



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Posgrado en Ciencias Químicas

Maestría en Ciencias Químicas

Área Bioquímica y Biología Molecular

Efecto de la administración crónica de cadmio sobre el perfil lipídico sistémico, la morfología y diferenciación de los adipocitos en ratas de la cepa Wistar

Tesis que presenta:

QFB Gabriela Gutiérrez López

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En el área de:

Bioquímica Y Biología Molecular

Director de tesis

DC Eduardo Miguel Brambila Colombres

Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP

Heroica Puebla de Zaragoza, Junio 2014

Agradecimientos

A mi familia Mid, Pat y Bora quienes apoyan incondicionalmente mis sueños, y quienes son el soporte de mi vida.

Al DC Eduardo Brambila Colombres por dejarme formar parte de su equipo de trabajo por más de 6 años, por ser tan paciente y por todos y cada uno de esos momentos de enseñanza tanto profesional como personalmente.

A mis compañeros de laboratorio Lupita, Samuel, Violeta, Thalía, Laura Tino, Alex, Kari, Venus por hacer amena la estancia en el laboratorio.

A la MC Maricela Torres y Soto por enseñarme de nueva cuenta Histotecnología y por sus consejos.

Al MC Víctor Blanco Álvarez mi maestro, uno de mis grandes amigos y el mejor cómplice durante mi estancia en la maestría.

A mi comité revisor, DC Bertha Alicia León Chávez, DC Laura Verónica Plá, DC Patricia Aguilar Alonso y DC Roberto Berra Romani por sus consejos y paciencia.

A mis amigos Beto, Vic, Gas, Mire, Lau, Mariana, Valeria, Andrés, Adrián, Lalo, Jorge, Russel, Julieta, Carlos, Yaya, Jazmín, Ricardo, Daniel, Martha, Ribí, Alex, Nessie y Viri con quienes amar es engordar.

Índice de figuras

1	Componentes celulares del tejido adiposo	13
2	Vías de señalización para la adipogénesis	19
3	Rutas de transporte y destino de las lipoproteínas	22
4	Lipogénesis y lipólisis	25
5	Estructura de los dominios de MT de mamífero	31
6	Efecto de la administración crónica de Cd sobre la concentración de MT total en los diferentes tejidos de estudio	48
7	Efecto de la administración crónica de Cd durante 2 meses sobre la morfología de los tejidos adiposos en estudio	50
8	Efecto de la administración crónica de Cd durante 2 meses sobre el número y área de los adipocitos	51
9	Efecto de la administración crónica de Cd durante 3 meses sobre la morfología de los tejidos adiposos en estudio	53
10	Efecto de la administración crónica de Cd durante 3 meses sobre el número y área de los adipocitos	54
11	Efecto de la administración crónica de Cd durante 4 meses sobre la morfología de los tejidos adiposos en estudio	56
12	Efecto de la administración crónica de Cd durante 4 meses sobre el número y área de los adipocitos	57
13	Efecto de la administración crónica de Cd sobre las concentraciones de TG en TAS, TAR y TAE	59
14	Efecto de la administración crónica de Cd sobre el perfil lipídico sistémico	61
15	Efecto de la administración crónica de Cd sobre los perfiles electroforéticos de lipoproteínas.	63
16	Efecto de la administración crónica de Cd sobre las concentraciones de TG en tejido hepático	64
17	Mecanismo de acción del cadmio sobre el perfil lipídico sistémico y la morfología del tejido adiposo	72

18	Diseño de oligonucleótidos para PPAR γ	87
19	Alineamiento del oligonucleótido sentido CAGAACTGAGTAGCCTG de PPAR γ	88
20	Alineamiento del Oligonucleótido antisentido CCTTGGATATTAGTGGTTCACAGC de PPAR γ	89
21	Diseño de oligonucleótidos para la proteína ribosomal S29	91
22	Alineamiento del oligonucleótido sentido GTCTGAAGGCAAGATGGGTC de la proteína ribosomal S29	92
23	Alineamiento del oligonucleótido antisentido GGGTAGACAGTCGAATCATCC de la proteína ribosomal S29	93
24	Efecto de la administración crónica de dos meses de Cd sobre los niveles de mRNA de PPAR γ 2 en tejido adiposo	96

Índice de tablas

1	Oligonucleótidos iniciadores de la PCR para los genes en estudio	94
2	Protocolo de termociclado para PPAR γ 2	94
3	Protocolo teórico de termociclado para la proteína ribosomal S29	95

