



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

"Efecto de la fructosa sobre la expresión del gen del angiotensinógeno en la línea celular HepG2".

Tesis individual

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

Sandra Margarita Hidalgo Martínez

Dirigido por:

Dr. en C. Pablo García Solís

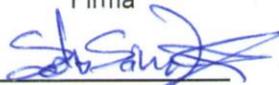
Dr. en C. Pablo García Solís
Presidente


Firma

Dr. en C. Enrique Villarreal Ríos
Secretario


Firma

Dr. en C. Juan Carlos Solís Sáinz
Vocal


Firma

Dr. en C. María Carlota García Gutiérrez
Suplente


Firma

Dra. María Elena Villagrán Herrera
Suplente


Firma



Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea.
Directora de la Facultad



Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.
Directora de Investigación y
Posgrado

Contenido

RESUMEN	3
SUMMARY	4
DEDICATORIA.....	5
Declaratoria de autoría.....	6
AGRADECIMIENTOS	7
INDICE DE CUADROS	8
INDICE DE FIGURAS	9
Introducción.....	11
Antecedentes	12
Hipertensión Arterial.....	13
Angiotensinógeno	15
Estructura de la proteína.....	15
Estructura del gen del angiotensinógeno.....	17
Regulación de la expresión del gen del Angiotensinógeno.....	18
Estructura y regulación del RNAm.....	22
Renina.....	25
Fructosa	26
Generalidades	26
Composición química.....	27
Consumo recomendado.....	28
Absorción y metabolismo.....	28
Regulación de la expresión génica por carbohidratos.....	30
Efectos del consumo de la fructosa	34
Otros efectos deletéreos asociados a la fructosa	35
Modelos para estudiar los efectos metabólicos de la fructosa.....	36
Ácido úrico y fructosa.....	38
3. Objetivo	40
Objetivo General.....	40

Objetivos Particulares	40
4. Hipótesis.....	40
5. Justificación.....	41
6. Material y Métodos.....	42
Cultivo y subcultivo celular:.....	43
Protocolo de Trizol	49
Medición de la concentración de RNAm	52
Electroforesis en gel de agarosa.....	53
RT-PCR	54
7. Resultados y discusión.....	57
8. Conclusión.....	63
9. Referencias bibliográficas	64

RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica y es el factor de riesgo más importante para desarrollar enfermedades cardiovasculares que son la primera causa de muerte en el mundo, por lo que se considera un problema de Salud Pública. En México la prevalencia de HTA es de 31.5%, su incremento se ha asociado a diferentes factores como el alto consumo de la fructosa en los productos alimenticios dado su mayor poder edulcorante, bajo índice glucémico y menor costo. Para estudiar el papel de la fructosa se han desarrollado modelos *in vitro* con células HepG2. **Objetivo:** Analizar el efecto de la fructosa en la expresión del gen del angiotensinógeno en la línea celular HepG2. **Métodos:** Estudio experimental con la línea celular HepG2. El RNA total se extrajo con reactivo de Trizol. Se realizó RT-PCR. Se realizaron curvas de dosis respuesta de fructosa y glucosa (0, 5, 10 y 20 μ M) a las 24 h para medir la expresión del RNA mensajero. **Resultados:** Se probó la hipótesis de que la fructosa incrementa la expresión del ANG en un modelo *in vitro* de hepatocitos humanos. A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas se encontró una tendencia de mayor expresión del mRNA del ANG y ACC con la concentración de 20 mM de fructosa. **Conclusión:** diversos estudios epidemiológicos y experimentales muestran que existe relación entre el consumo excesivo de fructosa y la HTA.-En ésta investigación se observó que la fructosa aumenta la expresión del mRNA del ANG y la ACC en las células HepG2 y se destaca la importancia de estudiar la fructosa en combinación con glucosa en diferentes concentraciones.

Palabras clave: Fructosa, HepG2, Angiotensinógeno, Hipertensión Arterial.

SUMMARY

High blood pressure (HBP) is a chronic disease and is the most important risk factor to develop cardiovascular diseases that are the leading cause of death in the world, which is why it is considered a public health problem. In Mexico the prevalence of HBP is 31.5%; its increase has been associated with different factors such as the high consumption of fructose in food products given its greater sweetening power, low glycemic index and lower cost. To study the role of fructose, in vitro models with HepG2 cells have been developed. Objective: To analyze the effect of fructose on the expression of the angiotensinogen gene in the HepG2 cell line. Methods: Experimental study with the HepG2 cell line. The total RNA was extracted with Trizol reagent. RT-PCR was performed. Fructose and glucose dose response curves (0, 5, 10 and 20 μ M) were performed at 24 h to measure the expression of messenger RNA. Results: The hypothesis that fructose increases the expression of ANG in an in vitro model of human hepatocytes were tested. Despite the fact that no statistically significant differences were found, a tendency of higher expression of ANG and ACC mRNA was found with the 20 mM concentration of fructose. Conclusion: several epidemiological and experimental studies show that there is a relationship between excessive fructose consumption and HTN. In this research, it was observed that fructose increases the expression of ANG mRNA and ACC in HepG2 cells and highlights the importance of studying fructose in combination with glucose in different concentrations.

Key words: Fructose, HepG2, Angiotensinogen, Hypertension.

DEDICATORIA

A mi hijo Pablo Meré Hidalgo porque siempre me apoya en todos los proyectos que emprendo y por ser mi razón de existir.

Al Dr. Bernardo del Sagrado Corazón de Jesús Recamier Torres, por su cariño, paciencia y apoyo incondicional.

Declaratoria de autoría

Declaro que el trabajo que se presenta en esta tesis fue realizado por mí, a excepción de aquellas secciones que formaron parte de colaboraciones, mismas que se indican explícitamente en el texto.

Confirmando que las ideas originales aquí presentadas son de mi autoría y que a lo largo de la tesis le he dado crédito al trabajo de otros investigadores mediante el uso adecuado de las referencias.

Esta copia se ha sometido a la Universidad Autónoma de Querétaro bajo el entendido de que constituye material con derechos de autor y que no puede citarse ningún pasaje de esta tesis sin darle el crédito adecuado.

©2018. Universidad Autónoma de Querétaro y Sandra Margarita Hidalgo Martínez.

AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto Mexicano del Seguro Social** por otorgar la beca íntegra y permitirme tener el tiempo y recursos económicos para estudiar la maestría, esperando contribuir a esta noble institución y realizar investigación de la mejor calidad en beneficio de la derechohabiente.

A la **Universidad Autónoma de Querétaro** por el apoyo económico para el desarrollo de la presente investigación, mediante el programa **FOPER**.

A mi Director de Tesis Dr. Pablo García Solís, por su paciencia y tolerancia para la enseñanza de conocimientos procedimentales y conceptuales, por contagiarme su amor a la investigación y ser un ejemplo a seguir en ética y valores.

Al Dr. Enrique Villarreal Ríos, por su gran apoyo como Co-director, por respaldarme ante el IMSS, por estar siempre dispuesto a ayudar y compartir sus conocimientos.

A todos los docentes de la Maestría en Ciencias de Biomedicina, por compartir sus conocimientos y ser un estímulo positivo, lo que me motivó a buscar la forma de hacer de mi trabajo de investigación, una realidad y demostrar que sí se puede, gracias porque existen muchos docentes con mente brillante que les agrada enseñar, escuchar, orientar, apoyar, guiar, motivar y mostrar los diferentes caminos para llegar a alcanzar las metas propuestas.

Al Dr. Juan José García González y Dr. Juan Carlos Torres Molina de la Coordinación de Educación e Investigación por su tiempo y experiencia en los procesos administrativos.

Al Director de la Unidad de Medicina Familiar N° 9 de la Delegación Querétaro, Dr. Héctor Alhi Gutiérrez y Dr. Luis Proceso Vaquero por su valioso apoyo antes, durante y después de la maestría. Así como al personal de recursos humanos, la administradora y todas las bellas personas que con una sonrisa y palabras de apoyo en diferentes momentos me ayudaron a seguir.

Al personal de la Jefatura de Prestaciones Médicas que me brindaron todo el apoyo para poder concluir la maestría.

Al personal del laboratorio de Inmunología FMUAQ que me abrieron sus puertas y compartieron sus conocimientos y experiencia en la investigación biomédica, especialmente a la MCS Nadia Angélica Jiménez Luna.

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1	Efecto de la ANG II a través de los receptores AT1 y AT2	14
2	Efectos de varios reguladores de Angiotensinógeno en concentraciones plasmáticas y expresión del RNAm	18
3	Elementos reguladores del gen del ANG identificados funcional y/o estructuralmente en diferentes especies	19
4	Incremento de la concentración del angiotensinógeno o producción bajo diferentes factores de estimulación	22
5	Estímulos que alteran los niveles del mRNA de ANG en rata	24
6	Reactivos, medios de cultivo y equipo de laboratorio	42
7	Concentraciones y tiempo de tratamientos	46
8	Cuantificación de ácidos nucleicos	53
9	Primers utilizados en experimento	55
10	Protocolo PCR	56

INDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Mapa de regiones localizadas río arriba en el gen del angiotensinógeno de humano y rata con gen humano de antitrombina III.	20
2	Mapa de ANG humano localización de secuencias de variantes identificadas en sujetos hipertensos indicadas por las flechas	21
3	Consumo de sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa en E.E. U.U	27
4	Promedio diario per cápita de calorías en E.E.U.U. de alimentos disponibles	27
5	Absorción de fructosa	29
6	Metabolismo hepático de la fructosa y glucosa	29
7	Fructosa es un sustrato para la lipogénesis y la glucólisis	31
8	Estructura de la proteína ChREBP y sus variantes	32
9	Activación transcripcional de los genes glucolíticos y lipogénicos por ChREBP/M1x y SREBP-1c en el hígado	33
10	Incremento de síntesis de lípidos directamente por activación de ChREBP	33
11	Esquema del metabolism de las purinas luego de la fosforilación de la fructosa.	39
12	Vista microscópica de las Células HepG2	44
13	Subcultivo celular	45
14	Multiwell con tratamiento de fructosa o glucosa	46
15	Solución Stock de glucosa y fructosa	47
16	Extracción de RNA con método de Trizol	48
17	Extracción de ANG con PBS	49

18	Fase de homogeneizar y separar del Protocolo de Trizol	50
19	Fases de aislamiento y lavado del Protocolo de Trizol	51
20	Fase de resuspender del Protocolo de Trizol	52
21	Pantalla del Espectrofotómetro	52
22	Gel de agarosa de RNA	54
23	Protocolo RT	55
24	Efecto de la glucosa y fructosa sobre la expresión del mRNA del angiotensinogeno ANG en las células HepG2 después de 24 h de tratamiento	58
25	Efecto de la glucosa y fructosa sobre la expresión del mRNA del acetil CoA carboxilasa (ACC) en las células HepG2 después de 24 h de tratamiento	59
26	Ácido úrico de las células HepG2 con tratamiento de glucosa y fructosa en concentración de 5, 10 y 20 mM obtenido a las 12, 24 y 48 h	60

Introducción

En la actualidad existe una importante producción de alimentos endulzados con edulcorantes distintos a la sacarosa que, por aportar menos energía, son utilizados en productos para perder peso o para mantener un peso saludable, así mismo, para ofrecer opciones alimenticias a individuos que padecen de diabetes o intolerancia a la glucosa. Uno de los edulcorantes de mayor utilización es el jarabe de maíz alto en fructosa que tiene un costo más bajo para la industria alimentaria lo que permite su utilización en gran cantidad de productos que se consumen a diario (jugos, refrescos, salsas, etc.) por personas de todas las edades. El consumo excesivo del jarabe de maíz alto en fructosa se ha relacionado con la incidencia y prevalencia de enfermedades crónicas como la hipertensión arterial (HTA), la obesidad, la diabetes, las dislipidemias, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares. La obesidad, el sedentarismo y la alimentación son un elemento clave del estilo de vida y medio ambiente, que influyen en la salud y que pueden ser controlados, sin embargo, estas enfermedades se han convertido en epidemias; las diferentes estrategias implementadas por el sector salud no han sido exitosas y cada día se incrementa el número de personas que sufren dichos padecimientos con gran costo económico y social, dado que se incrementan los años de vida saludables perdidos, años de vida perdidos por muerte prematura y por discapacidad, los cuales son indicadores que permiten analizar la carga de la enfermedad.

La HTA a nivel mundial se ha convertido en un problema de salud pública, con una prevalencia que se incrementa en forma alarmante; es el principal factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, las cuales constituyen la primera causa de muerte a nivel mundial. El papel de la fructosa en la génesis de la HTA no se conoce plenamente sin embargo existen varios elementos que sugieren una fuerte asociación. En modelos animales se ha demostrado que el consumo excesivo de fructosa causa hipertensión arterial, obesidad, hígado graso y otros desordenes metabólicos (Hwang, 1987; Dai, 1994; Singh, 2008).

En esta investigación se utilizó un modelo *in vitro* de células hepáticas humanas derivadas de hepatocarcinoma, las cuales independientemente de ser cancerígenas, no son tumorigénicas y se ha demostrado ser un modelo útil para estudiar la fisiología y aspectos bioquímicos hepáticos. Adicionalmente, existe una dificultad técnica para tener cultivos primarios de hepatocitos, lo que hace a las células HepG2 como un excelente modelo *in vitro* en que se pueden generar alteraciones metabólicas. Por otra parte, se ha demostrado que la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (CHREBP) participa en la regulación de la expresión génica por carbohidratos la cual es estimulada o inhibida por diferentes metabolitos permitiendo la expresión o no de diferentes genes que codifican varias enzimas que intervienen en las vías metabólicas glucolíticas y lipogénicas. Esta investigación permite en forma inicial verificar la utilidad del modelo *in vitro* de las células HepG2 además de determinar el efecto de la fructosa y glucosa en la expresión del angiotensinógeno, que es el sustrato principal del sistema renina-angiotensina-aldosterona que tiene una función primordial en la regulación de la presión arterial.

Antecedentes

Las enfermedades cardiovasculares son responsables de casi un tercio del total (17 millones) de muertes por año en el mundo. Las complicaciones de la hipertensión arterial (HTA) causan anualmente 9.4 millones de muertes, de las cuales el 45% son por cardiopatías y el 51% por accidente cerebrovascular (OMS, 2013). En México de acuerdo a la Encuesta de Nutrición en Salud (ENSANUT) realizada en el 2012, la prevalencia de HTA fue de 31.5% [intervalo de confianza al 95% (IC 95%) 29.8-33.1], en adultos con obesidad fue del 42.3% (IC 95% 39.4-45.3) y en adultos con diabetes 65.6% (IC 95% 60.3-70.7). Se identificó que, del total de los adultos hipertensos, el 47.3% desconocía su diagnóstico (Barquera *et al.*, 2012).

Hipertensión Arterial

La HTA es una enfermedad poligénica y multifactorial, que afecta a diversos órganos y sistemas. La HTA ampliamente difundida por el mundo, representa el factor de riesgo más importante para desarrollar enfermedad cerebrovascular, enfermedad coronaria, enfermedad vascular periférica y falla renal progresiva (Meaney, 2006; Passalacqua, 2010).

La importancia de la HTA radica en el incremento de los eventos vasculares cerebrales y el deterioro renal hasta de 4 veces más que la población normal. Se consideran como factores que influyen el pronóstico a los niveles de la presión sistólica y diastólica, la edad en hombres > 55 años y en mujeres > 65 años, el tabaquismo, la dislipidemia, los niveles de glucosa entre 102 y 125 mg/dl, la intolerancia a la glucosa, la obesidad e historia de enfermedad cardiovascular (Martínez et al., 2017).

Para realizar el diagnóstico de la HTA, se consideran las cifras de la presión arterial sistólica y diastólica y se clasifica en presión óptima cuando los valores se encuentran menores o iguales a 120/80 mmHg. Para la presión arterial normal se establecieron los valores de 120-129/80-84 mmHg; una presión arterial normal alta se considera con valores de 130-139/85-89 mmHg. La HTA se clasifica en varias etapas: Etapa 1 corresponde a valores de 140-159/90-99 mmHg, la etapa 2 tiene valores entre 160-179/100-109 mmHg y etapa 3 con valores de $\geq 180 / \geq 110$ mmHg (Secretaría de Salud, 2010).

En el desarrollo de la HTA está implicado el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRA). El SRA clásico o plasmático actúa como un mecanismo de defensa, que se activa en respuesta a una hipotensión hipovolémica. Cuando la presión arterial disminuye por diferentes causas como hipovolemia o restricción de sodio, las células yuxtaglomerulares del riñón sintetizan a la renina, que se libera a la sangre, la cual rompe el enlace existente entre la Leu-10 y la Val-11 del angiotensinógeno (AGT) y genera un decapeptido inactivo llamado Angiotensina I (ANG I). La ANG I es transformada a Angiotensina II (ANG II) por la enzima convertidora de la angiotensina (ECA). La ECA es secretada por las células endoteliales de los pulmones y de los riñones, e hidroliza el dipéptido terminal His-9–Leu-10 de la ANG I y genera a la ANG II (octapéptido activo) (Ponce y Ponce, 2012).

La ANG II actúa a través de por lo menos dos clases de receptores, los receptores AT-1 y AT-2. La ANG II se une con similar afinidad a los receptores AT-1 y AT-2 y la acción funcional dependerá de qué receptor se encuentre con más expresión en el organismo. La mayoría de los efectos fisiológicos son a través de los receptores AT-1 ya que los AT-2 se expresan principalmente durante el periodo fetal y se asocian con la diferenciación y regeneración celular. La estimulación de los receptores de ANG II tienen diferentes efectos (**Cuadro 1**) (Santeliz *et al.*, 2008).

La ANG II produce una respuesta vasoconstrictora, aumenta la actividad del sistema simpático, estimula la liberación de vasopresina, incrementa el cronotropismo cardíaco y genera un aumento en la liberación de aldosterona por la corteza suprarrenal. La ANG II promueve la retención renal de sodio y agua, aumentando la presión arterial. La ANG II a través de los receptores AT1 en las células yuxtaglomerulares inhibe la síntesis y liberación de la renina, con lo que se regula la activación del SRA (Ponce y Ponce, 2012; Santeliz *et al.*, 2008; Pérez-Díaz *et al.*, 2006; Passalacqua, 2010).

Cuadro 1. Efecto de la ANG II a través de los receptores AT1 y AT2

Sitio	AT 1	AT 2
Arterias	<ul style="list-style-type: none"> • Vasoconstricción • Hipertrofia • Induce apoptosis • ↑ Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando la angiogénesis y remodelación vascular • (efecto inflamatorio vascular y endotelial) 	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatación • Promueve la apoptosis del músculo liso vascular • Fomenta en forma indirecta la producción de ON por estimulación de la ENOs • Bloquea la acción de radicales libres • Disminuye la expresión de los AT1
Corazón	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Contractilidad • ↑ Hipertrofia (prolif. de miocitos y colágena) • Induce apoptosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Antihipertrofia • Disminuye la apoptosis de miocitos • Disminuye la expresión de los AT1
S.N.	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Act. simpática • ↑ H. antidiurética (Sed) 	<ul style="list-style-type: none"> • Neuroprotección (apertura de los canales rectificadores retrasados de K y cierre de los canales de Ca) • Reparación nerviosa • Promueve la diferenciación celular
Endotelio	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Síntesis de radicales libres • Induce apoptosis • Disminuye síntesis de ON • ↑ La expresión del PAI-1(efecto procoagulante) • Activa a la Cox-2 • ↑ Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fomentando la angiogénesis y remodelación vascular 	<ul style="list-style-type: none"> • Fomenta en forma indirecta la producción de ON por estimulación de la ENOs • Regula la apoptosis • Bloquea la acción de radicales libres • Antiaterogénico • Promueve la diferenciación celular • Antiproliferativo • Reparación de tejido • Disminuye la expresión de los AT1
Riñón	<ul style="list-style-type: none"> • Retención Na • Inhibición renina 	<ul style="list-style-type: none"> • Vasodilatación aferente
Suprarrenales	<ul style="list-style-type: none"> • Libera catecolaminas • Libera aldosterona 	
Otros	<ul style="list-style-type: none"> • Libera Ca⁺⁺ 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibe la proliferación y crecimiento celular, regula la apoptosis, libera estrógenos y bradicinina

Tomado de: Santeliz *et al.*, 2008.

