



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Químicas

Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Departamento de Farmacia

“Evaluación de la actividad biológica de insulina funcionalizada con Vanadio en un modelo de Diabetes tipo 1 en rata Wistar”

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciatura en Químico
Farmacobiólogo

Presenta:

pQFB Anahi Cruz Cuateco

Lugar de realización:

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Director de tesis:

D.C Samuel Treviño Mora

Asesor:

D.C Enrique González Vergara



PUEBLA, PUEBLA

DICIEMBRE 2019



MTRA. MARIA ELENA RUIZ VELAZQUEZ
DIRECCION DE ADMINISTRACION ESCOLAR
P R E S E N T E

En relacion al oficio de fecha 22 de Noviembre de 2019, signado por el Coordinador del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Quimicas, me permito comunicar a Ud. el nombre de los Catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO que sustentará:

CRUZ CUATECO ANAHI

JURADO

DR. EDUARDO M. BRAMBILA COLOMBRES
DR. ALFONSO DANIEL DIAZ FONSECA
MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ

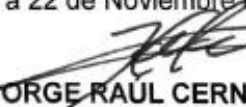
Examen que se realizará el dia 12 de Diciembre de 2019, a las 17:00 horas en el SALON DE JUNTAS del ICUAP.

Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideracion

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

H. Puebla de Z. a 22 de Noviembre de dos mil diecinueve


DR. JORGE RAUL CERNA CORTEZ
DIRECTOR



C.c.p. Archivo

Facultad de Ciencias Químicas | San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP

Puebla, Pue. a 27 de Mayo de 2019

**C. CRUZ CUATECO ANAHI
PRESENTE**

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Area de Farmacia,

DR. SAMUEL TREVIÑO MORA, Director de Tesis,

DC. ENRIQUE GONZALEZ VERGARA, Asesor,

se le comunica la autorización de su anteproyecto de tesis denominado:

**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSULINA
FUNCIONALIZADA CON VANADIO EN UN MODELO DE DIABETES TIPO 1 EN
RATA WISTAR"**

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad,
para los fines legales a los que haya lugar

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR



Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP Puebla, Pue. a 27 de Mayo de 2019

DR. EDUARDO M. BRAMBILA COLOMBRES
DR. ALFONSO DANIEL DIAZ FONSECA
MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ

Con toda atención comunico a Uds. que se les propone como integrantes de la Comisión Revisora de Tesis que presenta el (la) Pasante de la Carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

CRUZ CUATECO ANAHI

cuyo título es :

**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSULINA
FUNCIONALIZADA CON VANADIO EN UN MODELO DE DIABETES TIPO
1 EN RATA WISTAR"**

Realizada en el Area de Farmacia;

asimismo, les ruego que a la brevedad posible emitan el dictamen correspondiente.

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ

DIRECTOR



C.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06



BUAP

DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
PRESENTE

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de la Tesis del alumno
de la carrera de QUIMICO FARMACOBIOLOGO
CRUZ CUATECO ANAHI

realizada en el area de Farmacia, comunican a Ud. la aprobación
de la misma con la siguiente redacción:

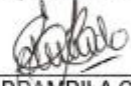
**"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE INSULINA FUNCIONALIZADA
CON VANADIO EN UN MODELO DE DIABETES TIPO 1 EN RATA WISTAR"**

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan, a los
20 días del mes de Noviembre de 2019

Atentamente

"Pensar bien para vivir mejor"




DR. EDUARDO M. BRAMBILA COLOMBRES


DR. ALFONSO DANIEL DIAZ FONSECA


MC. JOSE ANGEL FRANCISCO FLORES HERNANDEZ

C.c.p. Archivo

Vo. Po.


Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

ÍNDICE

Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	9
Abreviaturas.....	10
1.MARCO TEÓRICO.....	12
1.1 Diabetes Mellitus.....	12
1.2 Clasificación.....	12
1.3 Diagnostico.....	13
1.4 Diabetes tipo 1.....	14
1.6 Insulina.....	17
1.7 Complicaciones de la Diabetes.....	21
1.8 Tratamiento.....	24
1.9 Nuevos enfoques terapéuticos.....	31
1.11 Vanadio.....	31
1.12 Vanadio y Diabetes.....	34
1.10 Modelos experimentales de hiperglicemia.....	36
1.10.1 Modelos animales Diabetes tipo 1.....	37
2. DEFINICION DEL PROBLEMA.....	41
3. JUSTIFICACION.....	42
4. OBJETIVOS.....	43
4.1 Objetivo general.....	43
4.2 Objetivos específicos.....	43
5. HIPÓTESIS.....	44
5.1 Hipótesis nula.....	44
5.2 Hipótesis alternativa.....	44
6.DIAGRAMA DE TRABAJO.....	45
7. METODOLOGÍA.....	48
7.1 Construcción de Apo-insulina.....	48
7.2 Formulación de Insulina-Decavanadato.....	48
7.3 Formulación de Insulina-Vanadato.....	49
7.4 Animales.....	49
7.5 Inducción del modelo Diabetes tipo 1.....	50
7.6 Curva dosis-respuesta Insulina Humalog 75/25.....	50

7.7 Establecimiento de grupos	50
7.9 Obtención de la muestra sanguínea	51
7.10 Determinaciones bioquímicas.....	52
7.11 Métodos y fundamentos.....	52
7.12 Determinaciones tisulares.....	57
7.13 Análisis estadístico.	58
8. RESULTADOS	59
8.1 Validación del modelo de Diabetes tipo 1 por inducción con Aloxano.....	59
8.2 DE ₅₀ de Insulina.....	59
8.3 Glucosa semanal y dosis de insulina correspondiente.....	60
8.4 Evaluación de glucosa e insulina en respuesta a un reto metabólico.....	61
8.5 Efecto de la administración de Insulina combinada con vanadio sobre fructosamina.....	64
8.6 Evaluación de glucógeno en tejidos.	66
8.7 Evaluación de perfil lipídico.	68
8.8 Evaluación de triglicéridos en tejidos.....	71
8.9 Evaluación el efecto toxicológico hepático-renal en la administración del complejo y sal de vanadio.....	73
9.DISCUSIÓN.....	75
10. CONCLUSIONES	83
11. BIBLIOGRAFÍA.....	84
12. ANEXOS	87

Índice de figuras.

Figura 1. El “octeto ominoso” de hiperglicemia en DT2. Tomado y modificado de DeFronzo (2015). (página 17)

Figura 2. Especiación y solubilización en dependencia del pH en diferentes cavidades y tejidos. Tomado y modificado de Treviño 2018. (página 33)

Figura 3. Validación del modelo Diabetes tipo 1. (página 59)

Figura 4. DE_{50} de insulina. (página 60)

Figura 5. Curva de tolerancia oral a la glucosa y respuesta de insulina. en el grupo AI al término de un mes de tratamiento. (página 62)

Figura 6. Curva de tolerancia oral a la glucosa y respuesta de insulina en los grupos AID9:1 (1), AID7:3 (2), AID5:5 (3), AID3:7 (4), AID1:9 (5) y AD (6) al término de un mes de tratamiento. (página 63)

Figura 7. Curva de tolerancia oral a la glucosa y respuesta de insulina en los grupos AIV9:1 (1), AIV7:3 (2), AIV5:5 (3), AIV3:7 (4), AIV1:9 (5) y AV (6) al término de un mes de tratamiento. (página 64)

Figura 8. Concentración de fructosamina en suero (página 65)

Figura 9. Concentración de fructosamina en suero (página 65)

Figura 10. Concentración de glucógeno en diferentes tejidos (página 67)

Figura 11. Concentración de glucógeno en diferentes tejidos (página 68)

Figura 12. Concentración de triglicéridos en diferentes tejidos (página 71)

Figura 13. Concentración de triglicéridos en diferentes tejidos (página 72)

Índice de tablas.

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes. ADA 2019. (página 13)

Tabla 2. Criterios de diagnóstico Federación Internacional de Diabetes. (página 14)

Tabla 3. Tipos de insulina. (página 27)

Tabla 4. Tratamiento coadyuvantes y/o complementarios en Diabetes tipo 1.(página 28)

Tabla 5. Modelos más utilizados de DT1. (página 38)

Tabla 6. Promedio de glucosa basal semanal, dosis correspondiente de tratamiento y microgramos de vanadio por UI. (página 61)

Tabla 7. Perfil lipídico de los tratamientos de insulina combinada con decavanadato (página 70)

Tabla 8. Perfil lipídico de los tratamientos de insulina combinada con vanadato. (página 70)

Tabla 9. Evaluación de marcadores de daño renal y hepático en los tratamientos de insulina combinada con decavanadato. (página 73)

Tabla 10. Evaluación de marcadores de daño renal y hepático en los tratamientos de insulina combinada con decavanadato. (página 74)

Abreviaturas.

FDI Federación Internacional de Diabetes

ADA Asociación Americana de Diabetes

DT1 Diabetes tipo 1

DT2 Diabetes tipo 2

DGM Diabetes Mellitus Gestacional

OMS Organización Mundial de la Salud

IAA Autoanticuerpos contra insulina

GAD Descarboxilasa de Ácido Glutámico

GLP1 Péptido similar al glucagón 1

GLUT Transportador de Glucosa

ATP Adenosin trifosfato

SGLT Transportador de Sodio/Glucosa

UI Unidades de Insulina

LPL Lipoprotein Lipasa

HDL Colesterol de alta densidad

LDL Colesterol de baja densidad

VLDL Colesterol de muy baja densidad

PKC Proteína cinasa C

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos

ADN Ácido Desoxirribonucleico

NADH Nicotin Adenin Dinucleotido reducido

ROS Especies Reactivas de Oxígeno

NOAEL Dosis sin efecto adverso

STZ Estreptozotocina

GSH Glutación reducido

PTP 1B Proteína Tirosina Fosfatasa 1B

IRS1 Sustrato del Receptor de Insulina 1

PKB/AKT Proteína Cinasa B

PI3K Fosfoinositol 3-Cinasa

AST Aspartato Aminotransferasa

ALT Alania Aminotransferasa

ALP Fosfatasa Alcalina

1.MARCO TEÓRICO

1.1 Diabetes Mellitus

La Federación Internacional de Diabetes (FID) define la diabetes mellitus, más conocida simplemente como “diabetes”, como una afección crónica que se produce cuando se dan niveles elevados de glucosa en sangre debido a la falta de insulina o la incapacidad de las células de responder ante la misma. Lo anterior provoca un alto nivel de glucosa en sangre o hiperglucemia, que es la principal característica de la diabetes. La hiperglucemia, de no controlarse, puede provocar daños comorbilidades a largo plazo, que son complicaciones sanitarias discapacitantes, como los son las enfermedades cardiovasculares, neuropatía, nefropatía o enfermedades oculares que acaban en retinopatía y ceguera. Por otra parte, si se logra controlar la diabetes adecuadamente, dichas complicaciones se pueden retrasar o prevenir (Han et al., 2017).

La diabetes tipo 1 y tipo 2 son enfermedades heterogéneas en las que la presentación y la progresión de la enfermedad pueden variar considerablemente; la clasificación es importante para determinar la terapia. Tanto en la diabetes tipo 1 como en la tipo 2, diversos factores genéticos y ambientales pueden provocar la pérdida y/o función de células β que se manifiesta clínicamente como hiperglicemia, pacientes con cualquiera de los dos tipos de diabetes, están en riesgo de desarrollar las mismas complicaciones crónicas, aunque las tasas de progresión pueden diferir. La identificación de terapias individualizadas para la diabetes, en un futuro requerirá una mejor caracterización para vías que llevan a la pérdida o disfunción de las células β .

1.2 Clasificación

- De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA) , la diabetes puede ser clasificada en las siguientes categorías generales:
- Diabetes tipo 1 (DT1): Debida a la destrucción autoinmune de las células β , que usualmente conduce a una deficiencia absoluta de insulina.

- Diabetes tipo 2 (DT2): Debida a una pérdida progresiva de la secreción de insulina de las células β , frecuentemente en el trasfondo de resistencia a la insulina.
- Diabetes mellitus gestacional (DMG): Diabetes diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo, que no era declarada diabetes antes del embarazo.
- • Tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo, síndromes de diabetes monogénica (como la diabetes neonatal y la diabetes de inicio de madurez de los jóvenes [MODY]), enfermedades del páncreas exocrino (como fibrosis quística y pancreatitis), y diabetes inducida por fármacos o químicos (como el uso de glucocorticoides, en el tratamiento de VIH/SIDA, o después del trasplante de órganos) (ADA, 2019).

1.3 Diagnóstico

Los criterios de diagnóstico de diabetes se han debatido y se han ido actualizando a lo largo de décadas, pero, según los criterios actuales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se diagnostica diabetes mediante la observación de niveles elevados de glucosa en sangre (Han et al., 2017), la Asociación Americana de Diabetes (ADA, por sus siglas en inglés) establece que la diabetes puede ser

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico de diabetes. ADA 2019.

Glucosa basal ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) Sin ingesta calórica por lo menos 8 horas antes de la determinación.
Glucosa posprandial 2 horas ≥ 200 mg/dL (11.1 mol/L) durante una curva de tolerancia oral a la glucosa. La prueba se debe realizar como lo describe la Organización Mundial de la Salud, usando una carga de glucosa que contenga lo equivalente a 75g de glucosa anidar disuelta en agua.
HbA1c $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol).
Paciente con la sintomatología clásica de hiperglicemia o crisis hiperglicémica, con un valor de glucosa ≥ 200 mg/dL
El diagnóstico requiere dos resultados anormales de los ensayos.

diagnosticada en función de criterios de glucosa en ayuno o a las 2 h durante una prueba de tolerancia oral a la glucosa de 75 g, o criterios de HbA1c (Tabla 1) (ADA, 2019).

Dichas pruebas se pueden usar para diagnosticar y evaluar la diabetes, así como para detectar a individuos con alteración de la tolerancia a la glucosa o alteración

Tabla 2. Criterios de diagnóstico Federación Internacional de Diabetes

Se debe diagnosticar la diabetes cuando se cumplan uno o más de los siguientes criterios	Se debe diagnosticar la ALTERACIÓN DE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA cuando se cumplan ambos criterios	Se debe diagnosticar ALTERACIÓN DE LA GLICEMIA EN AYUNAS cuando se cumplan los siguientes criterios
Glucosa en plasma en ayunas ≥ 7.0 mmol/L (126mg/dL)	Glucosa en plasma en ayunas ≥ 7.0 mmol/L (126mg/dL)	Glucosa en plasma en ayunas 6.1 - 6.9 mmol/L (110 a 125 mg/dL)
Glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75g, 7.8-11.1 mmol/L (140-200 mg/dL)	Glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75g, 7.8-11.1 mmol/L (140-200 mg/dL)	Glucosa en plasma tras dos horas de haber ingerido por vía oral una carga de glucosa de 75g, <7.8 mmol/L (140 mg/dL)
Nivel de glucosa al azar > 11.1 mmo/L (200 mg/dL) o la HbA1c ≥ 48 mmo/mol (equivalente a 6.5%)		

de la glicemia en ayunas (Tabla 2.) (Han et al., 2017).

1.4 Diabetes tipo 1

Este tipo de diabetes constituye el 5% -10% de los sujetos diagnosticados con diabetes y se debe principalmente a la destrucción de las células β del páncreas y/o a cuestiones autoinmunes las cuales derivan en una hipoinsulinemia severa. La diabetes tipo 1 representa el 80% -90% de la diabetes en niños y adolescentes (Katsarou et al., 2017). La incidencia de diabetes tipo 1 se encuentra en aumento en todo el mundo, pero hay una gran variación según los países, con algunas regiones del mundo que presentan una incidencia mucho más alta que

otros, la razón de esto podrían ser un conjunto de factores genéticos y medioambientales que influyen (Han et al., 2017). Este tipo de diabetes se debe principalmente a una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas a través de la respuesta inflamatoria mediada por células T (insulinitis), así como una respuesta humoral (células β). La presencia de autoanticuerpos contra las células de los islotes pancreáticos es el sello distintivo de diabetes tipo 1, las interacciones que ocurren entre las células T y las células B pueden conducir a la formación de autoanticuerpos dirigidos contra islotes. La aparición del primer autoanticuerpo dirigido a islotes refleja la presentación de autoantígenos por las células dendríticas y las respuestas posteriores de autoantígeno específico de células T CD4+ y células T CD8+. Estas son específicas para autoantígenos de células β y son detectables en pacientes con DT1. Las células T reconocen preferentemente post-traduccionalmente péptidos modificados de células β , lo que sugiere que la pérdida de tolerancia a los autoantígenos de células β podría resultar de los cambios en las proteínas que ocurren en respuesta a estrés dentro de la célula β (Katsarou et al., 2017).

Los autoanticuerpos incluyen autoanticuerpos de células de islotes y autoanticuerpos para insulina (IAA), descarboxilasa de ácido glutámico (GAD, GAD65), proteína tirosina fosfatasa (IA2 e IA2 β) y proteína transportadora de zinc (ZnT8A). Los autoanticuerpos pancreáticos son características de DT1 y podrían detectarse en el suero de pacientes meses o años antes del inicio de la enfermedad. La DT1 autoinmune tiene fuertes asociaciones HLA, con vínculos con los genes DR y DQ (Kharroubi & Darwish, 2015). Los haplotipos HLA-DR3-DQ2 y HLADR4DQ8 son los dos principales factores de riesgo para DT1, estos dos haplotipos son también los principales factores de riesgo para el desarrollo de autoanticuerpos dirigidos a células β . Como consecuencia, los factores de riesgo asociados con HLA podrían aumentar el riesgo de desarrollo de DT1, además, estos factores de riesgo genético asociados a HLA están asociados con el tipo de autoanticuerpo que aparece primero. Las personas con el haplotipo HLA-DR3-DQ2 tienen más probabilidades para desarrollar el autoanticuerpo GAD65, mientras que las personas con HLA-DR4-DQ8 tienen más probabilidades de desarrollar primero

autoanticuerpos de insulina. Finalmente, la edad a la que ocurre la seroconversión de autoanticuerpos parece estar asociada con estos haplotipos. Este hallazgo implica que las personas con estos haplotipos tienen un mayor riesgo de desarrollar autoanticuerpos a una edad temprana (Katsarou et al., 2017).

Además de la predisposición genética, se han implicado varios factores ambientales en la etiología de la enfermedad. Los factores virales incluyen rubéola congénita, infección viral con enterovirus, rotavirus, virus herpes, citomegalovirus, retrovirus endógeno y virus Ljungan. Otros factores incluyen niveles bajos de vitamina D y la exposición prenatal a los contaminantes (Kharroubi & Darwish, 2015).

La patogenia de la DT1 se estudia desde para la etapas que se relaciona con la detección de autoanticuerpos y la progresión a destrucción de células β , disglucemia y finalmente síntomas asociado con hiperglucemia. La DT1 a menudo se desarrolla repentinamente y puede producir síntomas como polidipsia, poliuria, enuresis, falta de energía, cansancio extremo, polifagia, pérdida de peso repentina, heridas de curación lenta, infecciones recurrentes y visión borrosa con deshidratación severa y cetoacidosis diabética en niños y adolescentes (Kharroubi & Darwish, 2015). La cetoacidosis diabética se presenta en 15 – 67% de niños con DT1 y resulta de la insuficiencia absoluta de insulina lo que lleva a una acidosis metabólica, hiperglucemia y cetonuria (Shulman & Daneman, 2010). Los síntomas son más graves en niños que en adultos. Los pacientes con DT1 autoinmune también son propensos a otros trastornos autoinmunes como la enfermedad de Graves, la tiroiditis de Hashimoto, la enfermedad de Addison, el vitiligo, la enfermedad celíaca, la hepatitis autoinmune, y la anemia perniciosa (Kharroubi & Darwish, 2015). Ya sea en adultos o en pediátricos existe una necesidad de la administración de insulina exógena, la cual es necesaria e indispensable para realizar diversas acciones biológicas en los tejidos (figura 1).

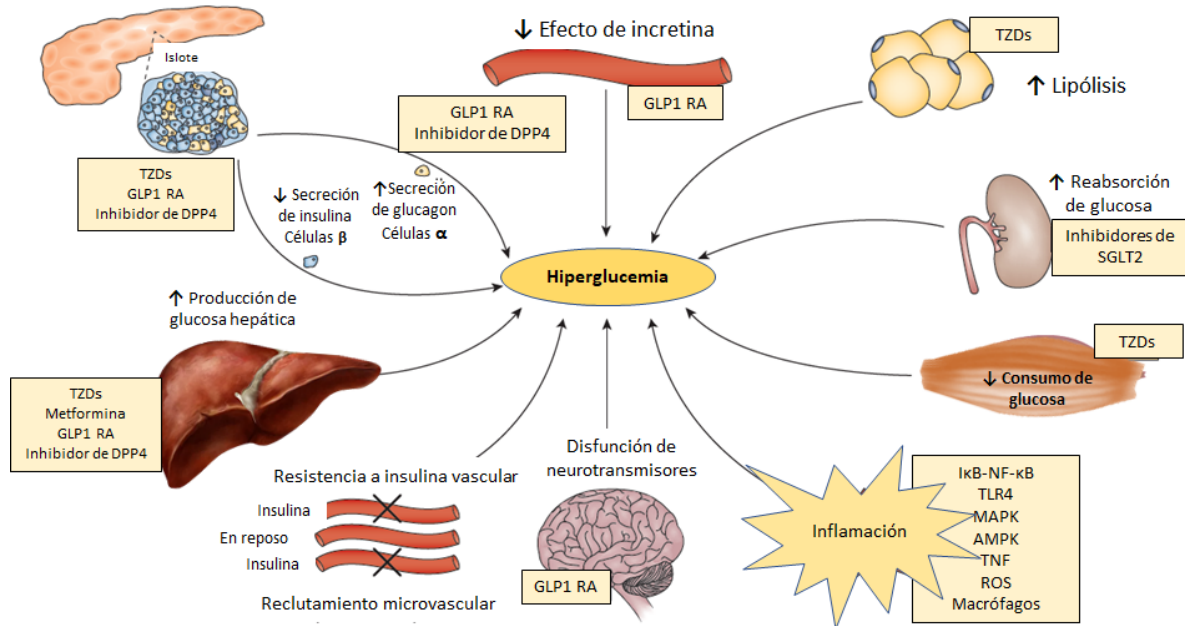


Figura 1. El “octeto ominoso” de hiperglicemia en DT2. Tomado y modificado de DeFronzo (2015).

1.6 Insulina

La insulina juega un papel importante dentro de todos los efectos metabólicos de la DT1. La insulina es una hormona de 5.8 kDa de peso molecular formada por dos cadenas de polipéptidos, A y B, unidas por dos enlaces disulfuro. Es sintetizada en el páncreas como un precursor inactivo de una sola cadena (preproinsulina) con un grupo amino terminal, secuencia de señal, que direcciona su paso dentro de vesículas secretoras. La remoción proteolítica de esta secuencia señal y la formación de tres enlaces disulfuro producen la proinsulina la cual es almacenada en gránulos secretores de las células pancreáticas β en los Islotes de Langerhans, donde proteasas específicas rompen dos enlaces peptídicos para formar la molécula de insulina (Guo, 2014). El incremento de los niveles de glucosa en sangre estimula la secreción de la insulina. La función principal de esta hormona es el mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango biológico de entre 70-100 mg/dL, favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en tejido adiposo y músculo. En hígado se favorece su almacenamiento y se inhibe su producción regulando así el metabolismo de los carbohidratos. Además, tiene

impacto en el metabolismo de lípidos y proteínas, promoviendo la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitógenos (Saltiel & Kahn, 2001).

La insulina inicia sus acciones biológicas por su unión a receptores específicos (IR) localizados en la membrana celular. Después de que la insulina se une a su receptor, las subunidades α sufren cambios conformacionales que permiten que las subunidades β se activen y sean capaces de autofosforilarse en residuos de tirosina (Tyr). Dos vías principales de transducción son activadas por acción de la insulina: la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas). Ambas vías regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas al metabolismo energético, expresión genética y efectos mitógenos (Mendivil Anaya & Sierra Ariza, 2005).

