

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**Facultad de Ciencias Químicas-Instituto de Ciencias  
Posgrado En Ciencias Químicas**

**Tesis de maestría:**

**“Estudio del efecto de Metformina-Decavanadato sobre la cascada de  
señalización hepática insulina-glucógeno en rata Wistar con Síndrome Metabólico”**

Presenta:

**QFB. Carlos Ignacio León Flores**

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Químicas  
Área: Bioquímica y Biología Molecular**

**Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas**

Director de tesis

**DC. Samuel Treviño Mora**

Codirector

**DC. Enrique González Vergara**

**JUNIO 2021**

## Contenido

Contenido .....	ii
Contenido de Esquemas .....	iv
Contenido de Tablas .....	iv
Contenido de Figuras .....	iv
Abreviaturas .....	vi
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1. Síndrome metabólico .....	2
2.2. Fisiopatología del Síndrome metabólico .....	2
2.2.1. Homeostasia de la glucosa.....	2
2.2.2. Resistencia a la insulina y síntesis de glucógeno .....	3
2.2.3. Síntesis de glucógeno.....	4
2.2.4 Regulación de la síntesis de glucógeno en el hígado .....	5
2.2.5. Lipogénesis hepática .....	7
2.2.6. Regulación de la lipogénesis hepática.....	8
2.2.7 Equilibrio de los ácidos grasos-triglicéridos .....	10
2.2.8. Dislipidemia .....	11
2.3 Nuevos abordajes terapéuticos en el Síndrome metabólico .....	12
2.4. Generalidades del Vanadio .....	12
2.5. Fuentes de exposición a Vanadio .....	13
2.5.1. Fuentes naturales .....	13
2.5.2. Vías de entrada y distribución de Vanadio.....	13
2.6. Mecanismo de incorporación celular del Vanadio .....	15
2.7. Interconversión entre especies de V y balance redox celular .....	16
2.8. Vanadio y Síndrome metabólico.....	17
3. Planteamiento del problema.....	22
4. Justificación.....	23
5. Objetivo general .....	24
6. Objetivos particulares .....	24
7. Diseño experimental.....	25
8. Material y métodos .....	27
8.1 Síntesis y cristalización de los compuestos: $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{NH}_4][\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	27

8.2 Animales .....	27
8.3. Conformación de grupos.....	28
8.4. Zoometría.....	28
8.5. Muestras sanguíneas.....	28
8.6. Tejido hepático.....	29
8.7 Ensayos séricos .....	29
8.8. Valoración de la resistencia a la insulina .....	29
8.9. Ensayos tisulares .....	30
8.10. Estudios histológicos.....	30
8.11. Tinción H&E .....	31
8.12. Tinción PAS .....	31
8.13. Ensayos de Western Blot.....	32
8.14. Análisis estadístico.....	33
9. Resultados .....	33
9.1 Monocristales de $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	33
9.2 Espectroscopia vibracional de estado sólido .....	34
9.2.1 $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	34
9.4 Zoometría.....	36
9.5 Tolerancia a la glucosa, respuesta insulínica e índice de resistencia a la insulina.....	38
9.6. Ensayos séricos .....	40
9.7 Evaluación de la zoometría a los 60 días de tratamiento.....	41
9.8 Ensayos séricos después de 60 días de tratamiento .....	42
9.9 Tolerancia a la glucosa, respuesta insulínica e índice de resistencia a la insulina después de 60 días de tratamiento.....	43
9.10 Resistencia y sensibilidad hepática a la insulina después de 60 días de tratamiento .....	46
9.11 Dinámica de formación de glucógeno después de 60 días de tratamiento .....	47
9.12 Análisis de la cascada de fosforilación de la insulina.....	49
9.13 Análisis histológico a los 60 días de tratamiento.....	55
9.14 Análisis de la dinámica de formación de glucógeno en las zonas del lobulillo hepático.....	58
10. Discusión.....	63
11. Conclusiones.....	96
12. Bibliografía .....	97

13. Anexos .....	105
------------------	-----

### Contenido de Esquemas

Esquema 1 Vías metabólicas para la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos ..	8
Esquema 2. Regulación de la lipogénesis de novo por LXR- $\alpha$ , SREBP1c y Chrebp .....	10
Esquema 3. Especiación y solubilización de V dependiente de pH en diferentes cavidades y tejidos .....	15
Esquema 4. Interacción entre (HMetf) <sub>6</sub> y (V <sub>10</sub> O <sub>28</sub> ) <sup>6-</sup> .....	21
Esquema 5. Primer nodo crítico de la vía de señalización de la insulina. ....	79
Esquema 6. Segundo nodo crítico de la vía de señalización de la insulina. ....	84
Esquema 7. Vía de señalización de insulina y síntesis de glucógeno	

### Contenido de Tablas

Tabla 1. Evaluación zoométrica post-tratamiento de los diferentes grupos de estudio.....	41
Tabla 2. Valoración de la dislipidemia post-tratamiento en los diferentes grupos de estudio.....	42

### Contenido de Figuras

Figura 1. Monocristales de los compuestos de vanadio .....	33
Figura 2. IR de [HMetf] <sub>6</sub> [V <sub>10</sub> O <sub>28</sub> ].6H <sub>2</sub> O. ....	34
Figura 3. IR de [NH <sub>4</sub> ] <sub>6</sub> [V <sub>10</sub> O <sub>28</sub> ].6H <sub>2</sub> O.....	35
Figura 4. Espectro de <sup>51</sup> V-RMN en D <sub>2</sub> O de [HMetf] <sub>6</sub> [V <sub>10</sub> O <sub>28</sub> ].6H <sub>2</sub> O .....	36
Figura 5. Zoometría. A) Peso, B) Talla, C) Índice de masa corporal, D) Circunferencia (IMC), E) Índice Lee .....	38
Figura 6. Tolerancia a la glucosa e índice de resistencia a la insulina .....	39
Figura 7. Ensayos séricos .....	41
Figura 8. Tolerancia a glucosa e insulina .....	43
Figura 9. Evaluación de la resistencia y sensibilidad a la insulina.....	45

Figura 10. Comportamiento del glucógeno hepático .....	47
Figura 11. Expresión de IRpT e IRpY.....	51
Figura 12. Expresión de IRS1, PTEN, PTP1B.....	53
Figura 13. Expresión de GSK3 $\beta$ , GS y GSp.....	54
Figura 14. Características histológicas del tejido hepático post carga de glucosa a los 0, 10 y 30 minutos .....	57
Figura 15. Características histológicas del tejido hepático post carga de glucosa a los 0, 10 y 30 minutos .....	58
Figura 16. El acino hepático .....	60
Figura 17. Dinámica de formación de glucógeno en el tejido hepático post carga de glucosa a los tiempos de cohorte: 0, 10 y 30 minutos.....	61
Figura 18. Dinámica de formación de glucógeno en el tejido hepático post carga de glucosa a los tiempos de cohorte: 0, 10 y 30 minutos.....	62

## Abreviaturas

<b>ACC</b>	Acetil CoA Carboxilasa
<b>AGPAT</b>	Acilglicerol-fosfato acil transferasa
<b>AGL</b>	Ácidos grasos libres
<b>AG</b>	Ácidos grasos
<b>Akt</b>	Proteína cinasa B
<b>apoB100</b>	Apolipoproteína B 100
<b>AMPK</b>	Cinasa activada con monofosfato de adenosina
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CT</b>	Colesterol total
<b>ChREBP</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta de carbohidratos
<b>DG</b>	Diacilglicerol acil transferasa
<b>DNL</b>	Lipogénesis de Novo
<b>DMT1</b>	Transportadores de metales divalentes
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>ERK</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares
<b>FAS</b>	Sintasa de ácidos grasos
<b>Fe</b>	Hierro
<b>FoxO1</b>	Proteína de la caja de forkhead O1
<b>G3P</b>	Gliceraldehído 3-fosfato
<b>GLUT2</b>	Transportador de glucosa tipo 2
<b>GS</b>	Glucógeno sintasa
<b>GSH</b>	Glutación
<b>GST</b>	Glutación S transferasa
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad
<b>IR</b>	Espectro de Infrarrojo
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad
<b>LXR</b>	Receptor del hígado X
<b>HOMA-IR</b>	Modelo de evaluación de la homeostasis de Resistencia a Insulina
<b>JNK</b>	Cinasa Jun N-terminal
<b>LOAEL</b>	Nivel más bajo de efecto adverso observado
<b>LPA</b>	Ácido lisofosfatídico
<b>NAFLD</b>	Enfermedad de hígado graso no alcohólico

<b>Ni</b>	Níquel
<b>NOAEL</b>	Nivel de efecto adverso no observado
<b>MAPK</b>	Proteína de actividad mitógena cinasa
<b>mGPAT</b>	Glicerol-fosfato acil transferasa mitocondrial
<b>MTP</b>	Proteína de transferencia de triglicéridos microsomales
<b>Mn</b>	Magnesio
<b>MRS</b>	Espectroscopía de resonancia magnética
<b>PA</b>	Ácido fosfatídico
<b>PAP</b>	Fosfatidato fosfatasa
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-cinasa
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A
<b>PKB</b>	Proteína cinasa B
<b>PL</b>	Fosfolípidos
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>RI</b>	Resistencia a insulina
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear en solución
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SREBP1c</b>	Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de muy baja densidad

## 1. Introducción

El Vanadio (V), es quinto metal de transición más abundante en la corteza terrestre y el vigésimo segundo elemento más abundante en la tierra. Se encuentra ampliamente distribuido en todos los organismos (animales, peces, pequeños mamíferos, plantas principalmente) así como en suelos, mares, océanos y la atmosfera (Jakusch and Kist 2017). El incremento y distribución de este elemento en el ambiente está potenciado tanto por fenómenos naturales (incendios forestales o erupciones volcánicas), así como por la actividad humana (inhalación de contaminantes y gases provenientes de la industria minera y metalúrgica y, la quema de combustibles fósiles). Sin embargo, el auge en el estudio de los compuesto con base en vanadio y sus posibles usos como metalofármacos comienza desde los años 70's (Crans et al. 2004), cuando se descubre el carácter terapéutico, en el tratamiento de diversas patologías como: Diabetes mellitus, cáncer, infecciones bacterianas, infecciones virales, diversas parasitosis (Bishayee et al. 2010) y recientemente en el tratamiento de los signos y síntomas del Síndrome Metabólico (SM). En este sentido, compuestos como el metavanadato y decavanadato han sido estudiados en un amplio número de sistemas biológicos y biomédicos (Pereira et al. 2009), debido a su uso potencial en el tratamiento del SM y la diabetes (Crans et al. 2004). Por otro lado, estudios realizados muestran que la administración vía oral de decavanadato de metformina (MeftDeca) mejora la sensibilidad a la insulina al regula la síntesis de glucógeno, además disminuir los niveles de glucosa basal, la concentración sérica de triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol VLDL (Treviño y González-Vergara 2019). Sin embargo, hasta la fecha no existen reportes del papel de vanadio sobre la vía de señalización de insulina y su relación con la síntesis de glucógeno en el tejido hepático, en el SM. Por lo que el presente trabajo se enfoca en el estudio del mecanismo por el cual los compuestos con base en vanadio mejoran la síntesis y dinámica de la formación de glucógeno, la cual involucra la cascada de señalización del brazo metabólico de la acción de la insulina.

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Síndrome metabólico**

El SM es un conjunto de condiciones clínicas que comprenden sobrepeso y obesidad central/abdominal, hipertensión sistémica, resistencia a la insulina, dislipidemia, un estado proinflamatorio y protrombótico provocados por un estilo de vida sedentario, el aumento en el consumo de alimentos ricos en carbohidratos, el estrés diario y la disminución en la ingesta de alimentos ricos en fibra (Ford, Li, y Sattar 2008). Diversos estudios epidemiológicos demuestran que el consumo de una dieta hipercalórica rica en azúcares conduce a alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, provocando la aparición del SM. El SM está relacionado con la pérdida en la sensibilidad y subsecuente desarrollo de resistencia a la insulina (RI). La pérdida a la sensibilidad se refiere a modificaciones en la interacción del dominio alfa del receptor a insulina con la hormona, lo cual lleva a una fallida cascada de señal en la célula blanco. Mientras que, la RI es un concepto bioquímico-molecular que se traduce en una menor eficiencia de la acción biológica de la insulina debido a la existencia de modificaciones en las fosforilaciones de los residuos aminoacídicos asociados a la cascada de transducción de señales de la hormona. En ambos casos hiperglucemia transitoria se presentan en los pacientes siendo compensado con hiperinsulinemia (Zhang 2007).

### **2.2. Fisiopatología del Síndrome metabólico**

#### **2.2.1. Homeostasia de la glucosa**

El SM está relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina (RI). Sin embargo, el SM no es sólo el resultado de la aparición de la RI, también incluye efectos causado por la hiperglucemia, como la alteración en la vía de señalización de la insulina y los efectos compensatorios de la hiperinsulinemia (Valle et al. 2012)

La RI afecta la función de los tejidos sensibles a la insulina (hígado, músculo, páncreas y tejido adiposo principalmente). Lo que conlleva a una dismetabolía de carbohidratos y lípidos. Particularmente, los hepatocitos

responden a la insulina, inhibiendo la gluconeogénesis, produciendo síntesis de novo lipídica y aumentando la síntesis de glucógeno. Bajo condiciones fisiológicas, la ingesta de carbohidratos produce liberación de insulina. Sin embargo, en estados de RI y SM, la insulina no es capaz de suprimir la producción de glucosa hepática, mientras que, paradójicamente la inducción de la lipogénesis de novo es sostenida, contribuyendo, tanto a estados hiperglucémicos como hiperlipémicos, (Haas et al., 2012; Yecies et al., 2011)

Bajo esta condición, la capacidad de la insulina de aumentar el consumo de glucosa y de disminuir su producción endógena resulta ineficiente, por lo que es necesario que las células  $\beta$  pancreáticas secreten una mayor cantidad de la hormona, "obligando" a la normoglicemia, evitando una hiperglucemia sostenida, pero redundando en el establecimiento de la RI (Adiels et al. 2008). Aunque la hiperinsulinemia es el principal mecanismo compensatorio contra la hiperglucemia, una prolongada hiperfunción en las células  $\beta$  pancreáticas puede conducir a su agotamiento y a la disminución de insulina y desarrollo de estados hiperglucémicos de tipo diabético (McCracken, Monaghan, y Sreenivasan 2018). Si la secreción de insulina se vuelve inadecuada y los niveles de glucosa séricos comienzan a ascender, presenta intolerancia a la glucosa y después diabetes mellitus (Takamiya et al. 2004).

### 2.2.2. Resistencia a la insulina y síntesis de glucógeno

En individuos metabólicamente "sanos", la insulina dirige el manejo hepático de la glucosa. Esto implica la supresión coordinada de la gluconeogénesis y la glucogenólisis, así como la activación de la síntesis de glucógeno. La generación de glucógeno mediada por la insulina está dada por la actividad de la glucógeno sintasa y la inhibición de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) (principal cinasa encargada de la inhibir su actividad) haciéndola más sensible a la concentración de glucosa-6 fosfato (G6P) y aumentando su defosforilación por medio de proteína fosfatasa 1 (PP1) (Langhans, Geary, y Scharrer 1982). Por su parte, la concentración de G6P es un inhibidor alostérico de glucógeno fosforilasa y un activador alostérico de glucógeno sintasa; favoreciendo el incremento de la síntesis de glucógeno (Roach et al. 2016).

Sin embargo, en condiciones de RI hepática la mayoría de los estudios sugieren la presencia de anomalías en el metabolismo del glucógeno hepático. En humanos, las mediciones de espectroscopía de resonancia magnética (MRS) del contenido de glucógeno hepático revelaron que la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se asocia a la disminución del contenido de glucógeno hepático en un postprandio de 4 hrs (Saklayen 2018). Asimismo, se ha demostrado que sujetos con DM2 tienen menor contenido de glucógeno hepático en ayunas y una disminución de su síntesis en postprandio cuando se usa un “clamp” hiperinsulinémico-hiperglucémico. Adicionalmente, se ha reportado que la glucogenólisis no es completamente suprimida por la insulina en personas con DM2 (Iqbal et al. 2017). Aunque estos procesos son claros en pacientes diabéticos, no se ha reportado en pacientes con SM y RI.

### 2.2.3. Síntesis de glucógeno

El glucógeno es un polímero altamente ramificado de glucosa que desempeña un papel importante como reserva energética para el organismo (Hatting et al. 2017). En individuos sanos la reserva hepática de glucógeno representa un 5% del peso total de este órgano. Después del consumo de una dieta rica en carbohidratos hasta el 30-40% son almacenados en forma de glucógeno (Krause et al. 2002).

La síntesis de glucógeno requiere la presencia de un cebador de oligosacárido formado por glucosas, que se produce primero a través de la autoglicosilación de la proteína glucogenina, mediante enlaces  $\alpha$ -(1-4). Este proceso requiere el azúcar nucleótido, uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), como sustrato. La UDP-glucosa es una forma activada de la glucosa sintetizada a partir de glucosa 1- fosfato y UTP, esta reacción es catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa (Niewoehner, Gilboe, y Nuttall 1984). La glucógeno sintetasa permite la formación de un enlace  $\alpha$ -(1-4) glucosídico a la glucosa del UDP-glucosa con una de las glucosas del oligosacárido, desplazando al UDP en este proceso. Sin embargo, glucógeno sintetasa solamente cataliza la síntesis de enlaces  $\alpha$ -(1-4), por lo que es necesaria la participación de otra enzima para la formación de enlaces  $\alpha$ -(1-6), que hacen del glucógeno un polímero ramificado (Adeva-andany et al. 2016).

Por otro lado, la insulina también es capaz de inhibir la glucogenólisis en hígado. Este proceso inicia con la acción de la enzima glucógeno fosforilasa, la cual no es capaz de romper enlaces más allá de los puntos de ramificación, es decir se detiene cada cuatro residuos de glucosa de un punto de ramificación en donde existe una ramificación  $\alpha$ -(1-6) (Sharabi, Tavares, y Puigserver 2019). Para hidrolizar estas ramificaciones del glucógeno, se requiere de una segunda enzima, la glucantransferasa que tiene actividad de transferasa la cual deja expuesto un sólo residuo de glucosa unido por un enlace glucosídico  $\alpha$ -(1-6) (Niewoehner, Gilboe, y Nuttall 1984). Dicho residuo se libera por la actividad  $\alpha$ -(1-6)-glucosidasa que posee glucantransferasa, lo que da lugar a una molécula de glucosa libre y una estructura no ramificada de residuos de glucosa susceptible de ser fraccionado por la fosforilasa. La glucosa 1-fosfato producida por la fosforilasa, debe convertirse a glucosa 6-fosfato para metabolizarse mediante la glucólisis, esta reacción es catabolizada por la enzima glucofosfomutasa (Nielsen y Wojtaszewski 2004).

Al llegar al límite de saturación intracelular de glucógeno, existe un desvío para la lipogénesis de novo (formación de triglicéridos) primordialmente en hígado. Por otro lado, la glucógeno sintasa puede ser inhibida por medio de fosforilación, al poseer nueve sitios en su estructura que son blancos de cinasas, que al ser fosforilados provocan diferentes efectos en su actividad (Petersen, Vatner, y Shulman 2017). En estados crónicos de hiperinsulinemia y RI se altera profundamente la correcta síntesis de glucógeno hepático y homeostasis metabólica.

#### 2.2.4 Regulación de la síntesis de glucógeno en el hígado

Fisiológicamente, la formación y degradación de glucógeno en el hígado se encuentra regulado por la acción de insulina y glucagón. En esencia, la insulina promueve la glucogénesis e inhibe la glucogenólisis a través de la activación de la Proteína Fosfatasa 1 (PP1), lo que lleva a la desfosforilación de la glucógeno fosforilasa (inactivación) y la glucógeno sintasa (activación). Este evento es mediado a través de la activación de la proteína cinasa B (PKB también conocida como Akt), lo que lleva a la fosforilación de la glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK-3 $\beta$ ), (inhibe) la fosforilación y activa la glucógeno sintasa. Además, la insulina

promueve la activación de PP1, que desfosforila e inactiva a la glucógeno fosforilasa. (Langhans, Geary, y Scharrer 1982).

La glucógeno sintasa se inactiva mediante la fosforilación en múltiples residuos de serina por diversas serina / treonina cinasas como la caseína cinasa-1, la proteína cinasa A (PKA) y la GSK-3 $\beta$  (Niewoehner, Gilboe, and Nuttall 1984).

En el ayuno, GSK-3 desfosforilada (forma activa), fosforila e inactiva a la glucógeno sintasa, lo que conduce a la inhibición de la síntesis de glucógeno hepático. En el postprandio, el aumento de la señalización fosfoinositido-3 cinasa PI3K activa Akt en la célula, que a su vez fosforila e inactiva GSK-3 $\beta$ , resultando en la activación de la glucógeno sintasa (Ford, Li, y Sattar 2008). Por otro lado, concentraciones elevadas de glucosa 6-fosfato activan alostéricamente esta enzima, potenciando así su actividad catalítica en condiciones de alimentación. La PP1 puede ser responsable de la desfosforilación y activación de la glucógeno sintasa. En consecuencia, se ha demostrado que la glucosa activa PP1, mientras que el glucagón y la epinefrina inhiben su actividad (Samuel y Shulman 2016).

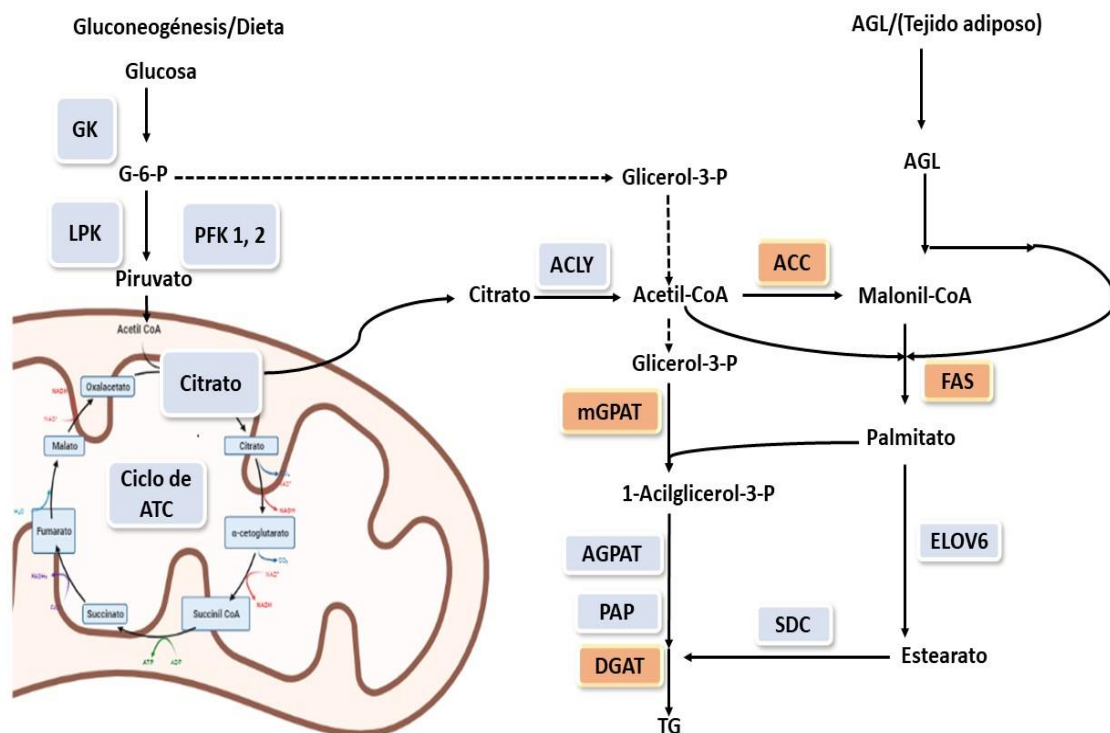
La glucógeno fosforilasa conduce a la generación de glucosa 1-fosfato (Ailanen et al. 2018). La glucosa 1-fosfato se puede convertir en glucosa 6-fosfato mediante la fosfoglucomutasa, y la glucosa 6-fosfato se puede incorporar a la glucólisis o convertirse en glucosa mediante la glucosa 6-fosfatasa, según el estado energético del organismo. La forma activa de glucógeno fosforilasa fosforila en Ser 14, y está sujeta a la señalización de epinefrina y glucagón. Asimismo, los niveles del AMP cíclico intracelular (cAMP) aumentan a través del adenilato ciclasa, lo que lleva a la activación de proteína cinasa A (PKA). La PKA es entonces responsable de la fosforilación y activación de la glucógeno fosforilasa coordinando la degradación del glucógeno (Miranda et al. 2005). En condiciones de alimentación, esta cascada de cinasas está inactiva debido a la falta de secreción de hormonas catabólicas. Además, la insulina promueve la activación de PP1, que desfosforila e inactiva la glucógeno fosforilasa (Hatting et al. 2017).

### 2.2.5. Lipogénesis hepática

Cuando la tasa de glucogénesis llega a su límite, la señalización de insulina promueve lipogénesis hepática de novo. Esta es una vía biosintética de ácidos grasos primordial en el hígado, que contribuye al almacenaje y secreción de lípidos por los hepatocitos (Jensen-Urstad and Semenkovich, 2012). Este proceso es propiciado por el empleo de sustratos derivados principalmente de la glucólisis y el metabolismo de los hidratos de carbono. La vía conduce a una generación de cadenas de ácidos grasos ligadas a la coenzima A, que se pueden incorporar a una gran diversidad de especies lipídicas. Se ha sugerido que el aumento de DNL contribuye a la patogénesis de la enfermedad de hígado graso no alcohólico (Donnelly et al., 2005), una enfermedad metabólica relacionada con el desarrollo de la DM2. La DNL también se incrementa en condiciones de RI (Ameer et al., 2014). Por lo tanto, puede ser crucial para comprender y asignar el espectro completo de trastornos metabólicos asociados con la RI.

La DNL es la síntesis de cadenas de ácidos grasos a partir de subunidades de acetil-CoA producidas durante el glucolisis (Smith y Tsai, 2007) y estas pueden condensarse con una molécula de glicerol. El mecanismo de reacción comienza con la producción de malonil-CoA a partir de un precursor de acetil-CoA, bajo la actividad catalítica de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Bianchi et al., 1990). El malonil-CoA mediante diferentes reacciones, que involucran al complejo multienzimático de la ácido graso sintasa tipo I (FAS) y otra molécula de acetil-CoA (Smith, 1994) producen acil coA. El alargamiento de este acil coA cesa en la etapa 16 o 18 carbonos con la liberación de ácido palmítico o ácido esteárico (Foster and Bloom, 1963).

Si bien, la glucólisis proporciona acetil-CoA como el principal sustrato para la DNL, existen intermediarios como el gliceraldehído que es posteriormente fosforilado para producir gliceraldehído 3-fosfato (G3P) (Mayes, 1993). Durante la síntesis de novo de triacilglicerol se da la acilación de glicerol-3-fosfato, generando ácido lisofosfatídico (LPA) (Coleman and Lee, 2004). El LPA es acondicionado enzimáticamente para producir diacilglicerol (DG). Finalmente, una acil-CoA acila el DG dando paso triacilglicérido (TG), por medio de la actividad catalítica de la diacilglicerol acil transferasa (DGAT) (Shi and Cheng, 2008). Este proceso es resumido en la figura 1.



**Esquema 1** Vías metabólicas para la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. La glucosa absorbida por la célula proveniente de la dieta o de la gluconeogénesis se convierte en piruvato a través de la glucólisis. El piruvato se convierte en acetil-CoA y entra en el ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). El exceso de acetil-CoA es convertido en citrato y puede salir de las mitocondrias, ya en citoplasma es sustrato de las enzimas lipogénicas. Las principales enzimas implicadas son la acetil-CoA Carboxilasa (ACC) y la Sintasa de ácidos grasos (FAS). Las principales enzimas implicadas en la esterificación y producción de triacilglicerol (TG) incluye a la Glicerol-3-fosfato acil transferasa mitocondria (mGPAT) y a la Diacil glicerol acil transferasa (DGAT). Tomado y modificado de Wang et al., 2015.

Una vez sintetizados los triglicéridos, estos son transportados fuera del hepatocito por medio de las lipoproteínas de baja densidad (VLDL) (Olofsson, Stillemark - Billton y Asp,2000; Sundaram y Yao,2010). Estas lipoproteínas pueden oscilar entre 35 y 100 nm, sin embargo, diversas fuentes indican que la DNL puede conducir a un aumento en el tamaño de VLDL (aproximadamente 130 nm) pero no al número de partículas de VLDL segregadas (Grefhorst et al., 2002; Choi and Ginsberg, 2011).

### 2.2.6. Regulación de la lipogénesis hepática

La vía lipogénica tiene una doble regulación: la transcripción de enzimas integrales a la síntesis de AG y regulación alostérica de ACC. A su vez, la regulación transcripcional de DNL tiene dos vías de activación: la proteína de

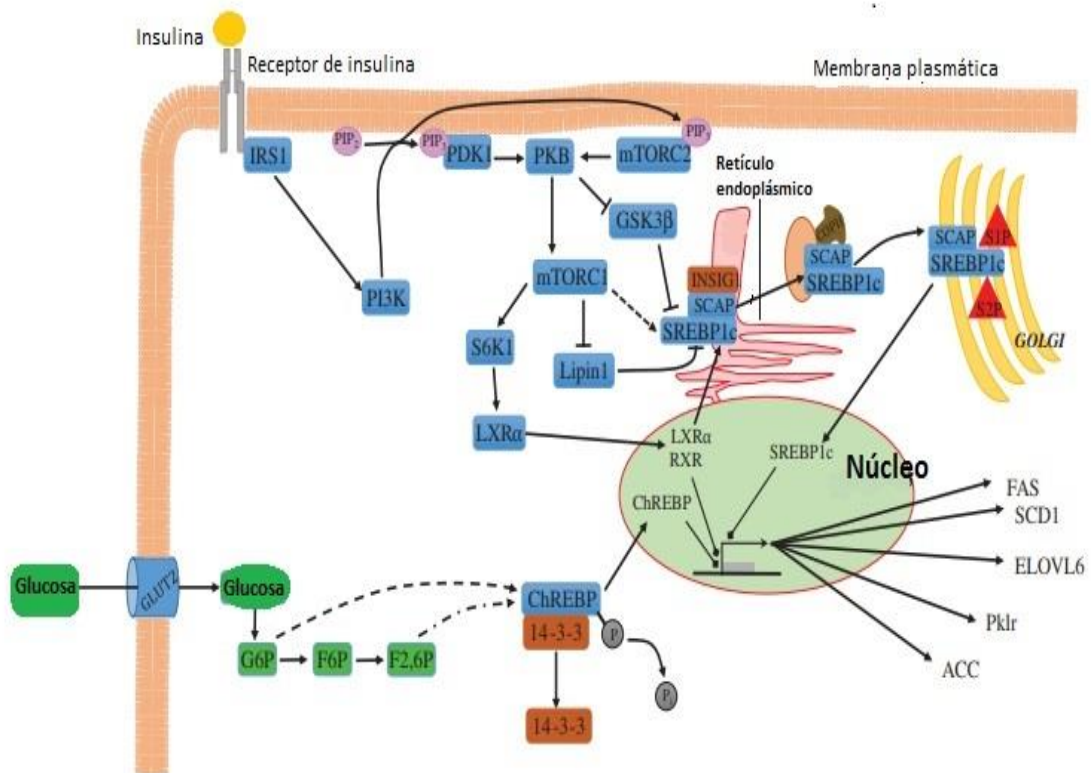
unión al elemento regulador de esterol 1c (SREBP1c) y la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP). Ambas vías se activan por el aumento de la señalización de la insulina y el aumento de las concentraciones de glucosa, ambas inducidas por la alimentación (Figura 2) (Kawano y Cohen 2013, Oosterveer y Schoonjans, 2014).

La actividad de SREBP1c es regulada positivamente por la señalización de la insulina, sin embargo, el mecanismo no está completamente dilucidado (Gancheva et al. 2015). La activación de SREBP1c ocurre mediante dos vías principales río abajo del receptor de insulina, ambas involucrando la vía (PI3K) / proteína cinasa B (PKB), una que resulta en la fosforilación de la propia SREBP1c naciente, la otra en la activación del receptor X del hígado (LXR), predominantemente la isoforma LXR $\alpha$  presente en el hígado (Meshkani y Adeli 2009).

La acción de la insulina a través de la vía PI3K / PKB promueve la fosforilación naciente de SREBP1c, lo que conduce a una mayor acumulación de la forma madura de SREBP1c y a niveles reducidos de la forma naciente unida a la membrana de la proteína en hepatocitos de rata y ratones in vivo (Hegart et al., 2005)

ChREBP, en contraste con SREBP1c, se activa por el aumento postprandial de glucosa en hepatocitos. La tasa de glucólisis en estas células aumenta debido al equilibrio citosólico - plasmático de glucosa a través de la proteína de la familia del transportador de glucosa independiente de la insulina, GLUT2 (Mueckler y Thorens, 2013). La activación de ChREBP parece ser estimulada por una serie de moléculas generadas durante la glicólisis, aunque el mecanismo exacto no está claro; se ha sugerido que la regulación principal de ChREBP es a través de la desfosforilación de Ser196 y otros sitios de fosforilación de la PKA o cinasa activada con monofosfato de adenosina (AMPK), lo que conduce a la disociación de la proteína en el citosol, la translocación a núcleo y activación de genes que contienen el elemento de respuesta a los carbohidratos (ChoRE) (Uyeda and Repa, 2006). Sin embargo, los cambios en el estado de fosforilación pueden no ser el único mecanismo de regulación. El resultado de esta ruta aún no definida es la regulación positiva de genes que

contienen el ChoRE, incluyendo aquellos genes que codifican proteínas integrales de la vía DNL tales como FAS, ACC y también piruvato cinasa, que proporciona el precursor de acetil CoA como sustrato lipogénico a través de la actividad de la piruvato deshidrogenasa (Ma et al., 2005). A este proceso es resumido en el esquema 2.



**Esquema 2.** Regulación de la lipogénesis de novo por LXR- $\alpha$ , SREBP1c y ChREBP. La activación del receptor de insulina conduce a la fosforilación del sustrato 1 del receptor a insulina (IRS1), que posteriormente activa la fosoinositol 3-cinasa (PI3K), a cinasa dependiente de fosoinositido (PDK1), diana del complejo 1 de rapamicina de mamífero (mTORC1), la cual activa a la proteína ribosómica S6 cinasa 1 (S6K1), que conduce a la localización nuclear del receptor X del hígado  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ), así de manera directa o indirecta mTORC1 ayuda a la maduración de SREBP1c desde RE hasta Golgi, promoviendo su translocación a núcleo. Por otro lado, la vía glucolítica produce intermediarios que conducen a la desfosforilación de ChREBP y disocian a la proteína citosólica, conduciendo a ChREBP nuclear y la posterior transcripción de sus genes lipogénicos diana. Líneas continuas (vía directa), líneas discontinuas (vía indirecta). (Tomado y modificado de Sanders et al., 2016.).

### 2.2.7 Equilibrio de los ácidos grasos-triglicéridos

Diversos investigadores consideran que el almacenamiento disfuncional de los ácidos grasos es un punto fundamental en la aparición de la RI, como

causa o consecuencia (Batsis, Nieto-Martinez, y Lopez-Jimenez 2007). En 1992, se propuso una interpretación diferente de cómo el paradigma de la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hiperglucemia e hipertrigliceridemia pueden estar interrelacionados. Sugiriéndose que, en lugar de una patología centrada en el metabolismo de la glucosa, quizás la patogénesis de la resistencia a la insulina se entiende mejor como una desregulación del metabolismo de los lípidos, debido al aumento de las tasas de lipogénesis hepática (McGarry, 1992). Se acepta que la resistencia a la insulina se asocia con alteraciones en el metabolismo de los lípidos hepáticos. Bajo esta hipótesis, el círculo vicioso propuesto sigue siendo centrado en procesos de hiperinsulinemia que conducen al aumento de lipogénesis de novo (DNL, por sus siglas en inglés), la cual induce una mayor resistencia a la insulina (Williams et al., 2013), con fracaso en la supresión de gluconeogénesis, e hiperglucemias sostenidas, las cuales estimulan más secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas

Por otro lado, los AGL también producen lipotoxicidad en las células  $\beta$  pancreáticas, provocando a largo plazo una disminución en la secreción de insulina. La RI también contribuye al desarrollo de hipertensión, debido a la pérdida del efecto vasodilatador de la insulina y el efecto vasoconstrictor provocado por los AGL. La RI también incrementa la viscosidad plasmática, induciendo un estado protrombótico que permite la liberación de citocinas proinflamatorias desde los adipocitos (Després y Lemieux 2006). Los depósitos de grasa visceral contribuyen a la RI en mayor medida que la grasa subcutánea, debido a que su lipólisis permite un aumento del suministro de AGL al hígado por medio de la circulación esplénica (Adiels et al. 2008).

#### 2.2.8. Dislipidemia

El SM también está caracterizado por la presencia de dislipidemia, que es una condición determinada por anomalías en el metabolismo de las lipoproteínas y el colesterol, que conduce a un aumento en los niveles de TG, VLDL, LDL y AGL, además de una disminución de HDL (Adiels et al. 2008). La dislipidemia asociada a RI, comienza con sobreproducción de TG y su empaquetamiento en VLDL consecuencia del aumento en la síntesis de novo en

el hígado y a la liberación de AGL por parte de los adipocitos (Després y Lemieux 2006).

Las VLDL son la principal forma de transporte de TG endógenos hacia los tejidos, por acción de lipoprotein lipasa (LPL) que se encarga de la hidrólisis de los TG, las VLDL son transformadas en IDL y finalmente en LDL (Zabielski et al. 2018). En estados de RI, se generan VLDL, IDL y LDL ricas en TG (Unger et al. 2010) las cuales disminuyen la dinámica de la hidrólisis, por lo tanto, pasan mayor tiempo en circulación, lo que contribuye al desarrollo de esteatosis y aterosclerosis (Sesti 2006).

