

El glicerol incrementa la hipertension inducida por la ingestion de fructosa en la rata

PABLO F. DAMIANO*, MARIA I. ROSON*, EDUARDO DASCALT, LUIS CUNIBERTIT, LILIANA E. ALBORNOZ*, ANA M. PUYOS, IGNACIO J. DE LA RIVA*

RESUMEN

Una dieta enriquecida en fructosa es capaz de producir hipertension arterial en la rata. El objetivo de este trabajo fue potenciar las alteraciones glucolipídicas que acompañan este proceso y estudiar su impacto sobre la presión arterial (PA). Las ratas se dividieron en cuatro grupos según la dieta: C, dieta estandar; G, **glicerol a 15% en la bebida**; F, **55% de fructosa en reemplazo de la dextrina** y FG, la misma dieta que F y glicerol al 5%. Al final **de dos semanas los valores de PA** fueron mayores en el grupo F con respecto al C y en el FG con respecto a ambos. La insulinemia se vio incrementada en el grupo FG con respecto a los otros tres grupos. La trigliceridemia fue **superior en los** tres grupos experimentales (G, F y FG) con respecto al control. Los anillos de aorta mostraron una ED₅₀ menor al forbol 12,13-dibutirato (PDBu) en FG con respecto al C, con una correlación positiva ED₅₀ PDBu/PA: $r = 0,69$ ($r^2 = 0,48$). **Se concluye que la administración de glicerol a ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa potencia el desarrollo de HTA. Además,** las correlaciones positivas entre la sensibilidad PDBu y **la insulinemia por un lado** y la PA por el otro, sugieren la participación de la proteínquinasa C (**PKC**) **entre los mecanismos que conducen a las alteraciones que se desarrollan en estos** parametros. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 87-92.

Palabras clave Hipertension arterial - Hiperinsulinemia - Proteínquinasa C - Contractilidad vascular

INTRODUCCION

Se ha descrito que una dieta enriquecida en fructosa es capaz de producir hipertension arterial (HTA) en la rata, acompañada de hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. (1-5). Asimismo, se ha sugerido que la hiperinsulinemia y/o la resistencia a la insulina estarian relacionadas con el aumento en la presión arterial (PA). (6, 7). Sin embargo, la hiperinsulinemia y la hipertensión tambien son procesos que se desarrollan en forma independiente. (7, 8). La alteración en el metabolismo de los lípidos que acompaña a la hipertensión por sobrecarga de fructosa es otro de los factores para considerar. Se ha observado un "circulo vicioso" que se desarrolla entre la hipertrigliceridemia y la insulinorresistencia, (9) que hace

dificil establecer con certeza cual de estas alteraciones es responsable de la otra. El hecho es que el mecanismo responsable de la HTA en este modelo no se ha esclarecido completamente.

Por otro lado, Prentki y Corkey (10) desarrollaron una hipótesis según la cual la alteración de la secreción de insulina en los pacientes diabeticos de tipo II (diabetes mellitus no insulinodependiente) seria la consecuencia de alteraciones en el metabolismo de los glucidos y de los lípidos, que producirian el incremento intracelular de Acil CoA de cadena larga (CL-CoA). Esto derivaria en la formación de acido fosfatidico y diacilglicerol, capaces de estimular diversas isoformas de la proteínquinasa C (PKC). La activación de esta enzima tambien podria explicar el incremento en la resistencia vascular periferica por

* Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

t Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Pediatría R. Gutierrez.

§ Universidad Favaloro, Buenos Aires, Argentina.

Catedra de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Trabajo recibido para su publicación: 11/99 Aceptado: 12/99

sus conocidas acciones: 1) inhibición de la óxido nítrico sintasa (NOS) de las células endoteliales, disminuyendo la disponibilidad de óxido nítrico (NO) de potente acción vasodilatadora, 2) aumento de la producción de radicales libres de oxígeno, que de manera indirecta harían descender aún más el ya deficiente NO por su transformación en peroxinitrito, 3) fosforilación de proteínas directamente relacionadas con la contracción del músculo liso vascular y 4) producción de hipertrofia e hiperplasia de la capa muscular de los vasos. (11, 12)

En el presente trabajo se estudió el trastorno metabólico producido por una dieta rica en fructosa y potenciado por el suministro concomitante de glicerol en el agua de bebida, sobre el desarrollo de la presión arterial y su relación con la PKC vascular. Este último factor se evaluó a través de estudios de contractilidad vascular *in vitro* bajo estímulo con 12,13 forbol dibutirato (PDBu).