La vía del PI3K es el principal mecanismo por el que esta hormona ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y de lípidos, ya que por esta vía se lleva a cabo la regulación del transporte de glucosa donde la insulina promueve la translocación del transportador de glucosa GLUT4 desde compartimentos intracelulares hacia membrana plasmática, esto incrementa el ingreso de glucosa a través de un número mayor de transportadores GLUT4, principalmente en corazón, tejido adiposo y músculo esquelético (Huang & Czech, 2007).

En la mayoría de los tejidos no dependientes de insulina, la incorporación de glucosa se hace a través de GLUT2, otro transportador de glucosa de baja afinidad ($K_m = 15\text{--}20\text{ mM}$) que se expresa en el hígado humano adulto, riñón, células beta de los islotes de Langerhans y en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino delgado (Thorens, 2015). Debido a su elevado K_m este GLUT transporta glucosa proporcionalmente a su concentración por lo que se le atribuye la propiedad de glucosensor en las células que lo poseen, en especial en hígado y célula beta pancreática; así, por ejemplo, con una baja concentración de glucosa en plasma este GLUT no es capaz de transportar eficientemente glucosa al interior de la célula β , y por ende, la secreción de insulina disminuye. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración plasmática de glucosa en suficiencia para poder ser transportada al interior de la célula beta, la generación de ATP producto del metabolismo de la glucosa es capaz de estimular la liberación de insulina. En el

metabolismo hepático, después de las comidas, el hígado es capaz de incorporar la glucosa proveniente de los alimentos gracias al GLUT2 para ser convertida rápidamente en glucógeno. GLUT2 es un transportador de tipo bidireccional que puede transportar glucosa desde la sangre al tejido o desde el tejido hacia la sangre a nivel hepático y renal, funcionando como sensor de la concentración plasmática de glucosa y permitiendo su intercambio entre la sangre y el hepatocito dependiendo de la condición alimentaria predominante en el momento (Eisenberg et al., 2005). En el epitelio intestinal (desde el íleo hacia el sistema portal) y epitelio de los túbulos contorneados proximal (reabsorción de la glucosa filtrada en el glomérulo nuevamente al torrente circulatorio), existen sistemas de co-transporte de glucosa acoplados a Na^+ que permiten la absorción rápida de esta molécula. El sistema SGLT (Sodium/Glucose Transporters), del cual se conocen 6 isoformas (SGLT1-6) que aprovechan el transporte del Na^+ a favor de su gradiente de concentración para generar una corriente electroquímica, que produce los cambios conformacionales necesarios para la translocación de la glucosa a través de la membrana plasmática (Arraiz et al., 2007).

En el hígado y músculo esquelético, la insulina es la hormona encargada de estimular la síntesis de glucógeno; un polisacárido de elevado peso molecular, altamente ramificado. La UDP-glucosa es una forma activada de la glucosa y se sintetiza a partir de glucosa 1-fosfato y UTP en una reacción catalizada por la UDP-glucosa pirofosforilasa. Para la síntesis de glucógeno es necesaria la presencia de un oligosacárido de glucosas (este oligosacárido se encuentra unido a una proteína identificada como glucogenina) unidas por enlaces α -(1-4), la enzima glucógeno sintetasa es la enzima reguladora del proceso; la cual enlaza mediante la formación un enlace α -(1-4) glucosídico a la glucosa del UDP-glucosa con una de las glucosas del oligosacárido, lo que desplaza al UDP. Repetidas participaciones de esta enzima hacen posible el crecimiento del glucógeno. La glucógeno sintetasa cataliza solamente la síntesis de enlaces α -(1-4), por lo que es necesaria la participación de otra enzima para formar enlaces α -(1-6), que hagan del glucógeno un polímero ramificado. La ramificación tiene lugar después de que un cierto número de residuos de glucosa que se hayan unido mediante enlaces α -(1-4)

por la glucógeno sintetasa. La amilo-(1,4 1,6)-transglucosilasa, transfiere un fragmento terminal de 6 o 7 residuos de longitud, desde un extremo de al menos 11 residuos de longitud a un grupo hidroxilo situado en posición 6 de un residuo de glucosa del interior del polímero, esta reacción crea dos extremos para que continúe la acción de la glucógeno sintetasa, esta mecánica es coordinada en gran parte por la señalización de insulina. Por otra parte, la insulina también es capaz de inhibir la degradación de glucógeno (glucogenólisis) en hígado. Este proceso inicia con la acción de la enzima glucógeno fosforilasa quien escinde mediante la adición de ortofosfato (Pi), esta enzima no es capaz de romper enlaces más allá de los puntos de ramificación, ya que los enlaces glucosídicos α -(1-6) no son susceptibles para la fosforilasa, la ruptura se detiene a los cuatro residuos de glucosa de un punto de ramificación. Para eliminar la ramificación se requiere de una segunda enzima, la glucantransferasa que cataliza dos reacciones; en primer lugar, tiene actividad de transferasa, la enzima elimina tres residuos de glucosa restantes y transfiere este trisacárido intacto al extremo de alguna otra ramificación externa, esta transferasa deja expuesto un sólo residuo de glucosa unido por un enlace glucosídico α -(1-6). Dicho residuo se libera por la actividad α -(1-6)-glucosidasa que posee la misma enzima 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 fosfoglucomutasa. Además, una vez saturado el sistema de resguardo de glucógeno, insulina en hígado promueve la lipogénesis de novo. En donde el hígado sintetiza continuamente triglicéridos, a partir de dos fuentes: re-esterificación de AGL tomados del plasma con glicerol, y a partir de Acetil-CoA provenientes principalmente de hidratos de carbono. Los triglicéridos se secretan en forma de VLDL nacientes (VLDLn), impidiendo así la esteatosis hepática. Esta lipoproteína está constituida por la fracción Apo-B100, Apo-C y Apo-E estas moléculas apo-proteicas son sintetizadas por los ribosomas. En el plasma esta lipoproteína recibe más Apo-C (en especial Apo-CII) cedida por las HDL, aquellas entonces se convierten en VLDL “maduras” y de esta forma se transforma

en el sustrato ideal para interactuar con la lipoproteína lipasa (LPL) en la superficie del endotelio capilar, que dicho sea, también su expresión es estimulada por la acción de insulina (Butterworth, 2005).

1.7 Complicaciones de la Diabetes

De no controlarse adecuadamente, cualquier tipo de diabetes puede acabar generando complicaciones que afectan a distintos tejidos del organismo, lo que resulta en hospitalizaciones frecuentes y muerte prematura. Las personas con diabetes corren un mayor riesgo de desarrollar una serie de graves problemas de salud potencialmente letales, aumentando los costes de la atención sanitaria y disminuyendo la calidad de vida. Niveles de glicemia persistentemente altos causan lesiones vasculares generalizadas, que afectan al corazón, la vista, los riñones y los nervios. La diabetes es una de las principales causas de enfermedad cardiovascular, ceguera, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores. Las complicaciones diabéticas se pueden dividir en complicaciones agudas y crónicas. Las complicaciones agudas incluyen hipoglucemia, cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar hiperglicémico, coma diabético hiperglicémico, convulsiones o pérdida de conciencia e infecciones. Las complicaciones microvasculares crónicas son la nefropatía, la neuropatía y la retinopatía, mientras que las complicaciones macrovasculares crónicas son la enfermedad coronaria que conduce a la angina o el infarto de miocardio, la enfermedad arterial periférica que contribuye al accidente cerebrovascular (Han et al., 2017).

La retinopatía diabética, que causa pérdida de visión, tiene una prevalencia de >80% entre pacientes con DT1. Además, las personas con DT1 tienen mayor riesgo de edema macular, cataratas y glaucoma. La nefropatía diabética es la principal causa de enfermedad crónica renal. La nefropatía se establece cuando la excreción urinaria de albúmina aumenta en ausencia de otras afecciones renales. La gravedad de la nefropatía se clasifica según el grado de albuminuria y la disminución de la tasa de filtrado glomerular (TFG). Aproximadamente un tercio de los pacientes con DT1 recién diagnosticada desarrollan albuminuria persistente dentro de las dos primeras décadas desde el inicio de la enfermedad. La albuminuria es un factor de

riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular en personas con diabetes, la albuminuria también aumenta el riesgo de progresar a enfermedad renal en etapa terminal.

Las neuropatías más comunes en DT1 son neuropatía sensoriomotora periférica y neuropatía autonómica; la neuropatía sensoriomotora periférica es muy frecuente y afecta a los nervios periféricos, la neuropatía autonómica, afecta el sistema cardiovascular, genitourinario y nervios gastrointestinales (Katsarou et al., 2017).

La gravedad de los déficits cognitivos en pacientes con DT1 se ve afectada por la edad de inicio y la duración de la diabetes. Los datos transversales han indicado que pacientes con DT1, de 30 a 40 años, tienen deficiencias cognitivas en áreas como inteligencia general, eficiencia psicomotora y flexibilidad cognitiva. La gravedad de la disfunción cognitiva se ha relacionado con la presencia de retinopatía proliferativa y neuropatía autonómica. Se han observado alteraciones cognitivas no sólo en adultos, sino también en niños y adolescentes (Shalimova et al., 2019).

Las personas con DT1 tienen ocho veces mayor riesgo de cardiopatía y muerte. La fisiopatología subyacente a este fenómeno se ha atribuido a alteraciones vasculares. Sin embargo, los niveles de HDL no son consistentemente bajos en sujetos con DT1 a pesar de su aumento en el riesgo de enfermedad cardiovascular. El control glicémico estricto en DT1 puede reducir la incidencia de enfermedades cardiovasculares al 42%. Se ha acumulado evidencia de que la DT1 confiere un riesgo muy alto de desarrollar insuficiencia cardíaca, que puede ser consecuencia de la exposición a largo plazo de hiperglicemia. La hiperglicemia parece tener un efecto más profundo sobre el riesgo cardiovascular en la DT1 que la DT2. Un estudio reciente del Registro Nacional de Diabetes de Suecia mostró que las personas con DT1 que tienen una HbA1c de 52 mmol / mol (6.2%) tienen un riesgo mayor de muerte por causas cardiovasculares, dos veces mayor que el riesgo en la población general; los riesgos son varias veces mayores entre los pacientes con concentraciones más altas de HbA1c.

Además, una de las grandes complicaciones de la disglucemia, es la dislipidemia secundaria a alteraciones en rutas metabólicas influenciadas por insulina. Un meta-

estudio observacional en personas con DT1, en la práctica clínica sueca mostró que cada aumento de 1 mmol / L en el colesterol LDL se traduce en un riesgo elevado de 9% de enfermedad cardiovascular en individuos sin medicamentos hipolipemiantes, aunque el colesterol LDL no parece ser un buen marcador de riesgo cardiovascular en prevención primaria en pacientes con DT1. Sin embargo, los Estándares ADA de Atención Médica en Diabetes si sugieren que el colesterol LDL ≥ 2.6 mmol / L es un marcador de riesgo cardiovascular. (Schofield, Ho, & Soran, 2019). Así mismo a los 65 años de edad, se ha reportado que la probabilidad de una amputación de las extremidades inferiores es de 11% para mujeres y 21% para hombres con DT1, que refleja un riesgo 85 veces mayor en relación con los pacientes no diabéticos (Katsarou et al., 2017).

Las complicaciones microvasculares diabéticas están estrechamente relacionadas a la severidad y duración de la hiperglucemia. La hiperglucemia promueve el desarrollo de complicaciones microvasculares a través de la activación de seis vías principales, incluida la ruta de polirol, aumento de la formación de productos de glicación avanzada, así como el aumento de la expresión de su receptor, activación de isoformas de proteína quinasa C (PKC), flujo de hexosamina mejorado y aumento de las especies reactivas de oxígeno intracelular. Los factores genéticos tienen un papel fundamental en la determinación de la susceptibilidad a complicaciones microvasculares y macrovasculares. En este sentido, se ha establecido que las especies reactivas de oxígeno deterioran la angiogénesis, activan varias vías proinflamatorias y causan cambios epigenéticos que resultan en expresión duradera de genes proinflamatorios que persisten después de que la glicemia se normaliza. La enfermedad cardiovascular aterosclerótica acelerada está asociada con varios factores de riesgo, incluida la resistencia a la insulina e hiperinsulinemia, activación de vías de inflamación y la presencia de múltiples factores de riesgo cardiovasculares (como hipertrigliceridemia, colesterol de alta densidad (HDL) reducido, pequeñas partículas densas de lipoproteína de baja densidad (LDL), hipertensión, disfunción endotelial, obesidad visceral, y esteatohepatitis no alcohólica o grasa) (DeFronzo et al., 2015).

1.8 Tratamiento

La ADA, proporciona "Estándares de atención médica en diabetes" que incluye las recomendaciones actuales de práctica clínica y está destinado a proporcionar los componentes del cuidado de la diabetes, los objetivos y pautas generales de tratamiento y las herramientas para evaluar la calidad de la atención. Debido a que el sello distintivo de la DT1 está ausente o casi ausente de la función de las células β , por lo que la insulina es el tratamiento esencial para las personas con DT1. Provisión insuficiente de la insulina causa no sólo hiperglucemia sino también trastornos metabólicos sistemáticos como hipertrigliceridemia y cetoacidosis. A lo largo de tres décadas, se ha acumulado evidencia que respalda que múltiples inyecciones diarias de insulina o administración subcutánea continua a través de una bomba de insulina, brindan la mejor combinación de efectividad y seguridad para personas con DT1. En general, los requisitos de insulina se pueden estimar en función del peso, con dosis que varían de 0.4 a 1.0 unidades / kg / día. Se requieren cantidades mayores durante pubertad, embarazo y enfermedad médica. La ADA señala la administración de 0.5 unidades / kg / día como dosis inicial típica en pacientes con DT1 que son metabólicamente estables, con la mitad administrada como insulina prandial, administrada para controlar glucosa en la sangre después de las comidas y la otra la mitad de insulina basal para controlar la glucemia en los períodos entre absorción de comida. La secreción fisiológica de insulina varía con glucemia, cantidad de comida y demandas de glucosa en tejidos. Para abordar esta variabilidad en personas que usan tratamiento con insulina, las estrategias han evolucionado para ajustarse dosis prandiales, basadas en las necesidades previstas. Por lo tanto, la educación de los pacientes sobre cómo ajustar la insulina prandial para tener en cuenta ingesta de carbohidratos y niveles de glucosa puede ser eficaz y debe ser considerado (ADA, 2019).

La mayoría de los estudios comparan inyecciones diarias con la infusión continua de insulina que ha sido relativamente de corta duración. Una revisión sistemática reciente concluyó que la bomba la terapia tiene ventajas para disminuir la HbA1c y para reducir la hipoglucemia severa en niños y adultos.

Se han desarrollado análogos de insulina que están asociados con menos hipoglucemia, menos aumento de peso y una disminución de HbA1c en

comparación con las insulinas humanas en las personas con DT1. El momento óptimo para administrar la insulina prandial varía según el tipo de insulina utilizado (análogo regular, de acción rápida, etc.), nivel de glucosa en sangre medido, calendario de comidas y consumo de carbohidratos. Por lo tanto, la administración de dosis de insulina debe ser individualizada. La técnica de inyección de insulina para pacientes y / o cuidadores debe entenderse, para garantizar una correcta administración de insulina, lo anterior para optimizar el control de glucosa y seguridad del uso de insulina. Por lo tanto, es importante que la insulina se entregue en el tejido adecuado de la manera correcta. La insulina exógena administrada debe ser inyectada en tejido subcutáneo, no intramuscularmente. Los sitios recomendados para la administración de insulina incluyen el abdomen, muslo, glúteos y parte superior del brazo. La absorción de insulina difiere, la inyección involuntaria intramuscular puede conducir a una absorción de insulina impredecible y efectos variables sobre la glucosa, pues es asociada con hipoglucemia frecuente. El riesgo de administrar intramuscularmente incrementa en pacientes más jóvenes y delgados cuando se inyecta en las extremidades en lugar de sitios troncales (abdomen y glúteos) y cuando se usa agujas más largas. La rotación del sitio de inyección es adicionalmente necesaria para evitar lipohipertrofia y lipoatrofia. La lipohipertrofia puede contribuir a la absorción errática de insulina, aumentando la variabilidad glucémica con episodios de hipoglucemia. Pacientes y / o cuidadores deben recibir educación sobre la rotación adecuada del sitio de inyección y para reconocer y evitar áreas de lipohipertrofia (ADA, 2019).

Medicamentos inyectables y orales para reducir los niveles de glucosa han sido estudiados por su eficacia adjuntos al tratamiento con insulina en DT1. La pramlintida que es un derivado sintético análogo a la amilina humana, hormona secretada por las células β del páncreas, actúa disminuyendo la secreción de glucagón, retrasa el vaciamiento gástrico con lo que produce un descenso de la glucosa posprandial, está aprobado para su uso en adultos con DT1. Resultados de estudios muestran reducciones variables de HbA1c (0–0.3%) y peso corporal (1–2 kg) con la adición de pramlintida al tratamiento de insulina. En estudios la adición de metformina a adultos con DT1 causaron pequeñas reducciones en el peso

corporal y en los niveles de lípidos, pero no mejoró la HbA1c. La adición de liraglutida, agonista del receptor del péptido de tipo 1, a la terapia con insulina causa pequeñas reducciones (0.2%) en HbA1c comparadas con el tratamiento de insulina sola en personas con DT1, así como también presentó reducción de peso corporal por 3 kg. Del mismo modo, la adición de un inhibidor del cotransportador sodio-glucosa 2 (SGLT2) a la terapia con insulina se ha asociado con mejoras en HbA1c y peso corporal en comparación con el tratamiento de insulina sola; sin embargo, el uso de inhibidores de SGLT2 también está asociado con eventos adversos que incluyen cetoacidosis. El inhibidor dual SGLT1 / 2 sotagliflozin se encuentra actualmente bajo consideración por la FDA y, si se aprueba, sería el primer complemento terapia oral en DT1 (ADA, 2019).

De acuerdo con otras alternativas, el trasplante de páncreas e islotes normaliza niveles de glucosa, pero requiere de por vida inmunosupresión para prevenir rechazo del injerto y recurrencia de destrucción autoinmune de islotes. Dado los posibles efectos adversos de inmunosupresores, el trasplante de páncreas debe reservarse para pacientes con DT1 (ADA, 2019).

Análogos de insulina recombinante han suplantado principalmente formulaciones de insulina humana recombinante. La terapia de insulina exógena debe administrarse en tal forma en que la insulina pasa primero a través del hígado, de manera similar a la insulina secretada endógenamente. Por lo tanto, la administración de insulina actual está diseñada para aproximarse más estrechamente al entorno fisiológico normal, en el que el páncreas secreta continuamente una pequeña cantidad de insulina y produce grandes cantidades en respuesta a una comida que contiene carbohidratos. En consecuencia, una combinación de análogos de insulina de acción prolongada y de acción corta es ahora utilizado en forma de múltiples inyecciones diarias de insulina; Después de la estabilización, se puede usar una bomba de insulina. Los análogos de insulina de larga duración incluyen insulina detemir, insulina glargina e insulina degludec, que tienen duraciones de acción de 20–24 horas, 24 horas y 24–42 horas, respectivamente. Los análogos de acción corta incluyen insulina Aspart, insulina lispro e insulina glulisina, que todos tener un inicio de acción similar (15 minutos),

un pico efecto dentro de 1-2 horas y una duración de acción de 4 horas. Otras formas de insulina (insulinas premezcladas, insulina isofánica e insulina humana regular) están disponibles, pero estas son menos fisiológicas que aquellas listadas arriba; su uso puede depender de la situación familiar o del costo (Tabla 3.) (Katsarou et al., 2017).

Tabla 3. Tipos de insulina

Insulinas	
Análogos de acción rápida	Lispro Glulisina Aspart Insulina inhalada
Acción corta	Humana regular
Acción intermedia	Humana HNP
Análogos Basales	Glargina Detemir Degludec
Insulinas premezcladas	HNP/Regular 70/30 Lispro 50/50 Lispro 75/25 Aspart 70/30

Otra alternativa para el tratamiento de DT1 es la vacunación genética que también tiene un alcance prometedor, ya que ofrece una gran flexibilidad para controlar la naturaleza de la respuesta de las células T. En general, la vacunación genética ofrece resultados favorables para prevenir o revertir la DT1. Las intervenciones inmunológicas pueden ser capaces de prevenir la destrucción autoinmune de las células β y reducir a los pacientes la dependencia de la insulina (Chellappan et al., 2018).

Sin embargo, el tratamiento de diabetes debe basarse en la reversión de las anomalías patógenas conocidas y no simplemente al reducir HbA1c, así como dichos tratamientos deben iniciarse temprano para prevenir y retrasar el fallo progresivo de las células β . Además, se recomienda un cambio de paradigma de tratamiento en el que la terapia de combinación se inicie con agentes que corrijan

los defectos patogénicos y produzcan una reducción duradera de la HbA1c en lugar de centrarse simplemente en la capacidad de reducción de glucosa del medicamento, como se expone en la tabla 4 (DeFronzo, Eldor, & Abdul-Ghani, 2013).

Tabla 4. Tratamiento coadyuvantes y/o complementarios en Diabetes tipo 1

Clase	Mecanismo de acción	Objetivo de glucosa	Principales precauciones, contraindicaciones, efectos adversos
Agentes orales			
Biguanida (metformina)	Disminuye la producción de glucosa hepática; sensibilizador de insulina hepática; disminuye la absorción intestinal de glucosa	Rápido	Síntomas gastrointestinales, acidosis láctica, contraindicados en insuficiencia renal
Sulfonilurea (gliburida, glipizida, glimepirida)	Aumenta la secreción de insulina	Ayuno y postprandial	Aumento de peso, hipoglicemia
Inhibidor de la α glucosidasa (acarbose, miglitol)	Retrasa la absorción de carbohidratos	De sobremesa	Síntomas gastrointestinales, acidosis láctica, contraindicados en insuficiencia renal
Tiazolidinediona (pioglitazona, rosiglitazona)	Sensibilizador de insulina	Ayuno y postprandial	El edema, el aumento de peso, las fracturas óseas pueden causar o exacerbar la insuficiencia cardiaca, contraindicada en la insuficiencia cardiaca. La rosiglitazona se ha retirado de los EUA debido a un mayor riesgo potencial de eventos

			cardiovasculares. La pioglitazona puede estar asociada con un mayor riesgo de cáncer de vejiga.
Meglitinida (nateglinida, repaglinida)	Aumenta la secreción de insulina	De sobremesa	Aumento de peso, hipoglicemia
Inhibidores de DPP-4 (sitagliptina, saxagliptina, linagliptina, alogliptina)	Aumenta los niveles de GLP- 1 y GIP	De sobremesa	Urticaria / angioedema
Agonista de dopamina (bromocriptina)	Modula los neurotransmisores centrales, lo que mejora el control glicémico y la tolerancia a la glucosa	De sobremesa	Hipotensión ortostática, síncope, náuseas
Secuestrante de ácidos biliares (colesevelam)	Reduce la glucosa plasmática y el colesterol LDL	De sobremesa	Estreñimiento
Inhibidores de SGLT2 (canagliflozina, dapagliflozina, empagliflozina)	Aumenta la excreción renal de glucosa	Ayuno y postprandial	Infecciones genitales y del tracto urinario. Contraindicado en insuficiencia renal moderada a severa
Agentes inyectables			
Agonista del receptor de GLP-1 (exenatida, exenatida de liberación prolongada, liraglutida)	Aumenta la secreción de insulina dependiente de glucosa, disminuye la secreción de glucagón, disminuye el vaciado gástrico	Postprandial, algo de ayuno	Sintomas gastrointestinales
Análogo de amilina (pramlintida)	Retrasa el vaciado gástrico, disminuye la secreción de glucagón	Postprandial, algo de ayuno	Hipoglicemia, síntomas gastrointestinales.
Insulina (varios análogos)	Estimular la captación de glucosa	Basal, bolo en ayunas, postprandial	Aumento de peso, hipoglicemia

Sulfonilurea (gliburida, glipizida, glimepirida)	Aumenta la secreción de insulina	Ayuno y postprandial	Aumento de peso, hipoglucemia
---	--	-------------------------	----------------------------------

Las biguanidas se recomiendan como agente para reducir la producción de glucosa hepática y mejorar la sensibilidad a la insulina. Las sulfonilureas se usan comúnmente para aumentar la producción de insulina endógena al aumentar la función de las células β . Las tiazolidinedionas actúan como sensibilizadores de la insulina para disminuir la resistencia a la insulina al activar los receptores activados por el proliferador de peroxisomas. El tratamiento de diabetes con terapias basadas en incretina puede aumentar la secreción de insulina e inhibir la secreción de glucagón y se asocia con tasas más bajas de hipoglucemia en comparación con otros tratamientos para la diabetes. Sin embargo, se han relacionado con la supresión de la motilidad gastrointestinal y la pancreatitis. Los inhibidores de la alfa-glucosidasa se usan para reducir los niveles de glucosa e insulina en sangre posprandial al retrasar la absorción de carbohidratos. Los inhibidores del cotransportador 2 de glucosa acoplada al sodio se han utilizado para inhibir la reabsorción de glucosa en el túbulo proximal para reducir la glucosa en sangre independientemente de la secreción o sensibilidad de insulina del paciente, pero sus efectos secundarios a largo plazo aún no están claros. El fracaso de la monoterapia en pacientes con diabetes es común y requiere terapias adicionales y uso de insulina para mantener el control glucémico a largo plazo, lo que lleva a un aumento de peso significativo, un alto riesgo de hipoglucemia severa y una baja adherencia a regímenes complejos de múltiples fármacos (Dong et al., 2019).