Se han descubierto SRA locales, compuestos por ANG y enzimas de conversión para la síntesis de ANG II. La renina de dichos sistemas deriva de la renina renal. Se regulan independientemente del SRA sistémico, aunque pueden interactuar con él. Se han identificado en el corazón, riñón, cerebro, páncreas, aparato reproductor, sistema linfático y el tejido adiposo (Ponce y Ponce, 2012). Además se han identificado en el interior de diferentes tipos de células, como los cardiomiocitos y los fibroblastos, las células A-120, las células HepG2, las células Chang Liver, las células HT1080 y las células T98G (Fukamizu *et al.*, 1990).

Los SRA locales constituyen un sistema endocrino, parácrino y autócrino que actúan sobre los receptores AT1 y AT2 de manera independiente o relacionada, y participan en el correcto funcionamiento de numerosos órganos, así mismo en mecanismos fisiopatológicos y alteraciones estructurales o funcionales, principalmente a nivel cardiovascular y renal. El SRA local protege al cerebro de alteraciones asociadas al síndrome metabólico, el aumento de peso, la hipertensión y la resistencia a la insulina (Campbell y Habener, 1986; Lynch y Peach, 1991; Segarra *et al.*, 2009; Ponce y Ponce, 2012).

Angiotensinógeno

Estructura de la proteína

El ANG, como ya se mencionó, es el sustrato de la renina, es una α -2 globulina que contiene en su extremo amino terminal, el decapeptido ANG I. El ANG se sintetiza principalmente en el hígado y el plasma es su principal reservorio. El ANG está formado por 452 aminoácidos y su peso molecular sin glicosilar es de 49 770 Da en el humano. El ANG tiene 2 variantes, de alto y bajo peso molecular (Morgan *et al.*, 1996).

En el extremo amino terminal del ANG se encuentra la ANG I, precedido por el péptido señal formado por 24 aminoácidos y el extremo carboxilo terminal que contiene 2 secuencias homólogas y 3 sitios potenciales de glicosilación en las posiciones 47-49, 295 a 297 y 319-321. Un 63% de las posiciones de aminoácidos en el pre-ANG de rata y humano son idénticas. Sin embargo, la secuencia adyacente al decapeptido ANG I es muy diferente en

humano y roedores, lo que se contribuye a la especificidad de especie que presenta la renina. La secuencia de aminoácidos del ANG es similar a la α -1-antitripsina, antitripsina y antitrombina por lo que se ha considerado un origen a partir de un gen ancestral común perteneciente a la superfamilia de inhibidores de las serina proteasas, sin embargo, al ANG no se le conoce actividad inhibitoria de proteasas (Ibarra-Rubio y Pedraza-Cheverri, 1993; Peach, 1977).

El ANG contiene varios sitios potenciales y patrones de N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) responsables del punto isoeléctrico y variantes del tamaño en la proteína circulante. El ANG de la rata y ratón son idénticos en 87% sin embargo, con respecto al ANG humano la identidad es de un 60% y 64%, respectivamente (Lynch, 1991).

Estructura del gen del angiotensinógeno

El gen del ANG se encuentra en los cromosomas 1q de humano, 19q de rata, y 8 de ratón. En las 3 especies hay un solo gen de ANG por genoma haploide.

La longitud del gen del ANG humano es de 13 kb formado por 5 exones separados por 4 intrones. La longitud de los exones del 1 al 5 es de 37 pb, 858 pb, 268 pb, 145 pb y 791 pb, respectivamente. En el exón 1 y las primeras 30 pb del exón 2 está codificada la región 5' no traducida del mRNA. En el exón 2 está codificada más del 50% de la proteína, incluidos el ANG I y el péptido señal. Tanto el exón 1 como las primeras 30 pb del exón 2 codifican para la región 5' no traducida del mRNA. El exón 5 tiene una secuencia codificadora corta y la secuencia 3' no traducida formada por 270 nucleótidos. Con respecto a los intrones, del A al D la longitud es 2.1 kb, 6.4 kb, 1.3 kb y 0.6 kb, respectivamente. El gen del ANG en rata al igual que el del humano consta de 5 exones y 4 intrones con una longitud y total de 11.8 kb. La longitud de los exones del 1 al 5 es de 31 pb, 859 pb, 268 pb, 145 y 459 pb, respectivamente. Con respecto a los intrones, la longitud del A al D es de 5.5 kb, 2.5 kb, 1.4 kb y 0.6 kb, respectivamente (Ibarra-Rubio y Pedraza-Chaverri, 1993).

Las diferencias más grandes entre los genes de ANG en humano y rata están en la región 3' no traducida. En el humano contiene 2 sitios potenciales de poliadenilación y ambos se usan *in vivo* para sintetizar 2 especies de mRNA solo diferentes en la región 3' terminal compuesta por 605 o 413 nucleótidos. El mRNA corto es 3 veces más abundante.

En el gen de la rata, la región 3' no traducida, es de 200 pb y tiene por lo menos 4 sitios de poliadenilación diferente por lo que es muy heterogéneo el tamaño del mRNA. Otra característica que lo diferencia con el gen del humano es que los glucocorticoides dirigen su transcripción desde un segundo promotor con dos nuevos sitios de iniciación de la transcripción a -386 y -328, por lo tanto estimulan la acumulación de dos formas más largas del mRNA extendidos en sus extremos 5'. Este segundo promotor es dependiente de dichas hormonas. En la rata existen dos TATA box a 25-30 nucleótidos de los

sitios de iniciación y dos elementos de respuesta a glucocorticoides (Tanaka *et al.*, 1984; Cloust *et al.*, 1988; Gaillard *et al.*, 1989).

Regulación de la expresión del gen del Angiotensinógeno

La región río arriba del gen del ANG en el humano y otras especies, contiene varias secuencias que participan en la regulación de la expresión génica al permitir la unión de diferentes factores de transcripción. Dentro los factores de transcripción descritos que regulan la expresión génica del gen del ANG se encuentran los receptores nucleares de glucocorticoides, estrógenos y hormonas tiroideas. La secuencia flanqueante 5' del gene del AGN de humano y rata presentan 60% de homología, lo que sugiere conservación de la regulación funcional. En el **Cuadro 2** se muestra el efecto de varios reguladores del gen del ANG sobre las concentraciones plasmáticas de la proteína y expresión del mRNA. (Gaillard *et al.*, 1989; Fukamizu *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1996).

Cuadro 2. Efectos de varios reguladores de Angiotensinógeno en concentraciones plasmáticas y expresión del RNAm.

Stimulus		Plasma angiotensinogen	mRNA	
Acute phase response		Rises	Hepatoma	Rises
Glucocorticoids				
Natural:	Cushing's syndrome	Rises		
	Adrenal insufficiency	Falls		
Induced:	Dexamethasone	Rises	Hepatic Brain Renal	+ 450% + 60% Unchanged
cAMP				
Induced:	Dibutyl cAMP	Rises*	Not measured	
Sex steroids				
Natural:	Pregnancy	Rises	Hepatic	Falls
Induced:	Oral contraceptives	Rises		
	Oestradiol	Rises	Hepatic	Rises
	Dihydrotestosterone	Unchanged	Hepatic	Falls
	Orchiectomy		Hepatic Renal	Falls Falls
Thyroid hormones				
Induced:	Thyroxine	Rises	Hepatic Brain	Rises Unchanged
	Tri-iodothyronine	Rises	Hepatic	Rises
	Hypothyroidism	Falls	Hepatic Brain	Falls Falls
Angiotensin II				
Induced:	Infusion	Rises	Hepatic Renal	Rises Rises
Insulin deficiency				
Induced:	Streptozotocin	Unchanged	Hepatic Adipocytes	Falls Falls

*Angiotensinogen concentration measured in cell culture medium.

Tomado de Morgan, L. 1996.

La región mínima regulatoria ubicada en la región 5' del gen de ANG es de 1 kb, 688 pb, 0.75 pb en el humano, rata y ratón (Morgan *et al.*, 1996).

En otros experimentos, se analizó el promotor basal del gen del ANG utilizando como gen reportero a la cloranfenicol acetiltransferasa, mostrando que el promotor proximal que va de -96 a +22, del sitio de inicio de la transcripción, es suficiente para expresar la actividad en las células HepG2- (Tamura *et al.*, 1994).

Se han estudiado varios elementos regulatorios del gen del ANG, identificados funcional y/o estructuralmente en humano, rata y ratón (**Cuadro 3**). Al comparar los promotores en la rata y ratón, mostró una región 5' flanqueante con caja TATA a su inicio en ambos genes, la región va de +22 a -207, existe una homología de 90%. Por otro lado, al comparar con la región promotora de los roedores con la del humano, releva una homología solo del 47% idéntico. El gen del ratón contiene una larga delección localizada entre la posición -209 y -210 donde la rata contiene 28 residuos de timina consecutivos, hipotéticamente se sugiere que los dominios conservados y las múltiples inserciones y delecciones pueden ser importantes para determinar los patrones de tejido específicos de especies para la expresión del gen del ANG. En este sentido, se sugiere la presencia de tipos celulares específicos con promotores funcionales para la expresión del gen del ANG, demostrado mediante la exhibición de la región flanqueante del promotor del ANG en las células de hepatoma HepG2 y células embrionarias de riñón, pero no en células de carcinoma cervical Hela (Tanaka *et al.*, 1984).

Cuadro 3. Elementos reguladores del gen del ANG identificados funcional y/o estructuralmente en diferentes especies.

Elemento	Especie
Secuencia TATA	Humano y rata
Secuencia CAAT	Humano
Intensificador	Rata
Elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE)	Humano, rata y ratón
Silenciador	Rata
Elemento de respuesta a estrógenos (ERE)	Humano y ratón
Elemento de respuesta a hormonas tiroideas (TRE)	Humano
Elemento de respuesta de fase aguda	Humano, rata y ratón

Tomado de Ibarra-Rubio (1993).

La regulación del angiotensinógeno se confirmó en hepatocitos de humanos y ratas, así como en líneas celulares. En esos modelos los

glucocorticoides, los estrógenos y las hormonas tiroideas aumentan la síntesis de ANG, sin embargo, la insulina y ANG II la inhiben dependiendo el modelo estudiado, lo que también hizo ver que se utilizan diferentes vías para los mecanismos regulatorios a nivel transcripcional. La región 5' flanqueante contiene secuencias cortas de nucleótidos implicadas en la regulación de procesos que se llevan a cabo gracias a la interacción DNA-proteínas. En este caso, el complejo hormona-receptor hormonal de glucocorticoide y estrógeno interactúa con la secuencia TGTCCTT y GGTCANNNTGACC respectivamente. Pueden existir un segundo o tercer mensaje intracelular que interactúa con las secuencias del DNA, tal es el caso del cAMP (Clauser, *et al.*, 1989).

Las primeras 500 pb se conservan en el gen del humano y roedores, se encuentran elementos responsivos a hormonas (HRE), dos elementos responsivos a glucocorticoides (GRE) localizados entre -129 y -217pb, un elemento responsivo a estrógenos (ERE) a -326pb. En la **Figura 1**, se muestra un mapa de los sitios de regulación transcripcional del gen del humano y rata y en la **Figura 2**, el mapa del ANG humano y sus quince variantes localizadas en población hipertensa.(Clauser *et al.*, 1989; Jeunemaitre *et al.*, 1992).

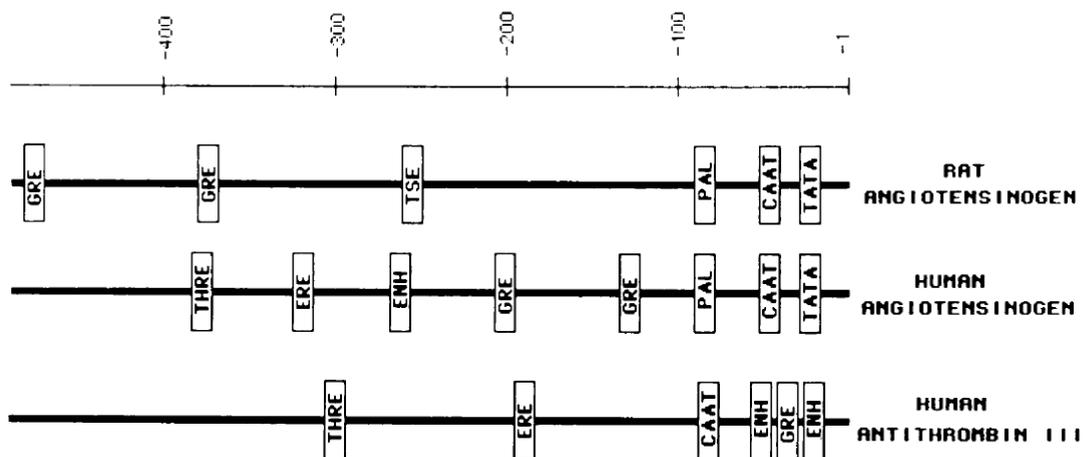


Figura 1. Mapa de regiones localizadas río arriba en el gen del angiotensinógeno de humano y rata con gen humano de antitrombina III. Tomado de: Clauser, *et al.*, 1989.

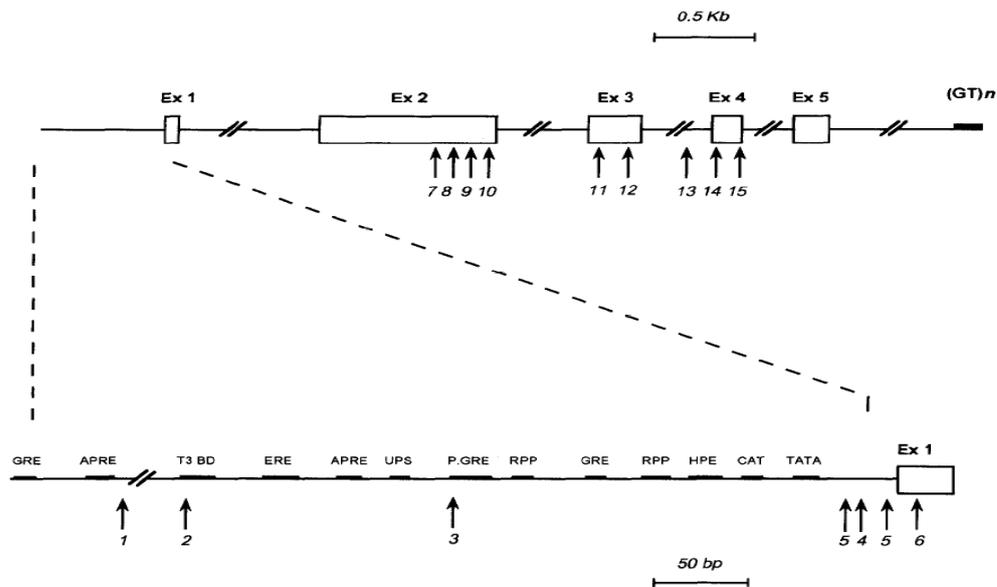


Figura 2. Mapa de ANG humano localización de secuencias de variantes identificadas en sujetos hipertensos indicadas por las flechas. Tomado de: Jeunemaitre 1992

En el **Cuadro 4** se muestra como se modifica la concentración existente o se produce el ANG, bajo el estímulo de sustancias cuyo receptor se ha identificado en la región promotora del gen del ANG en humano y rata. (Fukamizu, *et al.*, 1990; Lynch, 1991 (no está en lista); Ibarra-Rubio *et al.*, 1993; Morgan, *et al.*, 1996). Se ha demostrado que la estimulación del promotor del ANG trabaja como una unidad potenciadora, que incluye al receptor de glucocorticoides, factor nuclear Kappa B, proteína CEBP y caja CAAT que señala la unión para factores de transcripción del RNA (Ron, *et al.*, 1990).

En este sentido, se ha demostrado que con la activación del SRA a través de la producción de ANG II estimula la síntesis de ANG y el factor de transcripción kB que es regulado por la ANGII, actúa como segundo mensajero entre angiotensina y citocinas (Brasier y Li, 1996).

En las células HepG2, se demostró la existencia del factor del gen activador AGF2 y el AGF3, que ligan al elemento promotor proximal de -96 a -52 y activan al elemento activador del gen (AGE2) y el elemento del núcleo promotor de -6 a +22 (AGE3) respectivamente. Ambos elementos AG2 y 3 actúan sinérgicamente y activan la región del promotor proximal para el tipo celular específico (Tamura, *et al.*, 1994).

Cuadro 4. Incremento de la concentración del angiotensinógeno o producción bajo diferentes factores de estimulación.

	Plasma Angiotensinogen Concentration		Liver Angiotensinogen Production			
			Protein		mRNA	
	Rat	Human	In Vivo (tissue)	In Vitro (cell line)	In Vivo (tissue)	In Vitro (cell line)
Glucocorticoid	×2.5 to 3 (57, 58)	×2 to 2.3 (6)	Rat × 2 to 2.3 (13,14)	Rat × 2 (45)	Rat × 2 to 5 (49, 50)	Rat × 4 (51)
Estrogen	× 1.7 to 2.5 (43, 57, 58)	× 4 (6)	Rat × 2 to 3.5 (13, 14, 41, 60)	Human × 5 (46)	Rat × 2 (50)	Rat (51)
Thyroid hormones	× 1.5 to 2 (38-60)		Rat × 2.5 to 4 (14, 60)			Rat × 2 (51)
Angiotensin II	×2 (59)		Rat = (60)	Rat = (48) X2(40)		
Insulin			Rat × 2 (39)			
Binephrectomy	× 3.9 to 5 (36, 37)		Rat × 9 (41)		Rat × 2.1 (22)	
Inflammation	×3 (28)	×1.8 (7)			Rat × 5 (29)	

* The factor of multiplication affects either the plasma concentration of the protein (left) or the liver production of the protein or mRNA in either the rat or the human.

The references, where the values were found, are indicated in parentheses.

Tomado De Clauser, E. 1989.

El ANG es precursor de ANG II, que es importante regulador de la presión sanguínea y homeostasis electrolítica. Se han realizado análisis genéticos ligando la HTA con variantes del ANG humano. Se ha mostrado que los elementos *cis* localizados entre los nucleótidos 216 a 144 son muy importantes, por localizarse el nucleo promotor así como los factores nucleares AGCF1 y AGCE1 (nucleo promotores que ligan al factor y elemento 1, los cuales juegan un mayor rol al potenciar la función del ANG humano (Brasier *et al.*, 1989; Yanai *et al.*, 1996).

En ratones se identificó el sitio de unión FOXO1, para la supresión de la actividad del promotor por la insulina, por lo tanto regula la expresión del gen del ANG y controla en el plasma los niveles de ANG y ANG II, modulando la presión sanguínea (Wu *et al.*, 2011).

Estructura y regulación del RNAm

El mRNA de la rata contiene alrededor de 1800 nucleótidos de longitud, con 61, 1, 431 y 200-400 nucleótidos de la región 5' no traducible y la secuencia 3' no traducible. La heterogeneidad se debe a por lo menos cuatro diferentes sitios de poliadenilación, que se encuentran a 1650, 1785, 1800 y 1840 nucleótidos derivado de presentar dos sitios adicionales de transcripción para la acción de glucocorticoides, con el mismo potencial de codificación que

los mRNA predominantes en cada especie para el sistema renina-angiotensina (Lynch 1991).

