistencia a la insulina, (RI); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II); prueba de tolerancia a la glucosa oral, (PTGO); enzima convertidora de angiotensina, ECA; enzima convertidora de angiotensina tipo 2, (ECA2).

6.3. Inducción de hiperglucemia por STZ y administración crónica de tratamientos farmacológicos

Se utilizaron ratas neonatas machos de la cepa Wistar (3-4 días) y se dividieron en dos grupos. El grupo 1 fue utilizado como control (n=12) y recibió una dosis única de buffer de citratos (vehículo de STZ; 0.1M, pH=4.5). Al grupo 2 (n=48) se le administró una dosis única de STZ (70 mg/kg) [grupo de hiperglucemia, (grupo HG)], ambos tratamientos por vía i.p. Los 2 grupos fueron alimentados con alimento regular (LabDiet 5010) y agua del grifo, durante 12 semanas (Fig. 8A).

En la semana 12, el grupo 2 (grupo HG) se subdividió en 4 subgrupos (n=12 cada uno) a los cuales se les administró todos los días durante 4 semanas por vía i.p. los siguientes compuestos: 1) sin tratamiento (grupo control de diabetes); 2) vehículo (PBS 1mL/kg); 3) NaHS (5.6 mg/kg) o 4) DL-PPG (10 mg/kg) (Fig. 8A y 8B).

A) Diseño experimental



B) Curso temporal modelo de hiperglucemia

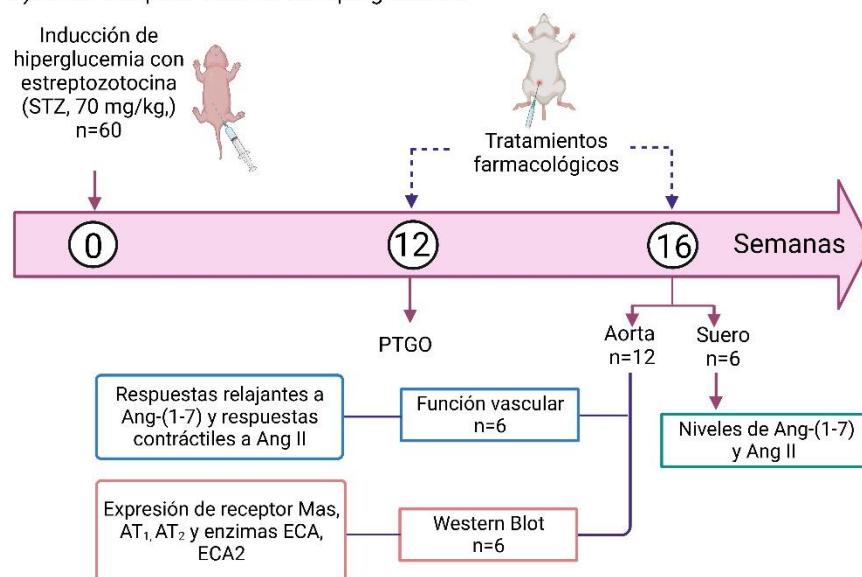


Fig. 8. (A) Diseño experimental y B) Curso temporal del modelo de hiperglucemia. Los neonatos recibieron una dosis única de STZ, 70 mg/kg, i.p., al tercer o cuarto día de nacidos. Después de 12 semanas se realizó una PTGO y se inició la administración de los tratamientos farmacológicos durante 4 semanas. Al término de los tratamientos farmacológicos, los animales fueron sacrificados y los niveles de angiotensinas fueron determinados en muestras de suero. Además, se obtuvo la aorta torácica para determinar la función vascular y la expresión de proteínas. Buffer de fosfatos salino (PBS, 1 mL/kg, i.p.); sulfhidrato de sodio (NaHS, 5.6 mg/kg, i.p.); DL-propargilglicina (DL-PPG 10 mg/kg, i.p.); hiperglucemia, (HG); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II); prueba de tolerancia a la glucosa oral, (PTGO); enzima convertidora de angiotensina, (ECA); enzima convertidora de angiotensina tipo 2, (ECA2).

6.4. Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)

Para la prueba de tolerancia a la glucosa oral, los animales tuvieron un ayuno de 12 horas. Posterior a este tiempo, se determinaron los valores de glucosa por medio de un glucómetro y tiras reactivas a glucosa (AccuCheck®, Roche de México) al minuto 0 (antes de la administración de glucosa) y a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa (2 g/kg/vía oral). Esta determinación se realizó a las 16 semanas en el grupo control (vehículo de fructosa) y en el grupo RI y a las 12 semanas en el grupo control (buffer de citratos) y en el grupo de HG. En el modelo de HG, se consideró que las ratas eran hiperglucémicas cuando los valores fueron mayores de 250 mg/dL (Hernandez-Munive et al., 2019) después de 30 o 60 minutos de la administración de glucosa.

6.5. Evaluación de la función vascular en la aorta torácica de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina e hiperglucemia

Después de 20 semanas (modelo de RI inducido por fructosa 15% p/v) y 16 semanas (modelo de HG inducido por STZ 70 mg/kg), las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (3%) y sacrificadas por decapitación (Fig. 7B y 8B). Posteriormente, se realizó una extracción de la aorta torácica y se retiró el tejido adiposo. Una vez que la aorta estaba limpia, se cortaron anillos con una longitud de aproximadamente 3 mm cada uno. Los anillos se montaron en cámaras para órgano aislado que contienen una solución de Krebs-Ringer con la siguiente composición (mM): NaCl 119.5, dextrosa 12, NaHCO₃ 24.9, KCl 4.74, MgSO₄ 7H₂O 1.18, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂ 2H₂O 2.5 y EDTA 0.026. Los anillos de la aorta torácica fueron colocados entre dos ganchos de Nikrom, uno de ellos se instaló en el fondo de la cámara y el otro fue puesto sobre el transductor de tensión (Grass, modelo FTO3, Grass Inst., USA), esto nos permitió conocer los cambios en la tensión de los anillos a través del sistema de adquisición de datos (Biopac Systems, Inc. Modelo MP 100). Previo a iniciar con el protocolo experimental, fue necesario mantener a los anillos con una temperatura de 37°C, cuidar que el pH de la solución de Krebs-Ringer fuera de 7.4 y mantener un burbujeo constante de 95% O₂ y 5% CO₂.

Cuando se tuvieron las condiciones óptimas para iniciar con el experimento, los anillos fueron estabilizados durante 30 minutos con una tensión de 2.5 g. Después,

para conocer que la estabilización era correcta y que los anillos iban a responder, se estimularon con noradrenalina (NA) (1×10^{-7} M). Cuando se obtuvo la respuesta deseada, se realizaron lavados. Posteriormente, se realizó una segunda curva con NA (1×10^{-7} M), cuando se presentó el efecto máximo los anillos fueron estimulados con ACh (1×10^{-5} M) durante 5 minutos, lo cual también permitió conocer si los anillos tenían endotelio. La tercera estimulación se realizó con KCl 80 mM. Para determinar la relajación de los anillos, se realizó una curva concentración-respuesta a Ang-(1-7) con incrementos de medios logaritmos (1×10^{-9} M a 1×10^{-6} M), estas concentraciones se colocaron de forma acumulativa, es decir, se inició la estimulación con la menor concentración hasta llegar a la mayor concentración. Después de esta curva se hizo un lavado y una vez que la respuesta regresó a su estado basal se evaluó la contracción de los anillos. Las respuestas contráctiles fueron evaluadas con una curva concentración-respuesta a Ang II, de la misma manera que la curva anterior; las concentraciones fueron colocadas de manera acumulativa iniciando de la menor a la mayor concentración (1×10^{-9} M a 1×10^{-6} M) (Fig. 9).

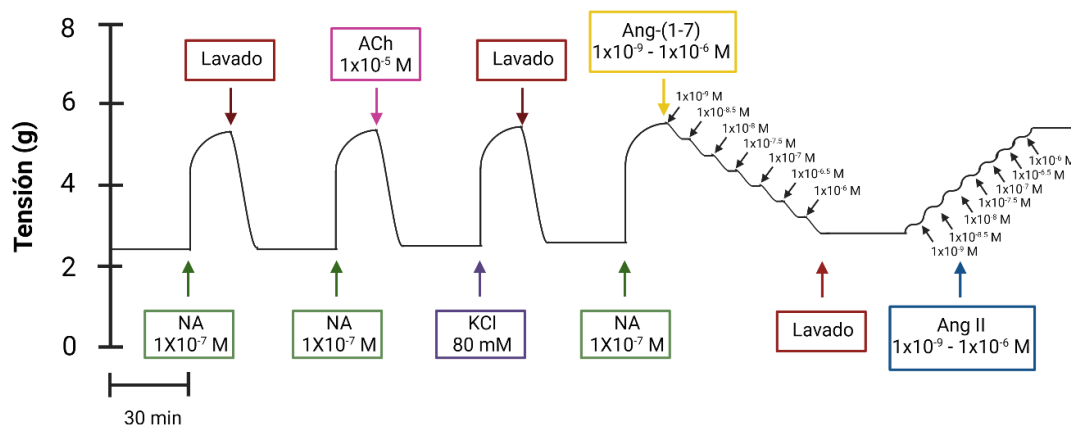


Fig. 9. Protocolo experimental para evaluar la función vascular. Este experimento se realizó con las aortas torácicas de los animales del modelo de RI y del modelo de HG. La determinación de la relajación se realizó con una curva concentración-respuesta de Ang-(1-7) y la evaluación de la contracción se realizó con una curva concentración-respuesta de Ang II. Noradrenalina, (NA); acetilcolina (ACh); cloruro de potasio (KCl); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II).

6.6. Determinación de los niveles de angiotensina-(1-7) y angiotensina II

Después de 20 y 16 semanas de haber realizado la inducción de los modelos y de administrar los tratamientos farmacológicos, los niveles de Ang-(1-7) y Ang II fueron determinados por medio del método de electroforesis capilar en aortas de animales con RI o HG (Fig. 7B y 8B). Las muestras de suero (50 µL) fueron diluidas en metanol frío (1:10 v/v) y la mezcla obtenida fue centrifugada a 16,000 g/4°C durante 16 minutos. Al sobrenadante se le agregó ácido acético frío (20%), se homogenizó y se centrifugó a 16,000 g/4°C durante 16 minutos. El sobrenadante fue diluido (1:10 v/v) con hidróxido de sodio 0.1M. Finalmente, las muestras obtenidas de este procedimiento fueron filtradas a través de filtros de nitrocelulosa (0.45 µm) y analizados por electroforesis capilar (P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter, CA, USA). Las concentraciones fueron obtenidas interpolando los valores de las muestras con valores de curvas estándar de Ang-(1-7) y Ang II (ambas obtenidas de Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los datos son expresados como pmol/mL (Tenorio-Lopez et al., 2010).

6.7. Determinación de la expresión de receptores (AT₁, AT₂ y Mas) y enzimas (ECA y ECA2)

Al final del tiempo estipulado para inducir resistencia a insulina (20 semanas) e hiperglucemia (16 semanas), se determinó la expresión de los receptores (AT₁, AT₂ y Mas) y enzimas (ECA y ECA2) a través de la técnica de Western blot (Fig. 10).

1. Obtención de muestras. Posterior a los tratamientos farmacológicos con vehículo (PBS), NaHS o DL-PPG, los animales fueron sacrificados. Se realizó una incisión sobre el tórax de la rata con la finalidad de extraer la aorta torácica. La aorta se mantuvo en solución salina para limpiarla de sangre y tejido adiposo, una vez que la aorta estaba limpia, se colocó en un tubo eppendorf que se mantuvo a -70°C para después realizar la homogenización.
2. Homogenización. Las muestras fueron homogenizadas en 300 µL de buffer Complete (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 100-x 1%, deoxicolato de sodio 5% y SDS 0.1%) el cual contiene inhibidores de proteasas (Complete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail; Sigma-Aldrich; Cat. No. 4693159001) e inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP™; Sigma-Aldrich; Cat. No.

4906845001). En seguida, las muestras se homogenizaron con el polytron en el nivel máximo (30000 rpm) durante aproximadamente 30 segundos y se dejaron reposar en hielo 15 segundos. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se almacenó a -70 °C hasta que la cuantificación de proteínas totales fuera a ser realizada.

3. Cuantificación de proteínas. Fue realizada por medio del método de Lowry. Inicialmente se realizó una curva patrón utilizando albúmina (0.00, 0.01, 0.1, 0.2, 0.44, 0.8 y 1.0 mg/mL) como referencia. Las muestras se prepararon en una dilución 1:10 (5 µL de muestra y 45 µL de agua). En una placa, se colocaron en cada pozo 10 µL de muestra preparada anteriormente y 10 µL de cada una de las concentraciones de proteína que se prepararon para la curva. Posteriormente se colocaron los reactivos de la reacción Lowry.
4. Inmunoblot. Se colocó el volumen de muestra que contenía 30 µg de proteína en un gel desnaturizante SDS-PAGE al 10%. A continuación, se realizó la electroforesis a 50 volts y cuando las muestras alcanzaron el gel separador, el voltaje se cambió a 120 volts durante aproximadamente 1 hora y media o hasta obtener la separación deseada. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, 0.45 µm, Millipore, Billerica MA, USA) a 10 volts durante 60 minutos en una placa para transferencia semi-seca, posteriormente las membranas fueron bloqueadas con leche 5% (Bio-Rad, Hercules CA, USA) en TBS-Tween 0.2% con pH de 7.4 durante 60 minutos a temperatura ambiente.

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente, receptor AT₁ (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-515884), receptor AT₂ (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-9040) y receptor Mas (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-390453), ECA (1:500; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-23908) y ECA2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-390851). Al día siguiente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-mouse (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) durante 90

minutos a temperatura ambiente. Las membranas fueron re-incubadas con anticuerpo monoclonal β -actina (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-47778) con la finalidad de realizar la normalización de la expresión de las proteínas. La señal de los inmunoblots se detectó mediante quimioluminiscencia (ChemiDoc™ XRS+ *ImagingSystem*, Bio-Rad, CA). El análisis de las bandas se realizó por densitometría (ImageLab™, BioRad, CA, EUA) (Fig. 4).

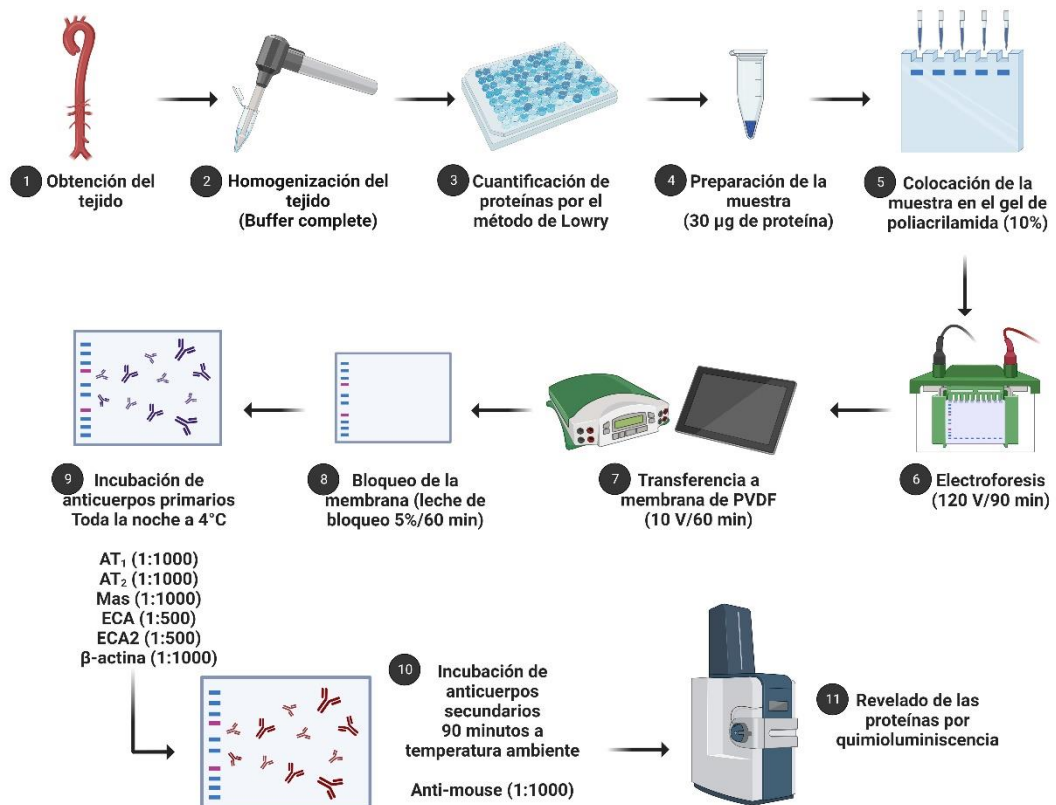


Fig. 10. Procedimiento experimental de la técnica de Western Blot. Se obtuvieron las aortas torácicas de los grupos experimentales y se homogeneizaron. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10%, después se realizó una electroforesis para separarlas con base en su peso molecular. El gel que contenía las muestras separadas fue transferido a una membrana de PVDF. La membrana fue bloqueada con leche al 5%. La membrana fue incubada toda la noche con los anticuerpos primarios correspondientes y al siguiente día fue incubada con su anticuerpo secundario. El revelado de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia y posteriormente por densitometría. Receptor de angiotensina II tipo 1, (AT₁); receptor de angiotensina II tipo 2, (AT₂); receptor Mas (Mas); enzima convertidora de angiotensina, (ECA); enzima convertidora de angiotensina tipo 2, (ECA2).

6.8. Fármacos

Los compuestos utilizados en el presente estudio fueron: sulfhidrato de sodio monohidratado (NaHS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.), DL-propargilglicina (DL-PPG) (PubChem CID: 95575), angiotensina-(1-7) (PubChem CID: 123805), angiotensina II (PubChem CID: 172198), (\pm)-bitartrato de noradrenalina (PubChem CID: 168929), acetilcolina (PubChem CID: 60311) y estreptozotocina (PubChem CID: 29327). La solución de Krebs-Ringer fue preparada con agua Milli-Q®. La noradrenalina, angiotensina-(1-7) y angiotensina II fueron disueltas en solución salina fisiológica. El NaHS y DL-PPG fueron disueltos en PBS, pH 7.4 a 25°C. Las soluciones de NaHS y DL-PPG, utilizadas como tratamiento, fueron preparadas diariamente.

6.9. Análisis estadístico

Todos los resultados de este trabajo se presentan como la media \pm error estándar de la media (e.e.m). El área bajo la curva (ABC) obtenida a partir de la PTGO de los niveles de glucosa e insulina, fue determinada por el método de los trapecios. El ABC de los grupos fue comparada contra el grupo control por medio de un ANOVA de una vía. Además, para las curvas concentración-respuesta de las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) y de las respuestas contráctiles inducidas por Ang II, se realizó una regresión no lineal de una curva logística de 4 parámetros de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

HillSlope: describe la pendiente de la curva

Top y bottom: mesetas en el eje Y

Esta regresión no lineal permitió determinar el logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pEC_{50}) y el efecto máximo ($E_{\text{máx}}$) de cada uno de los tratamientos.

Los niveles en suero de Ang-(1-7) y Ang II y la expresión de las proteínas en aorta fueron comparados entre los grupos y analizados con una prueba de ANOVA seguido de una prueba *post-hoc* de Tukey. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. Variables metabólicas

7.1.1. Efecto de la resistencia a la insulina e hiperglucemia sobre las variables metabólicas

La figura 11 muestra los cursos temporales y el ABC de los resultados obtenidos de los niveles de glucosa (Fig. 11A y 11C) e insulina (Fig. 11 B y 11D) durante la PTGO, determinados después de 16 semanas de consumo de fructosa 15% p/v (grupo RI). El consumo crónico de fructosa 15% p/v, durante 16 semanas no modificó significativamente ($t_{(10)}=1.664$; $p=0.135$) el ABC de los niveles de glucosa sanguínea obtenidos durante la PTGO cuando se comparó contra el grupo control (Fig. 11C). Por otro lado, el consumo de fructosa 15% p/v incrementó de forma significativa el ABC de insulina durante la PTGO cuando se comparó contra el grupo control ($t_{(10)}=4.349$; $p=0.002$, Fig. 11D). Estos resultados nos indican la existencia de hiperinsulinemia en el grupo que consumió fructosa 15% p/v (grupo RI) durante 16 semanas.

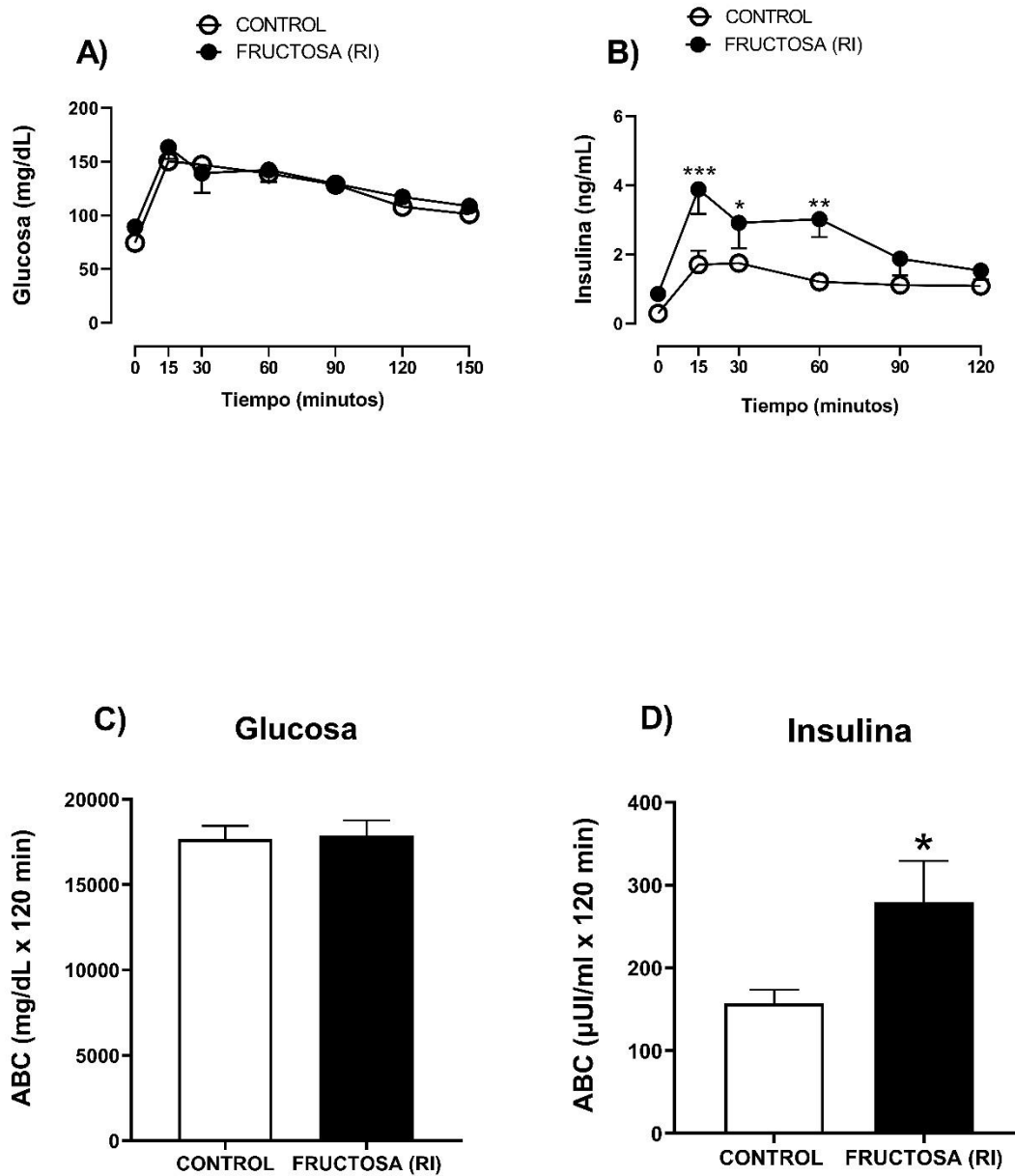


Fig. 11. Área bajo la curva de los valores de: (A) glucosa sanguínea y (B) insulina plasmática obtenida durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO). Cada barra representa la media \pm e.e.m de 5 animales. Resistencia a la insulina (RI). *, $p < 0.05$ vs control. Prueba de t, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.

En la tabla 5 se muestran los valores de glucosa e insulina basal y los índices HOMA y Matsuda-DeFronzo. El consumo de fructosa 15% p/v (grupo RI) durante 16

semanas: 1) no cambió los valores basales de glucosa ($t_{(10)}=0.547$; $p=0.6$), 2) incrementó significativamente los valores basales de insulina ($t_{(10)}=2.944$; $p=0.019$) y el índice HOMA ($t_{(10)}=2.954$; $p=0.018$) y 3) disminuyó de manera estadísticamente significativa el índice Matsuda-DeFronzo ($t_{(10)}=3.116$; $p=0.014$) cuando se comparó contra el grupo control.

Tabla 5. Efecto de la administración crónica de fructosa 15% p/v durante 16 semanas sobre los niveles de glucosa e insulina basales, así como el índice HOMA y Matsuda-DeFronzo en ratas Wistar macho.

	Glucosa (mg/dL)	Insulina (μUI/mL)	Índice HOMA	Índice Matsuda
Control	82.8 \pm 4.3	8.4 \pm 1.4	1.7 \pm 0.3	3.4 \pm 0.5
Fructosa 15% (grupo RI)	87.0 \pm 6.3	18.6 \pm 3.2*	4.0 \pm 0.7*	1.6 \pm 0.2*

Los valores representan la media \pm e.e.m. de 5 animales. *, $p<0.05$ vs. control. Resistencia a la insulina (RI).

La DMT2 es una enfermedad metabólica que se caracteriza por presentar un incremento en los niveles de glucosa (hiperglucemia). Por lo tanto, con la finalidad de conocer si nuestro modelo de hiperglucemia inducido por la administración neonatal de STZ (70 mg/kg) cumplía con esta característica, decidimos determinar los niveles de glucosa sanguínea.

Los resultados (Fig. 12) muestran los niveles de glucosa sanguínea obtenidos durante la PTGO en ratas Wistar macho que recibieron, a los 3 días de nacidos, el vehículo de STZ (buffer de citratos) o STZ (70 mg/kg, i.p.). Después de 12 y 16 semanas de haber recibido STZ, los niveles de glucosa sanguínea fueron determinados en estos animales. Como se puede observar, el tratamiento con STZ (70 mg/kg) incrementó de manera significativa los niveles de glucosa sanguínea a partir del minuto 15 y hasta el minuto 120 durante la PTGO a las 12 semanas ($F_{(1,5)}=9.503$; $p<0.001$, Fig. 12A). Al obtener el ABC se confirmó este incremento en los niveles de glucosa ($t_{(10)}=7.016$; $p<0.001$, Fig. 12B). Este efecto observado a las 12 semanas se mantuvo a las 16 semanas ($F_{(1,5)}=4.667$; $p=0.001$, Fig. 12A, $t_{(10)}=5.831$;

p<0.001, Fig. 12B) cuando se comparó contra el grupo vehículo. Estos datos nos muestran que la administración de STZ en los neonatos de 3-4 días de edad induce hiperglucemia, la cual es evidente a las 12 semanas y permanece a las 16 semanas.

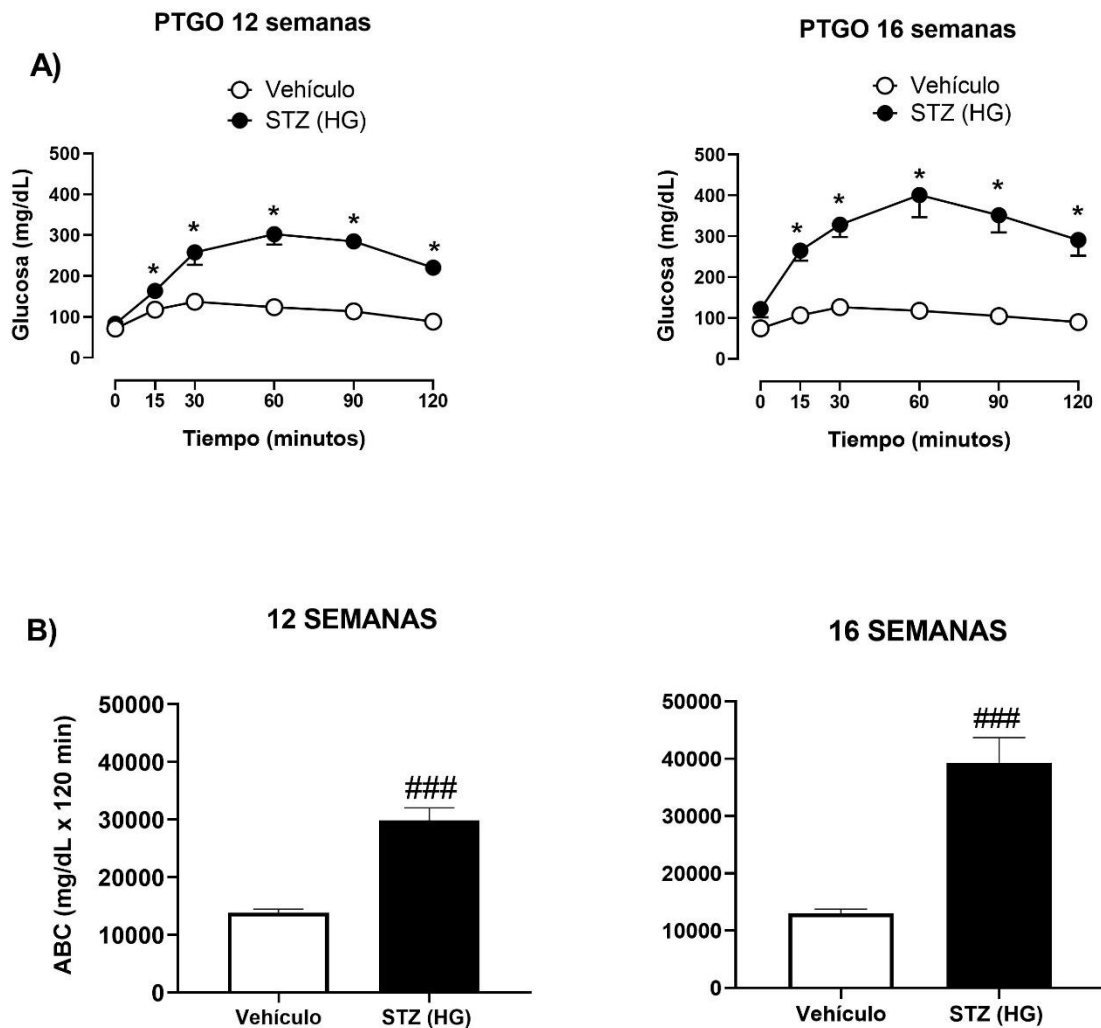


Fig. 12. Efecto de la administración de vehículo (buffer de citratos) o STZ (70 mg/kg) neonatal sobre: (A) el curso temporal y (B) el área bajo la curva obtenido durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral a las 12 y a las 16 semanas en ratas Wistar macho. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, p<0.05 vs vehículo utilizando ANOVA de dos vías, ###, p<0.001 vs vehículo utilizando ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. Hiperglucemia, (HG); estreptozotocina, (STZ).