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas Sprague Dawley macho, de 180-230 gramos al comienzo del estudio. Los animales se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y con el aire adecuadamente reciclado. Inicialmente, todas las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar (Asociación Cooperativas Argentinas) con la siguiente composición (P/P): 20% proteína, 3% grasa, 2% fibra, 6% minerales y 69% almidón y suplementos de vitaminas. Luego de dos semanas los animales fueron divididos en cuatro grupos: 1) control (C) ($n = 5$), que continuaron con la dieta estándar y recibieron agua como bebida, 2) glicerol (G) ($n = 5$), que recibieron la misma dieta sólida y como bebida una solución de glicerol al 5% V / V, 3) fructosa (F) ($n = 4$), que recibieron una dieta especial compuesta por los mismos componentes que la dieta común, salvo en los hidratos de carbono, en los que el 69% de almidón se reemplazó por 55% de fructosa más 14% de almidón, y agua como bebida, y 4) fructosa-glicerol (FG) ($n = 5$), que recibieron la misma dieta que el grupo 3 y la solución de glicerol al 5% como bebida. Todos los grupos fueron examinados a los catorce días de realizado el manipuleo en las dietas.

Medida de la presión arterial y del peso

Los animales fueron entrenados dos veces por semana a la 1:00 PM para procedimiento de medición de la presión arterial (PA), desde la semana previa al cambio dietético. La presión sistólica se determinó por método indirecto en la cola de la rata, con una célula fotoeléctrica conectada a un amplificador (II TC modelo 47, Woodland Hills, California, USA) en serie con un osciloscopio (tipo 532 TEKTRONIC

Inc, Portland Oregon, USA) para visualizar el pulso. Como presión sistólica correspondiente a cada determinación se tomó el promedio de tres lecturas consecutivas estables. Para las comparaciones estadísticas se utilizó el promedio de los valores de las presiones correspondientes a los días 11 y 13 del estudio. Además, se registró el peso de los animales en cada oportunidad en que se midió la PA.

Determinaciones bioquímicas

El día 14 desde el comienzo del estudio, los animales fueron mantenidos en ayunas durante cinco horas y luego anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal (60 mg/kg de peso). Luego de 45 minutos, recibieron una dosis de refuerzo de 30 mg/kg. A los 45 minutos desde esta nueva dosis, se tomaron muestras de sangre del plexo venoso retrocular, que inmediatamente se centrifugaron y se conservaron a -20°C hasta el momento de la determinación de la glucosa, los triglicéridos, la insulina y el nivel de nitratos/nitritos plasmáticos.

Los niveles de glucosa (Kit Winner Glycemia HK, UV) y triglicéridos (Boehringer Mannheim GPO-PAP, enzymatic method kit) se determinaron con métodos espectrofotométricos (Automatic Analyzer Abbot Spectrum CCX). La insulina se determinó en muestras de plasma por el método descrito por Herbert y colaboradores. (13) Para la determinación de nitritos/nitratos, las muestras de suero se desproteinizaron mediante centrifugación durante 45 minutos a 7500 g utilizando filtros de ultrafiltración (MSI, MA, USA). El nivel de nitritos/nitratos se midió por el método de Griess, previa reducción de los nitratos a nitritos con la enzima nitrato reductasa de *Aspergillus* sp (Boehringer Mannheim). (14) El límite de detección fue de 5 $\mu\text{mol/L}$ y el coeficiente de variación para dos lecturas consecutivas fue menor del 5%.

