



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACIÓN

**EFFECTO DE LA EPICATEQUINA SOBRE EL
SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO EN RATAS
CON UNA DIETA HIPERCOLESTEROLEMICA Y
FRUCTOSA**

Tesis

Que para obtener el grado de:

*Maestro en Ciencias
Quimicobiológicas*

PRESENTA:

Elizabeth De Jesús Torres

Director:

Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos

México D. F., Junio 2010



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Toxicología preclínica del departamento de Farmacia de la Escuela Nacional De Ciencias Biológicas bajo la dirección del Dr. Germán Alberto Chamorro Cevallos

El desarrollo de ésta tesis fue sustentado por CONACyT, beca PIFI y beca Tesis. Número de proyecto 20091645.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios por siempre estar a mi lado, por tantas bendiciones que me das cada día, por esa familia tan maravillosa que me has permitido formar y porque a pesar de todo, sigues caminando junto a mí.
- ❖ Víctor y Jorge, "los hombres de mi vida", perdón por cada día que no he estado con ustedes por lograr que esta meta personal sea una realidad. Saben de sobra que son lo más importante en mi vida y que todo este esfuerzo es para ustedes.
- ❖ Víctor, pensé que esto sería más fácil, pero te amo con todo mi corazón, gracias por el apoyo incondicional, por hacerme tan feliz, por todos los momentos que hemos vivido juntos y porque día a día construimos una familia más unida y llena de amor.
- ❖ Jorge, eres la luz de mi vida, desde que supe que llegarías me cambió la vida, eres el mejor regalo que Dios nos ha dado, gracias por tu inocencia, tus risas, tus travesuras, tus besos y por llenar de amor nuestro hogar. Tú mi gordito, logras sacar lo mejor de mí, ojalá algún día te sientas orgulloso de tus padres
- ❖ Mamá esto también es para ti. Yo sé que te fallé, pero este es solo un paso en mi vida para demostrarte que tu ejemplo, amor, sacrificios y dedicación valieron la pena y que como madre, eres la mejor. Gracias por que tu sola nos sacaste adelante y nunca te diste por vencida a pesar de todo el sufrimiento que cargabas, porque tu fuiste madre y padre a la vez, me siento tan orgullosa de ti, te amo Mamá. Gracias por cuidar a mi niño cuando iba a la escuela, yo sé que no es nada fácil cuidar a tres peques y de verdad, valoro tu esfuerzo.
- ❖ A mis hermanos, Yesica y José Luis, por cuidar a mi gordito en mi ausencia y por que cada uno a su modo me demuestra que siempre estará a mi lado. Los quiero baratijas.
- ❖ Papá, tal vez nunca veas esto pero no quiero dejar de agradecerte el haberme dado la vida, las cosas no han sido como hubiera

querido pero se que me quieres y a pesar de la distancia y los años sin vernos, tienes un lugar importante en mí vida, solo le pido a Dios que algún día regreses y nos permita estar juntos.

- ❖ Lidia, gracias por estar conmigo en esta aventura, por todo lo vivido estos años y por estar conmigo cuando más te necesité, te quiero mucho y te deseo todo el éxito del mundo. Es tan difícil tener una amiga verdadera y a mí me tocó la dicha de conocerte, eres una gran mujer y tienes un gran corazón. Estoy segura que serás muy feliz y lograras todos tus sueños.
- ❖ Al Doc. Chamorro, le agradezco el apoyo como director de tesis, pero sobre todo, le agradezco su amistad y haberme permitido conocerlo como persona, gracias por la confianza que depositó en mí y por los momentos agradables que compartimos.
- ❖ Leti, gracias por tu tiempo, tus enseñanzas y tu paciencia.
- ❖ A todos los Doctores que colaboraron en este trabajo. Gracias por su tiempo y conocimientos.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Índice general.....	i
Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Síndrome metabólico: definición.....	1
1.2 El consumo de fructosa.....	4
1.2.1 <i>Cambios metabólicos asociados al</i> <i>consumo de fructosa</i>	7
1.3 Oxidación de LDL.....	9
1.4 Obesidad, inflamación y resistencia a insulina.....	10
1.5 Disfunción endotelial e hipertensión.....	14
1.6 Riesgo cardiovascular presente en el SM.....	15
1.7 El riñón y el SM.....	16
1.8 El hígado graso no alcohólico.....	17
1.9 Epicatequina.....	19
1.9.1 <i>Historia del cacao</i>	19
1.9.2 <i>Flavonoides</i>	20
1.9.3 <i>Beneficios de los flavonoides</i>	21
2. JUSTIFICACIÓN	24
3. HIPÓTESIS	24

4. OBJETIVO GENERAL.....	25
4.1 Objetivos particulares	25
5. Metodología.....	25
5.1 Animales de experimentación.....	25
5.2 Grupos de estudio.....	26
5.3 Inducción del SM.....	26
5.4 Toma de muestra.....	27
5.5 Parámetros bioquímicos.....	27
5.5.1 <i>Glucosa, perfil lipídico e insulina</i>	27
5.5.2 <i>Presión arterial</i>	28
5.5.3 <i>Determinación de proteínas</i>	29
5.5.4 <i>Determinación de carbonilos</i>	30
5.5.5 <i>Determinación de nitritos</i>	31
5.6 Curva de tolerancia a la glucosa.....	31
5.7 Análisis estadístico.....	31
6. Resultados.....	32
6.1 Comportamiento del peso con respecto al tiempo.....	32
6.2 Tolerancia a la glucosa.....	33
6.3 Parámetros bioquímicos.....	33
7. Discusión.....	42
7.1 Inducción del SM con fructosa.....	42
7.2 Efecto de la epicatequina sobre el SM.....	43
8. Conclusiones.....	51
9. Bibliografía.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. Clasificación de los flavonoides.....	20
FIGURA 2. Peso corporal de los animales durante las 7 semanas de inducción.....	32
FIGURA 3. Efecto de la administración de fructosa más la dieta hipercolesterolémica sobre la tolerancia a la glucosa.....	34
FIGURA 4. Efecto de la epicatequina sobre la insulina (ng/ml) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

	PAGINA
TABLA 1. Definiciones actuales del síndrome metabólico.....	3
TABLA 2. Efecto de la epicatequina sobre el colesterol total (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	35
TABLA 3. Efecto de la epicatequina sobre triglicéridos (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	35
TABLA 4. Efecto de la epicatequina sobre el colesterol LDL (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	35
TABLA 5. Efecto de la epicatequina sobre el colesterol HDL (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	36
TABLA 6. Efecto de la epicatequina sobre la presión sistólica (mm Hg) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	37
TABLA 7. Efecto de la epicatequina sobre los niveles de carbonilos (mmol/mg de prot) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	37
TABLA 8. Efecto de la epicatequina sobre nitritos (mmol/lmg de prot) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	38
TABLA 9. Efecto de la epicatequina sobre la glucosa (mg/dl) e insulina (ng/ml) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.....	39
TABLA 10. Efecto del tratamiento de 10 días con epicatequina (1mg/kg de peso) en ratas con síndrome metabólico.....	41

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) comprende una serie de factores de riesgo para desarrollar daño cardiovascular y diabetes tipo 2. El consumo de epicatequina se ha relacionado con una disminución en la presión sanguínea y resistencia a insulina en pacientes con hipertensión, además de mejorar la disfunción endotelial aumentando los niveles de óxido nítrico (NO). En este trabajo se evaluó el efecto de la epicatequina (1mg/kg de peso) sobre el SM inducido con una dieta hipercolesterolémica y la administración de una solución de fructosa en ratas Wistar durante 7 semanas. Se analizaron parámetros clínicos como: colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, glucosa, insulina, presión arterial, carbonilos y nitritos al inicio, al inicio del estudio, a la tercera semana y al final de cada tratamiento. Los grupos tratados con epicatequina disminuyeron significativamente los niveles de colesterol, colesterol LDL, triglicéridos, glucosa, presión arterial, insulina y carbonilos, por otro lado se observó un aumento también significativo en los niveles de nitritos y colesterol HDL. De acuerdo a esto se puede concluir que la epicatequina tiene un efecto protector sobre los parámetros clínicos involucrados en el SM.

ABSTRACT

The metabolic syndrome (MS) comprises a cluster of risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes that are due to abdominal obesity and insulin resistance. Consumption of epicatechin has been shown to decrease blood pressure and insulin resistance in patients with hypertension, improve endothelial function and increase NO levels. In this experiment, we tested the effect of epicatechin (1mg/ kg weight) on MS, induced with a hypercholesterolemic diet and a fructose solution, in Wistar rats, for seven weeks. We evaluated clinical markers as total cholesterol, c-HDL, c-LDL, triglycerides, glucose, insulin, systolic blood pressure, carbonyl and nitrite groups, at the beginning, third week and end point of the experiment. The groups treated with epicatechin showed a significant reduction in cholesterol, glucose, insulin, systolic blood pressure, c-LDL, carbonyl groups and triglycerides, while c-HDL and nitrite group levels showed a significant reduction. For these reasons we can conclude that epicatechin has a beneficial effect against metabolic syndrome.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome metabólico: definición

En 1988, Reaven describió con el nombre de Síndrome X, un cuadro caracterizado por la agrupación de factores de riesgo cardiovascular (aumento de triglicéridos con disminución de colesterol HDL, hipertensión arterial y obesidad abdominal) asociado a resistencia a la insulina. En su hipótesis la resistencia a la insulina juega el papel principal y la obesidad es un factor predisponente (Qiao, et. al., 2007). La definición del síndrome metabólico (SM) como tal no existe, pues es multifactorial y engloba distintas entidades que comparten como eje principal la obesidad y la resistencia a insulina (Chávez, et. al., 2004).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la prevalencia del síndrome metabólico en México es de 13.61%, mientras que bajo los criterios de la National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) es de 26.6% (Grundy, 2008), esta diferencia se debe a las diferencias de criterios de cada organización, de cualquier forma, lo importante es resaltar que esta prevalencia va en aumento acelerado en nuestro país. En un estudio realizado por Escobedo et. al. arrojó que la Ciudad de México obtuvo una mayor prevalencia del SM con el 29%, seguida de Barquisimeto, Venezuela con el 26% mientras que las Ciudades de Lima, Buenos Aires y Quito obtuvieron el menor porcentaje, también se observó que la prevalencia de este síndrome es mayor en mujeres que hombres (22% y 20% respectivamente) y aumenta con la edad.

A nivel mundial, las personas con SM representan el 20-25% de la población total, variando el porcentaje de prevalencia de acuerdo a la edad, región, ambiente (urbano o rural) y etnia. A nivel global se ha observado que los individuos con este síndrome tienen una probabilidad tres veces mayor de sufrir un daño coronario agudo o una enfermedad cerebrovascular y dos veces mayor la probabilidad de morir por estas causas que las personas que no lo padecen.

Específicamente, la población afroamericana tiene mayor predisposición para desarrollar este tipo de enfermedades, debido posiblemente a que su dieta es alta en grasa y carbohidratos, en especial de fructosa. A propósito de esto último, diferentes estudios han demostrado que la fructosa puede inducir síndrome metabólico (Jonson, et. al., 2007).

Diversas organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la NCEP-ATP III, el grupo Europeo para el estudio de resistencia a insulina (EGIR), la American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) y recientemente la Internacional Diabetes Federation (IDF) han propuesto una serie de criterios de diagnóstico para identificar pacientes con Síndrome Metabólico (Després, et. al., 2008)

TABLE 2. Current Clinical Definitions of the Metabolic Syndrome^{a,b}

WHO, ⁹ 1999	NCEP ATP III, ^{10,11} 2001	IDF, ¹² 2005
Insulin resistance, identified as	At least 3 of the following 5 criteria	Abdominal obesity, identified as
Type 2 diabetes mellitus	Waist circumference	Waist circumference
Impaired fasting glucose	Men ≥ 102 cm (≥ 40 in)	European men ≥ 94 cm (≥ 37 in)
Impaired glucose tolerance	Women ≥ 88 cm (≥ 35 in)	European women ≥ 80 cm (32 in)
Abnormal findings of hyperinsulinemic euglycemic clamp	Triglycerides ≥ 150 mg/dL ^c	Ethnicity-specific values for other groups
Plus any 2 of the following	HDL-C ^c	Plus any 2 of the following
Hypertension $\geq 140/90$ mm Hg	Men < 40 mg/dL	Triglycerides ≥ 150 mg/dL ^c
Plasma triglycerides	Women < 50 mg/dL	HDL-C
Men < 35 mg/dL or	Hypertension $\geq 130/85$ mm Hg ^c	Men < 40 mg/dL
Women < 39 mg/dL	Fasting glucose ≥ 100 mg/dL	Women < 50 mg/dL
BMI > 30 and/or		Blood pressure $\geq 130/85$ mm Hg
Waist:hip ratio		Fasting glucose > 100 mg/dL
Men > 0.9		
Women > 0.85		
Microalbuminuria		

^a BMI = body mass index; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; IDF = International Diabetes Federation; NCEP ATP III = National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III; WHO = World Health Organization.