Campbell *et al.* (1985) demostraron que todas las formas de ANG derivan de un solo precursor, y que la heterogeneidad representa diferencias en el proceso postraduccional que incluye N-glucosilación y O-glucosilación, así como la formación de complejos de alto peso molecular por asociación entre ANG de bajo peso molecular, o con alguna otra proteína cuya secreción en los hepatocitos es estimulada por dexametasona y mestranol.

La biosíntesis del ANG está regulada por factores hormonales como glucocorticoides, estrógenos, hormona tiroidea, insulina y ANG II. La regulación multifactorial de la síntesis de ANG parece operar a nivel transcripcional. Se han identificado niveles altos de ANG en inflamación, hipercorticismo, embarazo, terapia anticonceptiva, síndrome de Cushing en tratamiento con estrógenos y glucocorticoides y disminuido en enfermedad de Addison y tratamiento con inhibidores de la ECA (Ibarra-Rubio y Pedraza-Chaverri, 1993; Morgan *et al.*, 1996; Kobori *et al.*, 2008).

En el **Cuadro 5**, se muestran los estímulos que alteran los niveles del mRNA del ANG en forma positiva, negativa o no la alteran en modelo de rata, así como los diferentes tejidos en los que se ha identificado que se expresa el mRNA en diferentes investigaciones (Ibarra-Rubio y Pedraza-Chaverri, 1993).

Se ha asociado el ANG a la HTA, derivado de varios estudios donde se identificó correlación altamente significativa entre concentraciones de ANG en plasma y presión sanguínea en humanos, así como altas concentraciones plasmáticas de ANG en sujetos hipertensos comparada con normotensos, asimismo, se han identificado altas concentraciones de ANG en descendencia de personas con HTA; en este sentido, cuando se administraron anticuerpos para ANG o se inyectó, se observó la disminución o aumento de la presión arterial. La expresión del gen del ANG en tejidos directamente involucrados en la regulación de la presión arterial en diferentes investigaciones demostraron su papel en esta patología (Jeunemaitre *et al.*, 1992; Lifton *et al.*, 2001).

Cuadro 5. Estímulos que alteran los niveles del mRNA de ANG en rata.

Estímulo	Alteración	Tejido
	+	Riñón
Dieta baja en sodio	=, +	Hígado
Dieta alta en sodio	-	Hígado, riñón
Furosemide	+	Hígado
	=	Riñón, corazón, adrenal, cerebro
	-	Hígado
Enalapril	=	Riñón
	+	Tejido adiposo café
Captopril	-	Hígado y riñón
Angiotensina II	+	Hepatocito
Aldosterona	+	Hepatoma
Adrenalectomía	-	Hígado
	=	Hígado, cerebro y riñón
Binefrectomía	+	Hígado y tejido graso café
AMPc	+	Hepatocito
	-	Hepatocito
Estrógenos	+	Hígado y cerebro
	=	Corazón y hepatoma
Glucocorticoides	+	Hígado, hepatoma, hepatocito y cerebro
	=	Corazón y riñón
Insulina	-	Hepatocito
Hipotiroidismo	-	Hígado
Triyodotironina	+	Hígado y hepatoma
	=	Cerebro y riñón
Glucagón	-	Hepatocito
Desarrollo (pubertad)	=	Hígado
	+	Riñón
Castración	-	Riñón
Dieta alta o baja en proteínas	=	Hígado y riñón
Diabetes espontánea	-	Riñón
Diabetes inducida	-	Hígado

(+) Aumento, (-) disminución, (=) sin cambios. Tomado de: Ibarra-Rubio *et al*, 1993.

En estudios genéticos, se ha identificado, que existen más de 15 variantes o polimorfismos en el gen del ANG, los más comunes son M235T y T174M. En el M235T, el aminoácido 235 una metionina ha sido reemplazada por treonina y T174M, que en el aminoácido 174 se encuentra metionina en vez de treonina. Los polimorfismos existen en un porcentaje variable de la población a nivel mundial, y se relacionan con mayor frecuencia de HTA, especialmente para los que son homocigotos o quienes portan uno o dos alelos que combinan ambas variantes (Quiroga, 2010).

Renina

La renina es una proteasa que actúa sobre el ANG y forma a la ANG I y es parte del SRA. El gen de la renina se localiza en el cromosoma 1, su tamaño es de 12 kb y cuenta con diez exones y nueve intrones. La renina es sintetizada, almacenada y secretada fundamentalmente por las células de la arteriola aferente glomerular (Ibarra-Rubio y Pedraza-Chaverri, 1993). La secreción de renina es regulada por cuatro mecanismos principales: a) la presión arterial baja (baro receptores neurovasculares); b) actividad del sistema nervioso simpático; c) balance de sodio; y d) la retroalimentación negativa por la ANG II (Brown, 2007).

La transcripción del gen de la renina es inhibida por la ANG II y es aumentada por los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), las dietas hiperproteínicas, la isquemia y una dieta pobre en sodio (Peach, 1977).

El sistema de la renina, definido inicialmente como sistema hormonal regulador del balance de sodio, presión arterial y secreción de aldosterona, también está implicado en la fisiopatología de acciones promotoras de lesiones de órganos e hipertrofia de las células musculares vasculares, el remodelamiento cardíaco, la estenosis y la reestenosis de las arterias coronarias, en la fibrinólisis reducida y en la fibrosis, todas estas acciones para las que se requiere de estimulaciones y señalizaciones continuas o crónicas (Fernández, 2009).

Epidemiológicamente, se ha confirmado la evidencia de que los altos niveles de renina son un factor de riesgo para el infarto al miocardio. Por otro lado, el hiperaldosteronismo primario que es una enfermedad autosómica recesiva, donde existe un bajo nivel de renina (Brown, 2007; New, 2005).

Fructosa

Generalidades

Los seres humanos han sufrido cambios importantes en su actividad física y su estado nutricional, lo que ha influido en el desarrollo de las enfermedades no transmisibles relacionadas con la nutrición. La alimentación en los seres humanos está relacionada a las regiones geográficas y estatus económico, lo que ha condicionado a lo largo de la historia las diferencias en el consumo de una gran variedad de productos alimentarios, así como diferentes cantidades. En la actualidad, la sociedad se caracteriza por tener una alimentación con grandes cantidades de azúcar, grasa y colesterol, poca fibra y ácidos grasos poliinsaturados, así como una disminución de la actividad física e incremento del sedentarismo (Tappy y Le, 2010).

La fructosa es un edulcorante natural que fue introducido como un sustituto del azúcar de mesa a mediados de los años 70 en los Estados Unidos de Norteamérica (**Figura 3**). A partir de ese momento el consumo de fructosa se incremento notablemente en población norteamericana, junto con el consumo de energía diario y la distribución del consumo de diferentes alimentos (**Figura 4**). La fructosa a diferencia de la glucosa. No tiene un efecto significativo sobre la glucemia o la insulinemia, lo que permitió su incorporación en la elaboración de productos alimentarios para el tratamiento nutricional del paciente diabético. En los últimos años, se ha descrito que un consumo de fructosa que aporte un 25% o más de la energía diaria, puede ocasionar desórdenes en el metabolismo de los lípidos y síntomas gastrointestinales (Esquivel-Solís y Gómez-Salas, 2007; Pérez *et al.*, 2007; Riveros *et al.*, 2014).

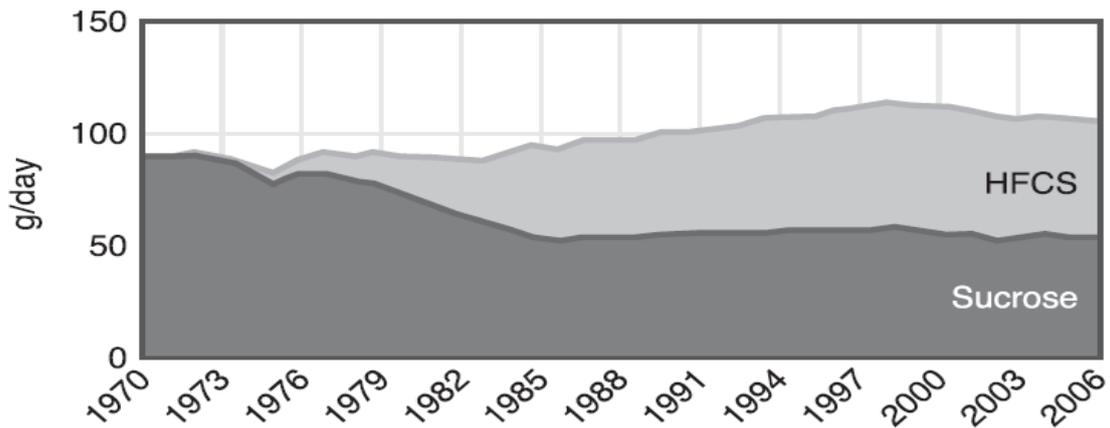


Figura 3. Consumo de sacarosa y jarabe de maíz alto en fructosa en E.E. U.U. Tomado de Tappy y Le, 2010.

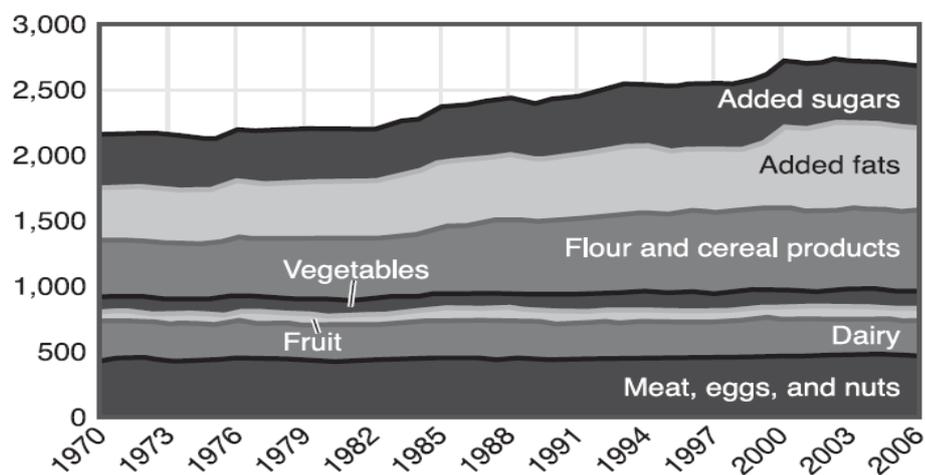


Figura 4. Promedio diario per cápita de calorías en E.E.U.U. de alimentos disponibles. Tomado de Tappy, L. *et al.*, 2010.

Algunas características de la fructosa como es su mayor poder edulcorante, índice glucémico bajo, menor respuesta glucémica e insulinogénica, menor supresión a la ghrelina, menor señal de saciedad y su bajo costo ha hecho que sea muy atractiva para su uso en la industria alimentaria en una amplia gama de productos (Pérez *et al.*, 2007).

Composición química

La fructosa tiene un grupo cetona unido al carbono 2 de la molécula, la glucosa tiene un grupo aldehído en el carbono 1. Los principales productos del

metabolismo de la fructosa, a través de la vía glucolítica, son: glucosa, glucógeno, lactato y piruvato; otros, en menor cantidad, son oxidados a bióxido de carbono, cuerpos cetónicos o convertidos a triacilglicerol (Tappy y Le, 2010). Una de las características principales de la fructosa es su poder edulcorante de 173, en comparación con la glucosa es de 74 y de 100 para la sacarosa (Esquivel-Solís y Gómez-Salas, 2007).

Consumo recomendado

La Organización Mundial de la Salud, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y la Asociación Americana de Dietética sugieren que el consumo de fructosa sea menor al 10% del consumo energético diario. En México, estas recomendaciones han sido revisadas por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán y avaladas por la Secretaria de Salud y la Academia Nacional de Medicina. Para los pacientes con diabetes mellitus, las recomendaciones de la Asociación Europea para el estudio de la Diabetes (EASD) y la Asociación Americana de Diabetes recomiendan un consumo limitado menor a 10% de la ingesta energética diaria (Reyes, 2014).

Absorción y metabolismo

En cuanto a la absorción gastrointestinal, la glucosa se transporta a través del borde en cepillo por un sistema específico de acarreadores dependientes de sodio, a diferencia de la fructosa que se absorbe en el duodeno y yeyuno por los transportadores GLUT-5 y GLUT-2, que no dependen del sodio (**Figura 5**) (Pérez *et al.*, 2007). La glucosa entra a los hepatocitos a través del transportador GLUT-2 y a los miocitos y adipocitos entra a través del transportador GLUT-4 que es dependiente de insulina. Por su parte la fructosa, ingresa al hepatocito a través de GLUT-5, sin requerir insulina. El GLUT-5 no se encuentra en las células β del páncreas ni en las células del cerebro por lo que no entra en éstos (Pérez *et al.*, 2007). Cuando la fructosa se absorbe, llega al hígado a través de la vena porta, y ahí es fosforilada por la Fructocinasa (FK) a fructosa 1-fosfato (Reyes, 2014).

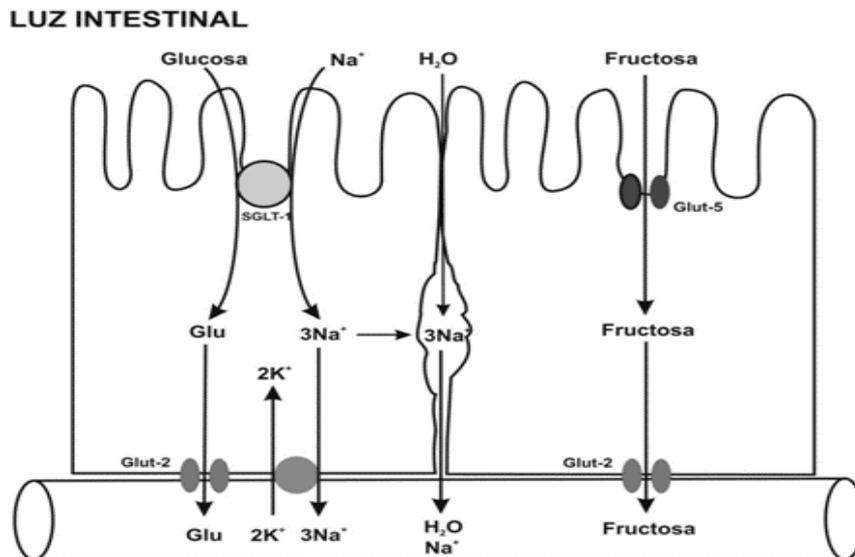


Figura 5. Absorción de fructosa. Tomado de Pérez *et al.*, 2007.

Contrario a la glucosa, la fructosa entra a la glucólisis sin pasar por la reacción catalizada por la fosfofructocinasa (PFK) principal punto de regulación de la glucólisis hepática. La fructosa puede entrar continuamente a la vía glucolítica y desregular la síntesis de glucosa, glucógeno, lactato y piruvato, proporcionando grupos glicerol y acilo para formar moléculas de acilglicerol, lo que ocasiona sobreproducción de triglicéridos (Tappy y Le, 2010). En la **Figura 6** se muestra el metabolismo de la fructosa y glucosa en el hígado.

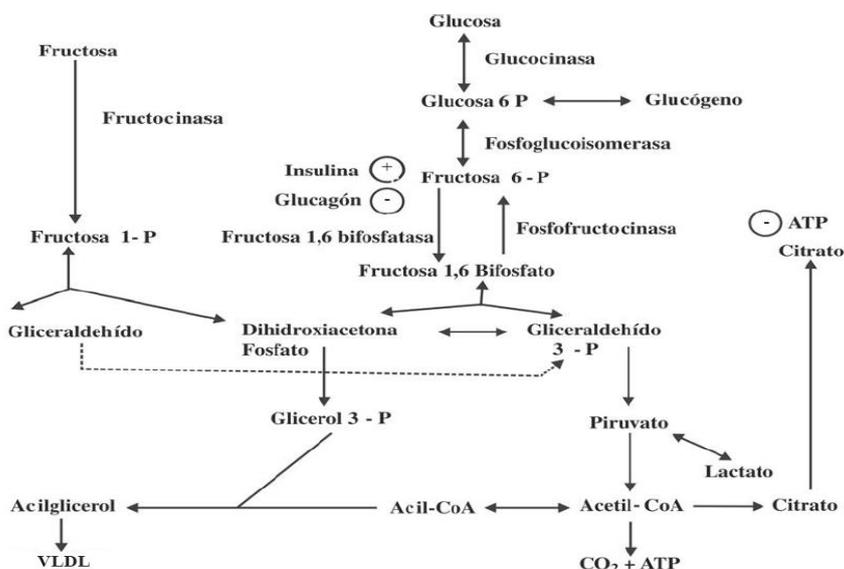


Figura 6. Metabolismo hepático de la fructosa y glucosa. Tomado de Savino, 2011.

El metabolismo hepático de la glucosa se limita por la capacidad de almacenar glucosa como glucógeno y por la inhibición de la glucólisis regulada por la PFK. La fructosa no estimula la secreción de insulina por lo que su consumo en alimentos y bebidas provoca menor incremento de la insulinemia que el que producen los alimentos ricos en glucosa (Reyes, 2014).

Regulación de la expresión génica por carbohidratos.

La absorción de la dieta alta en carbohidratos induce cambios metabólicos al disminuir la producción de glucosa por el hígado y almacenarla en forma de glucógeno. Cuando la glucosa se libera a la vena porta grandes cantidades de glucógeno hepático son restauradas y la glucosa se convierte en lípidos dentro del hígado a través de la lipogénesis, en forma de lipoproteínas de baja densidad y se almacena como triglicéridos en tejido adiposo. Existen diferentes vías metabólicas que conducen a síntesis de lípidos en hígado dependientes de los nutrientes. Los carbohidratos estimulan la vía lipogénica y glucolítica. Los genes que codifican enzimas para la glucólisis son la glucocinasa (GK), L-piruvato-cinasa (L-PK); para la lipogénesis incluye ATP citrato liasa, estearoil-CoA desaturasa (SCD-1), acetil CoA carboxilasa (ACC) y ácido graso sintetasa (FAS). La mayoría de las enzimas regulan por mecanismos post-traduccionales y alostéricos, insulina y altas concentraciones de glucosa o fructosa (**Figura 7**) (Casado, 2005).

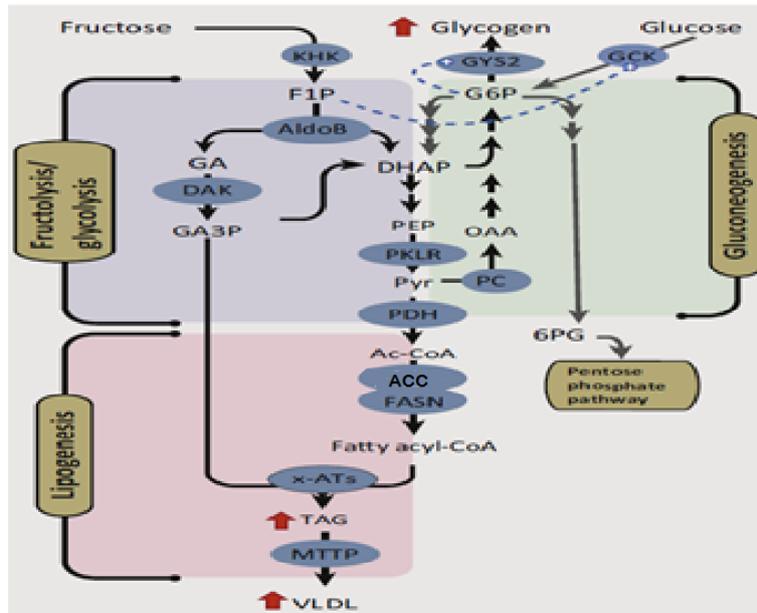


Figura 7. Fructosa es un sustrato para la lipogénesis y la glucólisis.