### 2.3 Nuevos abordajes terapéuticos en el Síndrome metabólico

Actualmente existe un gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de los signos y síntomas del SM. El carácter esencial con el que cuentan los iones metálicos y sus compuestos biomoleculares en el desarrollo y funcionamiento de los seres vivos ha estimulado un creciente interés en el campo de los metalofármacos con actividad sobre la homeostasia de lípidos y carbohidratos. Numerosas investigaciones han demostrado que una variedad de complejos con base en V, como sulfato de vanadilo,  $\text{VO}_4^{2-}$ ; metavanadato de sodio  $\text{NaVO}_3$ , bis (etil maltolato) oxoV (IV) (BEOV) y el polioxovanato decavanadato ( $\text{V}_{10}\text{O}_{28}$ )<sup>6-</sup>, exhiben una marcada actividad insulinomimética (Treviño, Sánchez-Lara, et al. 2015a) (Adachi et al. 2006)

### 2.4. Generalidades del Vanadio

El vanadio (V) (Z=23), es un metal de transición situado en el grupo 5B de la tabla periódica, cuenta con una masa atómica de 50.9415 g/mol, cuenta con dos isótopos estables  $^{50}\text{V}$  y  $^{51}\text{V}$  que representa el 99.75% y tiene la particularidad de existir en una amplia variedad de estados de oxidación -1, 0, +1, 2+, +3, +4, +5. Sin embargo, los estados de oxidación más comunes para V son (III), vanadil (IV) y vanadato (V), este último es el más común pero también el más tóxico (Imtiaz et al. 2015). El compuesto más común formado por V es el pentóxido de V ( $\text{V}_2\text{O}_5$ ), sin embargo, metavanadato de amonio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) y ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) también son formas comunes que adopta este elemento. V tiene configuración electrónica (Ar)  $3d^34s^2$ , cuenta con un punto de fusión 1910 °C, un

punto de ebullición correspondiente a 3407 °C y una densidad de 6.11g/cm<sup>3</sup> a 20 °C. Por otro lado, V tiene la particularidad de ser el único elemento de la tabla periódica considerado como doblemente descubierto, la primera en 1801 por Andrés Manuel del Río y posteriormente en 1831 por Nils Gabriel Sefstrom, quien lo redescubre en una mina en Taberg, Suecia. (Tripathi, Mani, y Pal 2018)

## 2.5. Fuentes de exposición a Vanadio

### 2.5.1. Fuentes naturales

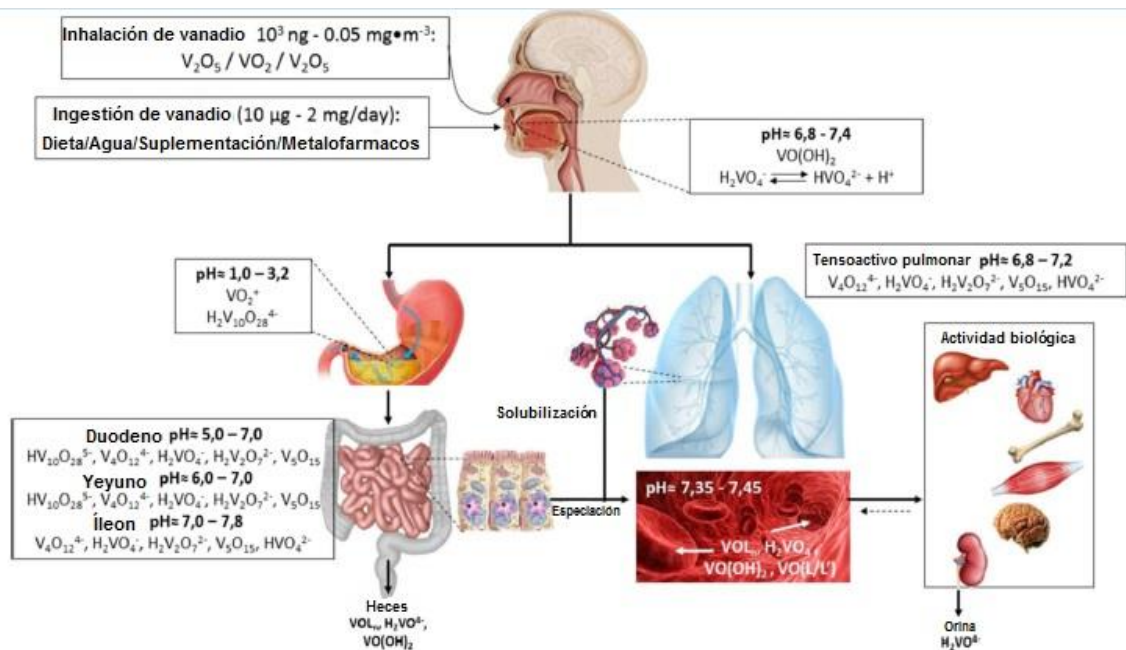
El vanadio es el vigésimo segundo elemento más abundante de nuestro planeta (0.013% p/p), tiene una concentración promedio en la corteza terrestre de 159 g/t y 0.14 mg/kg ubicando a este elemento en el quinto lugar dentro de los metales de transición presentes en la corteza terrestre. Así mismo, V se encuentra ampliamente distribuido en mares, océanos, atmosfera, así como en todos los organismos. Por lo que el ser humano se expone a este metal tanto por vía enterogástrica como respiratoria (Moreira et al. 2019).

### 2.5.2. Vías de entrada y distribución de Vanadio

Los pulmones constituyen el principal depósito de V proveniente del ambiente. Sin embargo, menos del 5% del V administrado por vía oral es absorbido intestinalmente. Las especies de V relacionadas con la ingestión vía oral son vanadatos ( $\text{HVO}_4^{2-}$ ) y vanadil ( $\text{VO}^{2+}$ ). No obstante, la captación de Vanadato es de 3-5 veces mayor que la captación de vanadil. En el estómago, el V ingerido es reducido parcialmente a  $\text{V}^{4+}$  y precipita a hidróxidos de vanadil ( $\text{VO}(\text{OH})_2$ ) y permanece en esta forma hasta pasar duodeno. Ya en el duodeno ( $\text{V}^{5+}$ ) permaneciendo en esta forma hasta finalmente ser excretado en heces. La actividad farmacológica de los compuestos de V es influenciada por la estabilidad del complejo, la interconversión y el estado de oxidación de las formas de  $\text{V}^{4+}$  y  $\text{V}^{5+}$ . En condiciones fisiológicas, las sales de oxovanadato pueden actuar como cationes o aniones. Las formas catiónicas son más comunes a un pH bajo y las aniónicas a pH neutro y alto. Sin embargo, cuando V actúa como un anión, este adopta la conformación de fosfato. El análogo V-fosfato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ,  $\text{HVO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ) es particularmente importante ya que puede interactuar con proteínas como fosfatasas y fosforilasas (Tripathi, Mani, y Pal 2018).

Una parte del V ingerido es absorbido y pasa a circulación sanguínea, donde se somete a especiación redox y se compleja con proteínas séricas como transferrina y albúmina. Además estudios han demostrado que  $V^{4+}$  puede unirse a moléculas de bajo peso molecular, como citrato, oxalato, lactato y fosfato (Samart et al. 2018). Comúnmente, el V en plasma se encuentra en un rango de 0.016-0.15 ng/mL el cual se distribuye y almacena en diferentes tejidos en tres fases: La primera fase tiene un declive rápido que va de 30 minutos a 1h. La segunda fase con un declive intermedio ( $t_{1/2} \approx 26$  h) y una tercera fase de declive lento ( $t_{1/2} \approx 10$  días). Por otro lado, la distribución de V en tejidos (humanos, ng/g en peso húmedo) corresponde a 7.5 para hígado, tiroides 3.1, riñón 3, pulmón 2.1, corazón 1.1, musculo y grasa 0.55. Su eliminación es por vía urinaria, y cerca del 50% del V es excretado después de 12 días. En hueso, V puede reemplazar al fosfato de la hidroxiapatita ( $Ca_5(PO_4)_3 OH$ ) por tanto, la duración se extiende hasta un mes con una vida media de 4-5 días (Fig. 3).

Gran parte de V en torrente sanguíneo se encuentra unido a transferrina, donde  $V^{4+}$  tiene la capacidad de unirse al sitio de unión con  $Fe^{3+}$ , desplazando del 30%-70% de este metal de la transferrina. (Sanna et al. 2017). Albúmina juega un rol importante en el transporte de V, se ha identificado un sitio de unión de alta afinidad (VBS1) que puede interaccionar con  $VO^{2+}$  y al menos cinco sitios de unión a V de afinidad relativamente baja (VBS2)(Figura 3)(Jakusch y Kiss 2017).



**Esquema 3.** Especiación y solubilización de V dependiente de pH en diferentes cavidades y tejidos. Tomado y modificado de Treviño et al 2018.

## 2.6. Mecanismo de incorporación celular del Vanadio

Los ligandos antes mencionados influyen en gran medida en la eficacia de los diversos compuestos de V al determinar su transporte, estabilidad y biodisponibilidad a diferentes tejidos. En particular, la biodisponibilidad de los compuestos de V es de suma importancia ya que está relacionada con su eficacia terapéutica. Los compuestos de V alcanzan la compartimentación celular después del reconocimiento del ligando específico por receptores de la superficie celular para posteriormente ser endocitados (Ruiz-Torres 2005). Luego las bombas de protones acidifican el ambiente intra vesicular y eventos celulares específicos producen cambios conformacionales que promueven la salida de V y que este se movilice hacia citoplasma, lo cual probablemente involucre al transportador de metales divalentes 1 (DMT1). Las especies de V consiguen ingresar a la célula por medio de difusión, empleando para ello los canales de sulfato o fosfato, transportadores membranales de citrato, transportadores de lactato (transportador monocarboxilado, MCT1) y el transportador de aniones orgánicos (OCT). Después de la recaptura celular, los compuestos de V pueden ser sujetos de especiación y modificaciones redox, las

cuales impactaran en su biodisponibilidad, sitio de interacción y efecto terapéutico y/o tóxico (Wong et al. 2018).

## 2.7. Interconversión entre especies de V y balance redox celular

La especiación del V está a cargo del pH, la arquitectura celular y de la estabilidad de quelantes biológicos o sintéticos. Las células que componen a los organismos vivos están divididas por membranas en diferentes compartimentos y vesículas, cada compartimento tiene un pH diferente dependiente del estado fisiológico, fisiopatológico y patológico. El estado celular influye en la formación de diferentes especies oligoméricas de V con diferentes estados de oxidación. Diversos estudios demuestran que V puede sufrir reacciones de especiación en células vivas. EPR y RMN de  $^{51}\text{V}$  ha proporcionado evidencia de la presencia de formación de tetrámero de vanadato y especies de vanadilo después de que las células fueron expuestas al vanadato monomérico (Chatkon et al. 2013). La RMN de  $^{51}\text{V}$  también evidenció la formación de decavanadato ( $\text{V}_{10}\text{O}_{28}$ ) $^{6-}$  en células con un pH de 6,5 y una concentración de vanadato de 5 mM, lo que demuestra que el V se puede concentrar dentro de los orgánulos celulares ácidos. Se ha demostrado que la distribución del V dentro de la célula depende del compuesto que se administre (Imtiaz et al. 2015).

El V cuenta además con la capacidad de reducirse ( $\text{V}^{+5}$  a  $\text{V}^{+4}$ ) en forma de vanadilo in vivo por especies que contienen grupos tiol como: cisteína y glutatión. Así, el grado en que el  $\text{V}^{+5}$  que se reduce a  $\text{V}^{+4}$  es un factor importante que influye en la cantidad de metal/compuesto que se transporta dentro y fuera de las células (Chatkon et al. 2013). La interconversión entre especies de V (principalmente  $\text{V}^{+4}/\text{V}^{+5}$  y en menor grado en  $\text{V}^{+3}$ ) ocurre constantemente dentro de las células. Estudios previos sugieren que los complejos ligando-V no son estables en el cuerpo. Por lo tanto, el V administrado buscará la especiación necesaria para una distribución equilibrada (Papapetropoulos et al. 2004). Este comportamiento prueba que la complejación y especiación del V es un proceso dinámico en un ambiente hidráulicamente inestable. Compuestos reductores como glutatión (GSH) y ácido ascórbico interactúan y reducen fácilmente el V de  $\text{V}^{+5}$  a  $\text{V}^{+4}$ ., sobre todo en regiones con poco oxígeno, donde la reducción es

completa, sin embargo, en presencia de oxígeno se establece un equilibrio redox. Aunque GSH es un agente reductor bastante ineficaz, las interacciones redox estabilizan el estado de oxidación del V a través de la complejación con GSH oxidado (GSSG). La alta concentración intracelular de GSH aumenta la posibilidad de formación de  $VO^{2+}$  y su complejación con GSH o GSSG. Se ha demostrado que tanto GSH como GSSG son potentes aglutinantes de  $VO^{2+}$ . Otros agentes reductores eficaces, como  $NAD^+/NADH$ ,  $NADP^+/NADPH$ ,  $FAD^+/FADH$  o ascorbato, pueden interconvertir  $V^{5+}$  y  $V^{4+}$ , así como a especies de  $V^{3+}$  (Willsky, Takeuchi, y Tracey 2010).

Por debajo de pH 6 y a una concentración superior a 0.2 mM es posible conseguir la formación de polioxovanadatos como el anión decavanadato ( $V_{10}O_{28}$ )<sup>6-</sup> (Manuel Aureliano 2011, Samart et al. 2018, Neh et al. 2008). Este compuesto se encuentra conformado por diez átomos de V y 28 de oxígeno, ensamblados en una estructura compacta que mide 8.3Å x 7.7 Å x 5.4 Å, en la cual los átomos de V se encuentran posicionados en los intersticios de las diez unidades ( $VO_6$ ) (M. Aureliano y Ohlin 2014). Cuenta con una vida media de cerca de 9 horas a pH 7.5 y 25 °C. Este rango de descomposición incrementa sustancialmente a valores de pH altos. En contraste a valores de pH bajos la estabilidad cambia significativamente, desde ser un polianion hasta ser protonado (Manuel Aureliano 2011). A pH cercanos a 1 y 25 °C, el tiempo de vida media de decavanadato es de tan solo 6 s. Estas especies decaméricas también cuentan con actividad biológica al poder interactuar con proteína como miosina y actina que se encuentran implicadas en el proceso de contracción muscular, además se ha reportado que decavanadato tiene un efecto insulín-potenciador en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina y en modelos de murinos diabéticos inducidos con aloxano o por dieta hipercalórica (Treviño, Sánchez-Lara, et al. 2015).

## 2.8. Vanadio y Síndrome metabólico

El estudio de los compuestos de V comienza desde los años 70's, cuando se describió el carácter terapéutico (Crans et al. 2004) y el posible uso biomédico que tienen muchos de los compuestos que contienen V con estados de oxidación +4 y +5. Como se ha demostrado el tratamiento de Diabetes mellitus, cáncer,

infecciones bacterianas e infecciones virales (Bishayee et al. 2010). Los efectos terapéuticos mostrados por especies de V, se han atribuido principalmente a que el vanadato tiene similitudes electrónicas y estructurales al fosfato (Samart et al. 2018). En este sentido el vanadato puede adoptar una geometría bipiramidal estable, similar al estado de transición que adopta fosfato al interactuar con las enzimas encargadas de su metabolismo (quinasas y fosfatasas) e inhibir su actividad biológica (Pereira et al. 2009).

Los primeros compuestos de V probados en contra de los signos del SM y la diabetes fueron las sales simples, los cuales demostraron que la concentración terapéutica estaba muy cercana al umbral toxicológico. En un esfuerzo por aumentar la eficacia y disminución de la toxicidad, los ligandos orgánicos coordinados V han ido en desarrollo (Rehder 2008). Se han realizado estudios limitados en humanos con sales de V (ortovanadato de sodio y sulfato de vanadilo), estos se han llevado a cabo con pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, con un régimen de dosificación de 2 a 6 semanas de 25 a 100 mg de la sal por día. Estas dosis son más bajas que las utilizadas en roedores y causan algunos malestares gastrointestinales, pero en general fueron bien tolerados, observando una mejora en la sensibilidad de insulina, la síntesis de glucógeno y supresión de la producción de glucosa hepática, también se demostró que el tratamiento con estas sales aumentan la fosforilación de la proteína tirosina del receptor de insulina (Willsky, Takeuchi, y Tracey 2010).

Actualmente sólo se han concretado ensayos clínicos de fase 1 en humanos para bis (etil-maltolato) oxovanadio (IV) (Willsky, Takeuchi, y Tracey 2010). El bis(2-etil-3-hidroxi-4-pironato) oxovanadio (IV) (BEOV) y su análogo el bis(3-hidroxi-2metil-4-pironato) oxovanadio (IV) (BMOV), ambos compuestos han mostrado ser capaces de mejorar la glicemia de ratas diabéticas con hiperglicemia, en estudios tanto crónicos como agudos. Esto llevo a BMOV a ser el compuesto de referencia con el que diversos compuestos antidiabéticos con base en V son comparados (Adachi et al. 2006). Con la descripción de BMOV y BEOV, una considerable cantidad de compuestos euglicémiantes con base en V han sido reportados y comparados contra BMOV Y BEOV de entre los cuales destacan piridin-2,6-dicarboxilado dioxoV (V) (V5-dipic), bis (maltolato) oxoV (IV) (VO-(malto)<sub>2</sub>) y amavadina análoga bis (N-hidrolaminaiminoacetato) V (IV)

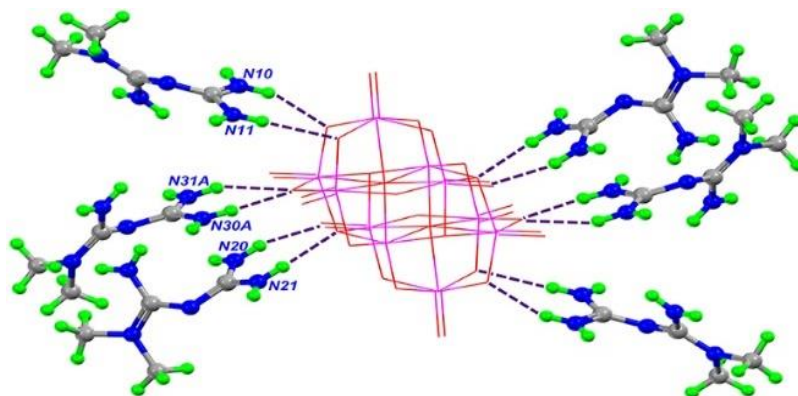
fueron analizados también en glucosa basal, consumo de glucosa estimulado por insulina en adipocitos de rata (Korbecki et al. 2016).

Por otro lado, los compuestos metavanadato y decavanadato han sido estudiados en un amplio número de sistemas biológicos (sistemas enzimáticos aislados, líneas celulares y en modelos animales) (Pereira et al. 2009), debido a su uso potencial en el tratamiento del SM y la diabetes (Crans et al. 2004). En este sentido, las primeras pruebas clínicas donde se empleó metavanadato de sodio datan de la década de los 90's. En estas pruebas, luego de la administración oral de una dosis de 50-125 mg/día durante 2-4 semanas, se registró la disminución en los niveles de glucosa basal y los requerimientos diarios de insulina en pacientes con DM1 (Adachi et al. 2006). Mientras tanto, la administración oral de metavanadato de sodio en pacientes con DM2, incrementó la sensibilidad a la insulina, la reducción de los niveles de glucosa basal, la disminución de los niveles de hemoglobina glicosilada y la supresión en la producción de glucosa hepática endógena (Ortega-Pacheco et al. 2018). La administración oral de metavanadato de sodio en pacientes sanos mostro un efecto hipoglucemiante y la disminución en los niveles de colesterol sérico y libre, por lo que se sugiere que puede interaccionar directamente en la biosíntesis del colesterol. Por otro lado, en hepatocitos y adipocitos aislados, se observó que el metavanadato de sodio modula la homeostasia de la glucosa (Pereira et al. 2009), el metabolismo de lípidos, estimula la lipogénesis y suprime de la actividad lipolítica (Makinen y Salehitazangi 2014).

Por su parte, el decavanadato es un polioxovanadato más grande y estable, por lo que tras su administración en modelos murinos de DM1, así como en adipocitos de rata aislados, ha mostrado ser un mejor regulador lipídico y un mejor regulador del consumo de glucosa que metavanadato de sodio (M. Aureliano y Ohlin 2014). Asimismo, el decavanadato puede reducir los niveles de glucosa basal, aumentar la sensibilidad a la insulina, normalizar la síntesis de glucógeno y disminuir la concentración de ácidos grasos no esterificados, después de su administración crónica en modelos murinos hiperglucémicos. Debido a su alta carga iónica, el ión decavanadato puede ser estabilizado por una gran cantidad de contraiones (protones, metales alcalinos, amonio,

alquilamonio, fosfonio y cationes orgánicos)(Lin, Tan, y Wang 2011)(Sánchez-Lombardo et al. 2014)(Wilsey, Matheny, y Scarpace 2015), entre ellos el ion amonio o Metformina; en su forma de clorhidrato de metformina (HMetf)Cl, que es un compuesto mundialmente empleado en el tratamiento de la DM2. En este sentido decavanadato de amonio en una dosis de (50  $\mu$ M) incrementa (6 veces) la captación de glucosa comparado con el basal, seguido por BMOV (1mM). En presencia de insulina (10 nM) decavanadato de amonio incremento (50%) el consumo de glucosa en comparación con la administración de BMOV y metavanadato en las mismas concentraciones (Copps y White 2012).

Actualmente, se han informado el compuesto decavanadato-metformina con la idea de inducir un efecto simbiótico entre estos dos compuestos con capacidades euglicemiantes. En nuestro grupo de trabajo ha sido posible generar una sal basada en decavanadato y Metformina [(HMetf)<sub>6</sub>(V<sub>10</sub>O<sub>28</sub>)], abreviado como Metf-Deca (Figura 4) (Sánchez-lara et al. 2018). Estudios previos, muestran que la administración vía oral de decavanadato de metformina (MetfDeca, Fig. 1) en una dosis de 2.5  $\mu$ M/ 2 veces a la semana/ 8-12 semanas (dosis 48, 000 veces menor que la dosis administrada de metformina) en modelos de ratas diabéticas por STZ (Treviño y González-Vergara 2019), es suficiente para mejorar la sensibilidad a la insulina y regular la síntesis de glucógeno, además de disminuir los niveles de glucosa basal, la concentración sérica de triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol VLDL. Por todo esto, Metf-Deca posee un gran potencial farmacológico como: hipoglucemiante, hipolipemiante y regulador metabólico. Estos compuestos frecuentemente han sido mencionados como insulino miméticos o insulino potenciadores. Sin embargo, hasta la fecha no se ha dilucidado el mecanismo de acción de estos compuestos, en particular del compuesto Metf-Deca. Sumado a esto, la insulina tiene efectos particulares en cada tejido, aún y cuando emplea la misma vía de señalización en cada uno de ellos. Por lo tanto, resulta necesario el comprender esta vía de señalización y la acción particular para poder diferenciar el mecanismo por el cual actúa el V.



**Esquema 4.** Interacción entre  $(\text{HMetf})_6$  y  $(\text{V}_{10}\text{O}_{28})^{6-}$ . Tomada y modificada de Sánchez-Lara et al., 2018.

### 3. Planteamiento del problema

La prevalencia del SM se ha convertido en un problema grave de salud pública dentro de la población mexicana debido a que puede incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades cardíacas y patologías crónico-degenerativas: como hipertensión y *diabetes mellitus*, además de tener una tasa de incidencia que actualmente se mantienen al alza. En el 2016, el gobierno federal destino el 23.68% del gasto público en salud, tan solo para atender el costo total provocado por la obesidad, presión arterial alta y diabetes mellitus en la población mexicana; que ascendió a cerca de 6, 620 millones de pesos (Trujillo-Hernández et al. 2017). Por otro lado, el costo anual de un paciente obeso que decide modificar su dieta y actividad física significó un gasto extra de hasta 92, 860 pesos en el gasto familiar. Según la ENSANUT 2018, el 35.6 % de la población de 5-11 años y el 75.2% de los adultos mayores de 20 años, presentan algún grado de sobrepeso y obesidad. Sumado a esto, el 56.6% de la población encuestada refirió ser atendida por los servicios públicos de salud, lo que convierte al SM en un problema de salud pública y económico insostenible. En los últimos años, se ha discutido el rol biológico que tiene el V y el uso potencial de sus sales (metavanadato de sodio) y ([HMetf]<sub>6</sub>[V<sub>10</sub>O<sub>28</sub>]) como posibles agentes terapéuticos. Sin embargo, no se han dilucidado con claridad el papel que tiene el V como tratamiento para las enfermedades metabólicas.

#### **4. Justificación**

El SM ha cobrado un alto impacto en la sociedad debido a la pérdida de salud y calidad de vida; así como por el alto costo de la atención médica y la pérdida de actividad económica potencial, por lo que se prevé que en un futuro cercano sea insostenible. Por lo tanto y ante los problemas que ocasionan las terapias farmacológicas tradicionales, se vuelve de suma importancia el estudio y caracterización del mecanismo por el cual los compuestos de V mejoran los parámetros clínicos del SM y por lo tanto sus comorbilidades. En este sentido, se sabe sobre la capacidad de los compuestos de vanadio de interaccionar con la vía de señalización de insulina, potenciando y mejorando la actividad biológica de dicha hormona. Una de las rutas de señalización de importancia, al ser una de las más afectadas en las enfermedades metabólicas en la formación y resguardo de glucógeno. Esta, constituye una de las fuentes energéticas más importantes en el organismo y al perder su regulación existen desvíos metabólicos que favorecen dislipidemias, con graves consecuencias para los pacientes. Los compuestos de V, en partículas de decavanadatos, al ser administrados como tratamiento podrían resultar en una mejora de los parámetros clínicos y metabólicos antes mencionados, por medio de su interacción en uno o más de los nodos de la cascada de señalización de la insulina, propuestos por nuestro grupo de trabajo. Particularmente, la posible mejora en la síntesis y dinámica de la formación de glucógeno, la cual involucra la cascada de señalización del brazo metabólico de la acción de la insulina, implicaría clínicamente mejoras en la homeostasia de la glucosa, lo cual es una de las principales alteraciones en el SM, que progresa rápidamente a entornos diabetogénicos. Por lo que, el comprender su probable acción o mecanismo sobre esta vía metabólica y cascada de señalización, establecería el posible uso de metavanadato de sodio, decavanadato de amonio y Metf-Deca como un profármaco de uso terapéutico.

## 5. Objetivo general

Evaluar el efecto de los compuestos decavanadato y Metf-Deca sobre la vía de señalización hepática insulina-glucógeno en rata Wistar con síndrome metabólico.

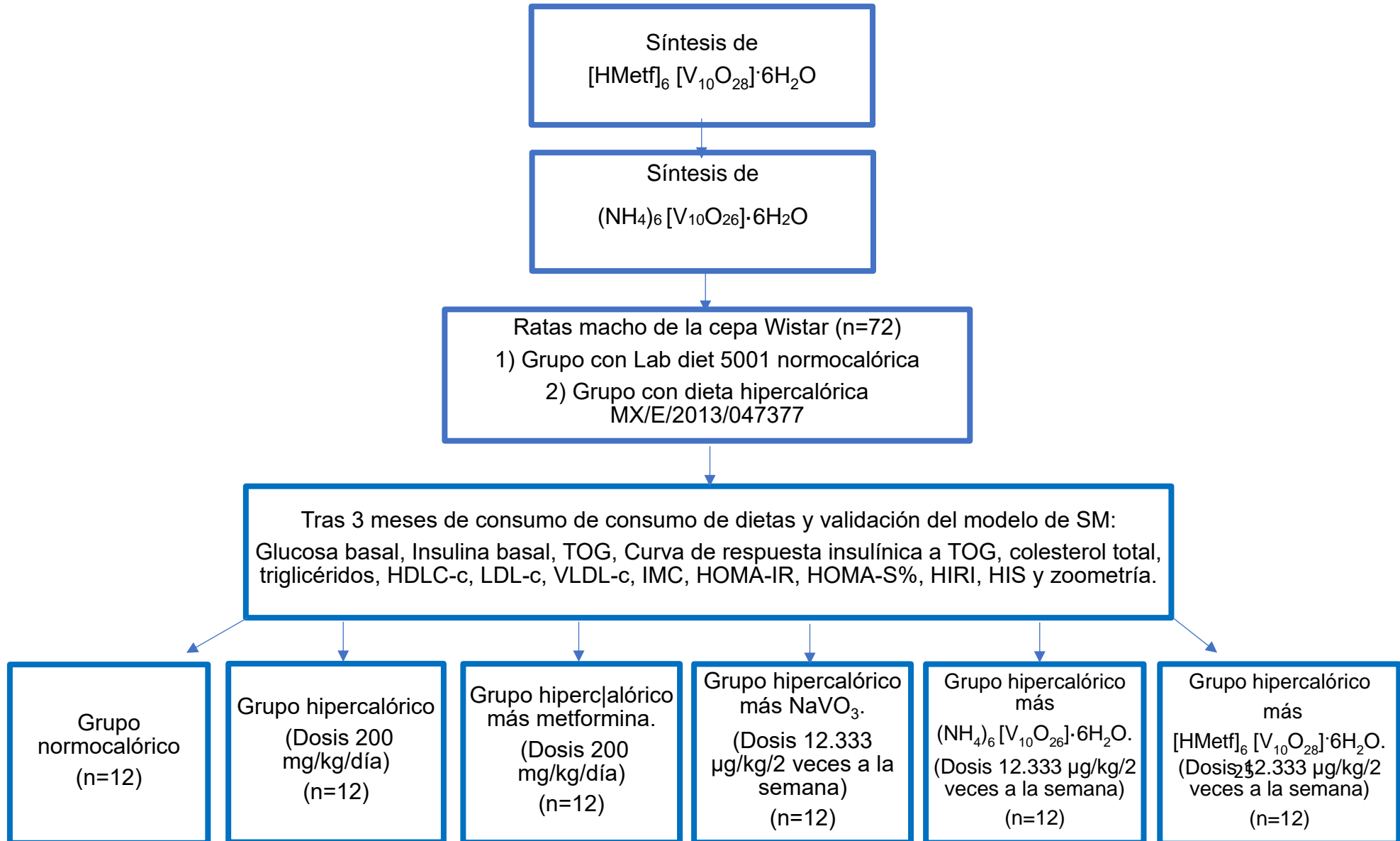
## 6. Objetivos particulares

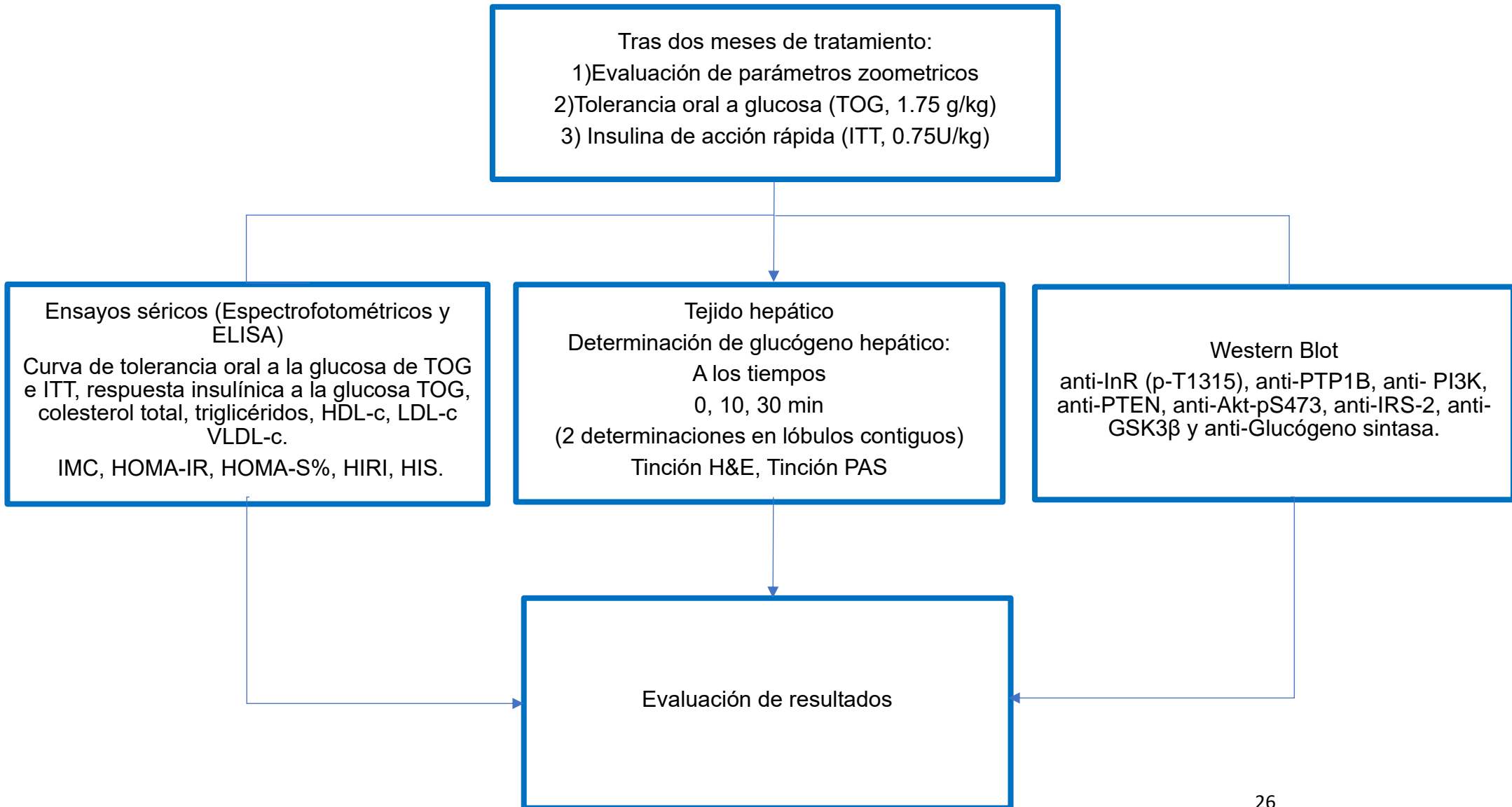
1. Optimizar la síntesis y caracterización de los compuestos de vanadio:  $(\text{NH}_4)_6 [\text{V}_{10}\text{O}_{26}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{HMetf}]_6 [\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

2. Evaluar el efecto del tratamiento con los compuestos de vanadio sobre los parámetros zométricos y bioquímicos clínicos característicos del síndrome metabólico.

3. Evaluar en el tejido hepático el efecto del tratamiento con los compuestos de vanadio sobre la vía de señalización de la insulina y dinámica de glucógeno

## 7. Diseño experimental





## 8. Material y métodos

### 8.1 Síntesis y cristalización de los compuestos: $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

La síntesis de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  fue realizada con el método propuesto por Sánchez-Lara (Ver anexo 1), mientras que la síntesis de  $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  se realizó con el método modificado propuesto por Todorovic (Todorovic et al. 2005) (Ver anexo 2). Todos los experimentos se llevaron a cabo en solución acuosa a temperatura ambiente (25 °C). La caracterización de ambos compuestos se llevó a cabo por medio de espectroscopia de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear. El IR fue obtenido a través de discos de KBr en el rango de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  empleando un espectrofotómetro IR Digilab, Mod. Scmitar. Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $\text{H}^1$  y  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos a 500 MHz y 125 MHz respectivamente, mientras que el espectro de  $^{51}\text{V}$ -RMN fue obtenido a 131.5 MHz con un espectrómetro Bruker AVANCE III empleando para ello agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) y buffer PBS.

### 8.2 Animales

Se emplearon 72 ratas de la cepa Wistar con un periodo de destete de 15 días y con un peso de entre 70-80 g. Los animales fueron obtenidos del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y se mantuvieron bajo condiciones controladas de ciclos de luz- oscuridad de 12 horas y una temperatura de 18-26 °C. Todos los animales se mantuvieron en jaulas de propileno con una cama de serrín estéril y disponibilidad de alimento y agua "Ad libitum". Se mantuvo un monitoreo continuo hasta que las ratas alcanzaron 100 g de peso, se alimentaron con dieta normocalórica de mantenimiento Lab Diet 5001. Una vez alcanzados los 100 g, los animales fueron divididos en dos grupos: El grupo control NC fue alimentado con dieta normocalórica Lab Diet 5001 (n=12) y el grupo HC, alimentado con dieta hipercalórica MX/E/2013/047377 (n=60), ambos mantuvieron estas condiciones durante 90 días. Todos los procedimientos se realizaron bajo las normas de la "Guía para el cuidado y uso animales de laboratorio de México" y fueron

aprobados por el Comité de Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio.

### 8.3. Grupos experimentales

Una vez concluida la inducción del modelo de SM, los animales del grupo HC fueron divididos aleatoriamente en cinco grupos:

- a) Grupo 1, dieta hipercalórica ad libitum (MX/E/2013/047377) (n=12)
- b) Grupo 2, dieta hipercalórica ad libitum + Metformina (200 mg/kg/día) (n=12)
- c) Grupo 3, dieta hipercalórica ad libitum + metavanadato de sodio (12.33 µg/kg/ 2 veces a la semana) (n=12)
- d) Grupo 4, con dieta hipercalórica ad libitum + decavanadato de amonio (12.33 µm/kg/ 2 veces a la semana) (n=12)
- e) Grupo 5, con dieta hipercalórica ad libitum + Metf-Deca (12.33 µm/kg/ 2 veces a la semana) (n=12)

Los tratamientos con metformina, metavanadato de sodio, decavanadato de amonio y Meft-Deca fueron administrados vía oral durante 60 días. Durante este periodo de tiempo, los animales del grupo NC fueron alimentados con dieta LabDiet 5001.

### 8.4. Zoometría

Las medidas corporales (peso, talla, circunferencia abdominal) fueron monitoreados semanalmente. El peso fue medido en una balanza digital tarada con una caja de policarbonato y serrín. La talla se midió con ayuda de una cinta métrica flexible, tomando desde la base de la cola a la punta de la nariz. El índice de masa corporal (IMC), se calculó con la fórmula:  $IMC = \text{peso} / (\text{talla})^2$  El porcentaje de grasa corporal fue determinado con base al índice Lee: % de grasa corporal =  $[(\text{Peso en g}^{0.333}) / \text{talla en mm}] \times 100$  (Rogers and Webb, 1980).

### 8.5. Obtención de muestras sanguíneas

Cumplido el periodo de tratamiento, los animales de cada grupo fueron puestos bajo condiciones de ayuno de 4 - 5 h. Posteriormente, los animales de

cada grupo fueron separados en dos grupos y sacrificados a los tiempos 0, 10 y 30 minutos, tras recibir una carga oral de glucosa equivalente a 1.75 g-glucosa/kg o una dosis de insulina de 0.75U/kg Humalog Mix75/25 (75% Insulina lispro protamina y 25% Insulina lispro), con la finalidad de evaluar la tolerancia a la glucosa, la respuesta insulínica y la síntesis de glucógeno hepático. Se les extrajo sangre (5 mL) por medio de punción cardiaca, misma que fue colectada en tubos con gel separador. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos, el suero se separó y fue congelado a -70 °C hasta su posterior análisis.

#### 8.6. Tejido hepático

Inmediatamente después de la obtención de las muestras sanguíneas, se realizó la perfusión cardiaca con solución salina isotónica y posteriormente biopsias del lóbulo mayor hepático fue extraído, seccionado y almacenado a -70 °C para su posterior análisis. También biopsias del lóbulo fueron resguardadas en formalina bufferada al 4%.

#### 8.7 Ensayos séricos

La cuantificación de glucosa, triglicéridos, colesterol total y sus fracciones lipoproteicas HDL y LDL (Anexos 3 - 7) fueron analizadas en un espectrofotómetro automatizado AutoKemII con reactivos de la marca Spinreact, según las indicaciones del productor. Los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad VLDL, fueron obtenidos por medio de la siguiente ecuación:  $VLDL = CT - (HDL + LDL)$

La concentración de insulina sérica fue determinada por inmunoensayo de ELISA (Diagnostica Internacional, Mex) (Ver Anexo 8), el complejo antígeno-anticuerpo se midió a una longitud de onda de 415 nm en un lector automatizado Stat fax 2600 (Winerlab, Arg).