Contractilidad de anillos vasculares

Comenzando el día 15 del estudio, se sacrificaron conjuntos de cuatro ratas (una de cada grupo). Se disecó rápidamente la aorta torácica, para ser colocada en solución de Krebs fría [(mmol/L) NaCl, 120; KCl, 4,8; KH_2PO_4 , 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3; CaCl_2 , 1,6; NaHCO_3 , 25; Dextrosa, 10; EDTA, 0,03], donde se procedió a la remoción del exceso de tejido adventicial. De cada aorta torácica se obtuvo un anillo de 3 mm de longitud que se suspendió en un baño de órgano individual de 3 ml. La solución de Krebs se mantuvo a $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ y se equilibró a un pH de 7,4 mediante burbujeo de carbónico (5% CO_2 - 95% O_2). La tensión desarrollada por el músculo liso vascular se registró con transductores de fuerza isométrica (Grass FTO3) conectados a un amplificador en serie con una PC con un programa adecuado de grabación. Los anillos se mantuvieron a una tensión de 2 g durante

un tiempo de equilibracion de 60 minutos durante el cual la solucion de Krebs se cambio y la *tension* se renovo cada 15 minutos. Luego de este tiempo se determinaron curvas dosis-respuesta al 12,13 forbol dibutirato (PDBU, $5,10^{-1}$ mol/L- $5,10^{-6}$ mol/L).

Analisis estadfstico

Los datos se expresan como media \pm error estandar. Las comparaciones entre los grupos se realizaron utilizando ANOVA y la prueba *a posteriori* de Newman-Keuls cuando se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Efectos de la fructosa y el glicerol en la PA y el peso

Los valores de PA a las dos semanas del suministro de las dietas experimentales se encuentran graficados en la Figura 1. Se observaron incrementos significativos en los valores de PA entre los grupos *F versus C* ($p < 0,005$), *versus G* ($p < 0,005$) y *FG versus C* ($p < 0,001$), *versus G* ($p < 0,001$) y *versus F* ($p < 0,005$) (Figura 1). Con respecto al peso de los animales, no se observaron diferencias significativas al final de las dos semanas de tratamiento (datos no incluidos).

Determinaciones de glucemia, trigliceridemia, insulinemia y nitritos/nitratos

Como se observa en la Figura 2, en el dia 14 los valores de glucemia para los grupos G, F y FG no fueron significativamente diferentes de los hallados en el grupo C. Sin embargo, la glucemia fue significativamente superior en el grupo F con respecto al FG ($p < 0,05$). Las concentraciones de los triglicéridos plasmaticos en los grupos G ($p < 0,02$), F ($p < 0,03$) y FG ($p < 0,02$) fueron significativamente superiores a las encontradas en el grupo C, sin que se *encontraran* diferencias entre estos tres grupos. Las

PresiOn Arterial

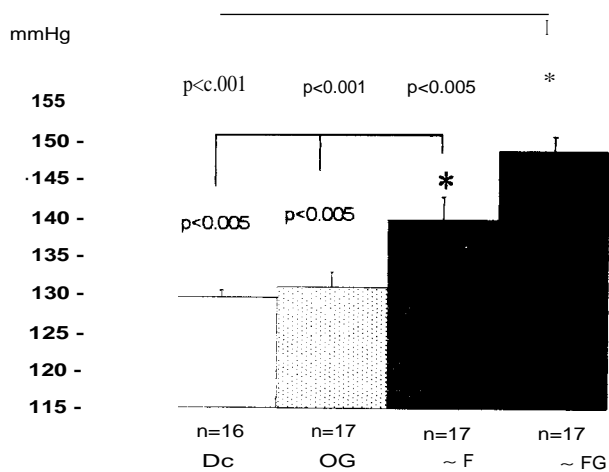


Fig. 1. Presion arterial en los grupos control (C), glicerol (G), fructosa (F) y fructosa + glicerol (FG); * indica el grupo cuyos valores resultaron significativamente diferentes.

concentraciones plasmaticas de insulina aumentaron significativamente en los animales del grupo FG con respecto a los otros tres grupos ($p < 0,001$).

Por otra parte, los valores nitritos/nitratos (gM) no mostraron diferencias significativas entre los diferentes grupos: C (n = 5), $39,4 \pm 3,6$; G (n = 5), $49,2 \pm 5,9$; F (n = 4), $41,0 \pm 8,8$; FG (n = 5), $31,9 \pm 2,9$.