Cetoheksokinasa (KHK), fructosa 1-fosfato (F1P), aldolasa B (AldoB), dihidroxiacetona fosfato (DHAP), dihidroxiacetona cinasa-2 (DAK), glucosa 6-fosfato (G6P), glucocinasa (GCK), glicógeno sintetasa (GYS2), acetil-CoA carboxilasa (ACC), acetil CoA (Ac-CoA), ácido graso sintetasa (FASN), gliceraldehído 3-fosfato (GA3P), oxaloacetato (OAA), piruvato carboxilasa (PC), complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), fosfoenolpiruvato (PEP), piruvatocinasa-hígado (PKLR), piruvato (Pyr), triacilglicerol (TAG), lipoproteína de baja densidad (VLDL), acetiltransferasas (x-AT). Tomado de Herman, *et al.*, 2017.

Los carbohidratos en la dieta causan cambios en la concentración de las hormonas pancreáticas, insulina y glucagón. Los efectos transcripcionales de la insulina son mediados por la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP-1c) tipo básico-hélice-loop-hélice-leucina cremallera, el cual induce a los genes lipogénicos por su capacidad de unión al elemento responsivo a esteroides (SRE) que se localiza en la secuencia del promotor de los genes, y es inducido por insulina e inhibido por glucagón (Herman y Varman, 2017).

En el promotor de genes lipogénicos se identificó el elemento de respuesta a carbohidratos (ChoREs) que media la respuesta transcripcional de la glucosa, el cual está compuesto de dos E-cajas (CACGTG) separadas por 5 pb. Los motivos de los elementos de respuesta reconocen a la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) (**Figura 8**) (Filhoulaud *et al.*, 2013).

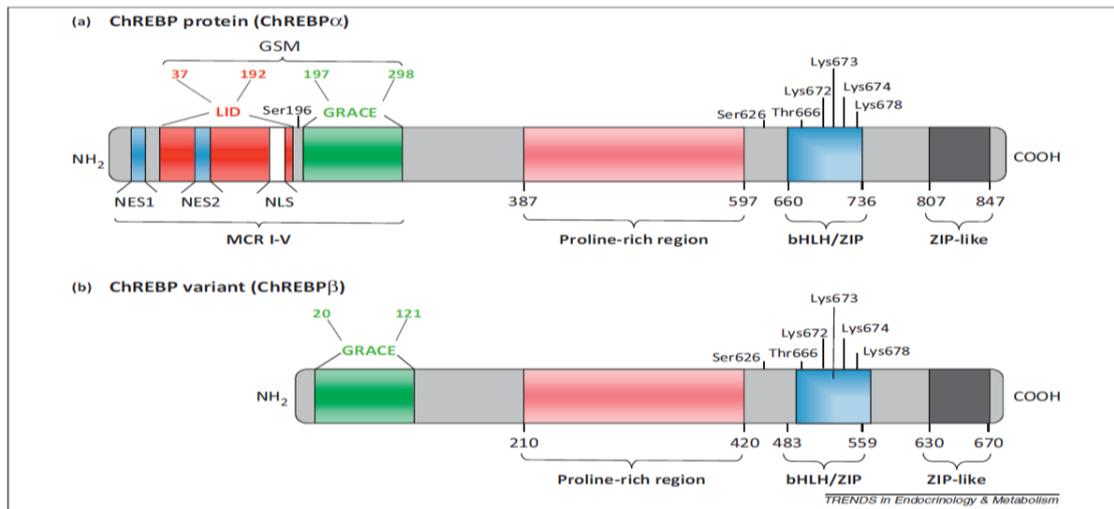


Figura 8. Estructura de la proteína ChREBP y sus variantes. Tomado de Filhoulaud, 2013.

La ChREBP media la transcripción de genes para la vía glucolítica y la vía lipogénica por carbohidratos y es independiente de insulina. Se expresa en el hígado, riñón, músculo, cerebelo, tejido adiposo blanco y café, islotes pancreáticos, e intestino. Tiene 864 aminoácidos y presenta una señal de localización nuclear cerca del extremo amino terminal, además dominios ricos en prolina y varios sitios potenciales de fosforilación por cAMP y AMPK. Los sitios principales de fosforilación/desfosforilación son mediados por el cAMPc y glucosa, el P1 se localiza en la región nuclear y el P3 en el dominio básico de unión al DNA (Postic *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2017).

En condiciones de concentraciones bajas de glucosa, el cAMP activa la fosforilación de la serina 196 cuando se encuentra en el citoplasma, luego se desfosforila por la fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A) activada por xilulosa 5 fosfato (Xu-5P), eso conduce a la traslocación del factor ChREBP al núcleo. En el núcleo sigue inactivo, hasta que se desfosforila el residuo treonina, lo que permite la unión del factor y la activación de los genes (**Figura 9**) (Postic *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2017).

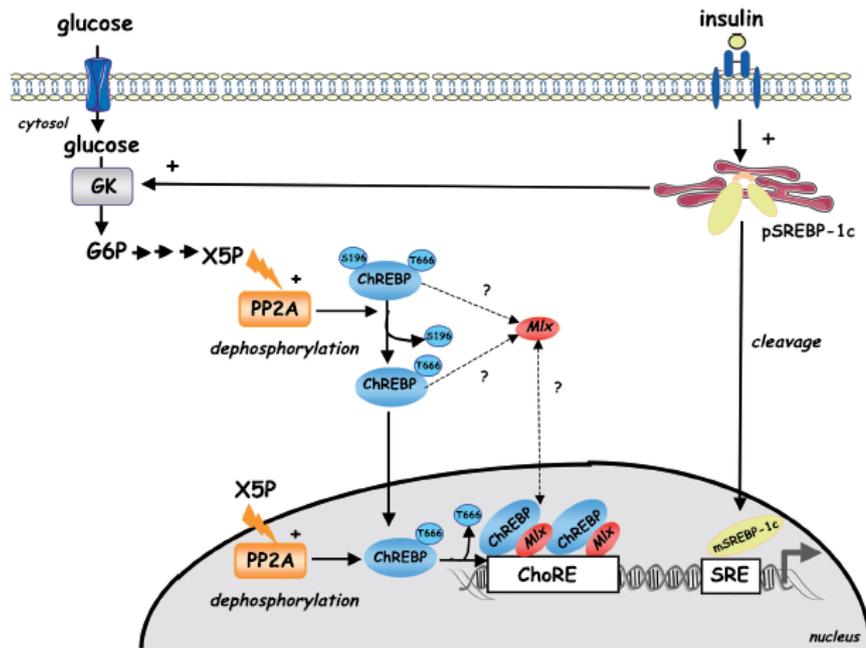


Figura 9. Activación transcripcional de los genes glucolíticos y lipogénicos por ChREBP/M1x y SREBP-1c en el hígado.

La fructosa incrementa la síntesis de lípidos directamente activando ChREBP e indirectamente inhibiendo sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1), además de promover la acumulación de ChREBP acetilada y activa. La inhibición de SIRT1 promueve la acumulación del co-activador 1 α del receptor gamma activado del proliferador de peroxisomas (PGC1 α) acetilado e inactivo, reduciendo la expresión y actividad del receptor activador de la proliferación de los peroxisomas (PPAR α) y eso controla la oxidación de ácidos grasos en el hígado (**Figura 10**) (Rebollo *et al.*, 2014; Iizuka, 2017).

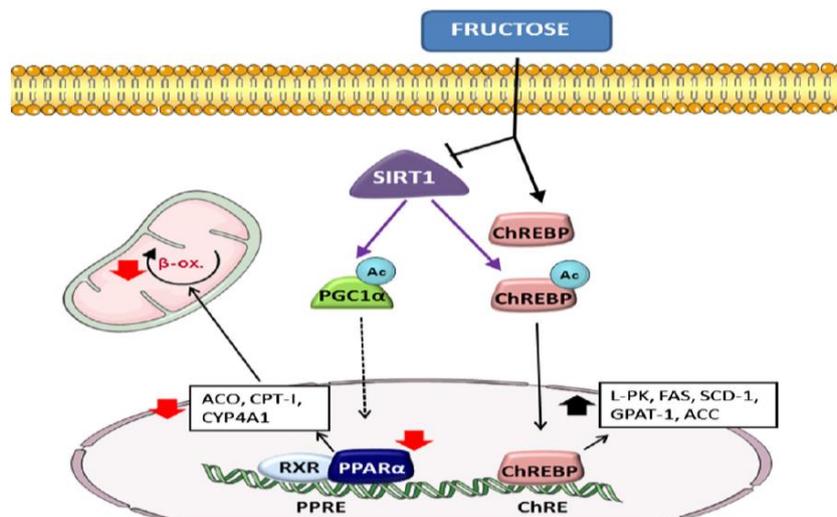


Figura 10. Incremento de síntesis de lípidos directamente por activación de ChREBP. Tomado de Rebollo, A. 2014.

Efectos del consumo de la fructosa

La fructosa de la dieta proviene principalmente de las frutas, la miel, la sacarosa (azúcar común) y el jarabe de maíz rico en fructosa, cuya fuente es el almidón de maíz y se encuentra como edulcorante en los diferentes alimentos industrializados. Estos alimentos favorecen la lipogénesis hepática. Se ha demostrado en animales y en humanos que el consumo de fructosa induce resistencia a la insulina, deteriora la tolerancia a la glucosa y produce hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión, factores importantes para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares que condicionan muerte prematura, aunque se desconocen los mecanismos (Savino, 2011; White, 2013; Ha *et al.*, 2013; Jayalath *et al.*, 2014; Rippe y Angelopoulos, 2016).

Las propiedades de la fructosa en los alimentos, favorece el consumo excesivo de alimentos ricos en energía altamente apetecibles. En comparación con otros nutrimentos tales como la glucosa o la grasa, la fructosa se procesa primero en órganos espláncnicos y luego se libera en forma de glucosa, lactato, o VLDL-TG en la circulación sistémica (Robin *et al.*, 2016).

La obesidad y la presencia de enfermedades no transmisibles relacionadas con la nutrición son el resultado de un alto consumo de productos con fructosa. Una fuente importante de azúcares son los refrescos o bebidas azucaradas, responsables de promover la obesidad e incrementar los factores de riesgo cardiovascular en los diferentes estratos socioeconómicos de la población (Esquivel-Solís y Gómez-Salas, 2007; Rebollo *et al.*, 2012).

La fructosa en los humanos se ha relacionado con el incremento de peso y resistencia a la insulina, hay poca evidencia que la fructosa directamente incrementa la presión arterial. La glucosa y fructosa incrementan la frecuencia y gasto cardíaco, pero la glucosa disminuye la resistencia vascular periférica previniendo un incremento en la presión arterial. La infusión intravascular de glucosa causa vasodilatación muscular a través de incremento de insulina mediada por incremento de óxido nítrico en las células endoteliales, pero la fructosa no tiene ese efecto (Tappy y Le, 2010; Jayalath, 2014).

Estudio de ratas alimentadas con fructosa que desarrollaron HTA, sobrepeso y aumento de triglicéridos, se analizaron en grupos con dieta alta en sal y sal normal, los resultados mostraron un incremento en la expresión de los receptores AT1 en el tejido adiposo. Lo que sugiere que éstos receptores pueden jugar un rol en la fisiopatología de las anomalías metabólicas y hemodinámicas inducidas por fructosa (Giacchetti *et al.*, 2000).

Soleimani y Alborzi (2011), analizaron el rol de la sal en la patogénesis de la HTA inducida por fructosa y concluyeron que la sobre carga de sal potencia la absorción de sal en el intestino y riñón. El incremento de la fructosa en la dieta estimula la absorción de sal en el intestino delgado y túbulo proximal del riñón a través de la activación coordinada de GLUT 5, supuesto transportador anión 1 (PAT 1) y intercambiador sodio-protones tipo 3 (NHE-3).

Los efectos adicionales de la fructosa en ácido úrico en la sangre y la actividad del sistema nervioso simpático también se han reportado, pero su relación con las enfermedades metabólicas y cardiovasculares sigue siendo hipotética. Existe una creciente evidencia de que la fructosa puede escapar de primer paso hepático metabolismo del hígado, y que las concentraciones sistémicas bajas de fructosa pueden ejercer efectos importantes sobre la función renal (Robin *et al.*, 2016).

Otros efectos deletéreos asociados a la fructosa

La fructosa incrementa levemente la glucemia e insulinemia postprandial, en comparación con otros hidratos de carbono. El aumento excesivo de fructosa se ha asociado con disminución de insulina y leptina, lo que reduce la sensibilidad a la insulina ocasionando resistencia (Tappy y Le, 2010).

La obesidad se relaciona con el consumo excesivo de energía a través de la dieta y un nivel de saciedad bajo, lo que incrementa el consumo de alimentos, con sobrepeso y obesidad. La insulina estimula la liberación de leptina, que tiene un efecto anorexigénico en el hipotálamo. Al consumir

grandes cantidades de fructosa, las concentraciones de insulina y leptina son menores (Ruiz-Gayo y Fernández-Alfonso, 2008).

El exceso de fructosa en el cuerpo incrementa la formación de triglicéridos, cuyo aumento genera dislipidemias (Savino, 2011).

La cantidad de 0.5 g de fructosa por kilogramo de peso son suficientes para generar hiperuricemia, la cual predice el inicio de hipertensión arterial y otras enfermedades (Tappy y Le, 2010).

El consumo de fructosa puede provocar problemas gastrointestinales, como: síndrome del colon irritable, distensión abdominal, dispepsia entre otros. Derivado de malabsorción provocada por inadecuada actividad del GLUT5 o cuando los microorganismos del intestino delgado fermentan la fructosa antes de que pueda absorberse (Riveros *et al.*, 2014).

El hígado graso no alcohólico se desarrolla cuando la captación y síntesis *de novo* exceden la oxidación y exportación de triglicéridos por las lipoproteínas. Su prevalencia y severidad se ha relacionada al aumento en la incidencia de obesidad y diabetes mellitus tipo 2 en la población (Riveros *et al.*, 2014). Y se ha demostrado *in vitro* en hepatocitos que la fructosa promueve a nivel hepatocelular la lipogénesis, así como su papel en el hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis al incrementar la síntesis de colesterol y triglicéridos (Windermuller *et al.*, 2016; Gómez *et al.*, 2012). Asimismo, se ha demostrado el efecto de la fructosa y metabolitos de carbonilo como toxinas endógenas (Lee, *et al.* 2008).

Modelos para estudiar los efectos metabólicos de la fructosa

En los modelos *In vitro*, se describen los efectos de una variable experimental en un subconjunto de las partes de un organismo, son apropiados para deducir un mecanismo de acción con menos variables y reacciones amplificadas que suceden cuando se realiza en modelos animales.

El uso de líneas celulares de hígado como modelo *in vitro* permite contrarrestar los problemas de trabajar y preservar cultivos primarios, por su mayor estabilidad fenotípica, y mayor facilidad para trabajar en laboratorio. El

inconveniente las líneas celulares hepáticas es su limitada actividad biotransformadora, debida a la pérdida de los niveles enzimáticos, especialmente las enzimas referentes al citocromo P450.

Una de las líneas celulares más utilizada como modelo hepático es la HepG2, debido a que muestra una gran cantidad de funciones hepáticas y de expresión enzimática (Gómez-Lechón *et al.*, 2007).

En las células HepG2 procedentes de hepatoma humano, combinaron glucosa, fructosa y diferentes ácidos grasos, induciendo desordenes metabólicos, incluyendo dislipidemia, resistencia a la insulina, hiperuricemia y estrés oxidativo demostrando que es un modelo apropiado (Zhao *et al.*, 2016).

Se han realizado trabajos que involucran el metabolismo de fructosa como predecesor de daño hepático realizados en células HepG2, y han reportado que el consumo fructosa aumenta la acumulación de triglicéridos (oleato y palmitato), también afecta la acción de la enzima Acetil CoA carboxilasa fosforilada, la lipasa sensible a hormonas fosforilada y la lipasa de triglicéridos de tejido adiposo. Todas correspondientes a enzimas del metabolismo de lípidos, aumentando su acumulación, y por consecuencia, la probabilidad de obesidad y problemas cardiovasculares (Acuña, 2013).

Dado que la fructosa está relacionada con la elevación de la presión arterial se ha explorado con un sistema *in vitro* si el exceso de fructosa es capaz de inducir la expresión del ANG en las células HepG2. Las cuales son capaces de expresar el mRNA y el ANG, a pesar de su naturaleza neoplásica son células diferenciadas que expresan varios marcadores propios del hepatocito sano y son adecuadas para explorar de forma inicial aspectos de fisiología hepática (Zhao *et al.*, 2016; Shimamoto *et al.*, 2004).

Como en el hígado humano, las células HepG2 utilizan activamente la fructosa y las células rápidamente incrementan la fructosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato, manteniendo los niveles. A pesar del metabolismo activo de la fructosa no existe evidencia de la activación de la biosíntesis de hexosamina o inducción de expresión de genes lipogénicos (Hirahatake *et al.*, 2011).

En relación con los modelos *In vivo*, existe gran cantidad de estudios que se realizan principalmente en ratas y ratones, dado su accesibilidad, costo y similitud en los genes, sin embargo, existen diferencias genéticas que pueden dar origen a resultados erróneos. Por otro lado, una desventaja es que existen

demasiadas variables que no se pueden controlar bien, además de la variabilidad que existe en cada uno de los animales.

Para el estudio de los efectos de la fructosa en modelos *in vivo*, se utilizan ratas y ratones que son alimentadas con fructosa, y se ha identificado la asociación entre la expresión de receptores vasculares tipo1 de ANG II y la disfunción vascular, el estrés oxidativo y la inflamación (Nyby *et al.*, 2007).

En un modelo de ratas alimentadas con fructosa que proporcionó evidencia de que el SRA media los cambios cardiovasculares que conducen a inflamación (Robin *et al.*, 2016).

Existe evidencia de que el alto contenido de glucosa estimula la expresión génica del angiotensinógeno y causa hipertrofia de las células a través de la activación de la biosíntesis de hexosamina en células de riñón de rata a nivel tubular proximal (Hsieh y Fustier, 2003).

Ácido úrico y fructosa

Por otro lado, una característica del metabolismo de la fructosa es la síntesis de ácido úrico (UA) como subproducto. La vía metabólica inicia cuando la fructosa es fosforilada por KHK-C a fructosa 1-fosfato, ésta enzima no está regulada por mecanismos de retroalimentación negativa, por lo que cuando hay una gran carga de fructosa, se agota rápidamente el ATP necesario para la reacción. La producción rápida de adenosina monofosfato (AMP) es desaminado a monofosfato de inosina (IMP) o desfosforilado a adenosina, y ambas son degradadas a hipoxantina y UA por la enzima xantina oxidasa. Algunos estudios epidemiológicos han encontrado que el aumento los niveles de UA plasmática se correlacionan con el consumo de bebidas azucaradas, encontrando una asociación entre UA sérico y daño a órganos diana (Nguyen 2009; Rho, 2011).

Se ha sugerido que la hiperuricemia inducida por la fructosa influye en el desarrollo de resistencia a la insulina, hipertensión e insuficiencia renal, ya que al reducir los niveles de AU con un inhibidor de xantina oxidasa (febuxostat o alopurinol) o un medicamento uricosúrico (benzodiarona) fue capaz de prevenir

o mejorar las diferentes características del síndrome metabólico en ratas (Nakagawa *et al.*, 2006).

Un posible mecanismo dañino del UA es el daño tisular que aumenta el estrés oxidativo. Se ha sugerido que UA actúa como un antioxidante solo en ambientes hidrofílicos, mientras que dentro de las células UA por sí solo o radicales libres, pueden comprometer la producción de oxidantes. El estrés oxidativo se ha demostrado en cultivo celulares en varias líneas de humanas vasculares, músculo, endoteliales, adipositos y fibroblastos cardiacos. El aumento del estrés oxidativo induce los mediadores proinflamatorios, activación del sistema renina-angiotensina, sobreexpresión de endotelina y activación de la cascada del factor nuclear-kB (Lanaspá, *et al.*, 2011) asimismo senescencia y apoptosis (Yu, *et al.*, 2010).