7.1.2. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre los niveles de glucosa en el modelo de hiperglucemia

Se ha reportado que las respuestas vasculares en modelos de diabetes están relacionadas con los niveles de glucosa, en este sentido, con la finalidad de conocer si los tratamientos farmacológicos modifican los niveles de glucosa en nuestro modelo de HG, en la figura 13 se muestran las concentraciones de glucosa sanguínea obtenidos durante la PTGO (Fig. 13A) y el ABC de estos datos (Fig. 13B), así como los niveles de glucosa obtenidos de manera espontánea en ratas Wistar macho hiperglucémicas a las cuales se les administró durante 4 semanas: 1) el vehículo de sulfhidrato de sodio (PBS 1 mL/kg), 2) el donador inorgánico de sulfuro de hidrógeno [sulfhidrato de sodio (NaHS 5.6 mg/kg)] o 3) el inhibidor de la enzima CSE (DL-PPG 10 mg/kg). Los resultados indican que el tratamiento con PBS ($F_{(1,5)}=0.300$; $p=0.911$, Fig. 13A) no modificó significativamente las concentraciones de glucosa sanguínea cuando se comparó con el grupo HG que no recibió tratamiento farmacológico. Además, los tratamientos con NaHS ($F_{(1,5)}=0.590$; $p=0.708$, Fig. 13A) y DL-PPG ($F_{(1,5)}=0.614$; $p=0.689$, Fig. 13A) no modificaron las concentraciones de glucosa sanguínea durante la PTGO cuando se compararon contra el vehículo (HG + PBS). En congruencia con lo anterior, ninguno de los tratamientos farmacológicos modificó los valores del ABC de la glucosa ($p=0.888$, Fig. 13B) al ser comparados contra el vehículo (HG + PBS).

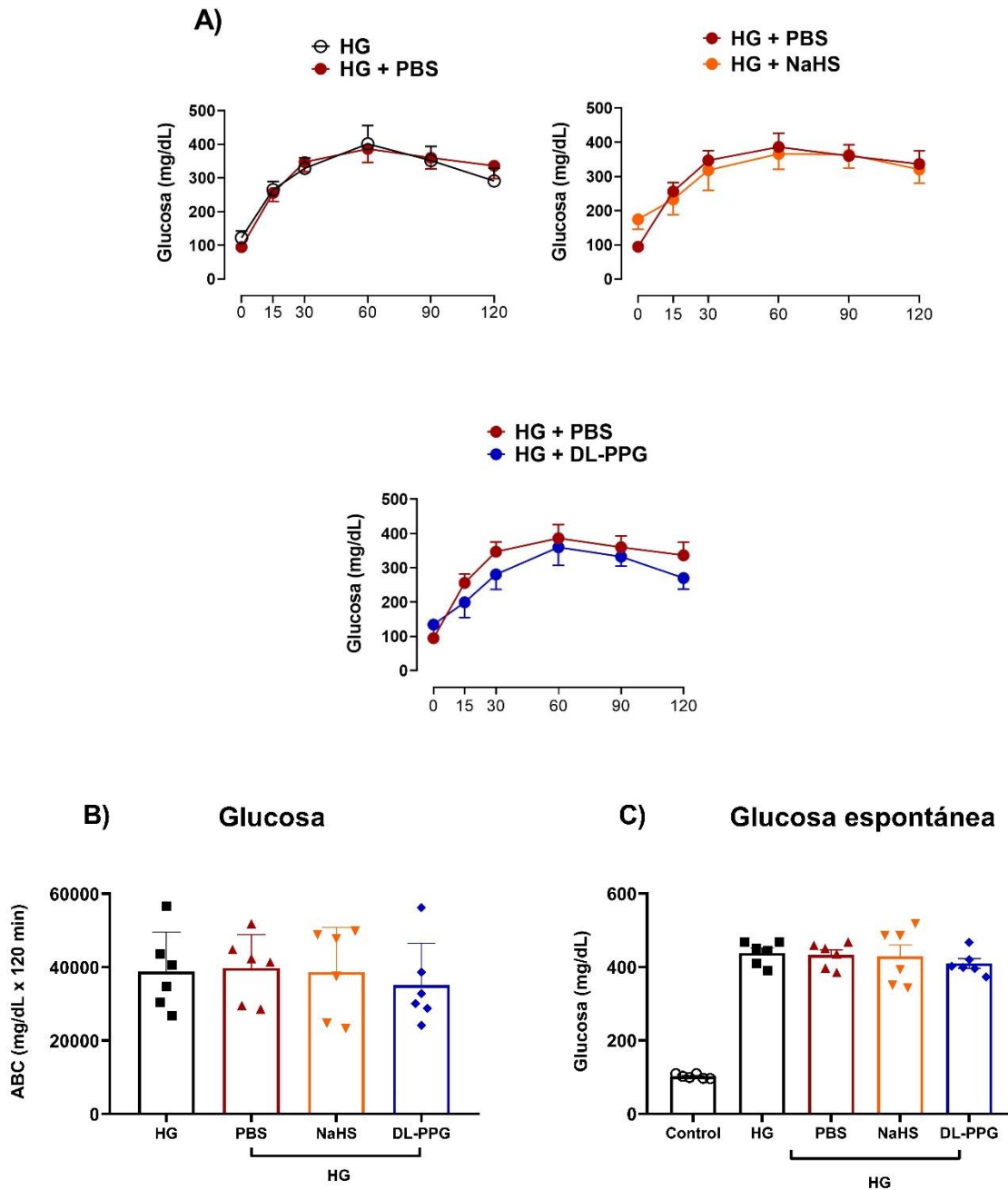


Fig. 13. Efecto de la administración de los tratamientos farmacológicos sobre: (A) el curso temporal; (B) el área bajo la curva obtenido durante la PTGO y (C) glucosa espontánea. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Hiperglucemia, (HG). Buffer de fosfatos salino (PBS, 1 mL/kg, i.p.); sulfhidrato de sodio (NaHS, 5.6 mg/kg, i.p.); DL-Propargilglicina (DL-PPG 10 mg/kg, i.p.).

7.2. Función vascular

7.2.1. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% p/v sobre las respuestas vasculares inducidas por Ang-(1-7) y Ang II en la aorta torácica de la rata

La figura 14 muestra las respuestas relajantes inducidas por concentraciones acumulativas de Ang-(1-7) (Fig. 14A) y las respuestas contráctiles inducidas por concentraciones acumulativas de Ang II (Fig. 14B) en la aorta torácica de ratas Wistar macho que recibieron fructosa 15% p/v o agua (control) durante 20 semanas. Además, se calculó la pEC_{50} y el $E_{m\acute{a}x}$ (Tabla 6). En los animales control, la Ang-(1-7) produjo una respuesta relajante de manera dependiente de la concentración con un $E_{m\acute{a}x}$ de $43.10\% \pm 1.48\%$ y una pEC_{50} de 6.68 ± 0.03 (Fig. 14A, tabla 6). El $E_{m\acute{a}x}$ de las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) disminuyó de manera significativa en el grupo RI al compararse con el grupo control ($23\% \pm 2.10\%$, $p=0.04$, Fig. 14A, tabla 6). Por otra parte, las respuestas contráctiles inducidas por Ang II produjeron una contracción dependiente de la concentración en el grupo control con un $E_{m\acute{a}x}$ de $0.49 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$ y una pEC_{50} de 7.40 ± 0.09 . Estas respuestas presentaron un incremento significativo en el $E_{m\acute{a}x}$ ($0.80 \text{ g} \pm 0.15 \text{ g}$, $p=0.04$, Fig. 14B, tabla 6) del grupo RI con respecto al grupo control. Estos resultados comprueban que nuestro modelo de RI induce disfunción vascular, por lo que fue posible iniciar con la administración de los tratamientos farmacológicos.

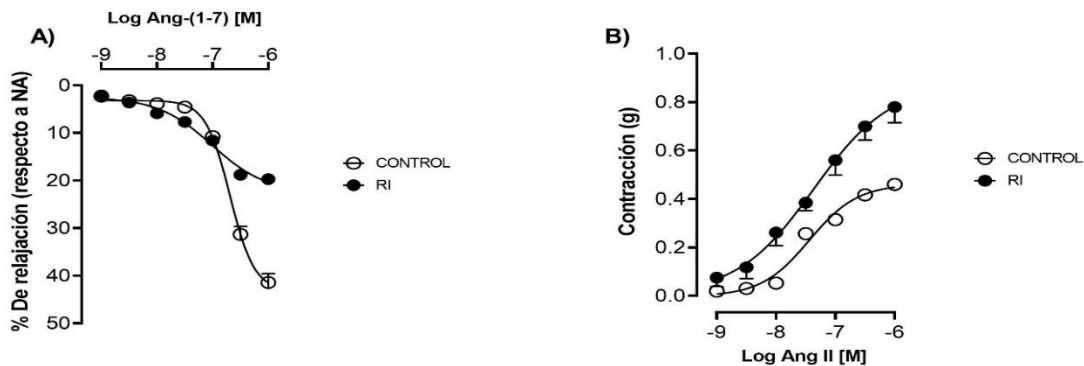


Fig. 14. Efecto de la administración crónica de fructosa 15% p/v (grupo RI) o de agua (control) durante 20 semanas sobre: (A) las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7), y (B) las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Resistencia a la insulina, (RI), noradrenalina, (NA); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II).

7.2.2. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas con resistencia a la insulina

En la figura 15 y en la tabla 6 se muestran los efectos de las respuestas relajantes inducidas por concentraciones acumulativas de Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas Wistar macho con RI. Adicional a nuestro grupo control de RI, las ratas que presentaban hiperinsulinemia (resistencia a la insulina), se dividieron y recibieron durante 4 semanas por vía i.p.: 1) el vehículo de sulfhidrato de sodio (PBS, 1 mL/kg), 2) el sulfhidrato de sodio (NaHS, 5.6 mg/kg) y 3) el inhibidor de la enzima CSE (DL-PPG, 10 mg/kg). Las respuestas relajantes provocadas por Ang-(1-7) en el grupo RI + PBS no fueron diferentes a las respuestas producidas por el grupo con RI ($E_{m\acute{a}x}=21.00\% \pm 2.30\%$, $p=0.67$; $pEC_{50}=7.01 \pm 0.14$, $p=0.96$, Fig. 15A, tabla 6). Marcadamente, en el grupo RI + NaHS incrementó el $E_{m\acute{a}x}$ de las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) al compararse contra el grupo RI + PBS ($E_{m\acute{a}x}=26.00\% \pm 1.7\%$, $p=0.03$; $pEC_{50}=7.70 \pm 0.11$, $p=0.12$, Fig. 15B, tabla 6). Por otro lado, el $E_{m\acute{a}x}$ del grupo RI + DL-PPG disminuyó de forma significativa cuando se comparó contra el grupo RI + PBS ($E_{m\acute{a}x}=13.60\% \pm 1.08\%$, $p=0.03$; $pEC_{50}=7.70 \pm 0.17$, $p=0.13$, Fig. 15C, tabla 6).

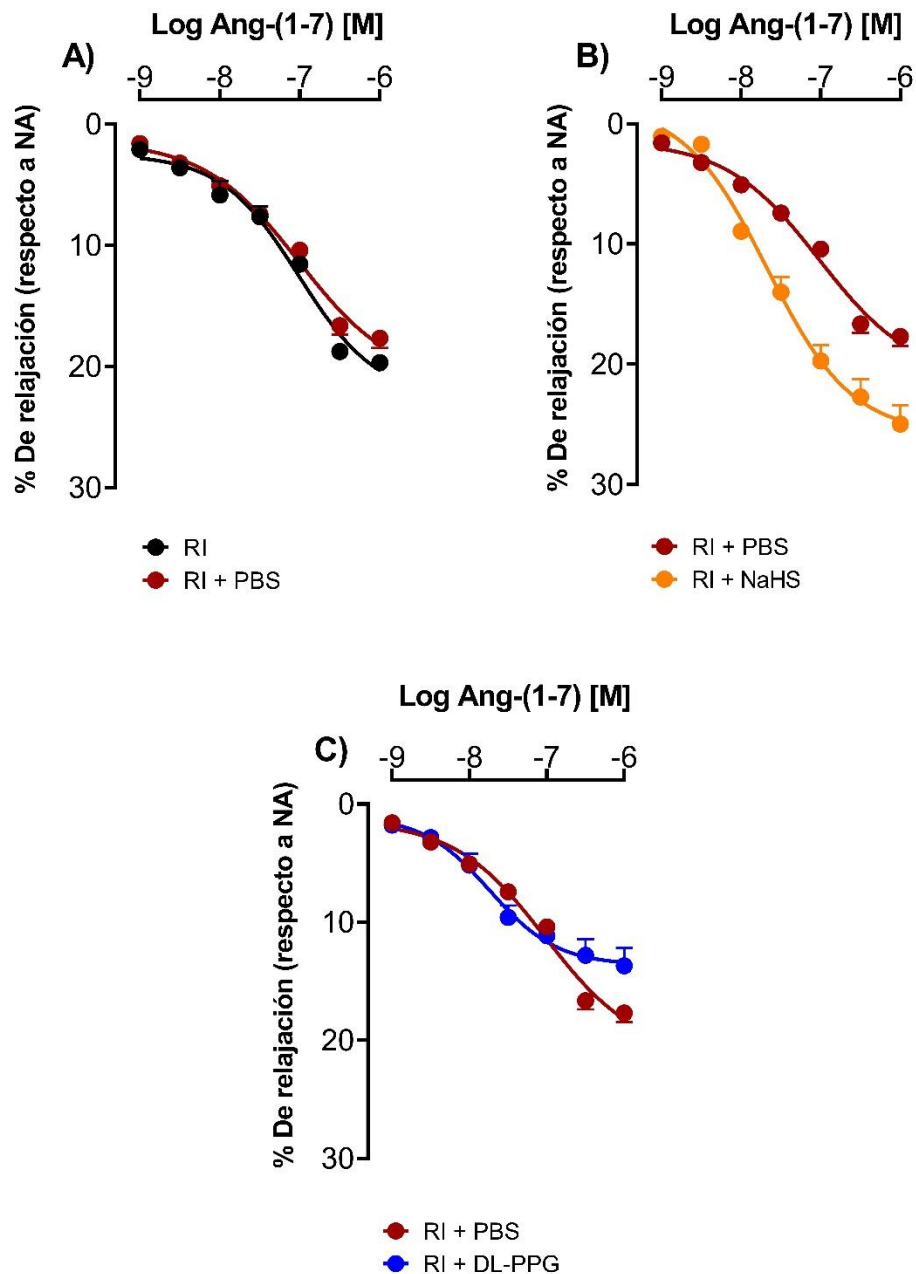


Fig. 15. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Resistencia a la insulina, (RI), noradrenalina, (NA); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

7.2.3. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas con resistencia a la insulina

En la figura 16 y en la tabla 6 se muestran los datos correspondientes a las respuestas contráctiles inducidas por concentraciones acumulativas de Ang II en la aorta torácica de ratas con RI. Adicional a nuestro grupo control de RI, las ratas que presentaban hiperinsulinemia (resistencia a la insulina), se dividieron y recibieron durante 4 semanas por vía i.p.: 1) el vehículo de sulfhidrato de sodio (PBS, 1 mL/kg), 2) el sulfhidrato de sodio (NaHS, 5.6 mg/kg) y 3) el inhibidor de la enzima CSE (DL-PPG, 10 mg/kg).

La administración de vehículo (RI + PBS) no modificó significativamente las respuestas contráctiles cuando se comparó contra el grupo RI ($E_{máx}=0.70 \text{ g} \pm 0.08 \text{ g}$, $p=0.47$; $pEC_{50}=7.50 \pm 0.18$, $p=0.58$, Fig. 16A, tabla 6). En contraste, en el grupo RI + NaHS se observó una disminución significativa del $E_{máx}$ y la pEC_{50} de las respuestas contráctiles inducidas por Ang II cuando se comparó contra el vehículo ($E_{máx}=0.20 \text{ g} \pm 0.02 \text{ g}$, $p=0.04$; $pEC_{50}=7.10 \pm 0.10$, $p=0.04$, Fig. 16B, tabla 6). Por último y de manera poco esperada, la administración del inhibidor DL-PPG disminuyó significativamente la pEC_{50} sin afectar el $E_{máx}$ de las respuestas contráctiles al compararse contra el vehículo ($E_{máx}=0.60 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$, $p=0.46$; $pEC_{50}=6.30 \pm 0.35$, $p=0.02$, Fig. 16C, tabla 6).

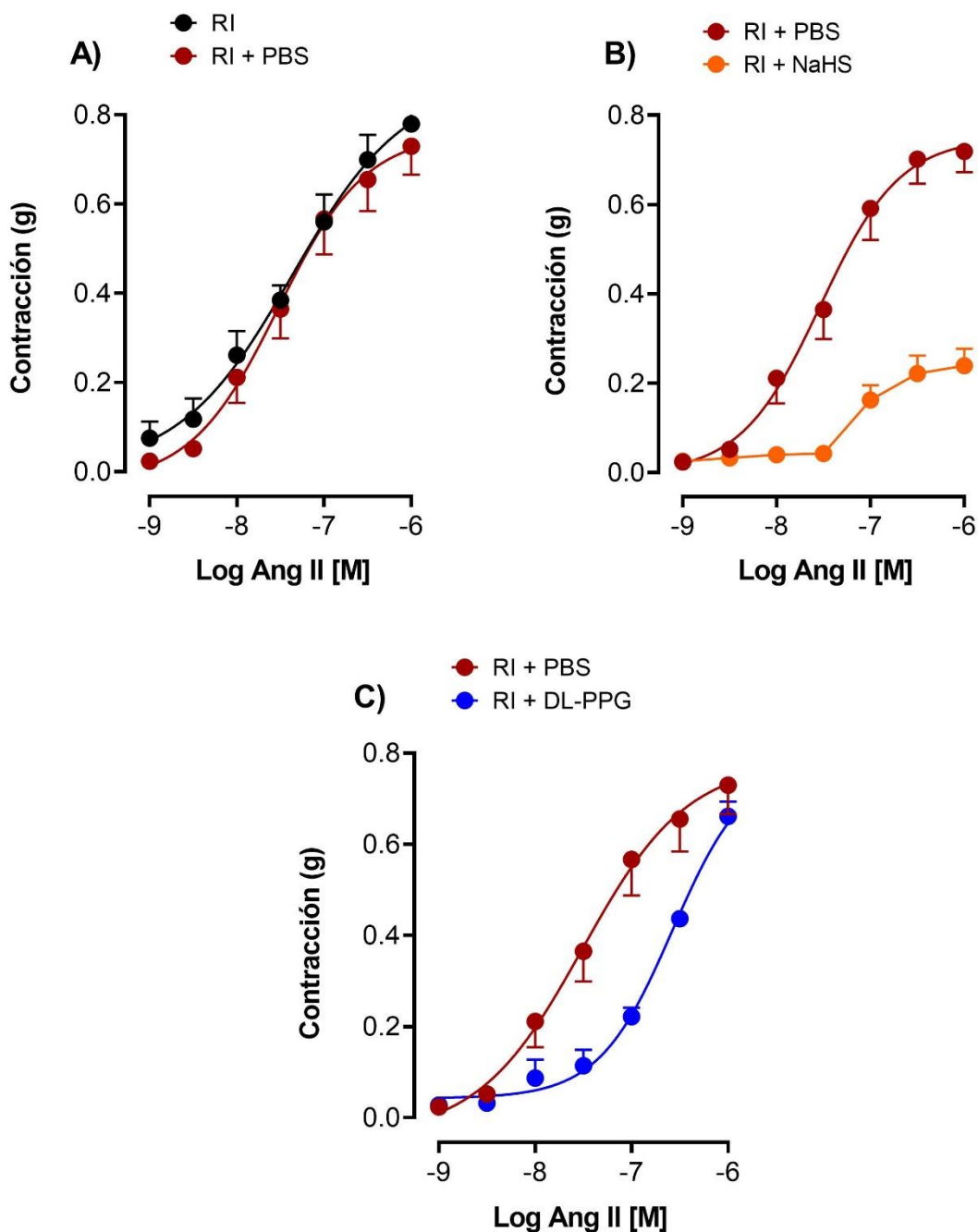


Fig. 16. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS, (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho con resistencia a la insulina. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG); angiotensina II, (Ang II).

7.2.4. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ sobre las respuestas vasculares inducidas por Ang-(1-7) y Ang II en la aorta torácica de la rata

Los resultados de la figura 17 ilustran las respuestas relajantes inducidas por concentraciones acumulativas de Ang-(1-7) (Fig. 17A) y las respuestas contráctiles inducidas por concentraciones acumulativas de Ang II (Fig. 17B) en la aorta torácica de ratas Wistar macho que fueron tratadas con STZ (70 mg/kg) por vía intraperitoneal a los 3 días de nacimiento (grupo HG). Los resultados muestran que, en los animales control, tratados con vehículo (buffer de citratos), la Ang-(1-7) produjo una respuesta relajante dependiente de la concentración ($E_{m\acute{a}x}=52.30\% \pm 3.3\%$; $pEC_{50}=6.84 \pm 0.07$, Fig. 17A, tabla 6). Estas respuestas fueron reducidas en el grupo HG ($E_{m\acute{a}x}=16.20\% \pm 0.5\%$, $p=0.02$; $pEC_{50}=7.23 \pm 0.05$, $p=0.08$, Fig. 17A, tabla 6). Por otra parte, las respuestas contráctiles inducidas por Ang II produjeron una contracción dependiente de la concentración en el grupo control ($E_{m\acute{a}x}=0.53 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$, $p=0.47$; $pEC_{50}=7.24 \pm 0.07$, Fig. 17B, tabla 6) y estas respuestas fueron disminuidas en el grupo HG ($E_{m\acute{a}x}=0.43 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$, $p=0.03$; $pEC_{50}=6.90 \pm 0.07$, $p=0.02$, Fig. 17B, tabla 6).

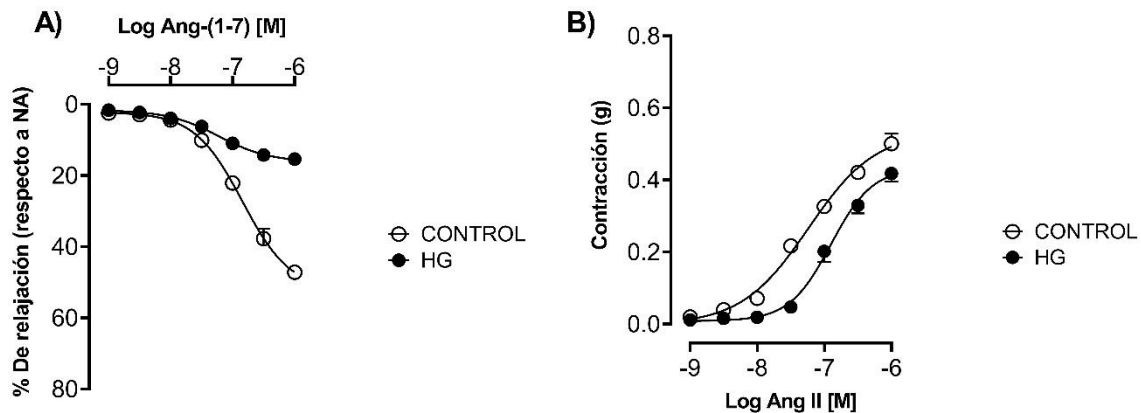


Fig. 17. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ sobre: (A) las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) y (B) las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Hiperglucemia, (HG), noradrenalina, (NA); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II).

7.2.5. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas con hiperglucemia

En la figura 18 y en la tabla 6 se presentan los resultados de las respuestas relajantes inducidas por concentraciones acumulativas de Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas Wistar macho con HG. Adicional a nuestro grupo control de HG, las ratas que presentaban hiperglucemia, se dividieron y recibieron durante 4 semanas por vía i.p.: 1) el vehículo de sulfhidrato de sodio (PBS, 1 mL/kg), 2) el sulfhidrato de sodio (NaHS, 5.6 mg/kg) y 3) el inhibidor de la enzima CSE (DL-PPG, 10 mg/kg). Las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en el grupo HG + PBS no fueron diferentes a las respuestas producidas por el grupo HG ($E_{m\acute{a}x}=16.81\% \pm 1.20\%$, $p=0.6$; $pEC_{50}=7.10 \pm 0.1$, $p=0.47$, Fig. 18A, tabla 6). El grupo HG + NaHS incrementó significativamente el $E_{m\acute{a}x}$ y la pEC_{50} de las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) al compararse contra el grupo HG + PBS ($E_{m\acute{a}x}=69.70\% \pm 12.2\%$, $p=0.02$; $pEC_{50}=7.44 \pm 0.2$, $p=0.04$, Fig. 18B, tabla 6). El grupo HG + DL-PPG no presentó diferencias en el $E_{m\acute{a}x}$ ni en la pEC_{50} de las respuestas relajantes al compararse contra el grupo HG + PBS ($E_{m\acute{a}x}=14.63\% \pm 0.2\%$, $p=0.33$; $pEC_{50}=7.20 \pm 0.14$, $p=0.47$, Fig. 18C, tabla 6).

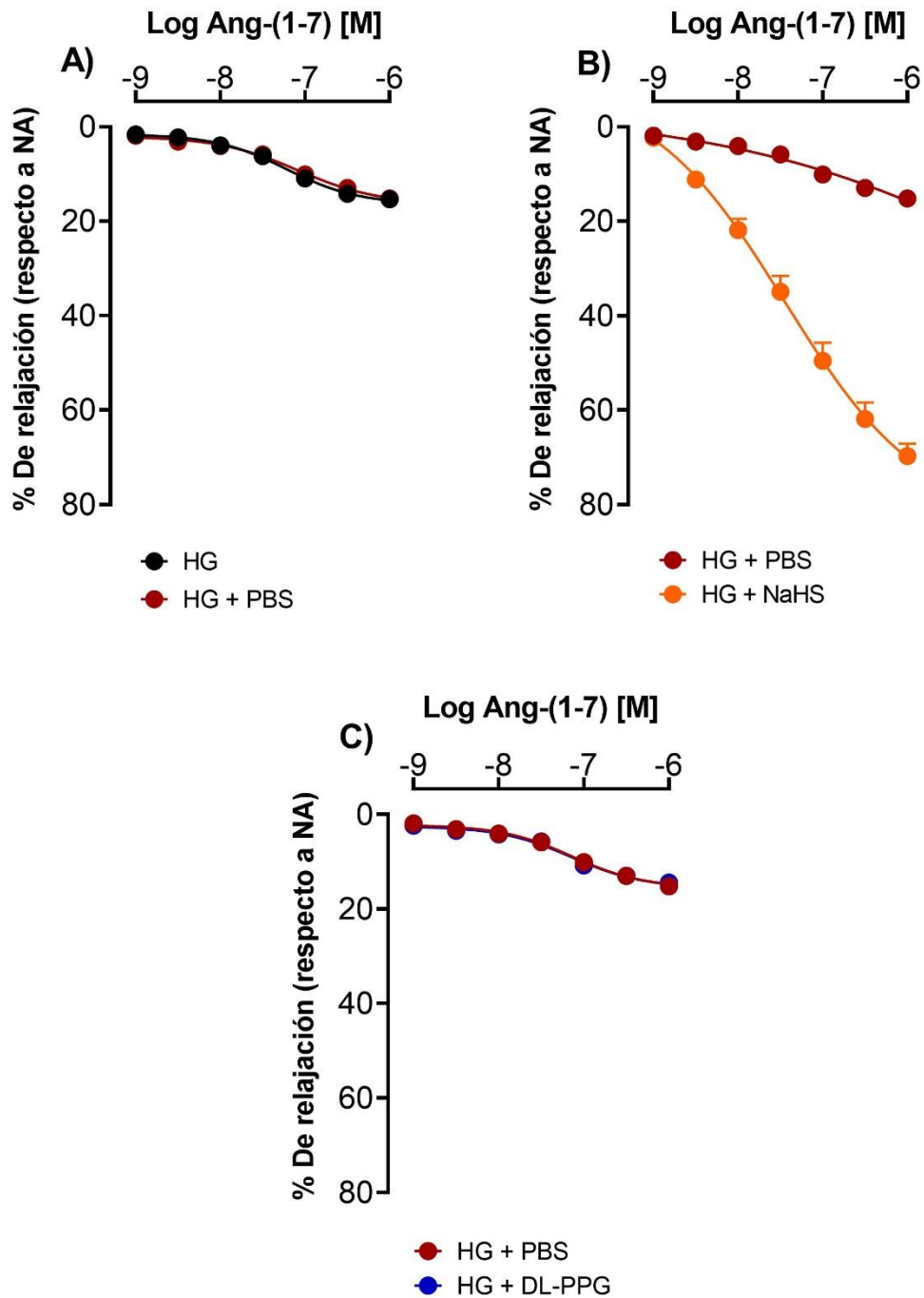


Fig. 18. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) en la aorta torácica de ratas Wistar macho con **hiperglucemia**. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Hiperglucemia, (HG), noradrenalina, (NA); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

7.2.6. Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas con hiperglucemia

La figura 19 muestra las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en ratas con HG y sin tratamiento farmacológico y ratas hiperglucémicas que recibieron durante 4 semanas por vía i.p.: 1) el vehículo de sulfhidrato de sodio (PBS, 1 mL/kg), 2) el donador inorgánico de sulfuro de hidrógeno (sulfhidrato de sodio, NaHS, 5.6 mg/kg) y 3) el inhibidor de la enzima CSE (DL-PPG, 10 mg/kg). Las respuestas contráctiles inducidas por Ang II no presentaron cambios en el grupo que recibió PBS cuando se compararon contra el grupo HG ($E_{m\acute{a}x}=0.45 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$, $p=0.74$; $pEC_{50}=6.93 \pm 0.08$, $p=0.54$, Fig. 19A, tabla 6). El tratamiento con NaHS incrementó significativamente el $E_{m\acute{a}x}$ y la pEC_{50} de las respuestas contráctiles cuando se compararon contra el grupo HG + PBS ($E_{m\acute{a}x}=0.55 \text{ g} \pm 0.14 \text{ g}$, $p=0.04$; $pEC_{50}=7.26 \pm 0.26$, $p=0.04$, Fig. 19B, tabla 6). Finalmente, el tratamiento con DL-PPG (10 mg/kg) no produjo cambios significativos sobre las respuestas contráctiles con respecto al grupo HG + PBS ($E_{m\acute{a}x}=0.40 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$, $p=0.58$; $pEC_{50}=7.10 \pm 0.13$, $p=0.35$, Fig. 19C, tabla 6).