Contractilidad vascular

En la Figura 3 pueden verse las curvas de dosis-respuesta realizadas con PDBu. Ellas permiten observar, para una concentracion de PDBu $3,42 \cdot 10^{-7}M$, una respuesta mayor en los anillos obtenidos de animales del grupo FG con respecto a los otros tres grupos (C: $p < 0,005$, G: $p < 0,001$ y F: $p < 0,005$). En el punto siguiente de la curva (PDBu $7,27 \cdot 10^{-7}M$), los

Glucemia

Trigliceridemia

Insulinemia

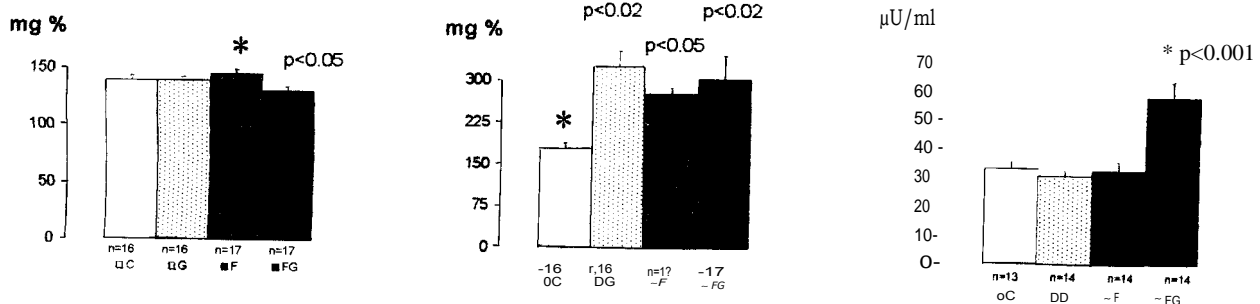


Fig. 2. Glucemia, trigliceridemia e insulinemia en los grupos control (C), glicerol (G), fructosa (F) y fructosa + glicerol (FG); * indica el grupo cuyos valores resultaron significativamente diferentes.