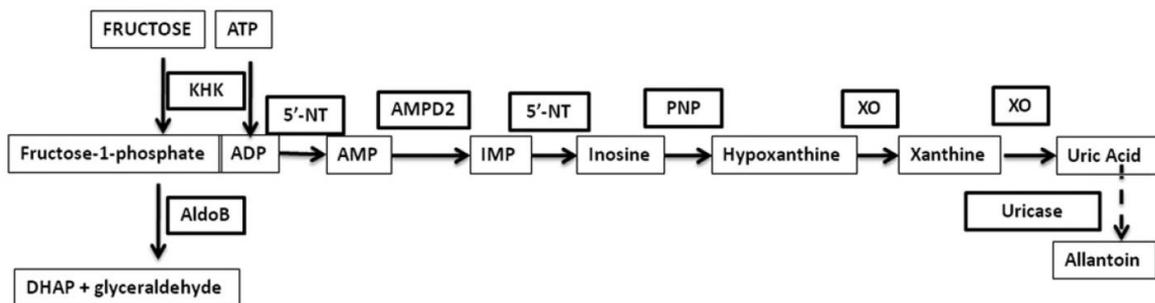


Figura 11. Esquema del metabolismo de purina después de la fosforilación de la fructosa. La fructosa es fosforilada por fructocinasa (KHK), luego es convertida por aldolasa B (Aldo B) a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído. La reducción del ATP, incrementa AMP por la 5'-nucleotidasa se metaboliza a IMP. PNP, purina nucleósido fosforilasa; XO, xantina oxidada; ADP, adenosin monofosfato; AMP, adenosin monofosfato; IMP inosin monofosfato.

3. Objetivo

Objetivo General.

Analizar el efecto de la fructosa en la expresión del gen angiotensinógeno en la línea celular HepG2.

Objetivos Particulares

1.- Estimar el efecto de las diferentes dosis de la fructosa sobre las células HepG2 y análisis en la expresión del ARN mensajero y la proteína del angiotensinógeno.

2.- Analizar el efecto de la fructosa sobre la expresión el ARN mensajero y la proteína del angiotensinógeno en los diferentes tiempos estimados.

4. Hipótesis

H1 El incremento de la fructosa, ocasiona un incremento en la expresión del gen del angiotensinógeno en la línea celular HepG2.

H0 El incremento de la fructosa, no ocasiona un incremento en la expresión del gen del angiotensinógeno en la línea celular HepG2.

5. Justificación

La hipertensión arterial se considera un problema de salud pública, está asociada a las cardiopatías, accidentes cerebrovasculares e insuficiencia renal, generando alta mortalidad y discapacidad prematuras. En México tres de cada 10 personas la presentan y se incrementa su prevalencia en aquellas personas con obesidad y diabetes mellitus.

Existen diferentes factores de riesgo como obesidad, sedentarismo, género, raza, tabaco, alcohol, alta ingesta de sal, en la actualidad se ha relacionado con el consumo de jarabe de fructosa, dado que su uso se ha incrementado por su bajo costo y alto poder edulcorante, por lo que se encuentra en bebidas endulzadas y gran cantidad de productos alimentarios y su ingesta diaria rebasa las recomendaciones de la OMS.

En el contexto de la investigación de fructosa y su implicación en la HTA, existen muchos procesos bioquímicos desconocidos, por lo que se propone para su estudio un modelo *in vitro* en las células hepáticas HepG2, las cuales han permitido generar desórdenes metabólicos, lo que puede contribuir en forma inicial para identificar los mecanismos y buscar alternativas de solución cuyo impacto social se refleje en una mejor salud en la población mundial.

6. Material y métodos

En el **Cuadro 6** se muestran los reactivos, medios de cultivo y equipo de laboratorio utilizado para la realización de esta investigación.

Cuadro 6. Reactivos, medios de cultivo y equipo de laboratorio.

Reactivos y Medios de cultivo	Marca	Presentación
Tripsina-EDTA	Corning	1 paq 6x100ml
Reactivo de Trizol	Invitrogen	100 mL
Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)- sin glucosa	Invitrogen	500 mL
DMEM-alto en glucosa	Invitrogen	500 mL
Suero fetal de bovino (SFB)	Sigma-Aldrich	500 mL
Glucosa	Sigma-Aldrich	100 g
Fructosa	Sigma-Aldrich	100 g
2-propanol	Sigma-Aldrich	4 x 25 mL
Cloroformo	Sigma-Aldrich	25 mL
Etanol	Sigma-Aldrich	500 mL
Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich	5 x 5 mL
Penicilina-Estreptomicina	Sigma-Aldrich	100 mL
Línea celular HepG2	ATCC	1 vial
DNA Polimerasa MyTaq	Bioline	1 kit
Sistema SuperScrip III First-Strand para RT-PCR	Invitrogen	1 kit
Marcador de peso molecular 1kb	Bioline	1 kit
Marcador de peso molecular 50bp	Bioline	1 kit

Material de laboratorio	Marca	Presentación
Pipeta Pasteur de borosilicato 5 3/4"	DAIGGER	1 paquete /250 piezas
Filtro de 0.22 µm MILLEX-GP25MM PES	MERCK	1 caja /50 piezas
Placa de cultivo con 12 pozos estéril	NEST	1 paquete/50 piezas
Placa de cultivo con 6 pozos estéril 6	NEST	1 paquete/50 piezas
Platos de cultivo de 100 mm de diámetro	NEST	5/bolsas 300/platos
Tubos cónicos de 50 mL	NEST	1 caja/ 500 piezas
Tubos cónicos de 15 mL	NEST	1 paquete/25 piezas
Microtubos	NEST	1 paquete/500 piezas
Viales criogénicos	NEST	1 paquete/100 piezas

Equipo	Marca	Modelo
Incubadora de CO ₂	THERMOFORMA	310
Bloque térmico	FELISA	36208/36209 TYPE A2
Campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad 2	LABCONCO PURIFIER CLASS II BIOSAFETY	CABINET
Cámara de electroforesis	THERMO SCIENTIFIC	EASYCASTB 2
Ultra congelador (-70°C)	HARRIS US LISTED KENDRO LAB	SLT-25 V-85 A 36
Congelador (-20°C)	FRIGIDAIRE GALERY	GLFC526FW9
Refrigerador (4°C)	MABE TWISTAIR	DFR1670 DBB DAEWOO
Máquina de hielo frapé	TOR REY	DH250/556B
Termociclador de punto final	THERMO SCIENTIFIC	AKC481301710
Espectrofotómetro	DYNAMICA	DNA MASTER
Centrifuga refrigerada	BIOSAN	LMC-42000R
Horno de secado	BINDER	BD-115-UL
Autoclave	FELISA	FE-398
Transiluminador	UVP	BIENCHTOP 2 UV
Fotodocumentador	BIO RAD LABORATORY	GEL DOC EZ IMAGING SYSTEM

Cultivo y subcultivo celular:

Las células HepG2 (ATCC® HB-8065) fueron amablemente donadas por el Dr. Armando Tovar, investigador del Instituto Nacional de la Nutrición y Ciencias Médicas Salvador Zubirán. La línea celular HepG2 se derivó de un carcinoma hepatocelular de un humano masculino caucásico. La línea celular HepG2 es de morfología epitelial, es adherente, expresa los receptores de insulina; y el factor de crecimiento similar a la insulina del tipo II (IGF II). Expresa los genes, α -fetoproteína; albumina; α 2- macroglobulina; α 1 antitripsina; transferrina; α 1 antiqumiotripsina; haptoglobina; ceruloplasmina; plasminógeno; complemento (C4); C3 activador; fibrinógeno; α 1 ácido glicoproteína; α -2 HS glicoproteína; β lipoproteína; proteína de unión a retinol. La línea celular no es tumorigénica y expresan actividad de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa y la lipasa hepática. Las células HepG2 tienen una reducción en la expresión del mRNA de la ApoA-I (ATCC).

La línea HepG2 se cultivó en DMEM, con 10% de SFB y 100 IU/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomina a una temperatura de 37°C y una atmósfera con 95% aire y 5% de CO₂.

ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**

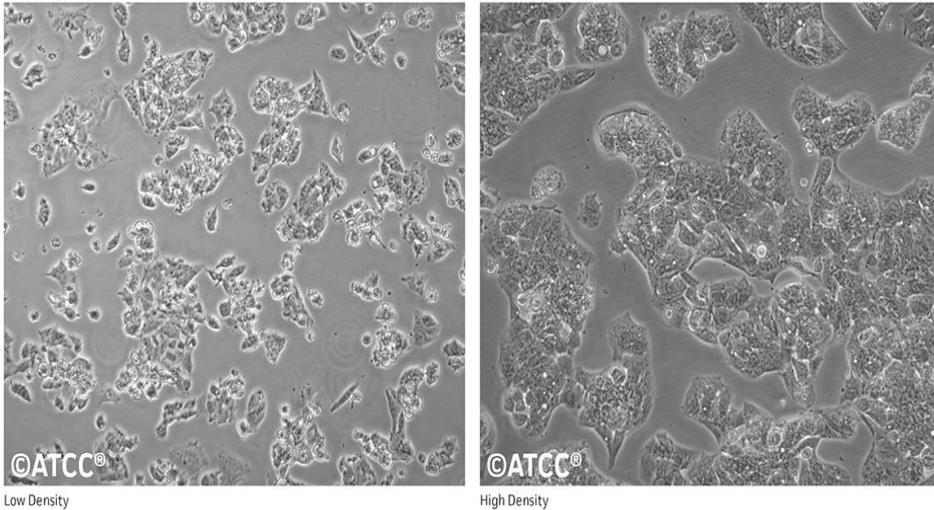


Figura 12. Micrografía de las células HepG2. Células HepG2 son derivadas de un hígado humano de masculino caucásico de 15 años con carcinoma hepatocelular, es epitelial, adherente, no tumorigénica. Se aprecia la imagen microscópica de baja densidad (izquierda) y alta densidad (derecha) que es cuando se recomienda subcultivar a razón de 1:4 o 1:6. Se realiza cambio de medio dos veces por semana, a 37°C, aire 95% y CO₂ 5%. Micrografía tomada de la American Type Culture Collection (<https://www.atcc.org>).

Se realizó subcultivo de la línea celular HepG2, de una caja de Petri se obtuvieron cuatro cajas el cambio el medio se realizaba cada 48 h, la confluencia al 80% para poder realizar el subcultivo se obtuvo a los 7 días. Se eliminó el medio y se lavó con tripsina-EDTA, posteriormente se añadió 5 mL de solución de tripsina-EDTA a la caja de Petri, se incubó por 10 min, se hicieron varios ensayos hasta que la monocapa se desprendiera sola sin lesionar a las células usando un objeto para desprenderlas. Al desprenderse la monocapa de células, se aspiraron suavemente con una pipeta y se depositaron en un tubo cónico de 15 mL con 3 mL de medio, se centrifugó 5 min a 380 rpm. Se extrajo el medio y se agregó 10 mL de SFB, se diluyó en 30 mL y resuspendió varias veces a fin de que fuera uniforme la cantidad de células en 10 mL depositadas en otra caja de Petri, las cuales fueron incubadas y con cambio de medio cada tercer día.

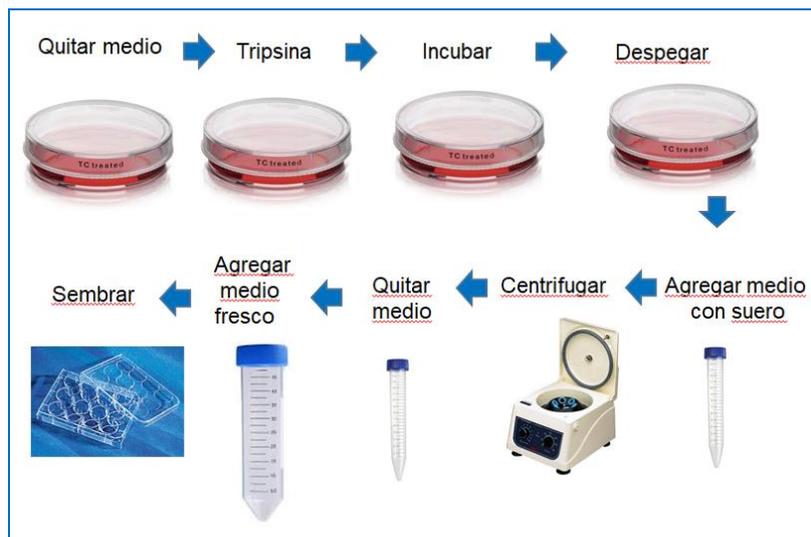


Figura 13. Subcultivo celular. Las cajas de Petri utilizadas para realizar el cultivo de las células HepG2. Se muestran los pasos a realizar para el subcultivo cuando se tuvo más del 80% de la superficie cubierta por crecimiento en las células, se utilizó tripsina-EDTA. Se usó DMEM con 10% de SFB para lavar la proteasa y limitar su actividad, para poder sembrar las células en otra caja nueva.

- Para realizar el primer experimento, se utilizaron 10 cajas de Petri con 12 pozos. Las células de las 4 cajas de Petri se lavaron con tripsina y centrifugaron, luego se les agregó 2.5 mL de medio y se resuspendieron, se pasaron a 30 mL de medio con glucosa y se colocó 350 μ L en cada uno de los 114 pozos junto con 2 mL de medio con glucosa. Se cultivaron por 48 h para su crecimiento y se observaron al microscopio invertido.

- Cuando hubo crecimiento de un 80% de cada pozo, se extrajo el medio y se agregó medio sin glucosa, se dejaron por 24 h a fin de tener un periodo de inanición y poder realizar el primer experimento.

- Posteriormente se extrajo el medio de la caja tiempo 0, y se colocó sobre una cama de hielo frapé, se designaron 3 pozos para RNAm y 3 pozos para angiotensinógeno. Se aplicó 400 μ L de Trizol en los 3 pozos para RNAm y se extrajo con pipeta el contenido, el cual se depositó en tubos Eppendorf previamente identificados. En los 3 pozos para ANG, se recolectó el medio de cultivo y luego se colocó en cada uno, 400 μ L de buffer PBS preparado y esterilizado previamente y el contenido de cada pozo fue depositado en tubos Eppendorf, se guardó en refrigerador a -80 °C.

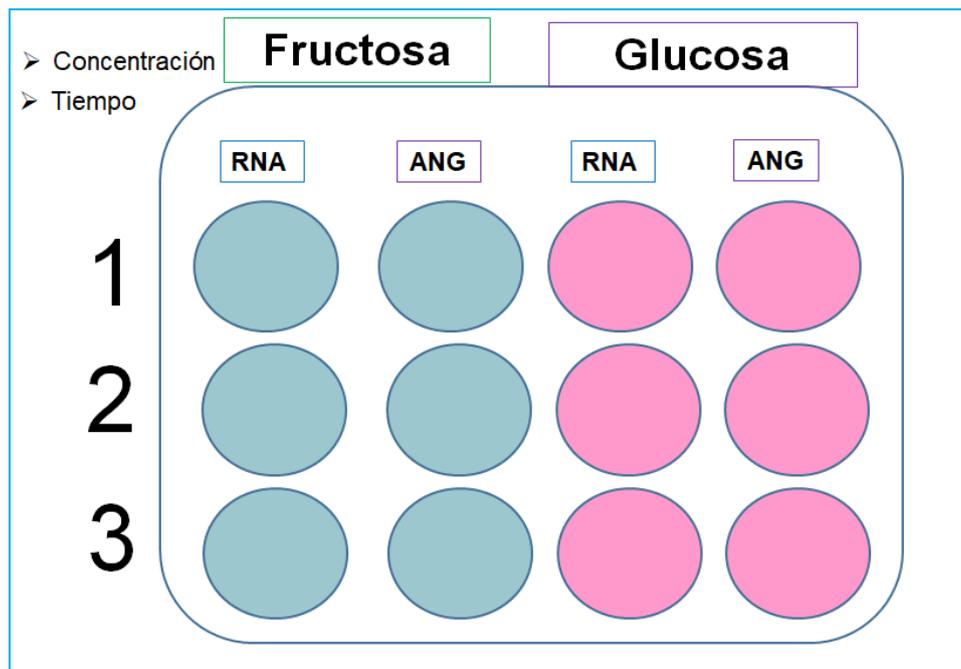


Fig. 14 Multiwell con tratamiento de fructosa o glucosa. Placa de cultivo celular de 12 pozos, en seis de ellos se aplicó medio de cultivo con fructosa de los cuales tres de ellos se destinó para obtener RNA y tres para proteína de ANG. A los otros seis se aplicó medio de cultivo con glucosa, y se destinaron tres para RNA y tres para proteína de ANG.

Cuadro 7. Concentraciones y tiempo de tratamientos.

Concentración	Tiempo
	24 h
5 mM	12 pozos
10 mM	12 pozos
20 mM	12 pozos
Total	36 pozos

- Tiempo 0 h con 6 pozos
- Total 36 pozos por experimento
- Tratamiento por triplicado
- Dos experimentos

Tratamiento a diferentes concentraciones de fructosa y glucosa en el medio de cultivo que se colocó en placa de 12 pozos, los cuales fueron recolectados a las 24 h.

- La solución stock de glucosa y fructosa fue preparada con 4 mL de medio con antibiótico y suero bovino fetal a una concentración de 200 mM; tener la concentración de 5 mM se agregó a 48.75 mL de medio, 1.25 mL de la solución stock; para la concentración de 10 mM fueron 2.5 mL de solución stock y 47.5 mL de medio y para la concentración 20 mM fueron 5 mL de la solución stock y 45 mL de medio, las mismas cantidades fueron utilizadas para glucosa y fructosa, antes de aplicarlo fue filtrada ambas soluciones mediante filtro de polietileno para jeringuilla Millex HPF.

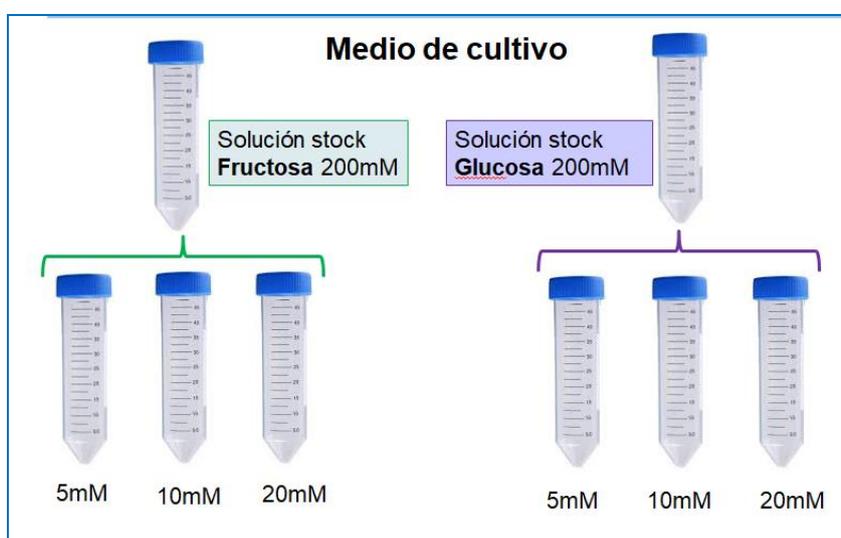


Figura 15. Solución Stock de glucosa y fructosa. La solución stock a concentración de 200mM con glucosa y fructosa de la cual se prepararon las soluciones para tratamiento a concentración de 5, 10 y 20 mM.