Las razones para no lograr los objetivos de tratamiento recomendados pueden incluir la falta de iniciación e intensificación del tratamiento y la disminución progresiva de la función de las células β , lo que hace que las terapias dependan de la secreción de insulina o la acción sea menos efectiva con el tiempo. En consecuencia, las nuevas terapias farmacológicas con mecanismos de acción que son independientes de la secreción o acción de la insulina y con perfiles de seguridad aceptables y un bajo riesgo de hipoglucemia y aumento de peso pueden mejorar la capacidad de los pacientes para lograr y mantener el control glucémico

(Cornell, 2015).

1.9 Nuevos enfoques terapéuticos

Actualmente existe el interés por desarrollar nuevos medicamentos para el tratamiento de la DT1 ofreciendo mejorar la calidad de vida de los pacientes. El rol esencial de los iones metálicos y sus compuestos biomoleculares en el desarrollo y funcionamiento de los seres vivos estimuló un creciente interés en el campo de los metalofármacos con actividad antidiabética. Numerosas investigaciones han demostrado que una variedad de iones metálicos y complejos a partir de sales de vanadio, como Sulfato de Vanadil, VO_2SO_4 ; Vanadato de sodio NaVO_3 , Cr (Bis (picolinato) cromo (III)), Mo (Molibdato de sodio, Na_2MoO_4), W (Selenito de sodio, Na_2WO_3), Zn (Cloruro de Zinc, ZnCl_2), y Mn (Cloruro de manganeso, MnCl_2), los cuales exhiben una consistente actividad insulinomimética (Levina & Lay, 2011) (Treviño et al., 2018).

1.11 Vanadio

El conocimiento de la química y bioquímica del vanadio ha aumentado desde principios de la década de 1980, particularmente de vanadio (III), (IV) y (V). Parte de este interés surgió a través de la utilidad de varios complejos de vanadio en catálisis y como nuevos materiales, pero particularmente después del entendido que los compuestos de vanadio tienen propiedades insulinomiméticas. El descubrimiento de varias haloperoxidasas y nitrogenasas de vanadio en microalgas marinas, así como la presencia acumulada de vanadio en hongos y ascidias ha contribuido también al interés de la química y bioquímica del vanadio (Pessoa J.Costa, Crans Debbie C., & Kustin Kenneth, 2007). Existen más de 8000 informes en que el vanadio muestra alguna aplicación en medicina o problemas de salud pública y se han solicitado más de 4000 patentes en relación con la aplicación de compuestos de vanadio, para su uso como antiparasitario, antivírico, antibacteriano, antitrombótico, antihipertensivo, antiaterosclerótico, espermicida, anti VIH, antituberculosis, sin embargo los principales objetivos están relacionados con fármacos dirigidos al cáncer y diabetes (Treviño et al., 2018).

El vanadio es un oligoelemento presente en sistemas biológicos, tanto en plantas como en animales. El elemento está disponible en seis oxidaciones, entre estos estados de oxidación, la forma V(III), vanadil V(IV) y vanadato V (V) son las más comunes. En los vertebrados, ingresa al organismo principalmente por vía oral y respiratoria, a través de la comida y la inhalación respectivamente. Una vez absorbido, se distribuye entre los tejidos y se acumula en diferentes tejidos, siendo las mayores cantidades detectadas en hígado, riñón y especialmente en hueso (Michibata, 2012). El vanadio en la dieta se produce principalmente como vanadil (VO_2^+) o vanadato (HVO_4^{2-}). La mayoría del vanadio ingerido vía oral se transforma en el estómago, donde se reduce parcialmente y precipita a hidróxidos de vanadil (VO_2^+) y permanece en esta forma a medida que pasa al duodeno, donde finalmente son excretados en heces (Figura 2). La especie HVO_4^{2-} se absorbe más rápido en el tracto gastrointestinal de 3 a 5 veces más eficazmente que el VO_2^+ (Treviño et al., 2018). Otra porción del vanadio ingerido es absorbida y circulada en la sangre, donde se somete a especiación redox y complejación por las proteínas del suero como transferrina y albúmina. Los vanadatos y vanadilos finalmente se incorporan a las células, principalmente las de hígado, bazo y riñón, la excreción también sucede a través de la orina (Rehder, 2008).

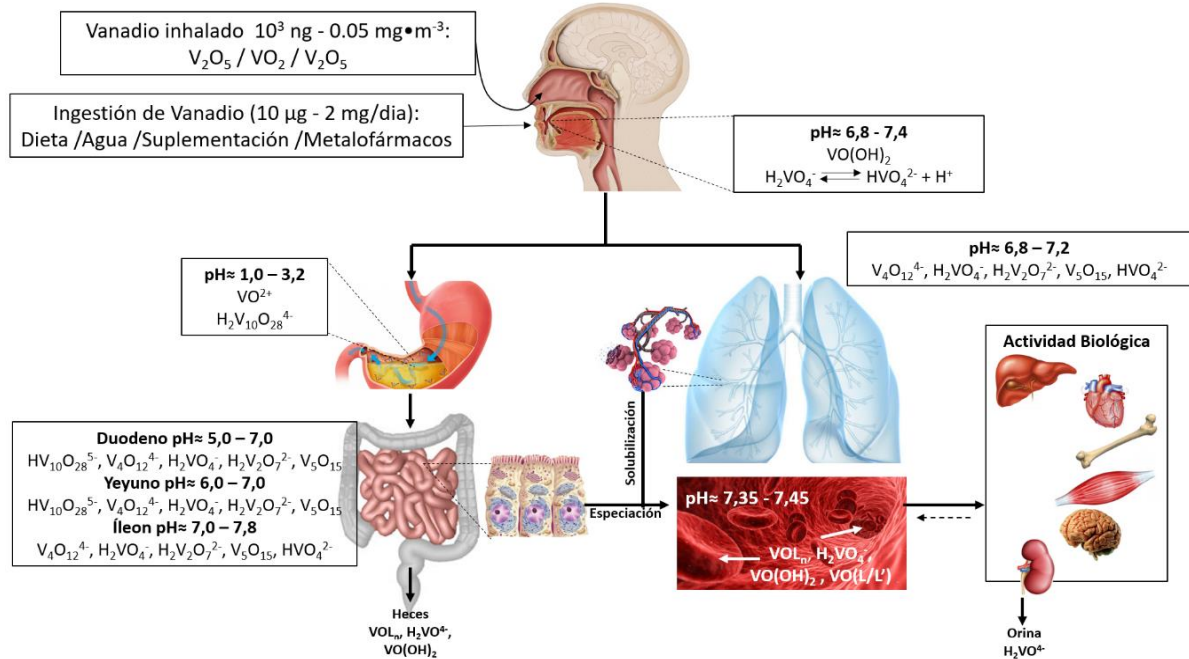


Figura 2. Especiación y solubilización en dependencia del pH en diferentes cavidades y tejidos. Tomado y modificado de Treviño 2018.

El vanadil acuoso puede existir tanto en forma catiónica como aniónica. Las formas catiónicas son más comunes a un pH bajo y las formas aniónicas a pH neutro y alto, La especiación de vanadio es una cuestión de pH y de estabilidad con quelantes biológicos o sintéticos. Dado que el vanadio posee una alta capacidad para cambiar los estados de oxidación o ligandos en relación con el medio ambiente, se puede entender su paso a través de las membranas celulares.

Por debajo de un pH 6 y a una concentración superior a 0.2 mM, se forma el decámero de vanadio (decavanadato) siendo la especie predominante. Este oligómero se somete a sucesivas reacciones de protonación con aumento de acidez, yendo desde el anión 6- a 3-. De estos estados, los aniones 4- y 5- son las formas predominantes, la interacción con la célula conduce a la estabilización del decavanadato, lo que sugiere que V10 interactúa con ubicaciones específicas dentro de esta (por ejemplo: fosfatasa alcalina, adenilato quinasa, ATPasas, F-actina, miosina y ribonucleasa). En condiciones muy ácidas y por debajo de un pH 2, el decavanadato se reemplaza por la especie catiónica $[\text{VO}_2(\text{H}_2\text{O}_4)]^+$ (a menudo referido como VO^{2+}), debido a su alta estequiometría de protones en comparación con los otros derivados de vanadato, el catión es con frecuencia el único compuesto

en una concentración significativa en solución en condiciones fuertemente ácidas, incluso en presencia de ligandos de fuerte unión. Por ende, actualmente, la química del vanadio en lo que respecta al desarrollo de fármacos metálicos busca formas de coordinación que protejan la especiación conservando sus características farmacológicas, previniendo las reacciones farmacológicas a la especiación en el cuerpo por los complejos de vanadio (Treviño et al., 2018).

1.12 Vanadio y Diabetes

El vanadio como vanadato en la célula tiene un papel específico en la regulación de muchas actividades enzimáticas, en la generación de radicales, fosforilación y desfosforilación de proteínas como las fosfatasas, que a pesar de que los sitios activos de estas como las proteínas tirosina fosfatasas están altamente conservados, los elementos de reconocimiento de superficie proporcionan posibilidades para desarrollando inhibidores selectivos de estas enzimas. El vanadio, in vivo, ha demostrado ejercer efectos similares a la insulina en el transporte, oxidación de glucosa, absorción de potasio, así como en la actividad de la glucógeno sintasa en adipocitos y músculo esquelético. Mediante la regulación de la actividad de mensajeros secundarios, puede afectar la transducción de señales en la célula. Activando a Proteína G acoplada a fosfolipasa C el vanadato estimula, en consecuencia, la síntesis de inositol trifosfato n diferentes células. El aumento en los niveles de inositol trifosfato conduce a la movilización de Ca^{2+} desde intracelular tiendas y el aumento posterior en el nivel intracelular de Ca^{2+} . Este fenómeno es importante en la estimulación de muchos procesos celulares, pero el exceso de Ca^{2+} puede también sea tóxico. En el metabolismo de los carbohidratos, el efecto de vanadio puede estar relacionado con la reducción de la concentración plasmática de glucosa. El ion vanadato estimula la formación de fructosa de 2,6-bifosfato que influye en la regulación de la glucólisis y la gluconeogénesis en el hígado. La importancia farmacológica del vanadio radica en el metabolismo de la glucosa, en la actividad de lipoproteína lipasa (LPL), reducciones de oxidaciones de NADH dependientes de vanadato, crecimiento de glóbulos rojos, actividad de adenilato ciclasa y transporte de aminoácidos. El vanadio a baja concentración

desempeña un papel importante en la modificación de la síntesis y reparación del ADN, pero parece citotóxica a dosis más altas. El hallazgo de propiedades únicas de este micronutriente inorgánico y sus complejos pueden contribuir en el mantenimiento de la salud humana y el desarrollo de terapias farmacológicas (Michibata, 2012).

Se ha demostrado que la administración oral de vanadio a animales reduce la hiperglicemia diabética, reduciendo los niveles de glucosa en sangre no sustancialmente más bajos para causar hipoglucemia clínica, una de las principales ventajas para la terapia de vanadio. Se ha sugerido la administración conjunta de vanadio con insulina para ayudar a mantener un control estricto de los niveles de glucosa en sangre, sin causar hipoglucemia. La administración de vanadio mejora alteraciones de la diabetes, además induce cambios en la actividad enzimática o la expresión génica sin afectar significativamente estos procesos en animales. La diabetes aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y sistemas de defensa antioxidante mitocondrial en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ). El estrés oxidativo causado por la formación de radicales libres está implicada en el desarrollo de resistencia a la insulina en ambos tipos de diabetes. La presencia de antioxidantes como el glutatión (GSH) protege contra el desarrollo y complicaciones diabéticas. Sin embargo, cualquier consideración de compuestos de vanadio como agentes antidiabéticos también deben considerar el efecto del compuesto sobre la formación de ROS (Willsky, Takeuchi, & Tracey, 2010).

El vanadio tiene efectos similares y diferentes a los de la insulina, la influencia hipoglicemiante del metal puede considerarse potenciadora de la insulina, más que insulino-mimético, porque los compuestos de vanadio no pueden sustituir totalmente a insulina en cualquier modelo de diabetes que requiera estrictamente insulina. El vanadio puede ejercer su efecto hipoglicémico a través de un mecanismo o combinación de mecanismos distintos a los de la insulina. Al considerar el vanadio como parte de un régimen terapéutico para la diabetes, se debe tener cuidado con la toxicidad. El esfuerzo por lograr fármacos de vanadio más potentes y ampliar la ventana terapéutica ha impulsado a la investigación sobre el

uso de ligandos para el vanadio y así tratar la diabetes.

Los primeros compuestos de vanadio que se probaron para actividades similares a la insulina fueron las simples sales, el sulfato de vanadilo V (IV) y los vanadatos V (V). En un esfuerzo por aumentar eficacia y disminución de la toxicidad, los ligandos orgánicos derivados del vanadio han ido en desarrollo (Rehder, 2008).

Se han realizado pruebas limitadas en humanos con sales de vanadio (ortovanadato de sodio y sulfato de vanadilo) y se han llevado a cabo con pacientes diabéticos con diabetes tipo 1 y tipo 2, con un régimen de dosificación de 2 a 6 semanas de 25 a 100 mg de vanadio por día. Estas dosis fueron más bajas que las utilizadas en roedores y causaron algunos malestares gastrointestinales, pero en general fueron bien tolerados, observando que mejora la sensibilidad de insulina, la síntesis de glucógeno y supresión de la producción de glucosa hepática y también se demostró que el tratamiento con vanadio aumento la fosforilación de la proteína tirosina del receptor de insulina.

Con respecto a los ensayos clínicos en humanos de los compuestos de vanadio con ligandos menos tóxicos, hasta la fecha solo se ha completado el complejo de bis (etilmaltoato) oxovanadio (IV) que ya se encuentra en ensayos clínicos de fase 1 (Willsky et al., 2010). Debido a lo anteriormente descrito, la utilidad de los compuesto con base de vanadio se estudian en modelos animales y cultivos celulares, con la finalidad de limitar su toxicidad y mejorar tanto su farmacocinética como su farmacodinámica.

1.10 Modelos experimentales de hiperglicemia

Los modelos animales se han utilizado ampliamente en la investigación de diabetes. En los primeros estudios utilizaron perros pancreatomizados para confirmar el papel central del páncreas en la homeostasis de la glucosa, que culminó en el descubrimiento y la purificación de la insulina. Hoy en día, la experimentación con animales es polémica y está sujeta a restricciones legales y éticas que varían en todo el mundo. La mayoría de los experimentos se realizan en roedores, aunque algunos estudios todavía se realizan en animales más grandes. Varias toxinas, incluidas la Estreptozotocina y el Aloxano, inducen hiperglucemia en ratas y ratones.

Todos los nuevos tratamientos para la diabetes, incluidos el trasplante de células de los islotes y las estrategias preventivas, se investigan inicialmente en animales. En los últimos años, las técnicas de biología molecular han producido una gran cantidad de nuevos modelos animales para el estudio de la diabetes, que incluyen ratones knock-in, knock-out generalizados y knock-out específicos para tejidos (Rees & Alcolado, 2005).

1.10.1 Modelos animales Diabetes tipo 1

La principal característica de DT1 es una destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, que conduce a la falta de producción de insulina. En modelos animales, esta deficiencia en la producción de insulina se logra mediante una variedad de mecanismos diferentes, que van desde la ablación química de las células β hasta los roedores reproductores que desarrollan espontáneamente diabetes autoinmune. Algunos de los modelos más utilizados de la DT1 se describen a en la Tabla 5. La diabetes inducida químicamente es apropiada para usarse cuando se prueban medicamentos o terapias donde el principal mecanismo de acción es disminuir la glucosa en la sangre de una manera no dependiente de las células β ; por ejemplo, para probar nuevas formulaciones de insulina. En los modelos inducidos químicamente, un alto porcentaje de las células β se destruyen, y por lo tanto hay poca producción de insulina endógena, lo que lleva a la hiperglicemia característico de la patología. La diabetes inducida químicamente no sólo proporciona un modelo simple y relativamente barato de diabetes en roedores, sino que también se puede usar en animales superiores. La diabetes generalmente se induce alrededor de 5 a 7 días antes del inicio del experimento para asegurar una hiperglucemia estable. Se usan dos compuestos principales para inducir diabetes: Estreptozotocina o Aloxano, ambos son relativamente inestables y las soluciones deben realizarse inmediatamente antes de la inyección (A. J. F. King, 2012a).

Tabla 5. Modelos más utilizados de DT1

Mecanismo de inducción	Modelo	Características	Usos
Inducción química	Alta dosis estreptozotocina	Modelo simple de hiperglucemia	Nuevas formulaciones de insulina
	Aloxano		Modelos de trasplante
	Baja dosis de estreptozotocina	Modelo de insulitis inducida	Tratamientos que puedan prevenir la muerte de las células beta
Espontanea autoinmune	Ratones NOD	Destrucción de las células beta por proceso autoinmune	Comprensión genética de Diabetes tipo 1
	Ratas BB		Comprensión del mecanismo de Diabetes tipo 1
	Ratas LEW.1AR1/ -iddm		Tratamientos que puedan prevenir la muerte de las células beta
			Tratamientos que puedan manipular procesos autoinmunes
Inducido genéticamente	Ratones AKITA	Destrucción de células beta por estrés retículo endoplasmático. Insulinoddependiente	Nuevas formulaciones de insulina Modelos de trasplante Tratamientos para prevenir el estrés retículo endoplasmático También aplicado en Diabetes tipo 2
Inducido por virus	Virus Coxsackie B, Virus de la encefalomiocarditis, Virus de la rata Kilham, Virus de la coriomeningitis	Destrucción de células beta inducida por infección viral de células beta	Establecer el papel potencial de los virus en el desarrollo de diabetes tipo 1

La capacidad de toxicidad dirigida a las células beta del páncreas que tienen ambos agentes diabetogénicos (estreptozotocina y Aloxano) se ha utilizado para producir modelos de DT1 a una dosis grande o dosis bajas repetidas durante varios días, ambos compuestos se acumulan en las células β y las destruyen a través de ROS y mecanismos de radicales libres provocando así una deficiencia de insulina (hipoinsulinemias) asociada a estados de hiperglicemia característico de DM1 (Chatzigeorgiou, Halapas, Kalafatakis, & Kamper, 2009).

1.10.2 Aloxano como inductor de hiperglicemia

Aloxano es una pirimida derivada del ácido úrico. Descubierta por primera vez en 1818, observando por primera vez que este compuesto tenía efectos diabetogénicos en 1943, y desde entonces ha sido utilizado como inductor de DT1 experimental (A. King & Austin, 2017). El aloxano ha sido mostrado para comenzar a ejercer sus efectos en 2 min (Szkudelski et al., 1998), ya que los niveles de insulina en plasma aumentan en consecuencia a la administración dando un período de hipoglicemia anterior a la hiperglucemia a largo plazo, la cual ha sido demostrada ser crónica (De Haro-Hernandez et al., 2004). Su efecto se atribuye principalmente a la rápida captación por las células β y la formación de radicales libres donde los mecanismos de defensa por parte de las células son deficientes (A. King & Austin, 2017). El Aloxano se reduce a ácido dialúrico y luego se oxida de nuevo a Aloxano, lo que crea un ciclo redox para la generación de radicales superóxido que se desarmen para formar peróxido de hidrogeno y posteriormente, radicales hidroxilo altamente reactivos que causan la fragmentación del ADN de las células β . Las dosis en ratones varían de 50 a 200 mg/kg y en ratas de 40 a 200 mg/kg. (A. J. F. King, 2012b)

La acción del Aloxano comienza en el páncreas con su rápida absorción por las células β , aunque también existe una absorción similar en hígado y otros tejidos, pero estos son más resistentes a las ROS en comparación con las células β del páncreas. Un aspecto importante de la acción de Aloxano es la formación de especies reactivas de oxígeno, la cual es precedida por la reducción de este compuesto ante la presencia de diferentes agentes reductores, ya que posee una

alta afinidad a grupos SH- contenidos en compuestos celulares, glutatión reducido (GSH), cisteína y grupos sulfhidrilos unidos a proteínas (incluyendo los presentes en enzimas) (Lenzen, Tiedge, & Panten, 1987).

Cuando el Aloxano es reducido se forma ácido dialúrico el cual es oxidado de nuevo a Aloxano generando un ciclo que da como resultado la producción ROS. También se le atribuye el aumento de calcio intracelular. Este efecto proviene de varios acontecimientos: afluencia de calcio al interior de la célula por un flujo mayor de calcio extracelular, movilización del calcio de depósitos intracelulares y su eliminación limitada del citoplasma. Esta afluencia de calcio puede ser resultado de la capacidad de Aloxano de despolarizar la célula β pancreática. Esta despolarización genera una apertura de canales dependientes de voltaje aumentando la concentración de calcio en interior de la célula, lo cual resulta en un vaciamiento de los compartimentos de insulina. La hiperinsulinemia en modelos de rata ha sido observada en las primeras 48 h, posterior a la administración del Aloxano. Resumiendo, la acción tóxica de Aloxano sobre células de β pancreáticas, se debe a la suma de varios procesos como la oxidación de grupos -SH, inhibición de glucocinasa, generación de radicales libres y perturbaciones en el calcio intracelular homeostasis. La concentración exagerada de este ion contribuye a la liberación descontrolada de insulina y junto con las ROS, causa daño de células de β pancreáticas (Szkudelski, 2001).

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

Diabetes Mellitus es un grave problema en salud pública. En México es la segunda causa de mortalidad entre sus habitantes. Representa uno de los principales problemas a nivel de salud pública, con un gasto de 85, 000 millones de pesos al año en su atención y complicaciones. La DT1 es una enfermedad que se caracteriza por el uso de insulina exógena de manera diaria y de por vida, así como de fármacos que a DE₅₀ y por tiempos prolongados inducen toxicidad en diferentes tejidos resultando en complicaciones graves, lo cual genera una disminución en la calidad de vida, aunado a altos costos que se generan por paciente y que van en aumento constante, además de que muy a menudo el uso de terapias con insulina no logran un control glicémico y la hiperglucemia (especialmente la postprandial) y la hipoglucemia siguen siendo problemáticas en el manejo del tratamiento de la patología.

3. JUSTIFICACION

La búsqueda de nuevas terapias farmacológicas que puedan brindar mejores resultados en el tratamiento de Diabetes tipo 1 es de relevancia por la mejora que pueden ofrecer a los tratamientos convencionales y a la calidad de vida de los pacientes, aunado a una disminución de costos generados por tratamiento.