^b SI conversion factors: To convert triglyceride value to mmol/L, multiply by 0.0113; to convert HDL-C value to mmol/L, multiply by 0.0259; and to convert glucose value to mmol/L, multiply by 0.0555.

^c Or taking medication for treatment of this risk factor.

Tabla1. Definiciones clínicas actuales del síndrome metabólico. Tomado de Blaha, et. al., 2008.

Estos criterios difieren dependiendo de cada organización pero en general se engloban los siguientes:

- ❖ Obesidad abdominal (Diámetro de la cintura: Hombres > 90 cm y Mujeres > 80 cm).
- ❖ Resistencia a Insulina
- ❖ Presión arterial $\geq 135/85$ mm Hg
- ❖ Glucosa en ayuno $\geq 100 \leq 125.9$ mg / dl.
- ❖ Triglicéridos séricos ≥ 150 mg / dl.
- ❖ Colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad (c-HDL) disminuido (Hombres ≤ 40 mg / dl y Mujeres ≤ 50 mg / dl)

La obesidad y la inactividad física son parte esencial en este síndrome, pero también existen factores secundarios que generan mayor susceptibilidad; estos incluyen desórdenes en el tejido adiposo (manifestados por la obesidad abdominal), factores genéticos, raciales y desórdenes endocrinos. El SM

puede desencadenar Diabetes Mellitus tipo 2 y futuras complicaciones vasculares (Blaha, et. al., 2008); algunos componentes de este síndrome pueden provocar hígado graso (Kotronen and Yki-Järvinen, 2007), apnea obstructiva del sueño, gota, depresión, daño musculoesquelético y síndrome del ovario poliquístico (Grund,2008). Otra complicación que pudiera ser desencadenada por el SM es cáncer de colon, páncreas, hígado, entre otros (Cowey y Hardy, 2006). Una persona con SM tiene el doble de riesgo de padecer daño aterosclerótico cardiovascular (Deprés, et. al., 2008).

Si bien se ha insistido en la existencia del SM en pacientes delgados, es probable que en la mayoría de los pacientes, la cascada de eventos se inicie con la adquisición de la obesidad central y luego se sumen múltiples factores de riesgo. Así, de no ser intervenido, el SM es una condición que empeora progresivamente con el aumento de la edad y con el incremento de peso. Diversos estudios han demostrado que el exceso de tejido adiposo intraabdominal es el responsable de los efectos dañinos de la obesidad y no el tejido adiposo subcutáneo abdominal (Deprés, 2006).

1.2 El consumo de fructosa

La nutrición representa un elemento en el estilo de vida que puede ser controlado y que influye directamente en la salud. Se ha demostrado que la comida alta en grasas saturadas induce ganancia de peso, resistencia a la insulina e hiperlipidemia (Romeieu, et. al., 1988), pero estudios recientes evidencian que un factor muy importante que contribuye a dañar la salud es el consumo de carbohidratos, particularmente de azúcares refinados y fructosa, las cuales tienen una clara relación con la aparición de SM

(Basciano, et. al., 2005). Una dieta alta en calorías influye sin duda en la aparición de SM.

La ingesta de fructosa se ha incrementado fuertemente debido a que la utilización del jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (HFCS, 55 a 90% de fructosa en su contenido) se ha disparado de forma alarmante. El HFCS es utilizado en la formulación de refrescos, jugos, comida empaquetada, cereales y algunos otros alimentos (Bray, et. a., 2004). En 1992, la USDA (United States Department of Agriculture) recomendó que sólo 40 gramos de azúcar fuera incluida en una dieta estandar de 2000 calorías, pero esta cantidad es la que se encuentra en sólo 350 ml de refresco. Esto representa un grave problema, porque mientras aumenta el consumo de estas bebidas, no se disminuye la ingesta calórica en el resto de la dieta para equilibrarla, y las personas no reducen sus porciones de alimento para poder tomar un refresco al día (Basciano, et. al., 2005).

El alarmante incremento del consumo de fructosa puede contribuir de manera importante en la obesidad y resistencia a la insulina que se presenta tanto en poblaciones jóvenes y adultas. Por muchos años, nuestra dieta solo contenía una pequeña cantidad de fructosa, por ejemplo; en las frutas y otros alimentos. La adaptación del hombre a dietas altas en glucosa y poca fructosa ha provocado que el metabolismo hepático de los carbohidratos sea utilizado para metabolizar fácilmente la glucosa con una limitada capacidad para metabolizar pequeñas cantidades de fructosa. El incremento en la utilización de endulzantes ricos en fructosa con respecto al pasado ha traído como consecuencia una considerable aumento en el consumo de fructosa en

la dieta diaria. Un gran flujo de fructosa en el hígado, provoca un disturbio en el metabolismo normal de los carbohidratos, incluida la glucosa.

Este monosacárido se absorbe con facilidad y es rápidamente metabolizada por el hígado, pero la exposición de este órgano a altas concentraciones de fructosa provoca la estimulación de la lipogénesis y la acumulación de triglicéridos, lo que contribuye a reducir la sensibilidad a la insulina y desarrollar resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Los efectos negativos a largo plazo de la fructosa, incluyen cambios en la digestión, absorción, niveles de hormonas en plasma (insulina, leptina), apetito y metabolismo hepático, culminando en diabetes, obesidad e inevitablemente daño cardiovascular (Moore, et. al., 2000).

En el hígado, la fructosa es metabolizada a gliceraldehido y dihidroxiacetona fosfato, estos productos en particular pueden entrar a la vía de la glicólisis. La fructosa puede entrar continuamente a glicólisis, por tanto, puede de forma incontrolable producir glicerol y porciones de moléculas de acil-glicerol. Estos sustratos en particular, podrían promover la producción de triglicéridos.(Mayes, et. al., 1993)

Se ha observado que el consumo crónico de fructosa reduce los niveles de adiponectina, la cual probablemente forma parte de un mecanismo que disminuye los ácidos grasos circulantes y aumenta la β -oxidación, lo que da como resultado final una disminución de triglicéridos en hígado y el aumento de la sensibilidad de la insulina; por lo tanto, la disminución de esta hormona puede contribuir a la resistencia a la insulina (Yamauchi, et. al., 2002).

1.2.1 *Cambios metabólicos asociados al consumo de fructosa*

La resistencia a la insulina ha sido asociada con las concentraciones altas en sangre del péptido-C, el cual forma parte de la pro-insulina. Se han realizado diversos estudios en donde se ha observado un aumento de esta molécula cuando se consume una dieta alta en fructosa lo cual se relaciona directamente con una mayor secreción de insulina, y una disminución en las concentraciones del mismo cuando se consume fibra (Wu, et. al., 2004).

La exposición crónica a la fructosa causa de forma indirecta hiperinsulinemia y obesidad. Un mecanismo propuesto para explicar este hecho tiene que ver con el GLUT-5, un transportador de fructosa que se sobreexpresa en ratas obesas, por tanto, es posible que el GLUT-5 esté involucrado en la patología del SM (Litherland, et. al., 2004).

Muchas evidencias sugieren que el incremento de ácidos grasos libres en pacientes diabéticos y en animales tratados con fructosa, juegan un papel importante en la resistencia a la insulina. Si los ácidos grasos libres no son removidos de los tejidos como ocurren en modelos animales de resistencia a insulina con alto consumo de fructosa, entonces hay un incremento en la secreción de triglicéridos. La resistencia a la insulina se ha relacionado con los niveles intracelulares de triglicéridos, que a su vez se involucran en lipotoxicidad y daño de las células beta (Basciano, et. al., 2005).

La insulina controla la expresión hepática de la proteína de unión al elemento regulatorio de esterol (SREBP), el cual es un factor de transcripción clave para la regulación de biosíntesis de ácidos grasos y colesterol (Shimano, et.al., 1999). La administración de fructosa en ratas provoca un aumento en

la expresión hepática de SREBP-1 y como consecuencia aumenta la síntesis de ácidos grasos (Shimizu, et. al., 2003)

El consumo de fructosa a largo plazo provoca cambios en el metabolismo de los lípidos, alterando la β -oxidación, esterificación y la liponeogénesis. En el hígado, el metabolismo de los lípidos se daña a nivel de dihidroxiacetona fosfato (Mayes, 1993).

Se sabe que el estado de resistencia a insulina desarrollado por la ingesta de fructosa está asociado con un aumento en la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en hígado. Una dieta alta en fructosa puede provocar un aumento de VLDL y de apolipoproteína B (apo B) en suero debido a una sobreproducción de lipoproteínas en hígado (Taghibiglou, et. al., 2000). Los triglicéridos séricos se elevan debido a un incremento en su secreción y una disminución en la eliminación de VLDL.

Una alta tasa de lipólisis en los depósitos de grasa visceral puede incrementar la disponibilidad de los ácidos grasos no esterificados y promover la síntesis hepática de triglicéridos. Los triglicéridos son empaquetados con apo B y se secretan como partículas de VLDL. El exceso en la secreción de VLDL da como resultado un incremento de ácidos grasos y triglicéridos en músculo y otros tejidos, lo que más adelante provocaría resistencia a insulina (Fried y Rao, 2003).

Otras observaciones afirman que los niveles de LDL aumentan cuando se presenta resistencia a insulina. Se ha encontrado que el tamaño de las partículas de LDL es inversamente proporcional a la concentración de triglicéridos y, por lo tanto, altas concentraciones de triglicéridos dan como

resultado partículas de LDL más pequeñas, densas y más aterogénicas, lo que contribuye a la morbilidad en los desordenes metabólicos asociados a la resistencia a insulina (Rainwater, et. al., 1999).

La combinación de algunos o todos estos factores que contribuyen a elevar los triglicéridos pueden estar relacionados con lo que se observa en los modelos de estudio para desordenes metabólicos donde se utiliza una dieta rica en fructosa. La fructosa consumida en grandes cantidades que estimula la secreción de VLDL, puede iniciar el camino hacia el SM y a la larga el desarrollo de diabetes tipo 2 (Zammit, et. al., 2001).

1.3 Oxidación de LDL

Otro importante factor de riesgo es la oxidación de LDL (ox-LDL), la cual activa los monocitos e incrementa su habilidad para infiltrarse por la pared vascular. Este incremento en la infiltración es un estado primario de aterogénesis (Cipolletta, et. al., 2005). Recientes estudios sugieren que la presencia de estrés oxidativo en el tejido adiposo es un primer paso para el desarrollo de SM (Furukawa, et. al., 2004).

Recientemente se ha empleado un modelo en ratón para el estudio del Síndrome Metabólico y su relación con la presencia de estrés oxidativo. Estos ratones tienen una deficiencia de leptina y de receptor para LDL (ob/ob, LDLR^{-/-}; double knockout [DKO] mice), son obesos y desarrollan hipetrigliceridemia, hipertensión, resistencia a la insulina y diabetes. Esta combinación de componentes del SM fue relacionada con el desarrollo acelerado de aterosclerosis debido a una acumulación de macrófagos asociada a disfunción endotelial que se pone en evidencia por un aumento en la expresión de las moléculas de adhesión celular VCAM-1 e ICAM-1 en la

aorta de los ratones DKO(Mertens, et. al.,2003). La acumulación de macrófagos fue asociada con un depósito de ox-LDL en la pared vascular, esto puede atribuirse parcialmente a un incremento en la producción de mieloperoxidasa por los macrófagos acumulados. Además el daño de la actividad antioxidante asociada a HDL en la sangre, se relacionó con la acumulación de más ox-LDL.

Al disminuir el peso de estos ratones, también se redujo la inflamación y el estrés oxidativo, finalmente estos cambios provocaron la inhibición de la aterosclerosis y el mejoramiento de la función cardíaca. La disminución de peso fue asociada con el incremento en la producción de la superóxido dismutasa (SOD), la cual previene la oxidación de LDL.

La inhibición de la aterosclerosis se debió a una disminución en la acumulación de macrófagos y en los depósitos de ox-LDL; esto como consecuencia de un mejoramiento del balance entre las enzimas pro-oxidantes y las antioxidantes en el tejido adiposo (Verreth, et. al., 2004).

1.4 Obesidad, inflamación y resistencia a la insulina

La obesidad se puede definir como un aumento en el porcentaje de grasa corporal total, por encima de un valor de índice de masa corporal (IMC > 26), que refleja a nivel celular un incremento en el número y/o tamaño de los adipocitos como consecuencia de dietas ricas en grasas y carbohidratos y del bajo consumo energético asociado al sedentarismo. Comprende toda una serie de mecanismos biológicos (genéticos, hormonales, inmunológicos, etc), psicológicos y sociales, que la hacen un fenómeno complejo (Pineda, 2008).