#### 8.8. Valoración de la resistencia a la insulina

Se empleó el modelo homeostático de insulinoresistencia (HOMA-IR) para evaluar la resistencia periférica a la insulina (Cacho et al. 2008):

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{glucosa basal} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) * \text{insulina basal} \left( \frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right)}{2430}$$

Por su parte, se empleó el modelo matemático HOMA-S%, para evaluar la sensibilidad global de la insulina, expresado por medio de la siguiente formula:

$$\text{HOMA} - \text{S}\% = \frac{1}{\text{HOMA} - \text{IR}} * 100$$

La resistencia a la insulina y la sensibilidad a esta hormona son independientes para cada tejido. Se evaluó la resistencia hepática a la insulina y la sensibilidad hepática a la insulina por medio de : a) HIRI (Índice de resistencia hepática a la insulina y b) HIS (Índice de sensibilidad hepática) (Treviño, Waalkes, et al. 2015), por medio de las siguientes formulas:

$$\text{a) HIRI} = \text{AUC}_{\text{Glu}(0-30)} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) * \text{AUC}_{\text{Insulina basal}(0-30)} \left( \frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right)$$

$$\text{b) HIS} = \frac{1000}{\text{Glucosa basal} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) * \text{Insulina basal} \left( \frac{\mu\text{U}}{\text{mL}} \right)}$$

## 8.9. Ensayos tisulares

Del hígado se obtuvieron 100 mg por biopsia, de cada uno de los animales de los diferentes grupos, fueron homogenizados con 800  $\mu\text{m}$  de SSI para la determinación de la concentración de triglicéridos siguiendo las indicaciones descritas en el kit comercial (Ver anexo 9). La determinación de glucógeno en tejidos fue realizada mediante la técnica descrita por Bennett en 2007 (Ver Anexo 10)

## 8.10. Estudios histológicos

Los tejidos obtenidos por hepatotectomía fueron fijados en formalina buferada al 4% a pH de 7.4. Posteriormente, se llevó a cabo la deshidratación de las muestras eliminando gradualmente el agua de los tejidos por medio de lavados de xilol y alcohol para finalmente realizar la impregnación con parafina

hasta completar la inclusión, tomando en cuenta el tamaño y la orientación del tejido. Los tejidos fueron cortados en un microtomo Leica RM2125 a un grosor de 4 µm (Ver anexo 11) y colocados en portaobjetos.

#### 8.11. Tinción H&E

Las laminillas con tejidos debidamente identificadas fueron desparafinadas con calor seco dentro de una estufa a 60 °C. Posteriormente, se realizó la hidratación de los tejidos de la siguiente manera: 2 pases de 15 lavados con xilol, 2 pases de 15 lavados con alcohol absoluto, 2 pases de 15 lavados con alcohol al 96%, agua corriente (15 lavados) y finalmente en PBS 1x. Luego, los tejidos fueron teñidas con hematoxilina de Harris (durante 15 min), agua corriente (15 lavados), alcohol ácido (5 lavados) para retirar el exceso de colorante, agua corriente (15 lavados), carbonato de litio (15 lavados) para contraste, agua corriente (15 lavados), finalmente, eosina amarillenta (5 lavados) como colorante de contraste. Posteriormente, se realizó la deshidratación de las muestras con alcohol 96% (15 lavados), alcohol 96% (15 lavados), etanol absoluto (15 lavados), etanol absoluto (15 lavados), xilol (15 lavados) y xilol (15 lavados). Por último, las laminillas fueron montadas con resina sintética y se dejó secar (una noche completa), evitando la formación de burbujas.

#### 8.12. Tinción PAS

Las laminillas con tejidos debidamente identificadas fueron desparafinadas con calor seco dentro de una estufa a 60 °C. Posteriormente, se realizó la hidratación de los tejidos de la siguiente manera: 2 pases de 15 lavados con xilol, 2 pases de 15 lavados con alcohol absoluto, 2 pases de 15 lavados con alcohol al 96%, agua corriente (15 lavados) y finalmente en PBS 1x. Las laminillas fueron sumergidas en ácido peryodico (5 min) para generar grupos aldehído, de los carbohidratos. Posteriormente las laminillas fueron lavadas con agua destilada (5 lavados) y se usó el reactivo de Schiff (30 min en oscuridad) que reaccionó con los grupos aldehído (color rosado intenso). Luego se lavó con agua corriente (15 lavados) y se contrastó con hematoxilina de Harris (durante 15 min) e inmediatamente después fueron lavadas con agua corriente (15 lavados con

agua caliente). Posteriormente, se realizó la deshidratación de las muestras con alcohol 96% (15 lavados), alcohol 96% (15 lavados), etanol absoluto (15 lavados), etanol absoluto (15 lavados), Xilol (15 lavados) y Xilol (15 lavados). Por último, las laminillas fueron montadas con resina sintética y se dejó secar (una noche completa), evitando la formación de burbujas.

Las fotografías obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ, previa transformación a escalas de grises. El análisis de píxeles fue realizado en la zona de interés; después de haber construido curvas de calibración de píxeles.

### 8.13. Ensayos de Western Blot

Las muestras de tejido hepático fueron homogenizadas en buffer RIPA con inhibidores de fosfatasas y proteasas. Luego los homogenizados fueron centrifugados a 13 000 rpm, durante 15 minutos a 4 °C. Las proteínas solubles totales fueron determinados por el método de Bradford, y 40 µg de estas fueron colocadas por carril y sometidas a electroforesis SDS con geles de poliacrilamida a través de geles al 8-12.5%. Inmediatamente después, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF al finalizar la transferencia. La inmunodetección fue realizada con anticuerpos monoclonales y policlonales contra anti-InR (p-T1315), anti-PTP1B (ab189179), anti- PI3K (sc-1637), anti-PTEN (ab76431), anti-Akt-pS473 (sc-101629), anti-IRS-2 (sc-390761), anti-GSK3β (Milipore) y anti-Glucógeno sintasa (sc-390391) (ver anexos 14-21).

La detección del anticuerpo primario fue realizada con la incubación con un anticuerpo anti- conejo y anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano por dos horas a temperatura ambiente en movimiento suave. Los inmunoblots fueron visualizados con un fotodocumentador Uvitec 4.7 Cambridge para medir la abundancia por densitometría digital.

Las fotografías obtenidas fueron analizadas por el programa ImageJ, previa transformación a escalas de grises. El análisis de píxeles fue realizado en la zona de interés; después de haber construido curvas de calibración de píxeles.

#### 8.14. Análisis estadístico

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). Los resultados de la validación del modelo fueron evaluados e interpretados por medio del estadístico t de Student. Los resultados de los ensayos zoométricos y metabólicos fueron evaluados e interpretados por medio del análisis de varianza y comparación múltiple ANOVA de una vía y evaluación Bonferroni post hoc con un nivel de significancia  $p \leq 0.05$ , por medio del programa estadístico GraphPad Prism 5.0.

### 9. Resultados

#### 9.1 Monocristales de $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

El monocristal de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  fue obtenido con un rendimiento 45.4%. Posee un color naranja transparente, una estructura de polígono hexagonal, es capaz de formar conglomerados maclados y cuentan con brillo tras el contacto de la luz.

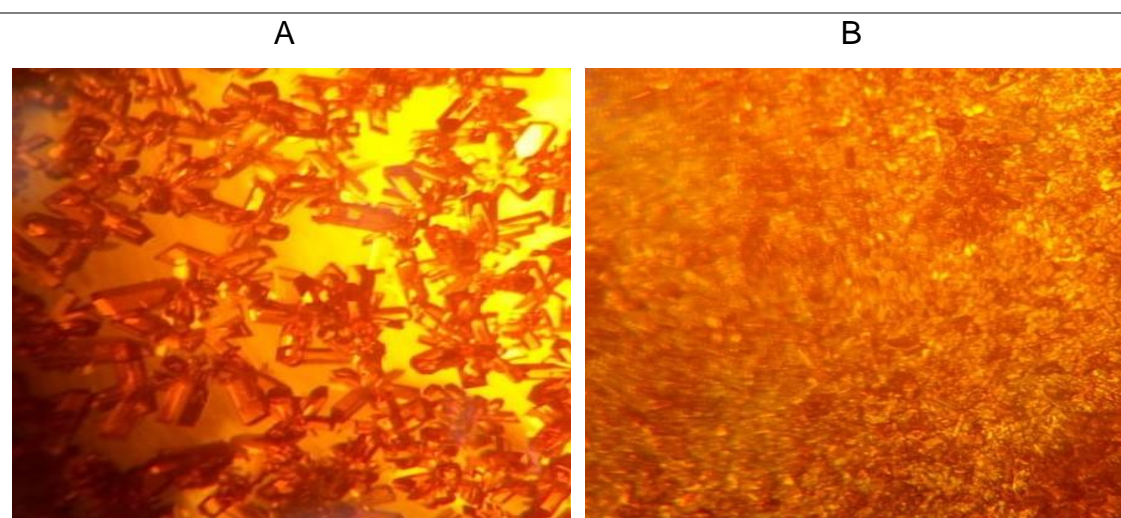


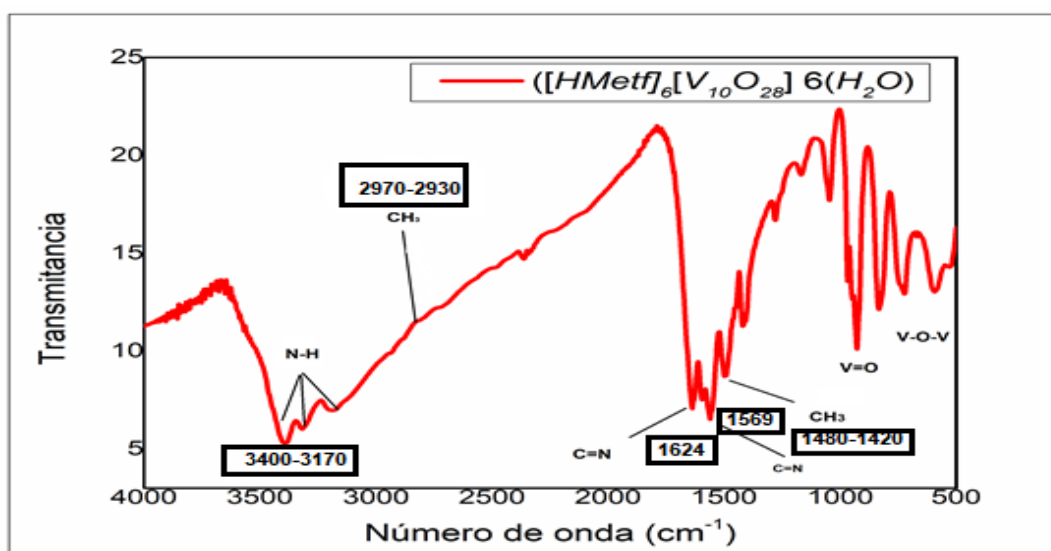
Figura 1. Monocristales de los compuestos de vanadio A)  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (pH=6.3) B)  $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Fotomicrografías tomadas en microscopía óptica 10x

Para el caso de los monocristales de  $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  el rendimiento final alcanzado fue de 62%. Estos monocristales son pequeños y finos, cuentan con una forma de polígono irregular, presentan un color naranja translucido y cuentan con brillo tras el contacto de la luz.

## 9.2 Espectroscopia vibracional de estado sólido

### 9.2.1 $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

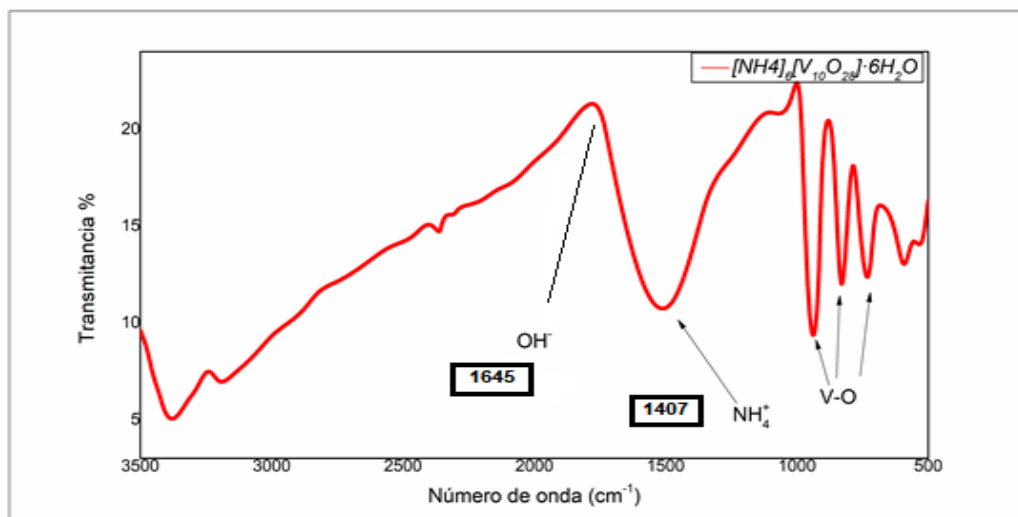
El espectro de infrarrojo (RI) correspondiente al compuesto  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 2) muestra la existencia de dos bandas de intensidad media localizadas en la región de alta frecuencia entre  $3395\text{-}3289\text{ cm}^{-1}$  y  $3200\text{-}3170\text{ cm}^{-1}$  atribuida al enlace  $\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$  y  $\nu_{\text{s}}(\text{N-H})$  respectivamente.



**Figura 2.** IR de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

Además, el espectro de IR muestra la existencia una banda localizada en la región de  $2970$  y  $2936\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a los modos de estiramiento simétrico y asimétrico de los grupos metilo de HMeft. También es posible observar una banda de intensidad fuerte localizada entre  $1624$  y  $1569\text{ cm}^{-1}$  originada a partir del enlace  $\nu_{\text{s}}(\text{C}=\text{N})$ . Es posible localizar dos bandas más entre  $1480$  y  $1420\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las deformaciones asimétricas de los grupos metilo que pertenecen a la molécula de metformina. Por último, existe

una banda de vibración fuerte encontrada en  $950\text{ cm}^{-1}$  en ambos espectros de IR, que corresponde al enlace  $\nu(\text{V}=\text{O})$ , otra banda localizada en  $830$  y  $736\text{ cm}^{-1}$  que pertenece al enlace  $\nu_{\text{as}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$  y otras bandas de intensidad media que están localizadas entre  $603$  y  $571\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al enlace  $\nu_{\text{s}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$ .



**Figura 3.** IR de  $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

El IR del compuesto  $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 3) mostró una banda en  $1407\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a  $\text{NH}_4^+$ , y otra en  $1645\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a  $\text{OH}^-$ . La posición de los picos de las bandas localizadas en  $3000\text{ cm}^{-1}$  sugiere la presencia de enlaces por puentes de hidrogeno de diferentes fuerzas. Existen dos bandas localizadas en  $954$  y  $825\text{ cm}^{-1}$  que son atribuidas al estiramiento del enlace V-O y diversas bandas por debajo de  $800\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones asimétricas y simétricas del enlace V-O.

### 9.3 Espectroscopia RMN en solución

La estructura del decavanadato puede descomponerse en tres especies: los cuales son monómeros de vanadato como  $[\text{H}_2\text{VO}_4]^-$ , dimérico  $[\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7]^{2-}$  y tetramérico  $[\text{V}_4\text{O}_{12}]^{4-}$ . Así después de la obtención del compuesto  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  se empleó la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear para determinar el grado de especiación presente en cada uno de estos monocristales.

Para el compuesto  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  es posible observar las señales de resonancia que corresponden a  $\text{V10A} = -514.43 \text{ ppm}$ ,  $\text{V10B} = -498$ ,  $\text{V10C} = -422.31 \text{ ppm}$ . También es posible

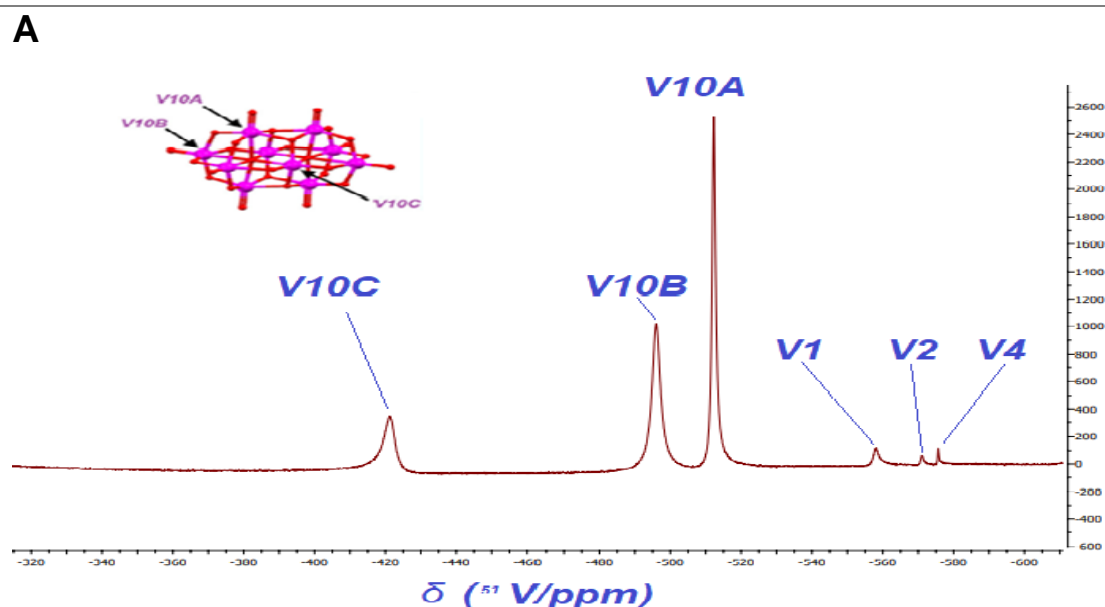


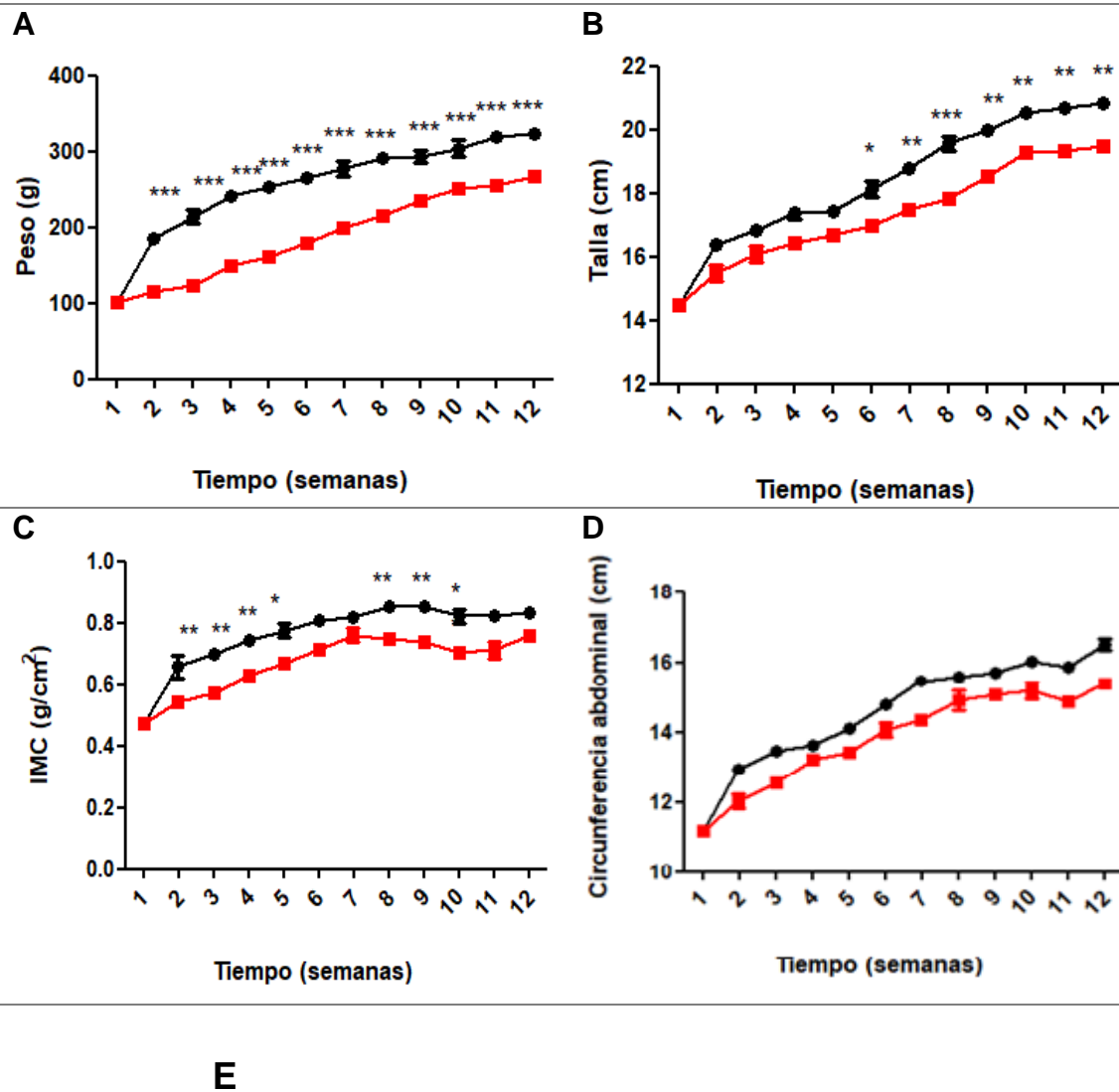
Figura 4. Espectro de  $^{51}\text{V}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Las señales corresponden a los sitios VA (campo bajo), VB y VC (campo alto) y los oligómeros de vanadio V1, V2 y V4

#### 9.4 Zoometría

Los animales alimentados con una dieta hipercalórica presentan una reducción del 38% de su peso corporal que fue estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) en comparación con el grupo control (Figura 5A). Esta disminución en el peso se manifiesta desde la segunda semana hasta la séptima. A partir de la octava semana existe una diferencia significativa del 17% ( $p < 0.001$ ) misma que se mantiene hasta el final del periodo de inducción.

Por otro lado, no existen diferencias significativas entre grupos respecto a la talla, desde la primera semana de inducción hasta la sexta (Figura 5B). A partir de este punto, existe una diferencia significativa del 10% en la talla ( $p < 0.01$ ) entre el grupo hipercalórico con el grupo control, que se mantiene hasta concluir las 12 semanas de inducción. Por su parte, el índice de masa corporal (IMC) (Figura 5C), muestra una disminución significativa (17%) ( $p < 0.01$ ) para el grupo

hipercalórico desde la segunda a la quinta semana de inducción y de la octava a la décima semana. Para el resto de las semanas de inducción no hubo una diferencia significativa entre estos grupos. Por último, la circunferencia abdominal y el índice Lee (Figura 5D-E), no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) después de 12 semanas de inducción.



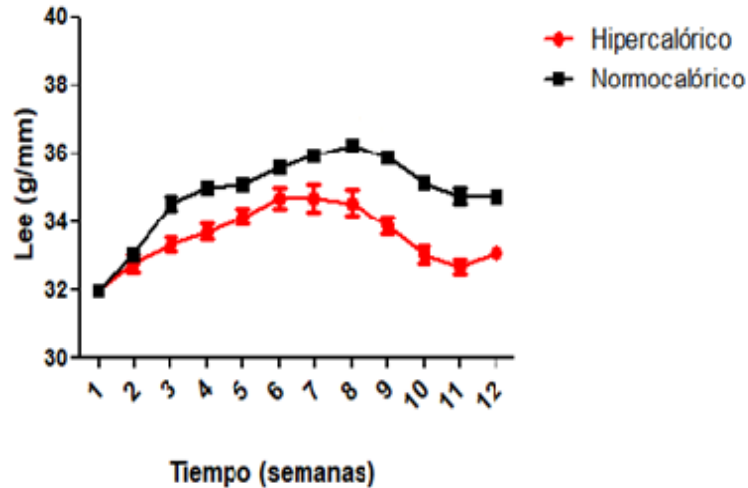


Figura 5. Zoometría. A) Peso, B) Talla, C) Índice de masa corporal, D) Circunferencia (IMC), E) Índice Lee. Los resultados mostrados son expresados como el promedio  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$ , (\*\*) diferencia significativa de  $p \leq 0.01$  y (\*\*\*) diferencia significativa  $p \leq 0.001$  respectivamente, por medio del estadístico ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Bonferroni.

### 9.5 Tolerancia a la glucosa, respuesta insulínica e índice de resistencia a la insulina

El análisis del corte a los 90 días de inducción mostró que durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa (TOG, Figura 6A), los niveles basales de glucosa del grupo hipercalórico no muestran diferencias significativas con respecto al grupo control. Asimismo, se registró un incremento de: 102% ( $p < 0.001$ ), 171% ( $p < 0.001$ ) y 144% ( $p < 0.001$ ) en el valor de glucosa sérica del grupo hipercalórico, para los tiempos 30, 60 y 90, respectivamente. La respuesta insulínica a la glucosa (Figura 6B), también se vio incrementada para el grupo hipercalórico en el tiempo 0, mostrando un aumento 69% ( $p < 0.01$ ) a los 30, 143% ( $p < 0.001$ ) a los 60', 132% ( $p < 0.001$ ) y a los 90' 115% ( $p < 0.001$ ). Por su parte, el índice HOMA-IR y el índice LIRI (Figuras 6C-D) correspondientes al grupo hipercalórico muestran un aumento significativo (157% y 36%) con respecto del grupo control. Por último, el índice HOMA- $\beta$  muestra una reducción (51%) y el índice de generación de insulina (IGI) registra un aumento significativo (126%) con respecto del grupo control. (Figuras 6E-D)

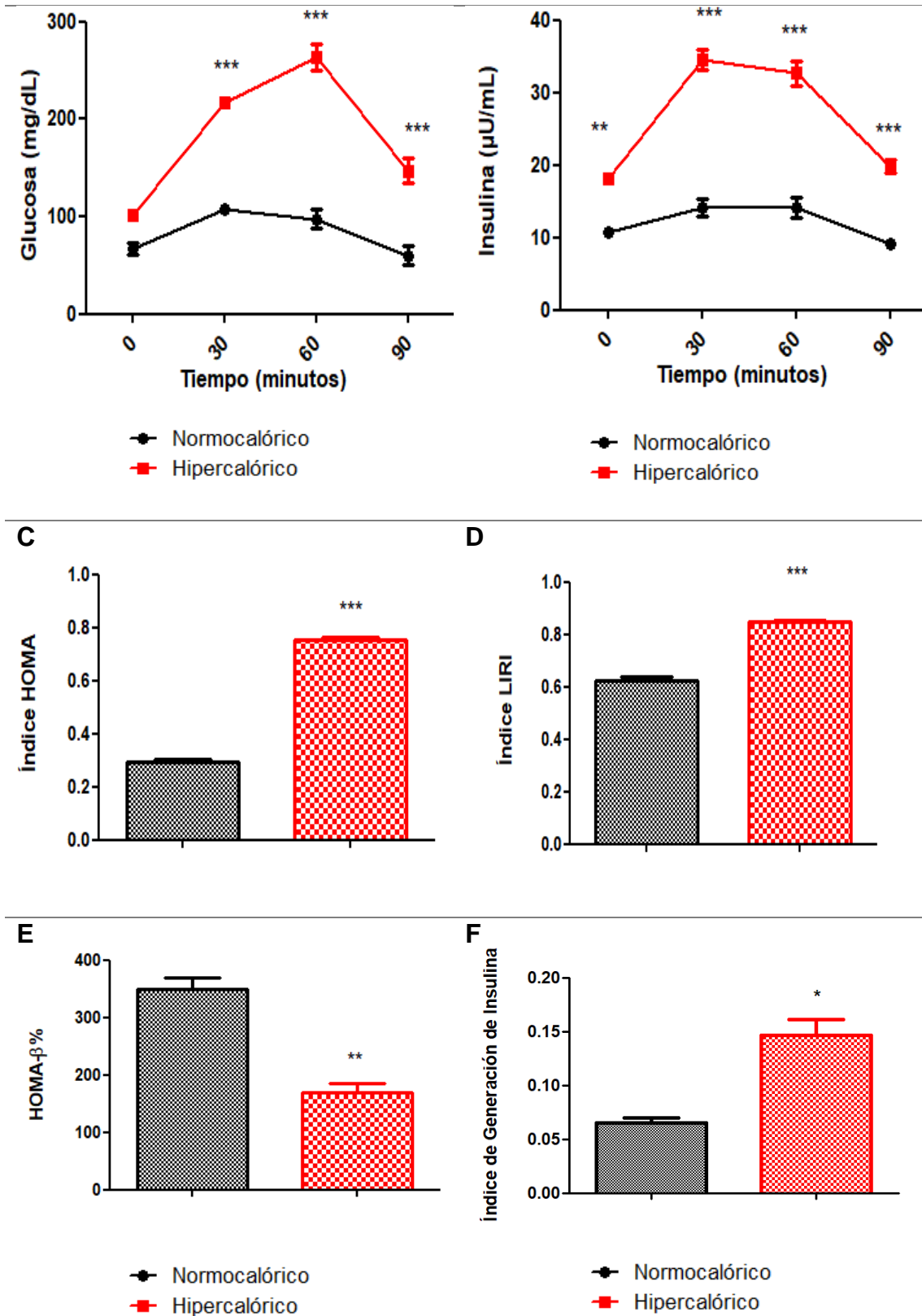
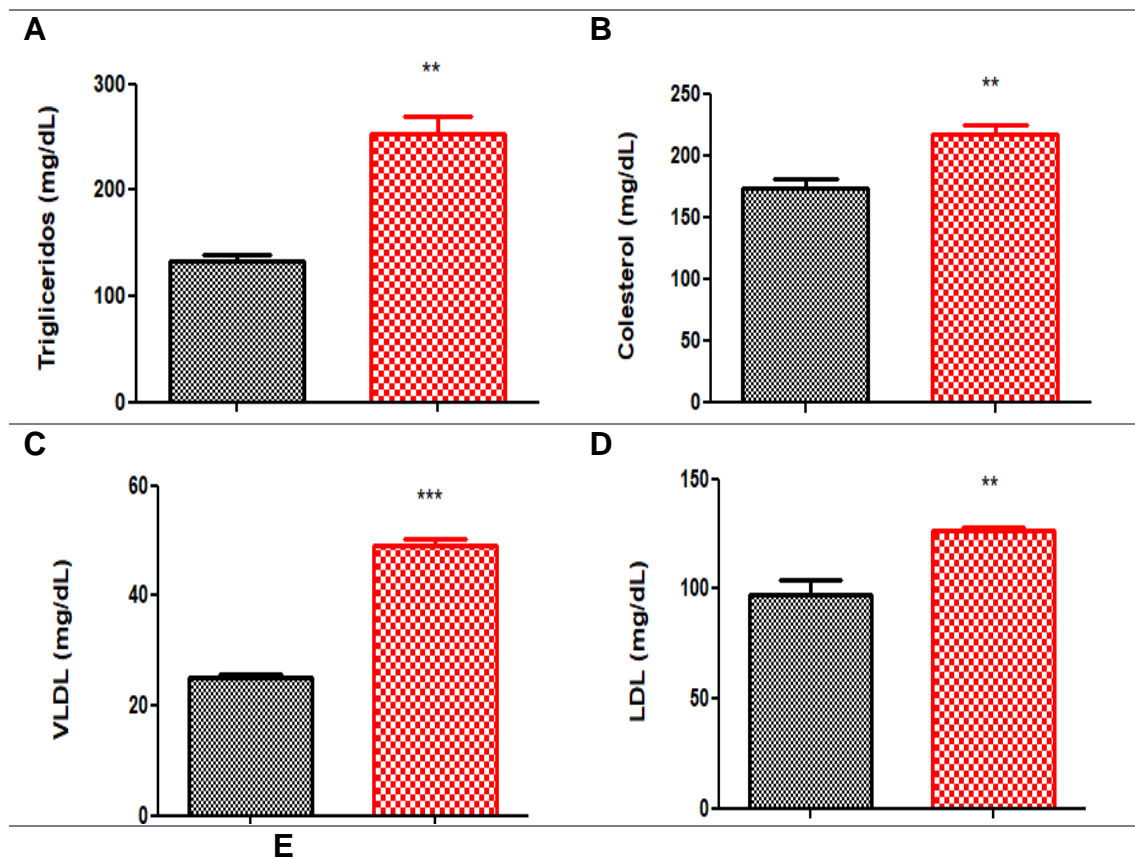


Figura 6. Tolerancia a la glucosa e índice de resistencia a la insulina. A) Curva de tolerancia a la glucosa, B) Respuesta de insulina a TOG C) HOMA-IR, D) LIRI, E) HOMA β% F) IGI. Los resultados son expresados como la media ± EEM. (\*\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.01$ , y (\*\*\*) diferencia significativa  $p \leq 0.001$  empleando estadístico ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Bonferroni. Los resultados son expresados como la media ± EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$ , (\*\*) diferencia

significativa de  $p \leq 0.01$  y (\*\*\*) diferencia significativa  $p \leq 0.001$  respectivamente, por medio del estadístico t Student.

## 9.6. Ensayos séricos

La dinámica sérica de los lípidos (Figura 7A - E) después de tres meses de inducción con dieta hipercalórica, mostró un aumento significativo en la concentración de TG (en 91.2%) ( $p < 0.01$ ), colesterol total (en 25%) ( $p < 0.001$ ), VLDL (en 96.8%) ( $p < 0.001$ ) y LDL (30.7%) ( $p < 0.01$ ) en el grupo hipercalórico con respecto al grupo control. Por otro lado, el grupo hipercalórico muestra una disminución significativa del (42.4%) ( $p < 0.001$ ) en la concentración de HDL en comparación con el grupo control.



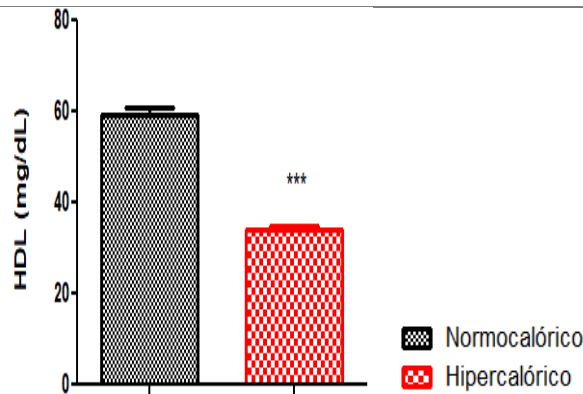


Figura 7. Ensayos séricos. A) Triglicéridos, B) Colesterol total, C) VLDL, D) LDL y E) HDL. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  EEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$ , (\*\*) diferencia significativa de  $p \leq 0.01$  y (\*\*\*) diferencia significativa  $p \leq 0.001$  respectivamente, por medio del estadístico t Student

### 9.7 Evaluación de la zoometría a los 60 días de tratamiento

Una vez concluido el tiempo de tratamiento, se realizó un análisis zoométrico (Tabla 1). Los resultados obtenidos después de los tratamientos con los decavanadatos, no muestran diferencias en relación con el control NC, en los parámetros: peso, talla, perímetro abdominal. IMC, porcentaje de grasa. Mientras que, en el grupo metavanadato se observó una disminución significativa en la talla (6.2%). El grupo tratado con Metformina disminuyó significativamente en los parámetros peso (20.4%), talla (5.7%) e IMC (12%) en relación con el control NC.

**Tabla 1. Evaluación zoométrica post-tratamiento de los diferentes grupos de estudio.**

Parámetro zoométrico	NC n=12	HC n=12	Metformina n=12	Metavanadato n=12	Decavanadato Amonio n=12	Metf-Deca n=12
<b>Peso</b>	353.4 $\pm$ 16.7	325.5 $\pm$ 10	281.3 $\pm$ 9.6 $\nabla$	339.6 $\pm$ 10	353.6 $\pm$ 16.6	344.7 $\pm$ 13.4
<b>Talla</b>	21.1 $\pm$ 0.6	20.3 $\pm$ 0.09	19.9 $\pm$ 0.2 $\nabla$	19.8 $\pm$ 0.3 $\nabla$	21 $\pm$ 0.6	20.6 $\pm$ 0.3
<b>Perímetro abdominal</b>	16.2 $\pm$ 0.3	15.8 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.5	16.1 $\pm$ 0.11	16.5 $\pm$ 0.5	17.2 $\pm$ 0.3
<b>IMC</b>	0.79 $\pm$ 0.03	0.8 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.02 $\nabla$	0.87 $\pm$ 0.04	0.81 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.03

% grasa corporal	3.28 ±0.07	3.33 ±0.02	3.24±0.02	3.47±0.06	3.32±0.07	3.34±0.04
------------------	------------	------------	-----------	-----------	-----------	-----------

Los resultados son el promedio de 12 animales experimentales ± SEM. (Δ) indica diferencia significativa con respecto al grupo control NC, (▽) indica diferencia significativa P<0.05 con valores por debajo del grupo control NC, empleando el estadístico ANOVA de una vía con Bonferroni post hoc test. NC = Normocalórico; HC = Hipercalórico; Metf-Deca = Decavanadato de metformina; IMC = Índice de masa corporal.

## 9.8 Ensayos séricos después de 60 días de tratamiento

Además, se analizó el panel lipídico (Tabla 2). Los resultados mostraron que, el grupo HC sin tratamiento mantuvo una franca dislipidemia, con valores estadísticamente diferentes al control NC. El tratamiento con Metformina mejoró los parámetros de triglicéridos, VLDL y LDL, las concentraciones de colesterol y de HDL mostraron una mejora con respecto al grupo HC, sin embargo, permanecieron con disminuciones estadísticas con respecto al NC en 21.3% y 29.5%, respectivamente.

**Tabla 2. Valoración de la dislipidemia post-tratamiento en los diferentes grupos de estudio.**

Metabolitos (mg/dL)	NC n=12	HC n=12	Metformina n=12	Metavanadato n=12	Decavanadato Amonio n=12	Metf-Deca n=12
Triglicéridos	61.5±5.7	136.3±2.6Δ	53.1±1.45	88.8±3.3 Δ	84.3±7.1 Δ	108.5±0.88 Δ
Col. total	104.2 ± 2.9	109.2± 1.3	82.05±2.2▽	69.53±3.8▽	91.2±7.2	94.8±2
VLDL	18.1 ± 1.7	33.5 ±3.8 Δ	12.7±0.42	17.4 ±0.3	18.9±2.3	19.4± 0.2
LDL	27.5 ±1.6	54 ± 2 Δ	28 ±1.4	21.25 ±2.9	37.8±4.2	35.8± 3.6
HDL	58.6 ±2.3	21.8 ±2.2▽	41.3±3.4▽	30.9±1.1▽	34.5±4.6▽	39.7±4▽

Los resultados son el promedio de 12 animales experimentales ± SEM. (Δ) indica diferencia significativa con respecto al grupo control, (▽) indica diferencia significativa P<0.05 con valores por debajo del grupo control, empleando el estadístico ANOVA de una vía con Bonferroni post hoc test. NC = Normocalórico; HC = Hipercalórico; Metf Deca = Decavanadato de metforminio; VLDL = Lipoproteínas de muy baja densidad; LDL = Lipoproteínas de baja densidad; HDL = lipoproteínas de alta densidad.