Los compuestos de vanadio se muestran como una novedosa alternativa para el tratamiento de diabetes, evitando la degeneración progresiva del metabolismo celular multisistémico, que enmarca la evolución de las complicaciones y problemáticas que acarrea la patología. Por lo que la generación de nuevos fármacos que sean coadyuvantes en la farmacoterapia del paciente, que provean de intervenciones exitosas, bajo nivel toxicológico, tiempo de efectividad más prolongado a dosis menores es de suma importancia. Este trabajo pretende evaluar la interacción de insulina con sales de vanadio y decavanadato como una mejora en la terapéutica actual.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto sobre el metabolismo de glucosa y lípidos de los complejos Insulina-Decavanadato e Insulina-Vanadato en un modelo experimental de Diabetes tipo 1 en rata Wistar.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta glicémica y lipídica durante el tiempo de administración del complejo y sal de vanadio.
- Evaluar la respuesta insulínica durante el tiempo de administración del complejo y sal de vanadio sobre el resguardo de glucógeno y triglicéridos .
- Evaluar el efecto toxicológico hepático-renal en la administración del complejo y sal de vanadio.

5. HIPÓTESIS

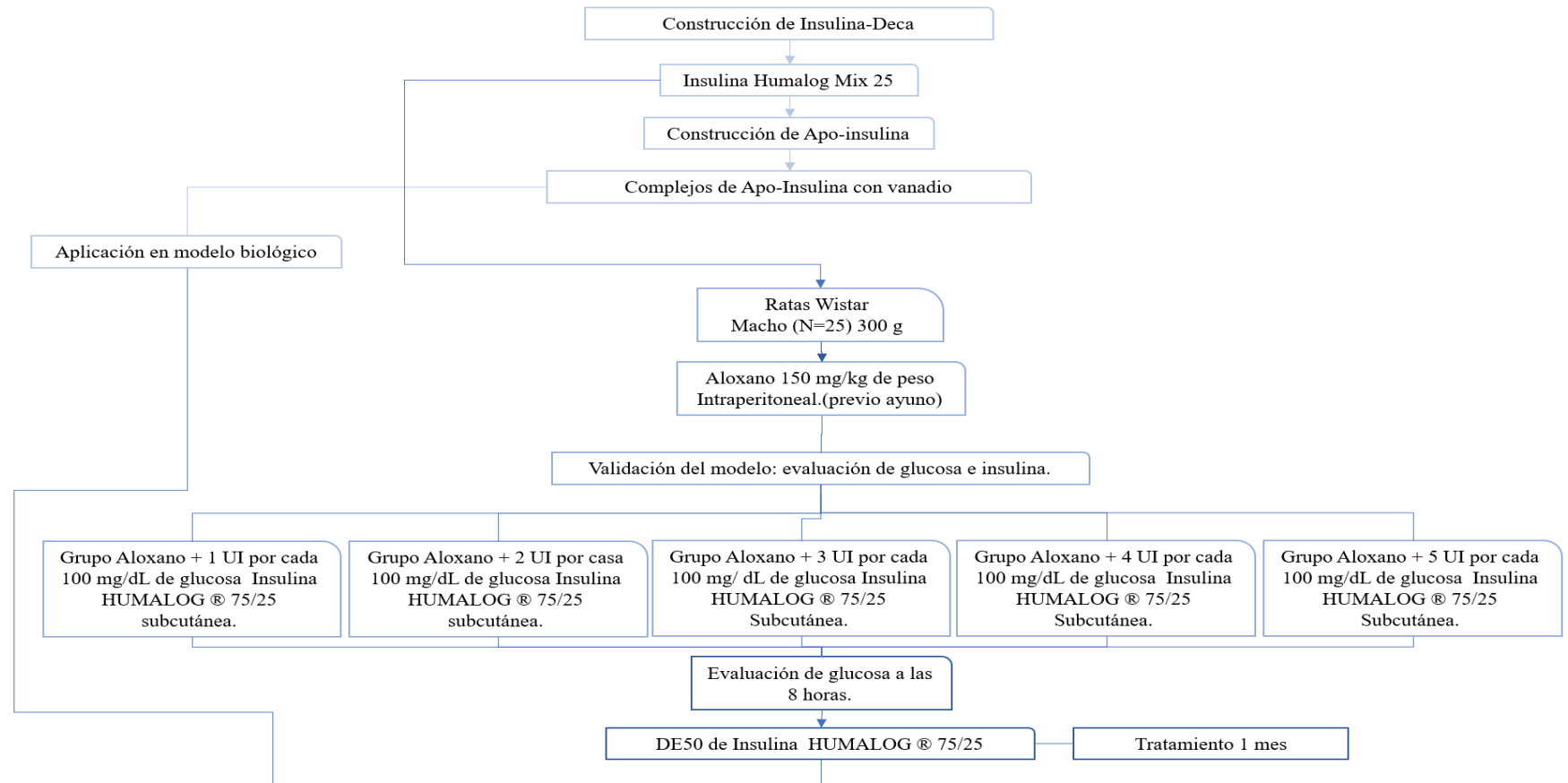
5.1 Hipótesis nula

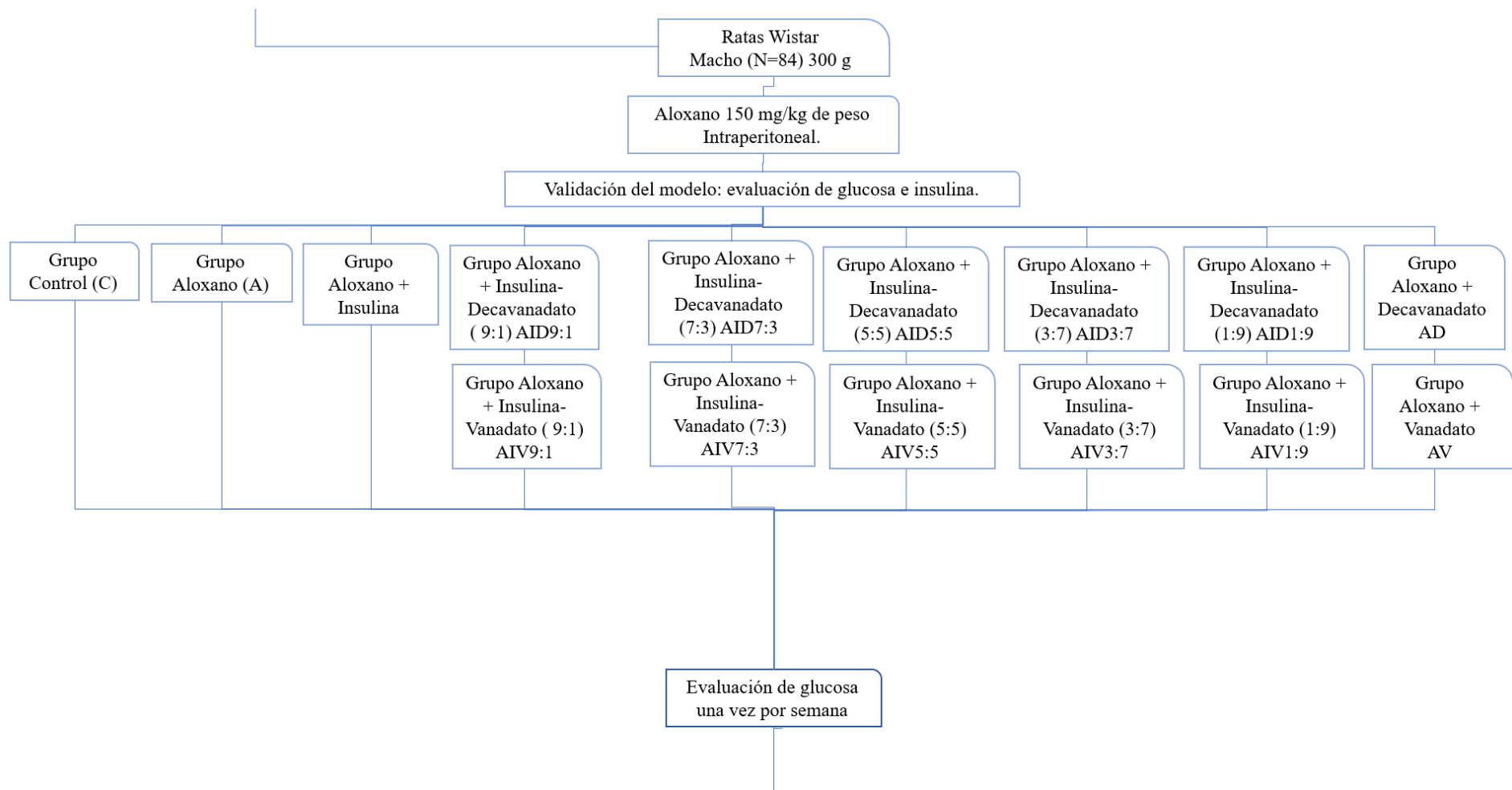
El tratamiento de los complejos Insulina-Decavanadato e Insulina-Vanadato no tiene un efecto potenciador sobre el tratamiento de insulina en un modelo experimental de Diabetes tipo 1 en rata Wistar.

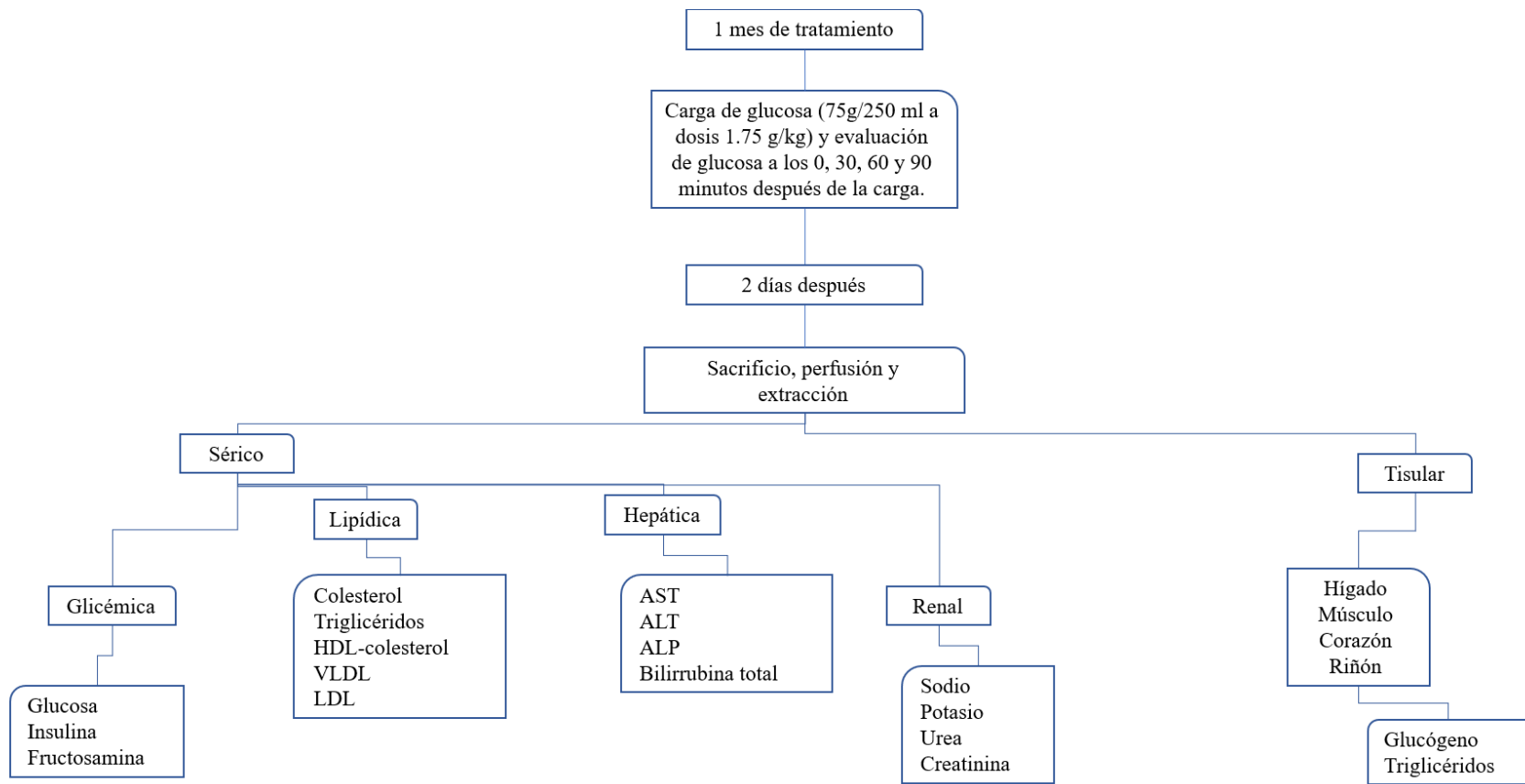
5.2 Hipótesis alternativa

El tratamiento de los complejos Insulina-Decavanadato e Insulina-Vanadato tiene un efecto potenciador sobre el tratamiento de insulina en un modelo experimental de Diabetes tipo 1 en rata Wistar

6. DIAGRAMA DE TRABAJO







7. METODOLOGÍA

7.1 Construcción de Apo-insulina

En tubos Eppendorf, se hidrataron 0.05 gramos de Chelex con 1 mL de TrisHCl (5 mM) a pH de 8.4 se dejaron por 8 horas en rotación constante para posteriormente centrifugar a 4000 r.p.m por 20 minutos separando la fase líquida, dejando únicamente las partes hidratadas.

A los eppendorf con perlas se les agrego 1 mL de Insulina HUMALOG® 75/25 y se dejó en movimiento por 24 horas para construir la Insulina libre de metales (Apo-Insulina).

7.2 Formulación de Insulina-Decavanadato

- a) Relación 10:0 (10 mol insulina, 0 mol de decavanadato) Apo insulina a pH 6.9
- b) Relación 9:1 (9 mol de insulina, 1 mol de decavanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 40 μ L de una solución de Decavanadato de Amonio a 0.17 mM.
- c) Relación 7:3 (7 mol de insulina, 3 mol de decavanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 156 μ L de una solución de Decavanadato de Amonio a 0.17 mM.
- d) Relación 5:5 (5 mol de insulina, 5 mol de decavanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 365 μ L de una solución de Decavanadato de Amonio a 0.17 mM.
- e) Relación 3:7 (3 mol de insulina, 7 mol de decavanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 849 μ L de una solución de Decavanadato de Amonio a 0.17 mM.
- f) Relación 1:9 (1 mol de insulina, 9 mol de decavanadato) a 100 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 3278 μ L de una solución de Decavanadato de Amonio a 0.17 mM.
- g) Relación 0:10 (0 mol de insulina, 10 mol de decavanadato) Decavanadato de Amonio a 0.17 mM.

7.3 Formulación de Insulina-Vanadato

- a) Relación 10:0 (10 mol insulina, 0 mol de vanadato) Apo insulina a pH 6.9
- b) Relación 9:1 (9 mol de insulina, 1 mol de vanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 40 μ L de una solución de vanadato de Amonio a 1.7 mM.
- c) Relación 7:3 (7 mol de insulina, 3 mol de vanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 156 μ L de una solución de vanadato de Amonio a 1.7 mM.
- d) Relación 5:5 (5 mol de insulina, 5 mol de vanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 365 μ L de una solución de vanadato de Amonio a 1.7 mM.
- e) Relación 3:7 (3 mol de insulina, 7 mol de vanadato) a 500 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 849 μ L de una solución de vanadato de Amonio a 1.7 mM.
- f) Relación 1:9 (1 mol de insulina, 9 mol de vanadato) a 100 μ L de Apo insulina a pH 6.9 se añadirán 3278 μ L de una solución de vanadato de Amonio a 1.7 mM.
- g) Relación 0:10 (0 mol de insulina, 10 mol de vanadato) Vanadato de Amonio a 1.7 mM.

7.4 Animales

Ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 300-350 gramos provenientes del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, mantenidas en condiciones controladas de acondicionamiento con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y temperatura de 19-26°C, con disponibilidad de alimento y agua "*Ad libitum*", mantenidas bajo las consideraciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

7.5 Inducción del modelo Diabetes tipo 1

A ratas con peso promedio de 300 g, se les administro vía intraperitoneal Aloxano a 150 mg/kg de peso, manteniendo a los animales con disponibilidad de alimento y agua, cuando los animales presentaron hiperglucemias >300 mg/dL asociadas a hipoinsulinemias < 5 μ U/mL se validó el modelo de DT1.

7.6 Curva dosis-respuesta Insulina Humalog 75/25

20 animales inducidos con DT1 se dividieron en 5 grupos y se les administro vía subcutánea las siguientes dosis de Insulina para obtener la DE₅₀ de insulina.

- a) Grupo Aloxano + 1 UI 100mg/dL de Glucosa de Insulina Humalog 75/25 subcutánea.
- b) Grupo Aloxano + 2 UI 100mg/dL de Glucosa de Insulina Insulina Humalog 75/25 subcutánea.
- c) Grupo Aloxano + 3 UI 100mg/dL de Glucosa de Insulina Insulina Humalog 75/25 subcutánea.
- d) Grupo Aloxano + 4 UI 100mg/dL de Glucosa de Insulina Insulina Humalog 75/25 subcutánea.
- e) Grupo Aloxano + 5 UI 100mg/dL de Glucosa de Insulina Insulina Humalog 75/25 subcutánea.

8 horas después de la administración se evaluó la concentración de glucosa basal sérica en los animales para la obtención de la DE₅₀ de insulina.

7.7 Establecimiento de grupos

Obtenida la DE₅₀ de Insulina Humalog 75/25, 72 animales inducidos con DT1 se dividieron en 12 grupos administrando de manera diaria la DE₅₀ de UI obtenida en el punto 7.6 vía subcutánea, resultando de la siguiente manera.

- a) Grupo Control (C)
- b) Grupo Aloxano , diabetes tipo 1(A)
- c) Grupo Aloxano, Insulina (AI)
- d) Grupo Aloxano + Insulina-Decavanadato (relación 9:1) 0.14 μ g de decavanadato por UI (AID9:1)
- e) Grupo Aloxano + Insulina-Decavanadato (relación 7:3) 0.47 μ g de decavanadato por UI (AID7:3)

- f) Grupo Aloxano + Insulina-Decavanadato (relación 5:5) 0.84 μ g de decavanadato por UI (AID5:5)
- g) Grupo Aloxano + Insulina-Decavanadato (relación 3:7) 1.25 μ g de decavanadato por UI (AID3:7)
- h) Grupo Aloxano + Insulina-Decavanadato (relación 1:9) 1.73 μ g de decavanadato por UI (AID1:9)
- i) Grupo Aloxano + Decavanadato, 2 μ g de decavanadato por UI (AD)
- j) Grupo Aloxano + Insulina-Vanadato (relación 9:1) 0.14 μ g de vanadato por UI (AIV9:1)
- k) Grupo Aloxano + Insulina-Vanadato (relación 7:3) 0.47 μ g de vanadato por UI (AIV7:3)
- l) Grupo Aloxano + Insulina-Vanadato (relación 5:5) 0.84 μ g de vanadato por UI (AIV5:5)
- m) Grupo Aloxano + Insulina-Vanadato (relación 3:7) 1.25 μ g de vanadato por UI (AIV3:7)
- n) Grupo Aloxano + Insulina-Vanadato (relación 1:9) 1.73 μ g de vanadato por UI (AIV1:9)
- o) Grupo Aloxano + Vanadato (relación 0:10) 2 μ g de vanadato por UI (AV)

Se evaluó la glucosa sérica en ayuno de 4 a 5 horas una vez a la semana a cada animal de cada grupo, para calcular la dosis correspondiente individual. El tratamiento duro 4 semanas.

7.9 Obtención de la muestra sanguínea

Después de un mes de tratamiento correspondiente a cada grupo, se suspendió el alimento de 4 a 5 horas antes de la obtención de la muestra sanguínea para las curvas de tolerancia oral a la glucosa, donde, después de la administración de una carga de glucosa a 1.75 g/kg y tras anestesiarse a las ratas se procedió a tomar muestra por punción intracardiaca extrayendo 200 μ L de sangre (aproximadamente), recolectando así, muestra sanguínea a los 0, 30, 60 y 90 minutos después de la administración de la carga de glucosa, la recolección se realizó en tubos eppendorf y para la obtención de suero, las muestras se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 10 minutos.

Después de 2 días de realizar la curva de tolerancia oral a la glucosa, los animales se sacrificaron, suspendiendo el alimento de 4 a 5 horas antes del sacrificio, obteniendo primero la muestra sanguínea seguido de una perfusión con solución salina, para finalmente la obtención de tejidos.

7.10 Determinaciones bioquímicas

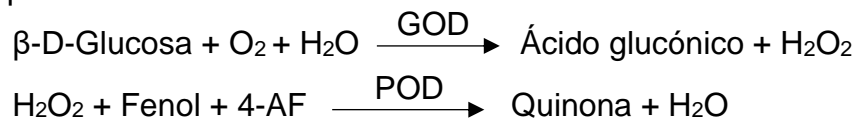
Una vez obtenidas las muestras, se realizó la medición de los siguientes parámetros bioquímicos séricos: glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol VLDL, curva de tolerancia a la glucosa con respuesta de insulina, fructosamina, bilirrubina total, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, sodio, potasio, urea y creatinina.

7.11 Métodos y fundamentos

- **Determinación de la concentración de glucosa sérica**

- **Fundamento**

La glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantificará por espectrofotometría.



- **Determinación de la concentración de insulina sérica**

- **Fundamento**

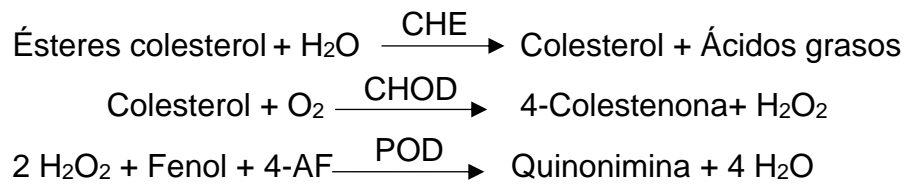
Ensayo Inmunoenzimométrico (Tipo 3): Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo inmunoenzimométrico incluyen anticuerpos de una alta afinidad y especificidad (Ab), (enzima conjugada e inmovilizada), con epítomos de reconocimiento diferentes y distintos, en exceso, y antígeno nativo (Ag). En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el ensayo en la superficie del pozo en el microplato durante la interacción de streptavidin cubierto sobre el pozo y agregando exógenamente 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 sterio hidrance, para formar un complejo de sándwich soluble. Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a

través de la reacción de alta afinidad de streptavidin y el anticuerpo biotinilado. 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 di versas 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.

- **Determinación del Colesterol**

- **Fundamento**

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



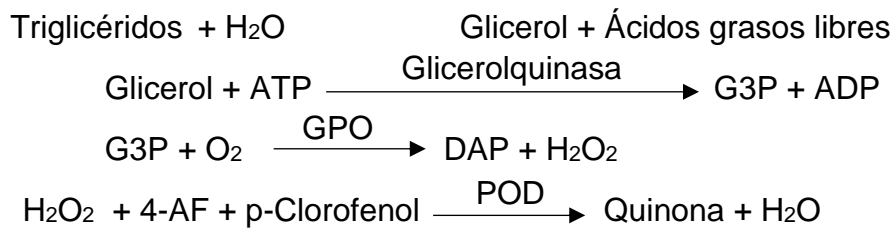
La intensidad del color formado será proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.

- **Determinación de la concentración de triglicéridos.**

- **Fundamento**

La concentración sérica de triglicéridos, se realiza por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponde a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, en la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-

aminoantipirina y 4- clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es medida a una longitud de onda de 505 nm.



- **Determinación del Colesterol HDL reactivo precipitante**

- **Fundamento**

El colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones es hidrolizado por una colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. El detergente presente en el reactivo solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la muestra. El colesterol de HDL se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación. El colesterol esterificado se hidrata mediante una colesterol esteras, dando como resultado colesterol y ácidos grasos libres, el colesterol resultante sufre una semioxidación e hidratación por una colesterol oxidasa, dando como resultado colesteno y peróxido de hidrógeno, este se acopla a una reacción coordinada por una peroxidasa con 4-aminoantipirina y una solución buffer DSBmT obteniéndose como producto final quinonaimina, que presenta color y este es detectado por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm.