En los últimos años se le ha dado mucha importancia a la distribución del tejido adiposo más que a su volumen clasificándose en dos tipos:

- Obesidad androide, central o abdominal
- Obesidad ginecoide o glúteo-femoral

De estas dos, la obesidad abdominal, especialmente el cúmulo de tejido adiposo visceral abdominal es el que se encuentra relacionado con los efectos perjudiciales para la salud.

Se han realizado estudios en la biología de los adipocitos, inflamación subclínica y estrés oxidativo para entender el mecanismo original de cómo la obesidad y la resistencia a la insulina contribuye al SM (Dandona, et. al.,2005).

El tejido adiposo, particularmente el de la cavidad abdominal, es un poderoso órgano endócrino y es la principal fuente de ácidos grasos libres, presentando importante actividad de adipocinas como la adiponectina y citocinas proinflamatorias como la IL-6 y TNF- α .

La adiponectina es un péptido de producción adipocitaria, es pro-inflamatoria y está implicada en el metabolismo de los carbohidratos, incrementando la sensibilidad a la acción de la insulina y la captación periférica de glucosa, así como en el metabolismo lipídico, promoviendo la oxidación de los ácidos grasos y la actividad de la lipo-protein-lipasa. Los niveles de adiponectina, , disminuye en personas con obesidad abdominal (Shojare, et. al., 2009)

La interleucina 6, TNF α y proteína C reactiva son secretadas en mayor cantidad cuando hay obesidad abdominal y existe evidencia de que la concentración de algunos de estos mediadores proinflamatorios se relacionan con la presencia de eventos cardiovasculares y con el grosor de la íntima y

de la media en la arteria carótida, además de ser reconocidos como índices de progresión de la aterosclerosis (Dandona, et. al., 2005), esto contribuye a que se presente un estado inflamatorio, trombótico e hipertensivo (Després, et. al. 2008). La elevación de IL-6 podría tener un mayor peso específico que el resto de marcadores inflamatorios de la fisiopatología del Síndrome Metabólico, ya que por si sola, puede inducir resistencia a insulina, hipertensión arterial, dislipidemia, disfunción endotelial y un estado de procoagulabilidad (Omoigui, 2007).

Con la obesidad el tejido adiposo abdominal pierde la capacidad protectora debido a la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos, y si esto sumamos la disfunción endotelial, la resistencia a insulina y el sedentarismo de los pacientes provoca una acumulación de grasa en órganos como el hígado, corazón, músculo, páncreas y riñón (Després, et. al., 2008).

Cuando la cantidad de grasa almacenada en los adipocitos aumenta, se libera leptina, lo que constituye una señal que informa al hipotálamo que el cuerpo tiene bastante comida y que debe inhibir el apetito, en la obesidad los niveles de leptina están aumentados y esto trae como consecuencia la pérdida de sensibilidad en los centros de apetito que se encuentran en el hipotálamo. Por otro lado, la leptina estimula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células endoteliales y de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α , lo que contribuye al desarrollo de hipertensión (Yang y Barouch, 2007).

La insulina tiene un papel fundamental en la regulación de prácticamente todos los aspectos biológicos del adipocito. Esta hormona promueve el almacenamiento de triglicéridos dentro de la célula y favorece la

diferenciación del preadipocito a adipocito maduro, de igual manera la insulina incrementa la captura de los ácidos grasos dentro del adipocito, derivados de las lipoproteínas circulantes(Chávez-Tapia, et. al.,2004). Su efecto vasodilatador estimula la producción de óxido nítrico (NO) en el endotelio vascular para incrementar el flujo sanguíneo y aumentar la absorción de glucosa en el músculo esquelético.

La resistencia a insulina se define como la pérdida de la respuesta fisiológica de los tejidos periféricos a la acción de la insulina produciendo alteraciones metabólicas y hemodinámicas.

La excesiva ingesta calórica incrementa los niveles de ácidos grasos libres, los que generan resistencia a la insulina en el músculo al promover la fosforilación del IRS-1 en el aminoácido serina en lugar de que sea en tirosina, lo que se traduce en menor traslocación de los transportadores de glucosa (GLUT-4). Además los ácidos grasos libres también provocan inhibición de la acción de la insulina causando lipotoxicidad de las células β que traerá como consecuencia modificaciones en el perfil lipídico (Després, et. al.,2008) . En presencia de resistencia a la insulina, las células beta pancreática incrementará la secreción de insulina para intentar compensar el aumento de glucosa produciendo hiperinsulinemia. Si lo consigue se alcanzará la normogluceemia, pero con el tiempo este mecanismo compensador irá fallando y se producirá la intolerancia a la glucosa.

La dislipidemia presente en el SM se explica por un aumento de la síntesis hepática de triglicéridos (por la mayor disponibilidad de ácidos grasos libres y por la hiperinsulinemia), mayor secreción de lipoproteínas de muy baja

densidad (VLDL) y mayor catabolismo de las HDL con aumento de la excreción renal apo A1.

1.5 Disfunción endotelial e hipertensión

El endotelio vascular es el regulador primario de la homeostasis cardiovascular. Su función es mantener el tono vascular, regula la permeabilidad, controla la inflamación vascular e inhibe la proliferación celular del músculo liso. En el SM se presenta una disfunción endotelial (Polagruto, et. al., 2006), caracterizado por un decremento en la bioactividad y biodisponibilidad del NO lo que provoca alteración en la vasodilatación mediada por el flujo sanguíneo (Schoroeter, et. al., 2005).

La hipertensión y la hipercolesterolemia pueden activar algunos sistemas de enzimas proinflamatorias como la xantina oxidasa, la NADPH oxidasa y la mieloperoxidasa, cuya activación produce la formación de especies reactivas de oxígeno y otros radicales, lo que puede modificar la biodisponibilidad del NO y esto contribuye a la disfunción endotelial (Carr, et. al., 2000).

La hipertensión en el SM se presenta probablemente porque en este padecimiento se reduce la biodisponibilidad del NO debido al estrés oxidativo inducido por la obesidad, el NO tiene como función entre otras, la de regular la presión sanguínea cumpliendo el papel de vasodilatador, esto aunado con un incremento en la reabsorción de sodio debido a un aumento en la producción de angiotensinógeno, así como el efecto vasoconstrictor de los ácidos grasos libres y otras adipocinas, da como resultado el aumento en la presión arterial.

Numerosos estudios han demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en enfermedades que implican daño cardiovascular y es causado por la oxidación del cofactor de la NO sintetasa llamado tetrahidrobiopterina, lo que provoca el desacoplamiento de la enzima y la interrupción de su actividad por también se ha observado la presencia de un ambiente de tipo inflamatorio.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son pro inflamatorias y estimulan la migración de monocitos, así como la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, que contribuye al daño en la función del endotelio vascular. En base a esto, el exceso de ROS se asocia al proceso patológico de disfunción endotelial, que es un factor característico en la hipertensión.

1.6 Riesgo cardiovascular presente en el síndrome metabólico

Los pacientes con SM tienen un alto riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, pues la activación plaquetaria en arterias dañadas puede provocar la formación de trombos (Devaraj, et. al., 2004). Las plaquetas son activadas después de la adhesión al colágeno que queda expuesto y esto provoca la síntesis de agonistas solubles como el adenosin difosfato (ADP) y el tromboxano A₂ (TXA₂), los cuales inducen la agregación plaquetaria; por otro lado, aumentan los niveles de fibrinógeno que contribuye a la formación de coágulos, además disminuye la fibrinólisis por un incremento en los niveles del activador del inhibidor 1 del plasminógeno, recordando que el plasminógeno es un precursor de la plasmina, una enzima que se encarga de deshacer los coágulos. Los depósitos de fibrina y plaquetas taponan los

vasos sanguíneos resultando en manifestaciones clínicas como ataque al corazón y trombosis.

1.7 El riñón y el síndrome metabólico

Se ha reportado, que existe una asociación entre obesidad y daño crónico renal. Pacientes con obesidad mórbida desarrollan glomerulomegalia, La NHANES III (The Third National Health and Nutritional Examination Survey) reportó un incremento en el riesgo de daño crónico renal (definido como TFG < 60 mL/min/1.73 m² y/o microalbuminuria) en pacientes con SM diagnosticado de acuerdo a los criterios de la ATP III.(Mariam, et. al., 2009).

En 2009, Mariam et. al., realizaron un estudio en el que observaron cambios en el intersticio tubular o fibrosis y atrofia tubular en pacientes con SM; sin embargo, no se presentó hialinosis arteriolar, uno de los principales cambios que se observan en la Diabetes, también observaron anomalías en el glomérulo con un alto grado de glomerulosclerosis (Mariam, et. al., 2009).

En estudios con animales se ha visto que la hiperlipidemia induce fibrosis intersticial y atrofia tubular. El mecanismo por el cual el riñón se daña en estos modelos animales parece ser una combinación del estrés oxidativo, a través de el incremento de especies reactivas de oxígeno, efectos del factor profibrótico TGF- β (Transforming growth factor β), la quimiocina MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) y un incremento de miofibroblastos (Scheuer, et. al., 2000).

El papel que juega la hiperglicemia en daño del túbulo renal también ha sido estudiado, la tolerancia a la glucosa o la diabetes mellitus son reconocidos como estados proinflamatorios. Por otro lado, existe una molécula llamada

MDK (Neurite Growth-promoting Factor 2), un factor dependiente de ácido retinoico, expresado en el túbulo proximal, que se ha identificado como una molécula que juega un papel básico en la inflamación del intersticio tubular asociada con la nefropatía diabética (Sato, et. al.,2001). Los cambios en el intersticio también se han observado en pacientes con hipertensión, la angiotensina II es un regulador de la cinética de las células del túbulo intersticial en ratas hipertensas (Mariam, et. al.,2009). La angiotensina II ejerce sus efectos por medio de un incremento de especies reactivas de oxígeno y la desregulación de la oxido nítrico sintasa, es posible que el daño vascular de cómo resultado el daño en el túbulo intersticial.

La lesión del riñón en el SM se caracteriza por cambios microvasculares conocidas como esclerosis arterial y arteriolar. Existe evidencia de que el ácido úrico tiene un papel importante en el daño vascular en modelos de SM inducido por fructosa y en disfunción endotelial por inhibición de la producción del NO (Sánchez-Lozada, et. al., 2007).

1.8 El hígado graso

El hígado graso se presenta comúnmente como una manifestación del SM. Ciertos desórdenes metabólicos como obesidad, diabetes, hipertrigliceridemia e hipertensión están asociados frecuentemente con el hígado graso y estos también son componentes del SM (Marchesini, et. al., 2001). Como la resistencia a la insulina es el principal mecanismo en la patogénesis del SM, se ha propuesto como un factor inicial en el proceso del hígado graso no alcohólico, aunque algunos casos de hígado graso, no

llenar todos los criterios para diagnosticar Síndrome Metabólico y no presentan resistencia a insulina (Machado, et. al., 2005).

Por otro lado, se ha encontrado una correlación entre varios grados de esteatosis hepática (leve, moderada y severa) y el índice de masa corporal. De acuerdo a ciertos estudios, la obesidad puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis hepática (Willner, et. al.). Sin embargo, Uslusoy et. al., no observaron ninguna conexión entre el aumento del índice de masa corporal y la esteatosis y necroinflamación o fibrosis en casos de esteatohepatitis no alcohólica.

También se considera que la diabetes y la dislipidemia (especialmente hipertrigliceridemia y niveles bajos de HDL) afectan la histología del hígado.

Recientemente se sabe que el hígado graso no alcohólico puede ocurrir en pacientes no diabéticos, sin obesidad y a veces en niños y adolescentes.

Algunos pacientes con hígado graso no alcohólico inicialmente no tienen factores metabólicos de riesgo y los componentes del SM pueden aparecer durante el curso del daño. En estos pacientes aun no se ha definido el tiempo que transcurre después del diagnóstico de hígado graso no alcohólico para que aparezcan desórdenes metabólicos tales como hiperglicemia hipertensión e hiperlipidemia (Uslusoy, et. al., 2009).

1.9 Epicatequina

1.9.1 Historia del cacao

Uno de los primeros documentos que menciona la palabra cacao o chocolate, es una carta incluida en el segundo reporte de Hernán Cortés al Rey de España, en 1520. El cacao es nativo de América, fue usado en Mesoamérica y Sudamérica, aunque su uso fue más extenso en Mesoamérica.

La palabra cacao fue creada por la cultura Olmeca, y este término fue adoptado por la cultura Maya, fueron los Aztecas quienes utilizaron el Cacao como alimento y además como medicina. De acuerdo a los Mayas y a los Mexicanos, el cacao tenía un origen divino, incluso, los Mayas tenían al Dios del cacao "Ek Chuah".

El chocolate era utilizado por los Aztecas como tratamiento para enfermedades gástricas e intestinales y cuando el cacao se combinaba con un líquido de la corteza de la planta de algodón, se utilizaba para curar infecciones. La diarrea en niños, la fiebre, tos con flema y la debilidad también se curaba utilizando el cacao. En otros casos el chocolate era utilizado para mejorar el sabor de la medicina Azteca (Dillinger, et. al., 2000).