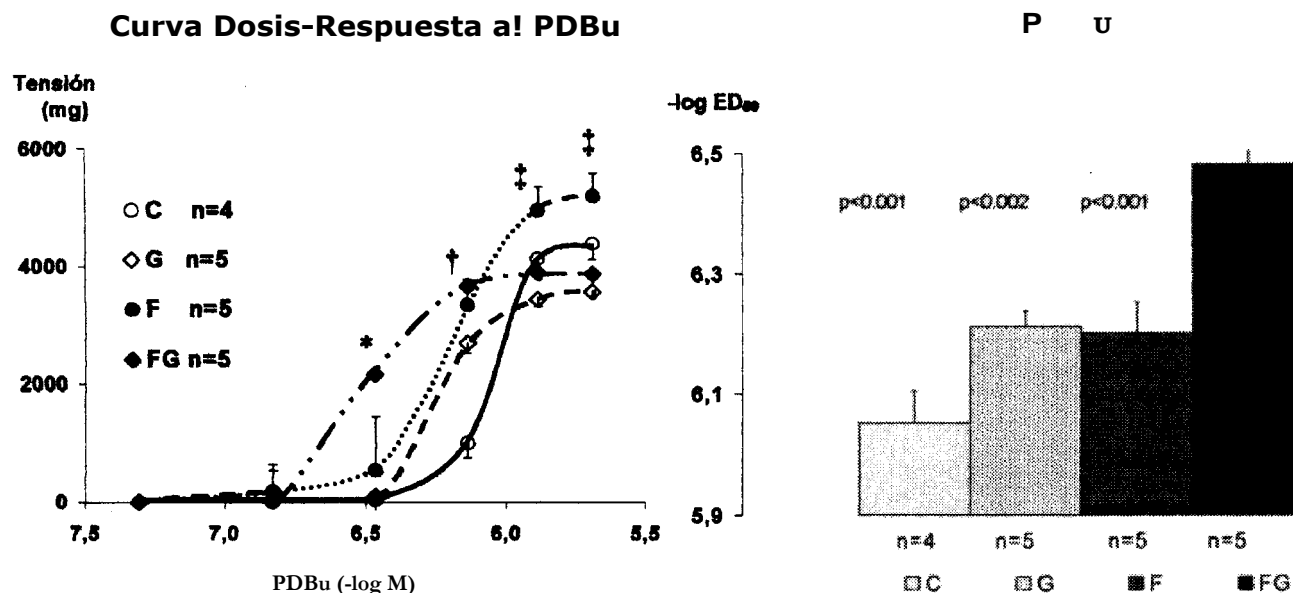


Fig. 3. Izquierda: Curvas dosis-respuesta al PDBu. Control (C), glicerol (G), fructosa (F) y fructosa + glicerol (FG). * FG significativamente diferente versus C ($p < 0,001$) y F ($p < 0,005$). t indica diferencias significativas de G ($p < 0,05$), F ($p < 0,05$) y FG ($p < 0,02$), con respecto al grupo control (C). f indica diferencias significativas entre los grupos FG ($p < 0,05$) y G ($p < 0,05$) respecto de F. Derecha: ED₅₀ al PDBu, -log M (media \pm error estandar).

grupos G ($p < 0,05$), F ($p < 0,05$) y FG ($p < 0,02$) mostraron una respuesta mayor a la encontrada en el grupo C. Asimismo, se observó una ED₅₀ significativamente menor (lo que nos habla de mayor sensibilidad) en los anillos de aorta del grupo FG respecto de C ($p < 0,001$), G ($p < 0,001$) y F ($p < 0,002$). La tensión máxima desarrollada ($T_{máx}$) se observó incrementada en el grupo F con respecto a los grupos G y FG ($p < 0,05$), con dosis de PDBu de $1,30 \cdot 10^{-6}$ y $2,05 \cdot 10^{-6}$ M.

La Figura 4 muestra las correlaciones entre PA e insulinemia (correlación positiva, $r = 0,43$, $r^2 = 0,19$), sensibilidad al PDBu y PA (correlación positiva, $r = 0,69$, $r^2 = 0,48$) y sensibilidad al PDBu e insulinemia (correlación positiva $r = 0,72$, $r^2 = 0,52$). Siendo aceptado que la contracción producida por esteroides del forbol está mediada por activación directa de la PKC, (15) puede verse que existe una vinculación más clara entre la PA y la PKC por un lado y la insulinemia y la PKC por el otro, que entre PA e insulinemia. Esto parece sugerir que el origen de la hiperinsulinemia y de la hipertensión se podría explicar por una alteración común en la que se vería implicada la PKC.

DISCUSION

El suplemento de glicerol en el agua de bebida en ratas alimentadas con una dieta enriquecida en fructosa, potenció el desarrollo de hipertensión y el incremento de la presión arterial se correlacionó directamente con una respuesta vascular mayor al PDBu. Estos hallazgos sugieren una participación de

la PKC en el desarrollo de hipertensión en este modelo experimental. Si bien la activación de la PKC es capaz de inhibir la NOS y favorecer además la inactivación del NO, lo cual podría explicar la disfunción endotelial descrita en este modelo, la ausencia de cambios en los nitritos/nitratos plasmáticos no permiten asociar el desarrollo de hipertensión con una disponibilidad menor de NO. Estudios previos sugieren que la PKC puede jugar un papel importante en las alteraciones metabólicas de la diabetes. Según una hipótesis descrita en diabetes de tipo II por Prentki y Corkey, (10) se produciría un trastorno glucídico con incremento de malonil-CoA, sustancia capaz de inhibir el metabolismo de los ácidos grasos incrementando los niveles de CL-CoA, la formación de DAG y el estímulo de la PKC. Otros autores también describieron que niveles elevados de glucosa incrementan la síntesis de DAG y la activación de la PKC en cultivos de células vasculares, en aorta, corazón y otros tejidos de ratas diabéticas por tratamiento con estreptozotocina en un modelo de diabetes de tipo I. (16-19) Sin embargo, en la actualidad no existen estudios de relación de la PKC con la hipertensión que se produce por una dieta enriquecida en fructosa. La razón de suplementar con glicerol a las ratas fructosa fue la de potenciar el trastorno metabólico que acompaña al desarrollo de hipertensión. El suministro de glicerol en la dieta induce hipertrigliceridemia semejante a la producida por la fructosa debido a una actividad disminuida de la lipoproteinlipasa. (20) El suministro