Abreviaturas

a.a.	Aminoácidos
aP2	Proteína transportadora de ácidos grasos aP2
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
AGL	Ácidos grasos libres
Akt	Serin/treonin protein cinasa
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ASP	Proteína estimuladora de acilación
ATGL	Adiposo-triglicérido lipasa
C/EBP	CCAAT/proteínas potenciadoras de unión
CaCl₂	Cloruro de calcio
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
CdCl₂	Cloruro de cadmio
DAG	Diacilglicerol
EEM	Error estándar de la media
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
FAS	Ácido graso sintetasa
Fe	Hierro
FL	Fosfolípidos
FT	Factor de transcripción
GPAT	α -glicerol-3-fosfato aciltransferasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HMG-CoA	Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL-6	Interleucina 6
IRS-1	Sustrato del receptor de insulina 1
JAK	Cinasas de Janus
HE	Tinción hematoxilina y eosina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoproteínlipasa
MAG	Monoacilglicerol
MAPK	Protein cinasas activadas por mitógenos
MGL	Monoacilglicerol lipasa
MT	Metalotioneínas
ORO	Rojo oleoso O
PAI-1	Inhibidor del activador de plasminógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPAR	Receptores activados de proliferación de los peroxisomas

PPAR-RXR	Heterodímero de PPAR y receptores a retinoides
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RXR	Receptor a retinoides X
SOCS 3	Supresores de la señalización de citocinas 3
SREBP1	Proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides
STAT	Activadores de la transcripción y transductor de señales
TA	Tejido adiposo
TAB	Tejido adiposo blanco
TAE	Tejido adiposo epididimal
TAM	Tejido adiposo marrón
TAR	Tejido adiposo perirrenal
TAS	Tejido adiposo subcutáneo
TG	Triglicéridos
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
Zn	Zinc

Índice

Introducción	12
Tejido adiposo	12
Diferenciación del tejido adiposo blanco	17
PPAR γ	19
Metabolismo de lípidos	20
Lipogénesis y lipólisis en el adipocito	23
Tejido adiposo y síndrome metabólico	26
Cadmio	28
Metalotioneínas	30
Planteamiento del problema	34
Justificación	35
Hipótesis	36
Hipótesis nula	36
Hipótesis alternativa	36
Objetivos	37
Objetivo general	37
Objetivos específicos	37
Diagrama de trabajo	38
Metodología	39
Animales	39
Cuantificación de cadmio en tejido adiposo	40

Cuantificación de metalotioneína total en tejido adiposo	40
Examen histológico	41
Análisis morfométrico	41
Inclusión en parafina	41
Cortes histológicos	42
Tinción hematoxilina y eosina (HE)	42
Cuantificación de triglicéridos en tejido	43
Evaluación del perfil lipídico sistémico	44
Determinación cuantitativa de ácidos grasos libres	44
Electroforesis en geles de poliacrilamida para lipoproteínas	45
Análisis estadístico	46
Resultados	47
Concentración de Cd en tejido adiposo	47
Concentración de MT en tejido adiposo	47
Examen histológico	49
Concentración de triglicéridos en el tejido adiposo	58
Evaluación del perfil lipídico sistémico	60
Discusión de resultados	65
Conclusiones	73
Perspectivas	74
Bibliografía	75
Anexos	86

Resumen

El Cadmio (Cd) es un metal de transición ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo tóxico para los seres vivos. Dentro de los mecanismos de toxicidad del Cd, se le ha relacionado con la interacción con diferentes vías metabólicas y desde una perspectiva “adipocéntrica”, las disfunciones en el tejido adiposo pueden verse reflejadas en modificaciones en el metabolismo de los lípidos. Sin embargo, aun falta por definirse completamente la información acerca de los efectos de la administración experimental de cadmio sobre el metabolismo lipídico sistémico y los cambios en tejido adiposo (TA). En este trabajo se evaluó el efecto de la administración crónica de CdCl₂ (65,5 mg/L en el agua de beber) sobre los cambios morfológicos, la acumulación del metal, nivel de metalotioneínas totales y triglicéridos (TG) en TA subcutáneo, perirrenal y epididimal, además de estudiar la existencia de cambios en el perfil lipídico sistémico. Los resultados obtenidos en los animales expuestos crónicamente a CdCl₂ mostraron que los diferentes tejidos adiposos no acumulan cantidades significativas de Cd, sin embargo, hay una inducción en la expresión de MT total en todos los tejidos. Por otro lado, el análisis histológico indica la existencia de cambios fenotípicos de los adipocitos, mostrando hipertrofia e hiperplasia y un incremento en el resguardo de TG que fue dependiente del tiempo de exposición al metal. La misma acumulación de TG fue vista en tejido hepático produciendo un cuadro de esteatosis hepática. Aunado a los cambios observados en TA, los animales en estudio mostraron cambios en los lípidos plasmáticos caracterizados por hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, aumento de