El grupo administrado con metavanadato de sodio mantuvo niveles incrementados de triglicéridos (35%) por encima del control y niveles bajos de HDL y colesterol (47%, para ambos parámetros). Mientras que los grupos de

decavanadato tanto de amonio como de metformina mantuvieron niveles incrementados de triglicéridos en 37 y 76%, y valores disminuidos de HDL en 41% y 32% respectivamente.

9.9 Tolerancia a la glucosa, respuesta insulínica e índice de resistencia a la insulina después de 60 días de tratamiento.

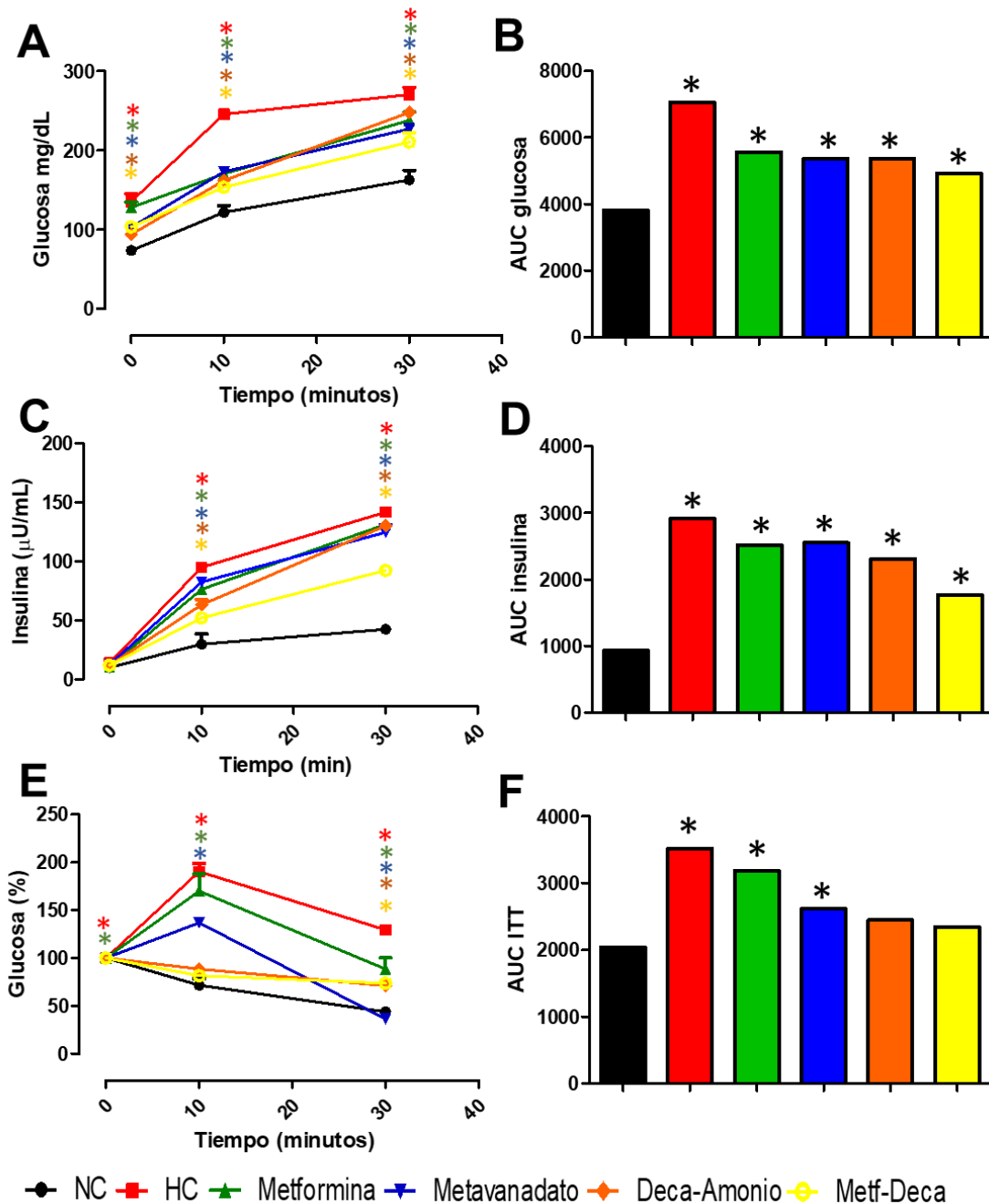


Figura 8. Tolerancia a glucosa e insulina. A) Tolerancia oral a glucosa B) Área bajo la curva (TOG) C) Respuesta insulínica a TOG D) Área bajo la curva de la respuesta insulínica E) Prueba de tolerancia a insulina F) Área bajo la curva de la tolerancia a insulina. **Los resultados son**

**expresados como la media  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto** al grupo control  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Posteriormente se analizó la tolerancia a glucosa en el modelo de SM tratados con los diferentes compuestos. Este análisis se basó en la pendiente que genera la glucosa en los primeros 30 minutos, donde el tejido hepático participa activamente. Se puede observar en la figura 8A y 8B el comportamiento de la pendiente positiva asignada a la recaptura hepática y el área bajo la curva posterior a la administración de una carga estandarizada (1.75 g de glucosa/kg de peso) en cada grupo de estudio. Los resultados muestran que todos los tratamientos mejoraron la tolerancia a glucosa de primera fase o de pendiente positiva, ya que todos ellos generan pendientes por debajo de la línea roja que representa al grupo HC sin tratamiento. Sin embargo, ninguna de ellas alcanza la concentración promedio del grupo NC (línea negra, Fig. 8A). El área bajo la curva (AUC; Fig. 8B) permite observar mejor los resultados de cada tratamiento, en donde respecto del grupo hipercalórico, en el grupo metformina mejoró 21%, para el grupo metavanadato 24%, para el grupo decavanadato de amonio y MetfDeca un 30%. También es de resaltar que los tratamientos con la sal y compuestos de vanadio redujeron la glicemia de ayuno por debajo de los 100 mg/dL.

En lo que respecta a la respuesta insulínica a la carga de glucosa, esta presentó un comportamiento similar a la tolerancia a la glucosa en donde se puede observar la fase exponencial de liberación por vía canónica. Todos los tratamientos mejoraron la cantidad de insulina liberada respecto del grupo hipercalórico, sin embargo, no alcanzaron las concentraciones del grupo NC (Fig. 8C). El análisis del AUC (Fig. 8D) muestra una disminución significativa del 13.6 % generada por el tratamiento con metformina, de 12.4% por metavanadato de sodio, 20.5% por decavanadato de amonio y de 39.2% por Metf-Deca.

Debido que la tolerancia a glucosa se encuentra influenciada por el correcto funcionamiento de diversos tejidos y hormonas, los resultados previamente obtenidos sobre el manejo hepático del carbohidrato pueden verse influenciados. La prueba de tolerancia a insulina fue realizada en los grupos de estudio para obtener un resultado que no fuera influenciado por variables fisiológicas propias

del proceso de digestión y absorción de la glucosa. Los resultados obtenidos muestran que los grupos HC, metavanadato y metformina presentan una pendiente positiva durante los primeros 10 min de monitoreo, lo cual es sugestivo de una acción insulínica alterada; mientras que ambos tratamientos con decavanadatos se observan un comportamiento similar al grupo control NC (Fig.8E). Estos resultados se visualizan de mejor manera con el análisis de la AUC (Fig. 8F).

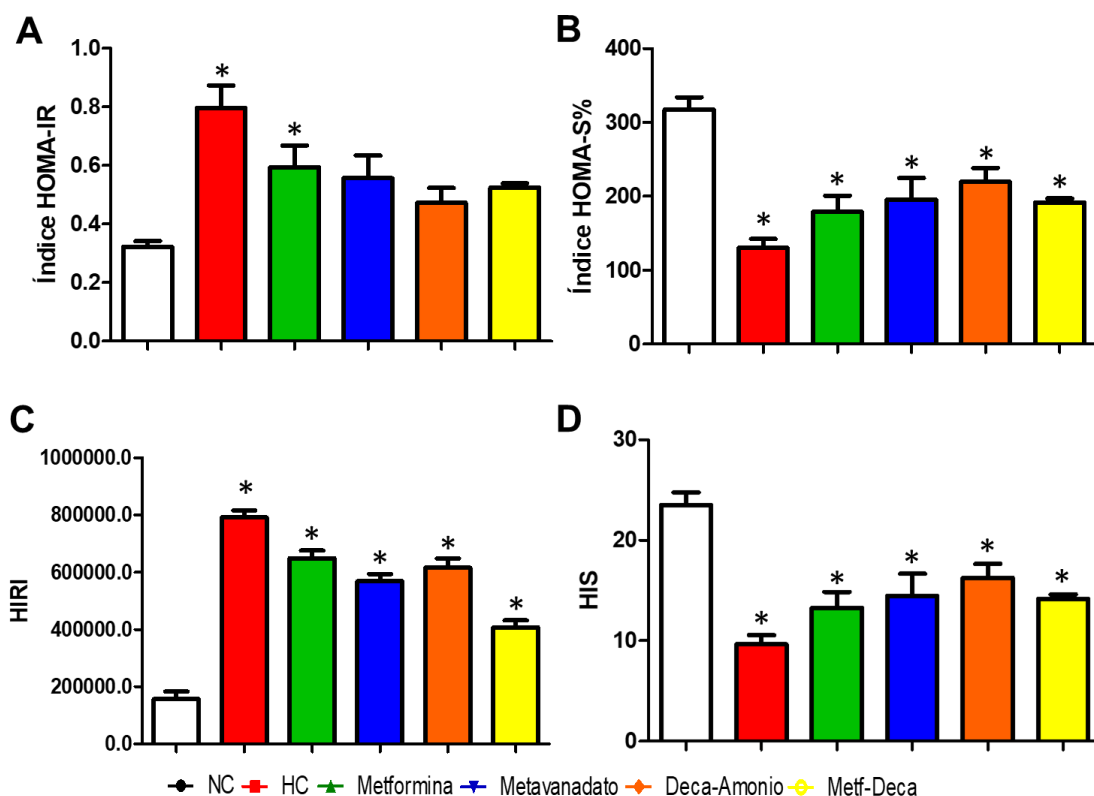


Figura 9. Evaluación de la resistencia y sensibilidad a la insulina A) Índice HOMA-IR B) Índice HOMA-S% C) Índice de resistencia a insulina hepática (HIRI) D) Índice de sensibilidad a insulina hepática (HIS). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Debido a que una secreción de insulina alterada se relaciona con la pérdida de la sensibilidad o desarrollo de resistencia a la hormona, se valoró la insulinoresistencia por medio del modelo homeostático de insulinoresistencia (HOMA-IR, por sus siglas en inglés). Los resultados muestran que la dieta hipercalórica generó una resistencia a la hormona de más del doble respecto al control NC, mientras que el tratamiento con Metformina y metavanadato reducen este índice en 25.5% y 30%. Tratamientos con ambos decavanadatos mejoraron el indicador en 40% y 35% respecto del control NC (Fig. 9A). Asimismo, la

valoración de la sensibilidad por el índice HOMA-S%, el cual demostró que los tratamientos mejoran la sensibilidad a insulina de manera similar, pero ninguno alcanza el valor del control NC (Fig. 9B).

#### 9.10 Resistencia y sensibilidad hepática a la insulina después de 60 días de tratamiento

Los índices evaluados anteriormente, solo establecen condiciones generales de individuo, por lo que se evaluaron modelos matemáticos específicos de resistencia (HIRI) y sensibilidad (HIS) hepática a la insulina. Los resultados muestran que la resistencia hepática a la hormona en el grupo HC fue 300% mayor en comparación con el grupo NC. Los tratamientos con Metformina, metavanadato y decavanadato de amonio fueron poco efectivos, mostrando la menor eficiencia terapéutica; mientras que el tratamiento con Metf-Deca redujo 50% este parámetro respecto del grupo HC (Fig. 9C). Todos los tratamientos mejoraron en proporciones similares la sensibilidad hepática a la hormona.

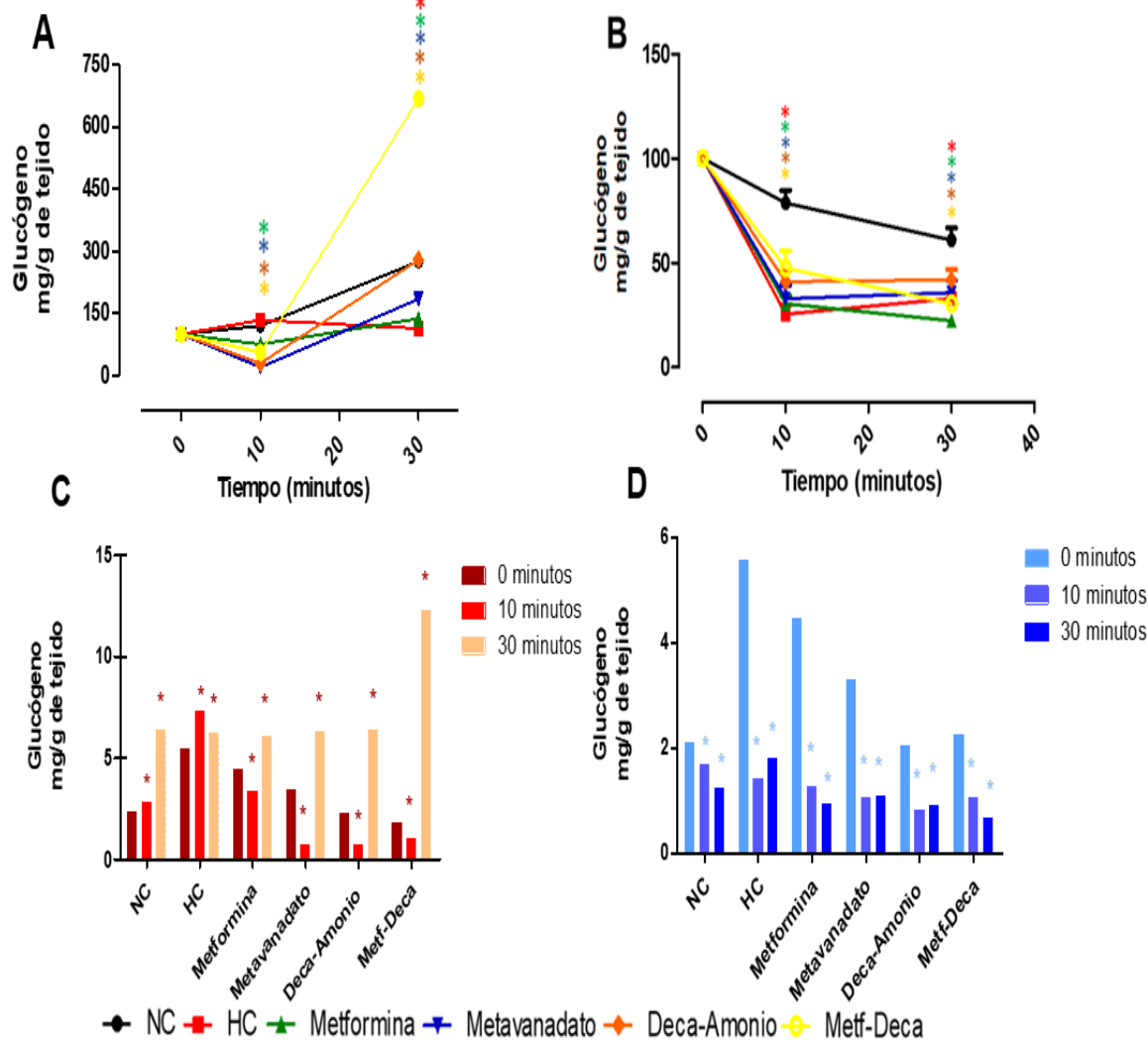


Figura 10. Comportamiento del glucógeno hepático. A) Concentración de glucógeno hepático post carga de glucosa B) Concentración de glucógeno hepático post carga de insulina C) Concentración de glucógeno hepático post carga de glucosa a los 0, 10 y 30 minutos D) Concentración de glucógeno hepático post carga de insulina a los 0, 10, 30 minutos. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. (\*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

### 9.11 Dinámica de formación de glucógeno después de 60 días de tratamiento

Después de conocer el estado de resistencia y sensibilidad hepática a insulina se analizó la dinámica de formación de glucógeno posterior a una carga de glucosa. La concentración de glucógeno hepático se incrementa en un 276% al minuto 30 para el caso del grupo NC (Fig. 10A). En donde se puede observar que el contenido hepático en ayuno fue de 2 mg de glucógeno/gr de tejido y al tiempo 30 post-carga llega a una concentración promedio de 6 mg de

glucógeno/gr de tejido (Fig. 10C). Mientras que en el grupo HC se observó una dinámica negativa en la formación de glucógeno (Fig. 10A), sin embargo, es de resaltar que en este grupo la concentración de glucógeno en ayunas es de 5 mg de glucógeno/gr de tejido, llegando a un máximo de síntesis a los 10' post-carga (7 mg) y luego una disminución en su contenido llegando a un máximo de 6 mg de glucógeno/gr de tejido (Fig. 10C), mostrando una conducta de síntesis completamente diferente al grupo NC. El tratamiento con Metformina muestra un comportamiento similar al grupo NC con un porcentaje menor en la generación de insulina (Fig. 10A), la concentración inicial de glucógeno en este grupo fue de 4.4 mg /gr de tejido, a los 10' post-carga la concentración de glucógeno hepático disminuye a 3.4 mg /gr de tejido y a los 30' se incrementó hasta 6 mg de glucógeno/gr de tejido (Fig. 10C) de manera similar al grupo NC, mostrando una dinámica alterada con relación a la señalización de insulina. Los grupos tratados con metavanadato de sodio y decavanadato de amonio observaron una dinámica similar entre ellos y con relación al grupo NC (Fig. 10A), su contenido hepático de glucógeno en ayuno correspondió a 3.4 y 2.3 mg /gr de tejido, a los 10' post-carga la concentración de glucógeno disminuyó a 0.7 mg /gr de tejido, recuperando valores similares al grupo NC a los 30' (Fig. 10C). Finalmente, el grupo MetfDeca observa una dinámica de formación de glucógeno completamente diferente a los otros tratamientos (Fig. 10A), en ayuno presentó valores similares al grupo NC, a los 10' post-carga la concentración de glucógeno disminuyó ligeramente a 1.4 mg /gr de tejido, mientras que la formación de glucógeno a los 30' llegó a una concentración máxima de 12.3 mg /gr de tejido (Fig. 10C).

Lo observado en los gráficos 10 A y C, muestra claramente que el consumo de una dieta hipercalórica modifica la dinámica de formación de glucógeno en el hígado, sin embargo, como ya se ha mencionado, la homeostasis de glucosa es influenciada por otros tejidos y hormonas que se involucran en el estado postabsortivo. A nivel hepático la insulina se encarga en gran parte de la homeostasis de glucógeno, es por ello se cuantificó este elemento posterior a una carga de insulina estándar (ITT). Los resultados se muestran en las figuras 10 B y D, de manera porcentual y cuantificada, respectivamente.

La carga de insulina produjo una disminución del contenido de glucógeno hepático del 40% en el grupo NC en un periodo de 30 minutos (Fig. 10B), observándose una pendiente negativa, inicialmente el contenido de glucógeno fue de 2.1 mg /gr de tejido, a los 10' de 1.7 mg /gr de tejido y a los 30' de 1.2 mg /gr de tejido (Fig. 10D). En el grupo HC la pendiente mostró un descenso del 67% (Fig. 10B), teniendo un contenido de glucógeno basal de 5.6 mg /gr de tejido, a los 10' de 1.4 mg /gr de tejido y terminando a los 30' con una concentración de 1.8 mg /gr de tejido (Fig. 10D). El tratamiento con Metformina observó una disminución de la pendiente del 79% (Fig. 10B), presentando un contenido de glucógeno basal de 4.5 mg /gr de tejido, a los 10' de 1.3 mg /gr de tejido y terminando a los 30' con una concentración de 0.9 mg /gr de tejido (Fig. 10D). Los tratamientos con la sal y compuestos de vanadio también observaron una disminución de la pendiente del 67% (metavanadato de sodio) 55% (decavanadato de amonio) y del 70% (para el MetfDeca) (Fig. 10B), cada grupo observó un contenido de glucógeno basal de 3.3, 2.1 y 2.3 mg /gr de tejido, a los 10' post-carga de insulina de 1.1, 0.8 y 1.1 mg /gr de tejido y a los 30' mostraron una concentración de 1.1, 0.8 y 0.7 mg /gr de tejido, respectivamente (Fig. 10D). Los resultados indican que cada tratamiento influye de manera diferente en la cascada de señalización de insulina.

#### 9.12 Análisis de la cascada de fosforilación de la insulina

Después de analizar el comportamiento del glucógeno, y tomando en cuenta que este depende en gran medida de la señalización de insulina, analizamos la cascada de fosforilación de la hormona en relación con el grupo NC en ayuno el cual su expresión se normalizó a 1, a partir de este valor se expresa el resultado en expresión relativa de las proteínas de la cascada, en cada tiempo y en cada grupo, incluyendo al control NC a los 10 y 30 minutos post carga de glucosa. La principal fosforilación del receptor de insulina (IR) es en tirosina, en el grupo NC la expresión relativa de IRpY incrementó en 0.2 veces a los 10' y se reestablece a los 30' post carga. El grupo HC disminuyó la expresión de IRpY, 0.55 veces en el ayuno, 0.45 veces al 10' y 0.8 veces al 30'. La expresión relativa de IRpY también disminuyó en el grupo tratado con Metformina, 0.65 veces en el ayuno, incrementó 1.3 veces a los 10', para luego disminuir 0.1 veces a los 30'. Los grupos tratados con los compuestos de

vanadio: metavanadato, decavanadato de amonio y MetfDeca también disminuyeron en el ayuno (0.4, 0.7 y 0.6 veces, respectivamente), al 10' el grupo metavanadato incrementó 1.2 veces, el decavanadato de amonio disminuyó 0.9 veces y el MetfDeca disminuyó 0.2 veces. Al 30', el grupo tratado con metavanadato disminuyó 0.9 veces, decavanadato de amonio 0.7 veces, mientras que MetfDeca aumentó 1.4 veces (Fig. 11).

La fosforilación secundaria del IR, es en treoninas, esta fosforilación fue analizada en los diferentes grupos. El análisis de la expresión relativa de IRpT en el grupo NC muestra una disminución en su expresión de 0.5 veces al 10' y 0.2 veces al 30' post carga de glucosa. Mientras tanto, la expresión de IRpT en el grupo HC disminuyó 0.4 veces en ayuno, 0.7 veces a los 10' y aumentó 1.2 veces su expresión a los 30'. Por su parte, el tratamiento con Metformina también disminuyó su expresión relativa de IRpT (0.7 veces) en el ayuno, 0.2 veces al 10' y 0.8 veces al 30'. Los grupos tratados con metavanadato de sodio y decavanadato de amonio muestran una dinámica similar entre sí, ambos grupos tienen una expresión relativa de IRpT baja en el ayuno (0.3 y 0.7 veces menor al grupo NC) que se acentúa (0.9 veces para ambos grupos) a los 10' y que finalmente aumenta (1.1 veces para ambos grupos) al minuto 30. Finalmente, en el grupo MetfDeca disminuyó la expresión relativa de IRpT en el ayuno (0.6 veces), a los 10' (0.3 veces) y a los 30' (0.7 veces) (Fig. 11).

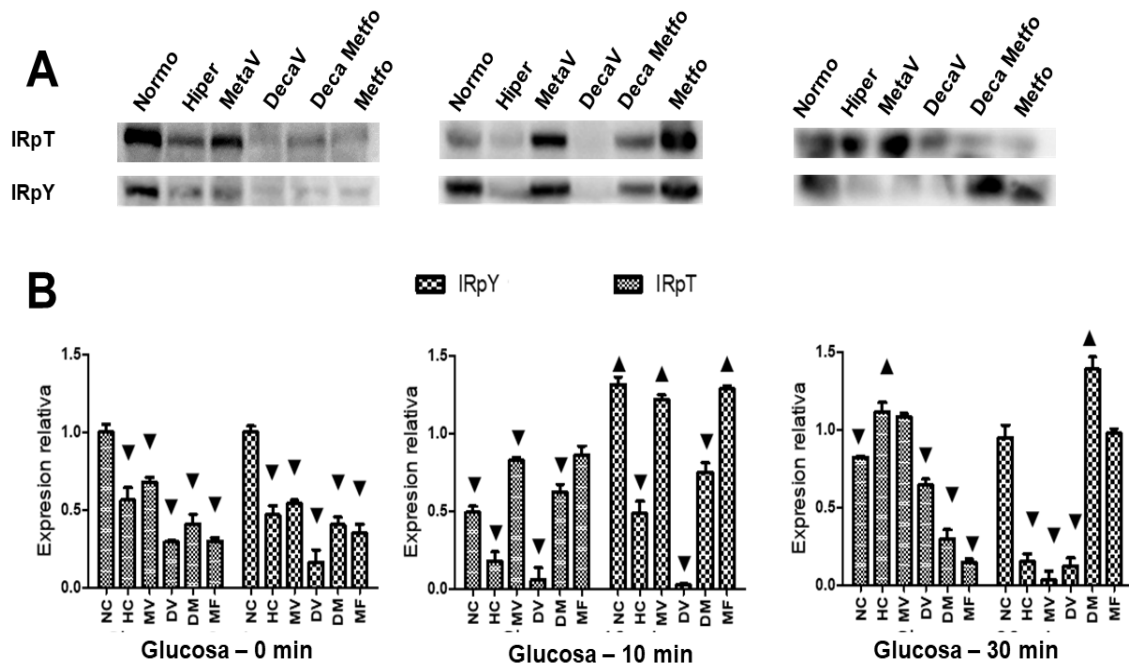


Figura 11. Expresión de IRpT e IRpY. A) Wester blot que muestra las bandas de la expresión de IRpT e IRpY a los 0, 10, 30 minutos post carga de glucosa. B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de IRpT e IRpY. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. (▲) Indica incremento, (▼) indica disminución con respecto del grupo NC al minuto 0,  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

Consecutivamente en el primer nodo de la cascada de señalización de insulina en hígado se encuentra IRS1. El análisis de la expresión relativa de IRS1 en el grupo NC disminuyó al 10' y 30' (0.8 veces y 0.3 veces). En el grupo HC disminuyó 0.5 veces en el ayuno, 0.1 veces al 10', pero incrementó 1.3 veces al 30'. El tratamiento con Metformina mantuvo disminuida la expresión de IRS1 durante los tiempos analizados, 0.9, 0.1 y 0.6 veces, respectivamente. La expresión en el grupo metavanadato de sodio disminuyó 0.7 y 0.3 veces en el ayuno y al 10', pero incrementó 1.4 veces al 30'. Los grupos decavanadato de amonio y MetfDeca mostraron un comportamiento similar, disminuyendo la expresión de IRS1 en el ayuno (0.9 y 0.7) y al 10' (0.8 veces), mientras que se registró un aumento a los 30' (1.2 y 1 veces) (Fig. 12).

La PTP1B es la enzima limitante en la fosforilación de IRS1. Al evaluar la expresión en el caso del grupo NC, se observó un aumento al 10' (1.3 veces) y se encuentra disminuida al minuto 30' (0.8 veces) (Fig. 12). Mientras que, el grupo HC aumento 1.3 veces en el ayuno y al 10' 1.4 veces, disminuyendo 0.4 veces al 30'. El tratamiento con Metformina mostró una disminución en la

expresión relativa de PTP1B en todos los tiempos que corresponde a 0.2, 0.4 y 0.1. Los grupos tratados con metavanadato de sodio, decavanadato de amonio y MetfDeca mantuvieron niveles elevados en la expresión de esta enzima a lo largo de la dinámica, en el ayuno 1.3, 1.5 y 1.6 veces, al minuto 10 (1.3, 1.3 y 1.4 veces) y al minuto 30 (1.0, 2.6 y 1.3 veces) (Fig. 12).

Otra enzima limitante en este nodo es PTEN, la cual regula la transmisión de la señal que llega a Akt. La expresión relativa de PTEN disminuyó al minuto 10 y 30 (0.3 y 0.1 veces) en el grupo NC. En el grupo HC disminuyó en el ayuno (0.7 veces) y al 10' (0.4 veces), sin embargo, se reestablece al 30'. El tratamiento con Metformina aumentó la expresión de PTEN en el ayuno (1.7 veces), pero disminuyó a los 10' y 30' (0.6 y 0.2 veces). El grupo tratado con metavanadato aumentó 1.6 y 1.7 veces en el ayuno y a los 10 minutos, sin embargo, a los 30 minutos disminuyó 0.6 veces. Los grupos tratados con decavanadato de amonio y MetfDeca mostraron una dinámica similar entre ellos, la expresión relativa de PTEN disminuyó en el ayuno (0.7 y 0.6 veces), aumentado después de la administración de la carga de glucosa al 10' (1.6 y 1.4 veces) y se mantiene así hasta los 30' (1.4 y 1.3 veces) (Fig. 12).

Finalmente, este nodo termina con la fosforilación de Akt. La expresión relativa de esta proteína en el grupo NC aumentó 1.5 veces al minuto 10, pero disminuye (0.4 veces) al minuto 30. En el grupo HC se observó una disminución de la expresión de esta proteína en el ayuno (0.5 veces) y al minuto 10 (0.1 veces), y aumentó al minuto 30 (1.8 veces). Por su parte, El tratamiento con Metformina aumentó en el ayuno (1.7 veces), al minuto 10 (1.8 veces) y en el minuto 30 (1.3 veces). El grupo tratado con metavanadato de sodio aumentó la expresión en el ayuno (2.4 veces), a los 10' (2.0 veces), y disminuyó al minuto 30 (0.4 veces). Los grupos decavanadato de amonio y MetfDeca disminuyeron la expresión en el ayuno (0.8 y 0.6 veces), seguido de un incremento al minuto 10 (1.9 y 2.3 veces) y una nueva disminución en la expresión al minuto 30 (0.2 veces).

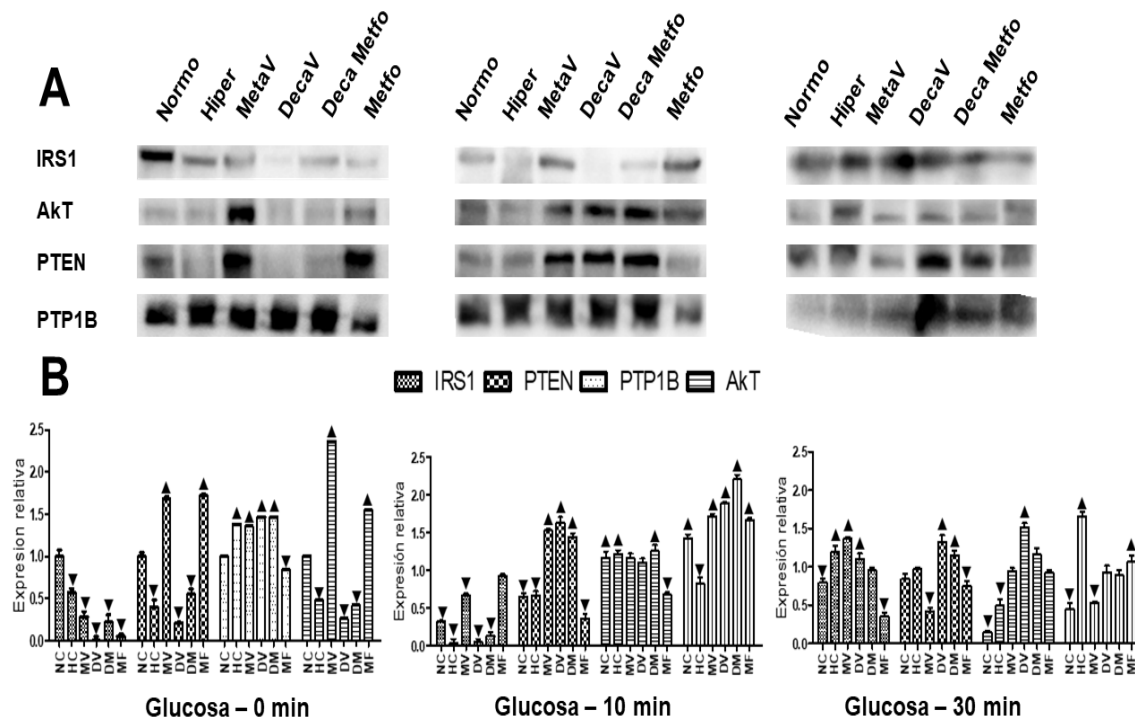


Figura 12. Expresión de IRS1, PTEN, PTP1B y Akt. A) Wester blot que muestra las bandas de la expresión de IRS1, Akt, PTEN y PTP1B a los 0, 10, 30 minutos post carga de glucosa. B) Análisis densitométrico de la expresión de IRS1, PTEN, PTP1B y Akt. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. (▲) Indica incremento, (▼) indica disminución con respecto del grupo NC al minuto 0,  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

El siguiente nodo de análisis en la cascada de señalización de insulina es que regula directamente la generación de glucógeno. En este la expresión relativa de GSK3 $\beta$  aumentó 1.2 veces al minuto 10 y disminuyó (0.8 veces) al minuto 30 en el grupo NC. En el grupo HC aumentó la expresión de esta enzima (1.2 veces) en el ayuno y al minuto 10, y disminuyó a los 30' (0.3 veces). El grupo administrado con Metformina disminuyó la expresión de GSK3 $\beta$  en el ayuno (0.2 veces) y aumentó a los 10' (1.9 veces) y a los 30' (1.1 veces). El grupo administrado con metavanadato de sodio disminuyó la expresión en ayuno (0.6 veces), pero esta se incrementó (1.9 veces) al minuto 10 y al minuto 30 (3.5 veces). Los grupos decavanadato de amonio y MetfDeca incrementaron la expresión de GSK3 $\beta$  en el ayuno (1.5 y 1.3 veces), al minuto 10 (2.1 veces en ambos grupos) y disminuyeron al minuto 30 (0.9 veces) (Fig. 13).

La GS fosforilada es la forma inactiva de la enzima encargada de la síntesis de glucógeno. Su expresión en el grupo NC disminuye a los 10' y 30' (0.2 y 0.5

veces). En el grupo HC disminuyó en el ayuno (0.2 veces), a los 10' (0.3 veces) y 30' (0.1 veces). Mientras que, en el tratamiento con Metformina disminuyó en el ayuno (0.4 veces), a los 10' (0.8 veces) y a los 30' (0.3 veces). Los grupos tratados con metavanadato de sodio, decavanadato de amonio y MetfDeca disminuyeron en el ayuno (0.6, 0.3 y 0.5 veces), a los 10' (0.3, 0.3 y 0.5 veces) y a los 30' (0.5, 0.6 y 0.6 veces) (Fig. 13).

Mientras que la expresión de GS (forma activa) en el grupo NC se incrementó 3.2 veces al minuto 10 y 3.5 veces al minuto 30. El grupo HC incrementó en el ayuno (1.3 veces), a los 10 minutos (3.9 veces) y a los 30 minutos (4.2 veces). El tratamiento con Metformina aumentó en el ayuno (3.9 veces), pero disminuyó a los 10' (0.2 veces) y nuevamente aumentó a los 30' (2.9 veces). El grupo tratado con metavanadato de sodio aumentó en el ayuno (1.2 veces), a los 10' (4.5 veces) y a los 30' (3.6 veces). Por último, los grupos decavanadato de amonio y MetfDeca aumentaron la expresión de esta enzima en el ayuno (3.5 y 3.3 veces), al minuto 10 (3.2 y 2.2) y al minuto 30 (1.5 y 1.1) (Fig. 13)

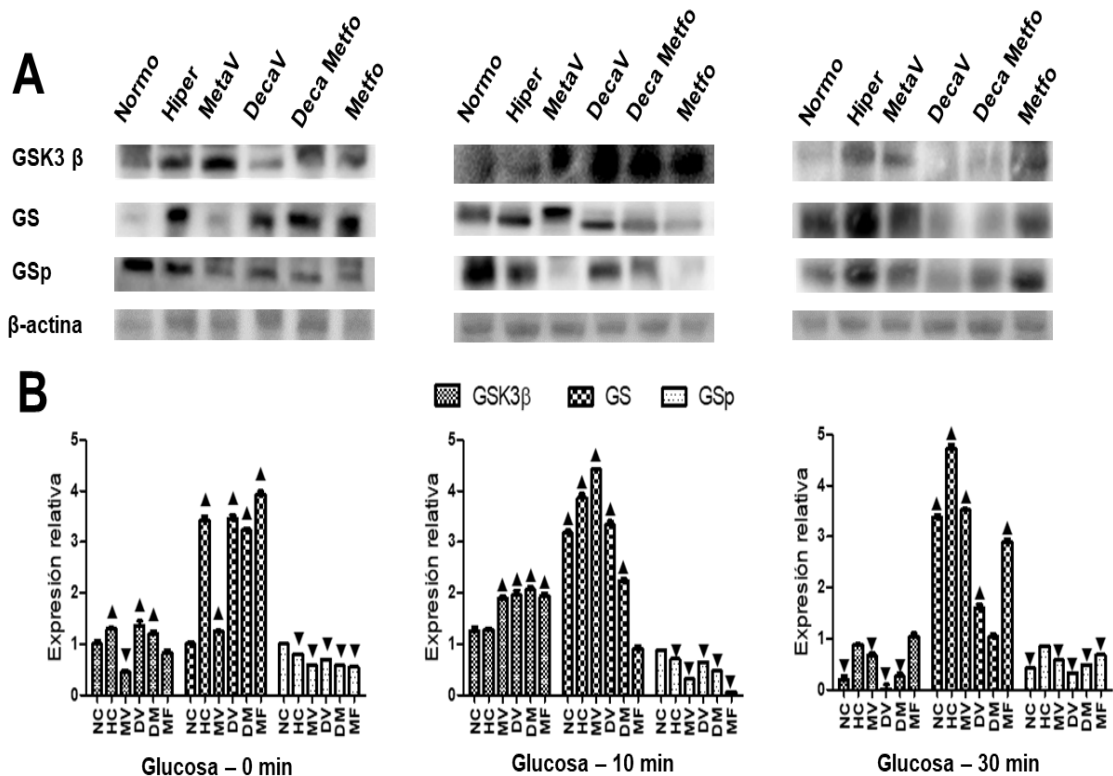


Figura 13. Expresión de GSK3 $\beta$ , GS y GSp. A) Wester blot que muestra las bandas de la expresión de GSK3 $\beta$ , GS y GSp a los 0, 10, 30 minutos post carga de glucosa. B) Análisis

densitométrico de la expresión relativa de GSK3 $\beta$ , GS y GSp. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. ( $\blacktriangle$ ) Indica incremento, ( $\blacktriangledown$ ) indica disminución con respecto del grupo NC al minuto 0,  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

### 9.13 Análisis histológico a los 60 días de tratamiento

Posterior al análisis de la cascada de fosforilación en la vía de señalización de la insulina, se evaluaron los cambios histológicos provocados por el SM y la administración de los tratamientos durante los tiempos cohorte posterior a la carga de carbohidratos. La tinción con hematoxilina y eosina (H&E) mostró las características que adopta el tejido hepático del grupo control NC, en donde resalta la presencia de células con citoplasma eosinofílico, un núcleo azul bien definido, la distribución y apertura de los espacios sinusoidales tomando la vena central como referencia. Estas características se conservan para este grupo a lo largo de toda la dinámica (Fig. 14 A – C).