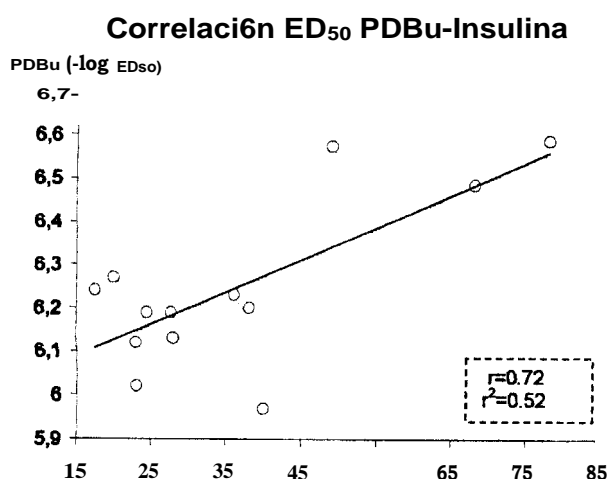
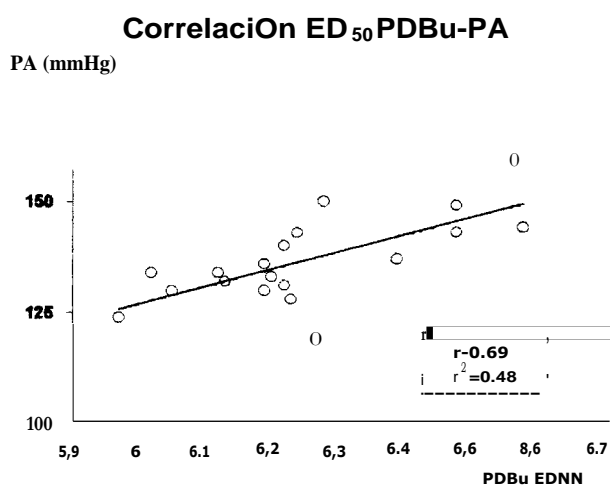
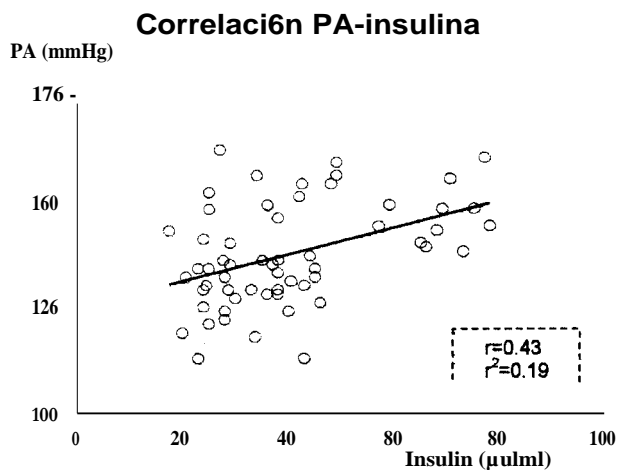


Fig. 4. Correlaciones entre valores de presi6n arterial e insulinemia, ED₅₀ y presi6n arterial al PDBu y ED₅₀ al PDBu e insulinemia.

tro de glicerol en la bebida, entonces, es una maniobra experimental interesante por su capacidad de potenciar el trastorno lipídico ocasionado por el suministro de fructosa, que permite dilucidar la importancia de la alteraci6n lipídica que acompaia el trastorno glt cido en el desarrollo de hipertensi6n. El hecho de que los animales del grupo G no tuvieran valores incrementados de PA podria deberse a que conservaron la capacidad de metabolizar los acidos grasos libres. En las ratas del grupo F, que presentaron un trastorno lipídico junto con el glucídico, se ha constatado el incremento de la PA. Los animales del grupo FG, en los que la alteraci6n del metabolismo de los lipidos se ve potenciada, no solo mostraron un valor de PA incrementada con respecto a los del grupo F, sino tambien un valor de insulinemia significativamente mayor, que se acompaia de una correlaci6n significativa entre la insulina y la sensibilidad al forbol. Las altas correlaciones entre sensibilidad al PDBu-insulina y sensibilidad al PDBu-PA concuerdan con que una mayor activaci6n de la PKC podria explicar la secreci6n inadecuada de insulina y el desarrollo de HTA en el modelo de ratas-fructosa.