El cacao proviene de la planta llamada *Theobroma cacao* la cual crece en zonas tropicales por sus condiciones de humedad y de temperatura. En su composición el polvo de cacao contiene grasas, proteínas, teobromina, carbohidratos, pequeñas cantidades de vitaminas, minerales y flavonoides (Heiss, et. al., 2005)

1.9.2 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C9), compuestos por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico).

Los flavonoides están divididos en varias subclases (Figura 1) , el cacao es particularmente rico en epicatequinas y procianidinas (polímeros de catequinas y epicatequinas) (Ding, et. al. 2006).

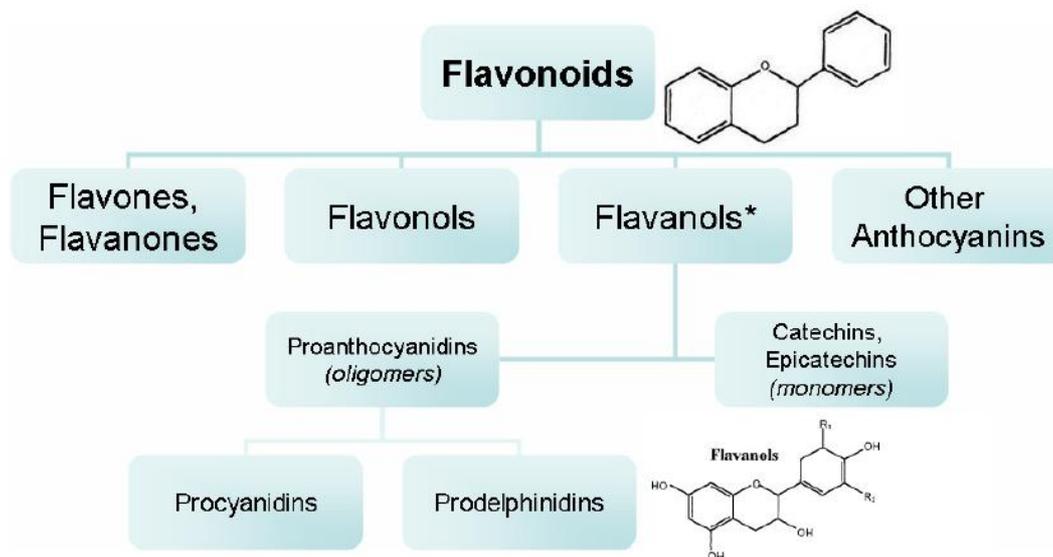


Figura 1. Clasificación de los flavonoides

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en frutas, verduras, semillas, plantas (arandano, *Gingko biloba*, cardo mariano), cerveza, vino tinto, té verde, te negro, soya, entre otros (Grassi, et. al.,2005), los cuales son consumidos en la dieta humana en forma habitual.

Los flavonoides desempeñan un papel importante en la fisiología vegetal; controlan los niveles de auxinas reguladoras de crecimiento y diferenciación de las plantas, presentan capacidad antifúngica y bactericida (Martínez-

Flores, et. al., 2002). Los flavonoides también pueden unirse a enzimas, proteínas transportadoras y ADN, por otro lado, son capaces de quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres (Hendrich, 2006).

1.9.3. Beneficios de los flavonoides

Los flavonoides han sido objeto de muchos estudios puesto que se les atribuyen gran cantidad de propiedades benéficas, por ejemplo, los flavonoides que contiene el chocolate han demostrado tener un potente efecto antioxidante en ensayos realizados *in Vitro* creando un ambiente artificial de estrés oxidativo (Osakabe, et. al., 2000). Las procianidinas tienen un poder antioxidante cincuenta veces superior al de la vitamina C (Fernández-Larrea, et. al., 2007). En otro estudio realizado *in vivo*, se demostró que la comida rica en flavonoides protege a los linfocitos humanos del daño oxidativo (Lean, et. al., 1999).

Los flavonoides pueden disminuir la lipoperoxidación en membranas biológicas. La epicatequina es capaz de incrementar los niveles de colesterol HDL y de disminuir la cantidad de colesterol LDL y protege de la oxidación a la LDL (Schroeter, et. al., 2001).

Diversos estudios demuestran que algunos flavonoides del chocolate, particularmente la catequina y la epicatequina, tienen un significativo efecto antiplaquetario similar al de la aspirina (Ding, et. al., 2006). En otro estudio encontraron una reducción en la activación plaquetaria en personas que consumían 100 g de chocolate oscuro, mientras que las que consumían chocolate blanco y chocolate con leche no presentaron este efecto (Innes, et.

al., 2003), probablemente la leche puede inhibir la absorción intestinal de los flavonoides.

A los flavonoides contenidos en el chocolate, también se les han demostrado la capacidad para mejorar la función endotelial, incrementando la producción de NO (Benito, et. al., 2002).

Se ha comprobado la capacidad de los flavonoides de cacao para aumentar la expresión de la eNOS (Karim, et. al., 2000) inhibir la oxidación de óxido nítrico a peroxinitrito (Prior y Squadrito, 1995) y aumentar la biodisponibilidad del óxido nítrico. Esto contribuye a mejorar la presión sanguínea debido a que el óxido nítrico es un vasodilatador, además de disminuir el estrés oxidativo, mejorar la función endotelial y aumenta la sensibilidad de la insulina.

El consumo de chocolate con alto contenido de procianidinas puede bajar significativamente los niveles de leucotrienos los cuales son potentes vasoconstrictores, agentes proinflamatorios y estimulantes de agregación plaquetaria; por otro lado, también se observa un incremento en los niveles de prostaciclina (vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria) (Ding, et. al., 2006).

Los polifenoles de la cocoa han demostrado tener capacidad anti-inflamatoria, reduciendo la expresión de la interleucina 2 (IL-2), particularmente las procianidinas reducen los efectos inflamatorios de citocinas como IL-5, TNF- α y TGF- β . (Susuki, et. al., 2009)

Se sabe que el chocolate tiene mayor proporción de flavonoides que el vino tinto y el té verde. Se estima que una barra de 100 gramos de chocolate contiene 170 mg de flavonoides, de los cuales el que se encuentra en mayor proporción es la epicatequina. (Ding, et. al., 2006).

Por ser la epicatequina el compuesto de mayor proporción en el cacao, se cree que todas sus propiedades benéficas se deben a éste, es por eso que en este trabajo se propone como alternativa de tratamiento para el Síndrome Metabólico.

2. JUSTIFICACION

La prevalencia del Síndrome Metabólico va en aumento acelerado a nivel mundial; así como el incremento del porcentaje de personas con obesidad, por tanto es de suma importancia la búsqueda de alternativas que permitan la prevención y el tratamiento de dicho padecimiento, el cual debe ser complementado con un cambio en el estilo de vida.

3. HIPÓTESIS

Dado que la epicatequina a demostrado actividad antihipertensiva, antioxidante, antiplaquetaria, entre otras; su administración contrarrestará o disminuirá las complicaciones causadas por este Síndrome.

4. OBJETIVO GENERAL

Observar los efectos de la epicatequina sobre el Síndrome Metabólico inducido en ratas con una dieta hipercolesterolémica y fructosa.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Inducir el Síndrome Metabólico en ratas Wistar por medio de una dieta hipercolesterolémica y la administración de una solución de fructosa al 60 %.
- ❖ Observar los efectos de la epicatequina sobre:
 - Presión arterial
 - Perfil lipídico
 - Glucosa
 - Estrés oxidativo
 - Daño endotelial
 - Resistencia a la insulina

5. METODOLOGIA

5.1 Animales de experimentación

Para este trabajo se utilizarán ratas Wistar macho de 200 ± 20 gramos de peso, los animales serán mantenidos a una temperatura controlada de $22 \pm 1^{\circ}$ C y con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. La comida y el agua estuvo disponible ad libitum.

5.2 Grupos de estudio

Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 5 grupos de estudio como se describe a continuación:

Grupo 1: Testigo (dieta estándar + vehículo) (**Testigo**)

Grupo 2: Epicatequina (dieta estándar + epicatequina 1mg/kg de peso)
(Epic)

Grupo 3: Síndrome Metabólico (dieta hipercolesterolémica + fructosa al 60%)
(SM)

Grupo 4: Síndrome Metabólico + epicatequina (1 mg/kg de peso) durante la inducción **(SM + Epic)**

Grupo 5: Síndrome Metabólico + epicatequina (1mg /kg de peso) por 10 días después de la inducción **(SM + Epic (10d))**

5.3 INDUCCION DEL SINDROME METABÓLICO

La inducción del Síndrome Metabólico se llevó a cabo durante 7 semanas con la administración diaria de una solución de fructosa al 60% en agua destilada, la cual fue administrada vía intragástrica, además se utilizó una dieta hipercolesterolémica que contiene:

- ❖ Colesterol1%
- ❖ Acido cólico.....0.5%
- ❖ Mantequilla.....5%
- ❖ Azúcar glass.....30%
- ❖ Caseína.....10%
- ❖ Alimento estándar...53.5%

5.4 TOMA DE MUESTRA

El tipo de muestra que se utilizó en este proyecto fue sangre, la cual se obtuvo vía punción retroorbital, la sangre se dividió en dos porciones para separar suero y plasma, y se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos. Para separar el plasma se utilizó 5µl de heparina y una temperatura de 4°C. Las muestras se congelaron a -70°C hasta su utilización.

La toma de muestra ocurrió en tres ocasiones, a todos los grupos se les tomó una medida basal al día 0 del experimento, a todos los grupos se les tomó una muestra intermedia a la tercera semana de inducción del Síndrome, esto con la finalidad de saber si efectivamente el Síndrome se inducía de manera exitosa en los grupos que así lo ameritaban. Posteriormente, al final de la inducción (séptima semana) se tomó otra muestra a todos los grupos para comprobar la inducción completa del Síndrome Metabólico.

Al grupo 5 se le tomó otra muestra al final el tratamiento de 10 días con epicatequina y a los grupos 1 y 3 también se les tomó muestra esa misma fecha.

5.5 Parámetros bioquímicos

5.5.1. Glucosa, perfil lipídico e insulina

La obtención de parámetros como glucosa, colesterol total, triglicéridos y HDL se realizó de manera automatizada utilizando el equipo Selectra 2 . Los valores de LDL se obtuvieron con la siguiente fórmula:

$$\text{LDL} = (\text{colesterol total} - \text{HDL}) - (\text{triglicéridos} \times 0.45)$$

Los niveles de insulina fueron medidos con la utilización del kit RIA ELISA.

5.5.2. *Presión arterial*

El método de Tail-Cuff fue utilizado para medir la presión arterial de las ratas y consiste en lo siguiente:

Los animales se sometieron a un período de adaptación previo a la toma de la presión:

1. Día 1: los animales se introdujeron a un cepo por media hora, alternando con media hora fuera de ella. Este procedimiento se replicó cinco veces en el mismo día.
2. Día 2: se repitió el mismo procedimiento que el día anterior, pero ahora, se realizó en un cuarto oscuro, en donde por medio de un equipo de calefacción se eleva la temperatura aproximadamente a 27°C.
3. Día 3: sumado a lo anterior, se agregaron períodos de presión constante en la cola de la rata con el manguito de látex, para adaptarlo a los cambios de presión.

Posteriormente al periodo de adaptación se procedió a la medición de la presión arterial. Esta se realiza en un cuarto oscuro y aislado de ruido. Se mantuvo una temperatura interior de aproximadamente 27°C con un equipo de calefacción.

Antes de medir la presión arterial, cada rata se colocó bajo un foco de 200W a una distancia de 30 cm por 2 minutos. Posteriormente se introdujo en un cepo especial para dejar libre la cola y colocar un manguito de látex acoplado distalmente a un sensor óptico que registrará el pulso en la arteria caudal. El manguito se infla mediante un esfigmomanómetro electrónico acoplado a una

columna de mercurio graduada hasta interrumpir la circulación de la cola, posteriormente se desinfla de manera gradual y constante, hasta obtener el registro de frecuencia cardiaca y presión arterial sistólica, diastólica y media. De cada animal se obtubieron tres registros de la presión, tomando estas lecturas cuando la frecuencia cardiaca de la rata se estabilice.

5.5.3 Determinación de proteínas (método de lowry)

Reactivos

- A. Solución de NaCO_3 al 2% y tartrato de sodio al 0.02% en NaOH 0.1 N
- B. Solución de CuSO_4 al 0.5% en agua destilada
- C. Solución cuproalcalina: 50 mL de la solución A con 1 mL de la solución B. Se prepara al momento de usarse.
- D. Reactivo de Folin. Diluido en una proporción de 1:1 en agua destilada
- E. Solución estándar. Albúmina bovina de 0.3 mg en 1 mL de agua destilada.