AGL y en las fracciones lipoproteicas de VLDL y LDL, además de la disminución de fosfolípidos y la fracción lipoproteica HDL. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la administración crónica de CdCl_2 en el agua de beber a animales de experimentación produce modificaciones en el TA subcutáneo, perirrenal y epididimal, así como en el tejido hepático, reflejándose en alteraciones de la morfología y un incremento “anormal” del almacenamiento de TG. Además, la administración de Cd afecta los niveles de lípidos séricos. En conjunto estos resultados sugieren que la toxicidad del Cd favorece la aparición de un cuadro con características similares a un síndrome metabólico.

Introducción

Desde una perspectiva “adipocéntrica” se postula que el síndrome metabólico reúne las siguientes anomalías: la expansión del TA en la parte superior del cuerpo, obesidad visceral o androide, hiperglucemias, hipertensión, niveles elevados de triglicéridos (TG) y niveles bajos de la lipoproteína colesterol-HDL [Eckel et al., 2005; Balistreri et al., 2010, Blüher, 2012]. Entre los mecanismos involucrados en este proceso se ha propuesto que existe un exceso del aporte energético que rebasa la capacidad oxidativa y de almacenamiento por parte del TA visceral, la alteración en la producción de adipocinas (el aumento de citocinas y la disminución de adiponectina, entre otros cambios), el aumento en el estrés oxidativo, la inflamación crónica principalmente por macrófagos con fenotipo proinflamatorio de tipo 1, y el incremento en el proceso de lipólisis en los adipocitos que da como resultado el aumento en los niveles de ácidos grasos libres (AGL) [Vigouroux et al., 2011; Balistreri et al., 2010].

Tejido adiposo

El TA es un tejido conjuntivo especializado con gran actividad metabólica, está integrado en una tercera parte por un grupo de células denominadas adipocitos, los cuales pueden encontrarse en forma individual o reunidos en grupos; el resto del tejido está compuesto por fibroblastos, macrófagos, células del estroma, monocitos y preadipocitos (Figura 1).

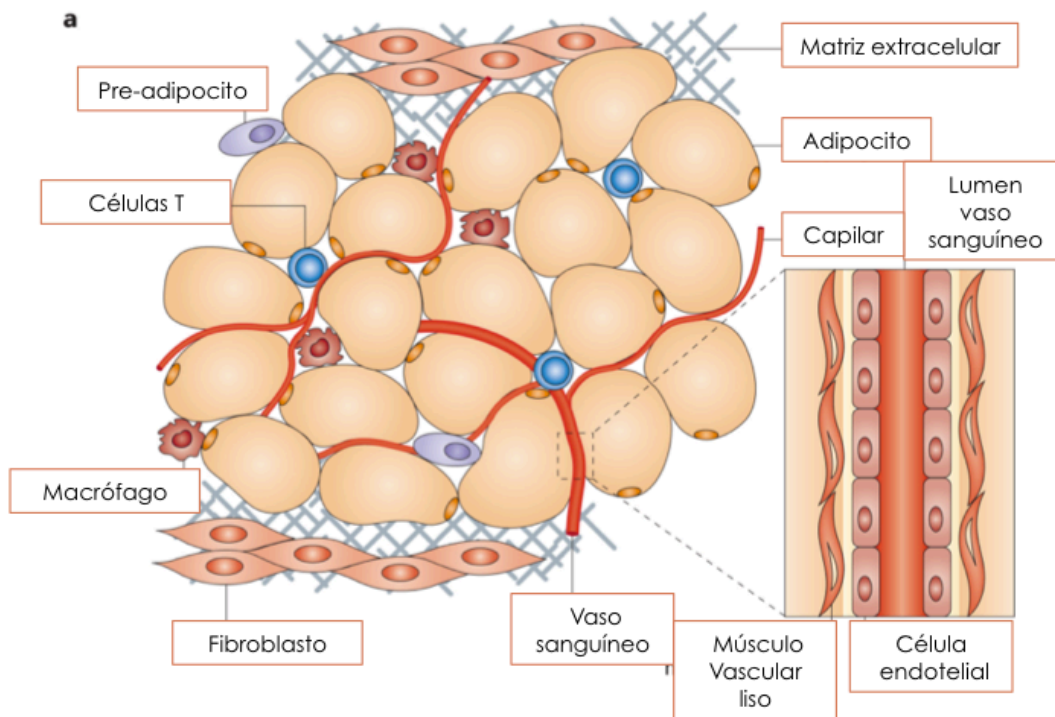


Fig. 1. Componentes celulares del tejido adiposo. Representación esquemática de las células del TA; adipocitos, preadipocitos, fibroblastos y componentes del sistema inmune. Tomado y modificado de Ouchi et al., 2011.