Por su parte, el análisis histológico del grupo HC en el ayuno, a los 10 y al minuto 30, mostró la presencia de un daño estructural marcado, cierre de los espacios sinusoidales, vacuolización del citoplasma, la presencia de infiltrados leucocitarios, necrosis hepatocelular y la presencia de cuerpos de Mallory-Denk (inclusiones en el citoplasma de los hepatocitos) (Fig. 14 D – F). En el ayuno, este grupo muestra una disminución significativa del 35% en el número de hepatocitos en un área estándar de análisis con respecto del grupo NC, 28% a los 10' y 36% a los 30' (Fig. 15B), así como un aumento significativo en el número de leucocitos del 97% en el ayuno, 94% a los 10 minutos y 73% a los 30 minutos (Fig. 15A).

El análisis del grupo administrado con Metformina mostró estrados histológicamente transicionales en dependencia de la dinámica de glucosa. Inicialmente se pudo percibir un daño estructural que comprendió la apertura del espacio sinusoidal e importante vacuolización citoplasmática que fue desapareciendo conforme se fue recapturando glucosa por el tejido (Fig.14 O – Q). Además, en este grupo se observó una menor infiltración leucocitaria y una disminución de la necrosis. Sin embargo, mostró la presencia de cuerpos de Mallory-Denk, así como una disminución significativa en el número de

hepatocitos del 31% en el ayuno, 32% y 35% a los 10 y 30 minutos post-carga en comparación con el grupo NC (Fig.15B). También, este grupo presentó un aumento significativo en el número de leucocitos en el ayuno del 97%, un 80% al minuto 10 y un 64% al minuto 30 (Fig.15A).

El tratamiento con metavanadato de sodio mostró en el ayuno y a los 30 minutos una estructura similar al grupo control NC, sin embargo, al minuto 10 se pudo observar un mayor tamaño sinusoidal en el tejido. En este grupo también se observó una disminución en la vacuolización citoplasmática de los hepatocitos, en la inflamación del tejido, así como la presencia de infiltrados leucocitarios (Fig. 14 G – I). Sin embargo, existe un aumento significativo del 10% con respecto del número de leucocitos por campo en comparación con el grupo NC en el ayuno, 11% al minuto 10 y 7% al minuto 30 (Fig. 15A), así como una disminución significativa del 10%, 22% y 18% respectivamente, en el número de hepatocitos con respecto del grupo NC para estos mismos tiempos (Fig. 15B).

El tratamiento con decavanadato de amonio mostró una recuperación estructural, con una mejora en la apertura sinusoidal y una disminución en la vacuolización citoplasmática principalmente a los tiempos 10 y 30 minutos (Fig. 14 J - L). Sin embargo, presenta aumento en el número de leucocitos por campo, 65% en el ayuno, 56% al minuto 10 y 53% al minuto 30 (Fig.15A), y una disminución significativa 23% en el número de hepatocitos por campo al inicio de la dinámica, 22% al minuto 10 y 29% al minuto 30 en comparación con el grupo NC (Fig.15B).

Finalmente, el análisis del tratamiento con MetfDeca, mostró la mejor recuperación de la estructura celular y apertura del espacio sinusoidal a los tiempos 0 y 10 minutos. El tratamiento disminuye la vacuolización citoplasmática, inflamación e infiltración leucocitaria (Fig. 14 M – Ñ). Se observó un incremento significativo del 21% en el número de leucocito en el ayuno, 39% al minuto 10 y 29% al minuto 30 (Fig. 15A), así como una disminución en el número de hepatocitos del 4% al inicio de la dinámica, 19% al minuto 10 y 7% al minuto 30, en comparación con el NC (Fig. 15B)

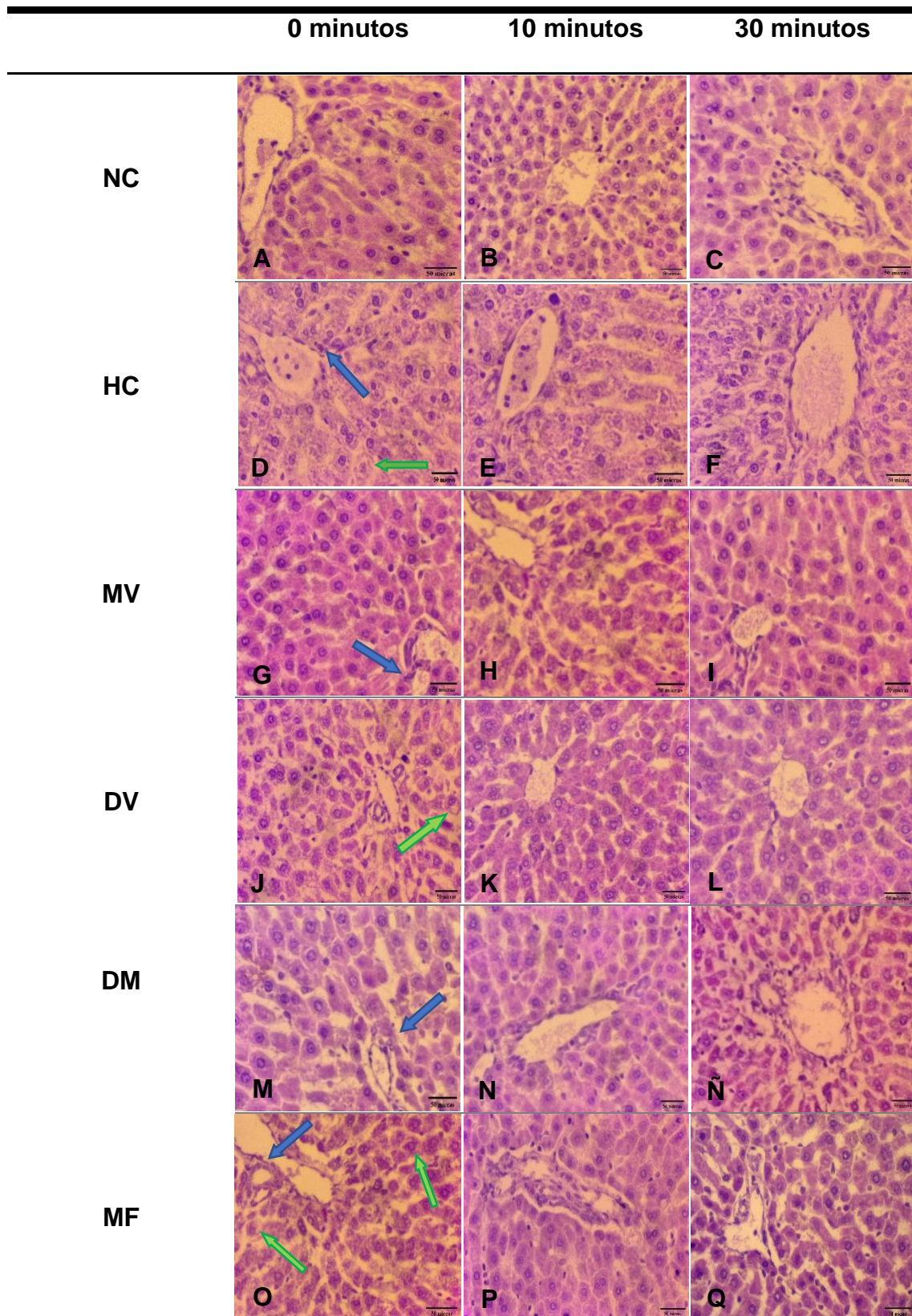
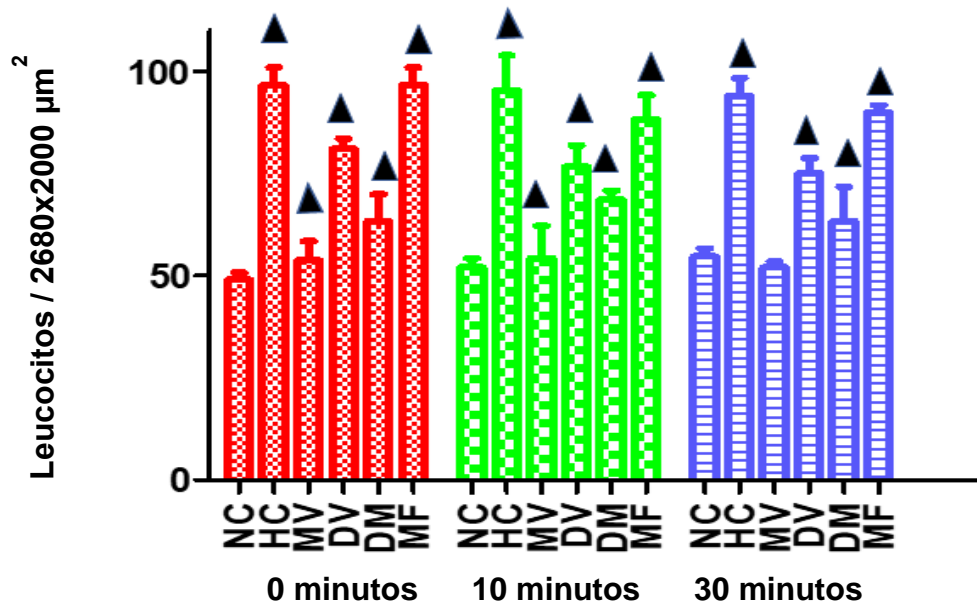


Figura 14. Características histológicas del tejido hepático post carga de glucosa a los 0, 10 y 30 minutos. Biopsias de tejido hepático teñidas con H&E de los grupos: NC (A-C), HC(D-F), MV (G-I), DV (J-L), DM (M-Ñ) y MF(O-Q). Microfotografías tomadas a 20x. La vena central es tomada como referencia. La flecha azul indica infiltración leucocitaria. La flecha verde indica la presencia de cuerpos de Mallory-Denk.

A



B

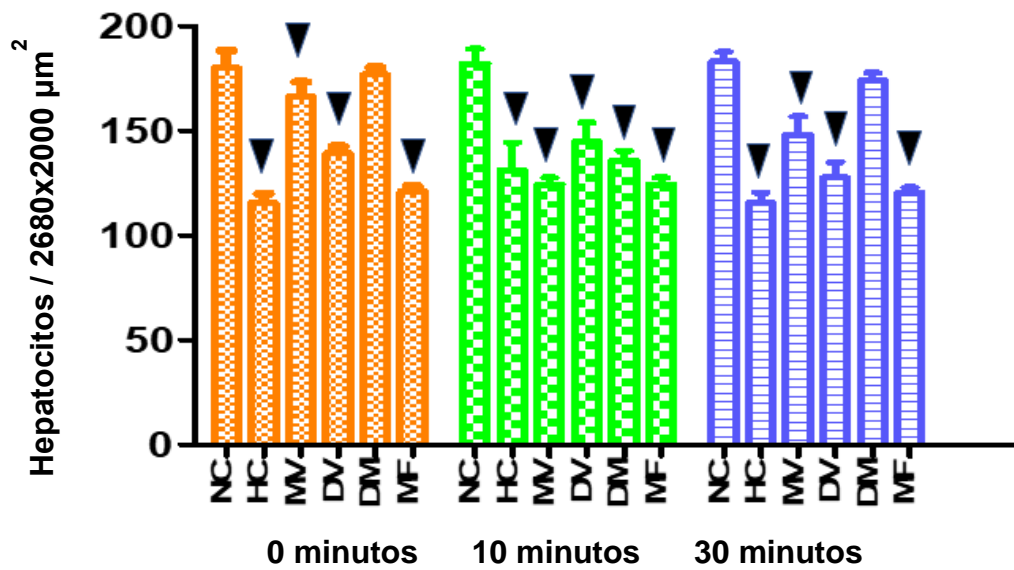


Figura 15. Características histológicas del tejido hepático post carga de glucosa a los 0, 10 y 30 minutos. A) Análisis cuantitativo del número de leucocitos B) Análisis cuantitativo del número de hepatocitos. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. ( $\blacktriangle$ ) Indica incremento, ( $\blacktriangledown$ ) indica disminución con respecto del grupo NC al minuto 0,  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

#### 9.14 Análisis de la dinámica de formación de glucógeno en las zonas del lobulillo hepático

Una vez evaluados los cambios histológicos provocados por el SM y los diferentes tratamientos, se evaluó la relación que tienen con la posible dinámica de formación de glucógeno en cada una de las zonas del lobulillo hepático, a los 0, 10 y 30 minutos posterior a la carga de carbohidratos (Fig. 16). El análisis de la densidad óptica de cortes histológicos teñido con ácido peryódico de Schiff (Fig. 17 A – Q), mostró un aumento significativo en la formación de bases de Schiff, lo cual es atribuible a la síntesis de glucógeno del 10% a los 10´ y un 22% a los 30´ en la zona I del grupo NC (Fig. 18 A). Así mismo, el análisis de la zona II muestra un incremento del 9%, 21% y 25 % para los tiempos de cohorte 0, 10 y 30 minutos (Fig. 18 B). Por último, la zona III observó un incremento en la síntesis de glucógeno del 20% y 21%, a los 10 y 30 minutos (Fig. 18 C).

El análisis densitométrico del grupo HC mostró de manera interesante una reducción significativa del 28% en la formación de base de Schiff en la zona I durante en el ayuno y un aumento del 9% a los 10 minutos (Fig. 18 A). En la zona II de este grupo se redujo 25% en el ayuno y aumentó significativamente 15% a los 10 minutos (Fig. 18 B). Mientras que, la zona III en el ayuno observó una disminución del 21%, seguido de un incremento del 10% al minuto 10 y un incremento de 21% al minuto 30 (Fig. 18 C).

Por su parte, el estudio densitométrico de la zona I del grupo administrado con Metformina a los 0´ mostró una disminución significativa del 30% seguido de un incremento del 15 % a los 30 minutos (Fig. 18 A). La zona II observó una disminución significativa del 42% durante el ayuno, seguido de un aumento del 11% al minuto 10 y un 14% al minuto 30 (Fig. 18 B). Por su parte, la zona III registró una disminución significativa del 20% en el ayuno, un aumento del 14% a los 10 minutos y un incremento del 20% a los 30 minutos post-carga (Fig. 18 C).

El grupo administrado con metavanadato de sodio, demostró un aumento significativo del 10% en el análisis densitométrico durante el ayuno, 25% al minuto 10 y un aumento del 16% al minuto 30 (Fig. 18 A). La zona II incrementó del 28% y 9% para los 10 y 30 minutos respectivamente (Fig. 18 B). Por último, el análisis de la zona III de este grupo, registró un aumento del 25% al minuto 10, seguido de un incremento del 18% al minuto 30 (Fig. 18 C).

El tratamiento con decavanadato de amonio, mostró solamente un aumento significativo en el análisis densitométrico en la zona I del 17% a los 30', permaneciendo sin diferencias significativas para los demás tiempos de cohorte (Fig. 18). El estudio de la zona II de este grupo, permite observar únicamente un incremento significativo del 16% a los 30 minutos (Fig. 18 B). Por su parte, el análisis de la zona III mostró incremento del 9% y 16% a los 10 y 30 minutos post-carga (Fig. 18 C).

Por último, el tratamiento con MetfDeca, fue el único grupo que registró un aumento significativo del 22% en la densitometría atribuible a la síntesis de glucógeno en la zona I durante el ayuno, 11% al minuto 10 y 35% a los 30 minutos (Fig. 18 A). En la zona II del grupo MetfDeca se observó incremento del 31% en el ayuno, 14% a los 10 minutos y 18% a los 30 minutos (Fig. 18 B). Por último, el análisis de la zona III del grupo MetfDeca, demostró un incremento del 28% en el ayuno, 23% al minuto 10 y 41% al minuto 30 (Fig. 18 C).

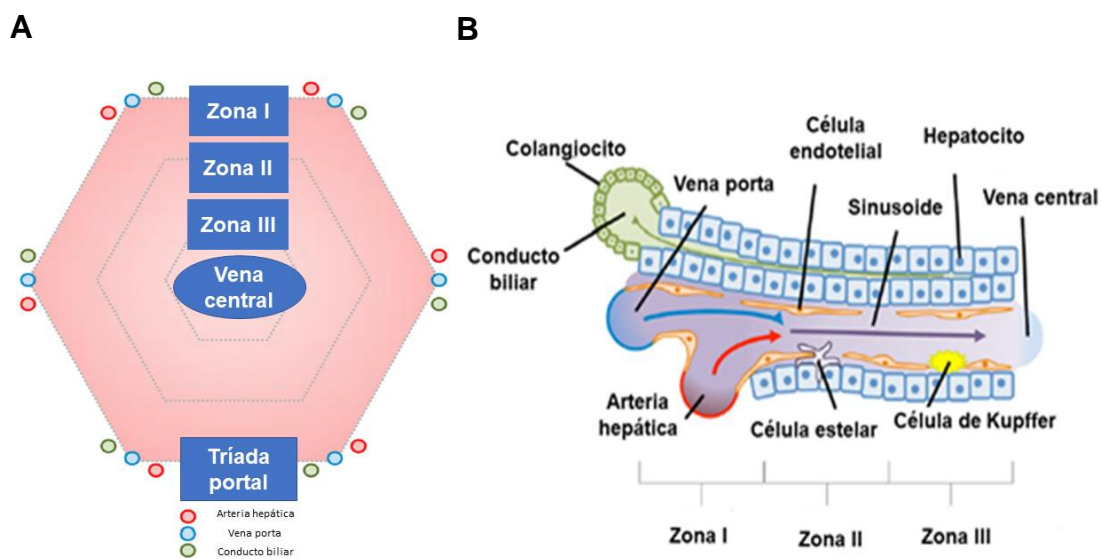


Figura 16. El acino hepático. (A) Citoarquitectura del parénquima hepático. El lóbulo hepático consiste en acinos hexagonales con una vena central y tríadas portales en las interfaces de los acinos. (B) Sección transversal del tejido hepático a lo largo del eje portocentral. Las células endoteliales forman las paredes de la sinusoide que también contiene macrófagos conocidos como células de Kupffer. Según lo indicado por las flechas (azul y roja), la sangre fluye desde el área portal a través de la sinusoide hacia la vénula hepática. La bilis (flecha verde) fluye en la dirección opuesta de los hepatocitos a través de los conductos biliares. Tomado y modificado de Trefts et al., 2017.

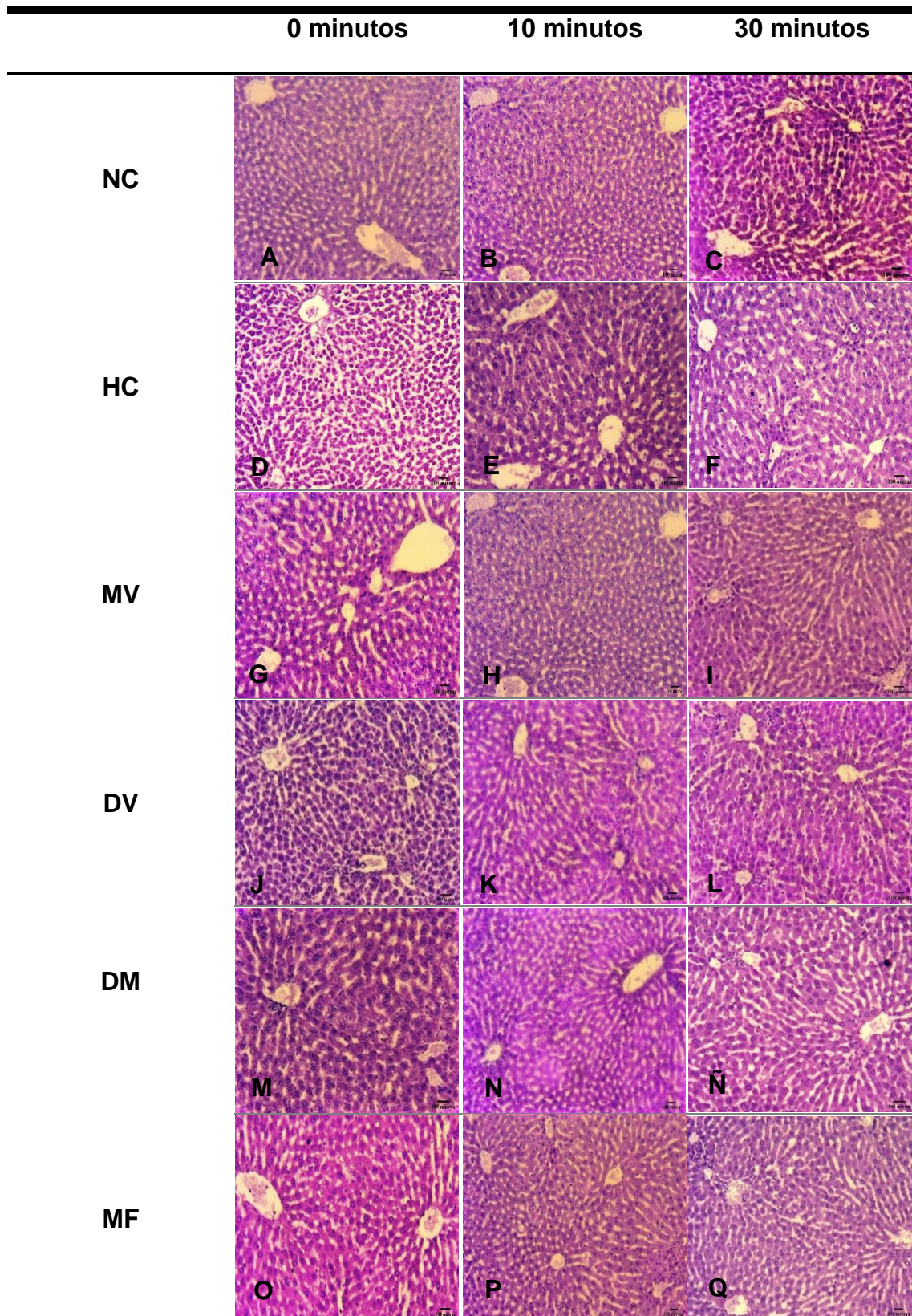


Figura 17. Dinámica de formación de glucógeno en el tejido hepático post carga de glucosa a los tiempos de cohorte: 0, 10 y 30 minutos. Biopsias de tejido hepático teñidas con Schiff de los grupos: NC (A-C), B), HC(D-F), MV (G-I), DV (J-L), DM (M-Ñ) y MF(O-Q). Microfotografías tomadas a 10x.

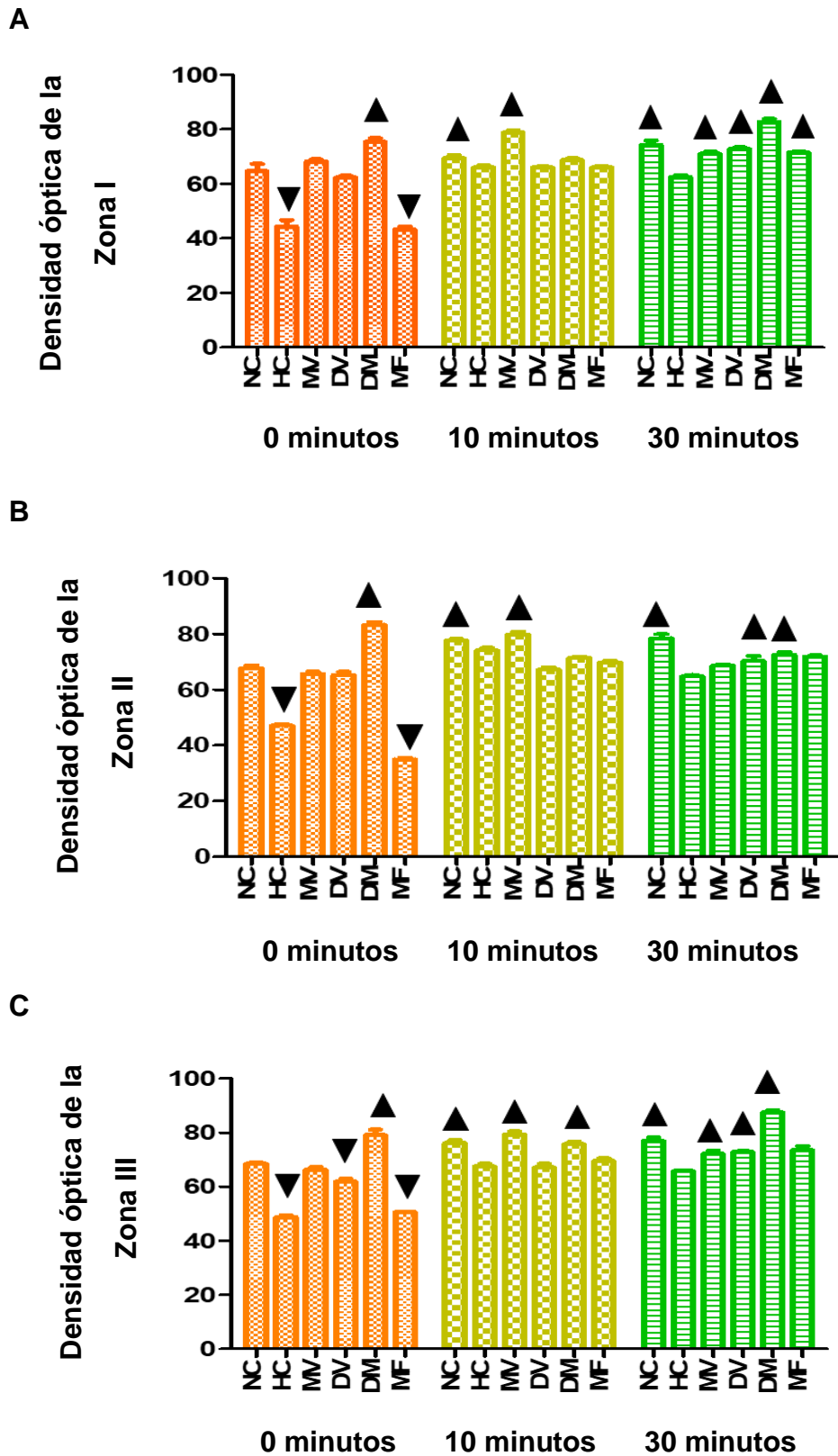


Figura 18. Dinámica de formación de glucógeno en el tejido hepático post carga de glucosa a los tiempos de cohorte: 0, 10 y 30 minutos. A) Análisis cuantitativo de la densidad óptica de a la zona 1 B) Análisis cuantitativo de la densidad óptica de la zona 2 C) Análisis cuantitativo de la densidad óptica de la zona 3. Los resultados son expresados como la media  $\pm$  SEM. ( $\blacktriangle$ ) Indica incremento,

(▼) indica disminución con respecto del grupo NC al minuto 0,  $p \leq 0.05$ , empleando estadístico ANOVA de una vía con análisis post hoc de Bonferroni.

## 10. Discusión

En una primera instancia se realizó, la optimización de los compuestos de decavanadato. El rendimiento obtenido para los monocristales de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  fue mejorado en relación a lo reportado previamente por nuestro grupo de trabajo (Sánchez-lara et al. 2018). Las mejoras observadas en rendimiento se relacionaron a la disminución en el tiempo de cristalización, lo que puede atribuir al estricto control en el pH (6.3 y 5) durante todo el proceso, el cual se monitoreo desde las soluciones madre de metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ) hasta el proceso de filtrado. Por otro lado, los monocristales  $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  fueron recuperados con rendimiento obtenido fue del 62 %, mismo que resultó por debajo del reportado por Todorovi (Todorovi et al. 2005). El tiempo de aparición de los primeros monocristales fue de 48 horas después de haberse realizado la síntesis, alcanzando un rendimiento final a las 72 hrs. Para la síntesis de este compuesto es necesario mencionar que no fue requerida la elevación de la temperatura ni enfriamiento durante todo el proceso de cristalización, como se menciona por los autores anteriores (Todorovi et al. 2005).

Posterior a la síntesis se procedió a la caracterización de los compuestos. Esta incluyó el análisis del espectro de IR, en el compuesto  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  se observó una banda de intensidad media localizado en la región de alta frecuencia entre  $3395\text{-}3289\text{ cm}^{-1}$  y otra banda en la región de  $3200\text{-}3170\text{ cm}^{-1}$  que corresponden al enlace  $\nu_{\text{as}}(\text{N-H})$  y a  $\nu_{\text{s}}(\text{N-H})$ , lo cual concuerda a lo reportado (Chatkon et al. 2013; Pooransingh et al. 2003) (Gunasekaran et al. 2006). Asimismo, se observa una banda localizada en la región de  $2970$  y  $2936\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los modos de estiramiento simétrico y asimétrico del grupo metilo de HMeft, así como la banda de intensidad fuerte, localizada entre  $1624$  y  $1569\text{ cm}^{-1}$ , originada a partir de  $\nu_{\text{s}}(\text{C=N})$  para ambos espectros. Es posible localizar dos bandas entre  $1480$  y  $1420\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las deformaciones asimétricas de los grupos metilo que

pertencen a la molécula de Metformina (Gunasekaran et al. 2006; Chatkon et al. 2013) (Madzharova et al. 2016). Existe una banda de fuerte vibración encontrada en  $950\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de IR de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que corresponde a  $\nu(\text{V}=\text{O})$  y la absorción que se encuentra en  $830$  y  $736\text{ cm}^{-1}$  pertenece al enlace  $\nu_{\text{as}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$  (Madzharova et al. 2016). Las bandas de intensidad media están localizadas entre  $603$  y  $571\text{ cm}^{-1}$  y corresponden a  $\nu_{\text{s}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$  (Frederickson and et al. 2001).

Sin embargo, para el espectro de IR de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , se muestra una diferencia marcada en las bandas localizadas en  $950\text{ cm}^{-1}$  corresponde a  $\nu(\text{V}=\text{O})$ , en  $830$  y  $736\text{ cm}^{-1}$  pertenece al enlace  $\nu_{\text{as}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$ , y por último en las bandas localizadas entre  $603$  y  $571\text{ cm}^{-1}$  los cuales corresponden a  $\nu_{\text{s}}(\text{V}-\text{O}-\text{V})$  (Madzharova et al. 2016). El IR del compuesto  $[\text{NH}_4]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  mostró las mismas bandas localizadas en  $1407\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a  $\text{NH}_4^+$ , y otra en  $1645\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a  $\text{OH}^-$  reportadas por Todorovi (Todorovi et al. 2005), con un ligero cambio en la intensidad de esta última, atribuible a la cantidad de moléculas de agua presentes en la molécula. De igual manera, el IR obtenido para este compuesto, muestra la posición de los picos de las bandas localizadas en  $3000\text{ cm}^{-1}$ , lo que sugiere la presencia de enlaces por puentes de hidrogeno de diferentes fuerzas. Y muestra dos bandas localizadas en  $954$  y  $825\text{ cm}^{-1}$  que son atribuidas al estiramiento del enlace V-O y diversas bandas por debajo de  $800\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones asimétricas y simétricas del enlace V-O (Todorovi et al. 2005).

Adicionalmente se realizó el análisis del espectro obtenido por RMN de  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en solución acuosa, el cual mostró la clásica señal de resonancia de  $^{51}\text{V}$  en tres diferentes átomos de vanadio dentro de la estructura de decavanadato:  $\text{V}10\text{A} = -515.88\text{ ppm}$ ,  $\text{V}10\text{B} = -500.31\text{ ppm}$  y  $\text{V}10\text{C} = -423.55\text{ ppm}$ ; así como la aparición de tres picos finos de señal en  $\text{V}1 = -560.39$ ,  $\text{V}2 = -572.19$  y  $\text{V}4 = -576.8\text{ ppm}$ , correspondientes a especies de vanadatos cíclicos. Estas señales corresponden a las reportadas previamente por (Sánchez-lara et al. 2018). Sin embargo, es posible observar una disminución en la intensidad de la señal localizada en  $\text{V}4 = -576.8$  ( correspondiente a  $[\text{V}_4\text{O}_{12}]^4$ , en comparación con los resultados obtenidos por (Sánchez-lara et al. 2018). Diversos estudios muestran que las especies de vanadato (V) en solución

pueden aparecer simultáneamente en equilibrio con diferentes estados de protonación y con diferentes conformaciones, dependiendo del pH, concentración de vanadio y fuerza iónica (Manuel Aureliano 2011)(Sánchez-lara et al. 2018). En el caso de la molécula de decavanadato, es bien sabido que a valores de  $\text{pH} > 6.5$  se descompone lentamente debido a que es termodinámicamente inestable, dando paso a la formación de tres vanadatos cíclicos: monomérico  $[\text{H}_2 \text{VO}_4]^-$ , dimérico  $[\text{H}_2 \text{V}_2 \text{O}_4]^{2-}$ , y tetramérico  $[\text{V}_4 \text{O}_{14}]^{4-}$  (Sanna et al. 2017). Así, la disminución en la intensidad de esta señal es resultado de una menor especiación de la muestra analizada, producto de un análisis temprano de la solución de decavanadato.

Por otro lado, se llevó a cabo la validación del modelo de SM, en la que los animales fueron inducidos con la dieta hipercalórica MX/E/2013/047377 durante un periodo de tres meses. Los animales alimentados con la dieta hipercalórica mostraron una disminución en el peso y talla (Figura 6A y Figura 6B), intermitencia en el IMC (Figura 6C) y no presentaron diferencias en el perímetro de la circunferencia abdominal (Figura 6D) así como en el porcentaje de grasa corporal (índice Lee) (Figura 6E) en comparación con el grupo normocalórico. Estos resultados contrastan con el fenotipo aceptado de SM en modelos animales como lo son: el aumento en el peso; al ser la cantidad de masa total de un individuo compuesta del total de músculos, órganos, huesos y tejido graso; el aumento en la talla, el aumento del IMC; al ser un indicador del estatus de sobrepeso u obesidad ya que al correlacionar a las mediciones de peso y talla es un indicador de la proliferación de la masa corporal en relación a músculo o tejido adiposo. Asimismo, se ha reportado el aumento en el perímetro de la circunferencia abdominal; debido a la acumulación de grasa a nivel visceral abdominal, siendo una de las causas en el desarrollo de obesidad central debido a alteraciones en el metabolismo y el aumento del porcentaje de grasa corporal (Wong et al. 2016).

El comportamiento observado en el grupo hipercalórico puede ser explicado por el ciclo de apetito y la saciedad en mamíferos, Este es regulado por dos grupos magnocelulares de neuronas del sistema nervioso central. Estos grupos se localizan en el núcleo arcuato del hipotálamo; uno produce dos potentes orexígenos: neuropéptido Y(NPY) y el péptido relacionado con agouti

(AgPR) y el otro produce dos anorexígenos: pro-opiomelancortina (POMC) además de péptido de transcripción regulado por cocaína y anfetamina (CART) (Ochoa et al 2014). Tanto las neuronas ricas en NPY/AgRP como en POMC/CART, proyectan sus dendritas hacia al núcleo paraventricular (PVN), que junto con el núcleo ventromedial y el núcleo dorsomedial, regulan la ingesta de alimentos y el gasto energético (Yadav et al. 2013). Estos dos grupos de neuronas poseen receptores específicos para hormonas como grelina, insulina y leptina, por lo que las modificaciones en sus concentraciones plasmáticas tienen un efecto sobre consumo de alimentos. De tal manera que, el consumo de una dieta con una alta concentración de carbohidratos simples como glucosa y fructuosa, facilita su digestión y provoca un aumento en su absorción en intestino después de cada consumo realizado. La glucosa y fructuosa absorbidas son conducidos al hígado por medio del sistema porta, el aumento en la concentración de glucosa sérica es censado por páncreas liberando insulina en respuesta y está en circulación, muestran el efecto de supresor del apetito. Por otro lado, el aumento en la concentración de leptina está regulada por la actividad adipocitaria con relación a la capacidad de almacenaje de TG y particularmente en el postpandrio sinérgicamente a la acción de la insulina. A nivel cerebral, el incremento de ambas hormonas regula la ingesta calórica y por ende el ciclo oxigénico- anorexígeno. Sin embargo, en etapas iniciales de la sobreingesta calórica como en el caso de nuestros modelos, la leptina estimula la termogénesis, lo cual reduce el peso corporal como se pudo observar en el tiempo de inducción (Petersen, Vatner, y Shulman 2017). Además, se sabe que grelina disminuye el apetito. Todo esto provoca en los animales del grupo hipercalórico una disminución en la cantidad de dieta consumida, pero manteniendo su requerimiento energético diario, por lo que la curva de ganancia de peso corporal, inicialmente es más lenta que la del grupo normocalórico, como se observa en nuestros resultados. Otra de las implicaciones del alto consumo de carbohidratos simples es la disminución en el consumo de macromoléculas como lípidos y proteínas necesarias para el crecimiento y desarrollo corporal, por lo tanto, el aumento en el consumo de carbohidratos está relacionado con el pobre desarrollo de la talla; impactando sobre el IMC.

Otra de las características fenotípicas aceptadas dentro del modelo de SM es el desarrollo de RI. Debido a que el SM, se encuentra relacionado con los efectos causado por la hiperglucemia, los efectos del desequilibrio en la vía de señalización de la insulina y los efectos compensatorios de la hiperinsulinemia. Se ha demostrado que el consumo de carbohidratos simples son los responsables de la inducción de las características bioquímicas del SM. Por tanto, después de tres meses de inducción con la dieta hipercalórica los animales del grupo hipercalórico muestran un aumento significativo en los niveles de glucosa sérica en el ayuno, así como en el postprandio (Fig. 6A). Los resultados obtenidos indican una intolerancia a la glucosa, producto del aumento en el consumo de carbohidratos simples, tras tres meses de consumo de la dieta hipercalórica (Aleixandre De Artiñano y Miguel Castro 2009).

El aumento de la glucosa sérica casi siempre es acompañado por hiperinsulinemia, como principal mecanismo compensatorio por parte del tejido pancreático, para restaurar la homeostasia de la glucosa en el individuo. Sin embargo, a largo plazo esta combinación desemboca en el desarrollo de RI, la cual afecta la capacidad de las células dependientes de la hormona para captar glucosa, y más aún, en hepatocitos promueve gluconeogénesis y *glucogénesis*, disminuyendo la capacidad glucogénica. Por lo que las células  $\beta$  pancreáticas secreten cantidades cada vez mayores de insulina, hasta obtener la homeostasia de la glucosa postprandial, sin que se genere una hiperglucemia sostenida, lo cual desarrolla un ciclo de alteración metabólica severa que conlleva a la alteración del metabolismo de lípidos y proteínas (Adiels et al. 2008). De acuerdo con esto, los animales del grupo hipercalórico mostraron un incremento significativo en los niveles de insulina en ayuno y una respuesta insulínica aumentada en el postprandio (Fig. 6B) en comparación con el grupo normocalórico.

*In vivo*, la sensibilidad, así como la resistencia a la insulina se encuentran reguladas por factores como el sobrepeso u obesidad, y se alteran rápidamente por cambios en los hábitos alimenticios y la actividad física (Barnard and Youngren, 1992). Estos factores de riesgo se ven potenciados por la interacción de numerosos factores, tanto genéticos como ambientales. La pérdida de la sensibilidad a la insulina tisular de forma aguda o crónica puede ocurrir a través de múltiples vías, a través de las cuales los mediadores celulares de la

señalización de insulina pueden ser alterados, rutas de interacción fosforilativa interacciones proteicas, y otras modificaciones en la regulación de la expresión genética son algunos de los mecanismos involucrados. El decremento de la sensibilidad está asociado con una reducción en la captación de glucosa por el tejido hepático y su consecuente desarrollo de resistencia a insulina, favoreciendo la lipogénesis y la gluconeogénesis (Fabbrini et al., 2009; Lim et al., 2011; Petersen et al., 2010).