- En 9 cajas de 12 pozos, se distribuyeron 3 cajas para la concentración de 5 mM, 3 cajas para concentración 10 mM y otras 3 para concentración 20 mM. Cada una de las cajas se le agregó medio con fructosa a 6 pozos en las concentraciones mencionadas y a los otros 6 medio con glucosa a las concentraciones específicas.

A las 24 h se tomó una caja de concentración 5, 10 y 20 mM y se extrajo el medio, se agregó 400µL Trizol en los 6 pozos, 3 con medio de glucosa y 3 con fructosa para RNAm, asimismo se extrajo y guardó el medio de cultivo y se agregó PBS en los 6 pozos para ANG, 3 de ellos con glucosa y

3 conteniendo fructosa, se depositó el contenido en tubos Eppendorf los cuales se congelaron.

- El RNA total se extrajo utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen™, Carlsbad, CA) conforme a las instrucciones del proveedor.

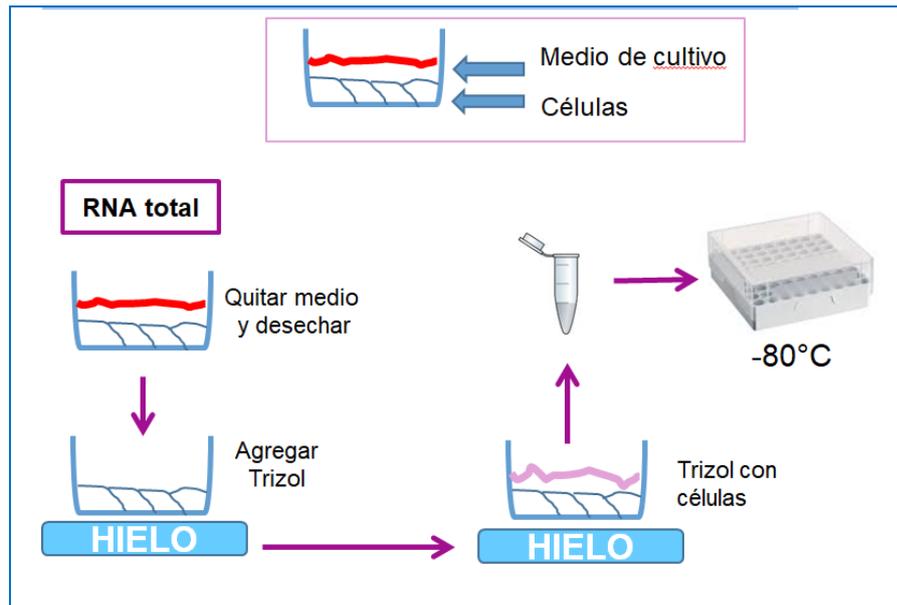


Figura 16. Extracción de RNA con reactivo de Trizol. Procedimiento para extracción del RNA de los tres pozos con medio de cultivo y fructosa y tres con glucosa, donde se desechó el medio de cultivo y se agregó reactivo de trizol compuesto por: el fenol (compuesto volátil tóxico) hidroxiquinoleína, que es un inhibidor de ARNasas, tiocianato de guanidina, tiocianato de aminio y glicerol. El Trizol es un líquido rosa brillante de olor fuerte, que mantiene la integridad de los ácidos nucleicos durante la homogeneización del tejido, rompe células y componentes celulares. La homogeneización del tejido tiene que hacerse en frío para evitar la degradación del RNA, pero una vez añadido el Trizol su degradación se ve seriamente reducida. Es muy corrosivo, irritante y puede causar la muerte, por lo que se trabaja en una cabina de flujo laminar.

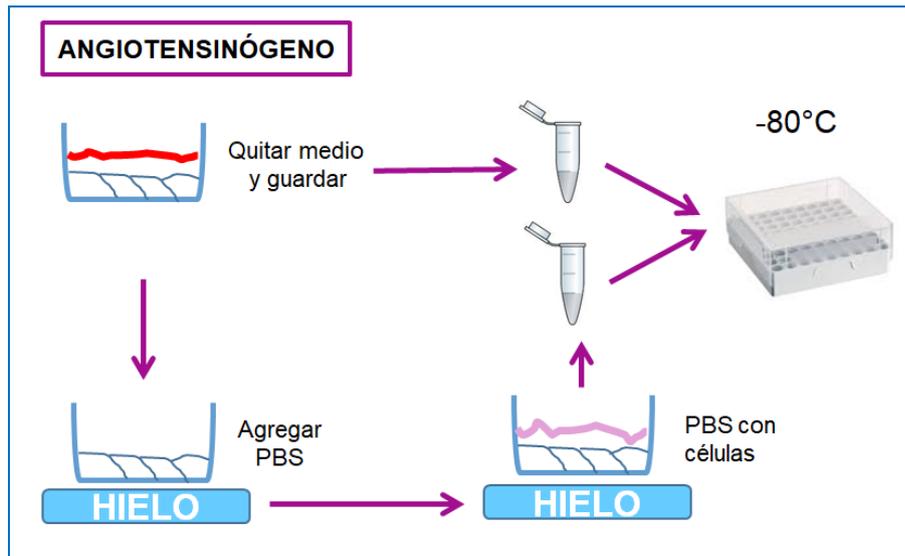


Figura 17. Extracción de ANG con PBS. Para la extracción de DNA, se extrajo el medio de cultivo y se depositó en tubo de Eppendorf. Se agregó PBS tampón fosfato salino es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, mantiene el pH estable, la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano. Es isotónico y no tóxico para las células, se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal.

Protocolo de Trizol

- La primera fase consiste en homogeneizar las muestras. Por lo que se agregó Trizol a las células y se lisaron directamente en el plato de cultivo, se pipetearon varias veces y recogieron en tubos Eppendorf.
- La segunda fase es de separación, para lo cual se incubó la muestra por 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 0.2 mL de cloroformo por 1 mL de Trizol, fueron 80µL, dado que se utilizaron 0.4 mL de Trizol. Se movió vigorosamente con vórtex por 15 segundos y se incubó por 3 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó la muestra a 12,000 gravedades por 15 min a 4 °C y se separó la muestra en capas, la primera acuosa que conteniendo RNA, una interfase y una capa más baja color rojo conteniendo DNA y proteínas.
- La tercera fase es la de aislamiento, para la cual se agregó 0.5 mL de isopropanol al 100% por cada 1 mL de trizol a la fase acuosa depositada en otro tubo. Dado la cantidad de Trizol, se usó 0.200 µL. Luego se incubó por 10 min a temperatura ambiente y fue centrifugado a 12,000 gravedades por 10 minutos a 4 °C.
- Para la fase de lavado se removió el sobrenadante y se dejó el pellet, luego se lavó con 1 mL de etanol al 75% por 1 mL de Trizol, por lo

tanto se usaron 0.400 μL . Se pasó por vortex brevemente y centrifugó a 7500 revoluciones por gravedad por 5 min a 4 °C. Se desechó el lavado y se conservó en hielo para secar el pellet por 5-10 min.

- La última fase consiste en resuspender en 50 μL de agua libre de RNAsas y se incubó en bloque térmico a 55 °C por 10 min luego fue almacenado a -70 °C.

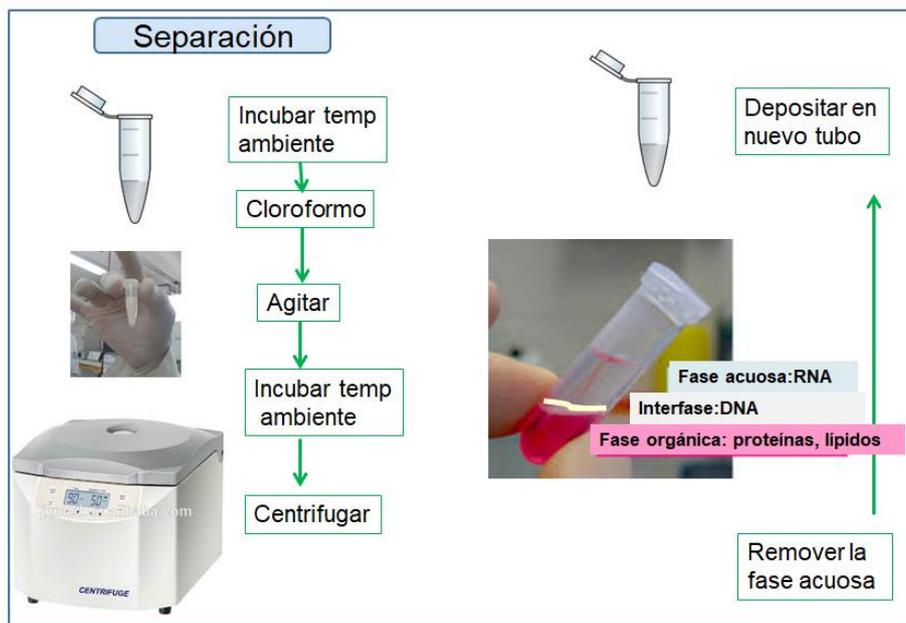


Figura 18. Fase de homogeneizar y separar del Protocolo de Trizol. La homogenización permite la disgregación de la estructura tisular y celular para facilitar la salida de los ácidos nucleicos. La separación y purificación permite la eliminación progresiva de proteínas y otros contaminantes celulares y la obtención de un material genético cada vez mas limpio. El fenol se utiliza para la desnaturalización y solubilización de las proteínas y componentes celulares y el cloroformo permite la separación de las fases durante la centrifugación y es desnaturalizante. La fase acuosa contiene RNA, muy fácil de contaminar.

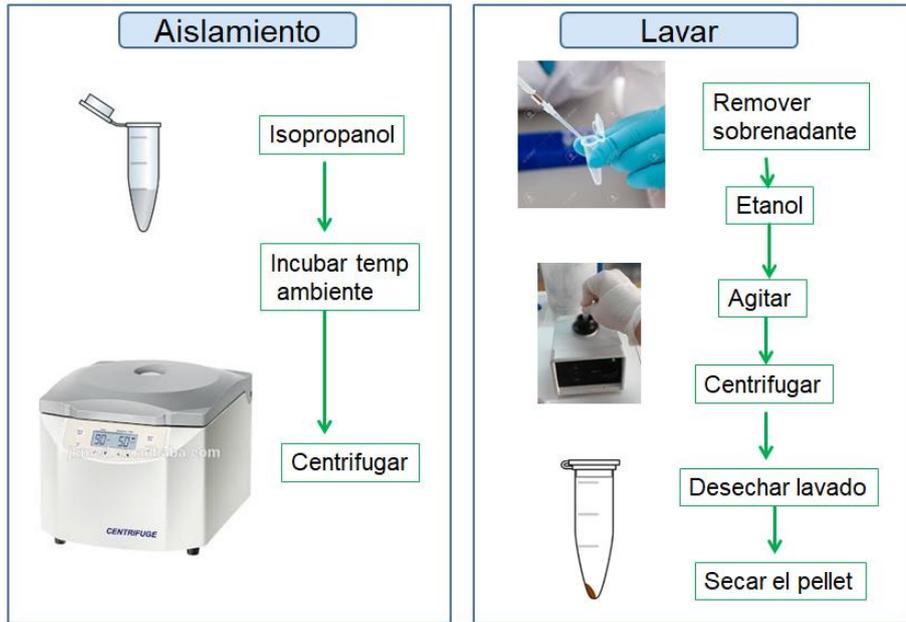


Figura 19. Fases de aislamiento y lavado del Protocolo de Trizol. Permite la obtención del ácido nucleico listo para ser almacenado o diluido a la concentración deseada para su utilización.



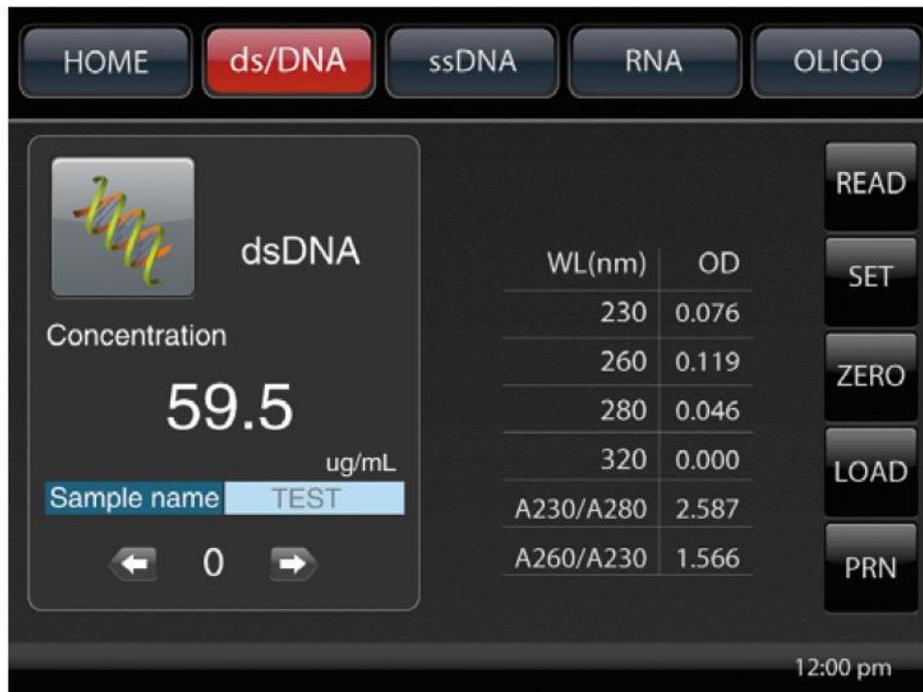
Figura 20. Fase de resuspender del Protocolo de Trizol

El resuspender la muestra permite disolver el pellet de RNA para ser utilizado o almacenado y continuar con los experimentos.

Medición de la concentración de RNAm

Para medir la concentración de RNAm se utilizó el espectrofotómetro Halo DNAmaster.

Figura 21. Pantalla del Espectrofotómetro



Para la cuantificación de los ácidos nucleicos aislados se realiza la medida de absorbancia de la muestra a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro. Se sabe empíricamente que la densidad óptica a 260nm de una solución de RNA puro de 40ug/mL es igual a 1. Con esta relación puede calcularse la concentración de DNA de nuestra muestra. En el caso del ARN la relación de absorbancias A260/280 con un valor entre 2.0-2.2 se considera de pureza óptima, valores > 1.7 es de pureza aceptable y < 1.7 sería indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos.

Cuadro 8. Cuantificación de ácidos nucleicos.

Quantification of Nucleic Acids

For the different types of nucleic acid solutions the average dynamic range of the absorbance relating to the concentration (ng/μl) results and its required sample volume as follows (depending on the lightpath):

	Factor	2 mm Lid (Factor 5) [ng/μl]	1 mm Lid (Factor 10) [ng/μl]	0.2 mm Lid (Factor 50) [ng/μl]	0.1 mm Lid (Factor 100) [ng/μl]	Total Detection Range [ng/μl]
dsDNA	50	6 - 425	13 - 850	63 - 4250	125 - 8500	6 - 8500
ssDNA	37	5 - 315	9 - 629	46 - 3145	93 - 6290	5 - 6290
RNA	40	5 - 340	10 - 680	50 - 3400	100 - 6800	5 - 6800
Oligo	33	4 - 281	8 - 561	41 - 2805	83 - 5610	4 - 5610

Corresponding Absorbance Value Limits for A 260 (Abs)	0.025 to 1.7	0.025 to 1.7	0.025 to 1.7	0.025 to 1.7
Required Sample Volume	6 - 10 μl	3 - 5 μl	0.7 to 4 μl	0.5 to 3 μl

* 1mm and 0.2mm lid come as standard with DYNAM-UM model, for other pathlength's lid, please enquire.

Se muestran los rangos de detección para RNA, se utilizó 1 μL con el factor 50 que permitió identificar de 50 a 3400 ng/μL.

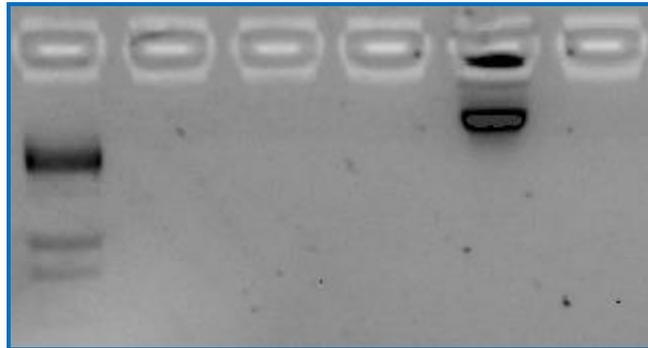
-Se colocó 1μL de cada muestra y el espectrofotómetro la analizó, indicando la concentración de RNAm de cada muestra en μg/μL y la relación 260/280.

-Se hizo cuadro con todos los resultados y se identificó la cantidad de muestra necesaria en base a su concentración de cada una para tener una concentración de 1.5μg de RNAm.

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1%, para lo cual se utilizó 1 gr de agarosa, 100 mL de buffer TAE, y 10 mL de bromuro de etidio. Se cargó 5 μL de producto de PCR y 5 μL de buffer de carga. Se corrió a 400 mAmp, 100 volts y 45 minutos.

Figura 22. Gel de agarosa de RNA



Gel de agarosa de la primera muestra de RNA, por lo que se procedió a realizar los experimentos.

RT-PCR

El cDNA se sintetizó utilizando el RNA total y el sistema SuperScript® III RT First-Strand para RT-PCR conforme a las instrucciones del proveedor.

La concentración de RNA total para sintetizar el cDNA fue de 1.5 µg/µL. Para iniciar se mezcló y centrifugó brevemente cada componente antes de usarse. Luego en un tubo de 0.2-0.5 mL se agregó RNA, oligo (dT) 1µL, dNTP mix 1 µL y agua inyectable hasta completar 10 µL, y se colocó en hielo por 1 min. Fue incubado en termociclador a 65°C por 5 min y se agregaron 10 µL de cDNA Synthesis mix que contiene 10X RT Buffer 2 µL; 25 mM MgCl₂, 4 µL; 0.1 M DTT, 2µL; RNaseOUT 1 µL y SuperScript III RT, 1 µL. La mezcla se incubó a 50°C por 50 min y se terminó la reacción a 85°C por 5 min luego fue colocado en hielo. Asimismo se agregó 1 µL de Rnasa H a cada tubo y se incubó por 20 minutos a 37°C, posteriormente fue almacenado a -80°C.

Figura 23. Protocolo RT

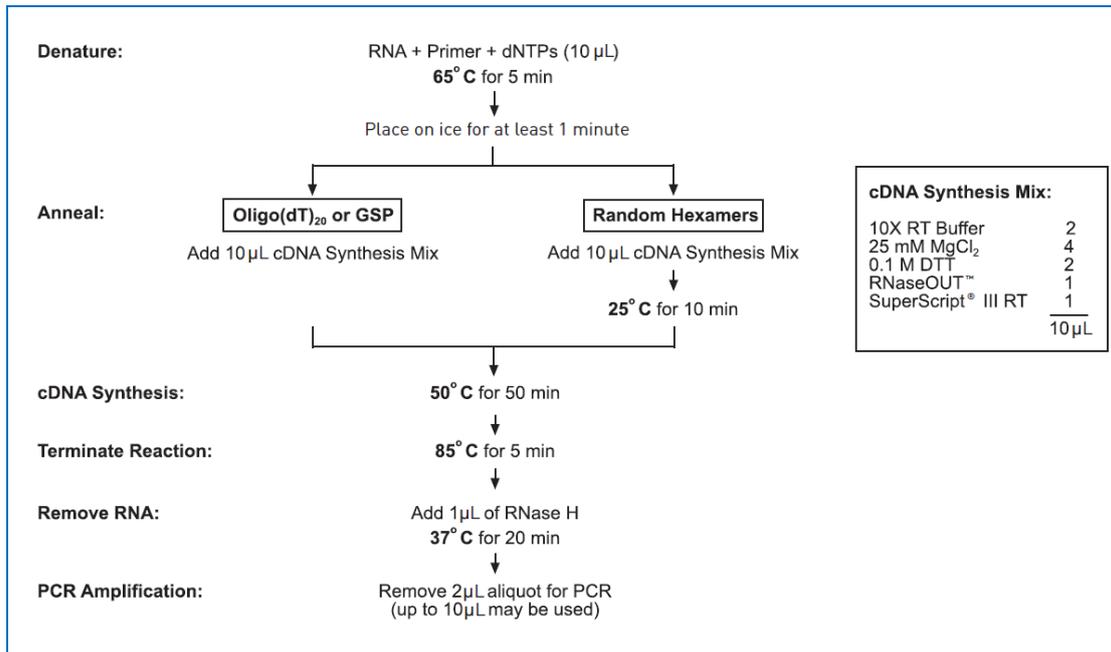


Diagrama de flujo de RT tomado de SuperScript III First-Strand, Invitrogen. El mix se realizó en tubo libre de RNAsas.