- **Determinación del Colesterol LDL**

- **Fundamento**

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de polivinil sulfato. La concentración de colesterol LDL se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y en el sobrenadante obtenido tras la precipitación.

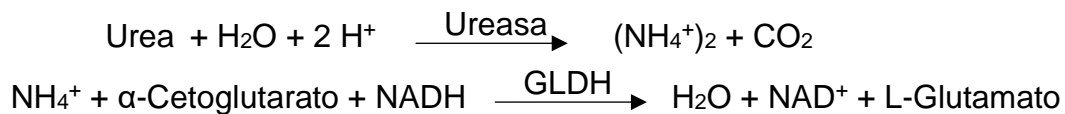
- **Determinación de sodio y potasio**

La medición de electrolitos se realizará con el analizador de electrolitos Plus Lyte II que se basa en una prueba de potencial entre el ion electrodo y el electrodo de referencia. Consiguiendo la concentración del ion por medio de la ecuación de Nernst. El analizador toma el método de comparación para determinar la actividad de los iones K^+ , Na^+ , es decir, obtener los dos potenciales del electrodo del ion empleando dos soluciones (solución slope y la calibradora), construyendo una curva de concentración como referencia con alguna pendiente basada en dos potenciales conocidos. Así, el potencial del electrodo de la muestra se compara con el potencial de la curva de referencia correspondiente, y se obtiene la concentración del ion en la muestra.

- **Determinación de Urea**

- **Fundamento**

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco (NH_4^+) y anhídrido carbónico (CO_2). Los iones amonio formados se incorporan al α -cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD^+ .



La disminución de la concentración de NADH en el medio será proporcional a la concentración de urea de la muestra.

- **Determinación de Creatinina**

- **Fundamento**

El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato de sodio descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar

gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado será proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

- **Determinación de Bilirrubina Total**

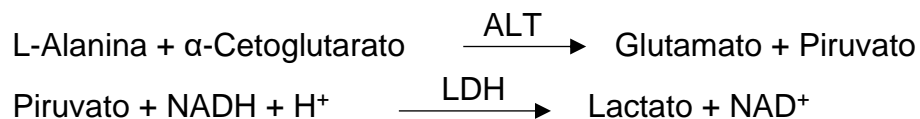
- **Fundamento**

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado será proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra.

- **Determinación de Alanina aminotransferasa**

- **Fundamento**

La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH.

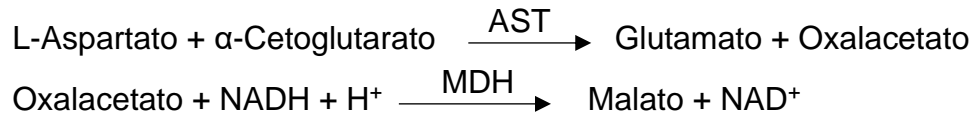


La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, será proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra.

- **Determinación de Aspartato aminotransferasa**

- **Fundamento**

La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH.



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, será proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra.

- **Determinación de Fosfatasa alcalina**

- **Fundamento**

La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, será proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra.

- **Determinación de fructosamina**

- **Fundamento**

Las proteínas glicadas séricas reducen a las sales de tetrazolio (NBT) en medio alcalino. La velocidad de formación del formazán a una temperatura determinada es proporcional a la concentración sérica de proteínas glicadas (Baker, Metcalf, Johnson, Newman, & Rietz, 1985).

7.12 Determinaciones tisulares

- **Obtención de las biopsias de tejidos.**

Las biopsias de tejidos (hígado, músculo, corazón, riñón) se almacenaron a -70°C para la posterior determinación de TAG y Glucógeno.

La determinación de TAG se realizó con la técnica para las determinaciones séricas de triglicéridos, lo anterior precedido de un homogenizado de los tejidos con solución salina isotónica.

- **Determinación de glucógeno**
 - **Fundamento**

El método que se realizará será el de L. W. Bennett (2007), el cual se basa en la extracción tisular de glucógeno mediante el empleo de ácido perclórico y etanol, seguida de su hidrólisis total mediante fenol y ácido sulfúrico, los cuales producen un compuesto colorimétrico que puede ser leído a 490nm. (L. W. Bennett, 2007)

7.13 Análisis estadístico.

Para la validación del modelo DT1, los datos de los grupos pareados se informaron como la media \pm error estándar (SEM), y las comparaciones se realizaron con una prueba “t” de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo. Para el resto del estudio, se utilizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba posterior de Bonferroni, con $p < 0.05$ como significativo.

8. RESULTADOS

8.1 Validación del modelo de Diabetes tipo 1 por inducción con Aloxano.

Una vez realizada la inducción de modelo DT1 con Aloxano vía intraperitoneal a dosis de 150 mg/kg, se procedió a evaluar los niveles de glucosa e insulina 3 días después de la administración del inductor con ayuno previo de 4 a 5 horas para la validación del modelo, teniendo como resultado un incremento de glucosa al 323% y una disminución de la concentración de insulina en un 99% del grupo Aloxano respecto al grupo Control, con una diferencia estadísticamente significativa donde las medias obtenidas de glucosa e insulina para el grupo Control y Aloxano fueron de 98 mg/dL, 415 mg/dL 18.06 μ U/mL y 0.18 μ U/mL (Figura 3).

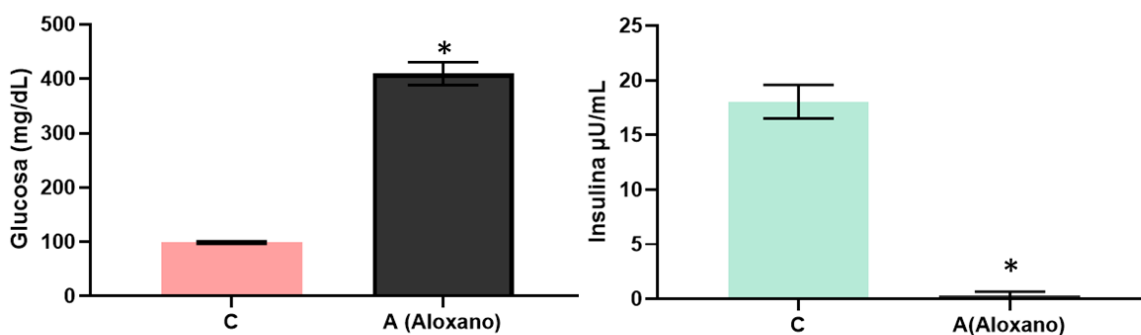


Figura 3. Validación del modelo Diabetes tipo 1. (Izquierda) Valores de glucosa en ayuno después de la inducción con Aloxano. (Derecha) Valores de insulina en ayuno después de la inducción con Aloxano. Los resultados se muestran \pm EME. (*) indica diferencia significativa respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por una prueba de "t" de Student.

8.2 DE₅₀ de Insulina.

Una vez validado el modelo de DT1 y para conocer la DE₅₀ de Insulina para dicho modelo, se realizó una curva dosis-respuesta de insulina en 5 grupos de ratas inducidas con Aloxano con dosis de 1UI, 2UI, 3UI, 4UI y 5UI por cada 100 mg/dL de glucosa respectivamente. La figura 4 muestra el porcentaje de animales que a las 8 horas de administración de la dosis de insulina mostraron valores de glucosa inferiores a 110 mg/dL pero superiores a 85 mg/dL partiendo de una glucosa basal promedio de 415 mg/dL. Los porcentajes de cada grupo corresponden al 10% - 1UI, 30% - 2UI, 60% - 3UI, 70% - 4UI y 90% - 5UI. Estableciendo 3UI como la DE₅₀.

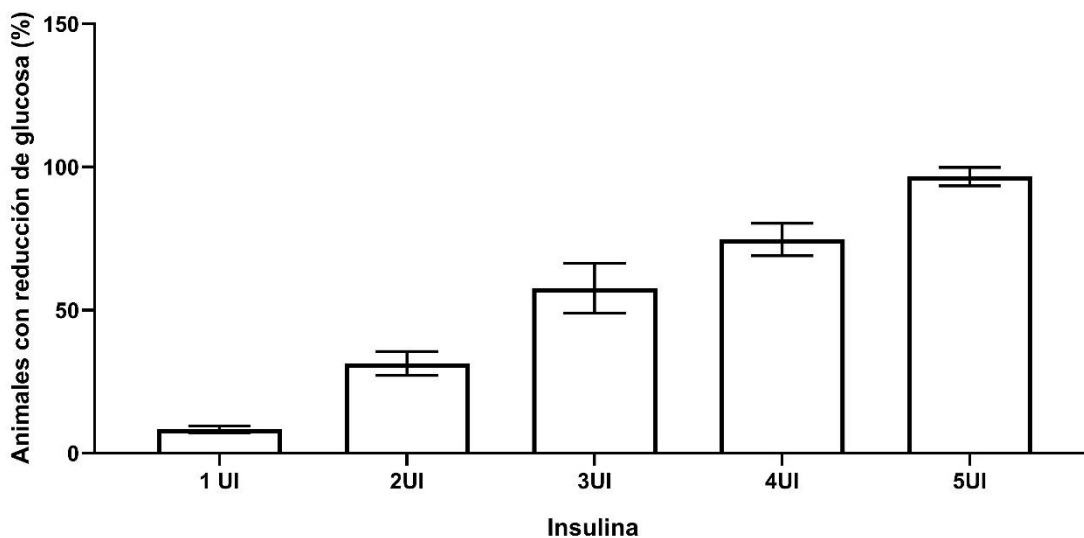


Figura 4. DE₅₀ de insulina. Porcentaje de animales hiperglucémicos, con reducción de glucosa basal 8 horas después de la administración de insulina a dosis de 1UI, 2UI, 3UI, 4UI y 5UI (n=5/grupo).

8.3 Glucosa semanal y dosis de insulina correspondiente.

El tratamiento para los grupos experimentales AI, AID9:1, AID7:3, AID5:5, AID3:7, AID1:9, AD, AIV9:1, AIV7:3, AIV5:5, AIV3:7, AIV1:9 y AV se siguió por un mes, por lo que semanalmente se realizó la determinación de glucosa con previo ayuno de 4 a 5 horas por rata, para establecer la dosis de insulina a administrar según los niveles de glucosa evaluada. Los grupos se iniciaron la primera semana con una administración de 3UI. Sin embargo, las UI se administraron a necesidad de la concentración de glucosa, por lo que las dosis variaron entre 2 y 4 UI/100mg/dL de glucosa /día. La Tabla 6 muestra el promedio de los niveles de glucosa evaluados semanalmente y las UI correspondientes para cada grupo, así como los microgramos de vanadio contenidos por dosis, donde se puede observar que hay una mayor disminución de la glicemia en los tratamientos donde se incrementa la concentración de decavanadato o vanadato, comportamiento que se puede ver reflejado en la disminución de las UI de insulina requeridas para el control de la glicemia que llega hasta 2UI/100 mg/dL de glucosa en grupos con mayor concentración de vanadio, siendo los tratamientos de insulina-decavanadato los de menor requerimiento de UI al inicio de la semana 4.

Tabla 6. Promedio de glucosa basal semanal, UI correspondiente de tratamiento y microgramos de vanadio por UI. Las UI se administraron a necesidad de las concentraciones de glucosa, donde pueden variar de 2 a 4 UI.

Grupo	Glucosa Semana 1	UI/100mg/dL de glucosa	Glucosa Semana 2	UI/100mg/dL de glucosa	Glucosa Semana 3	UI/100mg/dL de glucosa	Glucosa Semana 4	UI/100mg/dL de glucosa	µg de vanadio por UI
C	102 ± 4	0	103 ± 3	0	104 ± 5	0	105 ± 3	0	0
A	415 ± 12	3	398 ± 12	0	404 ± 15	0	406 ± 13	0	0
AI	415 ± 12	3	359 ± 15	4	287 ± 13	4	210 ± 16	4	0
AID9:1	415 ± 12	3	381 ± 8	4	248 ± 6	3	199 ± 6	3	0.1497
AID7:3	415 ± 12	3	358 ± 6	4	203 ± 9	3	189 ± 8	3	0.4758
AID5:5	415 ± 12	3	324 ± 11	3	157 ± 5	3	112 ± 7	2	0.8429
AID3:7	415 ± 12	3	309 ± 8	3	143 ± 6	3	96 ± 4	2	1.2592
AID1:9	415 ± 12	3	288 ± 9	3	100 ± 6	2	85 ± 9	2	1.7353
AD	415 ± 12	3	290 ± 8	3	78 ± 3	2	108 ± 7	2	2
AIV9:1	415 ± 12	3	345 ± 12	3	235 ± 12	3	178 ± 10	3	0.1497
AIV7:3	415 ± 12	3	368 ± 14	4	221 ± 11	3	185 ± 6	3	0.4758
AIV5:5	415 ± 12	3	340 ± 18	3	254 ± 13	3	192 ± 12	3	0.8429
AIV3:7	415 ± 12	3	327 ± 11	3	198 ± 6	3	148 ± 9	3	1.2592
AIV1:9	415 ± 12	3	307 ± 16	3	158 ± 9	3	112 ± 8	3	1.7353
AV	415 ± 12	3	227 ± 10	3	132 ± 13	2	98 ± 11	2	2

8.4 Evaluación de glucosa e insulina en respuesta a un reto metabólico.

Al término del mes de tratamiento cada grupo se sometió a la evaluación de glucosa e insulina frente a un reto metabólico administrando vía oral una carga de glucosa a 1.75 g/kg con previo ayuno de 4 a 5 horas. Las figuras 5, 6 y 7 muestran los resultados de glucosa e insulina para cada grupo al minuto 0, 30, 60 y 90 después de la administración de la carga oral de glucosa al término del mes de tratamiento, cada tratamiento es comparado contra el grupo Control que es referente del manejo de glucosa ideal. En la figura 5(A) el grupo Alozano exhibe glucosas por encima de 400 mg/dL en el seguimiento a la tolerancia oral a glucosa. Tras la administración de insulina se observa la acción hipoglucemiante de la hormona, la cual presentó una curva característica del manejo del carbohidrato, una pendiente positiva del minuto 0 al 30 y una pendiente negativa del minuto 30 al 90, sin embargo, debido a la naturaleza de la insulina, no se alcanzan valores similares al control intacto. En relación a la insulina (Fig. 5B), se puede observar que el grupo Alozano presenta una hipoinsulinemia característica de la DT1, mientras que la administración

exógena de la hormona observó un incremento de la hormona, con diferencia estadísticamente significativa en los minutos 0, 30 y 90 de la curva de insulina.

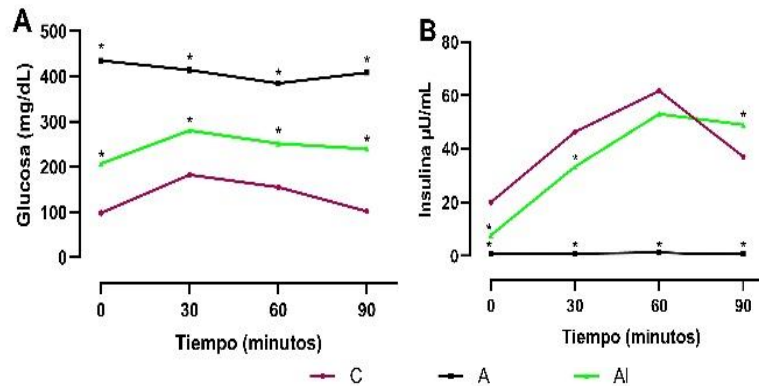


Figura 5. Curva de tolerancia oral a la glucosa y respuesta de insulina. en el grupo AI al término de un mes de tratamiento. A) Curva de tolerancia oral a la glucosa y B) respuesta de insulina. Los resultados se muestran \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis en cada tiempo por ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

La figura 6 muestra la administración de los complejos insulina-decavanadato en todas sus combinaciones, donde se observa una disminución de la glicemia de todas las combinaciones a lo largo de la curva de tolerancia a la glucosa, respecto al grupo Aloxano, sin presentar valores cercanos al grupo control, con excepción de los grupos AID1:9 y AD, sin embargo, si son comparados con el tratamiento de insulina, los tratamientos AID7:3, AID1:9 y AD exhiben un mejor comportamiento como hipoglucemiante. Con respecto a la insulina, los valores de todos los tratamientos de insulina-decavanadato muestran diferencias respecto al grupo control, los tratamientos con un contenido mayor de insulina exhiben concentraciones séricas de la hormona más elevadas a lo largo de la curva, sin embargo, no se observó un estado euglicémico adecuado. Por lo que, los tratamientos con la combinación insulina-decavanadato con mejores resultados corresponden a AID3:7, AID1:9 y AD.

La figura 7 muestra el comportamiento de glucosa en respuesta a la TOG, en la que se analizó el resultado de la administración de la combinación insulina-vanadato. Dichas combinaciones presentan diferente grado hipoglucemiante, y por lo tanto, diferencias significativas respecto al grupo control. De manera interesante, las

combinaciones insulina-vanadato mostraron mejoras en sobre la pendiente positiva (tejidos no dependientes de insulina), pero no para la pendiente negativa. Sin embargo, el grupo AV (ausente de insulina) demostró los mejores resultados hipoglucemiantes en tiempos cortos (90 min), incluso con lo observado para insulina en la figura 5.

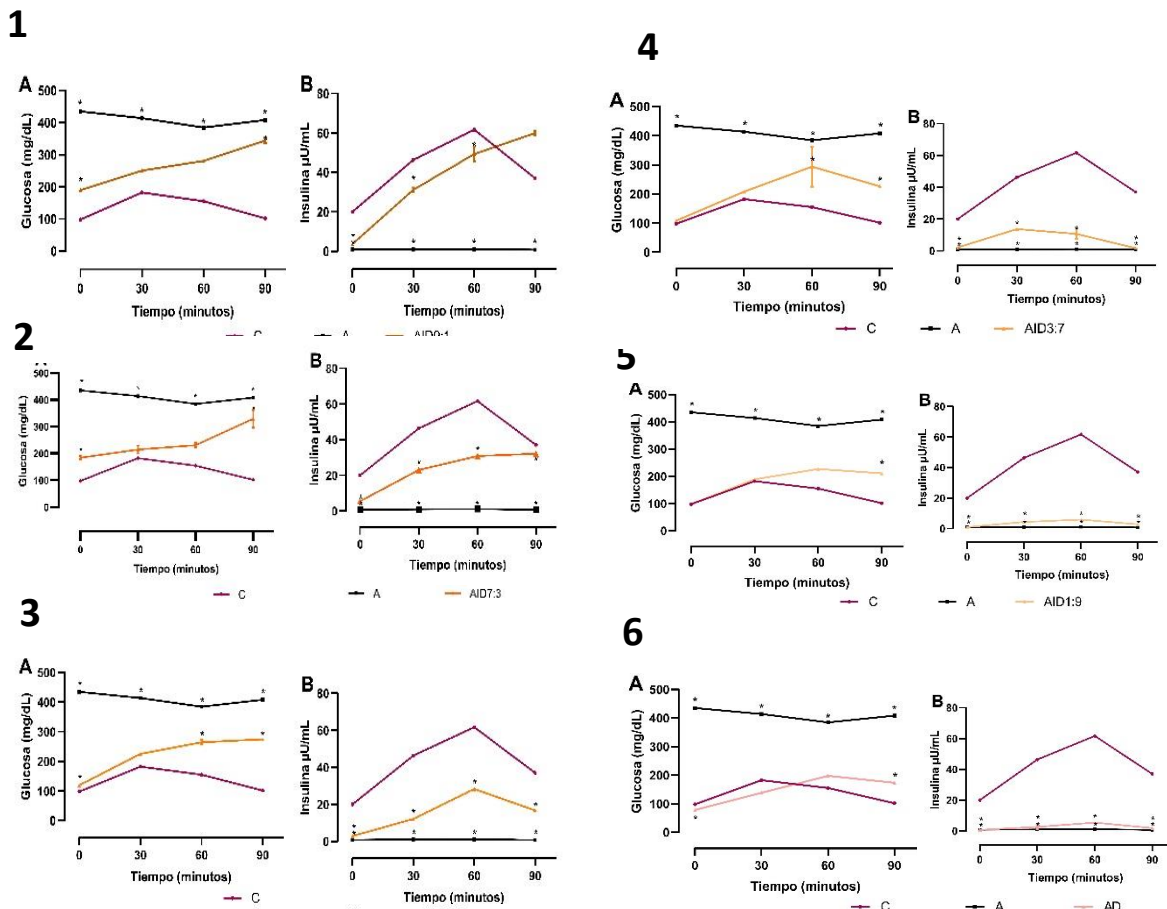


Figura 6. Curva de tolerancia oral a la glucosa y respuesta de insulina en los grupos AID9:1 (1), AID7:3 (2), AID5:5 (3), AID3:7 (4), AID1:9 (5) y AD (6) al término de un mes de tratamiento. A) Curva de tolerancia oral a la glucosa y B) respuesta de insulina. Los resultados se muestran \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

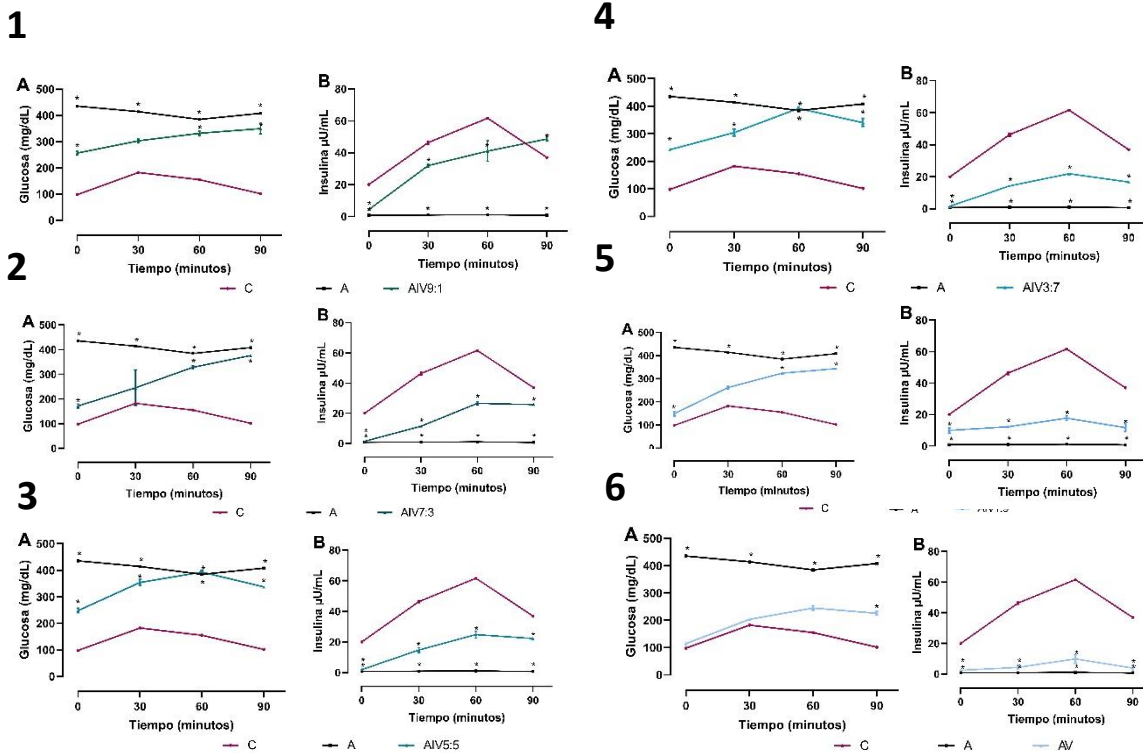


Figura 7. Curva de tolerancia oral a la glucosa y respuesta de insulina en los grupos AIV9:1 (1), AIV7:3 (2), AIV5:5 (3), AIV3:7 (4), AIV1:9 (5) y AV (6) al término de un mes de tratamiento. A) Curva de tolerancia oral a la glucosa y B) respuesta de insulina. Los resultados se muestran \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

8.5 Efecto de la administración de Insulina combinada con vanadio sobre fructosamina.

Toda vez que fue evaluada la respuesta hipoglucemiante en periodos cortos, se procedió a evaluar el control glicémico en periodos largos, días y semanas. Esta valoración puede realizarse de manera indirecta por medio de glicaciones características de estados hiperglicémicos, como lo es la HbA1c y la fructosamina. Debido a que el tratamiento fue por un mes existen limitantes técnicas para realizar HbA1c, por lo que se decidió evaluar niveles de glicación por medio de la fructosamina. La figura 8 muestra la media de los valores de fructosamina correspondiente a cada grupo de tratamiento de insulina-decavanadato. El valor de fructosamina en el grupo de Aloxano se ve aumentado notablemente con diferencias significativas respecto al grupo control, así mismo para el tratamiento de insulina que solo disminuyo un 17% respecto al grupo Aloxano. El tratamiento con las combinaciones AI, AID9:1, AID7:3, AID5:5 mostraron una disminución en los valores

de fructosamina con diferencia significativa respecto al grupo control. El tratamiento que mostro la mejor regulación sobre la glicación de proteínas en el tiempo de análisis correspondió a la combinación AID1:9.