Alrededor del 20% del peso corporal de una persona adulta en condiciones normales, está conformado por el TA, representando un importante órgano de reserva energética [Geneser, 2000], y balance energético del organismo, acumula grasa neutra en forma de TG durante los periodos de alta ingesta (lipogénesis) y la distribuye cuando el organismo requiere energía (lipólisis) [Gregoire et al., 1998; Large et al., 2004; Frigolet, et al., 2008]. Además, es reconocido como un órgano secretor activo a través de la producción de moléculas denominadas adipocinas con acción endocrina, parácrina y autocrina

[Gregoire et al., 1998; Gonzalez et al., 2002; Curat et al., 2006; Frigolet et al., 2008; Valenzuela y Zanhueza, 2009; Balistreri et al., 2010].

En los mamíferos existen dos tipos de TA, los cuales pueden diferenciarse por sus características morfológicas, color, grado de vascularización, distribución y actividad metabólica [Geneser, 2000; Ross y Pawlina, 2007; Frigolet et al., 2008; Balisteri et al., 2010].

El tejido adiposo marrón (TAM) o TA multilocular, llamado así por la presencia de varias gotas de lípido; presenta una coloración dorada a marrón rojiza a causa del elevado contenido de citocromos, sus células son poligonales y suelen medir de 30 a 40 μm de diámetro. Presentan citoplasma abundante y granuloso y gotas de lípido de diversos tamaños, que pueden encontrarse rodeadas en forma total o parcial por mitocondrias. El núcleo es redondeado con gránulos de cromatina gruesos. En el TAM existe gran irrigación sanguínea y su ubicación anatómica es entre las escápulas, las axilas, la región de la nuca y a lo largo de los grandes vasos sanguíneos; está muy desarrollado en fetos y en recién nacidos, disminuyendo a medida que transcurren los años en adultos, transformándose en tejido adiposo blanco. La actividad metabólica del TAM está determinada por la noradrenalina que estimula la termogénesis y regula la diferenciación a adipocitos multiloculares.

El tejido adiposo blanco (TAB) o unilocular, tiene como característica la presencia de una única gota de lípido que reduce el citoplasma a un fino borde y desplazando al núcleo a la periferia, sus organelos son escasos y sus células pueden presentar diámetros superiores a 100 μm . Los adipocitos son esféricos cuando están aislados y de color blanquecino amarillento por la presencia de carotenoides provenientes de la

dieta. Estos almacenan en su mayoría TG, recambiándose cada 2 a 3 semanas, y suelen deformarse entre sí cuando se encuentran en pequeños grupos adoptando formas poliédricas. El TAB posee gran vascularización, pero es menor en comparación con TAM [Geneser, 2000; Ross y Pawlina, 2007].

El TAB presenta una distribución heterogénea entre hombres y mujeres, en donde la topografía del tejido genera perfiles metabólicos distintos dependiendo de la ubicación anatómica, por ejemplo, la grasa subcutánea en mujeres se localiza a nivel de las caderas y en el hombre a nivel del abdomen, aunque en los dos casos tiene como función la regulación de la temperatura y/o el aislamiento térmico. La grasa visceral presenta gran actividad metabólica, provee de AGL al hígado, en donde puede causar alteraciones en la homeostasis de la glucosa [Curat et al., 2006]. El tejido visceral tiene como función llenar los vacíos entre los órganos y los mantiene en posición adecuada; tanto la grasa subcutánea como la visceral varían dependiendo de la edad, género y el estado nutricional del individuo. En zonas de acumulación de grasa, los adipocitos no liberan los lípidos almacenados durante los periodos de ayuno, por ejemplo, la grasa que rodea los riñones, las orbitas oculares, rodillas, palmas de las manos y plantas de los pies, en donde la función principal es de tipo mecánico, es decir, aislante de golpes y de sostén [Geneser 2000; Moreno y Martínez, 2002; Balistreri et al., 2010].