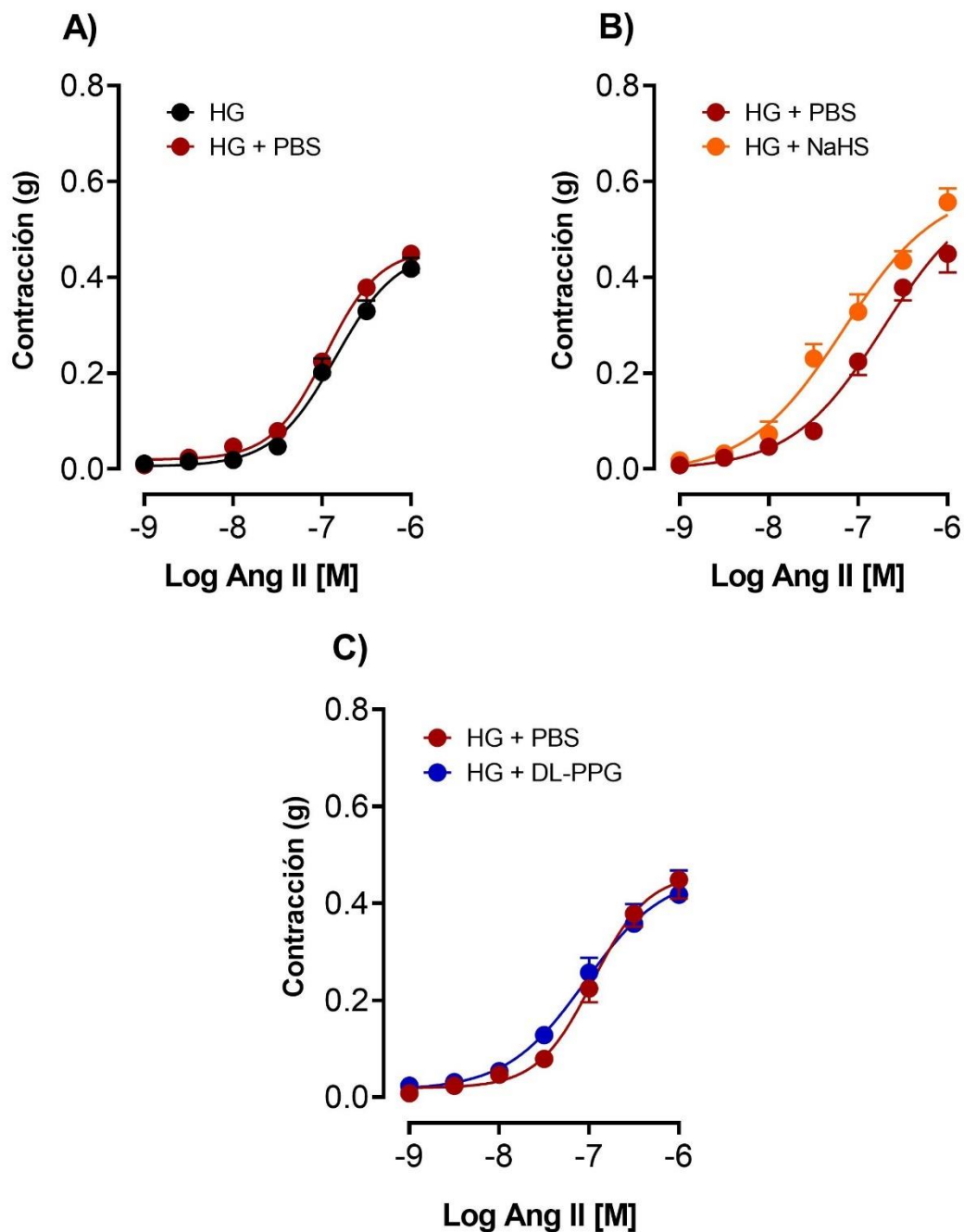


Fig. 19. Efecto de la administración durante 4 semanas por vía i.p. de: (A) vehículo (PBS, 1 mL/kg), (B) NaHS, (5.6 mg/kg) y (C) DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en la aorta torácica de ratas Wistar macho con hiperglucemia. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. Buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG); angiotensina II, (Ang II).

Tabla 6. Logaritmo negativo de la concentración efectiva 50 (pEC₅₀) y efecto máximo (E_{máx}) de las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7) y las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en animales con RI y HG, así como la administración de vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas), NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas) y DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas).

Modelo experimental	Respuestas relajantes a Ang-(1-7)		Respuestas contráctiles a Ang II	
	pEC ₅₀	E _{máx} (%)	pEC ₅₀	E _{máx} (g)
Resistencia a la insulina				
Control	6.68 ± 0.03	43.10 ± 1.48	7.40 ± 0.09	0.49 ± 0.02
RI	7.01 ± 0.13	23.00 ± 2.10*	7.40 ± 0.23	0.80 ± 0.15*
RI + PBS	7.01 ± 0.14	21.00 ± 2.30*	7.50 ± 0.18	0.70 ± 0.08*
RI + NaHS	7.70 ± 0.11	26.00 ± 1.7 [#]	7.10 ± 0.10 [#]	0.20 ± 0.02 [#]
RI + DL-PPG	7.70 ± 0.17	13.60 ± 1.08 [#]	6.30 ± 0.35 [#]	0.60 ± 0.03
Hiperglucemia				
Control	6.84 ± 0.07	52.30 ± 3.3	7.24 ± 0.07	0.53 ± 0.03
HG	7.23 ± 0.05	16.20 ± 0.5 ^{&}	6.90 ± 0.07 ^{&}	0.43 ± 0.03 ^{&}
HG + PBS	7.10 ± 0.1	16.81 ± 1.2 ^{&}	6.93 ± 0.08 ^{&}	0.45 ± 0.03 ^{&}
HG + NaHS	7.44 ± 0.2 ^{\$}	69.70 ± 12.2 ^{\$}	7.26 ± 0.26 ^{\$}	0.55 ± 0.14 ^{\$}
HG + DL-PPG	7.20 ± 0.14	14.63 ± 0.2	7.10 ± 0.13	0.40 ± 0.05

Cada punto representa media ± e.e.m. de 6 animales. *, p< 0.05 vs control; &, p< 0.05 vs control [#], p<0.05 vs RI + PBS; \$, p<0.01 vs HG + PBS. Resistencia a la insulina, (RI); Hiperglucemia, (HG); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II); buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

7.3. Niveles de angiotensinas

7.3.1. Efecto de la resistencia a la insulina, hiperglucemia y los tratamientos farmacológicos sobre los niveles de Ang-(1-7) y Ang II en muestras de suero

En este trabajo se decidió evaluar los niveles de angiotensinas debido a que se ha reportado que durante las enfermedades metabólicas los niveles de Ang-(1-7) y Ang II pueden verse modificados, lo cual también nos ayudaría a explicar los cambios observados en la función vascular durante la RI y la HG. En las figuras 20 y 21 se muestra su efecto sobre los niveles de Ang-(1-7) y Ang II. El análisis muestra que los niveles de Ang-(1-7) disminuyeron ($p=0.028$, Fig. 20A), mientras que los niveles de Ang II incrementaron ($p=0.006$, Fig. 20B) en el grupo RI, cuando se comparó contra el grupo control. Los niveles de Ang-(1-7) ($p=0.99$, Fig. 20A) y de Ang II ($p=0.941$, Fig. 20B) en el grupo RI + PBS no fueron estadísticamente diferentes a los resultados obtenidos por el grupo RI. En marcado contraste, el grupo RI + NaHS incrementó de manera significativa los niveles de Ang-(1-7) ($p<0.001$, Fig. 20A) y disminuyó de manera significativa los niveles de Ang II ($p<0.001$, Fig. 20B), mientras que el grupo RI + DL-PPG no modificó los niveles de Ang-(1-7) ($p=0.793$, Fig. 20A) ni los niveles de Ang II ($p=0.965$, Fig. 20B), al compararse contra el grupo RI + PBS. En el modelo de HG inducido por STZ, los niveles de Ang-(1-7) ($p<0.001$, Fig. 21A) y Ang II ($p=0.042$, Fig. 21B) disminuyeron significativamente cuando se compararon contra el grupo control. Este efecto no presentó cambios en el grupo HG + PBS ($p=0.99$ para Ang-(1-7) y $p=0.991$ para Ang II). De manera interesante, los cambios fueron restablecidos en el grupo HG + NaHS ($p<0.001$ para Ang-(1-7) y $p=0.013$ para Ang II). Finalmente, el grupo HG + DL-PPG no modificó los niveles de Ang-(1-7) ($p=0.895$, Fig. 21A) ni los niveles de Ang II ($p=0.983$, Fig. 21B), al compararse contra el grupo HG + PBS.

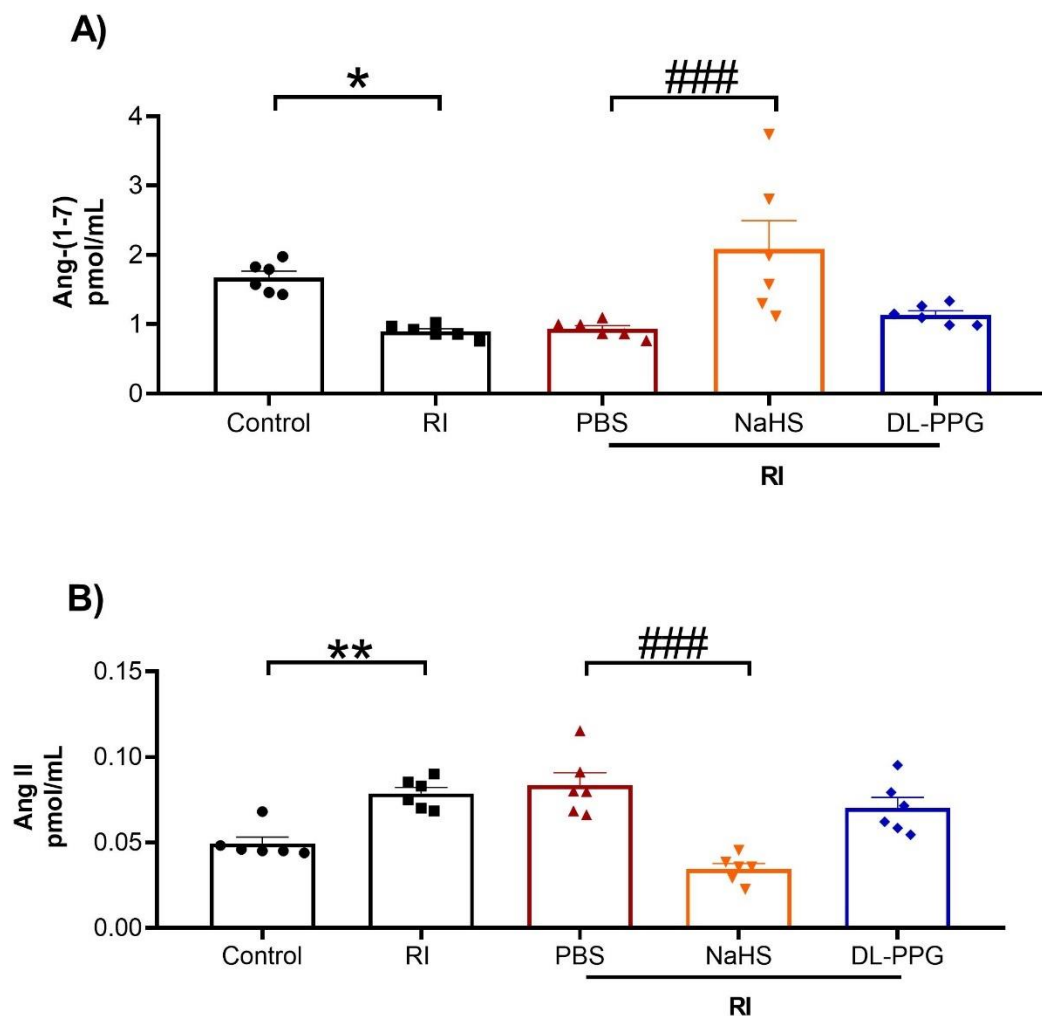


Fig. 20. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre: (A) los niveles de Ang-(1-7) y (B) sobre los niveles de Ang II en suero. Cada punto representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ vs control; ###, $p < 0.001$ vs HG + PBS. ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tukey. Resistencia a la insulina, (RI); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II); buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

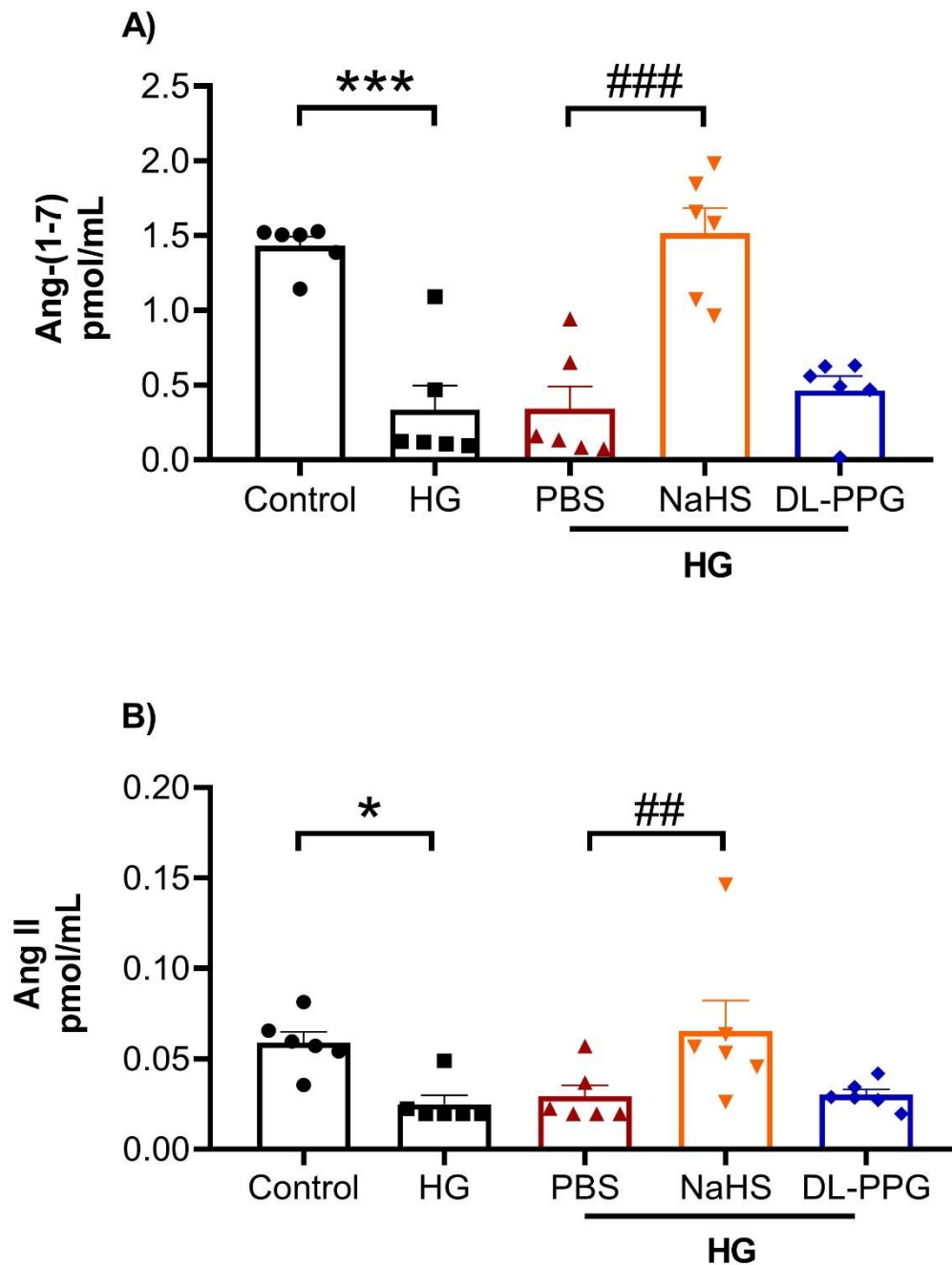


Fig. 21. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ neonatal y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre: (A) los niveles de Ang-(1-7) y (B) sobre los niveles de Ang II en suero. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ vs control; ##, $p < 0.01$, ###, $p < 0.001$ vs HG + PBS. ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tukey. Hiperglucemia, (HG); angiotensina-(1-7), [Ang-(1-7)]; angiotensina II, (Ang II); buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

7.4. Western Blot

7.4.1. Determinación de la expresión de receptores (AT₁, AT₂ y Mas) y enzimas (ECA y ECA2) por Western blot en aorta torácica de animales con resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y animales con tratamiento farmacológico

Para conocer si la RI y los tratamientos farmacológicos influyen sobre la expresión de enzimas y receptores involucrados en el sistema renina-angiotensina, en las figuras 22 y 23 se muestran el efecto de la RI, así como los tratamientos farmacológicos administrados por vía i.p. durante 4 semanas de: 1) vehículo (PBS 1 mL/kg), 2) NaHS (5.6 mg/kg) y 3) DL-PPG (10 mg/kg) sobre la expresión de ECA2 y del receptor Mas y sobre la expresión de ECA así como la expresión sobre los receptores AT₁ y AT₂. El grupo con RI: 1) disminuyó significativamente la expresión de ECA2 ($p=0.032$, Fig. 22B), la expresión del receptor Mas ($p<0.001$, Fig. 22C) y la expresión de AT₂ ($p=0.038$, Fig. 23D), y 2) incrementó significativamente la expresión de ECA ($p=0.006$, Fig. 23B) y de AT₁ ($p=0.003$, Fig. 23C), al compararse contra el grupo control. El grupo RI + PBS no modificó ninguno de estos parámetros. El grupo RI + NaHS incrementó la expresión de ECA2 ($p=0.011$, Fig. 22B), del receptor Mas ($p<0.001$, Fig. 22C) y de AT₂ ($p=0.024$, Fig. 23D). Por otro lado, el grupo RI + NaHS, disminuyó la expresión de ECA ($p=0.042$, Fig. 23B) y de AT₁ ($p<0.001$, Fig. 23C) cuando se comparó contra el grupo RI + PBS. El grupo RI + DL-PPG no presentó cambios en la expresión de ECA2 ($p=0.999$, Fig. 22B), ECA ($p=0.724$, Fig. 23B), receptor Mas ($p=0.911$, Fig. 22C) y AT₂ ($p=0.694$, Fig. 23D), pero sí disminuyó la expresión de AT₁ ($p=0.021$, Fig. 23C) cuando se comparó contra el grupo RI + PBS.

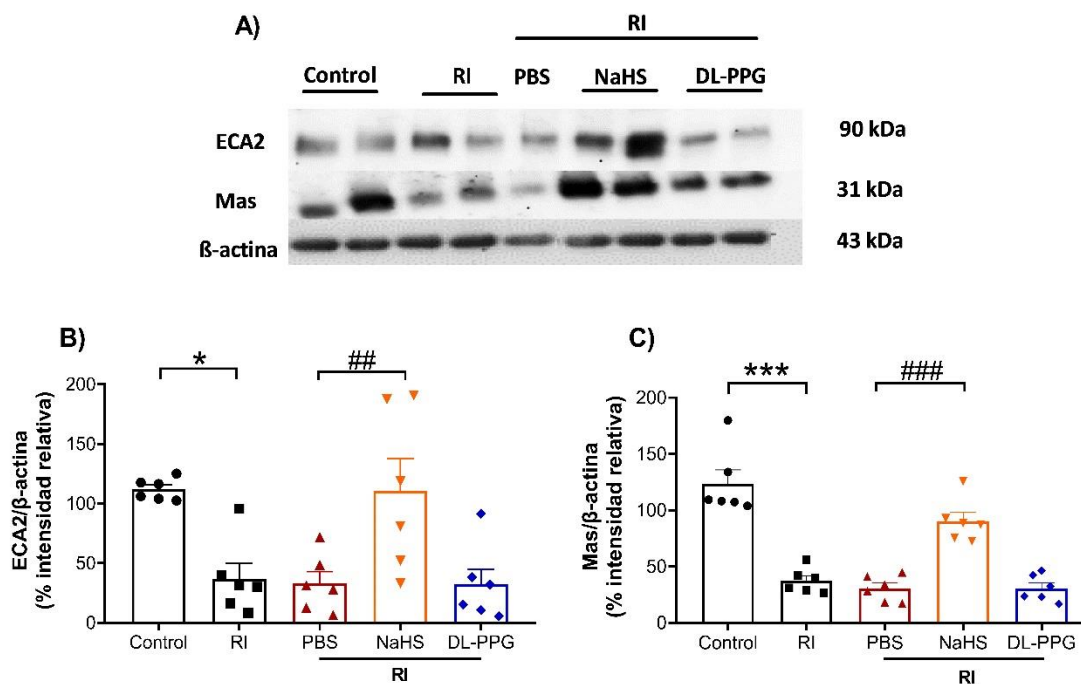


Fig. 22. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA2 y Mas en la aorta torácica. (A) Blot representativo de la expresión de ECA2 y Mas. (B) Cambios en la expresión de ECA2 y (C) Cambios en la expresión del receptor Mas. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. *, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$ vs control; ##, $p < 0.01$, ###, $p < 0.001$ vs RI + PBS. ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. Resistencia a la insulina, (RI); enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ECA2); receptor Mas (Mas); buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

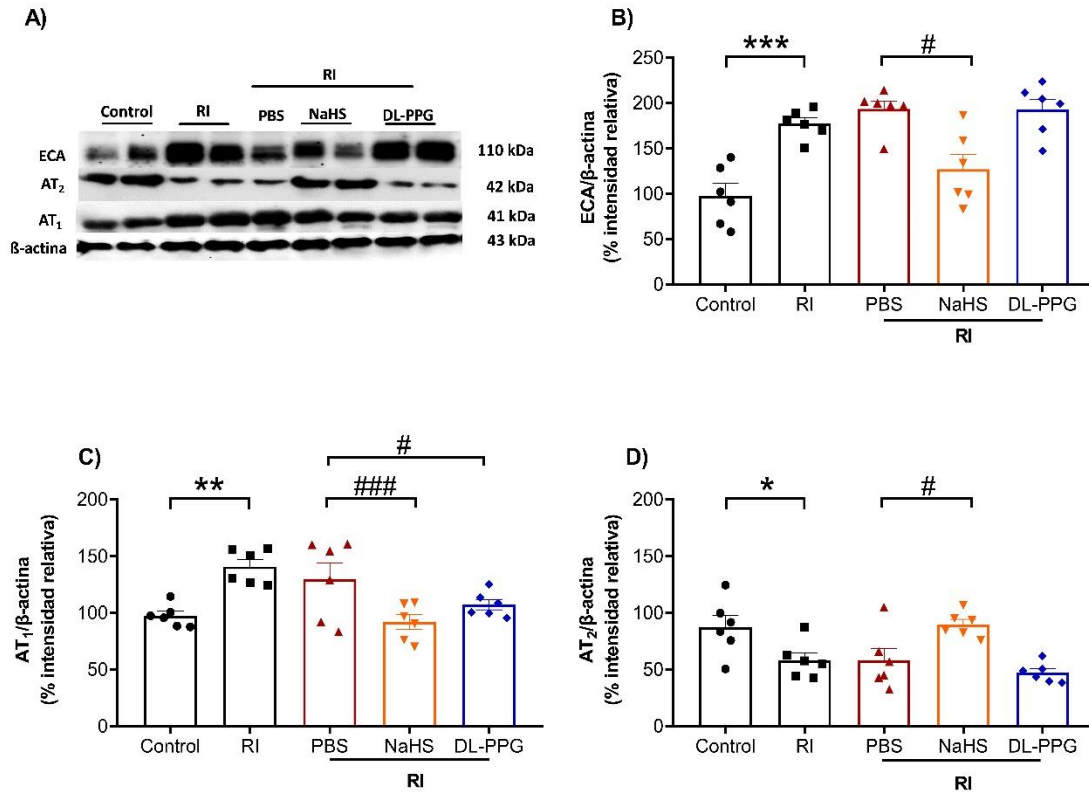


Fig. 23. Efecto de la resistencia a la insulina inducida por fructosa 15% y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA, AT₁ y AT₂ en la aorta torácica. (A) Blot representativo de la expresión de ECA, AT₁ y AT₂, (B) Cambios en la expresión de ECA, (C) Cambios en la expresión de AT₁, y (D) Cambios en la expresión de AT₂. Cada barra representa la media ± e.e.m. de 6 animales. *, p<0.05, ***, p<0.01, ***, p<0.001 vs control; #, p<0.05, ###, p<0.001 vs RI + PBS. ANOVA de una vía, seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. Resistencia a la insulina, (RI); enzima convertidora de angiotensina (ECA); receptor tipo 1 de angiotensina II (AT₁); receptor tipo 2 de angiotensina II (AT₂); buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

7.4.2. Determinación de la expresión de receptores (AT₁, AT₂ y Mas) y enzimas (ECA y ECA2) por Western blot en aorta torácica de animales con hiperglucemia inducida por STZ y animales con tratamiento farmacológico

Para conocer si la HG y los tratamientos farmacológicos influyen en la expresión de enzimas y receptores involucrados en el sistema renina-angiotensina, en las figuras 24 y 25 se muestra el efecto de HG, vehículo (PBS 1 mL/kg durante 4 semanas, i.p.), NaHS (5.6 mg/kg durante 4 semanas, i.p.) y DL-PPG (10 mg/kg durante 4 semanas, i.p.) sobre la expresión de ECA2 y del receptor Mas (Fig. 24) y sobre la expresión de ECA y de los receptores AT₁ y AT₂ (Fig. 25). En la figura 24, los resultados indican que el grupo HG disminuyó significativamente la expresión de ECA2 y Mas al compararse contra el grupo control ($p=0.01$ y $p<0.001$, respectivamente). Estos cambios no fueron modificados por la administración del vehículo (HG + PBS). El grupo HG + NaHS incrementó significativamente la expresión de ECA2 ($p=0.002$, Fig. 24B) y del receptor Mas ($p=0.003$, Fig. 24C). En contraste, el grupo HG + DL-PPG no presentó cambios en la expresión de ECA2 ($p=0.911$, Fig. 24B) y del receptor Mas ($p=0.99$, Fig. 24C) al compararse contra el grupo HG + PBS.

Por otro lado, en la figura 25, los resultados muestran que el grupo HG y los grupos que recibieron los tratamientos farmacológicos no alteraron la expresión de ECA con respecto al grupo control. El grupo HG incrementó la expresión de AT₁ al compararse contra el grupo control ($p<0.001$, Fig. 25C); estos cambios no fueron modificados por la administración del vehículo (HG + PBS). El grupo HG + NaHS disminuyó de manera significativa la expresión de AT₁ ($p=0.033$, Fig. 25C) y el grupo HG + DL-PPG ($p=0.975$, Fig. 25C) no cambio la expresión de AT₁ al compararse contra el grupo HG + PBS.

En el grupo HG, la expresión de AT₂ disminuyó de manera estadísticamente significativa ($p=0.001$, Fig. 25D) al compararse contra el grupo control, este efecto no presentó cambios en el grupo HG + PBS ($p=0.999$, Fig. 25D). El grupo HG + NaHS incrementó significativamente la expresión del AT₂ ($p<0.001$, Fig. 25D) a diferencia de lo observado en el grupo HG + DL-PPG ($p=0.877$, Fig. 25D) en el que

no se presentaron diferencias significativas, al compararse contra el grupo HG + PBS.

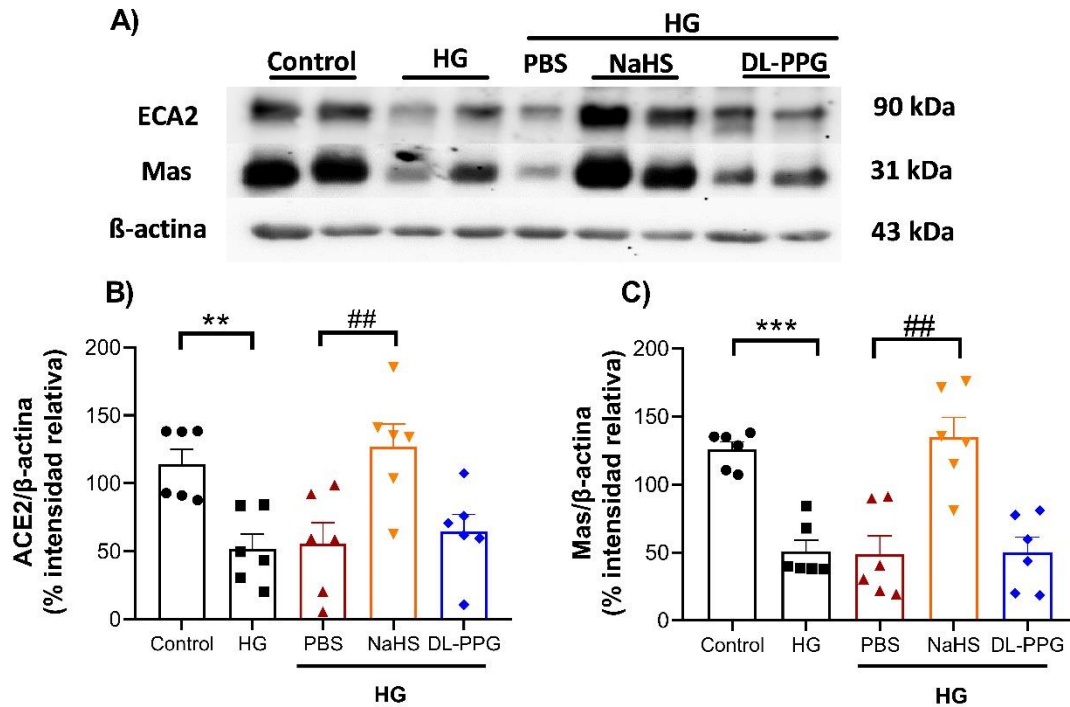


Fig. 24. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ neonatal y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA2 y Mas en la aorta torácica. (A) Blot representativo de la expresión de ECA2 y Mas. (B) Cambios en la expresión de ECA2 y (C) Cambios en la expresión del receptor Mas. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ vs control; ##, $p < 0.01$ vs HG + PBS. ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tukey. Hiperglucemia, (HG); enzima convertidora de angiotensina tipo 2 (ECA2); receptor Mas (Mas); buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

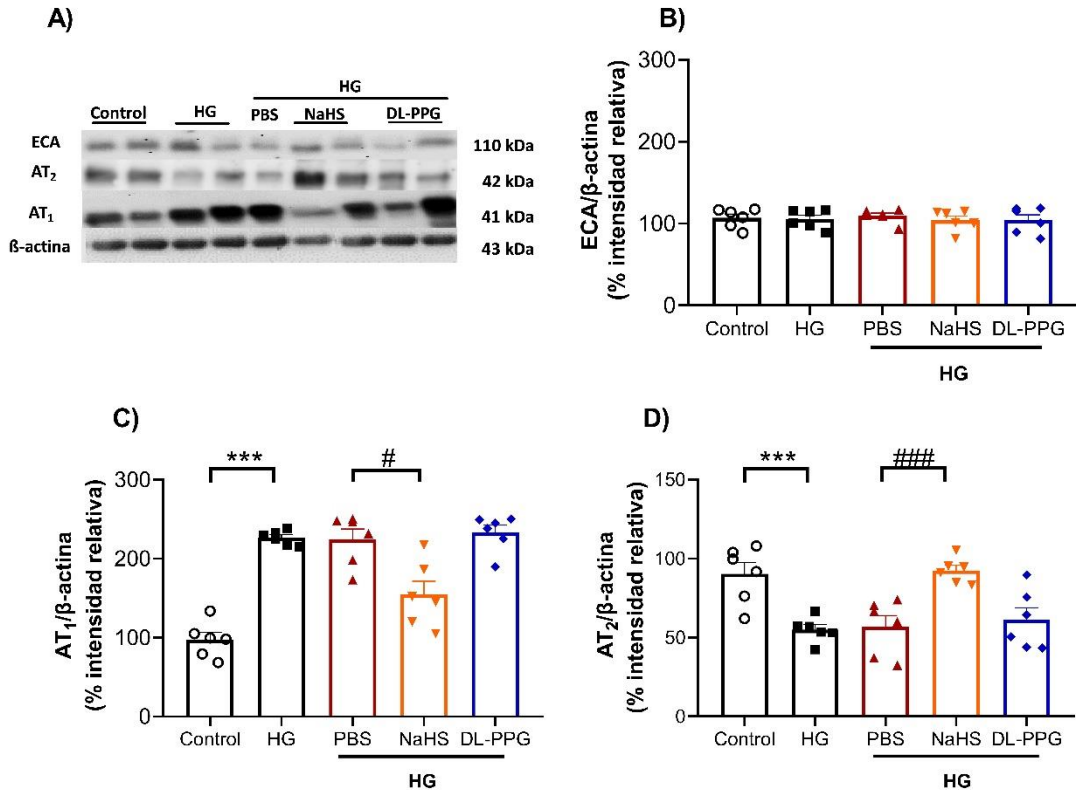


Fig. 25. Efecto de la hiperglucemia inducida por STZ neonatal y de la administración crónica durante 4 semanas de los tratamientos farmacológicos sobre los cambios en la expresión de ECA, AT₁ y AT₂ en la aorta torácica. (A) Blot representativo de la expresión de ECA, AT₁ y AT₂, (B) Cambios en la expresión de ECA, (C) Cambios en la expresión de AT₁ y (D) Cambios en la expresión de AT₂. Cada barra representa la media \pm e.e.m. de 6 animales. ***, $p < 0.001$ vs control; #, $p < 0.05$, ###, $p < 0.001$ vs HG + PBS. ANOVA de una vía, seguida de una prueba post-hoc de Tukey. Hiperglucemia, (HG); enzima convertidora de angiotensina (ECA); receptor tipo 1 de angiotensina II (AT₁); receptor tipo 2 de angiotensina II (AT₂); buffer de fosfatos salino, (PBS); sulfhidrato de sodio, (NaHS); DL-propargilglicina, (DL-PPG).