Curva tipo

TUBO	ALBÚMINA SÉRICA BOVINA $\mu\text{L} = \text{mg}$		μl de H_2O bidestilada	ml de Soln. C	μl de Soln. D
1	-	-	250	1	100
2	50	0.015	200	1	100
3*	100	0.03	150	1	100
4	150	0.045	100	1	100
5	200	0.06	50	1	100
6	250	0.075	-	1	100

**

* Tratamiento que se le da a las muestras las cuales deben estar diluidas 1:100.

** Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

*** Mezclar e incubar 45 minutos a temperatura ambiente

Pasado este tiempo se tomarán las lecturas a 550 nm.

5.5.4. Determinación de carbonilos

TUBO	PLASMA (mL)	DNPH 10 M (mL)	HCl 2.5 M (mL)
Blanco	50	-	500
Problema	50	500	-

* Para cada muestra se realiza un blanco.

1. Incubar 1 hora a oscuras, agitando cada 15 minutos
2. Agregar 1 ml de TCA al 10%
3. Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm
4. Tirar el sobrenadante (queda una pastilla)
5. Agregar 1 ml de TCA al 5 % y disolver la pastilla
6. Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm
7. Tirar el sobrenadante (queda una pastilla)
8. Agregar 2 ml de la solución de extracción etanol-acetato de etilo y disolver la pastilla
9. Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm
10. Retirar el sobrenadante y secar perfectamente las pastillas
11. Disolver la pastilla en 1 ml de Guanidina
12. Incubar 10 minutos a 37°C
13. Leer a 375 nm, utilizando guanidina para calibrar

14. Restar la absorbencia del tubo blanco a la del problema y multiplicarlo por el factor que es 45.45

5.5.5. Determinación de nitritos

- ❖ 250 μ L de la muestra + 30 μ L de *Escherichia coli* 1775
- ❖ Incubar 1 hora a 37° C a 100 r.p.m.
- ❖ Tomar 250 μ L del sobrenadante en la celda de lectura
- ❖ Agregar 50 μ L de Sulfanilamida
- ❖ Agregar 50 μ L de N-naftiletilendiamida
- ❖ Agitar por 30 segundos
- ❖ Leer a 554 nm

5.6 Curva de tolerancia a la glucosa

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó al final del experimento en todos los grupos de estudio. Después de 12 horas de ayuno, los niveles de glucosa en sangre fueron medidos por medio de un glucómetro, inmediatamente después de tomar las medidas basales, se les administró a las ratas vía intragástrica, una solución de glucosa (3.5 g/kg de peso). Los niveles de glucosa fueron medidos a los 30, 60, 120 y 150 minutos a partir de la administración. La muestra de sangre para estas medidas se obtuvo cortando la punta de la cola de las ratas.

5.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con la ayuda del programa Sigma Stat. La comparación de los resultados obtenidos se realizó con la prueba de ANOVA RM bifactorial. Las diferencias significativas se consideraron cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Comportamiento del peso con respecto al tiempo

En la figura 2 se muestra la ganancia de peso a través del tiempo de todos los grupos de estudio, el grupo testigo normal y el de epicatequina (Epic), muestran un comportamiento similar, la ganancia de peso en el grupo testigo de síndrome metabólico (SM) si muestra un aumento significativo del peso final con respecto al peso inicial los animales de ese grupo y con respecto a los grupos testigo.

En el grupo de SM + epicatequina (10 días) se observó una disminución del peso corporal al termino del tratamiento con epicatequina (dato no mostrado en la figura, 384.14 ± 7.6 g).

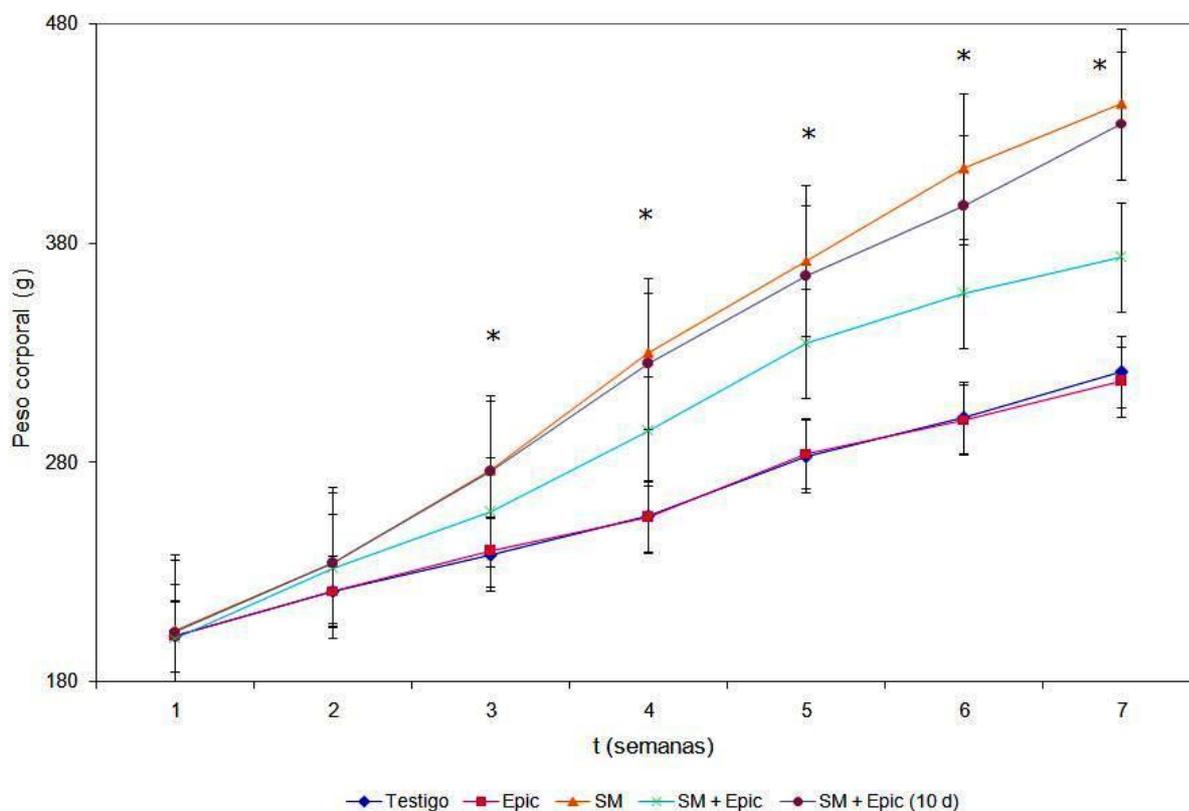


Figura 2. Peso corporal de los animales durante las siete semanas de inducción. Se muestra la media \pm desviación estándar. * diferencia significativa con respecto al grupo testigo. $p < 0.05$.

6.2. Tolerancia a la glucosa

En el grupo de SM se observa un daño de la tolerancia a la glucosa puesto que los niveles de glucosa en sangre a través del tiempo se mantienen elevados y no disminuyen como ocurre en los demás grupos (Figura 3)

La glucosa al tiempo 0 del grupo de SM es significativamente mayor que la de los grupos testigo y Epic, al minuto 60, los niveles de glucosa llegan a su nivel más alto en todos los grupos.

En los grupos de SM + Epic y SM + Epic (10 d) los niveles de glucosa sí disminuyen aunque no regresan a su valor original.

6.3. Parámetros bioquímicos

Los grupos testigo no mostraron diferencia significativa en los niveles de colesterol total, triglicéridos, HDL- colesterol y LDL- colesterol durante el tiempo que duró el estudio. Sin embargo, en el resto de los grupos, el perfil lipídico sí mostró cambios significativos, el colesterol total aumento significativamente en las determinaciones intermedias del grupo testigo de Síndrome metabólico con respecto a las de los testigos con dieta estándar, el nivel final de colesterol total del grupo de Síndrome metabólico fue de 59.8 ± 2.4 , significativamente más alto que los grupos testigo (tabla 2). El mismo comportamiento se observa en los niveles de Triglicéridos y LDL- colesterol (Tablas 3 y 4).

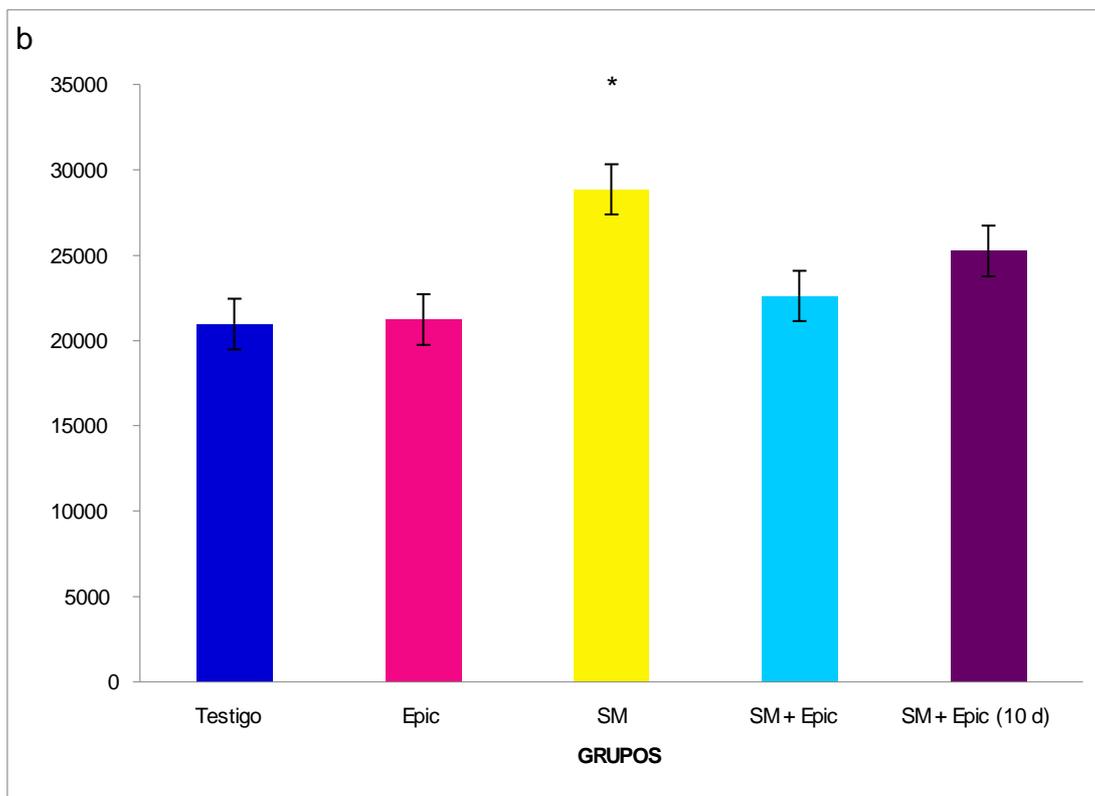
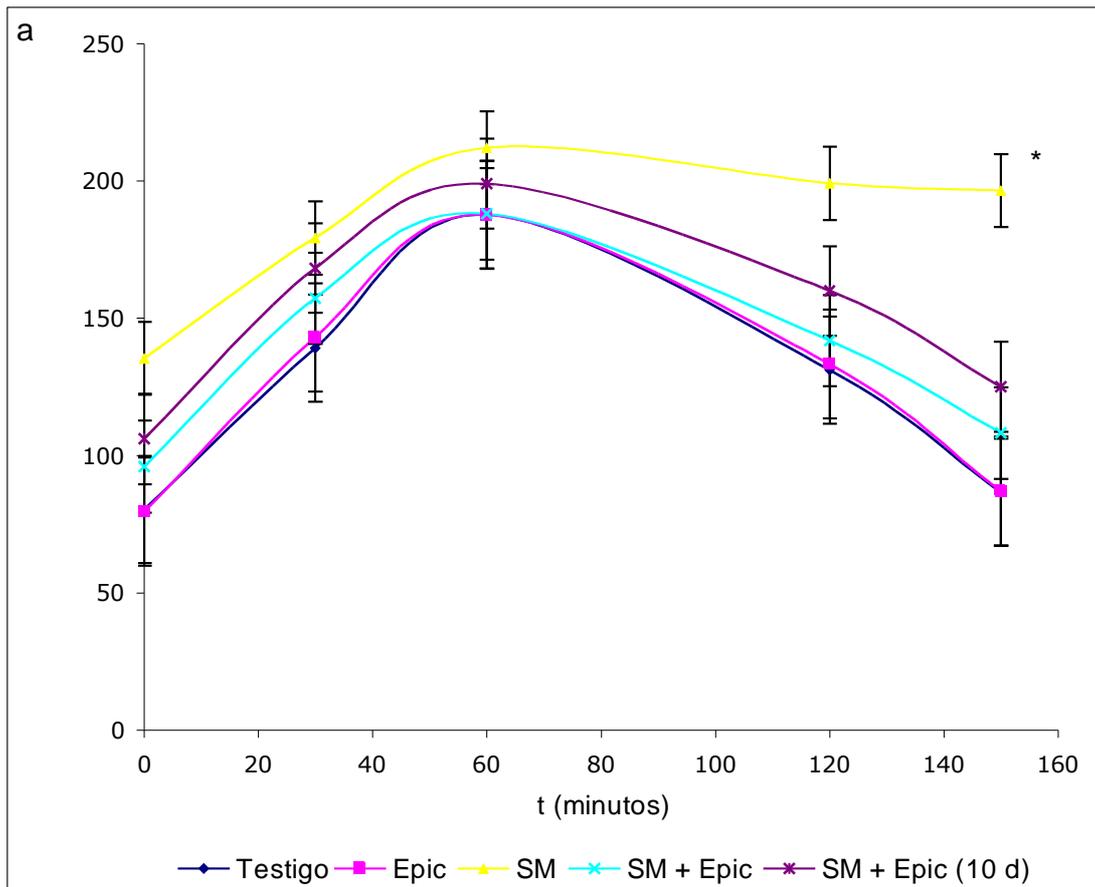