Otro papel importante del TAB es sintetizar y secretar activamente adipocinas con estructura química y función biológica diferente, por ejemplo: factores de crecimiento, factor de necrosis tumoral α (TNF- α), factor de crecimiento transformante β (TGF- β),

factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y quimiotácticos como MCP-1; citocinas clásicas, IL-6 y prostaglandinas, así como hormonas entre las cuales están: testosterona, estrógenos y glucocorticoides, participando en la regulación de múltiples funciones celulares, como la homeostasis energética; comprendiendo el metabolismo de la glucosa y de lípidos, la función reproductiva, procesos inmunológicos, hemostasia, angiogénesis, control de la presión arterial y la propia autorregulación del crecimiento y desarrollo del TA al interactuar con células de otros tejidos localizadas en órganos distantes, como hipotálamo, páncreas, hígado, músculo esquelético, riñón, endotelio y sistema inmune [Geneser, 2000; Ross y Pawlina, 2002; Sánchez et al., 2005; Kawakami et al., 2010]. La leptina, una adipocina con efecto neuroendocrino interviene en la regulación de la homeostasis energética, inhibe la ingesta de alimentos y la disminución del peso corporal, e informa sobre el estado energético del TA a los centros que regulan la captación de nutrientes. Por otro lado, adiponectina es importante en la oxidación de los ácidos grasos, disminuye la concentración de TG en plasma, actúa como una hormona antiinflamatoria y aumenta la sensibilidad de las células a insulina [Geneser 2000; Sánchez et al., 2005; Valenzuela y Sanhueza, 2009; Balistreri et al., 2010; Ouchi et al., 2011, Bluhër et al., 2012].

Diferenciación del tejido adiposo blanco

Para que el adipocito pueda ejercer su función es necesario que se lleve a cabo el proceso de adipogénesis que depende del estado de energía del organismo y las necesidades de almacenamiento. Los adipocitos son un tipo celular específico derivado de las células madre mesenquimatosas indiferenciadas que están en la adventicia de las vénulas pequeñas [Vigouroux et al., 2011; Nakagami, 2013]. Los preadipocitos deben interrumpir su crecimiento y llevar a cabo cambios cronológicos en la expresión de numerosos genes para adquirir el fenotipo característico (Figura 2) [Gregoire et al., 1998; Niemelä et al., 2008]. Sin embargo, este proceso no es conocido en su totalidad, por lo que se ha sugerido que en modelos *in vitro* se inicia con una inhibición del crecimiento, seguida de una expansión clonal y un incremento en el número de mitocondrias (dando lugar a adipocitos maduros pequeños sensibles a insulina y con capacidad de secretar altos niveles de adiponectina), así como cambios tempranos en la expresión de genes, por ejemplo, de lipoproteinlipasa (LPL), que refleja el cese del crecimiento de los adipocitos [Niemelä et al., 2008]. También se han descrito cambios en las familias de factores de transcripción (FT) como C/EBP (CCAAT/proteínas potenciadoras de unión), conformada por las isoformas α , β y δ , en donde C/EBP β y δ forman parte de la respuesta temprana de la diferenciación celular y anteceden a C/EBP α , el cual es un coadyuvante de la familia de receptores activados de proliferación de los peroxisomas (PPAR) y especialmente con PPAR γ , considerado como un regulador decisivo del proceso de diferenciación y el metabolismo de lípidos [Tontonoz et al., 1994; Barak et al.,

1999; Frigolet et al., 2008; Niemelä et al., 2008]. También se conoce que la expresión de proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP1), aumenta en la respuesta temprana para producir ligandos exógenos para C/EBP β y PPAR γ , y además puede inducir la transcripción de PPAR γ . En eventos tardíos, se lleva a cabo lipogénesis *de novo*, incrementa el número de receptores a insulina y GLUT-4, y por último, la diferenciación terminal en donde el adipocito es capaz de secretar adipocinas. Esta célula cuenta con un número limitado de mitocondrias y un aumento en su tamaño, perdiendo su actividad progresivamente donde los adipocitos maduros presentan resistencia a insulina [Gregoire et al., 1998; Moreno y Martínez, 2002; Niemelä et al., 2008; Valenzuela y Sanhueza, 2009; Vigouroux et al., 2011]. Las especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (ROS), generadas por la cadena respiratoria, pueden tener efectos duales sobre la diferenciación de los adipocitos. A bajos niveles fisiológicos, las moléculas de ROS actúan como mensajeros secundarios para activar la adipogénesis y la lipogénesis, lo que resulta en aumento del número y tamaño de los adipocitos. A niveles más altos, las ROS, podrían inhibir la maduración de los adipocitos [Vigouroux et al., 2011].