Los valores de fructosamina de los tratamientos de insulina-vanadato se muestran en la figura 9. Se logró observar una reducción de los niveles de fructosamina en los tratamientos AIV9:1, AIV7:3, AIV5:5, AIV3:7. La combinación AIV3:7 logró regular de mejor manera la glicación de proteínas. Los valores de fructosamina de los tratamientos de insulina-vanadato se observan en la figura 9 donde se muestra una reducción de los niveles de fructosamina en los tratamientos AIV9:1, AIV7:3, AIV5:5, AIV3:7, embargo en los grupos AIV1:9 y AV no mostraron un comportamiento de regulación negativa para la glicación de proteínas. Por lo que para este punto en específico el tratamiento que logro regular de mejor manera la glicación de proteínas es el AIV3:7.

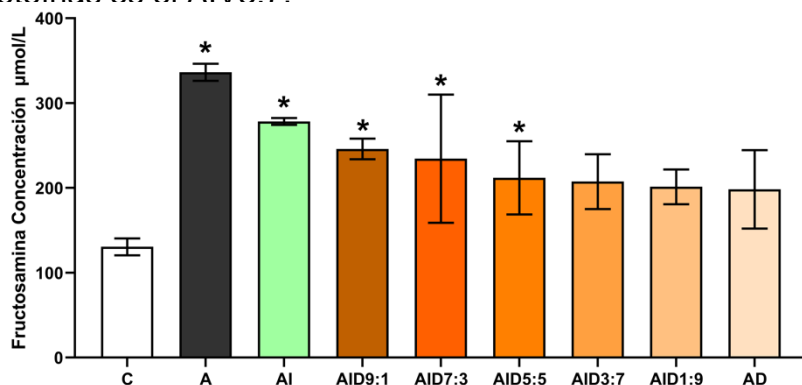


Figura 8. Concentración de fructosamina en suero al término de un mes de tratamiento de insulina combinada con decavanadato. Los resultados que se muestran son determinación de fructosamina en suero correspondiente a cada combinación de tratamiento. Los resultados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

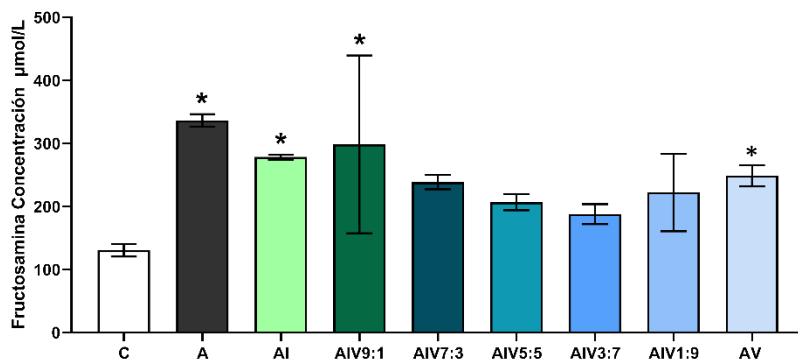


Figura 9. Concentración de fructosamina en suero al término de un mes de tratamiento de insulina combinada con avanadato. Los resultados que se muestran son determinación de fructosamina en suero correspondiente a cada combinación de tratamiento. Los resultados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

8.6 Evaluación de glucógeno en tejidos.

La homeostasis de la glucosa está asociada a la capacidad de captar el carbohidrato por tejidos, estos como se ha mencionado se dividen en dependientes e independientes de insulina para la recaptura del carbohidrato. Sin embargo, todos los tejidos dependen de insulina en cuanto a la señalización que coordina la síntesis de glucógeno. Aunque la señalización no fue valorada en el presente trabajo, se cuantificó la cantidad de glucógeno presente en diferentes tejidos (hígado, músculo, corazón y riñón). La figura 10 muestra la cantidad de glucógeno por cada 100 mg de hígado (A), músculo (B), corazón (C) y riñón (D, E). En hígado (Fig. 10A), la cantidad de glucógeno del grupo Aloxano disminuyó en un 89% respecto al grupo control. El tratamiento con insulina recuperó ligeramente la concentración, pero sin llegar a los valores del grupo control. El tratamiento de la combinación insulina-decavanadato mostró una mejor recuperación de la concentración de glucógeno, la combinación con mejor resultado fue AID1:9. El músculo (Fig. 10B), el glucógeno en el grupo Aloxano disminuyó un 68%, el tratamiento con insulina como su combinación con decavanadato no mostraron un comportamiento favorable. En corazón (Fig. 10C), el glucógeno disminuyó un 81% en el grupo Aloxano; ningún tratamiento llegó a los niveles del control, sin embargo, el tratamiento con insulina-decavanadato observó un mejoría en relación a insulina, para este caso fueron las combinaciones AID9:1 hasta AID5:5. Por último, se evaluó la cantidad de glucógeno en médula (10 E) y corteza renal (10 D), en las cuales el glucógeno disminuyó en el grupo Aloxano disminuyó un 62% y 74%, respectivamente. El tratamiento con insulina no mostró mejora, sin embargo, el tratamiento de insulina-decavanadato observó una mejor recuperación de la concentración del carbohidrato, sin llegar a valores del grupo control, en este sentido, el tratamiento AID3:7 reveló la mayor

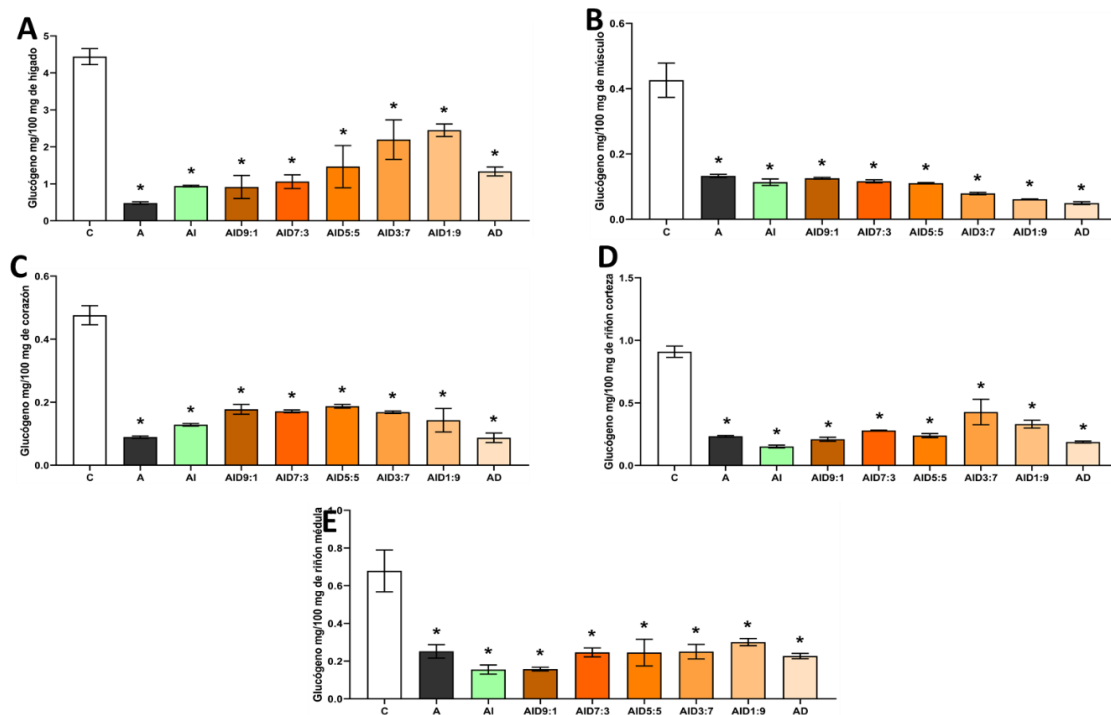


Figura 10. Concentración de glucógeno en diferentes tejidos. Los resultados que se muestran son determinación de glucógeno en (A) hígado, (B) músculo, (C) corazón, (D) corteza y (E) médula de riñón al término de un mes de tratamiento de insulina combinada con decavanadato en la composición correspondiente a cada grupo. Los resultados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

recuperación de glucógeno en riñón corteza; mientras que en médula los mejores resultado se observaron en las combinaciones de la AID7:3 hasta AID1:9.

Además en la figura 11 se muestra la cantidad de glucógeno en tejidos de animales tratados con la combinación insulina-vanadato. En hígado (Fig. 11A), todos los tratamientos mostraron una recuperación de glucógeno respecto al grupo Aloxano. La administración única de insulina fue la de menor recuperación, mientras que las combinaciones con vanadato recuperaron de mejor manera la cantidad de glucógeno, sobresaliendo la combinación AIV3:7. En músculo (Fig. 11B), las combinaciones de insulina-vanadato no mostraron mejoría en el parámetro. En corazón (Fig. 11C), combinaciones desde AIV7:3 hasta AIV3:7 mostraron mejores resultados inclusive que insulina, pero no al nivel del grupo control. La cantidad de glucógeno en médula y corteza renal mejoró notablemente en con las combinaciones de insulina-vanadato AIV7:3 hasta AIV1:9 mostraron una recuperación respecto al grupo aloxano y al tratamiento de insulina, sin llegar a

valores del grupo control y mostrando diferencias significativas respecto a este, en este sentido, el tratamiento AIV5:5 mostró la mayor recuperación de glucógeno en riñón corteza. Para el caso de médula de riñón, los tratamientos de insulina-vanadato mostraron una ligera recuperación de glucógeno, unos más que otros, como el tratamiento AIV7:3, AIV3:7 y AIV1:9 que mostraron mejor recuperación que los tratamientos AIV9:1, AIV5:5 y AV, sin embargo, a pesar de recuperar mejor los niveles de glucógeno respecto al tratamiento de insulina no los recuperaron a niveles del grupo control, mostrando diferencia significativa respecto a este, a pesar de ello, el tratamiento con mejor recuperación de glucógeno para este caso fue el AIV3:7.

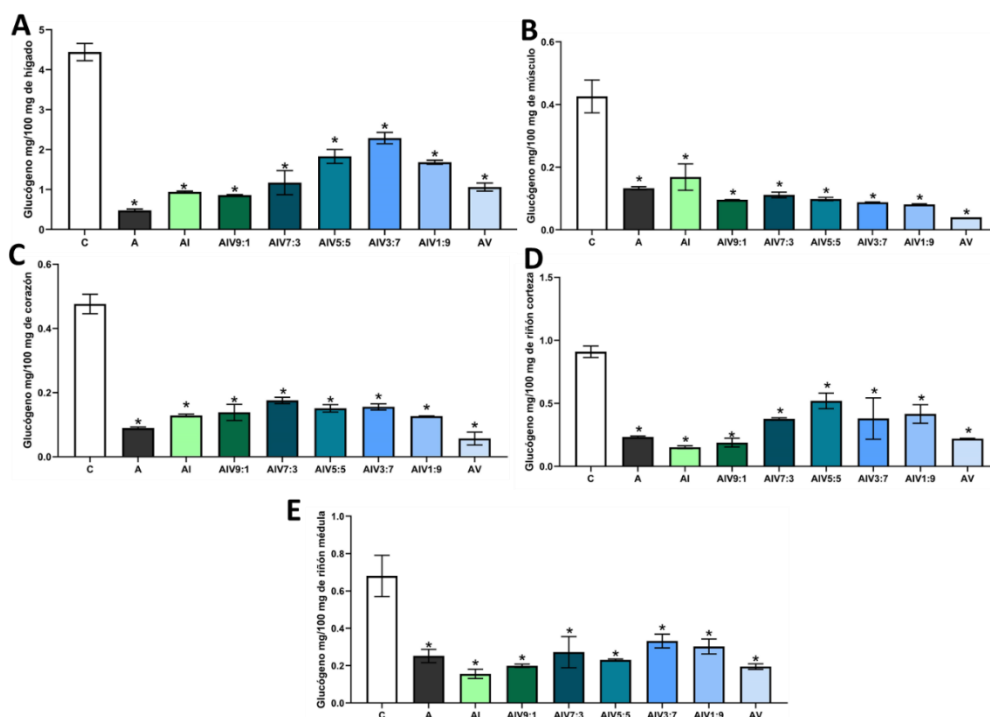


Figura 11. Concentración de glucógeno en diferentes tejidos. Los resultados que se muestran son determinación de glucógeno en (A) hígado, (B) músculo, (C) corazón, (D) corteza y (E) médula de riñón al término de un mes de tratamiento de insulina combinada con vanadato en la composición correspondiente a cada grupo. Los resultados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

8.7 Evaluación de perfil lipídico.

Una de las consecuencias naturales de la hiperglicemia es la dislipidemia. En la tabla 7 se muestra el perfil lipídico sérico después de 1 mes de tratamiento. El grupo

Aloxano muestra una descompensación en el manejo de lípidos con incremento en colesterol total (35%) y VLDL-col (121%) con diferencias estadísticamente significativa respecto al grupo control asociada a una disminución de triglicéridos (13%). LDL-col y HDL-col no mostraron diferencia significativa. El tratamiento con insulina mostró un incremento de colesterol total (13%), triglicéridos (234%), HDL-col (14%) y VLDL-col (64%) con diferencia significativa en los triglicéridos respecto al grupo control. Los tratamientos AID9:1, AID5:5 y AID1:9 no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control. Por otro lado, el tratamiento AID7:3 si mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control en colesterol total y LDL-col con un incremento al 30% y al 121% respectivamente, así mismo, el tratamiento AID3:7 mostro diferencias significativas solo el LDL-col con un incremento del 96% respecto al grupo control. Finalmente, el grupo AD mostró diferencia estadísticamente significativa con un incremento en colesterol total (35%) y LDL-col (130%) respecto al grupo control. Resultando en una mejor regulación para este caso los tratamientos AID3:7 y AID1:9.

Así mismo, la tabla 8 muestra el perfil lipídico en suero después de 1 mes de tratamiento. El tratamiento AIV9:1 sólo mostró diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control en VLDL-col con una disminución del 68% respecto a grupo control. Por otro lado, el tratamiento AIV7:3 mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control en LDL-col y VLDL-col con un incremento al 98% y una disminución al 68%, respectivamente. El tratamiento AIV5:5 no observó diferencias significativas respecto al grupo control. Por otro lado, el tratamiento AIV3:7 evidenció diferencias significativas sólo en VLDL-col con una disminución al 61% respecto al grupo control. Por otro lado, el grupo AIV1:9 presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control en el colesterol total, disminuyendo un 35%. Finalmente, el grupo AV mostró diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control con una disminución en VLDL-col con un 75%, en este sentido el tratamiento que mejor reguló la concentración de los diferentes parámetro evaluados, fue el grupo AIV5:5 que si bien no alcanzó valores del grupo control, regula mejor que los otros tratamientos de insulina-vanadato.

Tabla 7. Perfil lipídico de los tratamientos de insulina combinada con decavanadato. . Los resultados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

Grupo	C	A	AI	AID9:1	AID7:3	AID5:5	AID3:7	AID1:9	AD
Colesterol Total	110.1 \pm 17.8	149.2 \pm 4.9 *	124.6 \pm 22.02	132.6 \pm 8.4	144 \pm 9.5 *	112 \pm 8.6	127 \pm 13.5	97.5 \pm 1.9	149 \pm 9 *
Triglicéridos	65.3 \pm 7.0	56.8 \pm 3	219 \pm 40 *	97.0 \pm 6	108 \pm 24	67 \pm 13.5	57.0 \pm 20	61 \pm 7	128 \pm 33.5
HDL	64 \pm 6.1	74.9 \pm 2.9	73.3 \pm 11.5	69 \pm 6.5	65 \pm 11	67 \pm 1.5	57 \pm 2.5	61 \pm 6.7	66 \pm 3
LDL	33.9 \pm 16.8	53.2 \pm 6.45	35.6 \pm 19.15	44.6 \pm 4	75 \pm 9 *	42 \pm 6.5	67 \pm 14.5 *	39 \pm 5.5	78 \pm 8 *
VLDL	9.5 \pm 3.1	21.1 \pm 0.2*	15.7 \pm 4.0	19 \pm 10.5	8.3 \pm 4.5	4.8 \pm 3.8	5.2 \pm 1.35	3.7 \pm 1.0	5.3 \pm 1.5

Tabla 8. Perfil lipídico de los tratamientos de insulina combinada con vanadato. Los resultados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

Grupo	C	A	AI	AIV9:1	AIV7:3	AIV5:5	AIV3:7	AIV1:9	AV
Colesterol Total	110.1 \pm 17.8	149.2 \pm 4.9 *	124.6 \pm 22.02	101 \pm 6.74	133.75 \pm 9.31	112.42 \pm 1.272	101.18 \pm 16.4	71.55 \pm 8.67 *	98.34 \pm 11.81
Triglicéridos	65.3 \pm 7	56.8 \pm 3	219 \pm 40 *	102 \pm 34.5	74.33 \pm 23	62 \pm 2.0	135.7 \pm 74	71.25 \pm 34	96 \pm 42
HDL	64 \pm 6.1	74.9 \pm 2.9	73.3 \pm 11.5	60.67 \pm 5.5	63.33 \pm 1.5	55.33 \pm 3.5	57.33 \pm 3.0	54.34 \pm 5.8	67.1 \pm 3.87
LDL	33.9 \pm 16.8	53.2 \pm 6.45	35.6 \pm 19.15	38.03 \pm 3.24	67.41 \pm 10.31 *	51.09 \pm 8.5	40.18 \pm 18.5	23.69 \pm 3.57	27.3 \pm 9.3
VLDL	9.5 \pm 3.1	21.1 \pm 0.2 *	15.7 \pm 4.0	3.0 \pm 1.0 *	3.0 \pm 0.75 *	6.0 \pm 1.0	3.66 \pm 1.0 *	9.90 \pm 1.58	3.86 \pm 0.86 *

8.8 Evaluación de triglicéridos en tejidos.

Finalmente, el manejo de los lípidos involucra fuertemente la actividad de insulina y su ruta de señalización, por lo que su desregulación termina por alterar el resguardo en tejidos no adecuados para ello. Por lo que el resguardo de triglicéridos fue evaluado en hígado, músculo, corazón y riñón. La figura 12 muestra la cantidad de triglicéridos por cada 100 mg de hígado (A), músculo (B), corazón (C) y riñón (D, E) en los tratamientos de insulina-decavanadato. La cantidad de triglicéridos en hígado del grupo aloxano disminuye un 21% y el tratamiento con insulina y con la combinación AID9:1 regresan la concentración de triglicéridos al nivel del grupo control. En contraste con los grupos AID3:7, AID1:9 y AD mantienen valores cercanos al grupo Aloxano. En músculo, el grupo Aloxano mostró una disminución del 43% y ningún tratamiento alcanzó los valores del control. En corazón el grupo Aloxano disminuyó un 37% las concentraciones de triglicéridos, y de manera contrastante con el músculo, el tratamiento de insulina y las combinaciones desde

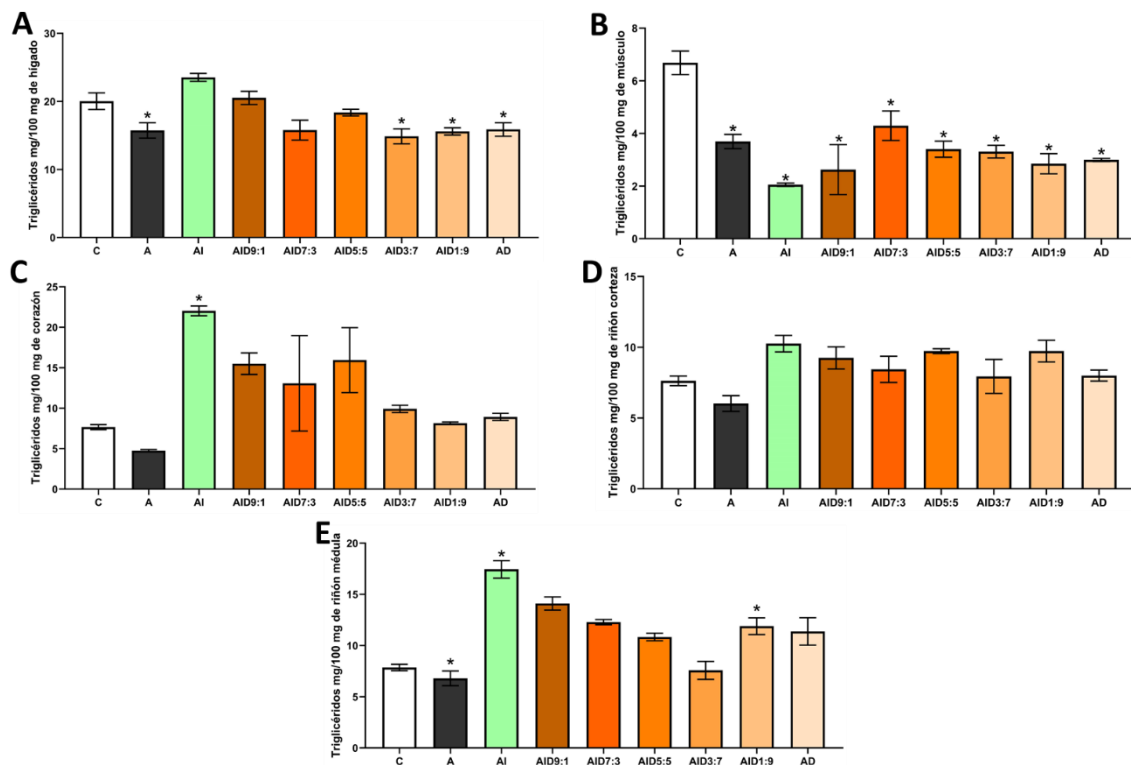


Figura 12. Concentración de triglicéridos en diferentes tejidos. Los resultados que se muestran son determinación de triglicéridos en (A) hígado, (B) músculo, (C) corazón, (D) corteza y (E) médula de riñón al término de un mes de tratamiento de insulina combinada con decavanadato en la composición correspondiente a cada grupo. Los resultados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

AID9:1 hasta AID5:5 sobrepasaron al control (187%, 102%, 70% y 108%); mientras que las combinaciones AID3:7, AID1:9 y AD se mantuvieron en niveles similares al grupo control. En corteza y médula renal el tratamiento con insulina y las combinaciones con decavanadato incrementaron la concentración de triglicéridos, observando la mayor esteatosis en médula renal.