En la resistencia a la insulina, la capacidad de la insulina para iniciar las cascadas de fosforilación río abajo que regulan la actividad de segundos mensajeros se encuentran disminuidas (Pirola et al 2004; White, 2003). La actividad enzimática, la fosforilación de cinasas y sustratos en estas vías de señalización se reducen, como se ha demostrado en biopsias musculares de sujetos insulinoresistantes (Sesti 2001).

El desarrollo de insulinoresistencia fue evidenciado por el aumento del índice HOMA-IR en el grupo hipercalórico, como consecuencia del incremento en glucosa e insulina (Fig. 6C). Asimismo, el índice LIRI que evalúa la RI hepática mostró el mismo comportamiento (Fig. 6D). Adicionalmente, el índice HOMA- $\beta$ % disminuyó (Fig. 6E), acompañado de una mayor generación de insulina (IGI) en el grupo hipercalórico (Fig. 6F). Lo anterior es indicativo de que las células  $\beta$  pancreáticas desregulan procesos homeostáticos en el mecanismo de generación, maduración y liberación de insulina, al mismo tiempo debido al entorno hipercalórico aceleran dicho mecanismo, observando hiperinsulinemia de tipo compensatorio contra la hiperglucemia. Una prolongada hiperfunción en las células  $\beta$  pancreáticas puede conducir al agotamiento, disminuyendo a largo plazo la producción de insulina, lo cual es una característica de los modelos de disfunción metabólica y desarrollo de diabetes mellitus (McCracken, Monaghan, y Sreenivasan 2018).

Cabe mencionar que la RI es independiente para cada tejido, y en el caso del tejido hepático, la RI está relacionada con alteración y defectos en el almacenaje de la glucosa, ácidos grasos y triglicéridos; que inducen cambios en las vías de señalización que favorecen la lipogénesis y la gluconeogénesis, incrementando la glicemia y obligando a mantener el estado hiperinsulinémico por largos periodos de tiempo (Poisson et al. 2017).

En este sentido, los animales del grupo hipercalórico mostraron dislipidemia, al aumentar los niveles séricos de TG (Fig. 7A); colesterol total (Fig. 7B), VLDL (Fig. 7C) y LDL (Fig. 7D), así como una marcada disminución en la cantidad de HDL (Fig. 7E). Es bien sabido que, la dislipidemia relacionada a RI, comienza con sobreproducción de TG y su empaquetamiento en VLDL debido al aumento en la síntesis de novo en el hígado y a la liberación de AGL por parte de los adipocitos (Després y Lemieux 2006). Las VLDL son la principal forma de transporte de TG endógenos hacia los tejidos. Por acción de la lipoprotein lipasa (LPL) se lleva a cabo la hidrólisis de los TG contenidos en las VLDL, las cuales son transformadas en IDL que pueden ser catabolizadas por el hígado o pueden permanecer en circulación y dar origen a LDL (Zabielski et al. 2018). En estados de RI, se generan VLDL, IDL y LDL ricas en TG (Unger et al. 2010), las cuales disminuyen la dinámica de la hidrólisis, por lo tanto, pasan mayor tiempo en circulación, lo que contribuye al desarrollo de esteatosis y aterosclerosis (Sesti 2006). Por último, la disminución en la cantidad de HDL en el grupo hipercalórico puede ser explicado por dos eventos característicos de la RI, la disminución de la síntesis y el aumento del aclaramiento. Este último, al modificar el tamaño (al disminuir su tamaño), el contenido lipídico al poseer una mayor cantidad de TG que de colesterol (se vuelven más densas), y pierden proteínas clave como la paroxonasa-1 (PON1), por lo que son más susceptibles a procesos de glicación y lipoperoxidación (se vuelven oxidadas), aclarándose a mayor velocidad por el hígado, riñón y el cerebro. En este último, el aclaramiento se da por el incremento de apolipoproteína E, lo que provoca una mayor deposición de TG en este órgano (Erejuwa et al. 2018).

Una vez establecido el modelo de SM, se procedió a administrar los diferentes compuestos, sin cambiar el hábito alimenticio del modelo para generar un mayor reto. Se ha establecido que las sales y compuestos decaméricos de vanadio pueden ser tratamientos alternativos efectivos contra los desórdenes metabólicos, por lo que se muestra el efecto de los tratamientos con metformina (200 mg/kg/día) y metavanadato de sodio, decavanadato de amonio y de metformina (12.33 µg/kg/2 veces por semana) sobre la homeostasis glúcido-lipídica de rata Wistar con alteraciones metabólicas y alimentados permanentemente con una dieta hipercalórica alta en carbohidratos.

Como se puede observar en la tabla 1 y tabla 2, tras dos meses de tratamiento, los grupos administrados con tratamientos con base en vanadio mejoraron sus mediciones zoométricas y su panel lipídico en comparación con el grupo HC; aunque este último, no logra recuperarse a nivel del grupo control.

Por su parte el tratamiento con Metformina registró una disminución del peso, talla e IMC en relación con el grupo NC. Estos resultados son consistentes con estudios en modelos animales que demuestran que el consumo de Metformina está ampliamente relacionado con una mejora sistémica y metabólica que implica la reducción de peso, talla, mejora del índice de masa corporal, debido a la reducción de síntesis de glucosa hepática, así como disminución en la lipogénesis, aumentando la beta oxidación, así como la glucólisis en tejidos periféricos causados por su administración (Wilson et al., 2010).

Metformina que es considerado el tratamiento de primera línea ante problemas metabólicos, ha demostrado capacidad de regular la concentración sérica de triglicéridos al aumentar la  $\beta$  oxidación, por medio de la vía del receptor activado por proliferador peroxisomal (PPAR- $\alpha$ ) en el hígado (Rea y Tien 2017). Además, facilita la actividad de la proteína cinasa activadora de AMP cíclico (AMPK) de forma secundaria a la interrupción del complejo I de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Grigorescu et al. 1991). El AMPK es un regular maestro del balance energético (Mehnert 2001). Estos efectos ya han sido previamente demostrados por nuestro grupo de trabajo tanto con la administración de metavanadato de sodio como de decavanadatos de amonio y de metformina (Treviño et al. 2018; Treviño, Sánchez-Lara, et al. 2015).

Así mismo, tanto los tratamientos con metformina y vanadio pueden modular la gluconeogénesis y glucólisis hepática. En ambos casos esto se logra a través de mejoras de la acción de insulina, como se ha mostrado en estudios *in vivo* e *in vitro* (Pereira et al. 2009)(Manuel Aureliano 2011). La capacidad hipoglucemiante con la que cuentan los compuestos con base en vanadio se encuentra relacionada con la activación de varios componentes clave de las vías de señalización de insulina, que incluyen proteínas cinasas como MAPK, ERK1/2, fosfoinositol 3 cinasa (PI3-K) / proteína cinasa B (PKB) que, a su vez,

están implicadas en la mediación de los efectos mitogénicos y metabólicos de la insulina. Particularmente, las evidencias denotan que, la vía PI3K/ PKB activada por insulina, juega un papel clave en la mediación del tráfico de GLUT4 estimulado por insulina (Wang et al. 2013) y con ello, las evidencias han demostrado mejoras en la captación de glucosa, tanto en células aisladas como en tejidos de diferentes modelos animales de diabetes tipo 1 y tipo 2 (M. Aureliano y Ohlin 2014). Todo lo anterior conduce a una mejora de la glicemia basal y postprandial, la respuesta insulínica y la captación de glucosa, como se observa en la Fig. 8. Sin embargo, ninguno de los tratamientos administrados logró llevar estos parámetros a nivel del control NC. Probablemente lo observado sea debido a que se mantuvo una respuesta hiperinsulinémica (Fig. 8 C-D).

Para corroborar este hecho se administró insulina exógena, lo cual se conoce como una prueba de tolerancia a insulina y se evaluó el comportamiento de glucosa (Fig. E-F). Esta prueba se usa para evaluar la sensibilidad a la insulina, al administrar una dosis estándar de insulina y se monitorea la glucemia, la tasa de desaparición de la glucosa plasmática indica el grado de sensibilidad a la insulina corporal y se correlaciona con la técnica del “clamp” de glucosa, el cual es el estándar de oro. El grupo NC observó una pendiente negativa en los primeros 30 minutos que es indicativa de la sensibilidad a insulina en hígado y músculo. Los tratamientos con decavanadatos observaron la misma dinámica que el grupo NC, pero muestran una pendiente negativa menos pronunciada en el mismo periodo de tiempo. Sin embargo, los grupos HC, metformina y metavanadato observan inicialmente una pendiente positiva que es indicativo de resistencia a la hormona, pobre recaptura de glucosa, y subsecuentemente estados glucogenolíticos y gluconeogénicos (Chu et al. 2014).

La mejora en la sensibilidad a la insulina observada en los tratamientos con decavanadato de amonio y MetfDeca, concuerda con la acción sensibilizadora con la que cuentan diversos compuestos con base en vanadio observada en diferentes estudios como: Bis ( $\alpha$ -furancarboxilato) oxovanadio (IV) (BFOV) (40.2  $\mu$ mol/kg) (12 semanas, en ratones KKAY) (Liu et al. 2021), bis(3-hidroxi-2-metil-4-pironato) oxovanadio (BMOV) (0.23 mM/kg) (6 semanas en modelos de ratas diabéticas neonatales no insulino dependientes por STZ) (Gancheva et al. 2015), en los cuales se muestra la recuperación completa de los valores de glucosa e

insulina basal, así como de la disminución del área bajo la curva de la tolerancia a insulina.

Para corroborar este hecho, se evaluaron por medio de modelos matemáticos previamente reportados y validados en modelos murinos, el estado de resistencia y sensibilidad a insulina periférica y hepática (Treviño y Waalkes. 2015). El cálculo de los índices HOMA-IR y HOMA-S% evidenciaron la presencia de resistencia a la insulina en los grupos y baja en la sensibilidad a esta hormona para los grupos: HC, metformina y metavanadato, después del tratamiento, mientras que los tratamientos con decavanadatos demostraron una mejora sustancial sobre el estado de insulinoresistencia (Fig. 9A-B).

Sin embargo, a pesar de la mejora observada en la sensibilidad y en la disminución de la resistencia a la insulina periférica en los tratamientos con decavanadato de amonio y MetfDeca, aún existe diferencia con respecto al nivel del grupo NC. Estos resultados contrastan con estudios realizados en nuestro grupo de trabajo, en los cuales el tratamiento con decavanadatos como: MetfDeca y decavanadato tetrakis 4-(N,N-dimetilamino) piridino en modelos animales de desregulación metabólica por consumo de dieta hipercalórica y en modelos animales de dislipidemia y disglucemia (Treviño et al. 2018) se observa un retorno completo de los valores de los índices HOMA-IR y HOMA-S% a los del NC. Por otro lado, el análisis de estos parámetros específicamente, hepáticos se observa que todos los tratamientos mejoran de manera similar la sensibilidad (Fig. 9D), aunque tampoco al nivel del control; pero el tratamiento con MetfDeca observó la mayor reducción de insulinoresistencia hepática (Fig. 9C).

Es bien conocido que la resistencia a la insulina compromete la síntesis de glucógeno, y que el aumento de la síntesis de glucógeno en el hígado mejora la tolerancia a la glucosa. La incapacidad para sintetizar glucógeno por una alteración local en la acción de insulina es evidenciada por una disminución temprana en la respuesta de varios componentes de la cascada de transducción del brazo metabólico de la insulina como lo son IRS, Akt, GSK3 y FoxO1 (Sharabi, Tavares, y Puigserver 2019). Para evidenciar si existe alteración sobre la síntesis de glucógeno, este fue cuantificado durante los primeros 30 min posteriores a la carga de glucosa. Con relación a la carga de glucosa (Fig. 10A)

se puede observar como el grupo NC y MetfDeca presenta una pendiente positiva, lo que se traduce a una recaptura de glucosa y generación de glucógeno.

Los resultados obtenidos para el grupo MetfDeca concuerdan con estudios realizados previamente en nuestro grupo de trabajo, donde la síntesis de glucógeno en modelos animales de desregulación metabólica por el consumo de dieta hipercalórica es regulada después de dos meses de administración de MetfDeca (2.5  $\mu\text{mol/kg}$ ) (Treviño, Sánchez-Lara, et al. 2015a) y con diferentes estudios en modelos animales que sugieren que el tratamiento con vanadio puede interferir con la actividad de diversas proteínas fosfatasas (Crans et al. 2004). Se ha reportado que vanadio mejora la actividad de la glucógeno sintasa (GS), estimula la fosforilación de la proteína (GSK3) y aumenta la actividad de la proteína fosfatasa tipo 1 (PP1) en músculo e hígado de modelos diabéticos inducidos por estreptozotocina (Semiz., et al., 2002). Por otro lado, estudios realizados en animales, también demostraron que la administración de compuestos con base en vanadio lograron estimular la síntesis de glucógeno, sugiriendo que la fosforilación en tirosina de IRS-1 y la activación de PI3K juegan un papel clave en la mediación del efecto insulino potenciador de vanadio en la síntesis de glucógeno (Hemmings y Restuccia 2012).

Sin embargo, en los otros tratamientos no se observó este comportamiento, por el contrario, todos observan una pendiente negativa, lo cual es indicativo de una pobre generación de glucógeno (Fig. 10C), siendo el tratamiento con metavanadato el que muestra la acción más pobre. Este comportamiento es típico de estados de insulinoresistencia y correlacionan con una limitada recaptura de glucosa (Figs. 8A y 9C), y con desvíos metabólicos de esta para generar estados lipogénicos.

La ruta de lipogénesis de novo se activa a nivel transcripcional por la acción sinérgica de los factores de transcripción SREBP1c (proteína de unión al elemento regulador de esterol-1c) y chREBP (proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos) que actúan sobre genes lipogénicos y glucolíticos. En los que, la insulina es el regulador más potente. Bajo las señales apropiadas, SREBP1c se escinde en el Golgi en la forma madura transcripcionalmente activa,

que se transloca al núcleo. La glucosa por su parte regula chREBP aumentando su expresión génica e induciendo su desfosforilación, favoreciendo su translocación nuclear (Irimia et al. 2017). Para reconocer la influencia de insulina sobre este punto clave, se analizó el anabolismo/catabolismo del glucógeno ante la acción de insulina y sus contrarreguladores cuando se expone a una carga exógena de la hormona (Fig. 10B). Como se puede observar el grupo NC generó una pendiente negativa (catabolismo) en la concentración de glucógeno posterior a la administración de insulina. En todos los grupos experimentales se pudo observar una disminución exacerbada en dicho parámetro, lo que sugiere fuertemente una alteración en la cascada de señalización de la insulina. Estos resultados permiten plantear hipótesis en varios puntos críticos, como lo es, un tratamiento insuficiente, ya que en trabajos anteriores se ha reportado mejoras de este parámetro (Treviño et al. 2016, 2018b; Treviño, Sánchez-Lara, et al. 2015), lipogénesis de novo, o alteración en la cascada de señalización.

La señalización de la insulina se encuentra regulada por una cascada de señalización compleja altamente integrada y regulada. Aunque un esquema de vías divergentes parece suficiente para explicarla, el concepto de nodos críticos se hace evidente cuando se observa la gran cantidad de isoformas proteicas que están involucradas en la activación de Akt/PKB y sus efectos metabólicos. Así para delimitar las posibles acciones de los compuestos de vanadio dentro de esta vía de señalización. Tres nodos han sido localizados **a)** el primer nodo crítico en la vía de señalización de la insulina es el RI y las proteínas IRS como modulador positivo y reguladores negativos como lo son las proteínas tirosina fosfatasas (PTPasas); **b)** el segundo nodo se encuentra asociado a PI3K, PDK y mTORC como señalización positiva hacia Akt/PKB y PTEN como un modulador negativo y **c)** el tercer nodo está relacionado a IRS y MAPK con sus moduladores negativos. Es importante señalar que sólo los dos primeros nodos se encuentran directamente implicados en la síntesis de glucógeno (Treviño y Diaz 2020).

El primer nodo de la cascada de señalización de insulina en hígado se encuentra en el RI, esta es una proteína transmembrana de 320 kDa, que pertenece a la familia de receptores con actividad tirosina cinasa (RTK) (Haeusler et al. 2019), que cataliza la transferencia del grupo fosfato del ATP a los residuos de tirosina sobre sus proteínas sustratos (Croll et al. 2016). El RI es

sintetizado como un pre-pro receptor, del cual se escinde un péptido señal de 30 aminoácidos. El pro-receptor se procesa posteriormente, sometiéndose a glicosilación, plegamiento y dimerización. En el aparato de Golgi, las cadenas dimerizadas de aminoácidos se escinden a continuación en subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Estos péptidos están unidos mediante enlaces disulfuro para formar un receptor holoheterotetramérico que consiste en dos componentes idénticos, las subunidades  $\alpha$  extracelulares que se unen a la insulina y dos subunidades  $\beta$  con dominios transmembranales idénticos, con actividad tirosina cinasa intracelular (Seino et al, 1989). La unión de insulina a las subunidades  $\alpha$  del RI, da lugar a un cambio conformacional que induce la autofosforilación de distintos residuos tirosina de las subunidades  $\beta$  (Youngren, 2007).

En ayuno nuestros resultados mostraron que este nodo el RI presentó una baja fosforilación tanto en tirosinas como en treoninas en el grupo NC, el cual fue reportada como expresión relativa. De esta forma podemos comparar el incremento o disminución de proteínas respecto del control sin estímulo (basal). Es importante recalcar que el estudio de las proteínas por el método de western blot se estableció en la dinámica de los primeros 30 min post carga de glucosa. Inicialmente el grupo NC al administrar una carga oral de glucosa, se incrementan los niveles de insulina como resultante de la dinámica de absorción del carbohidrato. A los 10' se incrementó la fosforilación en tirosinas (IRpY) y disminuyó dicha fosforilación en treonina (IRpT), lo que corresponde a una dinámica normal en este primer nodo. A los 30' la fosforilación regresa a niveles basales, por lo que los datos sugieren fuertemente que la participación de este primer nodo es rápida y controlada, tomando en cuenta que una mayor fosforilación en IRpT regula negativamente la cascada de señal de la hormona (Werner et al. 2004). El grupo HC una dinámica a la baja de la fosforilación en IRpY, mientras que la fosforilación en IRpT fue a la alta lo cual es compatible con un fenotipo de resistencia a insulina. El tratamiento con metformina observó una dinámica de fosforilación en IRpY similar al grupo NC, mientras que la fosforilación en IRpY comienza disminuida, incrementa súbitamente a los 10' y luego decae a los 30', lo que concuerda con la dinámica de formación de glucógeno ya que este tiene el mismo comportamiento, estos resultados son indicativos de que la vía de transmisión de señal permanece activa por más

tiempo del biológicamente requerido. La administración de la sal y compuestos a base de vanadio mostraron dinámicas diferentes entre ellas. La administración de metavanadato aumentó la fosforilación en IRpY a los 10' y a los 30' es la más baja. Sin embargo, en este punto la concentración de glucógeno es similar a la del grupo NC, esto es debido a que la fosforilación en IRpT se adecua para que exista una señalización correcta. El grupo decavanadato de amonio observó una baja fosforilación en IRpY durante el estudio, sin embargo, la fosforilación en IRpT se comporta de la misma manera el resultado es la formación de glucógeno de manera similar al control, los resultados sugieren que este tratamiento mejora la sensibilidad a la insulina. La mejor dinámica de fosforilación en IRpY y IRpT la mostró el grupo Metf-Deca.

La dinámica de fosforilación en residuos IRpY y IRpT puede deberse a la activación de proteínas serina-treonina cinasa. Aunque las consecuencias funcionales de estas fosforilaciones son inciertas, se ha propuesto como un mecanismo de retroalimentación negativa de la vía de señalización (Pilch, 1994; Tavaretj et al., 1991; Pilfay and Siddle, 1991). Existen muy poco trabajos que muestran la posible interacción del RI con vanadio, sin embargo, los resultados obtenidos concuerdan con estudios que demuestran que la administración de sales de vanadio en cultivos de pre-adipocitos (3T3-L1), aumentan la expresión de RI hasta niveles similares al grupo administrado con insulina (Pilfay and Siddle, 1991). Por otro lado, Mukherjee sugiere que el tratamiento con (DmpzH ( $\text{VO}(\text{O}_2)_2$  (dmpz)) puede unirse al RI y modular su autofosforilación de manera similar a como lo haría la insulina en experimentos in vitro, lo que podría estimular a las cinasas río abajo en la vía de señalización de insulina y facilitar la translocación del transportador GLUT4 del citosol hacia la membrana celular, en músculo y miotubos (Wang et al. 2013). Finalmente, nuestro grupo de trabajo reportó que la administración de Metf-Deca mejora la fosforilación de RI en ratas con SMet en una dosis 2.43 mg/kg/día, normalizando la síntesis de glucógeno hepático, el almacenamiento de lípidos y la expresión de GLUT4 en tejido adiposo (Treviño et al. 2018 ).

Consecutivamente, la acción de la insulina sobre el primer nodo de la señalización comprende la fosforilación de las proteínas que actúan como sustrato del receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2, los cuales están implicados en

la modulación de los efectos del brazo metabólico en el nodo 1. La fosforilación de los diferentes IRS's conduce a la activación de la cinasa dependiente de fosfatidilinositol -3 (PI3K) que se ubica en el nodo 2 de la cascada de señalización de insulina (Huang et al. 2018). La isoforma de IRS-1 corresponde a hígado. Además, el receptor de insulina es defosforilado e inactivado por las proteínas tirosina fosfatasa (PTP's), de las cuales PTP1B es la más importante, ejerciendo un efecto negativo sobre la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa al disminuir el estado de fosforilación del receptor (Lorenzo 2011). Diversos estudios han reportado que la sobreexpresión y actividad de esta enzima contribuye a la aparición de obesidad y diabetes (Korbecki et al. 2016). Nuestros resultados muestran que el grupo NC, IRS-1 y PTP1B responden a la dinámica de fosforilación del receptor y consecuente señalización río abajo. En el grupo HC una mayor expresión de PTP1B del minuto 0 al 30 coincide con una baja fosforilación de IRS-1, mientras que el evento contrario se observó a los 30', lo que es indicativo de un retraso en la transducción de la señal de insulina. El grupo tratado con metformina presenta una dinámica interesante ya que en estado basal tanto IRS-1 y PTP1B se encuentran bajas, a los 10' IRS-1 se incrementa al nivel del control, mientras PTP1B disminuye ligeramente, finalmente a los 30' la fosforilación en IRS-1 disminuye, mientras PTP1B se normaliza a nivel del control. Esto concuerda con lo informado por Kumar y Dey (2002), en donde observaron que, la administración de metformina puede mejorar la señalización de la insulina en el músculo esquelético resistente a la insulina al aumentar la fosforilación de tirosina de la actividad del RI e IRS-1 y PI 3-cinasa asociada con IRS-1 y mejora la captación de glucosa basal en miotubos resistentes a la insulina, así como la activación de p38 basal (Kumar y Dey 2002). Asimismo, Gunton y cols. (2003) en un estudio realizado en líneas celulares de hepatocitos humanos y células Huh7 observaron que la administración de metformina (1 µg / mL) aumentó la fosforilación de IRpY en un 150% de manera basal y 78% a los 30 min, consecuentemente aumentó la activación de IRS -1, y la recaptura de desoxiglucosa (Gunton et al. 2003).

En el grupo administrado con metavanadato de sodio en condiciones basales se observó una baja fosforilación de IRS-1 con niveles elevados de PTP1B, a los 10' postcarga incrementa IRS-1 aunque no a nivel del control,

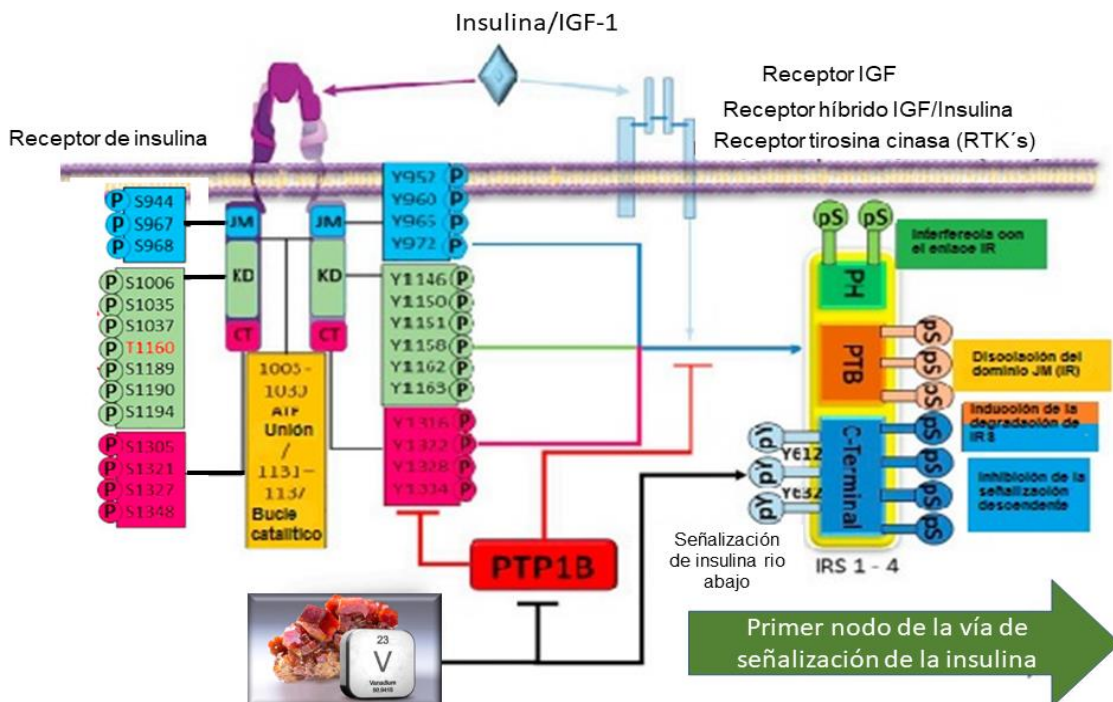
mientras la expresión de PTP1B se normaliza, finalmente a los 30' la fosforilación de IRS-1 incrementó, aunque PTP1B se mantiene similar al tiempo anterior. Los resultados son interesantes ya que en la literatura se ha propuesto que la especie vanadato puede competir con el sitio activo de esta enzima. Estudios computacionales e *in vitro*, demuestran la formación de un estado de transición V-PTP-1B y la inhibición de su actividad por vanadato (Makinen y Salehitazangi 2014). El análisis de estructuras cristalinas de complejos V5+-PTP proporcionan información relevante con respecto a los estados de transición, conformación y determinación de la estructura para la catálisis (Irving y Stoker 2017). En este sentido el ion ortovanadato tiene una estructura tetraédrica y una carga negativa con características que comparte con el grupo fosfato de los sustratos de PTP. Debido a esto, ortovanadato se ajusta al sitio activo de PTP debido a una geometría trigonal plana. De esta forma vanadato actúa como un inhibidor específico y competitivo de PTP (Korbecki et al. 2016). Por lo tanto, podemos deducir que, aunque la expresión de PTP1B no cambia, su actividad se inhibe y por ello sigue la transducción de señal río abajo.

Por su parte, los tratamientos con los compuestos de decavanadato presentaron una dinámica similar, baja fosforilación de IRS-1 al tiempo 0 y 30' y un incremento súbito a los 30'; mientras que, la expresión de PTP1B al tiempo 0' se presentó incrementada, a los 30' se normaliza al nivel del control y así se mantiene hasta el tiempo 30' en el grupo MetfDeca, sin embargo, en el grupo decavanadato de amonio incrementó la expresión. Los resultados sugieren fuertemente que la especiación a vanadato inhibe la actividad de PTP1B, y por lo tanto permite el flujo de fosforilaciones río abajo, en donde la quimera MetfDeca genera un ambiente adecuado para ello.

En la literatura se ha reportado que, la administración de compuestos con base en vanadio como BMOV, producen la fosforilación de los sustratos del receptor de insulina 1 (pIRS) en células de leucemia basofílica de rata (RBL-2H3). Por su parte la administración de arilalquilamida vanadio mostró un aumento de la activación de IRS independiente de la fosforilación del RI o Akt, estimulando así el transporte de glucosa y la expresión del transportador GLUT4 (Korbecki et al. 2016). Estudios realizados demuestran que la administración de Bis (alfafurancarboxilato) oxidovanadio IV (BFOV) potencia la expresión de

mRNA y de la proteína de IRS y GLUT 4 (Liu et al. 2017). En este sentido, el tratamiento con Bis (allixinato) oxovanadio (IV) (VO (alx)<sub>2</sub>) también aumentó la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática, seguida de la fosforilación en tirosina de la subunidad beta del RI e IRS, en adipocitos y células HepG2 (Rangel et al. 2009). Finalmente, la administración de (VO (acac)<sub>2</sub>) facilitó la fosforilación (pY) de IRS e IR-β en adipocitos 3T3-L1 (Eck, Dhe-paganon, y Nolte 1996).

Se ha sugerido que previniendo la defosforilación de la subunidad β, vanadio puede mejorar la actividad del RI. Así, diversos compuestos con base en vanadio, como la sal arilalquilamida vanadio ejerce un potente efecto insulinomimético río debajo de IR en adipocitos, la cual está caracterizada por la rápida activación de IRS, Akt y GSK3 independiente de la fosforilación del RI (S. Zhang y Zhang 2007).



**Esquema 5.** Primer nodo crítico de la vía de señalización de la insulina. Se encuentra asociado con la autofosforilación de tirosina (Y) en el dominio yustamembranal (JM) Y952-972, dominio tirosina cinasa (TK) donde se localiza el sitio activo. La fosforilación en (Y1316-1334) activa a IRS-2, el cual contribuye al efecto mitogénico de la señalización IR. Estas fosforilaciones están influenciadas por otra señalización RTK. Las fosforilaciones IRS1-4 son importantes para localizar las acciones celulares. PTP1B regula las fosforilaciones de IR y IRS, importantes para la acción del vanadio. Serina (S) y Treonina están asociadas como la disglucemia, dislipidemia,

inflamación y MAPK inducen una retroalimentación negativa de IR, pero en ciertas condiciones provoca resistencia a la insulina. Tomado y modificado de Treviño and Diaz, 2020.

El segundo nodo crítico en la vía de señalización de la insulina, da inicio con la activación de la fosfoinositol-3 cinasa (PI3K), una serina/treonina cinasa que está formada por una subunidad reguladora (p85) y otra con actividad catalítica (p110), ambas subunidades cuentan con un gran número de isoformas (Li, Brown, y Goldstein 2010). La activación de la subunidad catalítica depende de la interacción específica de los dos dominios SH2 en la subunidad regulatoria, con motivos específicos de fosfotirosina en las secuencias de las proteínas IRS, (pY) MxM y (pY) XXM. PI3K activa importantes reguladores de la vía de señalización de la insulina como lo son la activación de la serina/treonina cinasa Akt/Proteína cinasa B (PKB) y de la vía Raf/Ras/MEK/ MAPK (proteína cinasa activadora de mitógenos, conocida también como ERK) por medio de la catálisis de la formación del segundo mensajero PIP en las células (Hemmings y Restuccia 2012). La activación de la vía PI3K, también conlleva a la activación de las isoformas de Akt/PKB por medio de PDK (proteína cinasa dependiente de fosfoinositidos). PDKs se une a PIP3 en la membrana celular y de esta forma queda activada (Mora et al. 2004).

El siguiente paso en la vía de señalización de la insulina, es la activación de Akt/PKB, que es la encargada de modular muchas de las acciones metabólicas de esta hormona, la fosforilación de sustratos importantes, incluidas otras cinasas, proteínas y factores de transcripción. Lo que lo convierte en una enzima con un papel principal en la biosíntesis de glucosa, lípidos y glucógeno. Estudios demuestran que PDK1 promueve la fosforilación de Akt/PKB en Thr<sup>308</sup>. Sin embargo, la activación completa de Akt/PKB ocurre cuando se da una segunda fosforilación en Ser<sup>473</sup>. PDK1 no es capaz de fosforilar Ser<sup>473</sup>, por lo que la existencia de PDK2 ha sido postulada (Seong et al. 2012). Recientemente, nueva evidencia ha revelado que PDK2 para Akt/PKB podría ser el complejo del blanco mamífero de la rapamicina (mTOR), el cual es una serina/treonina cinasa que participa en la regulación de la síntesis de proteínas. Existen dos complejos que contienen mTOR: el complejo sensible a rapamicina (mTORC1), que tiene interacción con la proteína raptor, y un complejo insensible a rapamicina

(mTORC2), que se define por su interacción con rictor. Ambos estimulan la síntesis de proteínas por medio de la fosforilación del factor de iniciación de la traducción de eucariota 4E unido a proteína 1 (4EBP1) y la proteína ribosomal p70 s6 cinasa (Mora et al. 2004). Akt/PKB inhibe la actividad de GSK3 (Glucógeno sintasa cinasa 3) por medio de fosforilación en su N-terminal, lo cual activa a las proteínas de síntesis de glucógeno.

La expresión de Akt/PKB activa fue analizada en el presente trabajo, así como la del modulador negativo de este nodo de la vía de señalización, la fosfatidilinositol-3,4,5 -trifosfato-3 fosfatasa (PTEN), que es la encargada de la hidrólisis de fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato a PIP2 (antagonista de la vía PI3K), el cual impide que Akt/PKB sea activo y cumpla con sus funciones celulares (Xu et al. 2010). Nuestros resultados muestran que, Akt/PKB activa en el grupo control incrementa a los 10' y disminuye a los 30', lo que coincide con la expresión PTEN que presenta un comportamiento inverso a los tiempos analizados. El grupo HC presenta baja expresión de Akt/PKB activa y PTEN, hasta que a los 30' incrementa la expresión Akt/PKB activa y se normaliza la de PTEN, coincidiendo con lo previamente observado en el modelo. Interesantemente, el tratamiento con metformina mantiene incrementada la expresión de Akt/PKB activa en todo momento, mientras que PTEN es modulado de la siguiente manera, incrementado al tiempo 0 y 30 minutos y disminuido a los 10'. Al respecto algunos autores han informado la dinámica de Akt, coincidiendo con nuestros resultados (Rice et al. 2011), y siempre asociada a la presencia de insulina y por medio del sensor energético maestro AMPK. Es bien conocido que, metformina mejora el control glucémico principalmente mediante la supresión de la producción de glucosa hepática y, activando a AMPK específicamente en hepatocitos, lo que reduce la actividad de la acetil-CoA carboxilasa y aumenta la oxidación los ácidos grasos y suprime la expresión de enzimas lipogénicas (Zhou et al. 2001). Por lo que el tratamiento con metformina mejora la sensibilidad a la insulina y elimina la resistencia a la hormona, a través de la actividad mitocondrial, incremento de AMPK y regulación de la transducción de señales de la vía en estudio. Además, se ha informado que metformina suprime la expresión de PTEN de una manera dependiente de AMPK en las células preadipocitos 3T3-L1. La inhibición de PTEN potencia el aumento de la

fosforilación de Akt / ERK mediada por insulina (S. K. Lee et al. 2011). Estos hallazgos proporcionan evidencia de un nuevo papel de AMPK en la expresión de PTEN y, por lo tanto, sugieren un posible mecanismo por el cual la metformina puede contribuir a sus efectos benéficos sobre la señalización de la insulina.

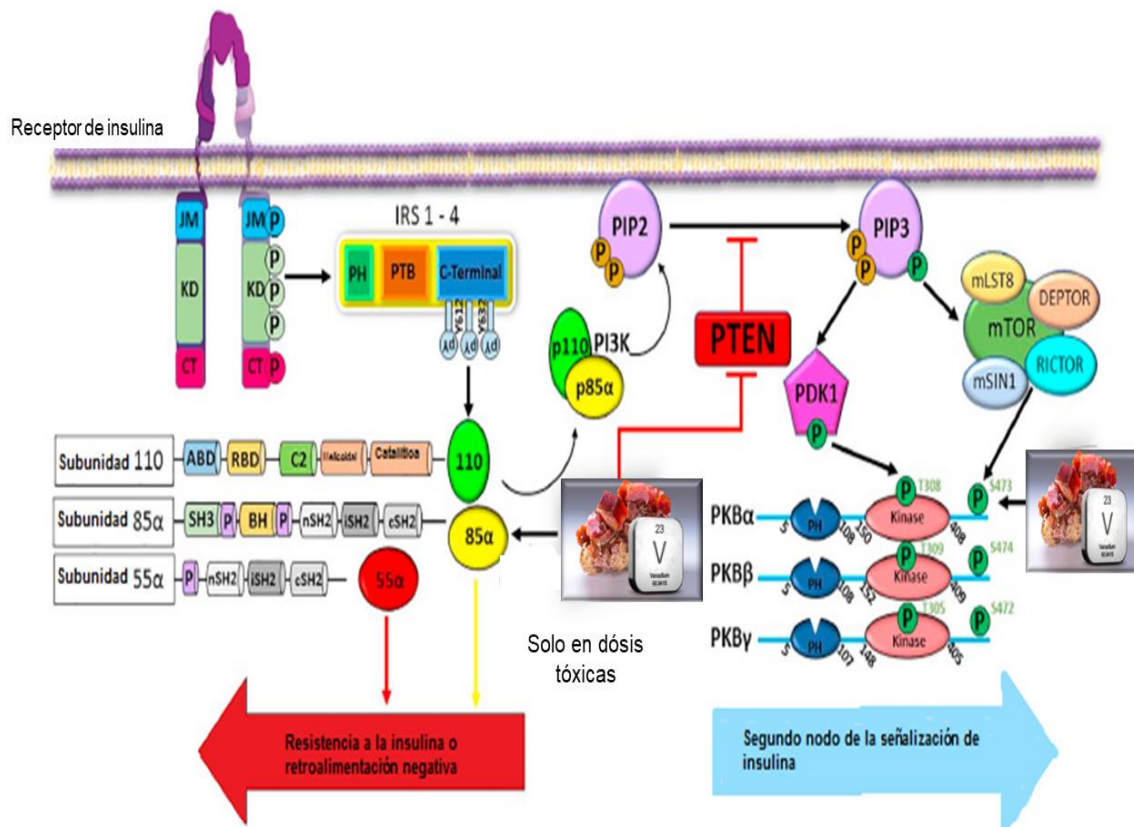
Por otro lado, el tratamiento con metavanadato mostró que la expresión de Akt/PKB activa y de PTEN se mantuvo incrementada al minuto 0 y 10, y a los 30' disminuyó para ambas proteínas. Como podemos ver, la integración de la señalización en hepatocitos es dinámica y adaptativa a las condiciones fisiopatológicas o terapéuticas. El tratamiento con ambos compuestos de decavanadato mostraron dinámicas similares, a nivel basal presentaron una baja expresión de Akt/PKB activa y PTEN, a los 10' ambas proteínas se incrementan por encima del control y finalmente a los 30' Akt/PKB activa se normaliza respecto del control mientras que PTEN permanece incrementada. El compuesto MetfDeca fue el que más se asemejó al comportamiento del grupo NC. Ambos compuestos mejoraron la señalización que se mostró deteriorada en el grupo HC. Nuestros resultados concuerdan con estudios que demuestran que la administración de N-N-dimetilfenilodiamina (DMPD) y VO (p-dmada) (0.15 mmol/kg/día) tiene la capacidad de activar Akt/PKB en hígado en ratones diabéticos tipo 2. Por otro lado, la administración de Bpv (1.0mg/kg) incrementa la fosforilación de Akt y GSK3 $\beta$  (Papapetropoulos et al. 2004). La administración de VO (acac)<sub>2</sub> y VO (malto)<sub>2</sub>, también muestran un incremento de la concentración y fosforilación de Akt/PKB en células tratadas con wortmannin e inhibidor de PI3K (Manning y Toker 2017). Por su parte, estudios realizados en células HepG2, demuestran que VOSO<sub>4</sub> tiene la capacidad de fosforilar a Tyr<sup>942</sup> como a Ser<sup>473</sup> en Akt (Hemmings y Restuccia 2012).