8. RESUMEN DE RESULTADOS

Variable	Modelo RI				Modelo HG			
	Control	RI + PBS	RI + NaHS	RI + DL-PPG	Control	HG + PBS	HG + NaHS	HG + DL-PPG
Glucosa	82.8 ± 4.3		Sin cambios		103.5±11	↑293.3±11	244.23±13.5	262.67±14.8
Insulina	8.4 ± 1.4	↑18.6 ± 3.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Índice HOMA	1.7 ± 0.3	↑4.0 ± 0.7	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Índice Matsuda	3.4 ± 0.5	↓1.6 ± 0.2	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Respuestas relajantes a Ang-(1-7)	43.1 ± 1.48%	↓21 ± 2.3%	↑26 ±1.7%	↓13.60±1.08%	52.3 ± 3.3%	↓16.81±1.2%	↑69.70±12.2%	14.63±0.2%
Respuestas contráctiles a Ang II	0.49±0.02 g	↑0.70±0.08 g	↓0.20±0.02 g	↓0.60±0.03 g	0.53±0.03 g	↓0.45±0.03 g	↑0.55±0.14 g	0.40±0.05 g
Expresión ECA	97.7±13.4%	↑193.2±9.1%	↓127±16.3%	192.9±11.6%	153.5±5.5%	↑152.7±5.9%	↓145.2±3.1%	150.8±6.5%
Expresión ECA2	112±3.7%	↓33.2±9.8%	↑110.5±27%	32.2±13%	114.3±10.7%	↓55.8±15.2%	↑126.9±16.8%	64.4±12.8%
Expresión de receptor AT ₁	97.3±4%	↑130±14.2%	↓91.6±6.6%	↓107.1±4.5%	97.3±9.2%	↑224.6±13%	↓154.3±17%	233±9.4%
Expresión del receptor AT ₂	87.5±10.1%	↓58±10.5%	↑89.7±4.5%	47±3.5%	90.2±7.3%	↓56.7±7.2%	↑92.4±3.3%	61.2±7.7%
Expresión del receptor Mas	123.7±12%	↓30.6±4.7%	↑90.4±7.8%	30.6±4.8%	125.7±5.5%	↓48.83±13.5%	↑134.9±14.5%	49.9±11.2%

----- Parámetro no determinado ↑ Incremento y ↓ disminución con respecto a control ↑ Incremento y ↓ disminución con respecto a control

La tabla muestra los resultados obtenidos después de la administración de los tratamientos farmacológicos en el modelo de RI inducido por fructosa 15% y en el modelo HG inducido por STZ neonatal.

9. DISCUSIÓN

9.1. Efecto de la fructosa y de la estreptozotocina sobre las variables metabólicas

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro modelo de RI inducido por el consumo de fructosa al 15% p/v, se observa que no hay un cambio en los niveles de glucosa durante la PTGO, pero sí se presenta un estado de hiperinsulinemia. En congruencia con estos resultados se ha descrito que el consumo de fructosa, en un alto porcentaje, contribuye al desarrollo de hiperinsulinemia (Hannou et al., 2018). Este efecto de hiperinsulinemia puede actuar como mecanismo compensador del páncreas durante la resistencia a la insulina (Sesti, 2006). Es decir, las células β del páncreas continúan secretando insulina y se consigue la regulación de los niveles de glucosa. Sin embargo, la insulina secretada tiene dañadas sus funciones fisiológicas normales o existe un defecto en su vía de señalización, lo cual lleva a que el páncreas no regule de manera correcta la cantidad de insulina que está secretando y se presente un estado de hiperinsulinemia (Motta et al., 2017; Sommese et al., 2016; Yin et al., 2013). El consumo de fructosa puede inducir RI a través de algunos mecanismos como: 1) favorecer el incremento de triglicéridos, lo cual genera un daño hepático inicial que avanza hasta producir RI a nivel periférico (Samuel, 2011), 2) disminuir la fosforilación de AKT y dañar la vía de señalización de insulina (P. Li et al., 2008) y 3) disminución en la fosforilación de residuos de tirosina del IRS, que al igual que el punto anterior, puede provocar un daño en la vía de señalización de la insulina (Bezerra et al., 2000; Ropelle et al., 2006; Samuel, 2011).

Continuando con la evaluación de las variables metabólicas, en nuestro modelo de HG donde se administró STZ, se observó que la administración neonatal de STZ incrementó significativamente los niveles sanguíneos de glucosa durante la PTGO en ratas adultas a las 12 semanas después de su administración. Similar a nuestros resultados, existe evidencia que la administración de STZ en los primeros días posteriores al nacimiento de los animales, puede dañar las células β pancreáticas y generar HG (Goyal et al., 2011; Portha et al., 1989). Debido a que el estado de HG es la principal característica de la DMT2, es importante cuidar estos niveles para evitar complicaciones micro y macrovasculares (Goyal & Jialal, 2021). Asimismo,

evaluamos el efecto del tratamiento con NaHS o DL-PPG sobre los niveles sanguíneos de glucosa. Nuestros resultados no mostraron cambios en los niveles de glucosa con los tratamientos administrados. Ciertamente, el efecto del NaHS sobre los niveles de glucosa es controversial. Así, algunos estudios, demuestran efectos metabólicos benéficos por la administración de un donador del H₂S durante la RI (Beltowski et al., 2018). Sin embargo, también se ha demostrado que la administración de NaHS durante 9 semanas aumentó los niveles de glucosa sérica en un modelo de ratas Wistar macho adulto con DMT2 inducida por una dieta rica en grasas y la administración de STZ (30 mg/kg, i.p.) (Gheibi et al., 2019). Además, en un estudio donde se empleó DL-PPG (40 mg/kg/día, i.p., durante 30 días), los resultados indicaron que ese tratamiento protegió contra la HG en ratones a los que se les administró STZ (Yang et al., 2011). La probable ausencia de cambios en nuestro trabajo podría deberse a las diferencias entre los modelos experimentales, el momento en el que se administró el NaHS o la cepa utilizada (Ghasemi & Jeddi, 2023). Debido a esto, la posibilidad de un efecto a largo plazo (más allá de las 16 semanas) o el uso de una dosis diferente de los tratamientos farmacológicos sobre los niveles de glucosa, no puede ser excluido categóricamente.

9.2. La resistencia a la insulina e hiperglucemia afectan las respuestas vasculares mediadas por el sistema renina-angiotensina en las aortas torácicas

La disfunción vascular es el desequilibrio en la producción de factores relajantes y contráctiles y es una de las complicaciones vasculares más comunes que se presenta en la RI e HG (Melo et al., 2021). Estos mecanismos subyacen a las complicaciones microvasculares y macrovasculares de la DMT2. Una de las razones principales por las que se presenta disfunción vascular es por el daño en la producción del NO (Shimokawa & Godo, 2016). Sin embargo, debido a que no es el único factor producido para la regulación del tono vascular, el estudio de otros péptidos como Ang-(1-7) y Ang II también contribuyen a conocer el estado en el que se encuentra la función vascular (Vanhoutte et al., 2017). En apoyo a esto, en las enfermedades metabólicas como la RI (Karpe & Tikoo, 2014; Viswanad et al., 2006), el síndrome metabólico (Ghatta & Ramarao, 2004) y la diabetes (Pernomian et al.,

2014) se ha reportado un decremento en la relajación inducida por Ang-(1-7) y un aumento en la contracción inducida por Ang II. Nuestros resultados muestran que las respuestas relajantes a Ang-(1-7) disminuyeron de manera significativa en el modelo de RI inducido por fructosa 15% p/v y en el modelo de HG inducido por STZ, lo cual probablemente sea debido a: 1) cambios en la expresión de receptores y enzimas relacionados con el eje ECA2/Ang-(1-7)/Mas (Pernomian et al., 2014; Qiao et al., 2015; S et al., 2021), 2) incremento en ROS (Dornas et al., 2017; Pernomian et al., 2012; Xu et al., 2022), y 3) disminución en la producción de NO, en este sentido se ha reportado que la Ang-(1-7) puede regular a la NOS, por lo que al haber disfunción vascular esta regulación se podría ver afectada (Xu et al., 2022).

Continuando con la determinación de la función vascular, en el modelo de RI, las respuestas contráctiles inducidas por Ang II incrementaron significativamente. Nuestros resultados coinciden con lo demostrado en un modelo experimental de RI inducido en ratas a través del consumo de fructosa 60% durante 8 semanas en el cual se observó un incremento significativo en la contracción inducida por Ang II (Shinozaki et al., 2004). Además, en ese mismo trabajo, los autores reportan un incremento en la expresión de los receptores AT₁, lo que confirma que los cambios en la contracción están relacionados con los receptores y con el sistema que regula a Ang II (Shinozaki et al., 2004). Sin embargo, podrían existir otros mecanismos relacionados con estas respuestas incluyendo: 1) un incremento en la formación de peroxinitritos, debido a que está reportado que el consumo de fructosa contribuye al incremento de aniones superóxido los cuales pueden reaccionar con NO y consecuentemente formar peroxinitritos (Malakul et al., 2018), y 2) una interacción de Ang II con otros factores contráctiles como ET-1 (Lin et al., 2014; Tran, MacLeod, et al., 2009). Por otro lado, en el modelo de HG, las respuestas contráctiles disminuyeron. En apoyo con nuestro trabajo, en arterias mesentéricas de animales diabéticos se ha observado un decremento en las respuestas contráctiles inducidas por Ang II (Chin et al., 2007). Estos efectos observados en nuestras condiciones podrían estar relacionadas con: 1) cambios en la expresión con el receptor AT₁ de Ang II (Pernomian et al., 2012; Qiao et al., 2015); 2) diferencias en la expresión de las proteínas G que a su vez afectan la cascada de señalización de los receptores

(Siddiqui & Hussain, 2007); y 3) daño de otros sistemas contráctiles que implican a los receptores α_1 -adrenérgicos (Edith-Rodriguez et al., 2013; Schulingkamp et al., 2005). Debido al interés que se tenía en el SRA se determinaron los niveles de Ang-(1-7) y Ang II en suero de ratas de ambos modelos experimentales, los resultados obtenidos concuerdan con reportes previos en animales diabéticos (Ding et al., 2016; Singh et al., 2008; Vallon et al., 1995), animales con síndrome metabólico (Pedrosa et al., 2023) y animales con RI (Andrade et al., 2020).

Debido a esos resultados, se evaluó la expresión de ECA y ECA2 y de los receptores Mas, AT₁, AT₂. Nuestros datos muestran que la expresión de ECA2 y del receptor Mas presentó un decremento significativo en la aorta bajo condiciones de RI e HG, lo cual es similar a lo observado en tejidos como el corazón e hígado de animales diabéticos (Moon et al., 2008; Shin et al., 2017; Wang et al., 2021) y en vasos sanguíneos renales de animales con síndrome metabólico (Wang et al., 2015). Nuestros resultados nos sugieren que la RI inducida por fructosa 15% p/v y la HG inducida por STZ podría estar afectando la síntesis de Ang-(1-7) a través del daño en la expresión de ECA2, lo que podría explicar la disminución observada del nivel sérico de este péptido. Además, esto contribuye a la disminución de las respuestas relajantes que están reguladas por el receptor Mas, el cual también presentó una disminución en la expresión. Por lo que el eje ECA2/Ang-(1-7)/Mas si está involucrado en el decremento de las respuestas relajantes en ambos modelos experimentales.

Por otro lado, en el modelo de RI, se presentó un incremento en la expresión de ECA y del receptor AT₁ y un decremento en la expresión del receptor AT₂, lo cual concuerda con resultados observados en ratas que consumieron fructosa 10% p/v durante 9 semanas (Bundalo et al., 2016). Nuevamente, estos resultados proponen que la síntesis de Ang II está regulada por ECA y que las respuestas contráctiles inducidas por Ang II se ven influenciadas por la expresión del receptor AT₁ en el modelo de RI. Este incremento en la expresión de ECA también ayuda a explicar el por qué se presenta un decremento en las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7), ya que se ha descrito que la Ang-(1-7) es degradada por ECA, sin embargo, se necesitan más estudios para apoyar esta idea en nuestro trabajo (Batlle et al.,

2012; Steckelings et al., 2022). En contraste, en el modelo de HG, la expresión de ECA no mostró cambios. Al respecto, se ha sugerido que en el sistema cardiovascular se puede presentar un deterioro en la expresión de esta enzima debido al daño que causa la diabetes lo cual puede ocurrir desde la primer semana de la enfermedad (Crespo et al., 2003). Con respecto a los resultados obtenidos en la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 , existe evidencia de resultados similares en tejido cardíaco de ratas diabéticas (Qiao et al., 2015). A pesar de la ausencia de cambios en ECA, se podría sugerir que los efectos observados en la función vascular de las respuestas contráctiles, en el modelo de HG, podrían ser debidos principalmente a los cambios observados en la expresión de los receptores AT_1 y AT_2 e incluso formación de heterodímeros entre el receptor AT_2 y el receptor Mas (Leonhardt et al., 2017).

9.3. Efectos de los tratamientos farmacológicos sobre las respuestas vasculares mediadas por el sistema renina-angiotensina en las aortas torácicas

Nuestro estudio analizó el efecto de la administración i.p. durante 4 semanas de NaHS (5.6 mg/kg) y DL-PPG (10 mg/kg) sobre las respuestas relajantes a Ang-(1-7) y las respuestas contráctiles en la aorta torácica de ratas con RI y ratas con HG. Asimismo, se determinó la expresión de ECA, ECA2, AT_1 , AT_2 y Mas.

De acuerdo con lo observado en los resultados, la administración de NaHS restableció las respuestas relajantes en ambos modelos metabólicos (RI y HG), lo cual en parte podría ser debido al incremento en los niveles de suero de Ang-(1-7) y la expresión de ECA2. En apoyo a estos resultados, Lin y colaboradores reportaron que el tratamiento con NaHS promovió la expresión de ECA2 en la arteria carótida (Lin et al., 2017). De manera interesante en el modelo de HG observamos un $E_{m\acute{a}x}$ mayor en el grupo tratado con NaHS que en el grupo control (tabla 6). Esto podría ser debido a: 1) la unión de Ang-(1-7) a otros receptores, ya que se ha descrito que el receptor Mas no es el único receptor encargado de las respuestas relajantes de Ang-(1-7), por lo que existen otros receptores como el receptor MrgD (Tetzner et al., 2016); y 2) formación de heterodímeros, debido a que el receptor Mas puede formar heterodímeros con el receptor AT_2 generando una disminución

en la presión arterial, lo cual también contribuye al mejoramiento de las respuestas relajantes (Patel & Hussain, 2018). Con respecto a las respuestas contráctiles inducidas por Ang II en el modelo de RI, la administración de NaHS disminuyó la contracción, lo cual podría estar relacionado con una disminución en la expresión de los receptores AT₁. Además, de manera interesante, en este modelo de RI encontramos que la administración de NaHS redujo aún más las respuestas contráctiles que el grupo control, lo que nos lleva a pensar que además de que el H₂S pueda estar actuando sobre ECA y AT₁, también podría interferir sobre otros compuestos implicados en el SRA. En un modelo de hipertensión renovascular se reportó que el tratamiento con NaHS (5.6 mg/kg) puede modular la liberación de renina a través de la disminución en la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), siendo la renina una enzima importante para la producción de Ang II que afectaría las respuestas contráctiles mediadas por AT₁ (Lu et al., 2010).

En el modelo de HG, la administración de NaHS disminuyó la expresión del receptor AT₁ e incrementó la expresión de AT₂, además reestableció los niveles de Ang II en suero a pesar de que no hubo cambios significativos en la expresión de ECA. Estos efectos podrían contribuir al mejoramiento de las respuestas contráctiles por parte del NaHS. Incluso el incremento en la expresión del receptor AT₂ en el grupo HG + NaHS, podría ser otra propuesta para explicar por qué las respuestas relajantes son mayores en comparación con el grupo HG.

Los resultados de las respuestas contráctiles inducidas por Ang II después de la administración de NaHS en ratas con RI y en ratas con HG, nos sugieren que: 1) existe una interacción entre el H₂S y Ang II, lo cual ha llegado a describirse en modelos de hipertensión en los que se observa una reducción en la presión arterial y estrés oxidante, además de un incremento en las respuestas relajantes inducidas por ACh, en ese trabajo los autores sugieren que el H₂S puede ejercer sus efectos protectores inhibiendo los mecanismos de Ang II e incluso una posible interacción con el receptor AT₁ (Al-Magableh et al., 2015), 2) la presencia de los efectos antioxidantes de H₂S, debido a que el H₂S es un potente reductor químico de un electrón relacionado con los radicales libres (Carballal et al., 2011; Ng et al., 2017)

y 3) el H₂S podría estar inhibiendo a ECA a través de la interacción con Zn²⁺ y así inhibir la actividad enzimática de ECA (Laggner et al., 2007).

Otra observación importante que encontramos en nuestro trabajo es que los resultados indican que el NaHS mejora la función vascular sin afectar los niveles de glucosa en sangre, lo cual muestra que la regulación se da de forma independiente. Durante la HG se producen ROS, por lo que, podría pensarse que el tratamiento con NaHS está mejorando la función vascular a través de sus efectos antioxidantes, lo cual se ha demostrado en otros modelos que no son metabólicos (Al-Magableh et al., 2015; Lopez-Preza et al., 2023).

Finalmente, evaluamos los efectos del tratamiento con DL-PPG en el modelo de RI y en el de HG. En nuestro modelo de RI encontramos que la administración de DL-PPG disminuyó significativamente la pEC₅₀ de las respuestas contráctiles y la expresión del receptor AT₁. La disminución en la expresión de este receptor podría estar relacionada con el efecto disminuido en la contracción. Además, esto nos permite conocer que bajo nuestras condiciones experimentales en el modelo de RI, el H₂S podría tener efectos duales, lo cual se ha llegado a observar en modelos metabólicos (Geng et al., 2013). En este punto, es importante mencionar que la producción de H₂S en los vasos sanguíneos no depende únicamente de la enzima CSE, sino también de las enzimas CBS y 3-MST (Cirino et al., 2023). Contrario a esto, en el modelo de HG, la administración de DL-PPG no produjo cambios al compararse contra el grupo HG + PBS, lo cual nos indicaría que en el modelo de HG los efectos benéficos son mayormente regulados por el H₂S exógeno.

Es cierto que no podemos comparar ambos modelos porque fueron inducidos de manera diferente. Sin embargo, este trabajo nos permite conocer los efectos del H₂S sobre las respuestas vasculares mediadas por SRA en un estado de RI que es el paso previo al establecimiento de la DMT2 y en un estado donde se incrementa la glucosa, lo cual demuestra una vez más que el H₂S tiene funciones importantes en el sistema cardiovascular.

Con la finalidad de dar a conocer nuestros resultados de manera esquemática, en la Fig. 26 y 27 se presenta una explicación de los resultados obtenidos y de los

posibles mecanismos que se podrían estar activando en el modelo de RI y en el modelo de HG, respectivamente. En ambas figuras de lado izquierdo se encuentra la función fisiológica normal del vaso y del lado izquierdo la patología.

En la Fig. 26 se muestra que en condiciones fisiológicas normales el SRA funciona de manera adecuada, es decir, la expresión de ECA y ECA2 permite la síntesis de los péptidos Ang II y Ang-(1-7), los cuales a su vez se unen a sus respectivos receptores como AT₁ y AT₂ para Ang II y el receptor Mas para Ang-(1-7), de tal manera que la regulación de la función vascular se encuentra funcionando de manera correcta. En nuestros resultados demostramos que cuando se desarrollaba RI los niveles de Ang-(1-7) disminuían y los niveles de Ang II incrementaban significativamente, además de esto la expresión de los receptores AT₂ y Mas disminuyeron y la expresión del receptor AT₁ incrementó de manera significativa, lo cual probablemente contribuya a un daño en la vía de señalización y consecuentemente se presente disfunción vascular. De manera interesante, el tratamiento con NaHS revirtió estas respuestas lo cual nos indica que este gasotransmisor podría estar previniendo el desarrollo de RI. Además, es importante mencionar que en este modelo observamos que el H₂S puede tener efectos duales, ya que el tratamiento crónico con DL-PPG disminuyó la expresión de los receptores AT₁ y la pEC₅₀ de las respuestas contráctiles inducidas por Ang II.

Por otro lado, en la Fig. 27 se presenta el modelo de HG, de lado izquierdo tenemos la función fisiológica normal del SRA como se describió en la Fig. 26. Cuando se indujo HG observamos que los niveles de Ang-(1-7), Ang II, expresión de ECA2, AT₁, Mas y AT₂ disminuyeron significativamente lo cual contribuiría a que se presente disfunción vascular. Nuevamente en este modelo el H₂S revirtió los efectos generados por la HG.

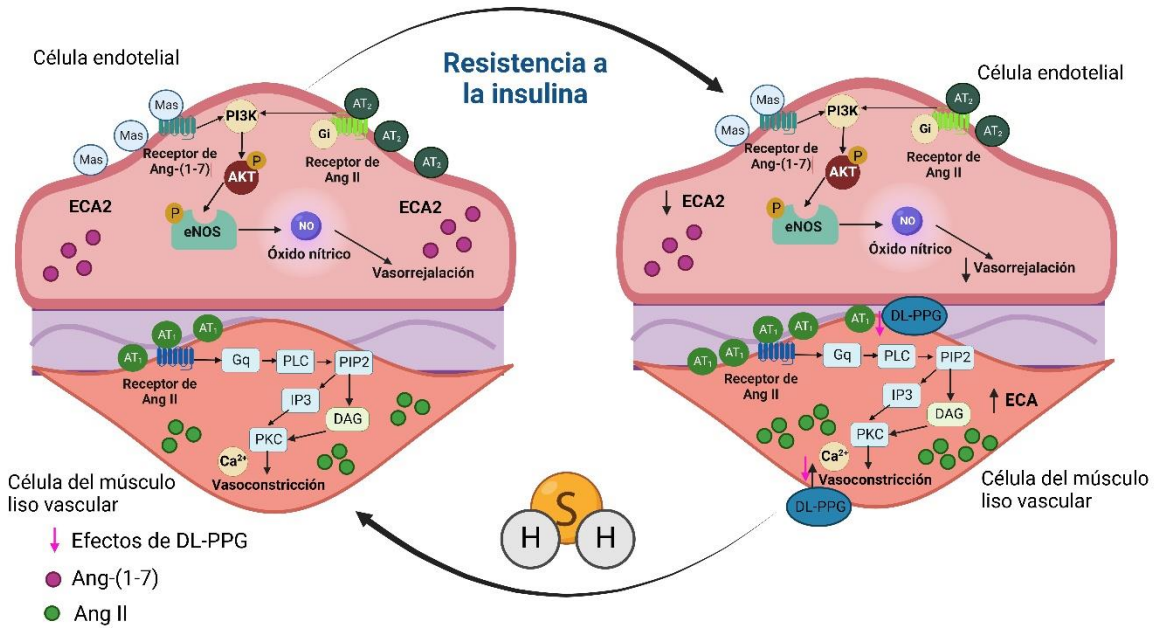


Fig. 26. Resumen de resultados y posibles mecanismos involucrados en el modelo de resistencia a la insulina. Durante la RI se presenta una disminución en las respuestas relajantes y un incremento en las respuestas contráctiles, probablemente por la reducción en los receptores Mas, expresión de ECA2, niveles de Ang-(1-7) e incremento en niveles de Ang II y receptores AT₁, lo cual fue restablecido por el H₂S. En este modelo observamos los efectos duales del H₂S debido a que DL-PPG modificó la expresión de AT₁ y las respuestas contráctiles. Resistencia a la insulina, (RI); fosfatidilinositol 3-cinasa, (PI3K); proteína cinasa B, (AKT); óxido nítrico sintasa endotelial, (eNOS); óxido nítrico, (NO); enzima convertidora de angiotensina tipo 2, (ECA2); diacilglicerol, (DAG); fosfolipasa C, (PLC); proteína quinasa C, (PKC); inositol polifosfato 5-fosfatasa, (PIP2).

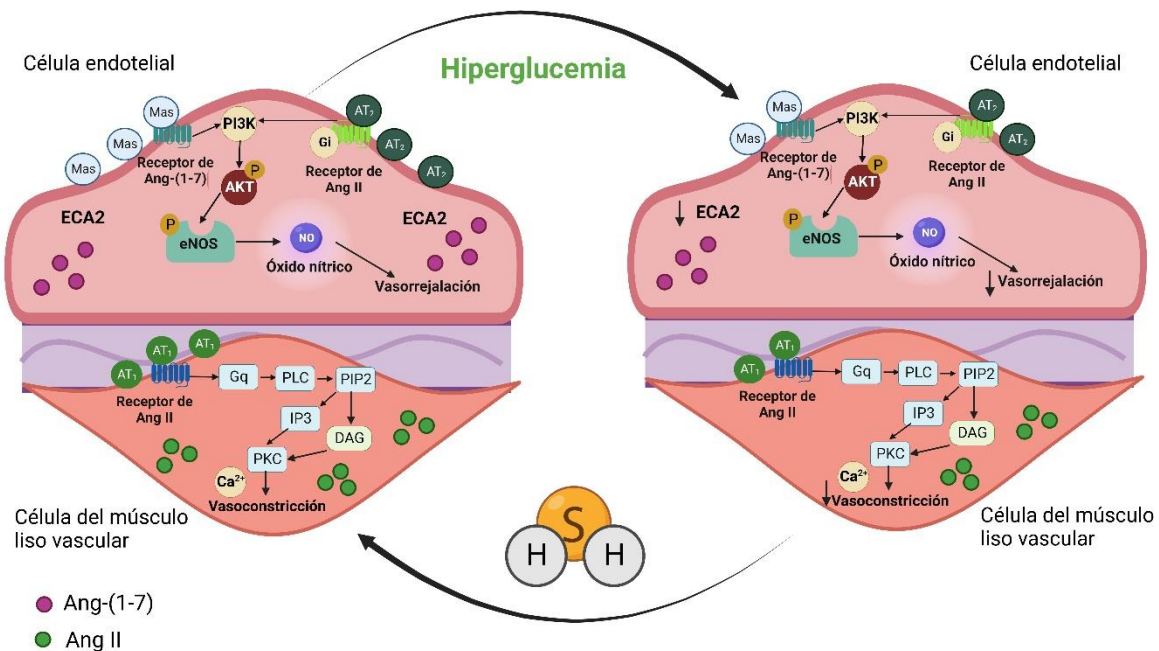


Fig. 27. Resumen de resultados y posibles mecanismos involucrados en el modelo de hiperglucemia. Durante la HG se presenta una disminución en las respuestas relajantes y contráctiles, probablemente por la reducción en los receptores Mas, expresión de ECA2, niveles de Ang-(1-7) y niveles de Ang II, lo cual fue restablecido por el H₂S. Hiperglucemia, (HG); fosfatidilinositol 3-cinasa, (PI3K); proteína cinasa B, (AKT); óxido nítrico sintasa endotelial, (eNOS); óxido nítrico, (NO); enzima convertidora de angiotensina tipo 2, (ECA2); diacilglicerol, (DAG); fosfolipasa C, (PLC); proteína quinasa C, (PKC); inositol polifosfato 5-fosfatasa, (PIP2).

10. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales indican que durante la resistencia a la insulina y la hiperglucemia se altera el SRA y sus respuestas vasculares. El donador de sulfuro de hidrógeno (NaHS) mejora de manera significativa la función vascular a través de la estimulación del eje ECA2/Ang-(1-7) /Mas y la disminución del eje ECA/Ang II/AT₁. Además, el sulfuro de hidrógeno tiene efectos duales durante la resistencia a la insulina. Estos datos contribuyen a la evidencia de que el H₂S influye en las complicaciones vasculares ocasionadas por estas enfermedades metabólicas.