SUMMARY

GLYCEROL INCREASES FRUCTOSE-INDUCED HYPERTENSION IN RATS

A fructose-enriched diet is known to promote arterial hypertension in the rats. The aim of this study was to evaluate blood pressure changes induced by glycolipidic alterations related to hypertension. Four groups of rats were studied: 1) controls (C), fed with a standard diet and tap water; 2) glycerol (G), maintained on a standard diet with the addition of 5% glycerol in tap water; 3) fructose (F), fed with 55% fructose in the diet; and 4) fructose + glycerol (FG), the same diet of F plus 5% glycerol in tap water. At the end of the second week the results were as follows: blood pressure and insulinemia increased in FG vs. C, G and F groups. Triglyceridemia increased in FG, F and G groups vs C one. Aorta rings showed a lower ED₅₀ to phorbol 12,13-dibutirate (PDBu) in FG vs. C group. There was a high positive correlation between ED₅₀, PDBu and BP ($r = 0.69$ $r^2 = 0.48$). We conclude that glycerol administration to rats on a diet rich in fructose, potentiates the development of hypertension. Furthermore, correlations between ED₅₀ to PDBu-insulinemia, and between ED₅₀ to PDBu-BP suggests a role for PKC in the mechanisms leading to the blood pressure elevations.

Key words Arterial hypertension - Hyperinsulinemia - Protein kinase-C (PKC) - Vascular contractility

Agradecimientos

Los trabajos expuestos en este manuscrito fueron subsidiados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y la Universidad de Buenos Aires, Argentina.

BIBLIOGRAFIA

1. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB y col. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987; 10:512-516.
2. Buna RD, Tomita T, Sasaki S. Chronic sucrose ingestion induces mild hypertension and tachycardia in rats. *Hypertension* 1983; 5: 218-225.
3. Preuss HG, El Zein M, Knapka J y col. Blood pressure responses to sucrose ingestion in four rats strains. *Am J Hypertens* 1992; 5: 244-250.
4. Hulman S, Falkner B. The effect of dietary sucrose on growth, blood pressure, and metabolism in developing Sprague-Dawley rats. *Pediatr Res* 1994; 36: 95-101.
5. Chicco A, Soria A, Fainstein-Day P y col. Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. *Horm Metab Res* 1994; 26: 397-403.
6. Heise T, Magnusson T, Heinemann L y col. Insulin resistant and the effect of insulin on blood pressure in essential hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 243-248.
7. Tsuruta M, Hashimoto R, Adachi H y col. Hyperinsulinaemia as a predictor of hypertension: an 11-year follow-up study in Japan. *Hypertension* 1996; 14: 483-488.
8. Masuo K, Mikami H, Ogihara T y col. Familial hypertension, insulin, sympathetic activity, and blood pressure elevation. *Hypertension* 1998; 32: 96-100.
9. Steiner G, Vranic M. Hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, a vicious cycle with atherogenic potential. *Int J Obes* 1982; 6 (Suppl 1): 117-124.
10. Prentki M, Corkey BE. Are the (3-cell signalling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes* 1996; 45: 273-283.
11. Lee MW, Severson DL. Signal transduction in vascular smooth muscle: Diacylglycerol second messengers and PKC action. *Am J Physiol* 1994; 267 (Cell Physiol 36): C669-C678.
12. Hirata KI, Kurosa R, Sakoda T. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension* 1995; 25:180-185.
13. Herbert V, Lan KS, Gottlieb CW y col. Charcoal immunoassay of insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1965; 25:1375-1384.
14. Moshage H, Kok B, Huijzen J y col. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-896.
15. Trombino C, Tazi KA, Gadano A y col. Protein kinase C alterations in aortic vascular smooth muscle cells from rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1998; 28: 670-676.
16. Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H y col. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: Proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5141-5145.
17. King GL, Ishii H, Koya D. Diabetic vascular dysfunction: A model of excessive activation of protein kinase C. *Kidney International* 1997; 52 (Suppl 60): S77-S85.
18. King GL, Kunisaki M, Nishio Y y col. Biochemical and molecular mechanisms in the development of diabetic vascular complications. *Diabetes* 1996; 45 (Suppl 3): S105-S108.
19. Feener EP, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 1997; 350 (Suppl I) 9-13.
20. Abe R, Macdonald I, Maruhama Y y col. Effect of glycerol on triglyceride metabolism in the rat. *Metabolism* 1979; 28:97-99.