Figura 3. Efecto de la administración de fructosa + dieta hipercolesterolémica sobre la tolerancia a la glucosa **a)** Curva de tolerancia a la glucosa **b)** área bajo la curva. *Diferencia significativa con respecto al testigo. $p < 0.05$

Tabla 2. Efecto de la epicatequina sobre el colesterol total (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

GRUPOS	TIEMPO		
	BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	18.5 ± 1.85	19.3±0.89	19.1±1.13
Epicatequina	18.7±1.11	19.1±0.7	19.0 ± 0.816
síndrome metabólico (SM)	18.8 ± 1.2	35.7±1.32 ^{a,c,d}	59.8±2.4 ^{a,b,c,d}
SM + epic (1mg/kg)	18.6±1.67	38.0±1.22 ^{c,d,e}	25.78±2.7 ^{c,d,e}

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

Tabla 3. Efecto de la epicatequina sobre triglicéridos (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

GRUPOS	TIEMPO		
	BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	0.7±0.18	0.7±0.16	0.8±0.16
Epicatequina (1 mg/kg)	0.7 ± 0.15	0.7 ± 0.19	0.80 ± 0.11
síndrome metabólico (SM)	0.8±0.18	2.6±0.20 ^{a,c,d}	3.0±0.14 ^{a,b,c,d}
SM + epic (1mg/kg)	0.8±0.17	1.6±0.19 ^{c,d,e}	1.3±0.21 ^{c,d,e}

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

Tabla 4. Efecto de la epicatequina sobre el colesterol-LDL (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

GRUPOS	TIEMPO		
	BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	4.61±1.65	5.3±0.7	5.16±1.1
Epicatequina (1 mg/kg)	4.7±1.2	5.1±0.71	4.96±0.97
síndrome metabólico (SM)	4.83±1.28	23.88±1.26 ^{a,c,d}	50.13±2.62 ^{a,b,c,d}
SM + epic (1mg/kg)	4.51±1.6	25.69±1.15 ^{c,d}	12.77±2.79 ^e

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

Los niveles de HDL- colesterol mostraron una disminución estadísticamente significativa con respecto a los testigos en las determinaciones finales (tabla 5).

El grupo al cual se le administró la epicatequina (1 mg / kg de peso) durante todo el tiempo que duró la inducción del Síndrome (7 semanas) mostró una diferencia significativa en sus valores intermedios de colesterol y triglicéridos con respecto a los del testigo con dieta estándar y el de Síndrome metabólico (tabla 2 y 3). Las HDL-colesterol y las LDL-colesterol solo mostraron diferencia significativa contra los grupos testigo. Al analizar los valores finales de este grupo encontramos una disminución significativa de los parámetros del perfil lipídico, salvo la HDL-colesterol que aumento también de forma significativa (Tabla 4 y 5).

Tabla 5. Efecto de la epicatequina sobre el colesterol-HDL (mmol/l) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolemica y fructosa

GRUPOS	TIEMPO		
	BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	13.4±0.37	13.5±0.41	13.6±0.43
Epicatequina (1 mg/kg)	13.7±0.32	13.7±0.17	13.7±0.27
síndrome metabólico (SM)	13.6±0.15	10.6±0.21	8.3±0.23 ^{a,c,d}
SM + epic (1mg/kg)	13.7±0.25	11.6±0.2 ^{c,d}	12.4±0.23 ^e

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

La presión sistólica también presentó cambios estadísticamente significativos, tal es el caso de los niveles intermedios del grupo de síndrome metabólico, que aumentaron significativamente con respecto a la medida basal del mismo

grupo y a las intermedias de los grupos testigo. Las medidas finales también presentan diferencia significativa.

En el grupo tratado con epicatequina durante toda la inducción, hay una disminución significativa en los niveles de presión sistólica intermedia y final comparada con el testigo de síndrome metabólico (tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la epicatequina sobre la presión sistólica (mm Hg) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

GRUPOS	TIEMPO		
	BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	111.9±2.1	111.6±1.59	111.9±1.72
Epicatequina (1 mg/kg)	111.7±1.03	112.5±0.84	112.5±1.05
síndrome metabólico (SM)	112.3±1.9	126.4±2.07 ^{a,c,d}	144.7±2.3 ^{a,b,c,d}
SM + epic (1mg/kg)	113.9±1.45	118.1±1.05 ^{c,d,e}	119.5±0.88 ^{c,d,e}

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

Los carbonilos fueron estadísticamente menores en este grupo con respecto al grupo de síndrome metabólico aunque también presentan diferencia significativa con los testigos. La determinación de grupos carbonilo para el testigo de síndrome metabólico mostró un aumento significativo comparado con los testigos, además los niveles intermedios son mayores a los basales y los finales son mayores a los intermedios, ambos significativamente (tabla 7).

Tabla 7. Efecto de la epicatequina sobre el nivel de carbonilos (mmol/mg de proteína) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

GRUPOS	TIEMPO		
	BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	8.25±0.207	8.225±0.128	8.25±0.05
Epicatequina (1 mg/kg)	8.17±0.15	8.34±0.151	8.37±0.15
síndrome metabólico (SM)	8.38±0.199	9.8±0.187 ^{a,c,d}	13.16±0.296 ^{a,b,c,d}
SM + epic (1mg/kg)	8.28±0.233	9.22±0.228 ^{c,d,e}	8.92±0.18 ^{c,d,e}

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

Una disminución significativa se observó en los niveles de nitritos del grupo testigo de síndrome metabólico en su medidas intermedias y finales con respecto a los testigos, por otro lado hubo un aumento significativo en los niveles de nitritos intermedios y finales del grupo tratado con epicatequina durante las siete semanas de inducción(tabla 8).

Tabla 8. Efecto de la epicatequina sobre los nitritos (mmol/mg de proteína) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

GRUPOS	TIEMPO		
	BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	0.0102±0.003	0.0092±0.0007	0.0103±0.0013
Epicatequina (1 mg/kg)	0.013±0.002	0.0136±0.003	0.014±0.0017
síndrome metabólico (SM)	0.0096±0.0012	0.0069±0.0008 ^{a,c,d}	0.005±0.001 ^{a,b,c,d}
SM + epic (1mg/kg)	0.0108±0.003	0.009±0.0008 ^e	0.0106±0.0013 ^e

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

En la tabla 9 se muestran los niveles de glucosa de todos los grupos al inicio a las 3 semanas de inducción y al final del tratamiento respectivo, también se observan los niveles de insulina los cuales se tomaron únicamente al final del experimento para todos los grupos. En el grupo de síndrome metabólico, la glucosa es mayor estadísticamente con respecto a los testigos para las determinaciones intermedias y finales, mientras que una disminución significativa se observó en el grupo de SM + epic con respecto al testigo de síndrome metabólico. La insulina fue significativamente mayor en el grupo testigo de síndrome metabólico con respecto al testigo normal y de

epicatequina. Esta hormona también presentó diferencia significativa en el grupo tratado con epicatequina contra el grupo de síndrome metabólico (Figura4).

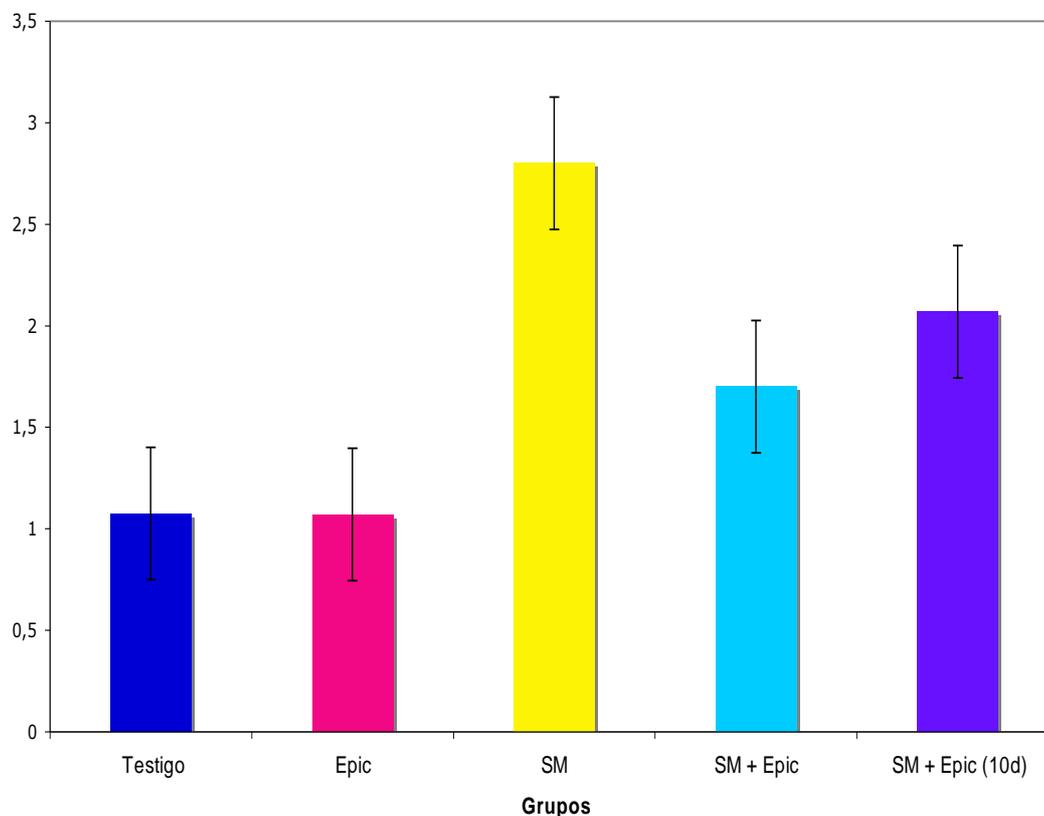


Figura 4. Efecto de la epicatequina sobre la insulina (ng/ml) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

Tabla 9. Efecto de la epicatequina sobre la glucosa (mg/dl) e insulina (ng/ml) en ratas con síndrome metabólico inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa

GRUPOS	PARAMETRO	TIEMPO		
		BASAL	INTERMEDIO	FINAL
Testigo	Glucosa	76.8±2.78	77.3±2.8	77.7±3.01
	Insulina			1.1 ± 0.15
Epicatequina	Glucosa	82.6±9.1	82.9±8.0	83.1±7.82
	Insulina			1.1 ± 0.26
Síndrome metabólico	Glucosa	84.1±8.3	105.1±3.79 ^{a,c,d}	141.1±2.31 ^{a,b,c,d}
	Insulina			2.8 ± 0.19 ^{c,d}
SM + epic (1mg/kg)	Glucosa	82.4±7.48	101.4±2.87	95.3±3.4 ^{c,d,e}
	Insulina			1.7 ± 0.15 ^e

Se presenta la media±desviación estándar. ^a diferencia significativa con respecto al basal de cada grupo. ^b diferencia significativa con respecto al intermedio de cada grupo. ^c diferencia significativa con respecto al testigo. ^d diferencia significativa con respecto al grupo de epicatequina. ^e diferencia significativa con respecto al testigo de síndrome metabólico. p<0.05

Los resultados del grupo tratado con epicatequina (1mg/kg de peso) al final de la inducción durante 10 días, se muestran en la tabla 10, recordemos que en este grupo se analizaron los parámetros clínicos a la semana 0, semana 7 y al término del tratamiento de 10 días.

En los valores de la semana 2 de este grupo, se observó un aumento significativo con respecto al testigo en la mayoría de los parámetros analizados, solo el colesterol HDL y los nitritos disminuyeron también de forma significativa. Al término del tratamiento con epicatequina se observa una disminución significativa del colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, presión sistólica, glucosa y carbonilos. Los niveles del colesterol HDL y nitritos presentaron un aumento significativo.

Para este grupo los niveles de insulina en sangre fue de 2.1 ± 0.12 ng/ml y comparado con el del grupo de SM (2.8 ± 0.19 ng/ml) es significativamente menor.