La PCR se hizo usando el Termociclador StepOne (Applied Biosystems, en base al protocolo establecido). El kit MyTaq DNA Polimerasa de Boline.

Los primers usados fueron de Invitrogen:

Cuadro 9. Primers utilizados en experimento

Cita	Nombre	Secuencia	Número en GenBank	Localización	Tamaño de amplicón	Especie
Stamtikos et al 2016	ACC s	taccatcaggtagcccgtgcagttt	NM_198836.2	6726-6749	180	Humano
	ACCas	gctcagggttggcattgtggattt		6906-6883		Humano
Juillerat-Jeanerret et al. 2014	hAGT s	tccacctcgtcatccaca	NM_00029.3	630-647	311	Humano
	hAGT as	ggc tccagatagagaga		958-941		Humano
Satou et al 2006	GADPH s	atcatccctgcctctactgg	NM_001289746	790-809	176	Humano
	GADPH as	ctgcttcaccaccttcttga		966-947		Humano

Los primers se tomaron de las referencias bibliográficas, se buscó que el tamaño de amplicón fuera suficiente y que fueran de humano. Asimismo se revisó toda la información en NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Para realizar la PCR, se agregó por cada muestra Buffer 10µL, el templado (cDNA) 2µL, de los primer 1 µL de cada uno, Taq DNA polimerasa 1µL y agua libre de Rnasas hasta 50 µL.

Se hizo la desnaturalización inicial a 95°C por 1 minuto un ciclo. Luego a 95°C por 15 segundos por 35 ciclos y la alineación por 15 segundos la temperatura dependiendo cada uno de los primers, obtenida con la fórmula $T_m((A+T)(2^\circ\text{C}) + ((G+C)(4^\circ\text{C}))$. $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$, por 35 ciclos. La extensión 72°C por 30 segundos por 35 ciclos y al final a temperatura de 72°C por 10 minutos, un ciclo y terminó a 4°C.

Se realizó electroforesis con gel de agarosa al 1% para observar los resultados.

Cuadro 10. Protocolo PCR.

PCR reaction set-up:

All reactions must be set-up on ice.

5x MyTaq Reaction Buffer	10 μL
Template	as required
Primers 20 μM each	1 μL
MyTaq DNA Polymerase	1 μL
Water (ddH ₂ O)	up to 50 μL

PCR cycling conditions

We suggest these conditions in the first instance:

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95 °C	1 min	1
Denaturation	95 °C	15 s	25-35
Annealing*	User determined	15 s	
Extension*	72 °C	10 s	

Se realizó una PCR para cada primer, y se probaron diferentes temperaturas de alineación en termociclador con gradiente de temperatura y se corrieron geles de agarosa a fin de identificar la temperatura correcta.

Por otro lado se realizó la búsqueda en bases de datos como <http://gene-regulation.com/> y <https://genome.ucsc.edu/>, para identificar alguna secuencia conocida en el promotor del angiotensinógeno del humano, la rata y el ratón para la proteína ChREBP dado la importancia que tiene al activarse o inhibirse por metabolitos de los carbohidratos, y regular la expresión de los genes, de varias enzimas que participan en las rutas metabólicas de lipogénesis y glucólisis.

7. Resultados y discusión.

En modelos murinos alimentados con altas concentraciones de fructosa se induce HTA. Los mecanismos por los cuales se induce la HTA no están plenamente dilucidados. En este trabajo se probó la hipótesis de que la Fructosa incrementa la expresión del ANG en un modelo *in vitro* de hepatocitos humanos. En la **Figura 24** se observa la expresión del mRNA del ANG en las células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones de glucosa y fructosa (5, 10 y 20 mM).

Es de destacar que a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas se encontró una tendencia de mayor expresión del mRNA del ANG con la concentración de 20 mM de fructosa. La falta de diferencia significativa de la concentración de fructosa 20 mM de fructosa podría deberse a que los datos con este tratamiento están muy dispersos. En **Figura 24**, panel superior, se observa una alta expresión del mRNA del ANG en dos de los tres carriles esto puede derivarse una falla en la extracción del RNA total. Sin embargo la intensidad de las bandas para el control de carga GAPDH sugiere que la extracción de RNA fue correcta. La forma en como se podría resolver la dispersión de los datos sería a través del PCR en tiempo real. A diferencia de la PCR de punto final, la PCR en tiempo real permite cuantificar los niveles de expresión génica (mRNA) entre diferentes tejidos o en el tiempo, o la respuesta de un tejido a diferentes tratamientos aún con cantidades pequeñas de mRNA. Los productos de amplificación se observan a medida que transcurren los ciclos de la PCR. El PCR en tiempo real está basado en la detección y cuantificación de un reportero fluorescente (SYBR Green I, bromuro de etidio o diferentes sondas), cuya señal aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en la reacción. El termociclador adquiere y cuantifica la señal emitida por el reportero al final de cada ciclo para cada muestra. La cuantificación del amplicón puede ser absoluta, para determinar el número exacto de moléculas de ADN o ARN presentes en una muestra o a través de una cuantificación relativa que permite determinar cuanto un ácido nucleico determinado se tiene con respecto a un gen de referencia.

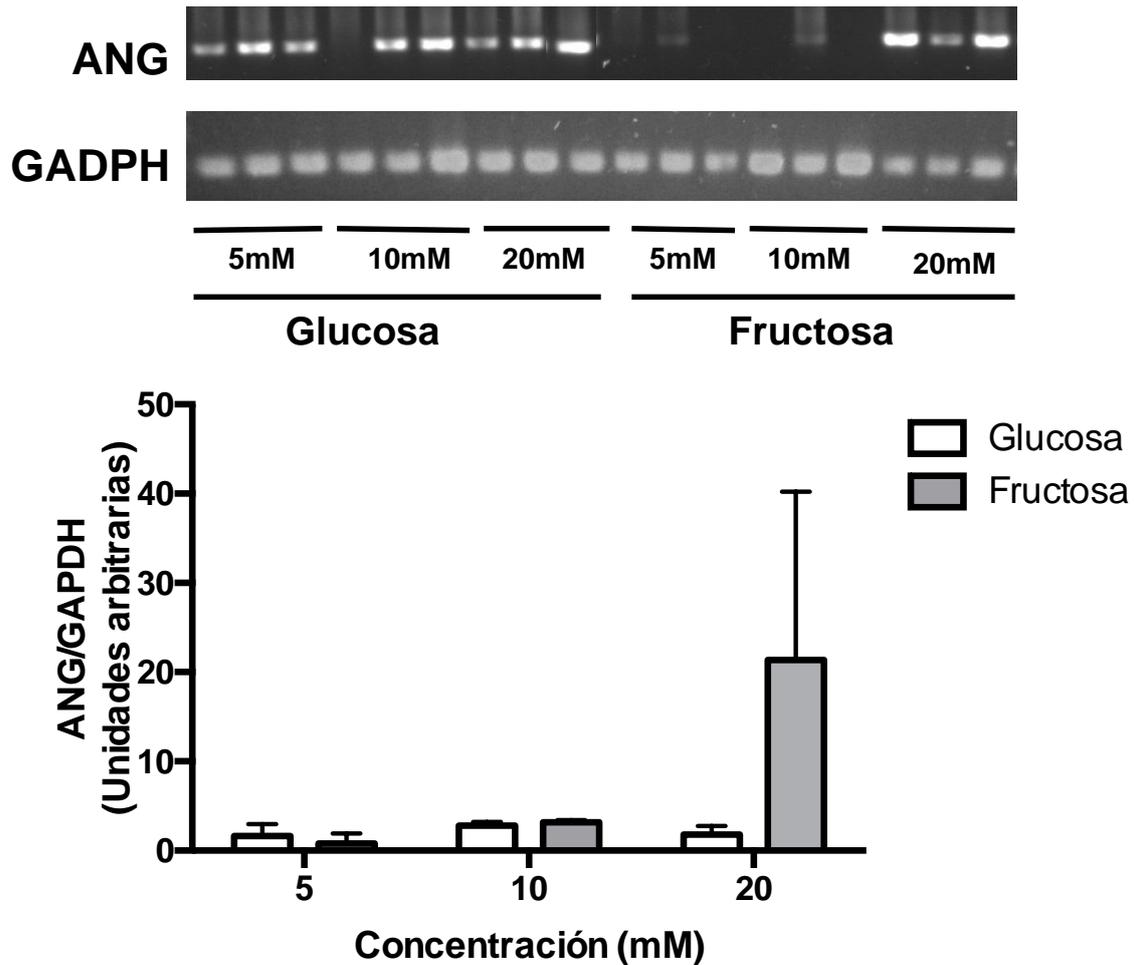


Figura 24. Efecto de la glucosa y fructosa sobre la expresión del mRNA del angiotensinogeno (ANG) en las células HepG2 después de 24 h de tratamiento. En el panel superior se muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de RT-PCR del ANG y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). El mRNA de la GAPDH se utilizó como control de carga. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión del mRNA del ANG. Se muestra el promedio y la desviación estándar. Se hicieron dos experimentos independientes por triplicado y se muestra el resultado de un solo experimento. Se realizó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

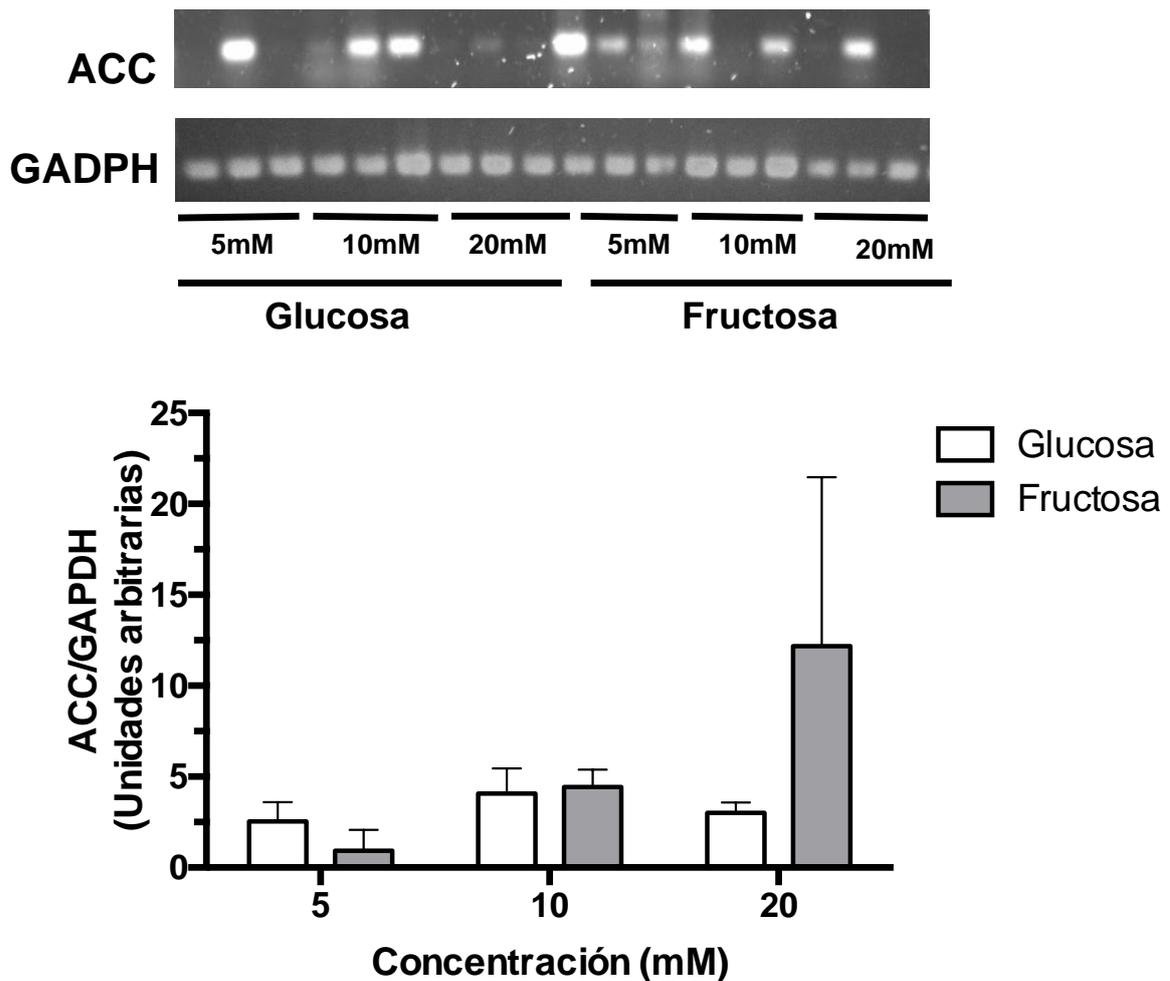


Figura 25. Efecto de la glucosa y fructosa sobre la expresión del mRNA del acetil CoA carboxilasa (ACC) en las células HepG2 después de 24 h de tratamiento. En el panel superior se muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de RT-PCR del ACC y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). El mRNA de la GAPDH se utilizó como control de carga. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de la expresión del mRNA del ACC. Se muestra el promedio y la desviación estándar. Se hicieron dos experimentos independientes por triplicado y se muestra el resultado de un solo experimento. Se realizó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

En la **Figura 25** se observa la expresión del mRNA del ACC en las células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones de glucosa y fructosa (5, 10 y 20 mM). A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas se encontró una tendencia a mayor expresión del mRNA del ACC con la concentración de 20 mM de fructosa. En el panel superior, se observa una alta expresión del mRNA de la ACC en uno de los tres carriles en concentración 20 mM.

La enzima clave de la síntesis de los ácidos grasos es la ACC, limita el aporte de malonil-CoA, la molécula que aporta la unidad de dos átomos de carbono a la cadena de ácido graso en crecimiento. Se usó como control positivo en este experimento.

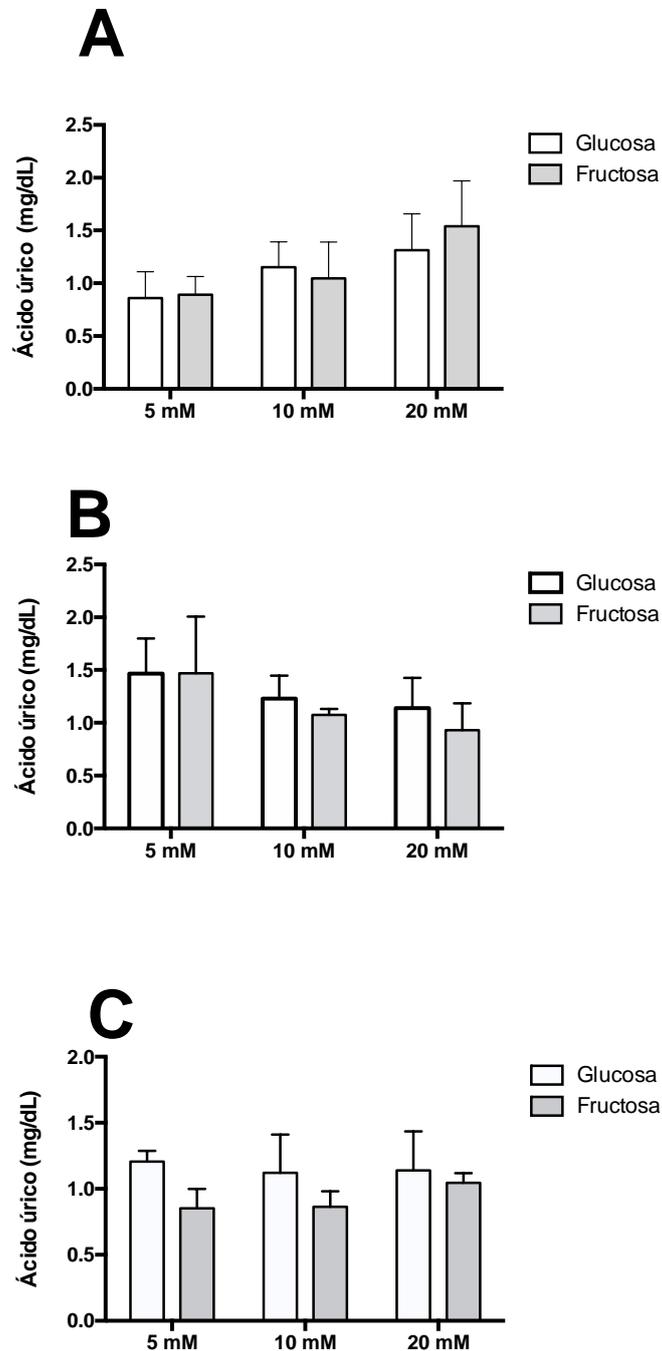


Figura 26. Ácido úrico de las células HepG2 con tratamiento de glucosa y fructosa en concentración de 5, 10 y 20 mM obtenido a las 12, 24 y 48 h. Se muestra análisis densitométrico de la concentración de ácido úrico en las muestras de mRNA con tratamiento de glucosa o fructosa en concentraciones de 5, 10 y 20 mM en diferentes tiempos, a las 12 h (panel A), 24 h (panel B) y 48 h (panel C). Se muestra el promedio y la desviación estándar. Se

hicieron dos experimentos independientes por triplicado y se muestra el resultado de un solo experimento. Se realizó un ANOVA de dos vías y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

En el panel A con tratamiento de 12 h, se aprecia que a mayor concentración de glucosa y fructosa hay mayor cantidad de ácido úrico, a diferencia del panel B con tratamiento de 24 h que se observa lo contrario, a menor concentración de glucosa y fructosa mayor cantidad de ácido úrico. En el panel C, con tratamiento de 48 h se aprecia leve incremento de ácido úrico con fructosa en concentración de 20 mM, sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa. Los resultados tan dispersos pueden ser atribuidos a que se obtuvo el promedio de los 3 pozos de cada una de las 3 concentraciones, con tratamiento a las 12, 24 y 48 h tanto de glucosa como de fructosa y en cada una de ellas pudo haber una cantidad diferente de producción de ácido úrico, que fue medido en el PBS con extracción del tRNA en el equipo de laboratorio Biosystems.

Por lo tanto, el modelo experimental *in vitro* es adecuado para estudiar el efecto del ácido úrico, sin embargo, puede diseñarse un experimento diferente, donde las células reciban tratamiento de AU y se mida la expresión de los componentes del SRA con PCR en tiempo real.