Así mismo, la regulación fisiológica en el segundo nodo de la vía de señalización de la insulina está controlada por un delicado equilibrio entre la fosforilación y la defosforilación mediada por PTEN (Torres y Pulido 2001). Numerosos estudios han demostrado el carácter inhibitorio de la actividad fosfatasa de PTEN con la que cuentan diversos compuestos con base en vanadio como la administración de Bisperoxovanadio (Bpv) (dosis 0.2mg/kg/día), que redujo los niveles de mRNA y proteicos de PTEN (Bishayee et al. 2010). Sin embargo, estudios realizados demuestran que la fosforilación de PTEN en

células NK disminuye significativamente (dosis 25  $\mu$ M), mientras que incrementa su expresión en dosis altas (100  $\mu$ M). Sin embargo, con dosis mayores (25-400  $\mu$ M) disminuye la expresión de SHP2 y aumenta la expresión de su forma fosforilada (Xu et al. 2010).

Siguiendo con la vía de señalización de la insulina, la proteína GSK3 es una serina/treonina cinasa que en mamíferos cuenta con dos formas ( $\alpha$  de 51 y  $\beta$  de 41 kDa, ambas comparten un sitio catalítico altamente conservado), que es capaz de inhibir la actividad de glucógeno sintasa, enzima involucrada en la síntesis de glucógeno (Peak et al. 1998). Sin embargo, la de mayor relevancia es la isoforma  $\beta$ . La regulación de la glucógeno sintasa (GS) ocurre en parte a través de la fosforilación de Akt y la inactivación de la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) en Ser21 y Ser9 en la isoforma  $\beta$  (Niewoehner, Gilboe, and Nuttall 1984). Por tanto, inactivada, la actividad de la cinasa GSK3 $\beta$  hacia GS disminuye y la GS desfosforilada es, a su vez, más activa. En los mamíferos existen dos isoformas: glucógenos sintasa 1 que se encuentra preferentemente en músculo y glucógeno sintasa 2 expresada en el hígado (Ford, Li, y Sattar 2008).

Nuestros resultados mostraron que en el grupo NC la disminución de la expresión de GSK3 $\beta$  fosforilada se da a los 30' post carga de glucosa, sin embargo, la GS activa sucedió desde los 10' y se mantuvo a los 30', mientras que la forma inactiva (GSp) está disminuida solo a los 30'. El grupo HC observó una GSK3 $\beta$  fosforilada elevada en el ayuno y a los tiempos 10 y 30 minutos se normalizó respecto del control, sin embargo, de manera muy interesante la expresión de GS activa altamente incrementada en todos los tiempos analizados, lo cual concuerda con la cuantificación realizada del glucógeno, mientras que la GSp está disminuida a los 0 y 10 minutos y normalizada a los 30'. Estos resultados confirman que etapas tempranas de SMet hay una descoordinación en la vía de señalización de la insulina, que implica la presencia de resistencia a insulina hepática limitada al nodo 1, sin embargo, esta es compensada en proteína centrales del nodo 2, que culminan con la sobregeneración de glucógeno. En nuestro conocimiento este fenómeno no ha sido reportado en la literatura.



**Esquema 6.** Segundo nodo crítico de la vía de señalización de la insulina. El segundo nodo comprende la activación de PI3K. Las subunidades 110 y 85 $\alpha$  son fosforiladas después de IRS. Más tarde PI3K fosforila a PIP2; después PDK y mTOR fosforilan a Akt/PKB en T308, 309 o 305 y S473, 474 o 472. El paso limitante de la vía de señalización de la insulina es PTEN activado, ya que inhibe la fosforilación PIP2-PIP3. Vanadio actúa sobre PTEN y mejora la fosforilación de S473. Sin embargo en dosis tóxicas, incrementa a la subunidad p85 $\alpha$ , promoviendo así resistencia a la insulina. El incremento de 55 $\alpha$  también genera resistencia a la insulina. Tomado y modificado de Treviño and Díaz, 2020.

El tratamiento con metformina incrementó la expresión de GSK3 $\beta$  solo a los 30' y de la GS activa a los 0 y 30 minutos, mientras que, la expresión de la GSp está permanentemente disminuido. Se ha observado que, los efectos inducidos por metformina (Shi et al. 2017) son a través de AMPK que estabiliza a GSK3 $\beta$  (Han et al. 2015) y mTOR que son las proteínas que desempeñan un papel crucial en la regulación de ciclo celular y la formación de glucógeno. A pesar de que esta vía particularmente se analiza en situaciones de cáncer (Xu et al. 2010)(Gwak et al. 2017), el aumento de la captación celular de glucosa se asocia con un aumento de la actividad de la glucógeno sintasa y el almacenamiento de glucógeno (Wiernsperger y Bailey 1999) . Sin embargo, la dosis es de suma importancia ya que se ha visto que a dosis de metformina

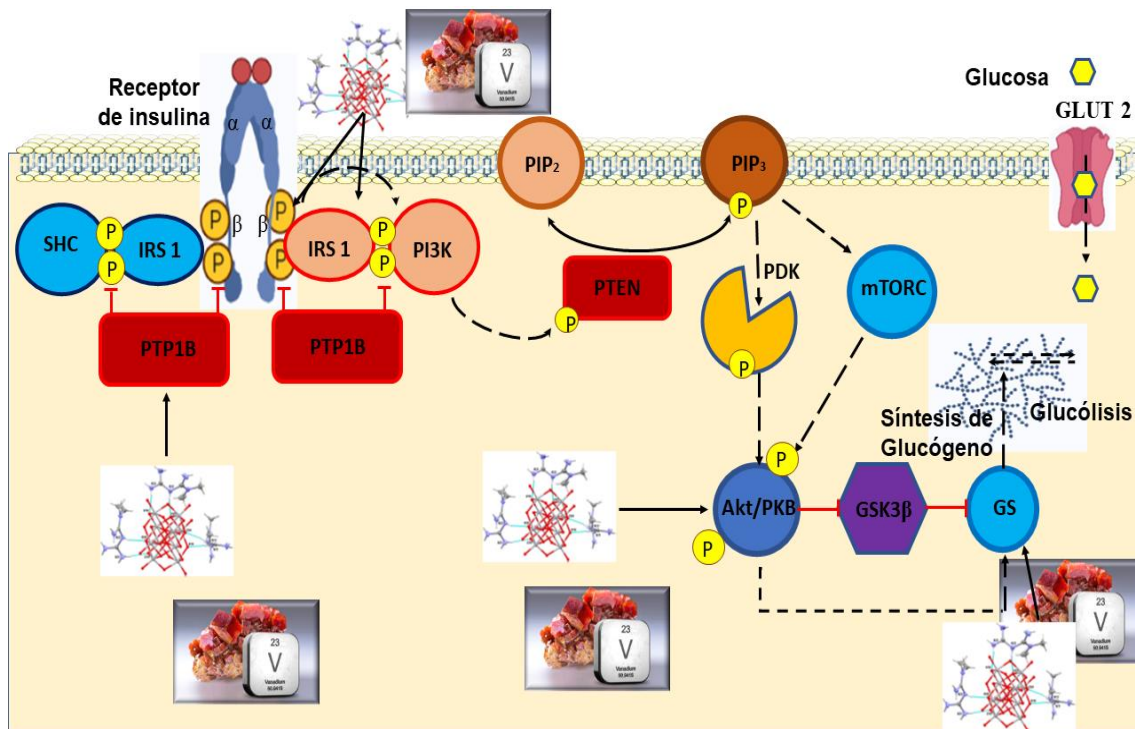
mayores de las requeridas el por paciente, se altera tanto la glucogénesis como la gluconeogénesis (Otto, Breinholt, y Westergaard 2003).

El tratamiento con metavanadato de sodio mostró una baja expresión basal y a los 30' de GSK3 $\beta$ , incrementándose únicamente a los 10', la expresión de GS estuvo incrementada, mientras que la GSp estuvo disminuida, ambas proteínas en los 3 tiempos de análisis. Estos resultados sugieren fuertemente que, la síntesis de glucógeno se encuentra promovida incluso en condiciones basales, e inhibida a los 10' postcarga de glucosa, lo cual es congruente con los resultados de glucógeno obtenidos.

Los tratamientos con decavanadato de amonio y MetfDeca mostraron una alta expresión de GSK3 $\beta$  en condición basal y una disminución en la expresión a los 30 minutos. Ambos compuestos observan alta expresión de GS a los 0 y 30 min, el decavanadato de amonio mantuvo esta expresión a los 30', mientras que el MetfDeca presentó niveles similares al grupo NC. Finalmente, la expresión de GSp se presentó permanentemente disminuida. El efecto de los diferentes tratamientos es muy interesante ya que todos ellos impactan sobre la actividad de esta enzima. Los resultados de los compuestos y sales de vanadio sugieren fuertemente que la síntesis de glucógeno se favorece con su administración.

Existen pocos estudios que demuestran interacción entre los compuestos de vanadio con la proteína GSK3  $\beta$ . Sin embargo, se ha reportado que la administración de Bpv (1.0 mg/kg) incrementa la fosforilación GSK3 $\beta$ , así como también el tratamiento con VO (acac)<sub>2</sub> and VO (malto)<sub>2</sub> ha demostrado un aumento de la fosforilación de esta proteína, en células inhibidas con wortmannin (inhibidor de PI3K) (Krause et al. 2002).

Dentro de los diferentes tratamientos con base en vanadio, el tratamiento con MetfDeca destaca al mostrar el mayor incremento en la expresión de GS y la menor expresión de su forma fosforilada, que sumado al incremento de la expresión de IRpY y IRS1 pertenecientes al primer nodo crítico de la vía de señalización de la insulina, así como el aumento en la expresión de Akt, en el segundo nodo crítico de la vía de señalización de esta hormona, lo que podría explicar el aumento en la concentración de glucógeno hepático observado para este grupo.



**Esquema 7.** Vía de señalización de insulina y síntesis de glucógeno. La fosforilación del receptor de insulina produce la fosforilación y activación de las proteínas IRS, estas a su vez, producen la activación de PI3K y la formación de PIP<sub>3</sub>. PDK es activado por el contacto con PIP<sub>3</sub> en la membrana celular y junto con mTORC activan a Akt al fosforilar Thr<sup>308</sup> y Ser<sup>473</sup> respectivamente. Akt activada, fosforila e inactivación a GSK3β, aumentando así la actividad de GS, lo que conduce a un aumento en la síntesis de glucógeno y la inhibición de la gluconeogénesis, las cuales mejoran la glucólisis, regulando así la lipogénesis y lipólisis. Tomado y modificado de Treviño and Díaz, 2020.

Toda vez que se analizó, el efecto de los tratamientos sobre la ruta de síntesis de glucógeno, se procedió a analizar la estructura hepática. El lóbulo hepático representa la unidad estructural del hígado, el acino hepático se considera la unidad funcional en términos de flujo sanguíneo (Langhans, Geary, y Scharrer 1982). El acino se puede visualizar conectando dos tríadas portales con una línea desde la cual se extiende en la dirección de las dos venas centrales adyacentes. Inicialmente se distinguieron dos zonas: la primera localizada alrededor de las tríadas portales (zona periportal,1) y otra alrededor de la vena central (zona perivenosa, pericentral o centrolobulillar,3). También se considera una zona intermedia adicional (zona 2)(Sanders y Griffin 2016). Los lóbulos/acinos del hígado muestran una gran heterogeneidad con respecto a las funciones subcelulares, bioquímicas y fisiológicas. Esta heterogeneidad permite que enzimas clave para diversas vías metabólicas se encuentran preferentemente en una u otra zona, formando un patrón conocido como

zonificación metabólica (Unger et al. 2010). Se ha demostrado la existencia de la zonificación metabólica para el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, amoníaco y xenobióticos. La importancia de la zonificación radica en capacidad de separación de rutas metabólicas opuestas, lo que evita la competencia por un sustrato común y ciclos inútiles. Además, permite enlazar rutas complementarias y se pueden llevar a cabo actividades que demanden sustrato en sitios específicos (Samuel y Shulman 2016).

El flujo sanguíneo y el metabolismo hepático dentro del acino son cruciales para la generación de gradientes modificadores (Vangipurapu et al. 2011). La sangre que proviene de la vena porta y la arteria hepática en los tractos portales fluye como una mezcla a través de los sinusoides hasta la vena central. Debido al metabolismo y la eliminación de compuestos la composición de la sangre cambia y se forman gradientes de sustratos, productos, hormonas y oxígeno. Este último es de particular importancia y varía de 60-65 mm Hg (84-91  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) en la sangre periportal y 30-35 mm Hg (42-49  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) en la sangre perivenosa (Hatting et al. 2018). En consecuencia, la  $p\text{O}_2$  intracelulares es de 45 a 50 mm Hg en las células periportales y de 15 a 20 mm Hg en las células perivenosas. Esto concuerda con las diferencias en el número y la estructura de las mitocondrias así como las capacidades oxidativas en las zonas periportal y perivenosa (Després y Lemieux 2006).

Se ha propuesto una teoría de localización anatómica para explicar la sensibilidad mantenida de la DNL hepática estimulada por insulina en presencia de resistencia a la hormona, en términos de falta de supresión de la gluconeogénesis hepática. Bajo esta propuesta el metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos se zonifica a lo largo del eje portocentral de los acinos. Para entender esto, se debe delinear la anatomía del flujo sanguíneo hepático, con sangre fluyendo desde la vena portal y la arteria hepática en los límites del acino hepático, a lo largo de los sinusoides para fluir fuera de las venas centrales del acino. Las células que se localizan alrededor de las venas porta se describen como periportales, y las que rodean la vena central como pericentrales (Jungermann and Keitzmann, 1996; Ishibashi et al., 2009).

El cambio estrictamente controlado entre la captación hepática y la liberación de glucosa mantiene las concentraciones de glucosa plasmática dentro de un rango entre 4 y 10 mM a pesar de que la ingesta y la utilización de carbohidratos varían en gran medida. Esta función homeostática del hígado con respecto a la glucosa plasmática se logra mediante varios mecanismos reguladores de enzimas que actúan en diferentes escalas de tiempo. A corto plazo, la fosforilación enzimática reversible dependiente de hormonas y los cambios en las velocidades de reacción provocados por los cambios de concentración de los sustratos / productos de reacción y los moduladores alostéricos permiten una respuesta metabólica en segundos o minutos. La activación recurrente de estos modos reguladores rápidos suele ir acompañada de cambios lentos en la abundancia de enzimas metabólicas en una escala de tiempo de horas a días (Hopgood et al., 1973; Weinberg y Utter, 1980). Tanto el modo rápido como el lento de regulación enzimática son importantes para la regulación del flujo de intercambio de glucosa entre los hepatocitos y el plasma sanguíneo (Bulik, Holzhütter, y Berndt 2016) debido a los gradientes de concentración de oxígeno, metabolitos, hormonas y morfógenos a lo largo de los capilares hepáticos. (sinusoides) la expresión de enzimas metabólicas puede diferir en varias zonas del acino hepático. Por ejemplo, la presión de oxígeno disminuye en un 50% a lo largo del eje portocentral del acino (Jungermann y Kietzmann, 2000). Esto va en consonancia con el número y la estructura de las mitocondrias (Schmucker, Mooney, and Jones., 1978.) y las capacidades glucolíticas en la zona periportal y pericentral (Braeuning et al. 2006). Los hepatocitos cercanos al polo portal (zona 1) que experimentan la concentración más alta de presión de oxígeno están predestinados para vías anabólicas fuertes que demandan ATP como la gluconeogénesis y la síntesis de urea. Por el contrario, los hepatocitos cercanos al polo venoso del acino (zona 3) experimentan las concentraciones más bajas de oxígeno y, por lo tanto, poseen una alta capacidad glucolítica, una característica típica de las células que trabajan en condiciones de privación permanente de oxígeno. La asignación heterogénea de capacidades gluconeogénicas y glucolíticas a diferentes hepatocitos a lo largo del eje porto-central puede incluso resultar en una situación en la que una cierta fracción de glucosa producida por las células periportales se utiliza para alimentar la glucólisis de las células pericentrales (Berndt et al. 2018).

En la zona 3 del acino hepático, la síntesis de glucógeno requiere un cebador de oligosacárido. Este se produce mediante la autoglucosilación de la proteína glucogenina (Roach y Skurat 1997) y requiere del nucleótido, uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa), como sustrato donante. Se pueden agregar hasta siete unidades de glucosa a la glucogenina, esto es fundamental debido a que la GS, solo puede extender una cadena de glucosa existente. La adaptación metabólica de los hepatocitos en las zonas 1 y 3 está dada por las presiones variables de oxígeno. Estas son controladas principalmente por factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF), complejos heterodiméricos que constan de una subunidad  $\beta$  expresada de forma constitutiva y una subunidad  $\alpha$  sensible al oxígeno. En el hígado, HIF-1 $\alpha$  regula principalmente genes glucolíticos, mientras que se sabe que HIF-2 $\alpha$  regula principalmente genes involucrados en la proliferación celular y el metabolismo del hierro (Ramakrishnan y Shah 2017). En consonancia con la caída de la presión de oxígeno a lo largo del eje porto-central, se encontraron HIF $\alpha$  con niveles más altos en la zona pericentral menos aeróbica (Kietzmann et al. 2001). Además del oxígeno, las hormonas pancreáticas insulina y glucagón son impulsores importantes de las diferencias en las actividades enzimáticas dependientes de la zona. El papel regulador de estas hormonas es doble. Controlan el nivel celular de AMPc de manera antagónica y, por tanto, ejercen efectos opuestos sobre la fosforilación reversible de enzimas reguladoras clave de la glucólisis y la gluconeogénesis como PFK2, PK y PEPCK. El aclaramiento hepático de las dos hormonas por captación endocítica en los hepatocitos crea un gradiente de concentración a lo largo del eje portocentral que implica diferencias dependientes de la zona en el nivel de fosforilación de las enzimas interconvertibles. Con respecto a la expresión génica de enzimas metabólicas, la insulina y el glucagón también controlan la eficiencia de varios factores de transcripción como ChREBP, SREBP-1c, CREB y Foxo. Ambas acciones del glucagón y la insulina están estrechamente interrelacionadas y funcionan en parte a través de los mismos mecanismos. Por ejemplo, la proteína cinasa A activada por AMPc (PKA) es responsable de la fosforilación de enzimas interconvertibles como FBPFK2 y PK, así como de la fosforilación de los factores de transcripción ChREBP y CREP (Uyeda y Repa 2006). El cAMP es producido por la activación inducida por glucagón de la adenilato ciclasa y degradado por

cAMP fosfodiesterasa estimulada por insulina. En consecuencia, el nivel de proteínas de las enzimas reguladoras clave refleja los niveles de hormonas integrales durante períodos de tiempo más prolongados.

Nuestros resultados mostraron una mayor densidad óptica generada del grupo NC en las zonas 1 – 3 en dependencia del tiempo (Fig. 17 A – C y 18 A – C) en dependencia del tiempo. En el grupo HC, el ayuno generó una menor densidad óptica en las 3 zonas de interés, sin embargo, a los 10 y 30 minutos incrementó en todas ellas. Por su parte, el tratamiento con metformina mostró una mayor densidad en la zona 1 a los 30 minutos. El tratamiento con metavanadato demostró un incremento en la zona 1 y 3 a los 10 y 30 minutos, en la zona 2 únicamente a los 10'. El tratamiento con decavanadato de amonio demostró una mayor densidad óptica de la zona 1 – 3 a los 30'. Mientras que, el tratamiento con MetfDeca demostró una mayor densidad óptica en las zonas 1 y 2 a los tiempos 0 y 30', mientras que la zona 3 demostró dicho parámetro incrementado a los 3 tiempos de análisis.

En nuestro conocimiento, no se ha reportado un análisis como el presentado, con relación a los tratamientos con vanadio. Sin embargo, el grupo control provee información muy interesante en cuanto a la dinámica de la acción de insulina sobre las zonas del lobulillo hepático estudiadas, en donde es evidente que en las 3 zonas analizadas son afectadas por la acción de insulina, sin embargo, la zona 3 es en donde se observa el mayor efecto de la hormona, lo cual está en concordancia con la literatura (Roach y Skurat 1997). En donde, la respuesta glucogénica restaura las reservas de glucógeno. A medida que un organismo pasa de un estado de absorción a un estado de ayuno, la insulina disminuye y el glucagón aumenta, y viceversa. Estos cambios en el hígado de la dinámica del almacenamiento de glucosa a la producción neta de glucosa, implica la degradación y formación del glucógeno, como se puede observar en nuestros resultados. La producción de glucosa es dinámica y responde a las necesidades energéticas de todo el cuerpo (por ejemplo, cerebro, músculo esquelético y sistema inmunológico).

En el grupo alimentado con dieta hipercalórica la dinámica de formación de glucógeno es constante, en las 3 zonas de análisis y en concentraciones netas

incrementadas a los tiempos analizados, como los resultados lo demuestran. Al respecto, una de las preocupaciones patológicas crecientes en los países desarrollados es la respuesta hepática a la sobrenutrición. Un componente clave de esta respuesta patológica es la resistencia a la insulina en el hígado, que está estrechamente relacionada con la diabetes tipo 2, la enfermedad del hígado graso no alcohólico y la enfermedad cardiovascular. Dadas las implicaciones para la salud pública de estos estados patológicos, es importante comprender las consecuencias funcionales de esta (Bechmann et al. 2012). La resistencia a la insulina hepática se caracteriza por una capacidad alterada de la insulina que se refleja en una alteración en la producción neta de glucosa hepática. Esto contribuye a un aumento de la glucosa en sangre, como se pudo observar en los resultados de la tolerancia a glucosa. Si bien se pierde el efecto inhibitorio de la insulina sobre la producción de glucosa hepática, se mantiene el efecto estimulante de la insulina sobre la lipogénesis (Chen et al. 2015) Esta disociación de los efectos de la insulina sobre el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos crea una "resistencia selectiva a la insulina" y se cree que contribuye al desarrollo de afecciones patológicas antes mencionadas. Hay diversos factores subyacentes implicados en el desarrollo de resistencia a la insulina hepática. Estos implican un acoplamiento alterado del receptor de insulina a proteínas de señalización intracelular, niveles de proteínas, actividades de cinasas, localización nuclear de factores de transcripción y otros mecanismos moleculares. Además, la resistencia a la insulina se asocia con un aumento del flujo de sustratos gluconeogénicos al hígado durante la sobrenutrición. Esto crea un paradigma en el que el aumento en el flujo de sustratos que combina el déficit molecular apropiado resultando un descontrol metabólico en la glucosa y lípidos.

Los tratamientos administrados mostraron diferencias entre ellos tanto en la cantidad de glucógeno cuantificado, como de la cualificación zonal. El tratamiento con metformina no disminuye la cantidad de glucógeno, sin embargo, al parecer la zonifica primordialmente a la zona 1 y 3. Mientras que, los tratamientos con vanadio mejoran la dinámica de formación de glucógeno que finalmente incrementa a los 30'. Así mismo la zonificación diferenciada mostró que, el metavanadato distribuye primordialmente a la zona 1 y 3. El tratamiento con decavanadato distribuye a las 3 zonas, pero únicamente a los 30 minutos

post carga de glucosa. Mientras que, el tratamiento con MetfDeca distribuye a las 3 zonas lobulillares y a los 3 tiempos analizados. Lo que sugiere fuertemente que existe una ventaja farmacológica sobre la dinámica de formación de glucógeno observada en el tratamiento con MetfDeca.

Además de las células parenquimatosas, el hígado también contiene células sinusoidales (alrededor del 35% del total de células hepáticas). Estas células ejercen funciones importantes en la morfología, función, defensa y cicatrización de heridas del hígado. Las células de Kupffer (KC) son macrófagos residentes en el hígado, con una función clave en la inmunidad innata y en la inflamación del parénquima (Bechmann et al. 2016). Las células endoteliales sinusoidales (SEC) forman el endotelio fenestrado en el parénquima hepático. Estas células depuradoras son capaces de secretar una gran variedad de citocinas con efectos paracrinicos o endócrinos (Friedman 2003)

Los macrófagos / células de Kupffer secretan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, estas citocinas proinflamatorias regulan negativamente la sensibilidad a la insulina hepática mediante la activación de la señalización proinflamatoria y la inhibición de la señalización del receptor de insulina, resultando en el desarrollo de esteatosis y fibrosis hepáticas (Srikanthan et al. 2016). Además, modulan el reclutamiento de leucocitos al parénquima hepático, incluyendo neutrófilos, células naturales asesinas (NK) y las células T contribuyen a la progresión de enfermedad hepática (Sinha et al. 2017).

El reclutamiento de leucocitario sucede a través de la unión al endotelio y el movimiento de rotación subsiguiente a lo largo de la pared del vaso y está mediado por una familia de moléculas denominadas selectinas (Mayadas et al. 1993) Existen tres selectinas en este proceso, E-selectina (CD62E), P-selectina (CD62P) y L-selectina (CD62L), las tres comparten una estructura similar que contiene un dominio similar a lectina N-terminal, un dominio similar a factor de crecimiento endotelial (EGF), un número variable de repeticiones de consenso, un dominio transmembrana único y una cola citoplasmática corta. Todas ellas son inducidas por las citocinas proinflamatorias antes mencionadas (W. Lee y Kubes 2008). Trabajos previos en nuestro grupo de trabajo muestran la inducción de citocinas proinflamatorias tras la alimentación con la dieta hipercalórica

hiperglúcida. En este sentido se ha descrito que una prolongada sobrenutrición dispara la respuesta inflamatoria hepática en paralelo a desórdenes metabólicos como los presentados en nuestro modelo (Stanton et al. 2011), misma que es caracterizada por la actividad de las células de Kupper y de macrófagos clase 1 (típicamente proinflamatorios), lo que resulta en daño a la citoarquitectura hepática.

Además, los neutrófilos polimorfonucleares mantienen el proceso de inflamación del hígado. La infiltración hepática de neutrófilos es una respuesta aguda a daño hepático, estrés hepático o señales inflamatorias sistémicas que agrava la reacción inflamatoria por la secreción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno citotóxicas o de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . La disfunción de los neutrófilos también se asocia con el desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática. De hecho, la proporción de neutrófilos a linfocitos es mayor en pacientes con progresión a fibrosis avanzada, y se ha propuesto como un marcador no invasivo para predecir la enfermedad hepática avanzada (Ramaiah 2007), (Ramadori et al. 2008),

Nuestros resultados coinciden con lo mencionado en la literatura ya que el número de leucocitos se incrementó en el grupo HC, observándose un mayor número de linfocitos en relación a los neutrófilos (datos no mostrados), mientras que el número de hepatocitos disminuyó significativamente (Figura 15). Otros hallazgos importantes de mencionar es que la infiltración leucocitaria se ubica principalmente en la vena centrolobulillar. Los sinusoides disminuyen mientras se observa un hinchamiento hepatocelular y cuerpos de Mallory-Denk. Estas características son sello morfológico del desarrollo de hígado graso no alcohólico (Bechmann et al. 2016). En biopsias de pacientes con hígado graso no alcohólico, se observan gotas de grasa grandes (es decir, esteatosis macrovesicular) dentro de los hepatocitos, pero, ocasionalmente, se pueden encontrar áreas más pequeñas de esteatosis microvesicular, como se describe en nuestro modelo. Los hepatocitos pericentrales, en comparación con los periportales, son más susceptibles a desarrollar esteatosis, debido a su papel específico en el metabolismo de las grasas; como consecuencia, en las primeras fases de la enfermedad hepática asociada a trastornos metabólicos, la esteatosis hepática se localiza principalmente alrededor de la vena centrolobulillar,

extendiéndose hacia los tractos portales a medida que aumenta la entidad de la esteatosis y se pierde la zonación hepática. La exposición continua de los hepatocitos a los factores estresantes celulares conduce a la aparición de características histológicas específicas de la esteatohepatitis no alcohólica, como el hinchamiento hepatocelular y los cuerpos de Mallory-Denk (MDB, o hialina de Mallory), que también representan índices de pronóstico negativos (Bechmann et al. 2016) Los hepatocitos en forma de balón son más grandes que los normales y se caracterizan por un citoplasma irregular enrarecido y por la pérdida de positividad para las citoqueratinas, como se puede observar en las fotomicrografías correspondientes al grupo HC (Fig. 14). Los MDB son acumulaciones de eosinófilos de proteínas ubiquitinadas dentro del citoplasma de los hepatocitos y pueden identificarse en tinciones de rutina (especialmente en hepatocitos con forma de balón o globo) (Langhans, Geary, y Scharrer 1982).

Nuestros hallazgos demuestran que la metformina no mejora la condición generada por el desorden metabólico del espectro histológico de esteatosis, inflamación y enbalonamiento hepatocelular. Nuestros resultados son consistentes con lo mostrado en estudios sistemáticos previamente publicados (Musso et al. 2010) Los datos actuales deben interpretarse objetiva y dialécticamente. Estos estudios evalúan el efecto de la metformina sobre la respuesta histológica, en la que la metformina no tuvo efectos benéficos. Otros estudios que emplearon la ecografía como medio de diagnóstico, también han concluido de manera similar, sin proporcionar evidencia de la eficiencia de metformina como tratamiento que mejor condiciones inflamaciones estructurales, al menos de manera macroscópica. Otros estudios que evaluaron la esteatosis hepática en grupos de pacientes también concluyeron que la metformina no tuvo un efecto significativo sobre esta característica histológica. Aunque no hay evidencia perfecta, los estudios demuestran que la metformina no tiene ningún efecto sobre la respuesta histológica en enfermedad hepática asociada a trastornos metabólicos (Bechmann et al. 2016).

Por otro lado, los tratamientos con la sal de vanadio y decavanadatos mostró una reducción del proceso proinflamatorio y una mejora notable en la citoarquitectura del parénquima hepático (Figura 14 y 15). Es posible que esta mejoría esté asociada al 3er nodo de la señal de insulina, dado que también se

ha propuesto el tratamiento con sales o compuestos de vanadio como modulador de las rutas de MAPK ya que se ha reportado que diversos tratamientos con sales o compuestos a base de vanadio logran disminuir la inflamación, el estrés oxidativo y con ello mejora el ciclo celular. (Scapin et al. 2018) El vanadato (V), el vanadilo (VI), el bis (maltolato) oxovanadio (IV) y el bis (maltolato) dioxovanadio (V), todos promotores de MAPK y NF- $\kappa$ B, estimularon el crecimiento celular a bajas concentraciones (como los resultados sugieren que sucede con nuestros tratamientos), pero lo inhiben a altas concentraciones e inducen cambios distintos en la morfología celular. El bis (maltolato) dioxovanadio (V) es el menos citotóxico y el inductor más débil de cambios morfológicos a concentraciones bajas (10  $\mu$ M), mostrando un patrón de fosforilación similar al de la insulina (Sálice et al. 1999), Por lo tanto, los resultados sugieren que un equilibrio entre tirosina cinasas y tirosina fosfatasas establece si una célula sobrevivirá o sufrirá apoptosis. Además, la activación de las vías de señalización celular parece converger principalmente en la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B y la transcripción de genes antiapoptóticos.

## 11. Conclusiones

- Se logró la optimización y la caracterización los compuestos  $(\text{NH}_4)_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .
- La administración de  $12.33 \mu\text{m/ kg/ 2}$  veces a la semana de los compuestos sintetizados mejoraron los parámetros clínicos asociados al síndrome metabólico, siendo el compuesto  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  el que mostró los mejores resultados.
- La administración de los compuestos de vanadio mejora la cascada de señalización hepática de la insulina, siendo el compuesto  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  el que mostró los mejores resultados.
- La administración de metavanadato de sodio y decavanadatos recupera completamente la dinámica de síntesis y resguardo de glucógeno en ratas con síndrome metabólico.
- La administración de metavanadato de sodio y decavanadatos reestablece las características histológicas del tejido hepático y el reclutamiento leucocitario generado por el síndrome metabólico.

## 12. Bibliografía

Adachi, Yusuke et al. 2006. «Bis(allixinato)oxovanadium(IV) complex is a potent antidiabetic agent: Studies on structure-activity relationship for a series of hydroxypyrrone- vanadium complexes». *Journal of Medicinal Chemistry* 49(11): 3251-56.

Adeva-andany, María M et al. 2016. «Glycogen metabolism in humans». *BBACLI* 5: 85-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2016.02.001>.

Adiels, Martin, Sven Olof Olofsson, Marja Riitta Taskinen, y Jan Borén. 2008. «Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28(7): 1225-36.

Ailanen, Liisa et al. 2018. «Metformin normalizes the structural changes in glycogen preceding prediabetes in mice overexpressing neuropeptide Y in noradrenergic neurons». *Pharmacology Research and Perspectives* 6(2).

Aleixandre De Artiñano, Amaya, y Marta Miguel Castro. 2009. «Experimental rat models to study the metabolic syndrome». *British Journal of Nutrition* 102(9): 1246-53.

Aureliano, M., y C. André Ohlin. 2014. «Decavanadate in vitro and in vivo effects: Facts and opinions». *Journal of Inorganic Biochemistry* 137: 123-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.05.002>.

Aureliano, Manuel. 2011. «Recent perspectives into biochemistry of decavanadate». *World Journal of Biological Chemistry* 2(10): 215.

Batsis, J. A., R. E. Nieto-Martinez, y F. Lopez-Jimenez. 2007. «Metabolic syndrome: From global epidemiology to individualized medicine». *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 82(5): 509-24.

Bechmann, Lars P et al. 2012. «Review The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases». *Journal of Hepatology* 56(4): 952-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.08.025>.

Bennett, L W, R W Keirs, E D Peebles, y P D Gerard. 1999. «Methodologies of Tissue Preservation and Analysis of the Glycogen Content of the Broiler Chick Liver 1 , 2». *Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station*,: 2653-65.

Berndt, Nikolaus, Marius Stefan Horger, Sascha Bulik, y Hermann-georg Holzhu. 2018. «A multiscale modelling approach to assess the impact of metabolic zonation and microperfusion on the hepatic carbohydrate metabolism». (ii): 1-22.

Bishayee, Anupam, Abhijeet Waghay, Mehool A Patel, y Malay Chatterjee. 2010. «Vanadium in the detection , prevention and treatment of cancer : The in vivo evidence». *Cancer Letters* 294(1): 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.01.030>.

Braeuning, Albert et al. 2006. «Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes». 273: 5051-61.

Bulik, Sascha, Hermann-georg Holzhütter, y Nikolaus Berndt. 2016. «The relative importance of kinetic mechanisms and variable enzyme abundances for the regulation of hepatic glucose metabolism – insights from mathematical modeling». *BMC Biology*: 1-22. <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-016-0237-6>.

Cacho, J. et al. 2008. «Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats». *American Journal of Physiology - Endocrinology and*

*Metabolism* 295(5): 1269-76.

Chatkon, Aungkana et al. 2013. «Counterion Affects Interaction with Interfaces: The Antidiabetic Drugs Metformin and Decavanadate». *European Journal of Inorganic Chemistry* 1: 1859-68.

Chen, Li, Rui Chen, Hua Wang, y Fengxia Liang. 2015. «Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance». *International Journal of Endocrinology* 2015.

Chu, Michael J.J. et al. 2014. «Ob/ob mouse livers show decreased oxidative phosphorylation efficiencies and anaerobic capacities after cold ischemia». *PLoS ONE* 9(6).

Copps, K D, y M F White. 2012. «Regulation of insulin sensitivity by serine / threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2». : 2565-82.

Crans, Debbie C, Jason J Smee, Ernestas Gaidamauskas, y Luqin Yang. 2004. «The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds».

Croll, Tristan I et al. 2016. «Short Article Higher-Resolution Structure of the Human Insulin Receptor Ectodomain : Multi-Modal Inclusion of the Short Article Higher-Resolution Structure of the Human Insulin Receptor Ectodomain : Multi-Modal Inclusion of the Insert Domain». *Structure/Folding and Design* 24(3): 469-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2015.12.014>.

Després, Jean Pierre, y Isabelle Lemieux. 2006. «Abdominal obesity and metabolic syndrome». *Nature* 444(7121): 881-87.

Eck, Michael J, Sirano Dhe-paganon, y Robert T Nolte. 1996. «Structure of the IRS-1 PTB Domain Bound to the Juxtamembrane Region of the Insulin Receptor». 85: 695-705.

Erejuwa, O. O. et al. 2018. «Effects of honey on postprandial hyperlipidemia and oxidative stress in wistar rats: Role of HMG-CoA reductase inhibition and antioxidant effect». *Nigerian Journal of Physiological Sciences* 33(2): 129-38.

Ford, Earl S., Chaoyang Li, y Naveed Sattar. 2008. «Metabolic syndrome and incident diabetes». *Diabetes Care* 31(9): 1898-1904.

Frederickson, L E O D. «Infrared Spectra Structure Correlation Study of Vanadium-Oxygen Compounds». : 818-27.

Friedman, Scott L. 2003. «Liver fibrosis – from bench to bedside». 38: 38-53.

Gancheva, Silvia, Maria Zhelyazkova-Savova, Bistra Galunska, y Trifon Chervenkov. 2015. «Experimental models of metabolic syndrome in rats». *Scripta Scientifica Medica* 47(2): 14.

Grigorescu, F., A. Laurent, A. Chavanieu, y J. P. Capony. 1991. «Cellular mechanism of metformin action». *Diabete et Metabolisme* 17(1 BIS): 146-49.

Gunasekaran, S, R K Natarajan, V Renganayaki, y S Natarajan. 2006. «Vibrational spectra and thermodynamic analysis of metformin». 44(July): 495-500.

Gunton, Jenny E., Patric J.D. Delhanty, Shin Ichiro Takahashi, y Robert C. Baxter. 2003. «Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(3): 1323-32.

Gwak, Hye Ran et al. 2017. «Metformin induces degradation of cyclin D1 via AMPK/GSK3 $\beta$  axis in ovarian cancer». *Molecular Carcinogenesis* 56(2): 349-58.

Haeusler, Rebecca A et al. 2019. «Biochemical and cellular properties of insulin receptor

signalling». 19(1): 31-44.

Han, Gang et al. 2015. «AMPK/mTOR-mediated inhibition of survivin partly contributes to metformin-induced apoptosis in human gastric cancer cell». *Cancer biology & therapy* 16(1): 77-87.