Tabla 10. Efecto del tratamiento de 10 días con epicatequina (1mg/kg de peso) en ratas con síndrome metabólico

PARAMETRO	TIEMPO	GRUPOS	
		Testigo	SM + Epic 10 días
Colesterol (mmol/l)	Semana 0	18.5 ± 1.85	17.8 ± 1.7
	Semana 7	19.1 ± 1.13	66.6 ± 1.94 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		30.2 ± 2.82 ^b
Triglicéridos (mmol/l)	Semana 0	0.7 ± 0.18	0.8 ± 0.16
	Semana 7	0.8 ± 0.16	2.8 ± 0.17 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		1.9 ± 0.16 ^b
Colesterol LDL (mmol/l)	Semana 0	4.61 ± 1.65	3.78 ± 1.51
	Semana 7	5.16 ± 1.1	56.98 ± 1.78 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		18.73 ± 2.7 ^b
Colesterol HDL (mmol/l)	Semana 0	13.4 ± 0.37	13.6 ± 0.22
	Semana 7	13.6 ± 0.43	8.3 ± 0.12 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		10.6 ± 0.2 ^b
Presión sistólica (mm Hg)	Semana 0	111.9 ± 2.1	113 ± 1.2
	Semana 7	111.9 ± 1.72	145.3 ± 1.58 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		126.8 ± 2.22 ^b
Carbonilos (mmol/mg prot.)	Semana 0	8.2 ± 0.21	8.3 ± 0.21
	Semana 7	8.2 ± 0.05	13.1 ± 0.23 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		10.7 ± 0.33 ^b
Nitritos (mmol/mg prot.)	Semana 0	0.0102 ± 0.003	0.012 ± 0.002
	Semana 7	0.0103 ± 0.0013	0.0049 ± 0.0009 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		0.008 ± 0.001 ^b
Glucosa (mg/dl)	Semana 0	76.8 ± 2.78	84.8 ± 3.65
	Semana 7	77.7 ± 3.01	151.4 ± 6.48 ^{a,c}
	Semana 7 + 10d		105.6 ± 3.24 ^b

. ^a diferencia significativa con respecto a la semana 0, ^b diferencia significativa con respecto a la semana 7, ^c diferencia significativa con respecto al grupo testigo. p<0.05.

7. DISCUSION

7.1 Inducción del síndrome metabólico con fructosa

El incremento en la ingesta calórica y en el consumo de carbohidratos refinados, aunado a la inactividad física han dado como resultado una incidencia alarmante de individuos con SM, con este trabajo se pretende buscar alternativas que contribuyan a disminuir estos índices de frecuencia de este padecimiento. La inducción del SM con fructosa en ratas es un modelo muy utilizado para tratar de dilucidar los mecanismos involucrados en este síndrome, existen muchos estudios que han confirmado que la sacarosa (particularmente la fructosa) puede inducir algunos factores presentes en el SM.

La dieta hipercolesterolémica y la administración de una solución de fructosa al 60% durante 7 semanas que utilizamos para inducir el síndrome, resultó ser un buen método para provocar SM en ratas Wistar.

En el grupo testigo de SM, se observa un aumento en colesterol total, triglicéridos, LDL colesterol, presión sistólica, glucosa y carbonilos desde la tercer semana de inducción, lo cual no indica que el SM se estaba induciendo correctamente, a la séptima semana, estos mismos parámetros aumentaron de manera franca y significativa estadísticamente. En cuanto a los niveles de HDL-colesterol y nitritos, observamos una disminución también significativa en este mismo grupo, lo que indica la presencia de daño en el perfil lipídico y daño endotelial en estos animales.

Existen diversas teorías del mecanismo por el cual la fructosa induce SM. La fructosa entra a los hepatocitos y otras células como adipositos y epitelio intestinal donde es metabolizada por la fructosinasa la cual utiliza ATP para fosforilar a la fructosa en fructosa 1-fosfato, esta enzima al ser poco regulada, puede fosforilar rápidamente la fructosa, agotar el ATP y acumular AMP lo cual estimula la AMP desaminasa para dar paso a la síntesis de ácido úrico. Altas concentraciones de ácido úrico se relacionan con hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a insulina e hipertensión(Nakagawa, et. al., 2006). El ácido úrico induce estrés oxidativo en adipositos dando como resultado un daño en la secreción de adiponectina (Sautin, et. al.).

El mecanismo por el cual el ácido úrico causa estos efectos puede estar relacionado con una disminución en las concentraciones de óxido nítrico y por lo tanto hay disfunción endotelial. La reducción de los niveles de óxido nítrico provoca una vasoconstricción intrarrenal, daño en la microvasculatura renal y finalmente una hipertensión sistémica.

7.2 Efecto de la epicatequina sobre el SM

Durante el tiempo que duró el estudio, llevamos a cabo el seguimiento de los pesos de todos los animales y encontramos un aumento significativo del peso en las ratas con SM a partir de la cuarta semana de inducción con respecto a los grupos testigo.

En el grupo que fue tratado con epicatequina (1mg/kg de peso) a la par de la inducción, se observan efectos benéficos sobre todos los parámetros analizados.

En el caso del perfil lipídico, se observa una disminución significativa en los niveles de colesterol total, LDL y triglicéridos, así como un aumento también

significativo de HDL-colesterol. En el grupo con tratamiento de epicatequina durante 10 días después de la inducción, también se observan estos efectos que aunque son estadísticamente significativos, no son tan marcados como en el grupo anterior. El mecanismo de cómo la epicatequina puede contribuir al mejoramiento en los niveles de colesterol no es muy claro.

En un estudio realizado por Mursu et. al. observaron un incremento en los niveles séricos de HDL en individuos saludables, no fumadores a los cuales se les dió una dosis diaria de 75 gramos de chocolate negro y chocolate con alto contenido de polifenoles durante 3 semanas.

Mahbubeh, et. al. realizaron un estudio en conejos a los cuales se les dio una dieta alta en colesterol durante dos meses, además de esta dieta, se les administró vía intragástrica jugo de manzana, al final observaron una disminución significativa del colesterol total, triglicéridos y LDL-colesterol y un aumento también significativo de HDL- colesterol en los animales tratados con jugo de manzana. Este efecto es atribuido a los flavonoides contenidos en la manzana.

En algunos estudios, bajos niveles de colesterol-HDL se asocian con un riesgo mayor de muerte por daño cardiovascular y el incremento del colesterol- HDL ha demostrado tener un efecto ateroprotector (Peter, et.al., 1988)

Algunos autores sugieren que las catequinas inhiben la absorción intestinal del colesterol, haciendo que el colesterol unido a la catequina co-precipite y se convierta en formas insolubles que no pueden ser absorbidas por el intestino(Osakaba, et.al., 2007).

Por otro lado, se propone que las catequinas inhiben la actividad de las lipasa pancreática, evitando así la absorción de grasas en el intestino (Juhel, et.al.,2000).

La presión sistólica en las ratas tratadas con epicatequina a la par de la inducción, es menor significativamente con respecto al grupo de síndrome metabólico, de igual forma el efecto benéfico de la epicatequina se observó , aunque en menor grado pero estadísticamente significativo, en los animales tratados 10 días al final de la inducción; lo que sugiere un efecto anti-hipertensivo de la epicatequina.

Al inducirse el SM, los niveles de nitritos disminuyen significativamente (tabla 8), esto como resultado del estrés oxidativo que contribuye a la presencia de disfunción endotelial y como consecuencia disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico.

En ambos grupos tratados con epicatequina se observa un incremento en los niveles de nitritos en las determinaciones finales con respecto a los niveles mostrados para el grupo de SM, en el caso del grupo tratado con epicatequina durante las 7 semanas, no hubo diferencia significativa en los niveles de nitritos a la tercera semana con respecto a la medida basal, ni tampoco en la séptima semana se observaron diferencias significativa con respecto a los valores basales e intermedios de ese mismo grupo.

En cuanto al grupo tratado con epicatequina por 10 días, también hay un aumento significativo de nitritos al final del tratamiento con respecto a los niveles obtenidos antes de iniciar la administración de epicatequina.

La mayoría de los estudios que se han hecho para probar los efectos de los flavonoides, han utilizado el alimento y/o bebida que los contiene, por

ejemplo, Benito et. al., 2002 observaron que el vino tinto (sin alcohol) y dietas ricas en catequinas, tiene un efecto vasodilatador *in vivo*, induciendo un incremento de óxido nítrico en aortas de rata, el cual contribuye a la relajación del músculo liso.

En otro estudio realizado en mujeres postmenopáusicas, hipercolesterolémicas, no fumadoras, sin haber usado fármacos para bajar el colesterol ni consumir suplementos antioxidantes, observaron que el consumo diario de una bebida de cocoa rica en flavonoides mejora la función endotelial, disminuye significativamente los niveles de presión arterial, incrementa de forma significativa los niveles de colesterol- HDL aunque los triglicéridos y el colesterol-LDL no presentan cambios significativos, además sugieren que la epicatequina circulante en sangre contribuye parcialmente a la vasodilatación incrementando la biodisponibilidad del óxido nítrico(Wang-Polagruto, et. al., 2006).

Schroeter et. al., demostraron que el consumo de epicatequina pura tiene efectos vasculares benéficos equivalentes a los observados en el consumo de cocoa con alto contenido de flavonoides,

El mecanismo de acción de la epicatequina para explicar su efecto anti-hipertensivo, no es muy claro, principalmente se sugiere que los polifenoles del cacao pueden disminuir la producción de óxido nítrico inducible por inhibición en la expresión de iNOS a nivel transduccional (Rimbach, et. al.,2009), además, también pueden regular la producción de citocinas proinflamatorias (Jun-ichi, et. al., 2009), lo que contribuye a disminuir la producción NO en los macrófagos activados en un proceso de inflamación crónica como el que se presenta en el SM, la epicatequina inhibe la expresión

de la arginasa, la cuál compite con la NOS por el sustrato que es L-arginina, esto puede estar asociado con un incremento en la actividad de la eNOS y en consecuencia aumenta la biodisponibilidad del óxido nítrico endotelial(Schnorr, et.al.,2008),

Los polifenoles del cacao también han demostrado tener la capacidad para inhibir la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Actis-Goretta, et.al., 2003), la cual esta involucrada en el sistema renina-angiotensina y cataliza la conversión de angiotensina I (que carece de actividad fisiológica) a angiotensina II (el vasoconstrictor mas potente del organismo). Todo lo anterior contribuye a disminuir los niveles de presión sanguínea.

Es bien sabido que en el SM se genera un ambiente de estrés oxidativo provocado principalmente por la obesidad, la gran cantidad de especies reactivas de oxígeno provocan daños a todo tipo de moléculas biológicas, por ejemplo: oxidan proteínas, lípidos y DNA debido a su alta capacidad de reacción. Sin embargo, las proteínas son posiblemente la forma mas inmediata de detectar daño oxidativo, los grupos carbonilos (aldehidos y cetonas) son producidos por oxidación directa en los aminoácidos prolina, arginina, lisina y treolina.

Nuestros resultados muestran un incremento significativo desde la tercera semana en los niveles de carbonilos en las ratas con síndrome metabólico, lo que corrobora la presencia de estrés oxidativo en este padecimiento. El grupo tratado con epicatequina durante 7 semanas, no mostró diferencia significativa en los niveles intermedios y finales de carbonilos con respecto a los obtenidos al inicio del experimento, por otro lado, si hay una disminución

significativa con respecto al grupo de síndrome metabólico. En el grupo con tratamiento de epicatequina durante 10 días, también se observó un efecto benéfico al final de este tratamiento, porque disminuyeron significativamente los niveles de carbonilos.

En un estudio realizado por Zhu QY, et. al.,2002 demostraron la capacidad anti-oxidante de la epicatequina, protegiendo a eritrocitos de la hemólisis inducida por la presencia estrés oxidativo.

Un mecanismo de acción propuesto para explicar la actividad antioxidante de los polifenoles del cacao, es que estos funcionan como atrapadores de radicales libres, las catequinas, por su estructura química pueden reaccionar con las especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido, hidroxilo, peroxinitrito, etc, además pueden quelar los metales de transición libres que también están involucrados en el daño oxidativo a lipoproteínas (Yang, et. al.,2009).

La epicatequina es absorbida en el tracto intestinal y distribuida en la sangre como una variedad de formas conjugadas y metiladas antes de ser excretada en la orina. Natsume M, et. al. (2006) compararon la actividad de la epicatequina y 4 de sus metabolitos para atrapar el peroxinitrito, el cual es generado en condiciones patológicas, especialmente en una respuesta inflamatoria debido a la reacción del radical superóxido con el óxido nítrico, el peroxinitrito causa daño y degeneración de células endoteliales y eritrocitos. Sus resultados confirman que la epicatequina y sus metabolitos son capaces de inhibir la nitración de los residuos de tirosina de la LDL por acción del peroxinitrito o de la mieloperoxidasa.