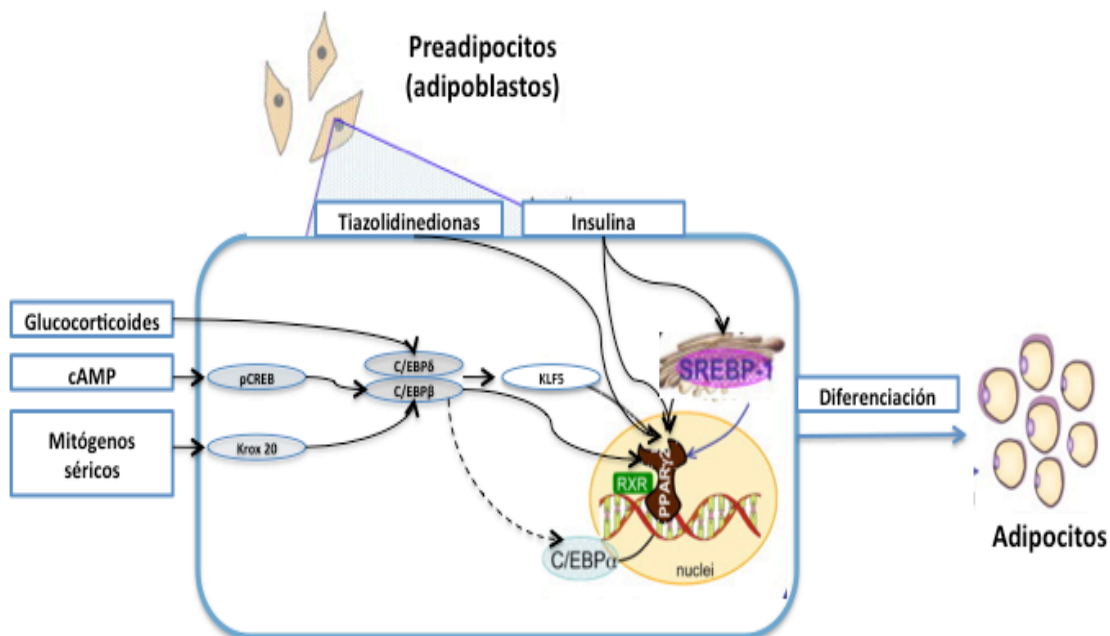


Fig. 2. Vías de señalización para la adipogénesis. La formación de adipocitos maduros que contienen una vesícula lipídica a partir de preadipocitos, se lleva a cabo por un proceso de diferenciación regulado por el factor de transcripción PPAR. Este factor es activado por las familias de factores de transcripción C / EBP y SREBP-1. Varios factores externos tales como la insulina, glucocorticoides, mitógenos séricos o ligandos de PPAR como las tiazolidinedionas pueden iniciar el proceso de diferenciación. Tomado y modificado de Frigolet et al.,2008.

PPAR γ

Los PPARs (α , $\delta\beta$ y γ) pertenecen a la familia de receptores nucleares de hormonas de tipo II que regulan la transcripción a través de la formación de heterodímeros de receptores a retinoides (PPAR-RXR) a un elemento de respuesta hexamérica de repetición de DNA (AGGTCA). En roedores, PPAR α regula la expresión de enzimas que catalizan la oxidación de ácidos grasos en tejidos hepático, cardíaco e

intestinal mediante ligandos endógenos o sintéticos; en humanos este FT esta principalmente expresado en riñón y músculo. PPAR δ es menos abundante y es expresado de forma ubicua en roedores y humanos. PPAR γ , por otro lado, induce la transcripción de la mayoría de los genes implícitos en la diferenciación de los adipocitos, así como en varios aspectos de la homeostasis del metabolismo de lípidos, como es la movilización y almacenamiento de ácidos grasos y la diferenciación de macrófagos a células espumosas [Tontonoz et al., 1998; Gregoire et al., 1998; Barak et al., 1999]. PPAR γ tiene dos isoformas generadas por corte y empalme alternativo: PPAR γ 1 con distribución ubicua y PPAR γ 2, expresado en TA. Se ha demostrado que PPAR γ 2 aumenta su expresión durante la adipogénesis en pacientes jóvenes, en comparación con pacientes de edad avanzada [Frigolet et al., 2008]. PPAR γ controla el metabolismo de los lípidos y el metabolismo de glucosa dependiente de insulina, ejerce efectos antiinflamatorios y antioxidantes en células endoteliales vasculares, células de músculo liso y macrófagos [Vigouroux et al., 2011]. Sin embargo, se sabe que una baja expresión de PPAR γ conduce a la alteración de la función mitocondrial y la acumulación de lipotóxicos, como ceramidas y DAG, en tejido no adiposo, además, ratones con deleciones de este FT, presentan lipodistrofia [Medina-Gomez et al., 2007].