11. PERSPECTIVAS

- 11.1.** Debido a que en el modelo de HG no observamos cambios en los niveles de glucosa al administrar los tratamientos farmacológicos lo cual difiere con algunos reportes, sería interesante analizar otras dosis de NaHS que pudieran modificar los niveles de glucosa.
- 11.2.** Los cambios vasculares observados podrían indicarnos que las enzimas encargadas de la producción de H₂S se encuentran afectadas, por lo que, sería interesante analizar la expresión de estas enzimas en la aorta torácica de animales hiperglucémicos y animales con resistencia a la insulina.
- 11.3.** Cuando los receptores de Ang-(1-7) y Ang II se activan, desencadenan una vía de señalización que a su vez activa otras enzimas, dado que en ambos modelos encontramos cambios en la expresión de los receptores AT₁, AT₂ y Mas sería necesario determinar la expresión de algunas enzimas como IP3, eNOS y AKT para tener conocimiento del punto donde posiblemente podría ocurrir el daño en la vía de señalización.
- 11.4.** En modelos metabólicos, como los empleados en este trabajo, se ha reportado un incremento en el estrés oxidante, por lo que determinar ROS contribuiría a proponer otro mecanismo por el cual se esté presentando un daño a nivel vascular.
- 11.5.** Debido a que en el modelo de HG observamos que el tratamiento con NaHS incrementó las respuestas relajantes inducidas por Ang-(1-7), incluso un poco más que las respuestas observadas en el grupo control, se podría evaluar la formación de heterodímeros, principalmente los que se forman entre el receptor AT₂ y Mas dado que se ha reportado que esos heterodímeros pueden disminuir las respuestas altas de presión arterial.
- 11.6.** En nuestro laboratorio se han probado dosis de DL-PPG de 1 mg/kg en un modelo de obesidad. Dado que en el modelo de RI observamos cambios con el tratamiento de DL-PPG (10 mg/kg), sería importante evaluar los efectos de otras dosis en este modelo debido a que aportaría más información sobre los efectos duales del H₂S.

12. REFERENCIAS

- Abe, K., Hori, Y., & Myoda, T. (2020). Volatile compounds of fresh and processed garlic. *Exp Ther Med*, 19(2), 1585-1593. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8394>
- Abe, K., & Kimura, H. (1996). The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*, 16(3), 1066-1071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
- Ahmad, F. U., Sattar, M. A., Rathore, H. A., Tan, Y. C., Akhtar, S., Jin, O. H., Pei, Y. P., Abdullah, N. A., & Johns, E. J. (2014). Hydrogen sulphide and tempol treatments improve the blood pressure and renal excretory responses in spontaneously hypertensive rats. *Ren Fail*, 36(4), 598-605. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.882218>
- Al-Magableh, M. R., Kemp-Harper, B. K., & Hart, J. L. (2015). Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice. *Hypertens Res*, 38(1), 13-20. <https://doi.org/10.1038/hr.2014.125>
- Ali, Q., Wu, Y., & Hussain, T. (2013). Chronic AT2 receptor activation increases renal ACE2 activity, attenuates AT1 receptor function and blood pressure in obese Zucker rats. *Kidney Int*, 84(5), 931-939. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.193>
- Andrade, N., Andrade, S., Silva, C., Rodrigues, I., Guardao, L., Guimaraes, J. T., Keating, E., & Martel, F. (2020). Chronic consumption of the dietary polyphenol chrysin attenuates metabolic disease in fructose-fed rats. *Eur J Nutr*, 59(1), 151-165. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01895-9>
- Aysert Yildiz, P., Ozdil, T., Dizbay, M., Guzel Tunccan, O., & Hizel, K. (2018). Peripheral arterial disease increases the risk of multidrug-resistant bacteria and amputation in diabetic foot infections. *Turk J Med Sci*, 48(4), 845-850. <https://doi.org/10.3906/sag-1803-217>
- Baber, S. R., Deng, W., Rodriguez, J., Master, R. G., Bivalacqua, T. J., Hyman, A. L., & Kadowitz, P. J. (2005). Vasoactive prostanoids are generated from

- arachidonic acid by COX-1 and COX-2 in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(4), H1476-1487. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00195.2005>
- Battle, D., Wysocki, J., Soler, M. J., & Ranganath, K. (2012). Angiotensin-converting enzyme 2: enhancing the degradation of angiotensin II as a potential therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 81(6), 520-528. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.381>
- Bazotte, R. B., Silva, L. G., & Schiavon, F. P. (2014). Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle*, 13(16), 2494-2500. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.947750>
- Beauchamp, R. O., Jr., Bus, J. S., Popp, J. A., Boreiko, C. J., & Andjelkovich, D. A. (1984). A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol*, 13(1), 25-97. <https://doi.org/10.3109/10408448409029321>
- Beltowski, J., Wojcicka, G., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.004>
- Bezerra, R. M., Ueno, M., Silva, M. S., Tavares, D. Q., Carvalho, C. R., & Saad, M. J. (2000). A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr*, 130(6), 1531-1535. <https://doi.org/10.1093/jn/130.6.1531>
- Bibli, S. I., Hu, J., Looso, M., Weigert, A., Ratiu, C., Wittig, J., Drekolia, M. K., Tombor, L., Randriamboavonjy, V., Leisegang, M. S., Goymann, P., Delgado Lagos, F., Fisslthaler, B., Zukunft, S., Kyselova, A., Justo, A. F. O., Heidler, J., Tsilimigras, D., Brandes, R. P., . . . Fleming, I. (2021). Mapping the Endothelial Cell S-Sulfhydryl Highlights the Crucial Role of Integrin Sulfhydration in Vascular Function. *Circulation*, 143(9), 935-948. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.051877>
- Boucher, J., Kleinridders, A., & Kahn, C. R. (2014). Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009191>

- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Zaid, A., Giannogonas, P., Cantalupo, A., Dhayade, S., Karalis, K. P., Wang, R., Feil, R., & Cirino, G. (2012). cGMP-dependent protein kinase contributes to hydrogen sulfide-stimulated vasorelaxation. *PLoS One*, 7(12), e53319. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053319>
- Bundalo, M. M., Zivkovic, M. D., Romic, S., Tepavcevic, S. N., Koricanac, G. B., Djuric, T. M., & Stankovic, A. D. (2016). Fructose-rich diet induces gender-specific changes in expression of the renin-angiotensin system in rat heart and upregulates the ACE/AT1R axis in the male rat aorta. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 17(2), 1470320316642915. <https://doi.org/10.1177/1470320316642915>
- Cao, X., Ding, L., Xie, Z. Z., Yang, Y., Whiteman, M., Moore, P. K., & Bian, J. S. (2019). A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? *Antioxid Redox Signal*, 31(1), 1-38. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7058>
- Carballal, S., Trujillo, M., Cuevasanta, E., Bartesaghi, S., Moller, M. N., Folkes, L. K., Garcia-Bereguain, M. A., Gutierrez-Merino, C., Wardman, P., Denicola, A., Radi, R., & Alvarez, B. (2011). Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest. *Free Radic Biol Med*, 50(1), 196-205. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.705>
- Centeno, J. M., Lopez-Morales, M. A., Aliena-Valero, A., Jover-Mengual, T., Burguete, M. C., Castello-Ruiz, M., & Miranda, F. J. (2019). Potassium channels contribute to the increased sensitivity of the rabbit carotid artery to hydrogen sulfide in diabetes. *Eur J Pharmacol*, 853, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.019>
- Chen, X., Zhao, X., Lan, F., Zhou, T., Cai, H., Sun, H., Kong, W., & Kong, W. (2017). Hydrogen Sulphide Treatment Increases Insulin Sensitivity and Improves Oxidant Metabolism through the CaMKKbeta-AMPK Pathway in PA-Induced IR C2C12 Cells. *Sci Rep*, 7(1), 13248. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13251-0>

- Chin, L. C., Achike, F. I., & Mustafa, M. R. (2007). Hydrogen peroxide modulates angiotensin II-induced contraction of mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats. *Vascul Pharmacol*, 46(3), 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.10.005>
- Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., 3rd, Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., & Birnbaum, M. J. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*, 292(5522), 1728-1731. <https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728>
- Cirino, G., Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2023). Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs. *Physiol Rev*, 103(1), 31-276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2021>
- Coletta, C., Papapetropoulos, A., Erdelyi, K., Olah, G., Modis, K., Panopoulos, P., Asimakopoulou, A., Gero, D., Sharina, I., Martin, E., & Szabo, C. (2012). Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(23), 9161-9166. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202916109>
- Cooper, A. J. (1983). Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem*, 52, 187-222. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.001155>
- Crespo, M. J., Moreta, S., & Gonzalez, J. (2003). Cardiovascular deterioration in STZ-diabetic rats: possible role of vascular RAS. *Pharmacology*, 68(1), 1-8. <https://doi.org/10.1159/000068725>
- Czech, M. P., Tencerova, M., Pedersen, D. J., & Aouadi, M. (2013). Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia*, 56(5), 949-964. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2869-1>
- Dalen, J. E., Alpert, J. S., Goldberg, R. J., & Weinstein, R. S. (2014). The epidemic of the 20(th) century: coronary heart disease. *Am J Med*, 127(9), 807-812. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2014.04.015>
- De Meyts, P. (2000). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In K. R. Feingold, B. Anawalt, M. R. Blackman, A. Boyce, G. Chrousos, E. Corpas, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. Hofland, S. Kalra, G.

- Kaltsas, N. Kapoor, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrere, M. Levy, E. A. McGee, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Sahay, A. S. Shah, F. Singer, M. A. Sperling, C. A. Stratakis, D. L. Trencce, & D. P. Wilson (Eds.), *Endotext*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27512793>
- DeFronzo, R. A., & Tripathy, D. (2009). Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *32 Suppl 2*, S157-163.
<https://doi.org/10.2337/dc09-S302>
- Dhar, I., Svingen, G. F. T., Pedersen, E. R., DeRatt, B., Ulvik, A., Strand, E., Ueland, P. M., Bonna, K. H., Gregory, J. F., & Nygard, O. K. (2018). Plasma cystathionine and risk of acute myocardial infarction among patients with coronary heart disease: Results from two independent cohorts. *Int J Cardiol*, *266*, 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.04.083>
- Ding, D., Du, Y., Qiu, Z., Yan, S., Chen, F., Wang, M., Yang, S., Zhou, Y., Hu, X., Deng, Y., Wang, S., Wang, L., Zhang, H., Wu, H., Yu, X., Zhou, Z., Liao, Y., & Chen, X. (2016). Vaccination against type 1 angiotensin receptor prevents streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *J Mol Med (Berl)*, *94(2)*, 207-218. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1343-6>
- Dombkowski, R. A., Russell, M. J., & Olson, K. R. (2004). Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *286(4)*, R678-685.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00419.2003>
- Dominici, F. P., Burghi, V., Munoz, M. C., & Giani, J. F. (2014). Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7). *Clin Sci (Lond)*, *126(9)*, 613-630.
<https://doi.org/10.1042/CS20130333>
- Dominici, F. P., Veiras, L. C., Shen, J. Z. Y., Bernstein, E. A., Quiroga, D. T., Steckelings, U. M., Bernstein, K. E., & Giani, J. F. (2020). Activation of AT2 receptors prevents diabetic complications in female db/db mice by NO-mediated mechanisms. *Br J Pharmacol*, *177(20)*, 4766-4781.
<https://doi.org/10.1111/bph.15241>

- Dornas, W. C., Cardoso, L. M., Silva, M., Machado, N. L., Chianca, D. A., Jr., Alzamora, A. C., Lima, W. G., Lagente, V., & Silva, M. E. (2017). Oxidative stress causes hypertension and activation of nuclear factor-kappaB after high-fructose and salt treatments. *Sci Rep*, 7, 46051. <https://doi.org/10.1038/srep46051>
- Du, J., Fan, L. M., Mai, A., & Li, J. M. (2013). Crucial roles of Nox2-derived oxidative stress in deteriorating the function of insulin receptors and endothelium in dietary obesity of middle-aged mice. *Br J Pharmacol*, 170(5), 1064-1077. <https://doi.org/10.1111/bph.12336>
- Du, Q., Zhang, S., Li, A., Mohammad, I. S., Liu, B., & Li, Y. (2018). Astragaloside IV Inhibits Adipose Lipolysis and Reduces Hepatic Glucose Production via Akt Dependent PDE3B Expression in HFD-Fed Mice. *Front Physiol*, 9, 15. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00015>
- Duvel, K., Yecies, J. L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A. I., Souza, A. L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M. G., MacKeigan, J. P., Finan, P. M., Clish, C. B., Murphy, L. O., & Manning, B. D. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*, 39(2), 171-183. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>
- Edgerton, D. S., Lautz, M., Scott, M., Everett, C. A., Stettler, K. M., Neal, D. W., Chu, C. A., & Cherrington, A. D. (2006). Insulin's direct effects on the liver dominate the control of hepatic glucose production. *J Clin Invest*, 116(2), 521-527. <https://doi.org/10.1172/JCI27073>
- Edith-Rodriguez, J., Resendiz-Albor, A. A., Arciniega-Martinez, I. M., Campos-Rodriguez, R., Hong, E., Huang, F., & Villafana, S. (2013). Effect of early diabetes on the expression of alpha-1 adrenergic receptors in aorta and carotid arteries of Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 35(6), 389-395. <https://doi.org/10.3109/10641963.2012.739233>
- ElSayed, N. A., Aleppo, G., Aroda, V. R., Bannuru, R. R., Brown, F. M., Bruemmer, D., Collins, B. S., Hilliard, M. E., Isaacs, D., Johnson, E. L., Kahan, S., Khunti, K., Leon, J., Lyons, S. K., Perry, M. L., Prahalad, P., Pratley, R. E., Seley, J.

- J., Stanton, R. C., . . . American Diabetes, A. (2023). Erratum. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Care in Diabetes-2023. *Diabetes Care* 2023;46(Suppl. 1):S19-S40. *Diabetes Care*, 46(5), 1106. <https://doi.org/10.2337/dc23-er05>
- Felton, J. S. (1997). The heritage of Bernardino Ramazzini. *Occup Med (Lond)*, 47(3), 167-179. <https://doi.org/10.1093/occmed/47.3.167>
- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., & Banerjee, R. (2018). Chemical Biology of H(2)S Signaling through Persulfidation. *Chem Rev*, 118(3), 1253-1337. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00205>
- Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*, 1(5), 228-237. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(90\)90070-2](https://doi.org/10.1016/0955-2863(90)90070-2)
- Fritsche, L., Weigert, C., Haring, H. U., & Lehmann, R. (2008). How insulin receptor substrate proteins regulate the metabolic capacity of the liver--implications for health and disease. *Curr Med Chem*, 15(13), 1316-1329. <https://doi.org/10.2174/092986708784534956>
- Geng, B., Cai, B., Liao, F., Zheng, Y., Zeng, Q., Fan, X., Gong, Y., Yang, J., Cui, Q. H., Tang, C., & 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073892>
- Ghasemi, A., & Jeddi, S. (2023). Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: a practical guide. *EXCLI J*, 22, 274-294. <https://doi.org/10.17179/excli2022-5720>
- Ghatta, S., & Ramarao, P. (2004). Increased contractile responses to 5-Hydroxytryptamine and Angiotensin II in high fat diet fed rat thoracic aorta. *Lipids Health Dis*, 3, 19. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-3-19>
- Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2019). Effects of Hydrogen Sulfide on Carbohydrate Metabolism in Obese Type 2 Diabetic Rats. *Molecules*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/molecules24010190>
- Godo, S., & Shimokawa, H. (2017). Endothelial Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37(9), e108-e114. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309813>

- Gomez, C. B., de la Cruz, S. H., Medina-Terol, G. J., Beltran-Ornelas, J. H., Sanchez-Lopez, A., Silva-Velasco, D. L., & Centurion, D. (2019). Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restores cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats. *Eur J Pharmacol*, *863*, 172707. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172707>
- Goodwin, L. R., Francom, D., Dieken, F. P., Taylor, J. D., Warenycia, M. W., Reiffenstein, R. J., & Dowling, G. (1989). Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol*, *13*(2), 105-109. <https://doi.org/10.1093/jat/13.2.105>
- Goyal, B. R., Parmar, K., Goyal, R. K., & Mehta, A. A. (2011). Beneficial role of telmisartan on cardiovascular complications associated with STZ-induced type 2 diabetes in rats. *Pharmacol Rep*, *63*(4), 956-966. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(11\)70611-9](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(11)70611-9)
- Goyal, R., & Jialal, I. (2021). Diabetes Mellitus Type 2. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30020625>
- Graus-Nunes, F., & Souza-Mello, V. (2019). The renin-angiotensin system as a target to solve the riddle of endocrine pancreas homeostasis. *Biomed Pharmacother*, *109*, 639-645. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.191>
- Hannou, S. A., Haslam, D. E., McKeown, N. M., & Herman, M. A. (2018). Fructose metabolism and metabolic disease. *J Clin Invest*, *128*(2), 545-555. <https://doi.org/10.1172/JCI96702>
- He, A., Shen, J., Xue, Y., Xiang, L., Li, Y., Huang, L., Lv, D., & Luo, M. (2021). Diacerein attenuates vascular dysfunction by reducing inflammatory response and insulin resistance in type 2 diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun*, *585*, 68-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.017>
- Hernandez-Munive, A. K., Rebolledo-Solleiro, D., & Fernandez-Guasti, A. (2019). Does Chronic Hyperglycemia Affect Female Rat Sexual Behavior? Differences in Paced and Non-Paced Mating. *J Sex Med*, *16*(8), 1130-1142. <https://doi.org/10.1016/j.jsxm.2019.05.017>

- Huang, C. W., & Moore, P. K. (2015). H₂S Synthesizing Enzymes: Biochemistry and Molecular Aspects. *Handb Exp Pharmacol*, 230, 3-25. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18144-8_1
- Huerta de la Cruz, S., Medina-Terol, G. J., Tapia-Martinez, J. A., Silva-Velasco, D. L., Beltran-Ornelas, J. H., Sanchez-Lopez, A., Sancho, M., & Centurion, D. (2023). Hydrogen sulfide as a neuromodulator of the vascular tone. *Eur J Pharmacol*, 940, 175455. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022.175455>
- Huerta de la Cruz, S., Rocha, L., Santiago-Castaneda, C., Sanchez-Lopez, A., Pinedo-Rodriguez, A. D., Medina-Terol, G. J., & Centurion, D. (2022). Hydrogen Sulfide Subchronic Treatment Improves Hypertension Induced by Traumatic Brain Injury in Rats through Vasopressor Sympathetic Outflow Inhibition. *J Neurotrauma*, 39(1-2), 181-195. <https://doi.org/10.1089/neu.2020.7552>
- Hunyady, L., & Catt, K. J. (2006). Pleiotropic AT₁ receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol*, 20(5), 953-970. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0536>
- Ishii, I., Akahoshi, N., Yu, X. N., Kobayashi, Y., Namekata, K., Komaki, G., & Kimura, H. (2004). Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J*, 381(Pt 1), 113-123. <https://doi.org/10.1042/BJ20040243>
- James, D. E., Stockli, J., & Birnbaum, M. J. (2021). The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(11), 751-771. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00390-6>
- Kang, J., Li, Z., Organ, C. L., Park, C. M., Yang, C. T., Pacheco, A., Wang, D., Lefer, D. J., & Xian, M. (2016). pH-Controlled Hydrogen Sulfide Release for Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Chem Soc*, 138(20), 6336-6339. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b01373>
- Karpe, P. A., & Tikoo, K. (2014). Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling. *Diabetes*, 63(3), 1124-1139. <https://doi.org/10.2337/db13-1267>

- Kim, K. H., Song, M. J., Yoo, E. J., Choe, S. S., Park, S. D., & Kim, J. B. (2004). Regulatory role of glycogen synthase kinase 3 for transcriptional activity of ADD1/SREBP1c. *J Biol Chem*, 279(50), 51999-52006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405522200>
- Kimura, H. (2014). Production and physiological effects of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*, 20(5), 783-793. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5309>
- Kobayashi, T., Hayashi, Y., Taguchi, K., Matsumoto, T., & Kamata, K. (2006). ANG II enhances contractile responses via PI3-kinase p110 delta pathway in aortas from diabetic rats with systemic hyperinsulinemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(2), H846-853. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01349.2005>
- Kohn, C., Schleifenbaum, J., Szijarto, I. A., Marko, L., Dubrovskaja, G., Huang, Y., & Gollasch, M. (2012). Differential effects of cystathionine-gamma-lyase-dependent vasodilatory H₂S in periaortic vasoregulation of rat and mouse aortas. *PLoS One*, 7(8), e41951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041951>
- Laggner, H., Hermann, M., Esterbauer, H., Muellner, M. K., Exner, M., Gmeiner, B. M., & Kapiotis, S. (2007). The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells. *J Hypertens*, 25(10), 2100-2104. <https://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32829b8fd0>
- Lee, J. H., Xia, S., & Ragolia, L. (2008). Upregulation of AT₂ receptor and iNOS impairs angiotensin II-induced contraction without endothelium influence in young normotensive diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(1), R144-154. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00191.2008>
- Leonhardt, J., Villela, D. C., Teichmann, A., Munter, L. M., Mayer, M. C., Mardahl, M., Kirsch, S., Namsolleck, P., Lucht, K., Benz, V., Alenina, N., Daniell, N., Horiuchi, M., Iwai, M., Multhaup, G., Schulein, R., Bader, M., Santos, R. A., Unger, T., & Steckelings, U. M. (2017). Evidence for Heterodimerization and Functional Interaction of the Angiotensin Type 2 Receptor and the Receptor MAS. *Hypertension*, 69(6), 1128-1135. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08814>

- Lewis, G. F., Vranic, M., & Giacca, A. (1997). Glucagon enhances the direct suppressive effect of insulin on hepatic glucose production in humans. *Am J Physiol*, 272(3 Pt 1), E371-378. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.272.3.E371>
- Li, L., Whiteman, M., Guan, Y. Y., Neo, K. L., Cheng, Y., Lee, S. W., Zhao, Y., Baskar, R., Tan, C. H., & 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. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.753467>
- Li, P., Koike, T., Qin, B., Kubota, M., Kawata, Y., Jia, Y. J., & Oshida, Y. (2008). A high-fructose diet impairs Akt and PKCzeta phosphorylation and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle. *Horm Metab Res*, 40(8), 528-532. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1073162>
- Lin, Y., Zeng, H., Gao, L., Gu, T., Wang, C., & Zhang, H. (2017). Hydrogen Sulfide Attenuates Atherosclerosis in a Partially Ligated Carotid Artery Mouse model via Regulating Angiotensin Converting Enzyme 2 Expression. *Front Physiol*, 8, 782. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00782>
- Lin, Y. J., Kwok, C. F., Juan, C. C., Hsu, Y. P., Shih, K. C., Chen, C. C., & Ho, L. T. (2014). Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 451(2), 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.119>
- Liu, Z., Han, Y., Li, L., Lu, H., Meng, G., Li, X., Shirhan, M., Peh, M. T., Xie, L., Zhou, S., Wang, X., Chen, Q., Dai, W., Tan, C. H., Pan, S., Moore, P. K., & Ji, Y. (2013). The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E(-/-) mice. *Br J Pharmacol*, 169(8), 1795-1809. <https://doi.org/10.1111/bph.12246>
- Lobov, G. I. (2020a). Relaxing Effect of Hydrogen Sulfide on Isolated Bovine Mesenteric Lymph Nodes. *Bull Exp Biol Med*, 169(2), 192-196. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04848-z>

- Lobov, G. I. (2020b). The Role of Hydrogen Sulfide in the Dilatation of Mesenteric Lymphatic Vessels in Bulls. *Bull Exp Biol Med*, 169(3), 302-305. <https://doi.org/10.1007/s10517-020-04874-x>
- Lopez-Preza, F. I., Huerta de la Cruz, S., Santiago-Castaneda, C., Silva-Velasco, D. L., Beltran-Ornelas, J. H., Tapia-Martinez, J., Sanchez-Lopez, A., Rocha, L., & Centurion, D. (2023). Hydrogen sulfide prevents the vascular dysfunction induced by severe traumatic brain injury in rats by reducing reactive oxygen species and modulating eNOS and H(2)S-synthesizing enzyme expression. *Life Sci*, 312, 121218. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.121218>
- Lu, M., Liu, Y. H., Goh, H. S., Wang, J. J., Yong, Q. C., Wang, R., & Bian, J. S. (2010). Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity. *J Am Soc Nephrol*, 21(6), 993-1002. <https://doi.org/10.1681/ASN.2009090949>
- Mahmoud, M. F., El-Nagar, M., & El-Bassossy, H. M. (2012). Anti-inflammatory effect of atorvastatin on vascular reactivity and insulin resistance in fructose fed rats. *Arch Pharm Res*, 35(1), 155-162. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0117-8>
- Malakul, W., Pengnet, S., Kumchoom, C., & Tunsophon, S. (2018). Naringin ameliorates endothelial dysfunction in fructose-fed rats. *Exp Ther Med*, 15(3), 3140-3146. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5759>
- Martelli, A., Testai, L., Citi, V., Marino, A., Bellagambi, F. G., Ghimenti, S., Breschi, M. C., & Calderone, V. (2014). Pharmacological characterization of the vascular effects of aryl isothiocyanates: is hydrogen sulfide the real player? *Vascul Pharmacol*, 60(1), 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2013.11.003>
- Martínez Basila, A., Maldonado Hernández, J., & López Alarcón, M. (2011). Métodos diagnósticos de la resistencia a la insulina en la población pediátrica. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 68, 397-404. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462011000500010&nrm=iso

- Matsuda, M., & DeFronzo, R. A. (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care*, 22(9), 1462-1470. <https://doi.org/10.2337/diacare.22.9.1462>
- Melo, B. F., Prieto-Lloret, J., Cabral, M. D., Martins, F. O., Martins, I. B., Sacramento, J. F., Ruivo, P., Carvalho, T., & Conde, S. V. (2021). Type 2 diabetes progression differently affects endothelial function and vascular contractility in the aorta and the pulmonary artery. *Sci Rep*, 11(1), 6052. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85606-7>
- Meng, G., Zhu, J., Xiao, Y., Huang, Z., Zhang, Y., Tang, X., Xie, L., Chen, Y., Shao, Y., Ferro, A., Wang, R., Moore, P. K., & Ji, Y. (2015). Hydrogen Sulfide Donor GYY4137 Protects against Myocardial Fibrosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 691070. <https://doi.org/10.1155/2015/691070>
- Mercurio, V., Carlomagno, G., Fazio, V., & Fazio, S. (2012). Insulin resistance: Is it time for primary prevention? *World J Cardiol*, 4(1), 1-7. <https://doi.org/10.4330/wjc.v4.i1.1>
- Mirabito Colafella, K. M., Bovee, D. M., & Danser, A. H. J. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Exp Eye Res*, 186, 107680. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.020>
- Mishanina, T. V., Libiad, M., & Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nat Chem Biol*, 11(7), 457-464. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1834>
- Moon, J. Y., Jeong, K. H., Lee, S. H., Lee, T. W., Ihm, C. G., & Lim, S. J. (2008). Renal ACE and ACE2 expression in early diabetic rats. *Nephron Exp Nephrol*, 110(1), e8-e16. <https://doi.org/10.1159/000149586>
- Motta, V. F., Bargut, T. L., Aguila, M. B., & Mandarim-de-Lacerda, C. A. (2017). Treating fructose-induced metabolic changes in mice with high-intensity interval training: insights in the liver, white adipose tissue, and skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985), 123(4), 699-709. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00154.2017>
- Mustafa, A. K., Sikka, G., Gazi, S. K., Steppan, J., Jung, S. M., Bhunia, A. K., Barodka, V. M., Gazi, F. K., Barrow, R. K., Wang, R., Amzel, L. M., Berkowitz,

- D. E., & Snyder, S. H. (2011). Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels. *Circ Res*, *109*(11), 1259-1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240242>
- Mustapha, S., Azemi, A. K., Wan Ahmad, W. A. N., Rasool, A. H. G., Mustafa, M. R., & Mokhtar, S. S. (2022). Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress Improves Acetylcholine-Mediated Relaxation in the Aorta of Type-2 Diabetic Rats. *Molecules*, *27*(16). <https://doi.org/10.3390/molecules27165107>
- National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, A. (2011). The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press (US)
- Copyright © 2011, National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.17226/12910>
- Ng, H. H., Yildiz, G. S., Ku, J. M., Miller, A. A., Woodman, O. L., & 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. <https://doi.org/10.1177/1479164117692766>
- Nicholls, P., & Kim, J. K. (1981). Oxidation of sulphide by cytochrome aa3. *Biochim Biophys Acta*, *637*(2), 312-320. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(81\)90170-5](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90170-5)
- Okamoto, M., Yamaoka, M., Takei, M., Ando, T., Taniguchi, S., Ishii, I., Tohya, K., Ishizaki, T., Niki, I., & Kimura, T. (2013). Endogenous hydrogen sulfide protects pancreatic beta-cells from a high-fat diet-induced glucotoxicity and prevents the development of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, *442*(3-4), 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.023>
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M. G., Branski, L. K., Herndon, D. N., Wang, R., & Szabo, C. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(51), 21972-21977. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908047106>

- Papapetropoulos, A., Whiteman, M., & Cirino, G. (2015). Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. *Br J Pharmacol*, 172(6), 1633-1637. <https://doi.org/10.1111/bph.12806>
- Patel, P., Sanghavi, D., Morris, D. L., & Kahwaji, C. I. (2023). Angiotensin II. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29763087>
- Patel, S., & Hussain, T. (2018). Dimerization of AT(2) and Mas Receptors in Control of Blood Pressure. *Curr Hypertens Rep*, 20(5), 41. <https://doi.org/10.1007/s11906-018-0845-3>
- Paz Ocaranza, M., Riquelme, J. A., Garcia, L., Jalil, J. E., Chiong, M., Santos, R. A. S., & Lavandero, S. (2020). Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 17(2), 116-129. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0244-8>
- Pedrosa, M. A., Labandeira, C. M., Valenzuela, R., Quijano, A., Sanchez-Andrade, M., Suarez-Quintanilla, J. A., Lanciego, J. L., Labandeira-Garcia, J. L., & Rodriguez-Perez, A. I. (2023). AT1 receptor autoantibodies mediate effects of metabolic syndrome on dopaminergic vulnerability. *Brain Behav Immun*, 108, 255-268. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2022.12.009>
- Pernomian, L., Gomes, M. S., Restini, C. B., & de Oliveira, A. M. (2014). MAS-mediated antioxidant effects restore the functionality of angiotensin converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS axis in diabetic rat carotid. *Biomed Res Int*, 2014, 640329. <https://doi.org/10.1155/2014/640329>
- Pernomian, L., Santos Gomes, M., Baraldi Araujo Restini, C., Naira Zambelli Ramalho, L., Renato Tirapelli, C., & Maria de Oliveira, A. (2012). The role of reactive oxygen species in the modulation of the contraction induced by angiotensin II in carotid artery from diabetic rat. *Eur J Pharmacol*, 678(1-3), 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.036>
- Perry, R. J., Camporez, J. G., Kursawe, R., Titchenell, P. M., Zhang, D., Perry, C. J., Jurczak, M. J., Abudukadier, A., Han, M. S., Zhang, X. M., Ruan, H. B., Yang, X., Caprio, S., Kaech, S. M., Sul, H. S., Birnbaum, M. J., Davis, R. J., Cline, G. W., Petersen, K. F., & Shulman, G. I. (2015). Hepatic acetyl CoA