Una pieza clave en la patogénesis del SM es la resistencia a la insulina, las ratas tratadas con epicatequina (durante la inducción y al final de esta por 10 días, respectivamente) muestran una disminución significativa en los niveles de glucosa y de insulina finales con respecto al grupo de síndrome metabólico; el efecto de la epicatequina sobre la resistencia a la insulina también se puede ver en la figura X de la curva de tolerancia a la glucosa, en primera instancia es básico destacar que los niveles de glucosa basales en las ratas con SM se encuentran por arriba de los 126 mg/dl y a los 150 minutos no bajan significativamente aunque si son menores de 200 mg/dl. Con esto podemos decir que estas ratas se consideran pre-diabéticas según los parámetros establecidos por la ADA (American Diabetes Association).

Los dos grupos tratados con epicatequina (durante y al final de la inducción) tienen niveles basales significativamente menores a los del grupo de síndrome metabólico y no rebasan los 126 mg / dl, incluso también están por debajo del límite inferior (110 mg / dl) marcado por la NCEP considerado en los parámetros para diagnosticar síndrome metabólico, en estos grupos el nivel más alto de glucosa (188 y 199 mg / dl respectivamente para grupo 4 y 5) se observaron al minuto 60 y a los 150 minutos la glucosa disminuyó significativamente aunque no regresó a sus niveles normales.

La sensibilidad de la insulina es parcialmente dependiente de la liberación de óxido nítrico, pues uno de los efectos vasculares de la insulina es precisamente estimular la producción del NO. La insulina se une a su receptor y esto provoca la fosforilación del IRS-1 para posteriormente activar a la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3-K) que a su vez activa a PDK-1 esto, provoca la activación de Akt y finalmente se fosforila a la eNOS aumentando

su actividad y por lo tanto la producción de NO (Muniyappa, et. al., 2008), de esta forma, los flavonoides pueden disminuir la resistencia a la insulina mejorando la biodisponibilidad del NO (Grassi, et. al., 2005).

En este trabajo obtuvimos mejores resultados administrando la epicatequina durante 7 semanas que en el tratamiento de los 10 días a la misma dosis (1 mg/ kg de peso) aunque en el tratamiento curativo (10 días al final de la inducción) también se vio su efecto benéfico. Es importante recalcar que el uso por si solo de la epicatequina no podría evitar la aparición del síndrome metabólico, el mejoramiento en el estilo de vida es clave para disminuir y/o evitar este tipo de padecimientos, la inclusión en la dieta de alimentos y/o bebidas que la contienen, debe acompañarse de ejercicio diario, disminución en la ingesta de comida alta en carbohidratos y grasas y evitar malos hábitos como el tabaquismo (factores predisponentes del SM).

8. CONCLUSIONES

La utilización de una dieta hipercolesterolémica aunado a la administración diaria de una solución de fructosa al 60% durante 7 semanas, resulta ser un buen método para la inducción de SM en ratas Wistar macho.

La epicatequina reduce los niveles de colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL y aumenta el colesterol HDL en ratas con SM inducido con una dieta hipercolesterolémica y fructosa al 60%.

La epicatequina disminuye los niveles sanguíneos de glucosa, insulina y contribuye a mejorar la tolerancia a la glucosa.

La epicatequina aumenta la biodisponibilidad del NO y reduce los niveles de presión arterial.

La administración de la epicatequina en la dosis de 1mg/kg de peso durante todo el SM tiene mejores resultados contra este padecimiento que el tratamiento de 10 días con la misma dosis.

9. BIBLIOGRAFIA

Quiao Q, Gao W, Zhang L, Nyamodorj R, Tucmeilehto J. Metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Ann Clin Biochem.* 2007; 44: 232-263

Chávez-Tapia NC, Almeda P, Motola D, Sánchez K, Méndez-Sánchez N. Síndrome metabólico. Aspectos fisiopatológicos e importancia epidemiológica. *Médica Sur.* 2004.11(3).

Després JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF, Poirier P. Abdominal obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28:1039-1049.

Grundey SM. Metabolic Syndrome Pandemic. *Arterioscler. Thromb, Vasc. Biol.*2008;28:629-636.

Jonson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang D, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hipertensión, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2007;86:899-906

Blaha MJ, Bansal S, Rouf R, Golden SH, Blumenthal RS, DeFilippis AD. A practical "ABCDE" approach to the metabolic syndrome. *Clin Proc.* 2008;83(8):932-943.

Kotronen A. y Yki-Järvinen H. Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008;28:27-38.

Cowey S. y Hardy RW. The metabolic síndrome a high-risk state for cancer?. *Am J Path.* 2006;169(5):1505-1522.

Després JP. Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome?. *Ann Med.* 2006;38:52-63.

Romieu I, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Sampson L, Rosner B, Hennekens CH, Speizer FE. Energy intake and other determinants of relative weight. *Am. J Clin Nutr.* 1988;47:406-412.

Basciano H, Federico L y Adeli K. Fructose, insulin resistance and metabolic dyslipidemia. *Nut & Metab.* 2005;2:1743-7075.

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:537-543.

Moore MC, Cherrington AD, Mann SL, Davis SN. Acute fructose administration decreases the glycemic response to an oral glucose tolerance test in normal adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:4515-4519.

Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 1993;58:754S-65S.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Kaki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002;8:1288-1295.

Wu T, Giovannucci E, Pischon T, Hankinson SE, Ma J, Rifai N, Rimm EB. Fructose, glycemic load, and quantity/quality of carbohydrate in relation to plasma C-peptide concentrations in US women. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:1043-1049.

Litherland GJ, Hajduch E, Gould GW, Hundai HS. Fructose transport and metabolism in adipose tissue of Zucker rats: diminished GLUT5 activity during obesity and insulin resistance. *Mol Cell Biochem.* 2004;261:23-33.

Shimano H. Sterol regulatory element binding protein I as a key. *J Biol Chem.* 1999;274(50):35832-35839.

Taghibiglou C, Carpentier A, Van Iderstine SC, Chen B, Rudy D, Alton A, Lewis GF, Adeli K. Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. *J Biol Chem.* 2000;275:8416-8425.

Fried SK, Rao SP. Sugars, hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2003;78:873S-880S.

Rainwater DL, Mitchell BD, Comuzzie AG, Haffner SM. Relationship of low-density lipoprotein particle size and measures of adiposity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23:180-189.

Zammit VA, Waterman IJ, Topping D, McKay G. Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance. *J Nutr.* 2001;131:2074-2077.

Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes* 2005;54(9):2779-2786.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752-1761.

Mertens A, Verhamme P, Bielicki JK. Increased low-density lipoprotein oxidation and impaired high-density lipoprotein antioxidant defense are associated with increased macrophage forming and atherosclerosis in dyslipidemic obese mice: LCAT gene transfer decreases atherosclerosis. *Circulation.* 2003;107(12):1640-1646.

Verreth W, De Keyzer D, Pelat M. Weight-loss-associated induction of peroxisome proliferator-activated receptor- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ correlate with reduced atherosclerosis and improved cardiovascular function in obese insulin-resistant mice. *Circulation.* 2004;110(20):3259-3269.

Dandona P, Aljada Ahmad, Chaudhuri A, Mohanty P, Garg R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation. *Circulation.* 2005;111:1448-1454.

Pineda CA. Síndrome metabólico: definición, historia, criterios. *Coloma Med.* 2008;39:96-106.

Shojare M, Sotoodah A, Shafaie G. Is adiponectin associated with acute myocardial infarction in Iranian non obese patients?. *Lipids Health Dis.* 2009;8:17

Omoigui S. The interleukin-6 inflammation pathway from cholesterol to aging – Role of statins, biphosphanates and plant polohenols in aging and age-related diseases. *Immunity & Ageing.* 2007;4:1.

Yang R y Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Cir Res.* 2007; 101(6):545-559.

Plolagluto JF, Villablanca AC, Polagruto JA, Lee L, Holt RR, Schrader HR, Ensunsa JL, Steinberg FM, Schmitz HH, Keen CL. Chronic consumption of flavonol-rich Cocoa improves endotelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47(2):S177-S186.

Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz Harold H, Kelm Malte. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavonol-rich cocoa on vascular function in humans. *PNAS*,2006;103(4):1024-1029.

Carr A, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1716-23.

Devaraj S, Rosenson RS, Jialal I. Metabolic syndrome: an appraisal of the pro-inflammatory and procoagulant status. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004;33(2):431-453.

Mariam PA, Tejas VP, Youssef MK, Flores A, Rennke HG, Singh AK. Kidney pathological changes in metabolic syndrome: a cross-sectional study. *Am J Kidney Dis.* 2009;53(5):751-759.

Scheuer H, Gwinner W, Honhbach J. Oxidants stress in hyperlipidemia-induced renal damage. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278:F63-F74.

Sato W, Kadomatsu K, Yuzawa Y. Midkine is involved in tubulointerstitial inflammation associated with diabetic nephropathy. *Lab Invest.* 2007;87:903-913.

Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Jiménez A. Fructosa- induced metabolic syndrome is associated with glomerular hipertensión and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292:F423-F429.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Foriani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850.

Machado M, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17:823-826.

Willner IR, Waters B, Patil SR, Reuben A, Morelli J, Riely CA. Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:2957-2961.

Uslusoy HS, NAK SG, Gülten M, Biyikli Z. Liver histology according to the presence of metabolic syndrome in nonalcoholic fatty liver disease cases. *Word J Gastroenterol.* 2009;15:1093-1098.

Dillinger TL. Barriga P, Escárcega S, Jiménez M, Salazar D, Grivetti LE. Food of the gods: cure for humanity?. *Cultural History of the medicinal an ritual use of chocolate.* *J Nutr.* 2000;130:2057S-2072S.

Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perré S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endotelial dysfunction in smokers. *J Am Col Cardiol.* 2005;46:1276-83.

Grassi D, Necozone S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg B, Ferri C. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilatation in hypertensives. *Hypertensión.* 2005;46:398-405.

Hendrich AB. Flavonoid membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Act Pharm Sin.* 2006;27:27-40.

Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: A systemic review. *Nut & Metab.* 2006;3:1743-7075.

Osakaba N, Natsume M, Adachi T, Yamagishi M, Hirano R, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. *J Atheroscler Thromb.* 2000;227(1):51-56.

Lean ME, Noroozi M, Nelly I, Burns J, Talwar D, Saltar N, Crozler A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. *Diabetes.* 1999;48(1):176-181.

Schroeter H, Spencer J, Rice-Evans C, Williams RJ. Flavonoids protect neurons from oxidized low density lipoprotein induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK) c-Jun and caspase-3.

Innes AJ, Kennedy G, McLaren M, Bancroft AJ, Belch JJ. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets.* 2003;14(5):325-327.

Benito S, Lopez D, Sáiz MP, Buxaderas S, Sánchez J, Puig-Parallada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *British J Pharm.* 2002;135:910-916.

Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium dependent relaxation. *J. Nutr.* 2000;130:2105S-2108S.

Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nagai R. Tea polyphenols regulate key mediators on inflammatory cardiovascular diseases. *Mediators of inflammation.* 2009.

Nakagawa T, Hu H, Zharikow S. A causal role for uric acid in fructose induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F625-31

Osakabe N y Yamagishi M. Procyanidins in Theobroma cacao reduce plasma cholesterol levels in high cholesterol-fed rats. *J Clin Biochem Nutr.* 2007;45:131-136.

Juhel C, Armand M, Pafumi Y, Rosier C. Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in Vitro. *J Nutr Biochem.* 2000;11:45-51.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman P, Martijn B, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study. *Lancet.* 1993;342:1007-1011.

Rimbach G, Melchin M, Moehring J, Wagner A. Polyphenols from Cocoa and vascular health-A critical review. *Int J Mol Sci.* 2009;10:4290-4309.

Zhu QY, Holt RR, Lazarus SA, Orozco TJ, Keen CL. Inhibitory effects of Cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp Biol Med.*2002;227(5):321-329.

Yang CS, Lambert JD, Sang S. Antioxidative and anti carcinogenic activities of tea polyphenols. *Arch Toxicol.* 2009;83(1):11

Prior WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995;268:L699-L722.

Natsume M, Osakabe N, Yasuda A, Osawa T, Terao J. Inhibitory effects of conjugated epicatechin metabolites on peroxynitrite-mediated nitrotyrosine formation. *J Clin Biochem Nutr.* 2006;42:50-53.

Muniyappa R, Lantorno M, Quon M. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am.*2008;37(3):685.

Shimizu S, Ugi S, Maegawa H, Egawa K, Nishio Y, Yoshizaki T, Shi K, Nagai Y, Morino K, Nemoto K. Protein-tyrosine phosphatase 1B as new activator for hepatic lipogenesis via sterol regulatory element-binding protein 1 gene expression. *J Biol Chem.* 2003; 278:43095-43101.