Metabolismo de lípidos

En condiciones normales los mamíferos contienen entre un 5 y un 25% de su peso corporal en forma de lípidos y un 90% de estos se encuentran en forma de TG, los cuales proceden de tres orígenes: la alimentación, la síntesis *de novo*; en especial en el

hígado, y las reservas que pueden ser almacenadas en TA de tipo dérmico, subcutáneo, mediastínico, mesentérico, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal.

La utilización de las grasas en los animales está relacionada con el metabolismo de las lipoproteínas. Los TG ingeridos son hidrolizados en la luz del intestino delgado por las sales biliares y la acción de lipasa pancreática. Estos productos de la hidrólisis absorbidos por la mucosa intestinal comprenden una mezcla de glicerol, ácidos grasos libres (AGL), monoacilglicerol (MAG) y diacilglicerol (DAG), que posteriormente son utilizados para la síntesis de TG en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi de las células de la mucosa.

Los TG exógenos (provenientes de la dieta) se combinan con apoproteínas, para formar quilomicrones, los cuales tienen como función el transporte a través de la sangre y la linfa. Los TG sintetizados en el hígado (proceso conocido como lipogénesis) se combinan con otras apoproteínas para formar las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) para su transporte hacia tejidos periféricos, representando estas dos lipoproteínas (quilomicrones y VLDL) la principal fuente de TG [Moreno y Martínez, 2002]. Por otro lado, como consecuencia de la hidrólisis de los TG en los capilares, los quilomicrones y las VLDL se degradan para generar restos de quilomicrones y lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), que darán lugar a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) al utilizar a apoproteína B-100, con función de transporte del colesterol esterificado a los tejidos y por último, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que transportan el colesterol no esterificado de los tejidos periféricos al hígado para su metabolismo o excreción (Figura 3) [Mathews et al, 2002].