- links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*, 160(4), 745-758. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.012>
- Polhemus, D. J., Li, Z., Pattillo, C. B., Gojon, G., Sr., Gojon, G., Jr., Giordano, T., & Krum, H. (2015). A novel hydrogen sulfide prodrug, SG1002, promotes hydrogen sulfide and nitric oxide bioavailability in heart failure patients. *Cardiovasc Ther*, 33(4), 216-226. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12128>
- Portha, B., Blondel, O., Serradas, P., McEvoy, R., Giroix, M. H., Kergoat, M., & Bailbe, D. (1989). The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. *Diabete Metab*, 15(2), 61-75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2525491>
- Qiao, W., Wang, C., Chen, B., Zhang, F., Liu, Y., Lu, Q., Guo, H., Yan, C., Sun, H., Hu, G., & Yin, X. (2015). Ibuprofen attenuates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiology*, 131(2), 97-106. <https://doi.org/10.1159/000375362>
- Qiu, Y., Wu, Y., Meng, M., Luo, M., Zhao, H., Sun, H., & Gao, S. (2018). GYY4137 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via activation of the PHLPP-1/Akt/Nrf2 signaling pathway in diabetic mice. *J Surg Res*, 225, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.12.030>
- Ropelle, E. R., Pauli, J. R., Prada, P. O., de Souza, C. T., Picardi, P. K., Faria, M. C., Cintra, D. E., Fernandes, M. F., Flores, M. B., Velloso, L. A., Saad, M. J., & Carvalheira, J. B. (2006). Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol*, 577(Pt 3), 997-1007. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120006>
- Rowland, A. F., Fazakerley, D. J., & James, D. E. (2011). Mapping insulin/GLUT4 circuitry. *Traffic*, 12(6), 672-681. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01178.x>
- S, K., V, A., Paul-Prasanth, B., M, V., A, R. S., & P, U. D. (2021). Aqueous extract of large cardamom inhibits vascular damage, oxidative stress, and metabolic changes in fructose-fed hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*, 43(7), 622-632. <https://doi.org/10.1080/10641963.2021.1925682>

- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., Williams, R., & Committee, I. D. F. D. A. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract*, *157*, 107843. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
- Sampaio, W. O., Souza dos Santos, R. A., Faria-Silva, R., da Mata Machado, L. T., Schiffrin, E. L., & Touyz, R. M. (2007). Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*, *49*(1), 185-192. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000251865.35728.2f>
- Samuel, V. T. (2011). Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, *22*(2), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.003>
- Schulingkamp, R. J., Aloyo, V., Tallarida, R. J., & Raffa, R. B. (2005). Changes in aorta alpha1-adrenoceptor number and affinity during one year of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacology*, *74*(1), 23-30. <https://doi.org/10.1159/000083211>
- Schultze, S. M., Jensen, J., Hemmings, B. A., Tschopp, O., & Niessen, M. (2011). Promiscuous affairs of PKB/AKT isoforms in metabolism. *Arch Physiol Biochem*, *117*(2), 70-77. <https://doi.org/10.3109/13813455.2010.539236>
- Sesti, G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, *20*(4), 665-679. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2006.09.007>
- Shao, W., & Espenshade, P. J. (2012). Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metab*, *16*(4), 414-419. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.002>
- Sharma, V. R., Matta, S. T., Haymond, M. W., & Chung, S. T. (2020). Measuring Insulin Resistance in Humans. *Horm Res Paediatr*, *93*(11-12), 577-588. <https://doi.org/10.1159/000515462>

- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., & Kimura, H. (2009). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal*, *11*(4), 703-714. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2253>
- Shimokawa, H., & Godo, S. (2016). Diverse Functions of Endothelial NO Synthases System: NO and EDH. *J Cardiovasc Pharmacol*, *67*(5), 361-366. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000348>
- Shin, Y. H., Min, J. J., Lee, J. H., Kim, E. H., Kim, G. E., Kim, M. H., Lee, J. J., & Ahn, H. J. (2017). The effect of fluvastatin on cardiac fibrosis and angiotensin-converting enzyme-2 expression in glucose-controlled diabetic rat hearts. *Heart Vessels*, *32*(5), 618-627. <https://doi.org/10.1007/s00380-016-0936-5>
- Shinozaki, K., Ayajiki, K., Nishio, Y., Sugaya, T., Kashiwagi, A., & Okamura, T. (2004). Evidence for a causal role of the renin-angiotensin system in vascular dysfunction associated with insulin resistance. *Hypertension*, *43*(2), 255-262. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000111136.86976.26>
- Siddiqui, A. H., & Hussain, T. (2007). Impaired angiotensin II AT(1) receptor function and enhanced Na, K-ATPase affinity for sodium in proximal tubule of streptozotocin-treated diabetic rats. *Clin Exp Hypertens*, *29*(7), 435-444. <https://doi.org/10.1080/10641960701615659>
- Singh, V. P., Le, B., Khode, R., Baker, K. M., & Kumar, R. (2008). Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes*, *57*(12), 3297-3306. <https://doi.org/10.2337/db08-0805>
- Sitdikova, G. F., Khaertdinov, N. N., & Zefirov, A. L. (2011). Role of calcium and potassium channels in effects of hydrogen sulfide on frog myocardial contractility. *Bull Exp Biol Med*, *151*(2), 163-166. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1280-5>
- Sommese, L., Valverde, C. A., Blanco, P., Castro, M. C., Rueda, O. V., Kaetzel, M., Dedman, J., Anderson, M. E., Mattiazzi, A., & Palomeque, J. (2016). Ryanodine receptor phosphorylation by CaMKII promotes spontaneous Ca(2+) release events in a rodent model of early stage diabetes: The

- arrhythmogenic substrate. *Int J Cardiol*, 202, 394-406.
<https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.09.022>
- Steckelings, U. M., Widdop, R. E., Sturrock, E. D., Lubbe, L., Hussain, T., Kaschina, E., Unger, T., Hallberg, A., Carey, R. M., & Sumners, C. (2022). The Angiotensin AT(2) Receptor: From a Binding Site to a Novel Therapeutic Target. *Pharmacol Rev*, 74(4), 1051-1135.
<https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000281>
- Szabo, C. (2012). Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications. *Antioxid Redox Signal*, 17(1), 68-80.
<https://doi.org/10.1089/ars.2011.4451>
- Szabo, C. (2018). A timeline of hydrogen sulfide (H₂S) research: From environmental toxin to biological mediator. *Biochem Pharmacol*, 149, 5-19.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.09.010>
- Szabo, C., & Papapetropoulos, A. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CII: Pharmacological Modulation of H₂S Levels: H₂S Donors and H₂S Biosynthesis Inhibitors. *Pharmacol Rev*, 69(4), 497-564.
<https://doi.org/10.1124/pr.117.014050>
- Takahara, M., Katakami, N., Kaneto, H., Noguchi, M., & Shimomura, I. (2013). Distribution of the Matsuda Index in Japanese healthy subjects. *J Diabetes Investig*, 4(4), 369-371. <https://doi.org/10.1111/jdi.12056>
- Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. *Diabetes Metab Syndr*, 13(1), 364-372. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>
- Tang, Q., Li, X., Song, P., & Xu, L. (2015). Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug Discov Ther*, 9(6), 380-385. <https://doi.org/10.5582/ddt.2015.01207>
- Taniguchi, T., & Kimura, T. (1974). Role of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the formation of the iron-sulfur chromophore of adrenal ferredoxin. *Biochim*

Biophys Acta, 364(2), 284-295. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(74\)90014-x](https://doi.org/10.1016/0005-2744(74)90014-x)

- Tenorio-Lopez, F. A., Zarco-Olvera, G., Sanchez-Mendoza, A., Rosas-Peralta, M., Pastelin-Hernandez, G., & del Valle-Mondragon, L. (2010). Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta*, 80(5), 1702-1712. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.10.010>
- Tetzner, A., Gebolys, K., Meinert, C., Klein, S., Uhlich, A., Trebicka, J., Villacanas, O., & Walther, T. (2016). G-Protein-Coupled Receptor MrgD Is a Receptor for Angiotensin-(1-7) Involving Adenylyl Cyclase, cAMP, and Phosphokinase A. *Hypertension*, 68(1), 185-194. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07572>
- Tofteng, A. P., Jensen, K. J., Schaffer, L., & Hoeg-Jensen, T. (2008). Total synthesis of desB30 insulin analogues by biomimetic folding of single-chain precursors. *Chembiochem*, 9(18), 2989-2996. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800430>
- Tran, L. T., MacLeod, K. M., & McNeill, J. H. (2009). Endothelin-1 modulates angiotensin II in the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol Cell Biochem*, 325(1-2), 89-97. <https://doi.org/10.1007/s11010-008-0023-z>
- Tran, L. T., Yuen, V. G., & McNeill, J. H. (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*, 332(1-2), 145-159. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0184-4>
- Triggle, C. R., Samuel, S. M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., & Ding, H. (2012). The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Can J Physiol Pharmacol*, 90(6), 713-738. <https://doi.org/10.1139/y2012-073>
- Tzivion, G., Dobson, M., & Ramakrishnan, G. (2011). FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1813(11), 1938-1945. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.002>
- Vallon, V., Wead, L. M., & Blantz, R. C. (1995). Renal hemodynamics and plasma and kidney angiotensin II in established diabetes mellitus in rats: effect of

- sodium and salt restriction. *J Am Soc Nephrol*, 5(10), 1761-1767. <https://doi.org/10.1681/ASN.V5101761>
- van den Born, J. C., Hammes, H. P., Greffrath, W., van Goor, H., Hillebrands, J. L., & Complications, D. G. I. R. T. G. D. M. (2016). Gasotransmitters in Vascular Complications of Diabetes. *Diabetes*, 65(2), 331-345. <https://doi.org/10.2337/db15-1003>
- Vandiver, M., & Snyder, S. H. (2012). Hydrogen sulfide: a gasotransmitter of clinical relevance. *J Mol Med (Berl)*, 90(3), 255-263. <https://doi.org/10.1007/s00109-012-0873-4>
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*, 219(1), 22-96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>
- Viswanad, B., Srinivasan, K., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2006). Effect of tempol on altered angiotensin II and acetylcholine-mediated vascular responses in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance. *Pharmacol Res*, 53(3), 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.11.002>
- Wallace, J. L., Motta, J. P., & Buret, A. G. (2018). Hydrogen sulfide: an agent of stability at the microbiome-mucosa interface. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 314(2), G143-G149. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00249.2017>
- Wang, Q. Y., Liang, W., Jiang, C., Li, N. Y., Xu, H., Yang, M. N., Lin, X., Yu, H., Chang, P., & Yu, J. (2015). [Effect of Astragali Radix in improving early renal damage in metabolic syndrome rats through ACE2/Mas pathway]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 40(21), 4245-4250. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27071265>
- Wang, R. (2012). Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, 92(2), 791-896. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2011>
- Wang, R. (2014). Gasotransmitters: growing pains and joys. *Trends Biochem Sci*, 39(5), 227-232. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.03.003>
- Wang, Y., Fu, W., Xue, Y., Lu, Z., Li, Y., Yu, P., Yu, X., Xu, H., & Sui, D. (2021). Ginsenoside Rc Ameliorates Endothelial Insulin Resistance via Upregulation

- of Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Front Pharmacol*, 12, 620524. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.620524>
- Warenycia, M. W., Goodwin, L. R., Benishin, C. G., Reiffenstein, R. J., Francom, D. M., Taylor, J. D., & Dieken, F. P. (1989). Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol*, 38(6), 973-981. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90288-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90288-8)
- Wasserman, D. H., & Ayala, J. E. (2005). Interaction of physiological mechanisms in control of muscle glucose uptake. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 32(4), 319-323. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04191.x>
- Writing Group, M., Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., Das, S. R., de Ferranti, S., Despres, J. P., Fullerton, H. J., Howard, V. J., Huffman, M. D., Isasi, C. R., Jimenez, M. C., Judd, S. E., Kissela, B. M., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., . . . Stroke Statistics, S. (2016). Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 133(4), e38-360. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000350>
- Xu, Y., Zhang, F., Li, C., Hao, H., & Hao, Y. (2022). Angiotensin-(1-7) improves diabetes mellitus-induced erectile dysfunction in rats by regulating nitric oxide synthase levels. *Peptides*, 151, 170765. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2022.170765>
- Xue, H., Zhou, S., Xiao, L., Guo, Q., Liu, S., & Wu, Y. (2015). Hydrogen sulfide improves the endothelial dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Physiol Res*, 64(5), 663-672. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932848>
- Yang, G., Tang, G., Zhang, L., Wu, L., & Wang, R. (2011). The pathogenic role of cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Am J Pathol*, 179(2), 869-879. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.04.028>
- Yang, G., Wu, L., Jiang, B., Yang, W., Qi, J., Cao, K., Meng, Q., Mustafa, A. K., Mu, W., Zhang, S., Snyder, S. H., & Wang, R. (2008). H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-

- lyase. *Science*, 322(5901), 587-590.
<https://doi.org/10.1126/science.1162667>
- Yang, J., Minkler, P., Grove, D., Wang, R., Willard, B., Dweik, R., & Hine, C. (2019). Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B(6). *Commun Biol*, 2, 194.
<https://doi.org/10.1038/s42003-019-0431-5>
- Yang, Y. W., Deng, N. H., Tian, K. J., Liu, L. S., Wang, Z., Wei, D. H., Liu, H. T., & Jiang, Z. S. (2022). Development of hydrogen sulfide donors for anti-atherosclerosis therapeutics research: Challenges and future priorities. *Front Cardiovasc Med*, 9, 909178. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.909178>
- Yin, Q. Q., Pei, J. J., Xu, S., Luo, D. Z., Dong, S. Q., Sun, M. H., You, L., Sun, Z. J., & Liu, X. P. (2013). Pioglitazone improves cognitive function via increasing insulin sensitivity and strengthening antioxidant defense system in fructose-drinking insulin resistance rats. *PLoS One*, 8(3), e59313.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059313>
- Yu, X. H., Cui, L. B., Wu, K., Zheng, X. L., Cayabyab, F. S., Chen, Z. W., & Tang, C. K. (2014). Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clin Chim Acta*, 437, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.07.012>
- Zaorska, E., Tomasova, L., Koszelewski, D., Ostaszewski, R., & Ufnal, M. (2020). Hydrogen Sulfide in Pharmacotherapy, Beyond the Hydrogen Sulfide-Donors. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020323>
- Zeng, G., Nystrom, F. H., Ravichandran, L. V., Cong, L. N., Kirby, M., Mostowski, H., & Quon, M. J. (2000). Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*, 101(13), 1539-1545.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.101.13.1539>
- Zhang, D., Du, J., Tang, C., Huang, Y., & Jin, H. (2017). H(2)S-Induced Sulfhydration: Biological Function and Detection Methodology. *Front Pharmacol*, 8, 608. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00608>
- Zhang, H., Bai, Z., Zhu, L., Liang, Y., Fan, X., Li, J., Wen, H., Shi, T., Zhao, Q., & Wang, Z. (2020). Hydrogen sulfide donors: Therapeutic potential in anti-

atherosclerosis. *Eur J Med Chem*, 205, 112665.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112665>

Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., & Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*, 20(21), 6008-6016. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>

Zhao, X., An, X., Yang, C., Sun, W., Ji, H., & Lian, F. (2023). The crucial role and mechanism of insulin resistance in metabolic disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 14, 1149239. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1149239>

13. ANEXOS

13.1. Artículo derivado de este proyecto

Silva-Velasco DL, Beltran-Ornelas JH, Tapia-Martínez J, Sánchez-López A, de la Cruz SH, Cervantes-Pérez LG, Del Valle-Mondragón L, Sánchez-Mendoza A, Centurión D. (2023). NaHS restores the vascular alterations in the renin-angiotensin system induced by hyperglycemia in rats. *Peptides*. Jun;164:171001. doi: 10.1016/j.peptides.2023.171001. Epub 2023 Mar 27. PMID: 36990388.

13.2. Artículos derivados de otros proyectos

13.2.1. López-Preza FI, Huerta de la Cruz S, Santiago-Castañeda C, **Silva-Velasco DL**, Beltran-Ornelas JH, Tapia-Martínez J, Sánchez-López A, Rocha L, Centurión D. (2022). Hydrogen sulfide prevents the vascular dysfunction induced by severe traumatic brain injury in rats by reducing reactive oxygen species and modulating eNOS and H₂S-synthesizing enzyme expression. doi: 10.1016/j.lfs.2022.121218. Epub 2022 Nov 23. PMID: 36427545.

13.2.2. Yesilyurt ZE, Matthes J, Hintermann E, Castañeda TR, Elvert R, Beltran-Ornelas JH, **Silva-Velasco DL**, Xia N, Kannt A, Christen U, Centurión D, Li H, Pautz A, Arioglu-Inan E, Michel MC. (2022). Analysis of 16 studies in nine rodent models does not support the hypothesis that diabetic polyuria is a main reason of urinary bladder enlargement. *Front Physiol*. doi: 10.3389/fphys.2022.923555. PMID: 36003651; PMCID: PMC9393211.

13.3. Congresos

13.3.1. Neuroscience 2019, the 49th the Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Chicago, IL, USA. Presentación de póster.

13.3.2. Primera conferencia sobre difusión y divulgación del programa de ciencia de posgrado. Durango, México. Presentación de poster en modalidad virtual.

13.3.3. XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Mérida, México. Presentación de póster.

13.3.4. Neuroscience 2022, the 50th the Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, (CA, USA).

13.4. Actividades académicas

13.4.1. Curso “Estadística Básica en R” por el Departamento de Educación Continua de la Universidad Veracruzana. 40 h, 2021.

13.4.2. Curso “Fisiopatología del Síndrome Metabólico y Diabetes tipo 2” por el Departamento de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. 40 h, 2021.

13.4.3. Curso “Técnicas selectas de Biología Molecular” por el Departamento de Bioquímica y Biología Estructural de la Universidad Nacional Autónoma de México. 40 h, 2021.

13.4.4. Profesora en la materia de Química para alumnos de bachillerato en UVM, modalidad virtual. De septiembre de 2022-actualidad.

13.4.5. Ponente en la plática “Enfermedades metabólicas y su relación con enfermedades cardiovasculares” para alumnos de medicina en el Instituto Sapiens (México, 2020).

13.4.6. Ponente en la materia de Neurofarmacología para alumnos de medicina de la Universidad Autónoma de México (México, 2021).

13.4.7. Ponente en las pláticas “Efectos del H₂S y DMT2” y “Gasotransmisores” para alumnos de la licenciatura de Química Farmacéutica Biológica de la Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Xochimilco. (México 2021 y 2022).

13.5. Actividades de retribución social

13.5.1. Comité Organizador de la Semana del Cerebro del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav Sede Sur. 2022.

13.5.2. Plática del tema “Complicaciones Vasculares de la resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus tipo 2” a través de la página @Revoluciones en facebook. 2022.

13.5.3. Comité Organizador de la Semana del Cerebro del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav Sede Sur. 2023.



NaHS restores the vascular alterations in the renin-angiotensin system induced by hyperglycemia in rats

Diana L. Silva-Velasco^a, Jesus H. Beltran-Ornelas^a, Jorge Tapia-Martínez^a,
Araceli Sánchez-López^a, Saúl Huerta de la Cruz^a, Luz Graciela Cervantes-Pérez^b,
Leonardo del Valle-Mondragón^b, Alicia Sánchez-Mendoza^{b,*}, David Centurión^{a,*}

^a Departamento de Farmacobiología, Cinvestav-Coapa, Czada. de los Tenorios 235, Col. Granjas-Coapa, Alcaldía Tlalpan C.P. 14330, Mexico

^b Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No.1, Col. Sección XVI, Alcaldía Tlalpan C.P. 14080, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Hydrogen sulfide
Hyperglycemia
Vascular dysfunction
Renin-Angiotensin System
Angiotensin receptors

ABSTRACT

Hyperglycemia (HG) impairs the renin-angiotensin system (RAS), which may contribute to vascular dysfunction. Besides, hydrogen sulfide (H₂S) exerts beneficial cardiovascular effects in metabolic diseases. Therefore, our study aimed to determine the effects of chronic administration of sodium hydrosulfide (NaHS; inorganic H₂S donor) and DL-Propargylglycine [DL-PAG; cystathionine-γ-lyase (CSE) inhibitor] on the RAS-mediated vascular responses impairments observed in thoracic aortas from male diabetic Wistar rats. For that purpose, neonatal rats were divided into two groups that received: 1) citrate buffer (n = 12) or 2) streptozotocin (STZ, 70 mg/kg; n = 48) on the third postnatal day. After 12 weeks, diabetic animals were divided into 4 subgroups (n = 12 each) that received daily i.p. injections during 4 weeks of: 1) non-treatment; 2) vehicle (PBS, 1 mL/kg); 3) NaHS (5.6 mg/kg); and 4) DL-PAG (10 mg/kg). After treatments (16 weeks), blood glucose, angiotensin-(1–7) [Ang-(1–7)], and angiotensin II (Ang II) levels, vascular responses to Ang-(1–7) and Ang II, and the expression of angiotensin AT₁, AT₂, and Mas receptors, angiotensin converting enzyme (ACE) and ACE type 2 (ACE2) were determined. HG induced: 1) increased blood glucose levels and expression of angiotensin II AT₁ receptor; 2) impaired Ang-(1–7) and Ang II mediated vascular responses; 3) decreased angiotensin levels and expression of angiotensin II AT₂ and angiotensin-(1–7) Mas receptors, and ACE2; and 4) no changes in ACE expression. Interestingly, NaHS, but not DL-PAG, reversed HG-induced impairments, except for blood glucose level changes. These results suggest that NaHS restores vascular function in streptozotocin-induced HG through RAS modulation.

1. Introduction

Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a complex metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia mediated by a decrease in insulin production [1]. T2DM is considered a growing critical public health problem since it affected 463 million patients worldwide in 2019, with an expected increase to 578 million by 2030 [2]. Moreover, hyperglycemia (HG) is a significant risk factor for vascular function impairments. Indeed, vascular dysfunction characterized by a reduction of relaxing factors and an increase in the production of contractile factors is a well-documented characteristic of HG or T2DM [3]. The most common relaxing and contractile factors are nitric oxide (NO) and endothelin 1. However, there are also vasoactive peptides derived from the Renin-Angiotensin System (RAS) that are involved in vascular tone

regulation, such as angiotensin-(1–7) [Ang-(1–7) and angiotensin II (Ang II)] [4]. Ang II is produced by angiotensin converting enzyme (ACE) and exerts contractile and vasorelaxant responses through the interaction with Angiotensin II type 1 (AT₁) and type 2 (AT₂) receptors, respectively [5]. Ang-(1–7) is produced by ACE type 2 (ACE2) and induces vasorelaxant effects after the activation of Angiotensin-(1–7) Mas receptor [6].

Due to the relevance of HG, it is necessary to find new molecules to decrease the vascular impairments observed during this condition. In this sense, hydrogen sulfide (H₂S), a novel gasotransmitter synthesized by cystathionine-γ-lyase (CSE), cystathionine-β-synthase (CBS), and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST), exerts antioxidant effect [7] and modulates neurotransmission [8] alongside its vasorelaxant properties [9]. In this regard, H₂S has been shown to restore endothelial

* Corresponding authors.

E-mail addresses: alicia.sanchez@cardiologia.org.mx (A. Sánchez-Mendoza), dcenturi@cinvestav.mx (D. Centurión).

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171001>

Received 30 January 2023; Received in revised form 13 March 2023; Accepted 21 March 2023

Available online 27 March 2023

0196-9781/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

function by decreasing oxidative stress and increasing NO bioavailability in a mouse model of streptozocin (STZ)-induced diabetes [10]. Significantly, changes in the expression of the receptors or enzymes that produce Ang-(1–7) and Ang II have been associated with vascular dysfunction in diabetic animal models [11]. In this context, NaHS (sodium hydrosulfide) treatment decreases blood pressure, vascular dysfunction, and oxidative stress in Ang II-induced hypertensive mice [12] and increases ACE2 expression and Ang-(1–7) levels in an atherosclerosis mouse model [13]. However, the interaction of H₂S with RAS-mediated vascular responses during diabetes remains largely unknown. Therefore, this study was designed to evaluate the effect of NaHS, an H₂S donor, on 1) blood glucose, Ang-(1–7), and Ang II levels; 2) vascular responses to Ang-(1–7) and Ang II; and 3) the expression of angiotensin II AT₁, AT₂ receptors and angiotensin-(1–7) Mas receptor, ACE, and ACE2 in thoracic aortas from male Wistar rats with hyperglycemia.

2. Material and methods

2.1. Animals

Sixty neonatal male Wistar rats (3–4 days old) were used in this work. Dams and neonatal male Wistar rats were housed in plastic cages, maintained under standardized conditions (22 ± 2 °C, 50% humidity, and 12/12 h light-dark cycle), and provided with food and water ad libitum (Fig. 1A). Animals were housed with dams until 21 days old. All animal procedures and the protocols of the present study were approved by the Institutional Ethics Committee (Cicual-Cinvestav) following the regulations established by the Mexican Official Norm for the Use and Welfare of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in the USA [14].

2.2. Induction of type 2 diabetes mellitus by STZ

On the third or fourth postnatal day, male neonate rats were selected and randomly divided into two groups. Group 1 was used as a control (n = 12) and received a single administration of citrate buffer containing sodium citrate dehydrate and citric acid monohydrate, 0.1 M, pH= 4.5 (1 mL/100 g; STZ vehicle). Group 2 received a single dose of STZ (70 mg/kg; n = 48). Both treatments were injected intraperitoneally (i.p.).

2.3. Oral glucose tolerance test

In order to determine the effect of STZ administration on glucose tolerance, an oral glucose tolerance test (OGTT) was performed after 12 weeks of STZ administration. For that purpose, animals fasted for 12 h, glucose levels were measured in tail blood samples using a glucometer and glucose strips (AccuCheck®, Roche, Mexico), at 0 (before), 15, 30, 60, 90, and 120 min after oral glucose (2 g/kg) load. Hyperglycemia was considered when blood glucose levels were > 250 mg/dL. Once we established that STZ administration induced hyperglycemia, we assessed the effect of the pharmacological treatments on this impairment. Therefore, an OGTT was performed in treated and non-treated animals at week 16 (at the end of the pharmacological treatment) (Fig. 1B). The animals that did not present levels > 250 mg/dL after 60 min of oral glucose were excluded.

2.4. Administration of pharmacological treatments

Once we confirmed that STZ induces hyperglycemia during the OGTT at week 12, the animals (group 2) were randomly divided into four subgroups (n = 12 each) that received daily i.p. injections during four weeks of 1) non-treatment (diabetic control group); 2) vehicle (phosphate buffer saline; PBS, 1 mL/kg); 3) sodium hydrosulfide (NaHS 5.6 mg/kg) and 4) DL-propargylglycine (DL-PAG 10 mg/kg) (Fig. 1A and B). Similar, NaHS and DL-PAG doses have shown cardiovascular

effects [15,16]. Particularly, we and others have demonstrated beneficial cardiovascular effects of NaHS 5.6 mg/kg in different experimental models [12,17,18].

2.5. Vascular function in aortic rings

2.5.1. Tissue preparation

At the end of pharmacological treatment (week 16), six rats in each group were anesthetized with isoflurane (3%) and euthanized by decapitation. Next, the descending thoracic aorta was dissected and placed in Krebs-Ringer solution with the following composition (mM): NaCl (119.5), dextrose (12), NaHCO₃ (24.9), KCl (4.74), MgSO₄ 7 H₂O (1.18), KH₂PO₄ (1.18), CaCl₂ (H₂O)₂ (2.5), and EDTA (0.026), and adjusted at a pH of 7.4 to assess in vitro vascular function, as previously described [19]. The thoracic aorta was cleaned of perivascular adipose tissue, blood, and connective tissue. The aorta with endothelium was cut into rings of 3 mm in length. Aortic rings were horizontally mounted with nichrome wire in organ bath chambers containing 2.5 mL Krebs-Ringer's solution at 37 °C and continually gassed with 95% O₂ and 5% CO₂. Changes in vessel tension were recorded isometrically by a force-displacement transducer (FTO3, Grass Instrument Co., U.S.A.) connected to a data acquisition unit (MP 100; Biopac Systems Inc., Goleta CA, U.S.A.).

2.5.2. Isometric tension studies

The rings were kept under a resting tension of 2.5 g (24.32 mN) for 30 min. After this time, the contraction capacity was evaluated with norepinephrine (NE) at a concentration of 1 × 10⁻⁷ M. After a washout, rings were pre-contracted with norepinephrine 1 × 10⁻⁷ M, and cumulative concentrations of Ang-(1–7) (1 × 10⁻⁹ M-1 × 10⁻⁶ M) were added to the organ bath to evaluate relaxant responses of the aorta. Lastly, cumulative concentrations of Ang II (1 × 10⁻⁹ M-1 × 10⁻⁶ M) were added to the organ bath to evaluate the contractile responses.

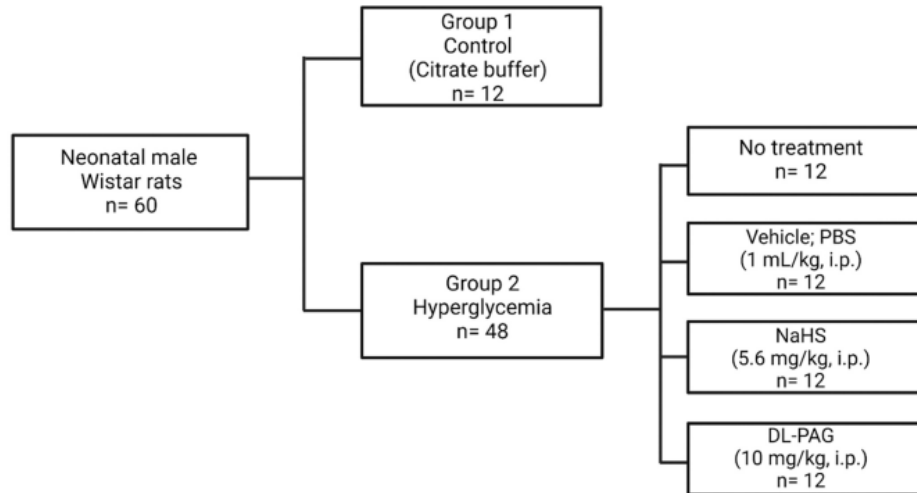
2.6. Determination of angiotensin-(1–7) and angiotensin II levels by capillary electrophoresis

After 16 weeks, serum Ang-(1–7) and Ang II levels were determined by capillary electrophoresis in the control, the diabetic, and the diabetic groups with pharmacological treatment. Serum samples (50 µL) were diluted in cold methanol (1:10 v/v), and the resulting mix was centrifuged for 16 min at 16,000 g/4 °C. The supernatant was exposed to ice-cold acetic acid (20%), homogenized, and centrifuged for 16 min at 16,000 g/4 °C. The supernatant was diluted (1:10 v/v) with sodium hydroxide 0.1 M. Finally, the samples were filtered through 0.45 µm nitrocellulose filters and analyzed by capillary electrophoresis (P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter, CA, USA). The concentrations were obtained by interpolating sample values with standard curves of Ang-(1–7) and Ang II (both from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Data are expressed as pmol/mL [20].