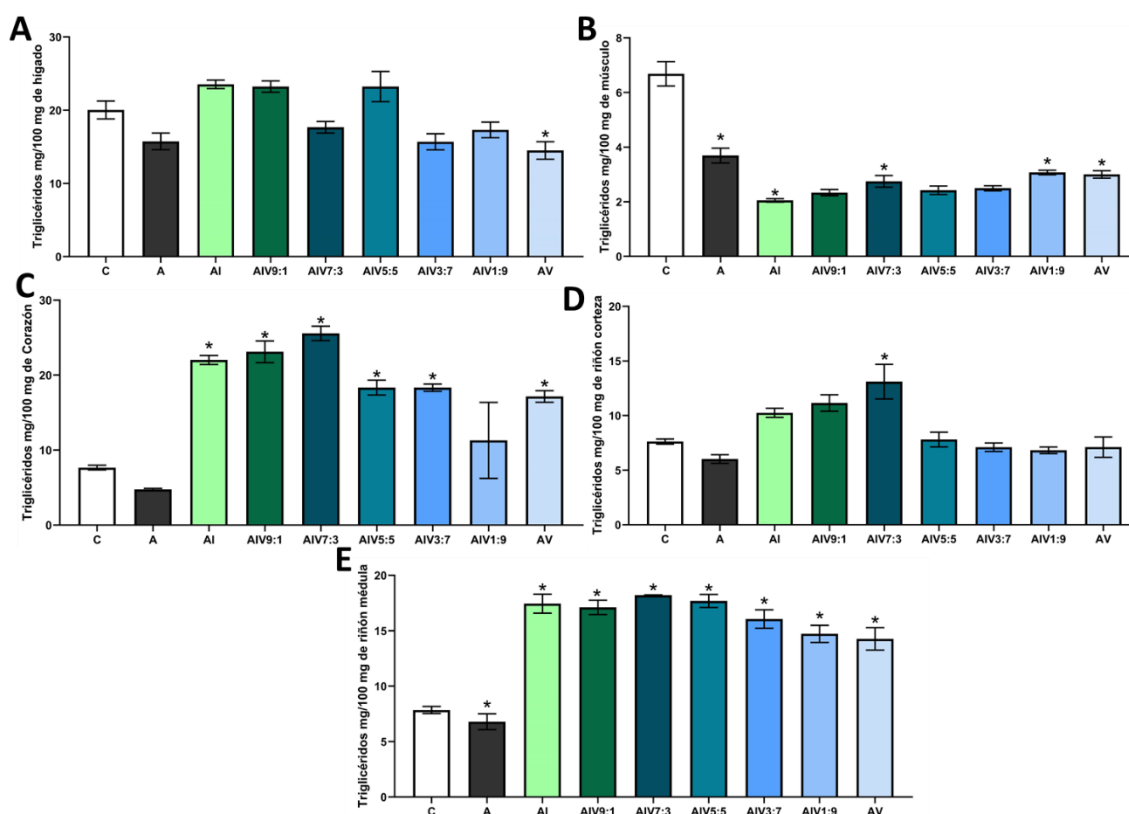


Figura 13. Concentración de triglicéridos en diferentes tejidos. Los resultados que se muestran son determinación de triglicéridos en (A) hígado, (B) músculo, (C) corazón, (D) corteza y (E) médula de riñón al término de un mes de tratamiento de insulina combinada con vanadato en la composición correspondiente a cada grupo. Los resultados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

La figura 13 muestra los tratamientos de insulina-vanadato. En hígado (Fig. 13A), los tratamientos AIV9:1 al AIV5:5 muestran similitud con el grupo control, en contraste con los tratamientos AIV3:7, AIV1:9 y AV no mejoran los niveles de triglicéridos respecto al grupo Aloxano. En músculo (Fig. 13B), los tratamientos no mejora el contenido de triglicéridos. En corazón (Fig. 13C), todos los grupos mostraron un incremento de triglicéridos con diferencias significativas respecto al

grupo control, con excepción del grupo AIV1:9, que no observó diferencias, por lo que es el mejor tratamiento para este tejido. Asimismo, se evaluó la concentración de triglicéridos en corteza de riñón, donde los tratamientos AIV9:1 y AIV7:3 demostraron un incremento respecto al grupo control además de presentar diferencias significativas. En contraste, los tratamientos AIV5:5, AIV3:7, AIV1:9 y AV no observaron diferencias respecto al grupo control y que además se presentan como la mejor opción de tratamiento para este caso. Finalmente, se evaluó la concentración de triglicéridos en médula renal, en la que se observó que todos los tratamientos favorecen el resguardo de triglicéridos, mostrando diferencias respecto al grupo control, lo cual nos demuestra que en esta caso ningún tratamiento es adecuado.

8.9 Evaluación el efecto toxicológico hepático-renal en la administración del complejo y sal de vanadio.

Tabla 9. Evaluación de marcadores de daño renal y hepático en los tratamientos de insulina combinada con decavanadato.

Grupo	C	A	AI	AID9:1	AID7:3	AID5:5	AID3:7	AID1:9	AD
Urea	48.6 ± 9.0	104 ± 5.5 *	116 ± 3.0 *	43 ± 12.5	58 ± 19.5	48 ± 6.0	56.3 ± 17.5	86.3 ± 35 *	57.3 ± 14
Creatinina	0.73 ± 0.12	1.12 ± 0.02 *	0.82 ± 0.18	0.74 ± 0.13	0.79 ± 0.16	0.8 ± 0.06	0.77 ± 0.07	0.87 ± 0.17	0.94 ± 0.1
Sodio	148 ± 1.0	131.7 ± 2.0*	150 ± 2.0	150.7 ± 2.0	149.4 ± 2.85	147.8 ± 1.5	145.8 ± 3.0	150.5 ± 5.15	148 ± 1.0
Potasio	5.7 ± 0.15	4.8 ± 0.35 *	5.14 ± 0.27	5.4 ± 0.43	5.45 ± 0.26	5.68 ± 0.1	5.63 ± 0.1	5.81 ± 0.88	5.53 ± 0.1
AST	172 ± 18	393 ± 14.5 *	143 ± 4.5	159 ± 18	183 ± 36	207 ± 15	230 ± 99.5	157 ± 33	213 ± 48.5
ALT	70.2 ± 9.5	98.7 ± 6.0	96 ± 12	79.3 ± 13	101 ± 16.5	90.3 ± 15.5	89.5 ± 35	75.3 ± 7.0	85.7 ± 15
ALP	328 ± 85	747 ± 94.5 *	549 ± 101	373.3 ± 109	684 ± 64 *	585 ± 306	322 ± 191	457 ± 179	441 ± 197
Bilirrubina	0.416 ± 0.2	1.02 ± 0.155 *	0.48 ± 0.13	0.50 ± 0.135	0.70 ± 0.115	0.28 ± 0.26	0.20 ± 0.025	0.41 ± 0.08	0.19 ± 0.09

Los resultados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

La tabla 9 muestra la evaluación de urea, creatinina, sodio, potasio, AST, ALT, ALP y bilirrubinas al término de un mes de tratamiento de cada grupo de insulina-decavanadato, así como del grupo control, Aloxano y AI. El grupo Aloxano exhibe una diferencia significativa respecto al grupo control con un incremento en urea (113%), creatinina (53%), AST (128%), ALT (40%), ALP (114%) y bilirrubina (145%), así como una disminución de sodio (11%) y potasio (15%). El tratamiento con

insulina (AI) exhibe un incremento de urea (179%), creatinina (12%), sodio (1.35%), ALT (36%), ALP (57%) y bilirrubina (16%) así como una disminución de potasio (9%) y AST (16%) respecto a grupo control. Los tratamientos de insulina-decavanadato, no mostraron diferencias significativas de los analitos, respecto al grupo control, con excepción de ALP en el grupo AID7:3 que mostró un incremento al 146%, por lo que todos los grupos se muestra seguros al restablecer los principales parámetros indicativos de falla renal y hepática.

Tabla 10. Evaluación de marcadores de daño renal y hepático en los tratamientos de insulina combinada con vanadato.

Grupo	C	A	AI	AIV9:1	AIV7:3	AIV5:5	AIV3:7	AIV1:9	AV
Urea	48.6 ± 9.0	104 ± 5.5 *	102.7 ± 22.5 *	41 ± 17.5	29.67 ± 1.5	42.67 ± 15	53 ± 21.5	78 ± 14	44.3 ± 19.5
Creatinina	0.73 ± 0.12	1.12 ± 0.02 *	0.82 ± 0.18	0.79 ± 0.08	0.74 ± 0.12	0.83 ± 0.1	0.78 ± 0.16	0.78 ± 0.14	0.78 ± 0.1
Sodio	148 ± 1.0	131.7 ± 2.0 *	150 ± 2.0	148 ± 1.0	149 ± 1.0	149 ± 1.0	148.6 ± 1.0	149.075 ± 1.5	148 ± 1.5
Potasio	5.7 ± 0.15	4.8 ± 0.35 *	5.14 ± 0.27	5.73 ± 0.05	5.66 ± 0.1	5.51 ± 0.35	5.8 ± 0.1	5.71 ± 0.77	5.49 ± 0.31
AST	172 ± 18	393 ± 14.5 *	143 ± 4.5	154 ± 31	152.3 ± 6.0	194.3 ± 5.5	295.7 ± 99 *	189.3 ± 45	204 ± 31
ALT	70.2 ± 9.5	98.7 ± 6.0	96 ± 12	105.3 ± 3.0	77.67 ± 5.5	83 ± 3.0	176.7 ± 71.5 *	85.5 ± 58	114 ± 51
ALP	348 ± 113	747 ± 94.5 *	549 ± 101	412 ± 80.5	370 ± 18	581.3 ± 296.5	408 ± 35	477.8 ± 29	566 ± 206
Bilirrubina	0.416 ± 0.2	1.02 ± 0.155 *	0.48 ± 0.13	0.38 ± 0.19	0.22 ± 0.075	0.38 ± 0.095	0.66 ± 0.20	0.43 ± 0.035	0.21 ± 0.05

Los resultados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control $p \leq 0.05$ por un análisis de ANOVA con una prueba post hoc Bonferroni.

La tabla 10 muestra también la evaluación de urea, creatinina, sodio, potasio, AST, ALT, ALP y bilirrubinas al término de un mes de tratamiento de los tratamientos de insulina-vanadato, los tratamientos todos los grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control, con excepción del tratamiento AIV3:7, el cual presentó diferencia significativa sólo en AST y ALT con un incremento al 171% y 251%, respectivamente, por lo que todos los tratamientos con excepción del antes mencionado se muestran seguros al restablecer los principales parámetros indicativos de falla renal y hepática.

9.DISCUSIÓN

La diabetes impone unos costes humanos, sociales y económicos inaceptablemente altos en todos los países, sea cual sea su nivel de ingresos. Las personas con diabetes tipo 1 necesitan para su supervivencia un suministro ininterrumpido de insulina de alta calidad, tanto análogos de acción rápida regular como de acción prolongada o insulina isofánica, ya que los que actualmente se han desarrollado recientemente son más costosos y sólo disponibles en países desarrollados económicamente (Han et al., 2017)

El estudio de nuevos candidatos para la farmacoterapia se basa en modelos animales o celulares. El modelo de inducción de hiperglicemia más usado o reportado en la literatura es el de estreptozotocina. El cual es una indicción química que daña a los islotes de Langerhans de manera dosis y tiempo dependiente. Su mecanismo de acción es la generación de ROS y la alquilación del ADN en las células β del páncreas. Sin embargo, se ha documentado que también causa daño en diferentes tejidos, produciendo cambios estructurales y metabólicos, complicando así la evaluación de estrategias terapéuticas (Furman, 2015). Mientras que, el Aloxano y su producto de reducción, el ácido dialúrico establecen un ciclo redox con la formación de radicales superóxido, el cual ha mostrado ser un tanto más selectivo sobre el tejido pancreático. Los radicales generados sufren dismutación a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Después de eso se forman radicales hidroxilos altamente reactivos mediante la reacción Fenton. La acción de las ROS simultáneamente con el incremento masivo de concentraciones de calcio citosólico causa rápidamente la destrucción de las células β del páncreas y podría también alterar - aunque en menor grado - a las células de diferentes tejidos, sin embargo, las defensas antioxidantes previenen severos daños por lo que es más adecuado para estudiar estrategias terapéuticas sobre DT1 (Ighodaro, Adeosun, & Akinloye, 2017)

Múltiples estudios para evaluar el efecto hipoglicemiante de nuevas terapias farmacológicas se basan en la inducción de la hiperglicemia por aloxano (Abdullah, Abul Qais, Hasan, & Naseem, 2019; Elangovan et al., 2019). Como consecuencia a los estados de hiperglicemia, se sabe que niveles altos de glucosa en la sangre pueden provocar complicaciones graves, como infecciones, sepsis, insuficiencia

renal e insuficiencia respiratoria (Martínez, Pauls, Cabrera, Granell, & Piqueres, 2017), además de que una hiperglucemia crónica y la presencia de factores de riesgo vascular como Hipertensión, así como las complicaciones microvasculares y macrovasculares se asocian con un mayor riesgo de desarrollar disfunción cognitiva (Kim, 2019), así mismo, en pacientes diabéticos se ha demostrado una relación directa entre los altos valores de glicemia en ayunas y la incidencia de infarto, accidente cerebrovascular y mortalidad cardiovascular (Curós Abadal & Flores, 2008). En este sentido existe un amplio panel farmacológico que ayuda en la prevención de dichas complicaciones, para el caso de DT1, el tratamiento de primera elección es con insulina, debido a la ausencia de esta hormona, sin embargo se ha demostrado que en adolescentes y adultos con DT1 se ha reducido la sensibilidad a la insulina exógena después de tiempo de administración, lo cual se cree que contribuye tanto a la iniciación como a la progresión de complicaciones macro y microvasculares (Bowden et al., 2015). Dadas todas las consecuencias originadas por la hiperglucemia, lo que se busca es reducir la dosis de administración de insulina, en este sentido se ha mostrado evidencia de que complejos a partir de las sales de vanadio exhiben actividad hipoglicemiante tanto en humanos como en animales murinos, donde la dosis de NOAEL observada para animales ha sido de 0.2mg de vanadio/kg/día (Levina & Lay, 2011; Treviño et al., 2018). Para ello en el presente trabajo se evaluó la actividad hipoglicemiante de los tratamientos insulina-decavanadato e insulina-vanadato, donde ambas combinaciones mostraron ser agentes hipoglicemiantes, sin embargo la glucosa no solo requiere de una regulación en ayuno si no en el postprandio, para lo cual se realizó una curva de tolerancia oral a la glucosa, los resultados muestran que hay una hiperglicemia sostenida cuando las concentraciones de insulina incrementan, y una disminución cuando las concentraciones de vanadio aumentan para ambos casos (insulina-decavanadato e insulina-vanadato) tomando en cuenta que la mayor concentración de vanadio administrado fue de 2 μ /UI (Tabla 6), la glucosa en la curva de tolerancia, tiene un manejo en una primera fase no insulino-dependiente por parte de hígado y en segunda fase insulino-dependiente por músculo y tejido adiposo (Wilcox, 2005), las concentraciones de insulina en la

segunda fase de la curva mostraron regulaciones positivas para los tratamientos con mayor concentración de vanadio, y una regulación negativa para los de mayor concentración de insulina, los resultados sugieren que las combinaciones de decavanadato integran en mejor medida la glucosa, agotando más rápido las concentraciones de insulina que en los grupos de insulina-vanadato, siendo los tratamientos con mejor regulación, AID3:7, AID1:9, AIV1:9 y AV. Lo anterior sugiere que el vanadio ejerce un efecto sensibilizador o de sinergia a la insulina, apoyando varios estudios que sugieren que el vanadio aumenta la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina, actuando, así como un agente sensibilizador de la insulina (Crans, 2015). Confirmando lo que se ha demostrado en humanos, donde la administración diaria de vanadio en sujetos diabéticos reduce los niveles de glucosa en ayuno, así como el porcentaje de hemoglobina glucosilada teniendo mejores respuestas en las pruebas de tolerancia oral a la glucosa (Thompson et al., 2009). Aunado a los estudios realizados en animales donde la administración de vanadio muestra una disminución de los niveles de glucosa y hemoglobina glucosilada, en ratones hiperglucémicos inducidos con aloxano (Cui, Han, Qu, & Lv, 2009; Elangovan et al., 2019; Sidorova, Skalnaya, Tinkov, & Mazo, 2019).

Por otro lado, la hiperglucemia tiene un papel importante en la patogénesis de las complicaciones diabéticas al aumentar la glucosilación de proteínas y la acumulación gradual de productos finales de glucosilación avanzada (AGE) en los tejidos del cuerpo. Estos AGE se forman en proteínas intra y extracelulares, lípidos, ácidos nucleicos y poseen estructuras complejas que generan fluorescencia y reticulación de proteínas. La glicación de proteínas y la AGE están acompañadas por una mayor actividad de radicales libres que contribuye al daño biomolecular en la diabetes. La reacción química inicial denominada «glicación temprana» ocurre entre azúcares reductores o sus productos derivados y los grupos amino en proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. Los compuestos originados en esta reacción reversible son inestables y se denominan bases de Schiff³. Posteriormente se someten a un reordenamiento estructural para formar productos de Amadori, siendo los más conocidos la hemoglobina glucosilada y la fructosamina (Ahmed, 2005). En pacientes se ha demostrado que un incremento en la concentración de hemoglobina

glucosilada es considerada un factor de riesgo significativo para enfermedades cardiovasculares y derrames cerebrales, además de estar asociada con el riesgo de mortalidad (Sherwani, Khan, Ekhzaimy, Masood, & Sakharkar, 2016). En humanos la fructosamina también puede reflejar el estado de la glucosa en sangre más rápidamente (2-3 semanas) que la hemoglobina glucosada (2-3 meses) (Zheng, Ma, Wu, & Lu, 2012). Como se mencionó, la fructosamina es un reflejo de este tipo de elementos glicosados a partir de una hiperglicemia crónica, efecto que puede observarse en los resultados obtenidos, donde el grupo aloxano exhibe un incremento de fructosamina respecto al grupo control, los tratamientos de insulina, vanadio y sus combinaciones redujeron los niveles de fructosamina mostrándose como mejores reguladores de fructosamina los grupos AID3:7 y AIV3:7. Lo que apoya la evidencia de que la administración de metformina-decavanadato 2 veces a la semana disminuyó casi a niveles del grupo control los valores de hemoglobina glucosilada (Treviño et al., 2016).

Así mismo, se sabe que la diabetes se caracteriza por estados de hiperglucemia crónica y dislipidemia, dos concomitantes debilitantes de la diabetes que desempeñan un papel clave en la creación de los trastornos secundarios, como las complicaciones macro y microvasculares. El Framingham Heart Study encontró que la dislipidemia era muy común en adultos con diabetes, caracterizada por altos niveles de triglicéridos y colesterol total y bajos niveles de HDL-C. Este patrón ocurre comúnmente en la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, reflejando el estado patógeno básico de la insuficiencia de secreción de insulina o la falta de acción efectiva debido a la resistencia a la insulina (Rask-Madsen & Kahn, 2012). En este sentido el grupo aloxano exhibe una desregulación del perfil de lípidos, donde los tratamientos de insulina-decavanadato e insulina-vanadato disminuyen gradualmente siendo la mejor opción de tratamiento los grupos AID3:7, AID1:9 y AIV5:5 lo que apoya estudios realizados al respecto donde la combinación de vanadio con la dieta en animales diabéticos normaliza los niveles de glucosa tiene un efecto beneficioso sobre el metabolismo de los lípidos (Sidorova et al., 2019), esto posiblemente se debe a que múltiples estudios acerca del vanadio sugieren que este favorece la regulación de los trastornos de lípidos en suero puesto que ya se ha demostrado

que la administración de dicho metal en sujetos diabéticos tiene efectos reductores sobre parámetros lipídicos distintos a HDL-col que aumentan con los niveles de triglicéridos, así mismo, se ha demostrado efecto similares en personas expuestas ocupacionalmente al vanadio, se ha sugerido que a activación de la proteína cinasa B es la responsable de dichos efectos del vanadio, a través de la disminución de la fosforilación de la lipasa sensible a las hormonas en el tejidos adiposo (Shah, 2016). Por otro lado, la regulación del equilibrio de nutrientes por el hígado es importante para asegurar el control metabólico total del organismo. La expresión hepática de genes implicados en el metabolismo de los lípidos está estrechamente regulada por glucosa e insulina, los carbohidratos consumidos en cantidades superiores a los requerimientos energéticos del organismo y por encima de la capacidad que tiene el hígado de almacenarlos en forma de glucógeno, han de ser convertidos en ácidos grasos para su almacenaje en forma de triglicéridos, el tejido adiposo blanco es el tejido primario que se encarga de almacenar la grasa. Es importante destacar, que, en hígado, la lipogénesis de novo y la posterior síntesis de triglicéridos, es debida a un elevado consumo de carbohidratos que conduce a un incremento en la síntesis y secreción de partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Wilcox, 2005). En este sentido, al disminuir la concentración de insulina en un modelo DT1 la capacidad de síntesis de triglicéridos a nivel de tejidos, se ve disminuida como lo muestran los resultados, el tratamiento con insulina, favorece esta dinámica de síntesis de triglicéridos, a nivel de hígado, corazón y riñón, lo cual no es muy favorable, dado que aquí se concentran una de las principales complicaciones de la diabetes debido a la acumulación de grasa en los tejidos, como son, hígado y riñón graso, así mismo para corazón a pesar de que la principal obtención de energía es a partir de los lípidos, concentraciones elevadas de estos en ese tejido pueden llevar a problemas cardiacos. Los tratamientos de insulina combinada con vanadio en sus dos especies, reducen gradualmente la concentración de triglicéridos en hígado musculo, corazón y riñón, respecto al tratamiento de insulina, pero en comparación con el grupo control, dichos tratamientos incrementan la concentración en hígado, musculo, corazón y riñón en algunos casos sin mostrar diferencias significativas respecto al grupo control, moatradose como las mejores opciones de tratamiento

los grupos AID:37, AID1:9 y AD lo anterior nos sugiere que si bien el tratamiento con insulina incrementa las concentraciones de triglicéridos en tejidos, el vanadio al administrarse conjuntamente a diferentes concentraciones disminuye la acumulación de estos triglicéridos, y que además en algunos casos sin mostrar diferencias significativas, lo anterior puede deberse a que las vías de señalización asociadas a la síntesis de triglicéridos en tejido, están reguladas por insulina normalmente después de la unión a insulina, el receptor y los sustratos específicos de respuesta a insulina se fosforilan, pero en diabetes existe una respuesta insuficiente de los receptores de insulina a la hormona, y por lo tanto en las cascadas de señalización. La mayoría de los efectos observados con la adición de vanadio a dichos sistemas ocurren a través de la fosforilación de IRS-1, Del mismo modo, un ligar importante para el vanadio intracelular para interactuar con la vía de transducción de señal de insulina es la inhibición de PTP1B, ya que esta fosfatasa regula el proceso de fosforilación entre el receptor de insulina y su sustrato IRS. La inhibición de la actividad de PTP1B aumenta eficazmente la concentración de receptor de insulina fosforilada e IRS-1. La fosforilación correcta de IRS-1 puede fosforilar secundariamente a PI3K y PKB/Akt, una proteína metabólica maestra que activa la biosíntesis de lípidos y glucógeno (Treviño et al., 2018).

La insulina en condiciones normales desencadena una cascada de activación de la fosfoproteína fosfatasa, dicha fosfatasa cataliza la hidrólisis de los grupos fosfato de todas las enzimas implicadas en el metabolismo de glucógeno, obteniendo como resultado la inactivación de la glucogenólisis y la activación de la gluconeogénesis (Arneth, Arneth, & Shams, 2019) en condiciones de ausencia de insulina, como es el modelo DT1 esta síntesis de glucógeno es un proceso que se ve disminuido como lo muestran los resultados en el grupo aloxano. El tratamiento con insulina favorece muy poco la síntesis de glucógeno, lo que nos sugiere que el tratamiento con insulina favorece el metabolismo de glucosa, pero no toda la regulación de las vías de insulina como es el caso de glucógeno. Los tratamientos de insulina combinada con vanadio en sus dos especies mostraron un aumento mínimo de los niveles de glucógeno que corresponden una dinámica oxidativa celular apropiada, que, si bien no logra restablecer los niveles de glucógeno a niveles del grupo control, si favorece

una mayor síntesis de glucógeno en hígado, musculo, corazón y riñón en comparación con el tratamiento de insulina, teniendo una mejor regulación en este sentido los grupos AID1:9 Y AIV3:7. Lo anterior puede deberse a que estudios sugieren que el vanadio puede interferir con las proteínas fosfatasas, como la proteína fosfatasa 1 que activa a la glucógeno sintasa y promueve la síntesis de glucógeno, dado que ya en múltiples estudios en modelos animales, administración de compuestos de vanadio estimularon la síntesis de glucógeno (Islam et al., 2007). Así mismo, en pacientes con diabetes, la enfermedad renal crónica podría tratarse de una autentica nefropatía diabética, debido principalmente a la hipertensión, aunque también podría deberse a una disfunción de la vejiga polineuropatía, al aumento de la incidencia de infecciones urinarias frecuentes o a una angiopatía macrovascular. La hiperglucemia induce la hiperfiltración, un indicador de enfermedad renal progresiva, y algunos cambios morfológicos en los riñones que, en última instancia, provocan lesiones en los podocitos y pérdida de superficie de filtración (Han et al., 2017). Otros indicadores de enfermedad renal son el incremento de urea y creatinina sérica, así como descompensación de sodio y potasio. La evidencia sugiere que la hiperglucemia se asocia con daño renal desde etapas iniciales (Kharroubi & Darwish, 2015).