En relación a la regulación de la expresión génica por carbohidratos, se ha identificado a la ChREBP como una proteína en el encendido de la lipogénesis y gluconeogénesis hepáticas al ser activada metabolitos de carbohidratos permitiendo que éstos regulen la expresión de los genes, dependiendo de bajas o altas concentraciones a nivel celular. Por lo tanto, se realizó la búsqueda de secuencias probables de unión a factores de transcripción en el promotor del ANG, que es una región de DNA que controla la iniciación de la transcripción de una determinada porción de DNA o RNA a para activar o desactivar el gen que regula, en este caso, con la finalidad de identificar sitios de unión de la ChREBP, la cual cuenta con diferentes nombres: MLXIPL, CHREBP, MIO, MONDOB, WBSCR14, WS-bHLH, bHLHd14, MLX interacting protein like, MLX. Las bases de datos consultadas fueron <http://gene-regulation.com/> y <https://genome.ucsc.edu/>, no identificando ninguna secuencia conocida hasta el momento en el humano, rata y ratón.

Por otro lado, ésta investigación comprueba que el modelo *in vitro* es adecuado para realizar diferentes experimentos en relación a expresión y regulación génica, independientemente de que las células HepG2 provienen de un hepatocarcinoma humano, contienen la maquinaria génica necesaria para la reproducción celular y permite exponerlas a situaciones suprafisiológicas en un ambiente que permite controlar las variables a estudiar, donde no hay influencia de factores internos y externos como sería en un experimento *in vivo*.

Las muestras evaluadas fueron con tratamiento de 24 h por considerarse tiempo suficiente acorde a la literatura para obtener resultados y comprobamos que sí hubo respuesta al tratamiento; en el humano se ha demostrado que la fructosa es metabolizada rápidamente en <6 h (Iizuka, 2017). Por otro lado, la variable a considerar es la concentración de fructosa, ya que fisiológicamente nunca se encuentra sola en el organismo, siempre hay glucosa. En este sentido, Macdonald *et al.* (1978) mostraron que un adulto de 70 kg, dosis de 1 g/kg de fructosa se alcanzan concentraciones de 0.4 mM y 0.5 mM a los 30 y 60 minutos, respectivamente. Con dosis de 1g/kg de glucosa se alcanzan concentraciones de glucosa de 6.7 mM y 5.6 mM de glucosa, respectivamente. Con dosis de 1g/Kg de sacarosa se alcanzan concentraciones de 7.7 mM de glucosa y de 0.2 mM de fructosa a los 30 minutos y 5.0 mM de glucosa y de 0.2 mM de fructosa a los 60 minutos.

Sun y Empie (2012) demostraron en humanos con trazadores isotópicos que la ingesta de 50 a 150 g de fructosa se traduce en concentraciones plásmicas de fructosa entre 0.17-0.61 mM, mientras que la misma cantidad de glucosa genera ≥ 8.3 mM de glucosa o más. Las concentraciones de fructosa probadas experimentalmente se pueden alcanzar a través de los alimentos. La concentración de fructosa en bebidas puede ir de 23 a 72 g/L (Walker *et al.* 2014; Havel, 2005). Estos resultados indican claramente que la fructosa ingerida en la sacarosa o como monosacárido se transforma en glucosa y las concentraciones plásmicas de fructosa son muy pequeñas.

Cholsoon *et al.* (2018) demostraron en ratones que la fructosa a dosis bajas (\leq g/kg) se elimina más del 90% en el intestino delgado, mientras altas dosis (≥ 1 g/kg) sobrepasa la absorción intestinal y la fructosa pasa al hígado y a la microbióta colónica.

En este trabajo las concentraciones utilizadas de fructosa fueron 50 veces más altas (20 mM) de las que se pueden alcanzar en plasma humano con altas dosis de fructosa de acuerdo a los experimentos antes mencionados. Las concentraciones de fructosa utilizadas en este trabajo son comparables con las utilizadas en otros trabajos realizados *in vitro* en esta misma línea celular u otras como Zhao *et al.* (2016) que indujeron desordenes metabólicos en células Hep G2 utilizando glucosa, fructosa y ácidos grasos con dosis de 10 y 15 mM. En 2003, Hsieh *et al.* demostró que la glucosa alta estimula la expresión génica de angiotensinógeno y la hipertrofia celular a través de la activación de la ruta de biosíntesis de hexosamina en células tubulares proximales de riñón de rata, con dosis de 5 mM.

Sin embargo, desde una perspectiva crítica y más fisiológica, se podrían plantear otros experimentos con el mismo modelo celular, con diferentes combinaciones de fructosa y glucosa concentraciones bajas de fructosa alrededor de 0.5 mM y concentraciones altas de glucosa de 3 a 5 mM. El principal problema con este esquema es que no se puede desagregar el efecto de la fructosa y la glucosa, y por otro lado, no es fisiológico probar exclusivamente concentraciones bajas de fructosa.

8. Conclusión.

En conclusión, diversos estudios epidemiológicos y experimentales muestran que existe relación entre el consumo excesivo de fructosa y la HTA. En ésta investigación se observó que la fructosa aumenta la expresión del mRNA del ANG y la ACC en las células HepG2 y se destaca la importancia de estudiar la fructosa en combinación con glucosa en diferentes concentraciones.

9. Referencias bibliográficas

- Acuña, C. (2013). Implementación de un sistema de cultivo de células hepáticas como modelo *in vitro* para estudios metabólicos. Tesis de licenciatura. Chile, Universidad de Chile.
- Barquera S., Campos-Nonato I., Hernández-Barrera L., Medina C., Rojas R., y A. Jiménez (2012). Hipertensión arterial en adultos mexicanos: importancia de mejorar el diagnóstico oportuno y el control. Encuesta Nacional de Nutrición y Salud 2012. México, Instituto Nacional de Salud Pública.
- Brasier, A., Tate, J., Ron, D. y J. Habener. (1989). Multiple *cis*-acting DNA regulatory elements mediate hepatic angiotensinogen gene expression. *Mol Endocrinol*, 1032, 1022-1034.
- Brasier, A., y J. Li. (1996). Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*. 27, 465-475.
- Brown, M. (2007). Renin: friend or foe? *Heart*. 93, 1026-1033.
- Campbell, D. J., Bouhnik, J., Coezy, E., Menard, J. y P. Corvol. (1985). Characterization of precursor and secreted forms of human angiotensinogen. *J Clin Invest*. 75, 1880-1893.
- Campbell, D y J. Habener. (1986). Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*. 78, 31-39.
- Casado, M. (2005). Regulación de la expresión génica por glucosa. Monograf Real Acad Nac Farm. XVIII, 4.
- Clauser, E., Gaillard, I., Wei, L., y P. Corvol. (1989). Regulation of angiotensinogen gene. *Am J Hypertens*. 2, 403-410.
- Cloust, N.W., Evans, B.A., Haralambidis, J., y R.I. Richards. (1988). Molecular cloning of the mouse angiotensinogen gene. *Genomics*. 2, 240-248.
- Dai, S., y J. McNeill. (1995). Fructose-Induced Hypertension in rats is concentration and duration dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2, 101-107.

- Esquivel-Solís, V., y Gómez-Salas, G. (2007). Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Med Costarric.* 49, 198-202.
- Fernández, C. (2009). Renina: descubierta en 1898, inhibida en 2008. Historia de su investigación. Evolución y desarrollo de sus inhibidores. *Rev Esp Cardiol.* 9, 1-23.
- Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J., y C. Postic. (2013). Novel insights into ChREBP regulation and function. *Cell.* 24, 257-268.
- Fukamizu, A., Takahashi, S. y M. Kazuo. (1990). Expression of the human angiotensinogen gene in human cell lines. *J Cardiovasc Pharmacol.* 16, 11-13.
- Fukamizu, A., Takahashi, S., Seo, M.S., Tada, M., y K. Tanimoto. (1990). Structure and expression of the human angiotensinogen gene. Identification of a unique and highly active promoter. *J. Biol. Chem.* 265, 13, 7576-7582.
- Gaillard, I. Clauser, E. y P. Corvol. (1989). Structure of human angiotensinogen gene. *DNA.* 8, 87-99.
- Giacchetti, G., Sechi, L.A., Griffin, C. A., Don, B.R., Mantero, F., y M. Schambelan. (2000). The tissue renin-angiotensinogen system in rats with fructose-induced hypertension: overexpression of type 1 angiotensin II receptor in adipose tissue. *J. Hypertens.* 18, 695-702.
- Gómez, A. Cardellá, L. Pita, G. y M. Hernández (2012). Consumo elevado de fructosa y su posible influencia en el metabolismo lipídico. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 22, 287-300.
- Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T., Martínez-Romero, A., Jiménez N., Castell J.V., y J.E. O'Connor. (2007). A Human hepatocellular *in vitro* model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact.* 165, 106–116
- Ha, V., Jayalath, V., Adrian, I., Cozma, M., Russell, J., y J. Sievenpiper. (2013). Fructose-containing sugars, blood pressure, and cardiometabolic risk: a critical review. *Curr Hypertens Rep.* 15, 281–297.

- Havel, P. (2005). Dietary fructose: Implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Res.* 5, 133-157.
- Herman, M. y S. Varman. (2017). The sweet path to metabolic demise: Fructose and lipid synthesis. *Trends Endocrinol Metab.* 1161, 1-12.
- Hirahatake, K. M., Meissen, J. K., Fiehn, O., y S.H. Adams. (2011). Comparative effects of fructose and glucose on lipogenic gene expression and intermediary metabolism in HepG2 liver cells. *PLoS One*, 6, e26583.
- Hsieh, T., Fustier, P., Zhang, S., Filep, J., Tang, S., Ingelfinger, J., Fantus, g., Hamet, P. y J. Chan. (2003). High Glucose Stimulates Angiotensinogen Gene Expression and Cell Hypertrophy via Activation of the Hexosamine Biosynthesis Pathway in Rat Kidney Proximal Tubular Cells. *Endocrinology.* 144, 4338–4349.
- Hwang, I., Hoffman, H., y G. Reaven. (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.*10, 512-516
- Ibarra-Rubio, M., y J. Pedraza-Chaverri. (1993). Renina: estructura y regulación de la expresión del gen y vías celulares de secreción. *Rev Invest Clin.* 45, 255-66.
- Iizuka K. (2017). The role of carbohydrate response element binding protein in intestinal and hepatic fructose metabolism. *Nutrients.* 9, 181-120.
- Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A., Morscher, R., Lee, G., *et al.* (2018). The small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. *Cell Metabolism.* 27, 351-361.
- Jayalath, V.H., Sievenpiper, J.L., de Souza, R.J., Ha, V., Mirrahimi, A., Santaren, I.D., Blanco Mejia, S., Di Buono, M., Jenkins, A.L., Leiter, L.A., Wolever, T.M., Beyene, J., Kendall, C.W., y D.J. Jenkins. (2014). Total fructose intake and risk of hypertension: a systematic review and meta-analysis of prospective cohorts. *Am Coll Nutr.* 33, 328–339.

- Jeunemaitre, X., Soubrier, F., Kotelevtsev, Y., Lifton, R., *et al.* (1992). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 71, 169-160.
- Kim, M., Krawczyk, S., Doridot, L., Fowler, A., Wang, J. *et al.* (2017) ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling. *J Clin Invest*. 126, 4372–4386
- Kobori, H., Harrison-Bernard, L., y G. Navar. (2008). Expression of angiotensinogen mRNA and protein in angiotensin II-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 12, 431–439.
- Lanaspa, M., Tapia, E., Soto., V., Sautin, Y., y L. Sánchez-Lozada. (2011). Uric Acid and Fructose: Potential Biological Mechanisms. *Semin Nephrol*. 31, 426-432.
- Lee, O., Bruce, W.R., Dong, Q., Bruce, J., Mehta, R. y P.J. O’Brien. (2008) Fructose and carbonyl metabolites as endogenous toxins. *Chem Biol Interact*. 178, 332-339.
- Lifton, R., Gharavi, A., y D. Geller. (2001). Molecular mechanisms review of human hypertension. *Cell*, 104, 545-556.
- Lynch, K., y M. Peach. (1991). Molecular biology of angiotensinogen. *Hypertension*. 17, 263-269.
- Macdonald, d., Keyser, A., y D. Pacy. (1978). Some effects, in man, of varying the load of glucose, sucrose, fructose, or sorbitol on various metabolites in blood. *Am J Clin Nutr*. 31, 1305-1311.
- Martínez, J.A., Rodríguez, G., Duran de la Fuente, I.E, Fuentes, S.A., Garzón, V., y J.H. Medina. (2017). Diagnóstico y tratamiento de hipertensión arterial en el adulto mayor. Guía de evidencias y recomendaciones: guía de práctica clínica. México, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Meaney, E. (2006). Aspectos moleculares en hipertensión arterial sistémica: aplicaciones en la práctica clínica. *Arch Cardiol Mex*. 76,170-175.
- Morgan, L., Broughton, F. y N. Kalsheker. (1996). Angiotensinogen: molecular biology, Biochemistry and physiology. *Int J Biochem Cell Biol*. 28, 1211-1222.

- Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., y K. Tuttle. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol*. 290, 625–31.
- New, M., Geller, D., Fallo, F. y R. Wilson. (2005). Monogenic low renin hypertension. *Trends Endocrinol Metab*. 16, 92-97.
- Nguyen, S., Choi, H., Lustig, R., y C. Hsu. (2009). Sugar-Sweetened Beverages, Serum Uric Acid, and Blood Pressure in Adolescents. *J Pediatr*. 154, 807-13.
- Nyby, M., Abedi, K., Smutko, V., Eslami, P. y M. Tuck. (2007). Receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res*. 30, 451-7.
- OMS. (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo. Ginebra, OMS.
- Passalacqua, C. (2010). Marcadores genéticos en hipertensión esencial. *Rev Med Chile*. 138, 767-772.
- Peach, M. (1977). Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action. *Physiol Rev*. 57, 313-370.
- Pérez, E., Serralde, A., y G. Meléndez. (2007). Efectos benéficos y deletéreos del consumo de fructosa. *Endocrinol Nutr*. 15, 67-74.
- Pérez-Díaz, I., Hiriart, M., Olivares-Reyes, JA. y G. Robles-Díaz. (2006). Receptores para la angiotensina II. *REB*. 25, 55-60.
- Ponce, Y. y A. Ponce. (2012). El sistema renina-angiotensina desde la circulación hasta la célula: implicaciones más allá de la hipertensión. *CorSalud*. 4, 287-293.
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P. y J. Girard. (2007). ChREBP, a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Ann Rev Nutr*. 27:179-192.
- Quiroga, M.I. (2010). Arterial hypertension – Genetics. *An Fac Med*. 71, 231-5.
- Rebollo, A., Roglans, N., Alegret, M., y C. Laguna. (2012). Way back for fructose and liver metabolism: Bench side to molecular insights. *World J Gastroenterol*. 18, 6552-6559.
- Rebollo, A., Roglans, N., Baena, M., Sánchez, R. Merlos, M., Alegret, M. y J.C. Laguna. (2014). Liquid fructose downregulates Sirt1 expression and

- activity and impairs the oxidation of fatty acids in rat and human liver cells. *Biochim Biophys Acta*. 514–524.
- Reyes, R. (2014). Consecuencias en la salud del consume excesivo de fructosa. Síndrome cardiometabólico. *Diabetes*. 4, 157-162.
- Rho, Y., Zhu, Y., y H. Choi. (2011). The Epidemiology of Uric Acid and Fructose. *Semin Nephrol*. 5, 410 – 419.
- Rippe, J.M., y T.J. Angelopoulos (2016). Added sugars and risk factors for obesity, diabetes and heart disease. *Int J Obes (London)*. 40, 22-27.
- Riveros, MJ., Parada, A., y P. Pettinelli. (2014). Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutr Hosp*. 29, 491-499.
- Robin, R., Surowska A., y L. Tappy. (2016). Pathogenesis of cardiovascular and metabolic diseases: are fructose-containing sugars more involved than other dietary calories? *Curr Hypertens Rep*. 18, 1-8.
- Ron, D., Brasier, A., y J. Habener. (1990). Transcriptional regulation of hepatic angiotensinogen gene expression by the acute-phase response. *Mol Cell Endocrinol*. 14, C97-C104.
- Ruiz-Gayo, M., y M. Fernández-Alfonso. (2008). Resistencia a leptina inducida por fructosa: ¿un camino rápido hacia la esteatosis hepática?. *Clin Invest Arterioscl*. 20, 247-8.
- Santeliz, H., Romano, L., González, A. y H. Hernández. (2008). El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. *Rev Mex Cardiol*. 19, 21-29.
- Savino, P. (2011). Obesidad y enfermedades no transmisibles relacionadas con la nutrición. *Rev Colomb Cir*. 26,180-195. 92-97.
- Secretaría de Salud. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009, para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. Diario Oficial de la Federación. 31 de mayo.
- Segarra, A., Banegas, I., Ramírez, M. e I. Prieto. (2009). Síndrome metabólico y sistemas renina angiotensina tisulares. *Seminar Med*. 61, 11-23.
- Shimamoto, Y., Hirota, K., y Fukamizu, A. (2004) Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on human angiotensinogen promoter. *Int J Mol Med*.13, 729-733.

- Singh, A., Amlal, H., Haas, P., Dringenberg, U., Fussell, S., Barone, S., et al. (2008). Fructose-induced hypertension: essential role of chloride and fructose absorbing transporters PAT1 and Glut5. *Kidney Int.* 74, 438 – 447.
- Soleimani, M., y P. Alborzi. (2011). The Role of Salt in the Pathogenesis of fructose-Induced Hypertension. *Int J Nephrol.* 2011, 392708.
- Sun, S., y M. Empie. (2012). Fructose metabolism in humans- what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab.* 9, 89.
- Tamura, K., Umemura, S., Ishii, M., Tanimoto, K., Murakami, K. y A. Fukamizu. (1994). Molecular mechanism of transcriptional activation of angiotensinogen gene by proximal promoter. *J Clin Invest.* 93, 1370-1379.
- Tamura, K., Tanimotom, K., Takahashi, S., Sagara, M., Fukamizu, A., y K. Murakami. (1992). Structure and expression of the mouse angiotensinogen gene. *Jpn Heart J.* 33, 113-124.
- Tanaka, T., Ohkubo, H. y S. Nakanishi. (1984). Common structural organization of the angiotensinogen gene and the α 1-antitripsin genes. *J Biol Chem.* 259, 8063-8065.
- Tappy, L. y K. Le. (2010). Metabolic effect of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev.* 90, 23-46.
- Walker, R., Dumke, K., y M. Goran. (2014). Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition.* 30, 928-935.
- White, J. (2013). Challenging the fructose hypothesis: new perspectives on fructose consumption and metabolism. *Adv Nutr.* 4, 246-256.
- Windemuller, F., Xu, J., Rabinowitz, S., Hussain, M. y S. Schwarz. (2016). Lipogenesis in Huh7 cell is promoted by increasing the fructose: Glucose molar ratio. *World J Hepatol.* 8, 838-843.
- Wu, C., Lu, H., Cassis, L., y A. (2011). Daugherty. Molecular and pathophysiological features of angiotensinogen: a mini review. *N Am J Med Sci.* 1, 183-190.

- Yanai, K., Nibu, Y., Murakami, K., y A. Fukamizu. (1996). A *cis*-acting DNA element located between TATA box and transcription initiation site is critical in response to regulatory sequences in human angiotensinogen gene. *J Biol Chem.* 271, 15981–15986.
- Yua, M., Sánchez-Lozada, L., Johnson, R., y D. Kanga. (2010). Oxidative stress with an activation of the renin–angiotensin system in human vascular endothelial cells as a novel mechanism of uric acid-induced endothelial dysfunction. *J Hypertens.* 28, 1234-1242.
- Zhao, L. Guo, X. Wang, O. Zhang, H. Wang, Y. Zhou, F. Liu, J., y B. Ji. (2016). Fructose and glucose combined with free fatty acids induce metabolic disorders in HepG2 cell: A new model to study the impacts of high-fructose/sucrose and high-fat diets in vitro. *Mol Nutr Food Res.* 60, 909–921.