2.7. Protein expression by western blot

Western blot analysis was used to assess the changes in angiotensin II AT₁, AT₂ receptors, and angiotensin-(1–7) Mas receptor, ACE, and ACE2 in the rat thoracic aorta. The remaining six animals of each group were anesthetized and decapitated to collect the thoracic aorta. The tissue was stored at -70 °C until further processing and evaluation. Frozen aortic samples were homogenized in a lysis buffer containing 250 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2.5 mM EDTA, and protease inhibitors (10 µg/mL leupeptin and 20 µg/mL aprotinin) at 4 °C. After that, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. Total protein in thoracic aortas was quantified by Lowry assay. Protein samples (30 µg) were separated by denaturing in a 10% SDS-PAGE gel at 120 V for 90 min. Then, separated proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (0.45 µm, Millipore, Billerica

A) Experimental protocol



B) Timeline of the experimental design

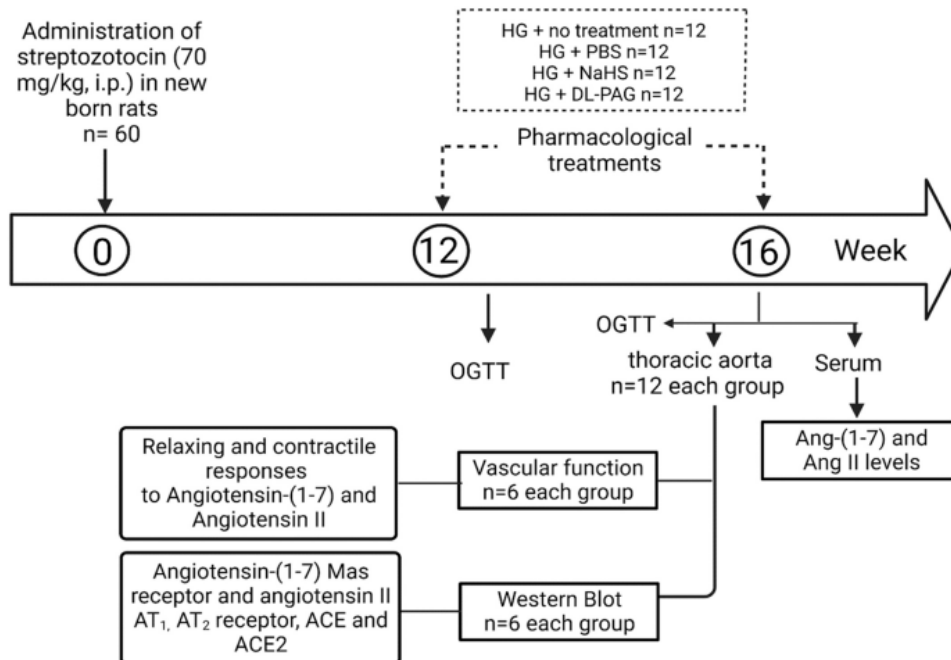


Fig. 1. A) Experimental protocol of hyperglycemic groups and pharmacological treatments. Phosphate-buffered saline (PBS, 1 mL/kg, i.p.); sodium hydrosulfide (NaHS, 5.6 mg/kg, i.p.); and DL-Propargylglycine (DL-PAG, 10 mg/kg, i.p.). B) Timeline of the experimental design used to determine the effect of chronic administration of NaHS on blood glucose, vascular function, Ang-(1-7) and Ang II levels, and protein expression. On the third or fourth day after birth, male neonates received a single dose of STZ (70 mg/kg, i.p.). After 12 weeks, an OGTT was performed, and pharmacological treatment was started in the animals that presented hyperglycemia. At the end of the pharmacological treatments, animals were euthanized, and the angiotensin levels were determined in serum samples. Thoracic aortas were obtained to perform the isolated tissue bath assays and protein expression. Ang-(1-7), Angiotensin-(1-7); Ang II, Angiotensin II; OGTT, oral glucose tolerance test; ACE, angiotensin converting enzyme; ACE2, ACE type 2; HG, hyperglycemia.

MA, USA) and blocked with 5% non-fat milk (Bio-Rad, Hercules CA, USA) in TBS-Tween 0.2% at pH 7.4 for 60 min. The membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in 1% non-fat milk against angiotensin II AT₁-AT₂ receptors (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-515884 and Cat. No. SC-9040), ACE and ACE2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-23908; Cat. No. SC-390851, respectively), and angiotensin-(1–7) Mas receptor (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-390453). The next day, membranes were washed and incubated with secondary antibodies for 90 min at room temperature (anti-mouse peroxidase-labeled; 1:1000, Santa Cruz Biotechnology). Blots were washed, and the protein signal was detected using the enhanced chemiluminescent detection system (Santa Cruz Biotechnology). Blots were stripped and re-incubated with monoclonal β -actin antibody (1:10000; Santa Cruz Biotechnology; Cat. No. SC-47778) as a protein loading control to normalize protein expression levels. Protein signals were quantified by densitometry using image analysis software (Image Lab Software Version 5.2.1, Bio-Rad, Hercules, CA).

2.8. Drugs

The compounds used in this study were: sodium hydrosulfide monohydrate (PubChem CID: 28015), DL-Propargylglycine (PubChem CID: 95575), angiotensin-(1–7) (PubChem CID: 123805), angiotensin II (PubChem CID: 172198), (±) norepinephrine bitartrate (PubChem CID: 168929) and streptozotocin (PubChem CID: 29327). Krebs-Ringer solution was prepared with ultrapure Milli-Q® water. Angiotensin-(1–7) and angiotensin II were dissolved in a physiological saline solution. Sodium hydrosulfide monohydrate and DL-Propargylglycine were dissolved in PBS, pH 7.4, at 25 °C. New solutions were prepared every single day.

2.9. Data presentation and statistical analysis

Results are presented as mean \pm S.E.M. Blood glucose levels are shown as time course and the area under the curve (AUC) of OGTT data. For differences in blood glucose levels during OGTT, two-way analysis of variance (ANOVA) of time and treatment was performed, and significance was determined using Tukey's post-hoc test. The AUC was calculated using the trapezoid rule. The comparison between control

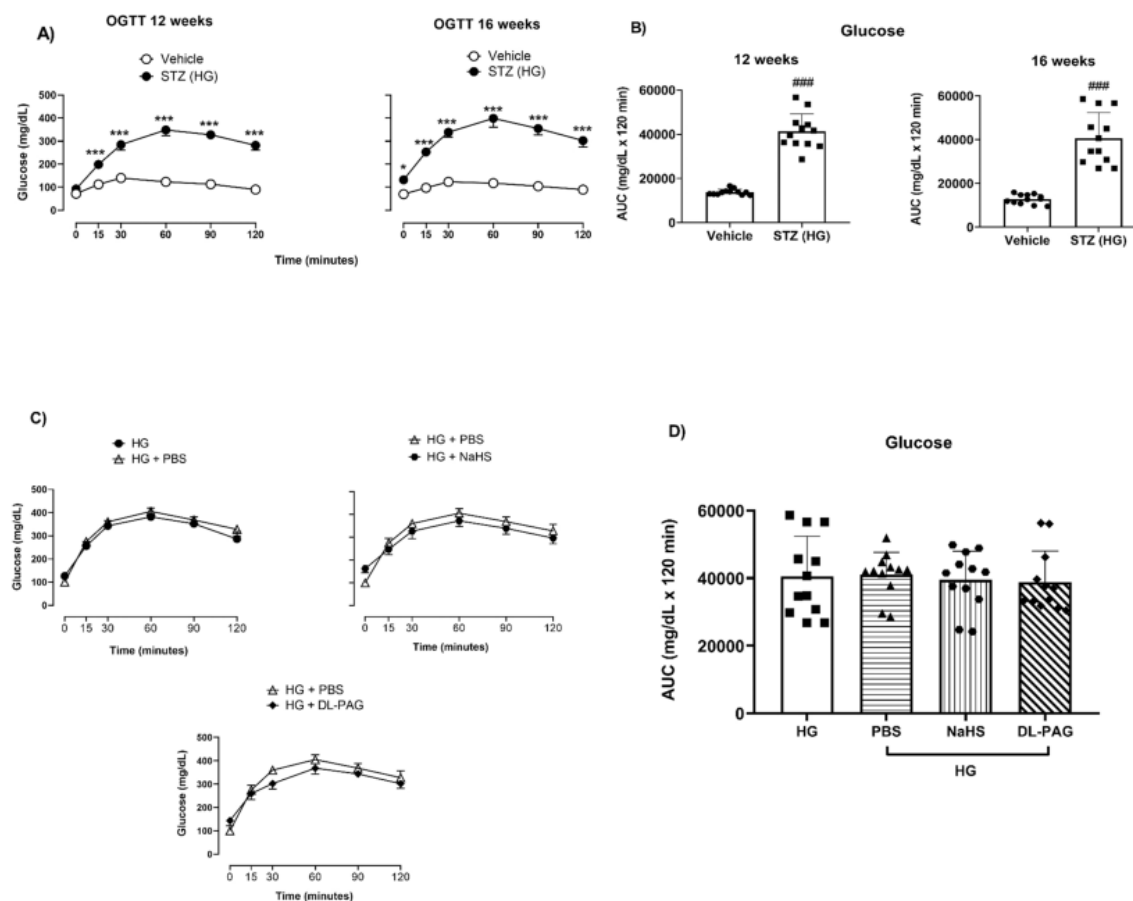


Fig. 2. Time course and the area under the curve (AUC) of blood glucose levels obtained during oral glucose tolerance test (OGTT) carried out at 12 and 16 weeks (A and B) in animals that received STZ (HG group) and its vehicle (citrate buffer), and animals with STZ (HG) plus pharmacological treatment (C and D). HG, Hyperglycemia; STZ, streptozotocin; PBS, phosphate buffer saline; NaHS, sodium hydrosulfide; DL-PAG, DL-Propargylglycine. Each value represents the mean \pm standard error of 12 animals. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs vehicle by Two-Way ANOVA, ###, $p < 0.001$ vs vehicle by One-Way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

and HG groups was evaluated by t-test and the comparison between the groups was evaluated by one-way ANOVA. The relaxant and contractile concentration-responses curves elicited by Ang-(1-7) and Ang II, respectively, were analyzed. The negative logarithm of the effective concentration 50 (pEC₅₀) and the maximum efficacy (E_{max}) in concentration-responses curves were calculated by the sigmoidal (4-parameter) non-linear regression curve fit using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Ang-(1-7) and Ang II levels were compared between groups and analyzed by ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. Lastly, protein expression was evaluated by ANOVA with Tukey's post-hoc test. Statistical significance was accepted when p < 0.05.

3. Results

3.1. NaHS administration does not affect STZ-induced blood glucose levels impairments

Since T2DM is a metabolic condition characterized by chronic hyperglycemia, we determined blood glucose levels at week 12 during the OGTT in STZ-administered rats. Our results show that treatment with STZ (HG group), but not its vehicle, significantly increased blood glucose levels from 15 to 120 min during the OGTT at 12 weeks (F_(1,5) = 17.454; p < 0.001, Fig. 2A), which was verified with the AUC (p < 0.001, Fig. 2B). This effect was also observed 16 weeks after STZ administration (F_(1,5) = 8.603; p < 0.001, Fig. 2A; p < 0.001, Fig. 2B).

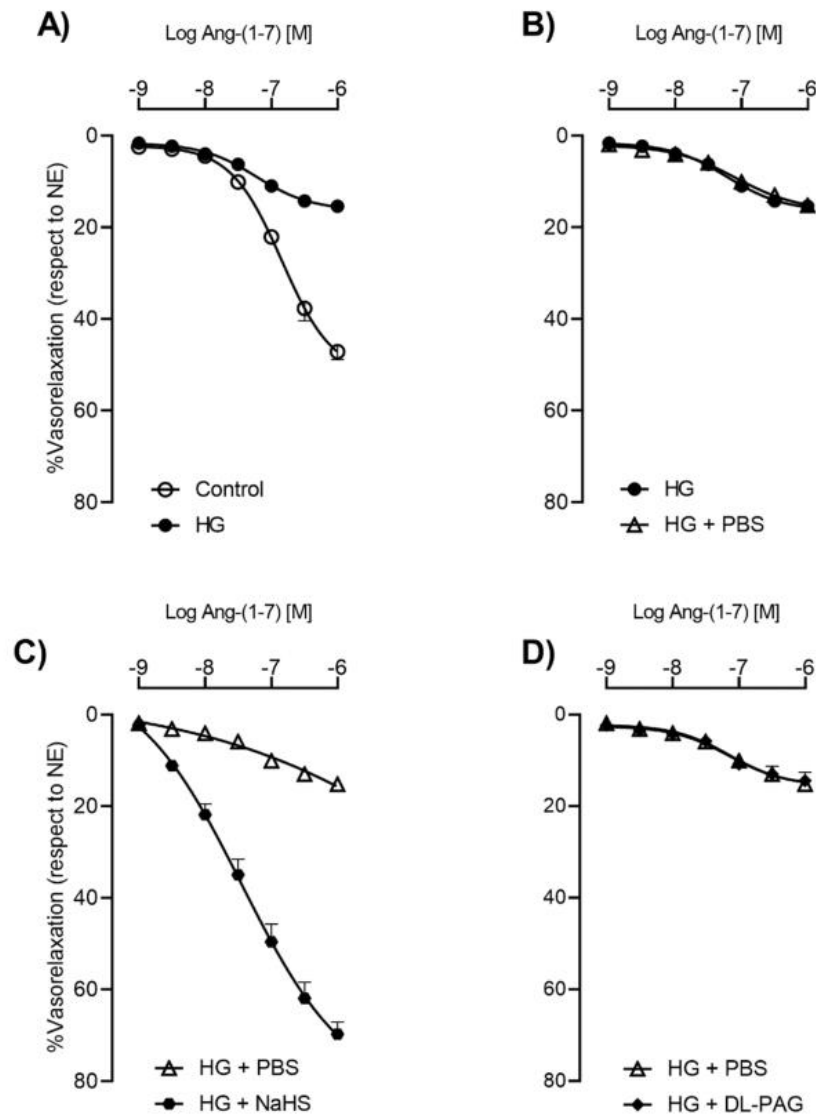


Fig. 3. Effect of i.p. administration of vehicle (PBS, 1 mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg), and DL-PAG (10 mg/kg) during 4 weeks on relaxant responses induced by Ang-(1-7). Each value represents the mean ± standard error of 6 animals. PBS, phosphate buffer saline; NaHS, sodium hydrosulfide; DL-PAG, DL-Propargylglycine; Ang-(1-7), angiotensin-(1-7); NE, norepinephrine; HG, hyperglycemia.

These results confirm hyperglycemia in rats after STZ treatment, as previously described [21]. After that, we evaluated whether the pharmacological treatments restored blood glucose levels. Our findings demonstrated that NaHS ($F_{(1,5)}=0.917$; $p=0.472$, Fig. 2C), DL-PAG ($F_{(1,5)}=1.316$; $p=0.261$, Fig. 2C), or its vehicle ($F_{(1,5)}=0.428$; $p=0.828$, Fig. 2C) did not change the hyperglycemia observed in the HG group during time course and AUC ($p=0.748$, Fig. 2D).

3.2. NaHS administration restores vascular dysfunction induced by HG

As hyperglycemia can modify vascular function and the RAS regulates vascular tone, we assessed the vascular responses to Ang-(1–7) and Ang II after STZ administration (Figs. 3 and 4). For that purpose, we first determined the effect of HG on the relaxing responses induced by Ang-(1–7) in the isolated aortic rings. The concentration-response curves for Ang-(1–7) in the control group showed relaxation in a concentration-dependent manner (Fig. 3A) with an E_{max} of $52.30\% \pm 3.3\%$ and a pEC_{50} of 6.84 ± 0.07 (Table 1). Conversely, the HG group showed a

significant decrease in E_{max} ($16.20\% \pm 0.5\%$, $p=0.02$) without significant changes in pEC_{50} (7.23 ± 0.05 , $p=0.08$) compared to the control group (Table 1, Fig. 3A), these results may suggest that STZ administration impairs relaxing responses to Ang-(1–7). As expected, PBS treatment in the HG + PBS group showed no effect on relaxant responses to Ang-(1–7) when compared with the HG group ($E_{max}=16.81\% \pm 1.2\%$, $p=0.6$; $pEC_{50}=7.10 \pm 0.1$, $p=0.47$; Table 1, Fig. 3B). Interestingly, the relaxant responses to Ang-(1–7) in the HG + NaHS group were significantly increased when compared with the HG + PBS group ($E_{max}=69.70\% \pm 12.2\%$, $p=0.02$; $pEC_{50}=7.44 \pm 0.2$, $p=0.04$; Table 1, Fig. 3C). In contrast, the HG + DL-PAG group did not show an effect on relaxant responses to Ang-(1–7) when compared with the HG + PBS group ($E_{max}=14.63\% \pm 0.2\%$, $p=0.33$; $pEC_{50}=7.20 \pm 0.14$, $p=0.47$; Table 1, Fig. 3D). Taken together, these results imply that exogenous, but not endogenous, H_2S regulates vascular responses to Ang-(1–7) under HG conditions.

Subsequently, we evaluated the contractile responses induced by Ang II (AT₁ agonist). The concentration-response curves for Ang II in the

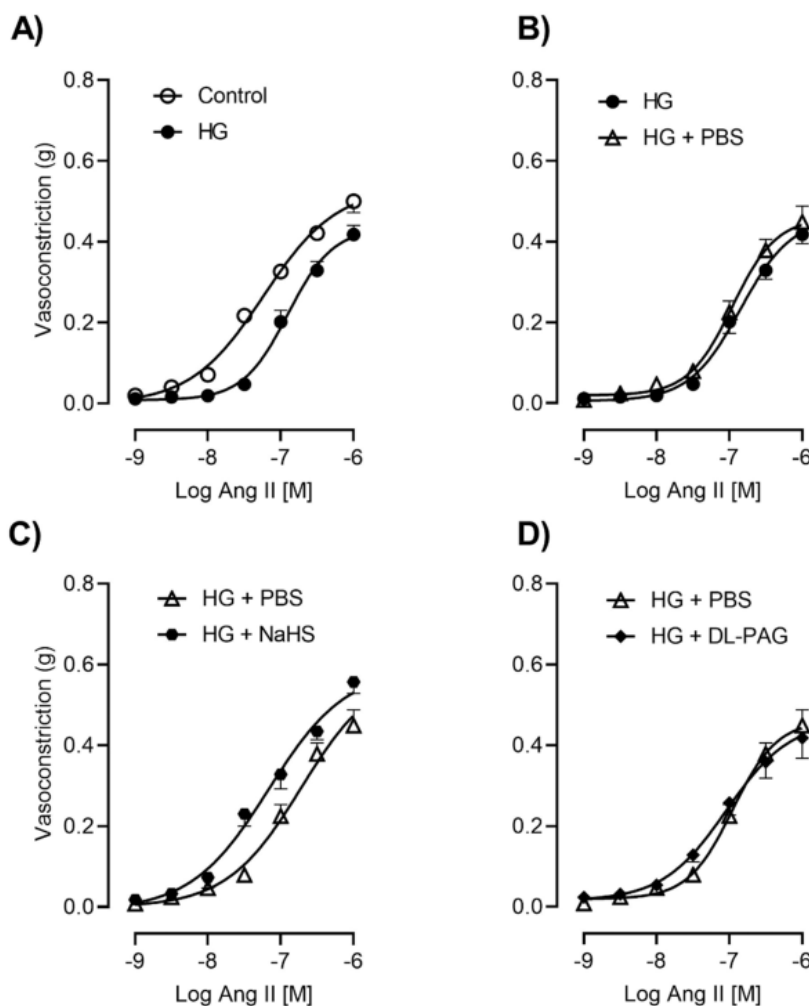


Fig. 4. Effect of i.p. administration of vehicle (PBS, 1 mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg), and DL-PAG (10 mg/kg) during 4 weeks on contractile responses induced by Ang II. Each value represents the mean \pm standard error of 6 animals. PBS, phosphate buffer saline; NaHS, sodium hydrosulfide; DL-PAG, DL-Propargylglycine; Ang II, angiotensin II, HG, hyperglycemia.

Table 1

The negative logarithm of the effective concentration 50 (pEC₅₀) and the maximum efficacy (E_{max}) of the vasorelaxant responses induced by Ang-(1-7) and vasoconstrictive responses induced by Ang II in animals treated with: 1) non-treatment (control); 2) HG induced by STZ; or 3) daily i.p. injections for 4 weeks of vehicle (PBS, 1 mL/kg), NaHS (5.6 mg/kg) and DL-PAG (10 mg/kg).

	Vasorelaxant responses to Ang- (1-7)		Vasoconstrictive responses to Ang II	
	pEC ₅₀	E _{max} (%)	pEC ₅₀	E _{max} (g)
HG				
Control	6.84 ± 0.07	52.30 ± 3.3	7.24 ± 0.07	0.53 ± 0.03
HG	7.23 ± 0.05	16.20 ± 0.5 *	6.90 ± 0.07 *	0.43 ± 0.03 *
HG + PBS	7.10 ± 0.1	16.81 ± 1.2 *	6.93 ± 0.08 *	0.45 ± 0.03 *
HG + NaHS	7.44 ± 0.2 [#]	69.70 ± 12.2 [#]	7.26 ± 0.26 [#]	0.55 ± 0.14 [#]
HG + DL-PAG	7.20 ± 0.14	14.63 ± 0.2	7.10 ± 0.13	0.40 ± 0.05

Each value represents mean ± standard error. of 6 animals. *, P < 0.05 vs. Control; #, P < 0.05 vs T2DM + PBS. HG, Hyperglycemia; PBS, phosphate buffer saline; NaHS sodium hydrosulfide; DL-PAG, DL-Propargylglycine; Ang-(1-7), angiotensin-(1-7) and Ang II, angiotensin II.

control group induced concentration-dependent responses with an E_{max} of 0.53 g ± 0.03 g and pEC₅₀ of 7.24 ± 0.07 (Table 1). The values from the HG group showed a significant decrease in E_{max} (0.43 g ± 0.03 g, p = 0.03) and pEC₅₀ (6.90 ± 0.07, p = 0.02) compared to the control group (Table 1, Fig. 4A). The HG + PBS group showed no change on contractile responses to Ang II when compared with the HG group (E_{max}=0.45 g ± 0.03 g, p = 0.74; pEC₅₀ =6.93 ± 0.08, p = 0.54; Table 1, Fig. 4B). These results demonstrate that the reduction in vascular responses to Ang II observed in the HG group was not affected by vehicle treatment. On the other hand, the contractile responses to Ang II in the HG + NaHS group were significantly increased when compared with the HG + PBS group (E_{max}=0.55 ± 0.14, p = 0.04; pEC₅₀ =7.26 ± 0.26, p = 0.04; Table 1, Fig. 4C). In contrast, the HG + DL-PAG group produced no effect on the contractile responses to Ang II when compared with the HG + PBS group (E_{max}=0.40 ± 0.05, p = 0.58; pEC₅₀ =7.10 ± 0.13, p = 0.35; Table 1, Fig. 4D). Thus, our data demonstrate that the impaired vascular response to Ang II in HG conditions are modified only by exogenous H₂S.

3.3. NaHS administration restores angiotensin levels during HG

As a potential explanation for the changes observed in vascular responses to Ang-(1-7) and Ang II during HG, we evaluated Ang-(1-7) (Fig. 5A) and Ang II (Fig. 5B) levels in serum samples in all the experimental groups. Our results show that serum levels of Ang-(1-7) (p < 0.001, Fig. 5A) and Ang II (p = 0.042, Fig. 5B) were significantly decreased in the HG group when compared with the control group. This phenomenon remained unaffected in the HG + PBS group [Ang-(1-7), p = 0.99, Fig. 5A; Ang II, p = 0.991, Fig. 5B] and the DL-PAG group [Ang-(1-7), p = 0.895, Fig. 5A; Ang II, p = 0.983, Fig. 5B] but was reversed in the HG + NaHS [Ang-(1-7), p < 0.001; Fig. 5A; Ang II, p = 0.013, Fig. 5B] compared to the HG + PBS group.

3.4. NaHS administration reverses the decrease of ACE2/angiotensin-(1-7) Mas receptor expression in thoracic aortas from HG

Since we found that serum levels and vascular responses to Ang-(1-7) were decreased, we decided to evaluate the expression of ACE2 and angiotensin-(1-7) Mas receptor as a potential mechanism to Ang-(1-7)-induced relaxation impairments during HG. Therefore, we assessed the effect of HG induced by STZ and pharmacological treatments on the expression of ACE2 (Fig. 6A and 6B) and the angiotensin-(1-7) Mas receptor (Fig. 6A and 6 C) in the thoracic aorta at week 16.

The results indicate that the protein expression of ACE2 and Ang-(1-7) Mas receptor was significantly decreased in the HG group when compared with the control group [ACE2, p = 0.01, Fig. 6B; Ang-(1-7)

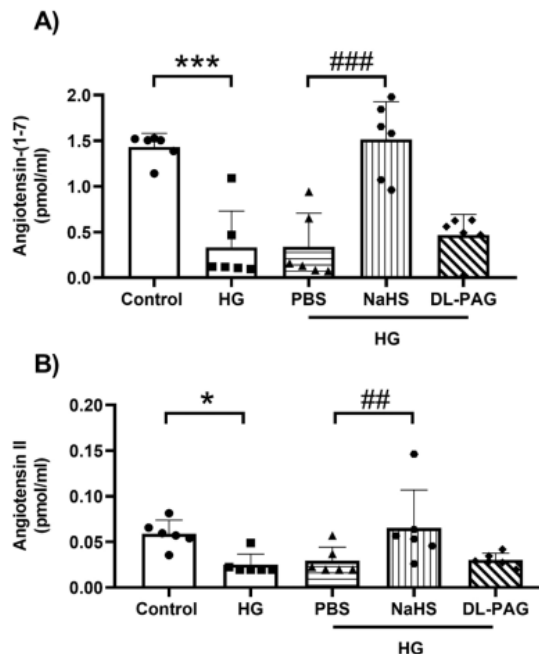


Fig. 5. Effect of chronic administration of NaHS on (A) angiotensin-(1-7) and (B) angiotensin II levels obtained after 16 weeks in serum samples. Each value represents the mean ± standard error of 6 animals. *, p < 0.05, *** p < 0.001 vs control and **, p < 0.01, ###, p < 0.001 vs HG + PBS by One-Way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

Mas receptor, p < 0.001, Fig. 6C]. These changes were not modified in the HG + PBS group. On the other side, the expression of ACE2 and the angiotensin-(1-7) Mas receptor significantly increased in the HG + NaHS group [ACE2, p = 0.002, Fig. 6B; Ang-(1-7) Mas receptor, p = 0.003, Fig. 6C], but not in the HG + DL-PAG group [ACE2, p = 0.911, Fig. 6B; Ang-(1-7) Mas receptor, p = 0.99, Fig. 6C] when compared to the group that received the vehicle (HG + PBS). These results suggest that NaHS administration improves serum levels and vascular relaxation to Ang-(1-7) by restoring ACE2 and angiotensin-(1-7) Mas receptor expression.

3.5. NaHS administration regulates the expression of angiotensin II AT₁, AT₂ receptors, and the expression of ACE during HG

Our results show that serum levels and vascular responses to Ang II are decreased in the HG group. Therefore, we ought to determine the effect of HG and the pharmacological treatments on the protein expression of angiotensin II AT₁ and AT₂ receptors and ACE in the thoracic aorta at 16 weeks. We found that the protein expression of ACE did not change either in the HG group or the groups that received the pharmacological treatments (Fig. 7A and Fig. 7B). On the other hand, we found an increase in the expression of the angiotensin II AT₁ receptor in the HG group when compared to the control group (p < 0.001, Fig. 7A and C); that remained unaffected in the HG + PBS group. Interestingly, the protein expression of the angiotensin II AT₁ receptor was significantly decreased in the group HG + NaHS (p = 0.033, Fig. 7A and C) with no significant changes in the HG + DL-PAG group (p = 0.975, Fig. 7A and C) when compared with the HG + PBS group. Lastly, the HG group showed a decrease in the protein expression of the angiotensin II AT₂ receptor (p = 0.001, Fig. 7A and D) compared to the control group, which remained unaffected after PBS administration (p = 0.999, Fig. 7A

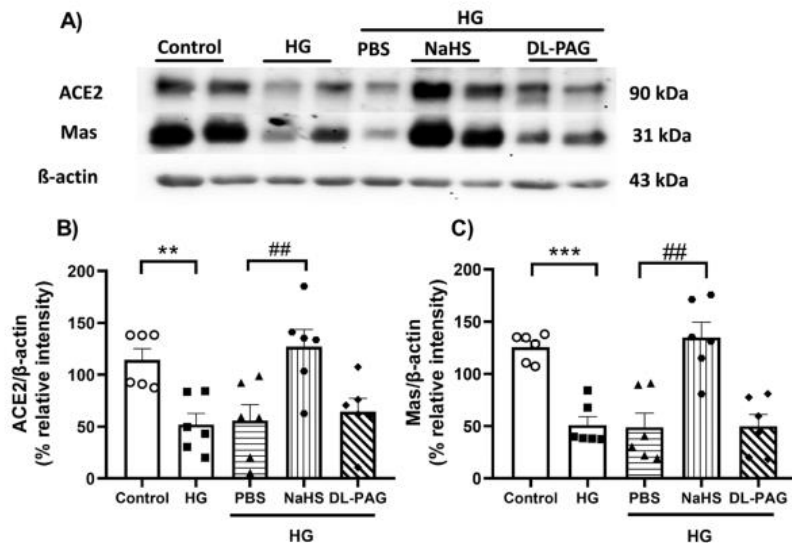


Fig. 6. Effect of chronic administration of NaHS on ACE2 and angiotensin-(1-7) Mas receptor expression changes in the thoracic aorta of hyperglycemic animals. (A) Representative blot of ACE2 and angiotensin-(1-7) Mas receptor expression. Effect of pharmacological treatment on (B) ACE2 enzyme and (C) angiotensin-(1-7) Mas receptor changes. Each value represents the mean \pm standard error of 6 animals. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs control group and ##, $p < 0.01$ vs HG + PBS by One-Way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. PBS, phosphate buffer saline; NaHS, sodium hydrosulfide; DL-PAG, DL-Propargylglycine; ACE2, angiotensin converting enzyme type 2; HG, hyperglycemia.