En el análisis para desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de DM, se deben considerar la contribución de los efectos tanto terapéuticos como tóxicos, se ha sido demostrado que el aloxano causa cambios en la estructura tanto tubular como glomerular lo que implica una pérdida en las funciones. Las ratas diabéticas inducidas por aloxano mostraron aumentos en suero de urea y creatinina, clásicas en el riñón diabético, también como pérdida de sodio y potasio, indicativo de deterioro de la función renal. Los tratamientos de insulina combinada con vanadio en sus dos especies (vanadato y decavanadato) no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control, lo que nos sugiere que, si bien la patología induce una desregulación renal, los tratamientos además de tener efecto hipoglucémico ayudan al restablecimiento de la función renal en modelos DT1.

Así mismo, los cambios provocados por el aloxano en la sangre se han asociado con lesiones morfológicas y ultraestructurales en el hígado que se parecen en gran

medida a la enfermedad hepática crónica en humanos vinculados diabetes. Los cambios en el hígado varían desde la degeneración grasa de las células hepáticas hasta la esteatohepatitis y fibrosis periportal. Se han reportado incrementos de la actividad enzimática en hígado en animales diabéticos inducidos por aloxano, donde ese aumenta los niveles de AST y ALT en las primeras 2 semanas después del tratamiento, pero solo ALT es la que permanece significativamente elevada hasta 26 semanas después de la inducción de diabetes. En este sentido, en nuestros resultados observamos aumento en el grupo aloxano de las transaminasas hepáticas y ALP, así como bilirrubina, que por sus niveles podría interpretarse como una inflamación hepática pero no como un efecto tóxico derivado de la necrosis causado por la administración de aloxano (Treviño et al., 2016), y así mismo una disminución de estas al cabo del mes de tratamiento respecto al grupo aloxano, sin mostrar diferencia significativa respecto al grupo control, por otro lado, si bien el vanadio en cualquiera de sus dos especies y siendo un metal se asumiría que podría inducir toxicidad hepática, los resultados obtenidos muestran lo contrario y dado que las concentraciones administradas en cada uno de los tratamientos de insulina combinada con vanadio, no inducen ninguna alteración enzimática a nivel hepático-renal, se sugiere que además de los efectos atribuidos al metabolismo de carbohidratos y lípidos, los tratamientos de insulina combinada con vanadio restablecen los daños generados por diabetes a nivel hepático y renal.

10. CONCLUSIONES

Los tratamientos de insulina combinada con vanadio se muestran como agentes hipoglicemiantes e hipolipemiantes en un modelo experimental de diabetes tipo 1.

Los tratamientos que mejor regulan el estado en ayuno y posprandial de la glucosa son AID3:7, AID1:9 Y AV3:7.

Los tratamientos de insulina combinada con vanadio recuperan los niveles de glucógeno y triglicéridos en hígado, corazón y riño, mostrándose como las mejores opciones de tratamiento los grupos AID1:9 y AIV 3:7.

Todos los grupos de insulina combinada con se muestran como agentes farmacológicos seguros, al no inducir toxicidad hepato-renal durante el tiempo de administración.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, K. M., Abul Qais, F., Hasan, H., & Naseem, I. (2019). Anti-diabetic study of vitamin B6 on hyperglycaemia induced protein carbonylation, DNA damage and ROS production in alloxan induced diabetic rats. *Toxicology Research*, 8(4), 568–579. <https://doi.org/10.1039/c9tx00089e>
- ADA. (2019). Standards of Medical Care in Diabetes -2019. *Diabetes Care*, 42(2), 204.
- Ahmed, N. (2005, January). Advanced glycation endproducts - Role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, Vol. 67, pp. 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.09.004>
- Arneht, B., Arneht, R., & Shams, M. (2019, May 18). Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20102467>
- Baker, J. R., Metcalf, P. A., Johnson, R., Newman, D., & Rietz, P. (1985). Use of Protein-Based Standards in Automated Colorimetric Determinations of Fructosamine in Serum. In *CLIN. CHEM* (Vol. 31).
- Bowden, D. W., Qi, L., Du, M., Liou, G. I., Cheng, J., Spinedi, E., ... Kautzky-willer, A. (2015). *World Journal of*. 9358(1), 1–216.
- Cui, B., Han, L., Qu, J., & Lv, Y. (2009). Hypoglycemic activity of *Grifola frondosa* rich in vanadium. *Biological Trace Element Research*, 131(2), 186–191. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8355-4>
- Curós Abadal, A., & Flores, J. S. (2008). Relevancia de la hiperglucemia en el síndrome coronario agudo. *Revista Española de Cardiología*, Vol. 61, pp. 447–450. <https://doi.org/10.1157/13119986>
- Elangovan, A., Subramanian, A., Durairaj, S., Ramachandran, J., Lakshmanan, D. K., Ravichandran, G., ... Thilagar, S. (2019). Antidiabetic and hypolipidemic efficacy of skin and seed extracts of *Momordica cymbalaria* on alloxan induced diabetic model in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 241. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111989>
- Han, N. ., Kirigia, J. ., Claude, J. ., Ogurstova, K. ., Guariguata, L. ., Rathmann, W. ., ... Reja, A. (2017). Diabetes Atlas de la FID. In *International Diabetes Federation*. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.09.002>

- Ighodaro, O. M., Adeosun, A. M., & Akinloye, O. A. (2017, January 1). Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycaemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. *Medicina (Lithuania)*, Vol. 53, pp. 365–374.
<https://doi.org/10.1016/j.medic.2018.02.001>
- Islam, M. K., Tsuboya, C., Kusaka, H., Aizawa, S. ichi, Ueki, T., Michibata, H., & Kanamori, K. (2007). Reduction of vanadium(V) to vanadium(IV) by NADPH, and vanadium(IV) to vanadium(III) by cysteine methyl ester in the presence of biologically relevant ligands. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1770(8), 1212–1218. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.05.003>
- Katsarou, A., Gudbjörnsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., ... Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Kharroubi, A. T., & Darwish, H. M. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6(6), 850–867.
<https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850>
- Kim, H.-G. (2019). Cognitive dysfunctions in individuals with diabetes mellitus. *Yeungnam University Journal of Medicine*, 36(3), 183–191.
<https://doi.org/10.12701/yujm.2019.00255>
- Levina, A., & Lay, P. A. (2011). Metal-based anti-diabetic drugs: advances and challenges. *Dalton Transactions*, 40(44), 11675.
<https://doi.org/10.1039/c1dt10380f>
- Martínez, T. G., Pauls, B. M., Cabrera, A. M. V., Granell, C. L., & Piqueres, R. F. (2017). Predictive factors of hyperglycemia in hospitalized adults receiving total parenteral nutrition. *Farmacia Hospitalaria*, 41(6), 667–673.
<https://doi.org/10.7399/fh.10784>
- Rask-Madsen, C., & Kahn, C. R. (2012). Tissue-specific insulin signaling, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), 2052–2059.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.241919>
- Shah, S. Zu. H. (2016). *Effects of oral vanadium on glycaemic and lipid profile in*

- rats. Retrieved from https://jpma.org.pk/article-details/8009?article_id=8009&fbclid=IwAR0GiewzHSv-RDtRLpUD1Fr1UYGRGnBA7BGwcn4FQs-HWv68goegQUBIPu4
- Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M. K. (2016, July 3). Significance of HbA1c test in diagnosis and prognosis of diabetic patients. *Biomarker Insights*, Vol. 11, pp. 95–104.
<https://doi.org/10.4137/Bmi.s38440>
- Shulman, R. M., & Daneman, D. (2010). Type 1 diabetes mellitus in childhood. *Medicine*, 38(12), 679–685. <https://doi.org/10.1016/J.MPMED.2010.09.001>
- Sidorova, Y. S., Skalnaya, M. G., Tinkov, A. A., & Mazo, V. K. (2019). The effect of vanadium compounds on carbohydrate and lipid metabolism disorders. *Problems of Endocrinology*, 65(3), 184–190.
<https://doi.org/10.14341/probl10093>
- Thompson, K. H., Lichter, J., LeBel, C., Scaife, M. C., McNeill, J. H., & Orvig, C. (2009). Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(4), 554–558.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.12.003>
- Treviño, S., Díaz, A., Sánchez-Lara, E., Sanchez-Gaytan, B. L., Perez-Aguilar, J. M., & González-Vergara, E. (2018). Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. *Biological Trace Element Research*, 188(1), 68–98.
<https://doi.org/10.1007/s12011-018-1540-6>
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 26(2), 19–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278749>
- Zheng, C. M., Ma, W. Y., Wu, C. C., & Lu, K. C. (2012, October 9). Glycated albumin in diabetic patients with chronic kidney disease. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 413, pp. 1555–1561. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.04.025>

12. ANEXOS

ANEXO 1. Determinación de glucosa sérica.

Método: Glucosa oxidasa/peroxidasa.

Fundamento

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrogeno (H_2O_2), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de peroxidasa (POD):





La intensidad de color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra problema.

Procedimiento

- Mantener el reactivo a temperatura ambiente
- Condiciones de la determinación:
 - Longitud de onda: 505 nm (490-550)
 - Temperatura: 37 °C
 - Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

- Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C o 30 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo. EL color es estable mínimo 30 minutos.
- Cálculos:

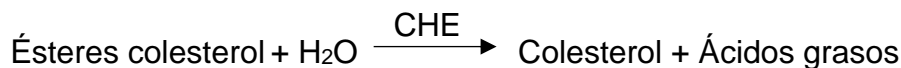
$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times (\text{Conc. Patrón}) = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de glucosa en la muestra}$$

ANEXO 2. Determinación de colesterol sérico.

Método: Colesterol oxidasa/peroxidasa.

Fundamento

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



Colesterol esterasa (CHE), Colesterol oxidasa (CHOD), Peroxidasa (POD), 4-Aminofenazona (4-AF).

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

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente

2. Condiciones de la determinación:

Longitud de onda: 505 nm (500-550)

Temperatura: 37 °C

Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

3. Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

4. Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C o 30 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).

5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo.

EL color es estable mínimo 30 minutos.

6. Cálculos:

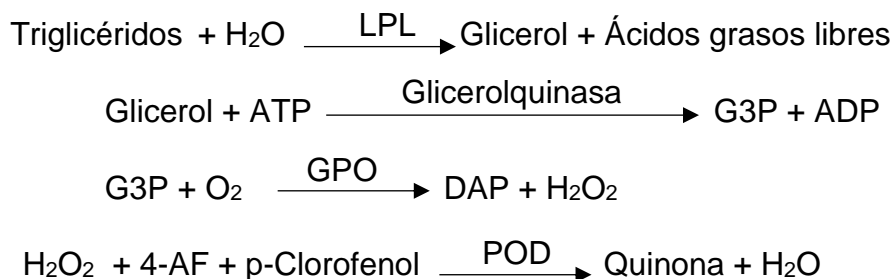
$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times (\text{Conc. Patrón}) = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de colesterol en la muestra}$$

ANEXO 3. Determinación de triglicéridos séricos.

Método: Glicerol-3-oxidasa/peroxidasa.

Fundamento

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) reacciona con 4- aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



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

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente
2. Condiciones de la determinación:

Longitud de onda: 505 nm (490-550)

Temperatura: 37 °C

Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

Blanco Patrón Muestra

3. Pipetear:	R (mL)	1.0	1.0	1.0
	Patrón (µL)	--	10	--
	Muestra (µL)	--	--	10

4. Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C o 30 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al blanco de reactivo. EL color es estable mínimo 30 minutos.
6. Cálculos:

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times (\text{Conc. Patrón}) = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de colesterol en la muestra}$$

ANEXO 4. Determinación de Colesterol de alta densidad (HDL).

Método: Reactivo precipitante.

Fundamento

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 (ANEXO 2.)

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente.
2. Dosificar en eppendorf

R(µL)	100
Muestra (mL)	1.0

3. Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 20 minutos a 4000 r.p.m. o 2 minutos a 12000 r.p.m.

5. Recoger el sobrenadante y procesar como muestra en la determinación de colesterol total (ANEXO 2.)

ANEXO 5. Determinación de Colesterol de baja densidad (LDL).

Método: Reactivo precipitante (polivinil sulfato / polietilenglicol).

Fundamento

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de polivinil sulfato. La concentración de colesterol LDL se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y en el sobrenadante obtenido tras la precipitación.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente.
2. Dosificar en eppendorf

R(μL)	200
Muestra (μL)	400

3. Agitar bien y dejar 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar durante 15 minutos a un mínimo de 4000 r.p.m.
5. Recoger con cuidado el sobrenadante y pipetear:

Reactivo de colesterol (mL)	1.0
Muestra (μL)	20

6. Mezclar bien e incubar los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 10 minutos a 37°C.
7. Leer la absorbancia de acuerdo con la determinación de colesterol total descrita en el ANEXO 2.
8. La concentración de colesterol LDL en la muestra se calcula:

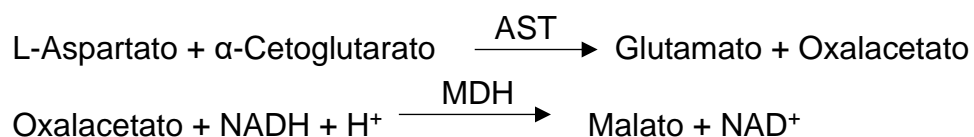
Colesterol LDL= Colesterol total -Colesterol en sobrenadante

ANEXO 6. Determinación de aspartato aminotransferasa GOT (AST).

Método: NADH, cinético UV.

Fundamento

La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxaloacética (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetato. El oxalacetato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra problema.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente
2. Condiciones de la determinación:
 - Longitud de onda: 340 nm
 - Temperatura: 37 °C
 - Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

3. Pipetear:

Reactivo (mL)	1.0
Muestra (μ L)	100

4. Mezclar, incubar 1 minuto.
5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
6. Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

7. Calculos:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de AST}$$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

ANEXO 7. Determinación de alanina aminotransferasa GPT (ALT)

Método: NADH, cinético UV.

Fundamento

La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvica (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra problema.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente
2. Condiciones de la determinación:
 - Longitud de onda: 340 nm
 - Temperatura: 37 °C
 - Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

3. Pipetear:

Reactivo (mL)	1.0
Muestra (μL)	100

4. Mezclar, incubar 1 minuto.
5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
6. Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).
7. Calculos:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT}$$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

ANEXO 8. Determinación de fosfatasa alcalina (FAL/ALP).

Método: p-Nitrofenilfosfato.

Fundamento

La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza la hidrólisis del p-nitrofenilfosfato (pNPP) a pH 10,4 liberando p-nitrofenol y fosfato, según la siguiente reacción:



La velocidad de formación del p-Nitrofenol, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de fosfatasa alcalina en la muestra problema.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente

2. Condiciones de la determinación:

Longitud de onda: 405 nm

Temperatura: 37 °C

Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

3. Pipetear:

Reactivo (mL)	1.2
Muestra (µL)	20

4. Mezclar, incubar 1 minuto.

5. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

6. Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

7. Calculos:

$$\Delta A/\text{min} \times 3300 = \text{U/L de FAL}$$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 µmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

ANEXO 9. Determinación de Bilirrubina Total.

Método: Sulfanílico Diazoado.

Fundamento

La cetrimida solubiliza la bilirrubina indirecta permitiendo su reacción junto con la fracción directa, que reaccionan con el ácido sulfanílico diazoado, originando un complejo coloreado que puede determinarse espectrofotométricamente.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente
2. Condiciones de la determinación:

Longitud de onda: 540 nm

Temperatura: 37 °C

Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

3. Pipetear

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	100	--
Muestra (µL)	--	--	100

4. Mezclar bien y dejar durante 2 minutos a temperatura ambiente.

5. Leer la absorbancia (A) de la muestra y patrón frente al blanco de reactivos.

6. Cálculos:

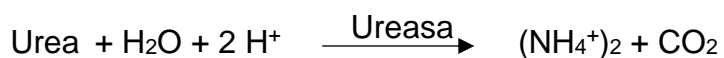
$$\frac{(A)_{\text{muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times \text{Conc. Patrón} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de bilirrubina en la muestra}$$

ANEXO 10. Determinación de urea.

Método: Ureasa-glutamato deshidrogenasa.

Fundamento

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea, presente en la muestra, en amoníaco (NH₄⁺) y anhídrido carbónico (CO₂). Los iones amonio formados se incorporan al α-cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con oxidación paralela de NADH a NAD⁺.



La disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de urea de la muestra problema.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente
2. Condiciones de la determinación:
Longitud de onda: 340 nm
Temperatura: 37 °C
Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.
3. Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

4. Mezclar y leer las absorbancias a los 30s (A1) y a los 90 (A2)
5. Calcular: $\Delta A = A1 - A2$

$$\frac{\Delta A_{\text{Muestra}} - \Delta A_{\text{Blanco}}}{\Delta A_{\text{Patrón}} - \Delta A_{\text{Blanco}}} \times \text{Conc. Patrón} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de urea en la muestra}$$

ANEXO 11. Determinación de creatinina.

Método: Jaffé, colorimétrico-cinético.

Fundamento

El ensayo de la creatinina está basado en la reacción de la creatinina con el picrato alcalino descrito por Jaffé. La creatinina reacciona con el picrato alcalino formando un complejo rojizo. El intervalo de tiempo escogido para las lecturas permite eliminar gran parte de las interferencias conocidas del método. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra problema.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente

2. Condiciones de la determinación:

Longitud de onda: 492 nm (490-510)

Temperatura: 37 °C

Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

3. Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	100	--
Muestra (µL)	--	--	100

4. Mezclar y poner en marcha el cronometro.

5. Leer las absorbancias a los 30s (A1) y a los 90 (A2) después de la adición de la muestra

6. Calcular: $\Delta A = A1 - A2$

$$\frac{\Delta A_{\text{Muestra}}}{\Delta A_{\text{Patrón}}} \times \text{Conc. Patrón} = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de creatinina en la muestra}$$

ANEXO 12. Determinación de fructosamina.

Fundamento

Las proteínas glicadas séricas reducen a las sales de tetrazolio (NBT) en medio alcalino. La velocidad de formación del formazán a una temperatura determinada es proporcional a la concentración sérica de proteínas glicadas.

Reactivo A: NBT 0,25 mmol/L

Reactivo B: Tampón carbonato 0,2 mol/L, pH 10,35.

Patrón S: Reconstituir con 1,00 mL de agua destilada. Agitar suavemente y dejar reposar 30 minutos antes de utilizar. La solución es estable durante 15 días a 2-8°C, si se evita la contaminación durante su uso, o durante 45 días a -20°C congelado en alícuotas.

El reactivo reconstituido es estable 12 días a 2-8 °C

Suero recogido mediante procedimientos estándar. Las muestras no deben presentar hemólisis.

Procedimiento

1. Mantener el reactivo a temperatura ambiente

2. Condiciones de la determinación:

Longitud de onda: 530 nm

Temperatura: 37 °C

Ajuste del espectrofotómetro a cero de absorbancia frente a agua destilada.

3. Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µL)	--	50	--
Muestra (µL)	--	--	50

4. Mezclar y leer las absorbancias a los 10 minutos (A₁) y a los 15 minutos (A₂)

5. Calcular:

$$\frac{(A_2 - A_1) \text{ Muestra}}{(A_2 - A_1) \text{ Patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

ANEXO 13. Determinación de insulina.

Método: ELISA de dos sitios en fase sólida.

Fundamento

Está basado en la técnica de sándwich directo en que dos anticuerpos monoclonales son dirigidos a dos determinados antígenos separados en la molécula de Insulina. Durante la incubación, la Insulina en la muestra reacciona al conjugado enzimático anti-Insulina-HRP y al anticuerpo anti-Insulina unido al micropozo. Un simple paso de lavado remueve el conjugado enzimático no unido. El conjugado

HRP unido es detectado gracias a la aplicación del sustrato. La reacción es frenada al agregar ácido para brindar una concentración colorimétrica que es leída utilizando un lector de ELISA.

Reactivos:

- Calibradores Insulina – liofilizados- Iconos A-F

Seis 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) μ IU/mL. Reconstituya cada frasco con 2mL de agua destilada o desionizada. Los calibradores reconstituidos son estables por sesenta 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 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 frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénese a 2-30°C.

- Substrato A

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

- Substrato B

Un frasco que contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 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

- SOLUCIÓN 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 28°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).

1. 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.

2. Tomar 50 µL de los sueros de referencia, controles y muestras en los pozos correspondientes.

3. Agregue 100 µL 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.

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

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

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

7. Agregue 300µL de la solución de lavado (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo o aspírelo. Repita dos veces adicionales para un total de tres 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 veces adicionales.

8. Agregue 100µL 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 DESPUÉS DE ADICIONAR EL SUSTRATO**

9. Incube en la temperatura ambiente por 15 minutos. Agregue 50µL de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos.

10. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.

11. 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 del microplacas. Los resultados se deben leer en el plazo de 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 del micro placas

2. Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Insulina en $\mu\text{IU/mL}$

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 14. Determinación de triglicéridos en tejidos.

Procedimiento:

1. Pesar 100 mg del tejido a analizar y colocarlos en un criotubo
2. Adicionar 800 μL de SSI
3. Homogeneizar durante 1 minuto
4. Tomar 10 μL 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.

*Notas: La técnica seguida corresponde al anexo 3.

ANEXO 15. Determinación de glucógeno en tejidos.

Reactivos:

Acido perclórico al 10 %

Etanol concentrado

Agua destilada

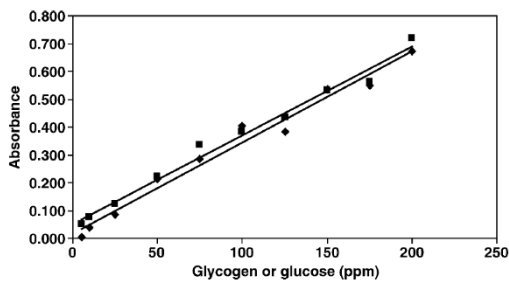
Fenol al 5 %

Ácido sulfúrico concentrado

Procedimiento:

- 1.- Homogenizar 125 mg de tejido con 1 ml de HClO_4 .
- 2.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.
- 3.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 1)
- 4.- Re suspender el pellet de tejido con 1 ml de HClO_4 .
- 5.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.

- 6.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 2)
- 7.- Combinar el sobrenadante 1 y 2. (Sobrenadante 3)
- 8.- Agregar 2.5 ml de etanol al sobrenadante 3, agitar fuertemente.
- 9.- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- 10.- Extraer el sobrenadante (Sobrenadante 4) * y guardar, en el fondo del tubo se observará un precipitado blanco.
- 11.- Re suspender el precipitado blanco con 1 ml de agua destilada.
- 12.- Tomar una alícuota de la disolución de glucógeno (no. 11) de 100 μ L
- 13.- Añadir 200 μ L de fenol y agitar.
- 14.- Agregar 1 ml de ácido sulfúrico y agitar.
- 15.- Leer la absorbancia a 490 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 30 min después de agitar con el ácido sulfúrico.



*En caso de Hígado se puede realizar determinación la concentración de glucosa en el sobrenadante 4 y sumarse a la concentración total de glucógeno.

16. Cálculos:

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

Se ocupó la ecuación de la recta para calcular la concentración de glucógeno elaborada por L. W. Bennett en 2007.