Hatting, Maximilian et al. 2018. «Insulin regulation of gluconeogenesis». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1411(1): 21-35.

Hatting, Maximilian, Clint D J Tavares, Kfir Sharabi, y Amy K Rines. 2017. «Insulin regulation of gluconeogenesis». : 1-15.

Hemmings, Brian A, y David F Restuccia. 2012. «PI3K-PKB / Akt Pathway». : 1-4.

Huang, Xingjun, Guihua Liu, Jiao Guo, y Zhengquan Su. 2018. «The PI3K / AKT pathway in obesity and type 2 diabetes». 14.

Imtiaz, Muhammad et al. 2015. «Vanadium , recent advancements and research prospects : A review». *Environment International* 80: 79-88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2015.03.018>.

Iqbal, Jahangir et al. 2017. «Metabolic Syndrome, Dyslipidemia and Regulation of Lipoprotein Metabolism». *Current Diabetes Reviews* 14(5): 427-33.

Irimia, Jose M. et al. 2017. «Lack of liver glycogen causes hepatic insulin resistance and steatosis in mice». *Journal of Biological Chemistry* 292(25): 10455-64.

Irving, Elsa, y Andrew W Stoker. 2017. «Vanadium Compounds as PTP Inhibitors».

Jakusch, Tamás, y Tamás Kiss. 2017. «In vitro study of the antidiabetic behavior of vanadium compounds». 351: 118-26.

Kietzmann, Thomas et al. 2001. « $\alpha$ -subunits , HIF1  $\alpha$  , HIF2  $\alpha$  and HIF3  $\alpha$  , in rat liver». 537: 531-37.

Korbecki, Jan, Irena Baranowska-Bosiacka, Izabela Gutowska, y Dariusz Chlubek. 2016. «Insulin-mimetic property of vanadium compounds». *Postepy biochemii* 62(1): 60-65.

Krause, Ulrike et al. 2002. «Signalling pathways and combinatory effects of insulin and amino acids in isolated rat hepatocytes». *European Journal of Biochemistry* 269(15): 3742-50.

Kumar, Naresh, y Chinmoy S. Dey. 2002. «Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and -independent pathways in insulin resistant muscle cells». *British Journal of Pharmacology* 137(3): 329-36.

Langhans, W., N. Geary, y E. Scharrer. 1982. «Liver glycogen content decreases during meals in rats». *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 12(2): 0-3.

Lee, Soo Kyung et al. 2011. «Metformin sensitizes insulin signaling through AMPK-mediated pten down-regulation in preadipocyte 3T3-L1 cells». *Journal of Cellular Biochemistry* 112(5): 1259-67.

Lee, Woo-yong, y Paul Kubek. 2008. «Leukocyte adhesion in the liver : Distinct adhesion paradigm from other organs q». 48: 504-12.

Li, Shijie, Michael S. Brown, y Joseph L. Goldstein. 2010. «Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(8): 3441-46.

- Lin, Shiwei, Huaqiao Tan, y Enbo Wang. 2011. «A new organic – inorganic hybrid based on Mn – sales and decavanadate». (September 2013): 37-41.
- Liu, Quan et al. 2021. «Combination of bis ( $\alpha$ -furancarboxylato) oxovanadium (IV) and metformin improves hepatic steatosis through down-regulating inflammatory pathways in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice». *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* (September 2020): 1-11.
- Madzharova, Fani, Zsuzsanna Heiner, Marina Gu, y Janina Kneipp. 2016. «Surface-Enhanced Hyper-Raman Spectra of Adenine, Guanine, Cytosine, Thymine, and Uracil».
- Makinen, Marvin W, y Marzieh Salehitazangi. 2014. «The structural basis of action of vanadyl (VO<sub>2</sub><sup>+</sup>) chelates in cells». *Coordination Chemistry Reviews* 279: 1-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.003>.
- Manning, Brendan D., y Alex Toker. 2017. «AKT/PKB Signaling: Navigating the Network». *Cell* 169(3): 381-405. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>.
- Mayadas, Tanya N et al. 1993. «Leukocyte Rolling and Extravasation Are Severely Compromised in P Selectin-Deficient Mice». 74: 541-54.
- McCracken, Emma, Monica Monaghan, y Shiva Sreenivasan. 2018. «Pathophysiology of the metabolic syndrome». *Clinics in Dermatology* 36(1): 14-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>.
- Mehnert, H. 2001. «Metformin, the rebirth of a biguanide: Mechanism of action and place in the prevention and treatment of insulin resistance». *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 109(SUPPL. 2).
- Meshkani, Reza, y Khosrow Adeli. 2009. «Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease». *Clinical Biochemistry* 42(13-14): 1331-46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.05.018>.
- Miranda, Phillipa J., Ralph A. DeFronzo, Robert M. Califf, y John R. Guyton. 2005. «Metabolic syndrome: Definition, pathophysiology, and mechanisms». *American Heart Journal* 149(1): 33-45.
- Mora, Alfonso, David Komander, Daan M F Van Aalten, y Dario R Alessi. 2004. «PDK1 , the master regulator of AGC kinase signal transduction». 15: 161-70.
- Moreira, Luiza de Paula Dias et al. 2019. «Potential of trace elements as supplements for the metabolic control of Type 2 Diabetes Mellitus: A systematic review». *Journal of Functional Foods* 57(July 2018): 317-27. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.015>.
- Musso, Giovanni, Roberto Gambino, Maurizio Cassader, y Gianfranco Pagano. 2010. «A Meta-Analysis of Randomized Trials for the Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease».
- Nielsen, Jakob N, y Jørgen F P Wojtaszewski. 2004. «Regulation of glycogen synthase activity and phosphorylation by exercise». : 233-37.
- Niewoehner, C. B., D. P. Gilboe, y F. Q. Nuttall. 1984. «Metabolic effects of oral glucose in the liver of fasted rats.» *The American journal of physiology* 246(1 Pt 1).
- Ortega-Pacheco, Diego et al. 2018. «Vanadyl sulfate effects on systemic profiles of metabolic syndrome in old rats with fructose-induced obesity». *International Journal of Endocrinology* 2018.
- Otto, M., Jens Breinholt, y N. Westergaard. 2003. «Metformin inhibits glycogen synthesis and

- gluconeogenesis in cultured rat hepatocytes». *Diabetes, Obesity and Metabolism* 5(3): 189-94.
- Papapetropoulos, Andreas et al. 2004. «Vanadate Is a Potent Activator of Endothelial Nitric-Oxide Synthase : Evidence for the Role of the Serine / Threonine Kinase Akt and the 90-kDa Heat Shock Protein». 65(2): 407-15.
- Peak, M. et al. 1998. «Signalling pathways involved in the stimulation of glycogen synthesis by insulin in rat hepatocytes». *Diabetologia* 41(1): 16-25.
- Pereira, Maria João et al. 2009. «Effects of decavanadate and insulin enhancing vanadium compounds on glucose uptake in isolated rat adipocytes». *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(12): 1687-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2009.09.015>.
- Petersen, Max C., Daniel F. Vatner, y Gerald I. Shulman. 2017. «Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease». *Nature Reviews Endocrinology* 13(10): 572-87.
- Poisson, Johanne et al. 2017. «Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases». *Journal of Hepatology* 66(1): 212-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.009>.
- Pooransingh, Neela et al. 2003. «Solid-State Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy and DFT Studies of Oxovanadium ( V ) Complexes Mimicking the Active Site of Vanadium Haloperoxidases 51 V». 42(4): 1256-66.
- Ramadori, G, F Moriconi, I Malik, y J Dudas. 2008. «Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair». : 107-17.
- Ramaiah, Shashi K. 2007. «Hepatic Neutrophil Infiltration in the Pathogenesis of Alcohol-Induced Liver Injury». : 431-40.
- Ramakrishnan, Sadeesh K, y Yatrik M Shah. 2017. «A central role for hypoxia-inducible factor ( HIF ) -2  $\alpha$  in hepatic glucose homeostasis». 4: 207-16.
- Rangel, Maria et al. 2009. «Novel 3-hydroxy-4-pyridinonato oxidovanadium(IV) complexes to investigate structure/activity relationships». *Journal of Inorganic Biochemistry* 103(4): 496-502. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.019>.
- Rea, Philip A., y Anderson Y. Tien. 2017. «Metformin: Out of Backwaters and into the Mainstream». *American Scientist* 105(2): 102.
- Rehder, Dieter. 2008. Bioinorganic Vanadium Chemistry *Bioinorganic vanadium chemistry*.
- Rice, Suman et al. 2011. «Action of metformin on the insulin-signaling pathway and on glucose transport in human granulosa cells». *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 96(3): 427-35.
- Roach, Peter J, Anna A Depaoli-roach, Thomas D Hurley, y Vincent S Tagliabracci. 2016. «themes». 441(3): 763-87.
- Ruiz-Torres, Antonio. 2005. «Aging and the Metabolic Syndrome». *The Metabolic Syndrome at the Beginning of the XXI Century: A Genetic and Molecular Approach*: 83-99.
- Saciedad, Apetito Y. 2014. «Hambre, apetito y saciedad».
- Saklayen, Mohammad G. 2018. «The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome». *Springer open choice* 9: 1-8.
- Sállice, V C, A M Cortizo, C L Gómez Dumm, y S B Etcheverry. 1999. «Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells». 115(1900): 119-28.

- Samart, Nuttaporn, Zeyad Arhouma, Santosh Kumar, y Heide A Murakami. 2018. «Decavanadate Inhibits Mycobacterial Growth More Potently Than Other Oxovanadates». 6(November): 1-16.
- Samuel, Varman T., y Gerald I. Shulman. 2016. «The pathogenesis of insulin resistance: Integrating signaling pathways and substrate flux». *Journal of Clinical Investigation* 126(1): 12-22.
- Sánchez-lara, Eduardo et al. 2018. «Decavanadate Salts of Cytosine and Metformin: A Combined Experimental-Theoretical Study of Potential Metallodrugs Against Diabetes and Cancer». *Frontiers in Chemistry* 6(October): 1-18.
- Sánchez-Lombardo, Irma et al. 2014. «Synthesis of metforminium (2+) decavanadates - Crystal structures and solid-state characterization». *European Journal of Inorganic Chemistry* 2014(27): 4581-88.
- Sanders, Francis W.B., y Julian L. Griffin. 2016. «De novo lipogenesis in the liver in health and disease: More than just a shunting yard for glucose». *Biological Reviews* 91(2): 452-68.
- Sanna, Daniele, Valeria Ugone, Maria Serra, y Eugenio Garribba. 2017. «Speciation of potential anti-diabetic vanadium complexes in real serum samples». *Journal of Inorganic Biochemistry* 173(March): 52-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.04.023>.
- Scapin, Giovanna et al. 2018. «HHS Public Access». 556(7699): 122-25.
- Schmucker, Douglas L, Jill S Mooney, y Albert L Jones. «S T E R E O L O G I C A L ANALYSIS OF HEPATIC FINE S T R U C T U R E I N T H E F I S C H E R 344 R A T Influence of Sublobular Location and Animal Age». (c).
- Seong, Hyun-a, Haiyoung Jung, Ravi Manoharan, y Hyunjung Ha. 2012. «PDK1 Protein Phosphorylation at Thr 354 by Murine Protein Serine-Threonine Kinase 38 Contributes to Negative Regulation of PDK1 Protein Activity \* □». 287(25): 20811-22.
- Sesti, Giorgio. 2006. «Pathophysiology of insulin resistance». *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* 20(4): 665-79.
- Sharabi, Kfir, Clint D J Tavares, y Pere Puigserver. 2019. «Regulation of Hepatic Metabolism , Recent Advances , and Future Perspectives». : 6-8.
- Shi, Peiguo et al. 2017. «Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation». *Cell Discovery* 3.
- Sinha, Abhinaba et al. 2017. «ScienceDirect Induction of apoptosis in human colorectal cancer cell line , HCT-116 by a vanadium- Schiff base complex». *Biomedicine et Pharmacotherapy* 92: 509-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.108>.
- Srikanthan, Krithika et al. 2016. «Systematic review of metabolic syndrome biomarkers: A panel for early detection, management, and risk stratification in the West Virginian population». *International Journal of Medical Sciences* 13(1): 25-38.
- Stanton, Michaela C et al. 2011. «Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice». *Journal of Inflammation* 8(1): 8. <http://www.journal-inflammation.com/content/8/1/8>.
- Takamiya, Tomoko et al. 2004. «World Health Organization-defined metabolic syndrome is a better predictor of coronary calcium than the adult treatment panel III criteria in American men aged 40-49 years». *Diabetes Care* 27(12): 2977-79.
- Todorovi, M R, U B Mio, I Holclajtner-antunovi, y D Šegan. 2005. «Synthesis and Characterization

- of Ammonium Decavanadate ( V )». *Materials Science Forum* 494: 351-56.
- Torres, Josema, y Rafael Pulido. 2001. «The Tumor Suppressor PTEN Is Phosphorylated by the Protein Kinase CK2 at Its C Terminus». 276(2): 993-98.
- Treviño, Samuel, Michael P. Waalkes, et al. 2015. «Chronic cadmium exposure in rats produces pancreatic impairment and insulin resistance in multiple peripheral tissues». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 583: 27-35.
- Treviño, Samuel, Eduardo Sánchez-Lara, et al. 2015a. «Hypoglycemic, lipid-lowering and metabolic regulation activities of metforminium decavanadate ( $\text{H}_2\text{Metf}_3$  [ $10^{10}\text{O}^{28}$ ] $\cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ) using hypercaloric-induced carbohydrate and lipid deregulation in Wistar rats as b». *Journal of Inorganic Biochemistry* 147: 85-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.04.002>.
- Treviño, Samuel et al. 2016. «Metforminium Decavanadate as a Potential Metallopharmaceutical Drug for the Treatment of Diabetes Mellitus». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016.
- Treviño, Samuel, y Alfonso Diaz. 2020. «Vanadium and insulin : Partners in metabolic regulation». 208(July 2019).
- Treviño, Samuel, y Enrique González-Vergara. 2019. «Metformin-decavanadate treatment ameliorates hyperglycemia and redox balance of the liver and muscle in a rat model of alloxan-induced diabetes». *New Journal of Chemistry* 43(45): 17850-62.
- Tripathi, Deepika, Veena Mani, y Ravi Prakash Pal. 2018. «Vanadium in Biosphere and Its Role in Biological Processes». *Biological Trace Element Research* 186(1): 52-67.
- Trujillo-hernández, Benjamín et al. 2017. «Frecuencia del síndrome metabólico y factores de riesgo en adultos con y sin». 19(1): 609-16.
- Unger, Roger H., Gregory O. Clark, Philipp E. Scherer, y Lelio Orci. 2010. «Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801(3): 209-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.10.006>.
- Uyeda, Kosaku, y Joyce J Repa. 2006. «Carbohydrate response element binding protein , ChREBP , a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis Minireview». (August): 107-10.
- Valle, M et al. 2012. «Resolution of diabetes mellitus and metabolic syndrome in normal weight 24-29 BMI patients with one anastomosis gastric bypass». 27(2): 623-31.
- Vangipurapu, J. et al. 2011. «A novel surrogate index for hepatic insulin resistance». *Diabetologia* 54(3): 540-43.
- Wang, Hong Yu et al. 2013. «AS160 deficiency causes whole-body insulin resistance via composite effects in multiple tissues». *Biochemical Journal* 449(2): 479-89.
- Werner, Eric D. et al. 2004. «Insulin resistance due to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 at serine 302». *Journal of Biological Chemistry* 279(34): 35298-305.
- Wiernsperger, Nicolas F., y Clifford J. Bailey. 1999. «The Antihyperglycaemic Effect of Metformin». *Drugs* 58(Supplement 1): 31-39.
- Willsky, Gail, Esther Takeuchi, y Alan Tracey. 2010. *Vanadium Vanadium in Biological Systems*.
- Wilsey, Jared, Michael K Matheny, y Philip J Scarpace. 2015. «Oral Vanadium Enhances the Catabolic Effects of Central Leptin in Young Adult Rats». 147(October): 493-501.

Wong, Sok Kuan et al. 2016. «Animal models of metabolic syndrome: a review». *Nutrition and Metabolism* 13(1): 1-12. <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-016-0123-9>.

Xu, Dazhong et al. 2010. «Regulation of PTEN Stability and Activity by Plk3 \* □». 285(51): 39935-42.

Yadav, Amita, Megha A Kataria, Vandana Saini, y Anil Yadav. 2013. «Clinica Chimica Acta Role of leptin and adiponectin in insulin resistance». *Clinica Chimica Acta* 417: 80-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.007>.

Zabielski, Piotr et al. 2018. «The effect of high fat diet and metformin treatment on liver lipids accumulation and their impact on insulin action». *Scientific Reports* 8(1): 1-11.

Zhang, Pei, y Bo Tian. 2014. «Metabolic syndrome: An important risk factor for Parkinson's disease». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014.

Zhang, Sheng, y Zhong-yin Zhang. 2007. «PTP1B as a drug target : recent developments in PTP1B inhibitor discovery». 12(May).

Zhou, G. et al. 2001. «Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action». *Journal of Clinical Investigation* 108(8): 1167-74.

## 13. Anexos

### Anexo 1

#### Síntesis de $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

##### Reactivos

Metavanadato de sodio (Sigma-Aldrich)

Agua destilada

Tabletas de 850 mg de Clorhidrato de metformina (Alpharma Laboratories)

Papel filtro cuantitativo sin cenizas grado 43 (Whatman)

HCl al 37%

##### Procedimiento

1. Disolver 0.5 g de  $\text{NaVO}_3$  en 30 mL de agua destilada a  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , hasta generar una solución transparente (SOLUCION 1).
2. Triturar dos tabletas de 850 mg de Clorhidrato de Metformina en un mortero y adicionarlos a solución 1.
3. Agregar ácido clorhídrico concentrado (37%) hasta alcanzar un valor de  $\text{pH}=6.3$ .
4. Mantener en agitación constante hasta obtener una solución naranja transparente.
5. Después de dos días se filtran (papel filtro cuantitativo sin cenizas grado 43 y se recolectaron los cristales naranjas del compuesto  $[\text{HMetf}]_6[\text{V}_{10}\text{O}_{28}]\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

**Nota: Es importante monitorear el pH durante la reacción y durante el proceso de formación de cristales. Ajustar si hay variaciones en este parámetro.**

## Anexo 2

### Síntesis de $[\text{NH}_4]_6 [\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

#### Reactivos

Metavanadato de amonio (Sigma-Aldrich)

Agua destilada

Papel filtro cuantitativo sin cenizas grado 43 (Whatman)

HCl al 37%

#### Procedimiento

1. Disolver 0.5 g de  $\text{NH}_4 \text{VO}_3$  en 30 mL de agua destilada a 80 °C, hasta generar una solución transparente (SOLUCION 1).
2. Agregar ácido clorhídrico concentrado (37%) y ajustarlo con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  hasta alcanzar un valor de pH=5.
3. Mantener en agitación constante hasta obtener una solución naranja transparente durante 45 min.
4. Mantener la solución en un lugar seco y oscuro a temperatura ambiente (24 °C) durante cuatro días.
5. Finalmente se filtran (papel filtro cuantitativo sin cenizas grado 43 y se recolectaron los cristales naranjas del compuesto  $[\text{NH}_4]_6 [\text{V}_{10}\text{O}_{28}] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

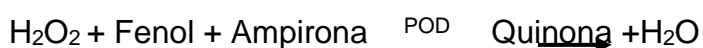
**Nota: Es importante monitorear el pH durante la reacción y durante el proceso de formación de cristales. Ajustar si hay variaciones en este parámetro.**

## Anexo 3

### Determinación cuantitativa de glucosa

#### Principio del método

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de la glucosa a ácido glucurónico. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD).



#### Método (Glucosa Oxidasa/Peroxidasa)

Atemperar el reactivo a 25 °C

Pipetear en un tubo de ensayo:

##### Reactivos

R1	TRIS pH 7.4
Tampón	Fenol
R2	Glucosa oxidasa (GOD)
Enzimas	Peroxidasa (POD)
	4- Aminofenazona (4-AF)
Glucose Cal	Patrón primario acuoso de Glucosa

Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a 25 °C o 5 min/ 37°C.

Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco.

El color es estable durante al menos 2 hrs.

#### Cálculos

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de la glucosa presente en la muestra, y esta es calculada por la siguiente formula:

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra mg/dL}$$

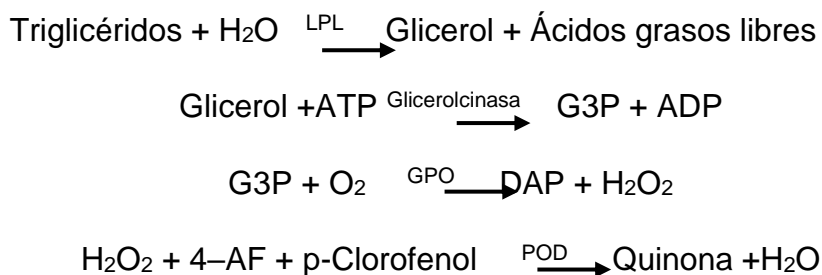
## ANEXO 4

### Determinación de la concentración de triglicéridos

#### Principio del método

Los triglicéridos incubados con lipoproteínlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerol fosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol cinasa (GK) para producir glicerol -3-fosfato (G3P) y adenosina -5-difosfato (ADP) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por GPO.

Finalmente, el peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja.



#### Método

#### (Glicerolfosfato deshidrogenasa- Peroxidasa)

Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

Pipetear en un tubo de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada. El color es estable como mínimo 30min.

## CALCULOS

La concentración de triglicéridos en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula:

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra mg/dL}$$

## ANEXO 5

### Determinación cuantitativa de Colesterol total

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.

### Reactivos

R	PIPES pH 6.9	
	Fenol	90mmol/L
	Colesterol esterasa (CHE)	26 mmol/L

Colesterol oxidasa	1000 U/L
Peroxidasa	300 U/L
4- Aminofenazona (4-AF)	0.4 mmol/L

**Colesterol calibrador**

Patrón primario de acuoso de Colesterol

**PROCEDIMIENTO**

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda:	505 nm (500-550).
Cubeta	1 cm paso de luz
Temperatura	37°C /15-25°C

2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada

3. Pipetear en una cubeta:

	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
R (ml)	1.0		
Patrón <sup>(Nota1-2)</sup> (µL)		1.0	
Muestra (µL)			1.0

4. Mezclar e incubar 5 min a 37°C o 10 min a 15-25°C.

5. Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo.  
El color es estable como mínimo 60 minutos.

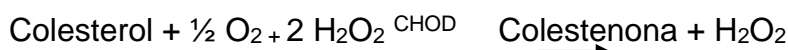
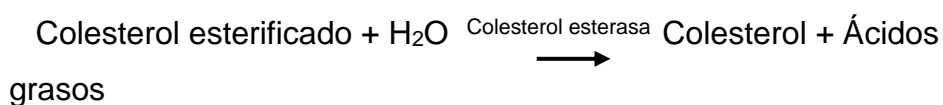
**Cálculos**

$$\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times C_{\text{patrón}} = C_{\text{de colesterol en la muestra mg/dL}}$$

## ANEXO 6

### Determinación de Colesterol LDL reactivo precipitante

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de polivinil. La concentración de colesterol LDL se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y el sobrenadante obtenido tras la precipitación. El colesterol se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación:



#### Procedimiento

1.- Pipetear en un tubo:

Muestra 0.4ml

Reactivo 0.2 ml

2.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
Agua destilada	20 µl		
Patrón de colesterol (S)		20 µl	
Sobrenadante de la muestra			20 µl

Reactivo de colesterol	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
------------------------	--------	--------	--------

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

### **Cálculos**

La concentración de colesterol en el sobrenadante se calcula a partir de la siguiente formula

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} \times \text{Factor de dilución de la muestra} = C \text{ muestra mg/dL}$$

La concentración de colesterol LDL en la muestra se calcula Colesterol LDL = colesterol total – colesterol en sobrenadante

## **ANEXO 7**

### **Determinación del Colesterol HDL reactivo precipitante**

#### **Principio del método**

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL) del suero o plasma, se precipitan con fosfotungstato en presencia de iones magnesio. Tras la centrifugación, el sobrenadante contiene lipoproteínas de alta densidad (HDL). La fracción de HDL colesterol se determina utilizando el reactivo enzimático de colesterol total.

#### **Método**

1.- Pipetear en un tubo Muestra 0.2 ml Reactivo (Col HDL) ml

Muestra	0.2 ml
Reactivo (Col HDL)	1 ml

2.- Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

3.- Centrifugar durante 15 min. a 4,000 r.p.m.

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	<b>Blanco</b>	<b>Patrón</b>	<b>Muestra</b>
Agua destilada	100 µl		
Patrón de colesterol		100 µl	
Sobrenadante de la muestra			100 µl
Reactivo de colesterol	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

7.- Agitar bien e incubar los tubos durante 30 min. a temperatura ambiente o durante 10 min. a 37°C.

8.- Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

### **Cálculos**

La concentración de colesterol HDL en la muestra se calcula a partir de la siguiente formula

$$\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times C_{\text{patrón}} \times \text{Factor de dilución de la muestra} = C_{\text{muestra}} \text{ mg/d}$$

## ANEXO 8

### Determinación de insulina

#### Fundamento

Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo inmunoenzimático incluye anticuerpos de una alta afinidad y especificidad (Ab), (enzima conjugada e inmovilizada), con epítopes de reconocimiento diferentes, en exceso, y antígeno nativo (Ag). En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en la microplaca durante la interacción de estreptavidina cubierta sobre el pozo y agregado exógenamente un anticuerpo de insulina monoclonal biotinilado. Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo de sándwich soluble. La interacción esta ilustrada por la siguiente ecuación:

Estreptavidina = Estreptavidina inmovilizada en el pocillo.

Complejo Inmovilizado = Complejo de Sándwich unido a la superficie de la fase sólida.

Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando diversas referencias del suero de los valores sabidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

## Reactivos:

- Calibradores Insulina – liofilizados- Iconos A-F

Seis (6) frascos de referencia del suero para el antígeno de Insulina en los niveles de 0(A), 5(B), 25(C), 50(D), 100(E) y 300(F)  $\mu$ IU/ml. Reconstituya cada frasco con 2mL de agua destilada o desionizada. Los calibradores reconstituidos son estables por sesenta (60) días entre 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.

\*Nota: los calibradores, basados en suero humano, se calibraron usando una preparación de referencia, el cual fue ensayado contra WHO 1st IRP 66/304.

### Reactivo de Enzima de Insulina

Un frasco que contiene la enzima etiquetada con afinidad purificada monoclonal de ratón x-insulina IgG, monoclonal biotinilado de ratón x-insulina IgG en solución, tinte y preservativo. Almacene a 2-8°C.

- Microplaca Revestida con Estreptavidina - 96 pozos

Una (1) microplaca con 96 pozos cubiertos con estreptavidina y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente desecante. Almacénese a 2-8°C.

- Solución Concentrada de Lavado

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénese a 2-30°C.

- Substrato A

Un (1) frasco que contiene tetrametilbencidina (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

- Substrato B

Un (1) frasco que contiene peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en solución. Almacénese en 2-8°C.

- Solución de Paro

Un (1) frasco que contiene un ácido fuerte (1NHCl). Almacénese en 2-8°C.

Preparación de los reactivos

**SOLUCION DE LAVADO.** Diluir el contenido del concentrado de lavado con 1000 mL de agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacénese a temperatura ambiente entre los 20-27°C por no más de 60 días.

- **SOLUCIÓN DE TRABAJO SUSTRATO.** Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución “A” en el frasco etiquetado con Solución “B”. Mezcle y guarde a 2-8°C. Coloque la tapa amarilla sobre el frasco transparente para una fácil identificación. Mezcle y etiquete acordemente. Almacénese a 2-8°C.

**Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul.**

### **Procedimiento del ensayo**

Antes de proceder con el análisis, traiga todos los reactivos, referencias del suero y controles a temperatura ambiente (20-27°C).

Saque los micropozos necesarios para cada suero de referencia, controles y muestras. Guarde los micropozos nuevamente dentro de la bolsa de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.

Pipetee 0.050 mL (50 µL) de los sueros de referencia, controles y muestras en los pozos correspondientes.

Agregue 0.100 mL (100µL) de la solución del Reactivo de la Enzima de Insulina a todos los pozos. Es muy importante dispensar todos Los reactivos cerca del fondo de los micropozos.

Golpear suavemente uno de los extremos de la microplaca por 20- 30 segundos para mezclar. Selle la microplaca con una cubierta de plástico.

Incube por 120 minutos a temperatura ambiente (20-27°C)

Deseche el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, después golpee ligeramente la placa seca con el papel absorbente.

Agregue 300µL de la solución de lavado (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo o aspírelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavados. Un lavador automático o manual de placas puede ser utilizado. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada micropozo bien, presionando el envase (evite

burbujas de aire) para dispensar la solución de lavado. Decante y repita dos (2) veces adicionales.

Agregue 0.100 mL (100 $\mu$ L) de la solución de Substrato a todos los pozos (véase la sección de la preparación el reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos. **NO AGITE DESPUES DE ADICIONAR EL SUSTRATO.**

Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.

Agregue 0.050 mL (50 $\mu$ L) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.

Lea la absorbancia en cada pozo a 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector de microplacas. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de haber agregado la solución de paro.

#### Cálculo de resultados

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de Insulina en especímenes desconocidos.

1. Registre la absorbancia obtenida del listado del lector de microplacas
2. Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Insulina en  $\mu$ IU/mL
3. Calcule la ecuación de la línea recta para la curva de calibración.
4. Para determinar la concentración de Insulina para un desconocido, despeje x de la ecuación de la línea recta.

## **ANEXO 9**

### **Determinación de triglicéridos en tejidos.**

#### **Procedimiento:**

1. Pesar 100 mg del tejido a analizar y colocarlos en un criotubo
2. Adicionar 800  $\mu$ L de SSI
3. Homogeneizar durante 1 minuto
4. Tomar 10  $\mu$ L del sobrenadante y colocarlos en un tubo.
5. Adicionar 1 mL del reactivo de triglicéridos
6. Esperar 15 minutos a temperatura ambiente
7. Leer a 505 nm.

**Nota: La técnica empleada es la correspondiente al anexo 2**

## ANEXO 10

### Determinación de glucógeno en tejidos

#### Reactivos

Ácido perclórico 10%

Etanol concentrado

Agua destilada

Fenol al 5%

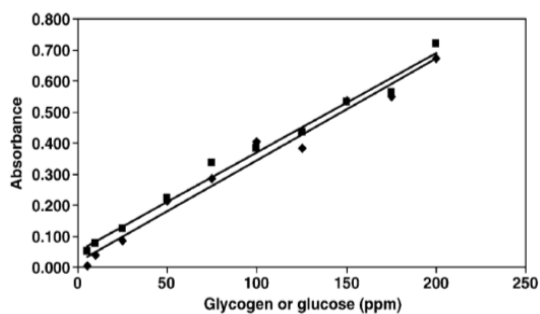
Ácido sulfúrico concentrado

#### Procedimiento

1. Homogeneizar 125 mg de tejido con 1ml de  $\text{HClO}_4$ .
2. Homogeneizar 125 mg de tejido con 1ml de  $\text{HClO}_4$ .
3. Centrifugar a 1450 rpm/15 min.
4. Extraer sobrenadante y guardar sobrenadante (SOBRENADANTE 1)
5. Resuspender el pellet de tejidos con 1ml de  $\text{HClO}_4$ .
6. Centrifugar a 1450 rpm/15 min.
7. Extraer sobrenadante y guardar sobrenadante (SOBRENADANTE 2).
9. Agregar 2.5 ml d etanol del sobrenadante 3 y agitar fuertemente.
10. Centrifugar a 3000 rpm/10 min.
11. Extraer sobrenadante (SOBRENADANTE 4) y guardar en el fondo del tubo se observará un precipitado blanco.
12. Resuspender el precipitado blanco con 1ml de agua destilada.
13. Tomar una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la disolución de glucógeno (paso 11).
14. Añadir 200  $\mu\text{L}$  de fenol y agitar.
15. Agregar 1 ml de ácido sulfúrico y agitar

8. Combinar los sobrenadantes  
1 y 2 para generar  
(SOBRENADANTE 3).
- 

Leer absorbancias a 490 nm (frente a un blanco de 0 (A), 30 min después de agitar con el ácido sulfúrico. Se empleo la ecuación de la recta para calcular la concentración de glucógeno elaborada por L.W. Bennett en 2007.



\*En caso de hígado se puede realizar determinación de glucosa en SOBRENADANTE 4 y sumarse a la concentración total de glucógeno.

#### **Cálculos**

Regresión lineal de absorbancia contra glucógeno y estándar concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100, 125, y 150 ppm de conejo ( $y = 0.0074x + 0.0347$ ;  $R^2 = 0.9874$ )

## **Anexo 11**

### **Técnica para deshidratación, embebido y corte de tejidos en parafina**

Una vez obtenidos los tejidos, estos son colocados en solución con formalina al 4% en PBS 1X, hasta su inclusión en parafina. Los tejidos son colocados en casetes para inclusión.

#### **Procedimiento**

1. PBS 1X, durante 45 minutos, para limpiar la formalina.
2. Alcohol 70%, 1 hora
3. Alcohol 80%, 1 hora
4. Alcohol 96% 1, 1 hora
5. Alcohol 96% 2, 1 hora
6. Alcohol 100% 1, 1 hora
7. Alcohol 100% 2, 1 hora
8. Alcohol-Xilol (1:1), 1 hora
9. Xilol 1, 1 hora
10. Xilol 2, 1 hora
11. Xilol-Parafina (1:1), 1:30 horas
12. Parafina 1, 1 hora
13. Parafina 2, 1 hora
14. Parafina 3 (Inclusión)

#### **Corte de tejidos**

Se obtuvieron 12 bloques de parafina de cada uno de los grupos, de los cuales se cortaron 2 laminillas de cada bloque a un espesor de 4  $\mu$ m y se almacenaron para la realización de tinciones H&E y PAS.

## **Anexo 12**

### **Tinción H&E**

#### **Reactivos**

Xilol

Etanol 96 y 100 %

Eosina

Agua destilada

Agua corriente

Hematoxilina de Harris

Eosina amarillenta

PBS 1x

Solución de Carbonato de litio (1%)

#### **Procedimiento**

1. Xilol (1) (15 lavados)
2. Xilol (2) (15 lavados)
3. Etanol absoluto (1) (15 lavados)
4. Etanol absoluto (2) (15 lavados)
5. Etanol al 96% (1) (15 lavados)
6. Etanol al 96% (2) (15 lavados)
7. PBS 1X (15 lavados)
8. Hematoxilina de Harris (10 minutos)
9. Agua corriente (15 lavados)
10. Alcohol ácido (Alcohol etílico al 70% con 1% de HCl concentrado)
11. Agua corriente (15 lavados)
12. Carbonato de litio (1%)
13. Agua corriente (15 lavados)
14. Eosina amarillenta (5 lavados)
15. Etanol al 96% (2) (15 lavados)
16. Etanol al 96% (1) (15 lavados)
17. Etanol absoluto (2) (15 lavados)
18. Etanol absoluto (1) (15 lavados)
19. Xilol (2) (15 lavados)

20. Xilol (1) (15 lavados)

21. Montar con resina y dejar secar (una noche completa), evitando la formación de burbujas.

### **Anexo 13.**

### **Tinción PAS**

#### **Reactivos**

Xilol

Etanol 96 y 100 %

Reactivo de Schiff

Ácido peryodico

Agua destilada

Agua corriente

Hematoxilina de Harris

Eosina amarillenta

PBS 1x

#### **Procedimiento**

1. Xilol 1 (15 lavados)
2. Xilol 2 (15 lavados)
3. Etanol absoluto (1) (15 lavados)
4. Etanol absoluto (2) (15 lavados)
5. Etanol al 96% (1) (15 lavados)
6. Etanol al 96% (2) (15 lavados)
7. PBS 1X (15 lavados)
8. Agua destilada (5 lavados)
9. Ácido peryodico (5 min)
10. Agua destilada (5 lavados)
11. Reactivo de Schiff (30 min en oscuridad)

12. Agua corriente (15 lavados)
13. Hematoxilina (10 minutos)
14. Agua corriente (15 lavados con agua caliente)
15. Agua destilada (15 lavados)
16. Etanol al 96% (2) (15 lavados)
17. Etanol al 96% (1) (15 lavados)
18. Etanol absoluto (2) (15 lavados)
19. Etanol absoluto (1) (15 lavados)
20. Xilol (2) (15 lavados)
21. Xilol (1) (15 lavados)
22. Montar con resina y dejar secar (una noche completa), evitando la formación de burbujas.

## **Anexo 14**

### **Evaluación de la expresión de InR por Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 8% en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes
4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-InR p-1315 (ab192657) durante dos horas a 4<sup>o</sup> C
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado

12. Incubar el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar

## **Anexo 15**

### **Evaluación de la expresión de PTP1B por Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 8% en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes
4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-PTP1B (ab189179) durante dos horas a 4<sup>0</sup> C
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar

## **Anexo 16**

### **Evaluación de la expresión de PI3K por Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 10 % en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes
4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas toda la noche
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-PI3K(sc-1637) durante dos horas a 4<sup>0</sup> C.
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar

## **Anexo 17**

### **Evaluación de la expresión de PTEN Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 12.5 % en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes
4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas toda la noche
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-PTEN (AB76431) durante dos horas a 4<sup>o</sup> C
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar

## **Anexo 18**

### **Evaluación de la expresión de Akt p-S473 Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 12.5% en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes

4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas toda la noche
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-Akt S473(sc101629) durante dos horas a 4<sup>o</sup> C.
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar

## **Anexo 19**

### **Evaluación de la expresión de IRS-1 por Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 8% en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes
4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas toda la noche
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-IRS-1 (**sc-390761**) durante dos horas a 4<sup>o</sup> C.
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar

## **Anexo 20**

### **Evaluación de la expresión de GSK3β por Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 12.5% en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes

4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas toda la noche
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-GSK3 $\beta$  (milipore) durante dos horas a 4 $^{\circ}$  C.
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar

## **Anexo 21**

### **Evaluación de la expresión de Glucógeno sintasa por Western Blot**

#### **Procedimiento**

1. Preparar un gel de poliacrilamida para electroforesis- SDS al 10% en vidrios de 1.5 cm con peine de 10 pocillos
2. Colocar un eppendor 30 µg de proteínas y adicionar el volumen correspondiente de buffer de carga (LOAEMLI)
3. Cargar las muestras en el gel en los pocillos correspondientes
4. Correr el gel aproximadamente 2.5 hrs a 100 V
5. Sacar el gel con cuidado y preparar la transferencia húmeda en membrana de PVDF
6. Transferir durante 60 min a 90 V
7. Concluida la transferencia, retirar la membrana y lavarla 5 minutos con PBS 1x
8. Bloquear la membrana con Alb 5% durante dos horas toda la noche
9. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
10. Incubar el anticuerpo primario anti-Glucógeno sintasa (sc-390391) durante dos horas a 4<sup>0</sup> C.
11. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado.
12. Incubar el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano por 1.5 horas a temperatura ambiente
13. Lavar tres veces con PBS-T, 10 min cada lavado
14. Añadir 0.5 ml de luminol y luego poner la membrana dentro del fotodocumentador
15. Obtener la imagen del inmunoblot y analizar