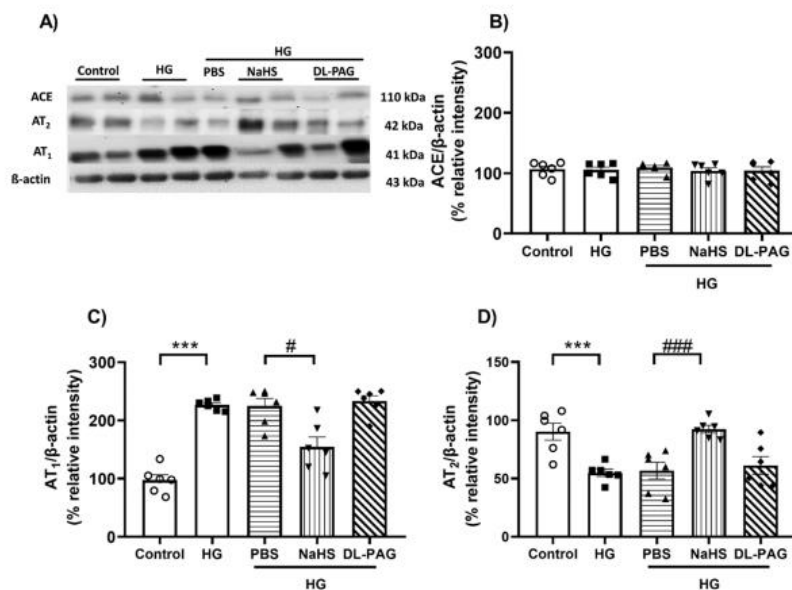


Fig. 7. Effect of chronic administration of NaHS on enzyme ACE and angiotensin II AT₁, AT₂ receptors expression changes in the thoracic aorta of hyperglycemic animals. (A) Representative blot of ACE, angiotensin II AT₁, and AT₂ receptors expression. Effect of pharmacological treatment on (B) ACE enzyme, (C) angiotensin II AT₁ receptor, and (D) angiotensin II AT₂ receptor changes. Each value represents the mean \pm standard error of 6 animals. *** $p < 0.001$ vs control group and #, $p < 0.05$, ###, $p < 0.001$ vs HG + PBS by One-Way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. PBS, phosphate buffer saline; NaHS, sodium hydrosulfide; DL-PAG, DL-Propargylglycine; ACE, angiotensin converting enzyme; AT₁, angiotensin II type I receptor; AT₂, angiotensin II type II receptor; HG, hyperglycemia.

and D). On the other hand, the HG + NaHS group showed a significant increase in the protein expression of the angiotensin II AT₂ receptor ($p < 0.001$, Fig. 7A and D) that was not observed in the HG + DL-PAG group ($p = 0.877$, Fig. 7A and D) when compared to HG + PBS group.

4. Discussion

4.1. NaHS does not decrease hyperglycemia

Type 2 Diabetes Mellitus is characterized by increased blood glucose levels (hyperglycemia). Several experimental models are based on STZ

injections that impair beta-pancreatic functions inducing hyperglycemia. In this context, the administration of STZ within the first postnatal days triggers the development of T2DM [21]. According to this, our results show that the STZ administration to male Wistar rats on postnatal days 3-4 promotes an increase in blood glucose levels, as previously demonstrated [22]. As the hyperglycemic state during T2DM is associated with cardiovascular complications, managing glucose levels during T2DM is essential to prevent microvascular and macrovascular complications [23]. Therefore, we tested whether NaHS or DL-PAG administration could regulate glucose levels in STZ-treated rats. Our results demonstrate that hyperglycemia was not prevented by either NaHS or

DL-PAG treatment. Conversely, previous reports have shown beneficial metabolic effects through K_{ATP}^+ channel activation by H_2S donor administration during insulin resistance [24]. However, NaHS administration for 9 weeks increased serum glucose levels in an adult male Wistar rat model with T2DM induced by a high-fat diet (HFD) along with STZ administration (30 mg/kg, i.p.) [25]. Moreover, DL-Propargylglycine treatment (40 mg/kg/day, i.p.) for 30 days protected against hyperglycemia in mice with STZ [26]. Despite these previous reports, we did not observe changes after the pharmacological treatment, probably due to differences in the experimental model, the timing of the NaHS administration, or the strain used. In this sense, we cannot exclude the possibility of a long-term effect (i.e., beyond week 16) of the pharmacological treatment on glucose levels.

4.2. HG impairs the RAS-mediated vascular responses in thoracic aortas

Vascular dysfunction is a common feature of hyperglycemic state and is defined as an imbalance in the production of relaxing and contractile factors [3]. Vascular dysfunction is mainly attributed to nitric oxide imbalance [27]. However, changes in vasoactive peptides derived from the RAS, such as Ang-(1–7) and Ang II, may also contribute to vascular dysfunction [4]. In this regard, a decrease in vasorelaxation to Ang-(1–7) and an increase in Ang II-induced contractile responses have been reported in metabolic diseases, including insulin resistance [28, 29], metabolic syndrome [30] and diabetes [31]. According to this, our results show that vascular responses to Ang-(1–7) are significantly decreased during STZ-induced HG probably due to: 1) changes in the expression of receptors and enzymes that favour signalling pathways and production of these peptides [31,32]; 2) an increase in reactive oxygen species [33,34], and 3) a lower NO production rate, since Ang-(1–7) upregulates nitric oxide synthase [34]. Conversely, we found that Ang II-induced contractile responses decreased in the HG group. In the same line of evidence, a previous study showed that contractile responses to Ang II decreased in mesenteric from diabetic animals [35]. Although we have no clear-cut explanation for this finding, the differences observed in the Ang II-mediated contractile responses under metabolic conditions could be mediated by: 1) changes in the expression of angiotensin II AT₁ receptor [32,33]; 2) changes in the expression of G proteins that affect the extent of receptor-initiated cellular signal and function [36]; 3) impairments of other contractile systems, such as α_1 -adrenergic receptors [37,38]. To fully characterize the changes in the RAS, we first determined Ang-(1–7) and Ang II serum levels in STZ-induced HG animals. Our results showed that both Ang-(1–7) and Ang II serum levels decreased in hyperglycemic animals, as previously demonstrated [39–41]. Thus, we assessed the protein expression of Ang-(1–7), Ang II synthesizing enzymes (i.e., ACE2 and ACE, respectively) and angiotensin-(1–7) Mas, angiotensin II AT₁ and AT₂ receptors. Our data demonstrated that ACE2 and the angiotensin-(1–7) Mas receptor decreased in the thoracic aortas of hyperglycemic animals, as previously shown in the kidney and hearts of diabetic animals [42–44]. On the other hand, we found that ACE expression did not change at week 16 after hyperglycemia induction. In this sense, it has been suggested that ACE deteriorates the cardiovascular system in the first week of diabetes with no further changes in its activity or expression at week 4 [45]. Lastly, our results demonstrate that the angiotensin II AT₁ receptor increased in the thoracic aortas of hyperglycemic rats, whereas the angiotensin II AT₂ receptor decreased. Similar results have been shown in cardiac tissue from STZ-induced diabetes models [32]. Taken together, our study reveals that STZ-induced HG alters Ang-(1–7) synthesis by impairing ACE2 protein expression, which promotes a decrease in this peptide serum level. Moreover, the impairment in the vasorelaxant responses to Ang-(1–7) is mediated by a decrease in angiotensin-(1–7) Mas receptor protein expression. Conversely, Ang II serum level, but not ACE protein expression, was diminished in HG rats. Despite this, it is possible to suggest that the angiotensin II AT₁ and AT₂ receptor protein expression changes may underlie the alteration in Ang

II-induced contractile responses during STZ-induced HG.

4.3. NaHS administration reverses vascular dysfunction induced by HG through RAS

It is well known that H_2S prevents the vascular dysfunction observed in several pathologies [12,46,10]. This beneficial effect is mainly attributed to the H_2S -induced vascular regulation through: 1) the activation of potassium channels such as K_{ATP}^+ [47]; 2) inhibition of phosphodiesterase 5 [48]; 3) restoration of NO-mediated relaxing responses [46]. However, the effect of H_2S on regulating RAS-mediated vascular function has been poorly evaluated under pathological conditions. In this regard, we investigated the effect of NaHS chronic administration (5.6 mg/kg, i.p. for 4 weeks) on the RAS impairments observed in thoracic aortas from hyperglycemic rats (HG + NaHS group). Thus, we demonstrated that NaHS administration restored Ang-(1–7)-induced vasorelaxant responses probably due to the restoration of Ang-(1–7) serum levels and the expression of the ACE2 and the angiotensin-(1–7) Mas receptor. In support of this, Lin et al. [13] previously reported that the administration of NaHS promoted the expression of ACE2 in the carotid artery [13]. We acknowledge that the angiotensin-(1–7) Mas receptor is not the only receptor mediating Ang-(1–7) vasorelaxant responses. Indeed, Ang-(1–7) also binds Mas-related G protein-coupled receptor member D (MrgD receptor) [49], and angiotensin-(1–7) Mas receptor can form heterodimers with angiotensin II AT₁ receptor [50], resulting in vasorelaxation. On the other hand, we found that NaHS chronic treatment decreased angiotensin II AT₁ receptor and increased angiotensin II AT₂ receptor protein expression. Additionally, our data show a restoration of Ang II serum levels after NaHS treatment with no changes in ACE protein expression. These findings may contribute to re-establishing the contractile responses to Ang II. Moreover, the increase in the expression of the angiotensin II AT₂ receptor could explain, at least in part, why the relaxing responses in the HG + NaHS are more significant when compared to the HG control group. It should be admitted that NaHS effects on the contractile responses in the thoracic aorta from hyperglycemic rats could also be mediated by: 1) a direct interaction between H_2S and angiotensin II AT₁ receptor [12]; 2) H_2S -induced antioxidant effects [10]; or 3) ACE inhibition [51].

Interestingly, we observed that NaHS ameliorated vascular dysfunction without altering blood glucose level, suggesting that RAS system affects vascular impairment independently of blood glucose level. According to this, the treatment with H_2S improved vascular function in thoracic aortas from STZ-induced hyperglycemic rats without affecting hyperglycemia [52]. Since hyperglycemic conditions are highly associated with an overproduction of reactive oxygen species [53], it is possible to suggest that NaHS treatment, in our study, could be restoring vascular function by decreasing the oxidative stress rather than modulating glucose levels. In this sense, we and others have previously demonstrated that decreasing oxidative stress promotes an improvement of vascular responses [54,46,55].

Lastly, we did not find any significant change in vascular function in the HG-induced impairments of the RAS after the pharmacological treatment with DL-PAG. To the best of our knowledge, this is the first study evaluating the effect of CSE inhibition on RAS-mediated vascular function. However, a previous study has shown that DL-PAG administration did not modify the relaxing responses to acetylcholine in an angiotensin II-induced hypertension model [12]. We acknowledge that the inhibition of CSE would be expected to trigger an effect on vascular responses due to its regulatory role on vascular function [56]. However, it should be mentioned that H_2S production in blood vessels depends not only on CSE enzyme but also on 3-MST and CBS enzymes [57]. Moreover, it has been demonstrated that the expression of the CSE enzyme is decreased in the aortas of spontaneously hypertensive rats [58], and periaortic adipose tissue after a high caloric diet [59]. Based on this, it is possible to suggest that CSE enzyme could be reduced under our experimental conditions limiting the effect of DL-PAG. In this context,

the absence of effects observed in the HG + DL-PAG group suggests that endogenous CSE-derived H₂S does not mediate the RAS-induced vascular responses and highlights the potential role of exogenous H₂S as a potential avenue for HG-induced vascular complications.

At this point, we should admit that H₂S is a gasotransmitter with significant implications in the cardiovascular system [60]. Particularly, H₂S treatment reversed atherosclerosis induced by partial ligation of the carotid artery by regulating angiotensin-converting enzyme type 2 [13]. Moreover, H₂S synthesis is impaired in patients with heart failure [61] and unstable angina [62]. Although we did not evaluate these potential effects in our study, it is possible that NaHS treatment in hyperglycemic rats could also prevent the development of cardiovascular events such as atherosclerosis and angiopathy. However, more studies addressing these possibilities are still required.

5. Conclusion

Our results demonstrate that hyperglycemia impairs the RAS and its associated vascular responses in thoracic aortas. Moreover, exogenous but not endogenous, H₂S ameliorates hyperglycemia-induced RAS alterations and, consequently, improves the vascular responses to Ang-(1–7) and Ang II. Altogether, these findings shed further light on the potential role of H₂S in treating the vascular complications observed during hyperglycemia.

CRedit authorship contribution statement

Diana L. Silva-Velasco: Conceptualization, Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Investigation. **Jesus H. Beltran-Ornelas:** Visualization, Methodology, Writing – review, Formal analysis. **Jorge Tapia-Martínez:** Conceptualization, Methodology, writing review. **Araceli Sánchez-López:** Methodology, writing review. **Saúl Huerta de la Cruz:** Conceptualization, Methodology, writing review, Validation. **Luz Graciela Cervantes-Pérez:** Visualization, Methodology, writing review. **Leonardo del Valle-Mondragón:** Writing review, Methodology. **Alicia Sánchez-Mendoza:** Conceptualization, Resources, Writing – original draft, Supervision, Funding acquisition. **David Centurión:** Conceptualization, Resources, Writing – original draft, Supervision, Funding acquisition.

Data Availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

The authors acknowledge Conacyt Mexico for the partial financial support (Grant No. 252702), and scholarships 489752 (DLSV) and 857923 (JHBO). We also acknowledge Marco Osciél Hidalgo Aquino, B. Sc., for their technical assistance in this study.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.peptides.2023.171001](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171001).

References

- [1] N.A. ElSayed, G. Aleppo, V.R. Aroda, R.R. Bannuru, F.M. Brown, D. Bruemmer, B. S. Collins, M.E. Hilliard, D. Isaacs, E.L. Johnson, S. Kahan, K. Khunti, J. Leon, S. K. Lyons, M.L. Perry, P. Prahalad, R.E. Pratley, J.J. Seley, R.C. Stanton, R. A. Gabbay, 2. Classification and diagnosis of diabetes: standards of care in diabetes-2023, *Diabetes Care* 46 (2023) S19–S40.
- [2] P. Saeedi, I. Petersohn, P. Salpea, B. Malanda, S. Karuranga, N. Unwin, S. Colagiuri, L. Guariguata, A.A. Motala, K. Ogurtsova, J.E. Shaw, D. Bright, R. Williams, IDF Diabetes Atlas Committee, Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition, *Diabetes Res. Clin. Pr.* 157 (2019), 107843.
- [3] B.F. Melo, J. Prieto-Lloret, M.D. Cabral, F.O. Martins, L.B. Martins, J.F. Sacramento, P. Ruivo, T. Carvalho, S.V. Conde, Type 2 diabetes progression differently affects endothelial function and vascular contractility in the aorta and the pulmonary artery, *Sci. Rep.* 11 (2021) 6052.
- [4] P.M. Vanhoutte, H. Shimokawa, M. Feletou, E.H. Tang, Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update, *Acta Physiol. (Oxf.)* 219 (2017) 22–96.
- [5] M. Paz Ocaranza, J.A. Riquelme, L. Garcia, J.E. Jalil, M. Chiong, R.A.S. Santos, S. Lavandero, Counter-regulatory renin-angiotensin system in cardiovascular disease, *Nat. Rev. Cardiol.* 17 (2020) 116–129.
- [6] V.C. Olivon, R.D. Aires, L.B. Santiago, L.Z. Ramalho, S.F. Cortes, V.S. Lemos, Mas receptor overexpression increased Ang-(1-7) relaxation response in renovascular hypertensive rat carotid, *Peptides* 71 (2015) 250–258.
- [7] U. Shefa, M.S. Kim, N.Y. Jeong, J. Jung, Antioxidant and cell-signaling functions of hydrogen sulfide in the central nervous system, *Oxid. Med. Cell Longev.* 2018 (2018) 1873962.
- [8] K. Abe, H. Kimura, The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator, *J. Neurosci.* 16 (1996) 1066–1071.
- [9] W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang, The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener, *EMBO J.* 20 (2001) 6008–6016.
- [10] H.H. Ng, G.S. Yildiz, J.M. Ku, A.A. Miller, O.L. Woodman, J.L. Hart, Chronic NaHS treatment decreases oxidative stress and improves endothelial function in diabetic mice, *Diab. Vasc. Dis. Res.* 14 (2017) 246–253.
- [11] F.P. Dominici, L.C. Veiras, J.Z.Y. Shen, E.A. Bernstein, D.T. Quiroga, U. M. Steckelings, K.E. Bernstein, J.F. Giani, Activation of AT2 receptors prevents diabetic complications in female db/db mice by NO-mediated mechanisms, *Br. J. Pharm.* 177 (2020) 4766–4781.
- [12] M.R. Al-Magableh, B.K. Kemp-Harper, J.L. Hart, Hydrogen sulfide treatment reduces blood pressure and oxidative stress in angiotensin II-induced hypertensive mice, *Hypertens. Res* 38 (2015) 13–20.
- [13] Y. Lin, H. Zeng, L. Gao, T. Gu, C. Wang, H. Zhang, Hydrogen sulfide attenuates atherosclerosis in a partially ligated carotid artery mouse model via regulating angiotensin converting Enzyme 2 expression, *Front Physiol.* 8 (2017) 782.
- [14] National Research Council Committee for the Update of the Guide for the Care, Use of Laboratory Animals, 2011. *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academies Press (US).
- [15] B. Geng, B. Cai, F. Liao, Y. Zheng, Q. Zeng, X. Fan, Y. Gong, J. Yang, Q.H. Cui, C. Tang, G.H. Xu, Increase or decrease hydrogen sulfide exert opposite lipolysis, but reduce global insulin resistance in high fatty diet induced obese mice, *PLoS One* 8 (2013), e73892.
- [16] O. Revenko, Y. Pavlovskiy, M. Savyt'ska, A. Yashchenko, V. Kovalyshyn, I. Chelpanova, O. Varyvoda, O. Zayachkivska, Hydrogen sulfide prevents mesenteric adipose tissue damage, endothelial dysfunction, and redox imbalance from high fructose diet-induced injury in aged rats, *Front Pharm.* 12 (2021), 693100.
- [17] C.B. Gomez, S.H. de la Cruz, G.J. Medina-Terol, J.H. Beltran-Ornelas, A. Sánchez-López, D.L. Silva-Velasco, D. Centurión, Chronic administration of NaHS and L-Cysteine restores cardiovascular changes induced by high-fat diet in rats, *Eur. J. Pharm.* 863 (2019), 172707.
- [18] S. Huerta de la Cruz, L. Rocha, C. Santiago-Castaneda, A. Sanchez-Lopez, A. D. Pinedo-Rodriguez, G.J. Medina-Terol, D. Centurion, Hydrogen sulfide subchronic treatment improves hypertension induced by traumatic brain injury in rats through vasopressor sympathetic outflow inhibition, *J. Neurotrauma* 39 (2022) 181–195.
- [19] J.F. Álvarez-Cámara, M.B. Ramírez-Rosas, G.J. Medina-Terol, D.L. Silva-Velasco, A. Velasco-Paz, A. Sánchez-López, C.G. Guzman-Priego, U. Osuna-Martínez, D. Centurión, Potential vascular alpha1-adrenoceptor blocking properties of metformin in rat aorta and tail artery, *Eur. J. Pharm.* 858 (2019), 172498.
- [20] F.A. Tenorio-Lopez, G. Zarco-Olvera, A. Sanchez-Mendoza, M. Rosas-Peralta, G. Pastelin-Hernandez, L. del Valle-Mondragon, Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats, *Talanta* 80 (2010) 1702–1712.
- [21] B. Portha, O. Blondel, P. Serradas, R. McEvoy, M.H. Giroix, M. Kergoat, D. Bailbe, The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin, *Diabete Metab.* 15 (1989) 61–75.
- [22] B.R. Goyal, K. Parmar, R.K. Goyal, A.A. Mehta, Beneficial role of telmisartan on cardiovascular complications associated with STZ-induced type 2 diabetes in rats, *Pharm. Rep.* 63 (2011) 956–966.
- [23] R. Goyal, I. Jialal, *Diabetes Mellitus Type 2*, StatPearls, Treasure Island (FL), 2021.
- [24] J. Beltowski, G. Wojcicka, A. Jamroz-Wisniewska, Hydrogen sulfide in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity: Implications for the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus, *Biochem Pharm.* 149 (2018) 60–76.
- [25] S. Gheibi, S. Jeddi, K. Kashfi, A. Ghasemi, Effects of hydrogen sulfide on carbohydrate metabolism in obese type 2 diabetic rats, *Molecules* (2019) 24.
- [26] G. Yang, G. Tang, L. Zhang, L. Wu, R. Wang, The pathogenic role of cystathionine gamma-lyase/hydrogen sulfide in streptozotocin-induced diabetes in mice, *Am. J. Pathol.* 179 (2011) 869–879.
- [27] H. Shimokawa, S. Godo, Diverse functions of endothelial NO synthases system: NO and EDH, *J. Cardiovasc Pharm.* 67 (2016) 361–366.
- [28] P.A. Karpe, K. Tikoo, Heat shock prevents insulin resistance-induced vascular complications by augmenting angiotensin-(1-7) signaling, *Diabetes* 63 (2014) 1124–1139.

- [29] B. Viswanad, K. Srinivasan, C.L. Kaul, P. Ramarao, Effect of tempol on altered angiotensin II and acetylcholine-mediated vascular responses in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance, *Pharm. Res* 53 (2006) 209–215.
- [30] S. Ghata, P. Ramarao, Increased contractile responses to 5-Hydroxytryptamine and Angiotensin II in high fat diet fed rat thoracic aorta, *Lipids Health Dis.* 3 (2004) 19.
- [31] L. Pernomian, M.S. Gomes, C.B. Restini, A.M. de Oliveira, MAS-mediated antioxidant effects restore the functionality of angiotensin converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS axis in diabetic rat carotid, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014), 640329.
- [32] W. Qiao, C. Wang, B. Chen, F. Zhang, Y. Liu, Q. Lu, H. Guo, C. Yan, H. Sun, G. Hu, X. Yin, Ibuprofen attenuates cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic rats, *Cardiology* 131 (2015) 97–106.
- [33] L. Pernomian, M. Santos Gomes, C. Baraldi Araujo Restini, L. Naira Zambelli Ramalho, C. Renato Tirapelli, A. Maria de Oliveira, The role of reactive oxygen species in the modulation of the contraction induced by angiotensin II in carotid artery from diabetic rat, *Eur. J. Pharm.* 678 (2012) 15–25.
- [34] Y. Xu, F. Zhang, C. Li, H. Hao, Y. Hao, Angiotensin-(1-7) improves diabetes mellitus-induced erectile dysfunction in rats by regulating nitric oxide synthase levels, *Peptides* 151 (2022), 170765.
- [35] L.C. Chin, F.I. Achike, M.R. Mustafa, Hydrogen peroxide modulates angiotensin II-induced contraction of mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats, *Vasc. Pharm.* 46 (2007) 223–228.
- [36] A.H. Siddiqui, T. Hussain, Impaired angiotensin II AT(1) receptor function and enhanced Na, K-ATPase affinity for sodium in proximal tubule of streptozotocin-treated diabetic rats, *Clin. Exp. Hypertens.* 29 (2007) 435–444.
- [37] J. Edith-Rodriguez, A.A. Resendiz-Albor, I.M. Arciniega-Martinez, R. Campos-Rodriguez, E. Hong, F. Huang, S. Villafana, Effect of early diabetes on the expression of alpha-1 adrenergic receptors in aorta and carotid arteries of Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats, *Clin. Exp. Hypertens.* 35 (2013) 389–395.
- [38] R.J. Schulingkamp, V. Aloyo, R.J. Tallarida, R.B. Raffa, Changes in aorta alpha-1 adrenoceptor number and affinity during one year of streptozotocin-induced diabetes in rats, *Pharmacology* 74 (2005) 23–30.
- [39] D. Ding, Y. Du, Z. Qiu, S. Yan, F. Chen, M. Wang, S. Yang, Y. Zhou, X. Hu, Y. Deng, S. Wang, L. Wang, H. Zhang, H. Wu, X. Yu, Z. Zhou, Y. Liao, X. Chen, Vaccination against type 1 angiotensin receptor prevents streptozotocin-induced diabetic nephropathy, *J. Mol. Med. (Berl.)* 94 (2016) 207–218.
- [40] V.P. Singh, B. Le, R. Khode, K.M. Baker, R. Kumar, Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis, *Diabetes* 57 (2008) 3297–3306.
- [41] V. Vallon, L.M. Wead, R.C. Blantz, Renal hemodynamics and plasma and kidney angiotensin II in established diabetes mellitus in rats: effect of sodium and salt restriction, *J. Am. Soc. Nephrol.* 5 (1995) 1761–1767.
- [42] J.Y. Moon, K.H. Jeong, S.H. Lee, T.W. Lee, C.G. Ihm, S.J. Lim, Renal ACE and ACE2 expression in early diabetic rats, *Nephron Exp. Nephrol.* 110 (2008) e8–e16.
- [43] Y.H. Shin, J.J. Min, J.H. Lee, E.H. Kim, G.E. Kim, M.H. Kim, J.J. Lee, H.J. Ahn, The effect of fluvastatin on cardiac fibrosis and angiotensin-converting enzyme-2 expression in glucose-controlled diabetic rat hearts, *Heart Vessels* 32 (2017) 618–627.
- [44] Y. Wang, W. Fu, Y. Xue, Z. Lu, Y. Li, P. Yu, X. Yu, H. Xu, D. Sui, Ginsenoside Re ameliorates endothelial insulin resistance via upregulation of angiotensin-converting enzyme 2, *Front Pharm.* 12 (2021), 620524.
- [45] M.J. Crespo, S. Moreta, J. Gonzalez, Cardiovascular deterioration in STZ-diabetic rats: possible role of vascular RAS, *Pharmacology* 68 (2003) 1–8.
- [46] F.I. Lopez-Preza, S. Huerta de la Cruz, C. Santiago-Castaneda, D.L. Silva-Velasco, J. H. Beltran-Ornelas, J. Tapia-Martinez, A. Sanchez-Lopez, L. Rocha, D. Centurion, Hydrogen sulfide prevents the vascular dysfunction induced by severe traumatic brain injury in rats by reducing reactive oxygen species and modulating eNOS and H(2)S-synthesizing enzyme expression, *Life Sci.* 312 (2022), 121218.
- [47] J.M. Centeno, M.A. Lopez-Morales, A. Aliena-Valero, T. Jover-Mengual, M. C. Burguete, M. Castello-Ruiz, F.J. Miranda, Potassium channels contribute to the increased sensitivity of the rabbit carotid artery to hydrogen sulfide in diabetes, *Eur. J. Pharm.* 853 (2019) 33–40.
- [48] M. Bucci, A. Papapetropoulos, V. Vellecco, Z. Zhou, A. Pyriochou, C. Roussos, F. Roviezzo, V. Brancaleone, G. Cirino, Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 1998–2004.
- [49] A. Tetzner, K. Gebolys, C. Meinert, S. Klein, A. Uhlich, J. Trebicka, O. Villacanas, T. Walther, G-protein-coupled receptor MrgD is a receptor for angiotensin-(1-7) involving adenylyl cyclase, cAMP, and Phosphokinase A, *Hypertension* 68 (2016) 185–194.
- [50] M.A. Clark, D.I. Diz, E.A. Tallant, Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells, *Hypertension* 37 (2001) 1141–1146.
- [51] H. Laggner, M. Hermann, H. Esterbauer, M.K. Mueller, M. Exner, B.M. Gmeiner, S. Kapiotis, The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensin-converting enzyme activity of endothelial cells, *J. Hypertens.* 25 (2007) 2100–2104.
- [52] K. Suzuki, G. Olah, K. Modis, C. Coletta, G. Kulp, D. Gero, P. Szoleczky, T. Chang, Z. Zhou, L. Wu, R. Wang, A. Papapetropoulos, C. Szabo, Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 13829–13834.
- [53] M.A. Vargas-Vargas, A. Saavedra-Molina, M. Gomez-Barroso, D. Pena-Montes, C. Cortes-Rojo, A.R. Rodriguez-Orozco, M.P. Rocio, Diazoxide improves muscle function in association with improved dyslipidemia and decreased muscle oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats, *J. Bioenerg. Biomembr.* 55 (2023) 71–78.
- [54] M.R. Al-Magableh, B.K. Kemp-Harper, H.H. Ng, A.A. Miller, J.L. Hart, Hydrogen sulfide protects endothelial nitric oxide function under conditions of acute oxidative stress in vitro, *Naunyn Schmiede Arch. Pharm.* 387 (2014) 67–74.
- [55] B.L. Predmore, K. Kondo, S. Bhushan, M.A. Zlatopolsky, A.L. King, J.P. Aragon, D. B. Grinsfelder, M.E. Condit, D.J. Lefer, The polysulfide diallyl trisulfide protects the ischemic myocardium by preservation of endogenous hydrogen sulfide and increasing nitric oxide bioavailability, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302 (2012) H2410–H2418.
- [56] A. Katsouda, M. Markou, P. Zampas, A. Varela, C.H. Davos, V. Vellecco, G. Cirino, M. Bucci, A. Papapetropoulos, CTH/MPST double ablation results in enhanced vasorelaxation and reduced blood pressure via upregulation of the eNOS/sGC pathway, *Front Pharm.* 14 (2023) 1090654.
- [57] G. Cirino, C. Szabo, A. Papapetropoulos, Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs, *Physiol. Rev.* 103 (2023) 31–276.
- [58] H. Yan, J. Du, C. Tang, The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats, *Biochem Biophys. Res Commun.* 313 (2004) 22–27.
- [59] X. Feng, Y. Chen, J. Zhao, C. Tang, Z. Jiang, B. Geng, Hydrogen sulfide from adipose tissue is a novel insulin resistance regulator, *Biochem Biophys. Res Commun.* 380 (2009) 153–159.
- [60] G.K. Kolluru, R.E. Shackelford, X. Shen, P. Dominic, C.G. Kevil, Sulfide regulation of cardiovascular function in health and disease, *Nat. Rev. Cardiol.* 20 (2023) 109–125.
- [61] D.J. Polhemus, J.W. Calvert, J. Butler, D.J. Lefer, The cardioprotective actions of hydrogen sulfide in acute myocardial infarction and heart failure, *Sci. (Cairo)* 2014 (2014), 768607.
- [62] H.L. Jiang, H.C. Wu, Z.L. Li, B. Geng, C.S. Tang, Changes of the new gaseous transmitter H2S in patients with coronary heart disease, *Di Yi Jun. Yi Da Xue Xue Bao* 25 (2005) 951–954.