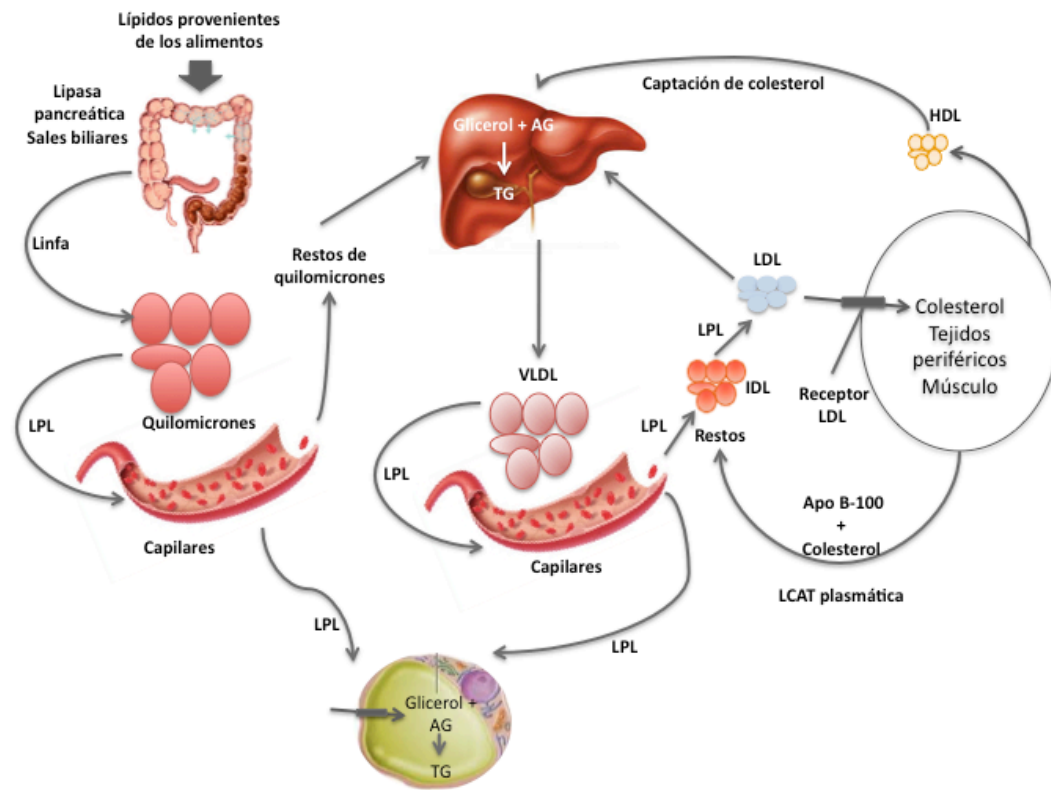


Fig. 3. Rutas de transporte y destino de las lipoproteínas. Los TG ingeridos se hidrolizan en la luz del intestino delgado por la lipasa pancreática y otras enzimas. Los productos de la hidrólisis absorbidos por la mucosa intestinal dan lugar a la formación de TG que se unen a apoproteínas para formar quilomicrones. Los TG sintetizados en el hígado son transportados por VLDL. Los TG en ambas proteínas se hidrolizan por la acción de LPL a glicerol y ácidos grasos en las superficies internas de los capilares en los tejidos periféricos dando lugar a las IDL y restos de quilomicrones respectivamente. Las LDL transportan el colesterol esterificado hacia tejidos periféricos, mientras que las HDL transportan colesterol no esterificado de los tejidos periféricos hacia el hígado. Tomado y modificado de Mathews et al., 2002.

Lipogénesis y lipólisis en el adipocito

La regulación de la lipogénesis y la lipólisis es esencial tanto para mantener la homeostasis energética, como para prevenir enfermedades metabólicas. Ambos procesos se encuentran regulados por la interacción de diferentes factores [Jaworski et al., 2007; Santos et al., 2012].

La lipogénesis en el TA es la síntesis de TG a partir de ácidos grasos esterificados, a partir de carbohidratos o de otras fuentes provenientes de la dieta. Los TG provenientes de los quilomicrones y VLDL sufren de nueva cuenta una hidrólisis mediada por LPL activada por apoproteína C-II en la superficie de los capilares dando como productos AGL y glicerol, los cuales pueden ser captados por las células adiposas o ser transportados unidos a la albúmina sérica. La proteína estimuladora de acilación (ASP) es la encargada de la estimulación de la síntesis de TG en TA, promoviendo el depósito de los mismos en este tipo celular. Una vez en el interior de la célula, los ácidos grasos son reesterificados para formar TG. La proteína transportadora de ácidos grasos aP2 se encarga de movilizar los AGL en la fase acuosa del citosol dirigiéndolos a los organelos para su esterificación.

La lipogénesis a partir de sustratos no lipídicos, principalmente glucosa, inicia cuando el metabolito ingresa al adipocito mediante el transportador de glucosa GLUT-4, el cual está regulado por insulina, sufriendo oxidación vía glicolítica a acetil-CoA, para ser transformada a malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC), para que la enzima ácido graso sintetasa (FAS) la convierta en acil-CoA, para ser esterificada en

retículo endoplásmico a TG. Finalmente, los TG son translocados al interior de la gota lipídica [Large et al., 2004].

Sin embargo, también se puede llevar a cabo el proceso de lipólisis en el adipocito, proporcionando AGL y glicerol a otros tejidos tales como el hígado, músculo esquelético, riñón y miocardio. La hidrólisis de los TG inicia con la acción de la enzima adiposo-triglicérido lipasa (ATGL) que es un efector en el control de la lipólisis [Xu et al., 2013], dando como productos DAG a los cuales la enzima lipasa sensible a hormonas (HSL) los hidroliza a MAG, los que finalmente son hidrolizados a AGL y glicerol por la monoacilglicerol lipasa (MGL). La lipólisis mediada por HSL es activada por fosforilación de la proteína cinasa A (PKA) dependiente de AMP cíclico (cAMP), que además puede ser estimulada por glucagón y catecolaminas, que al unirse a su receptor activan a proteínas G estimuladoras y, por tanto a la adenilato ciclasa para la formación de cAMP, mientras que su degradación es regulada por fosfodiesterasas o proteínas G inhibitoras [Moreno et al., 2002; Langin, 2006]. La activación de los receptores β -adrenérgicos también inducen la lipólisis, por ejemplo, las células de grasa visceral son más sensibles a la activación de los receptores β -adrenérgicos en comparación con los adipocitos subcutáneos [Frigolet et al., 2008]. Otras vías de señalización que pueden estimular lipólisis en el adipocito son la cinasa de proteína activadas por mitógenos (MAPK), la vía de las cinasas de Janus y los activadores de la transcripción y transductores de señales (JAK-STAT), y las cinasas reguladas por señales extracelulares (Figura 4) [Xu et al., 2013].

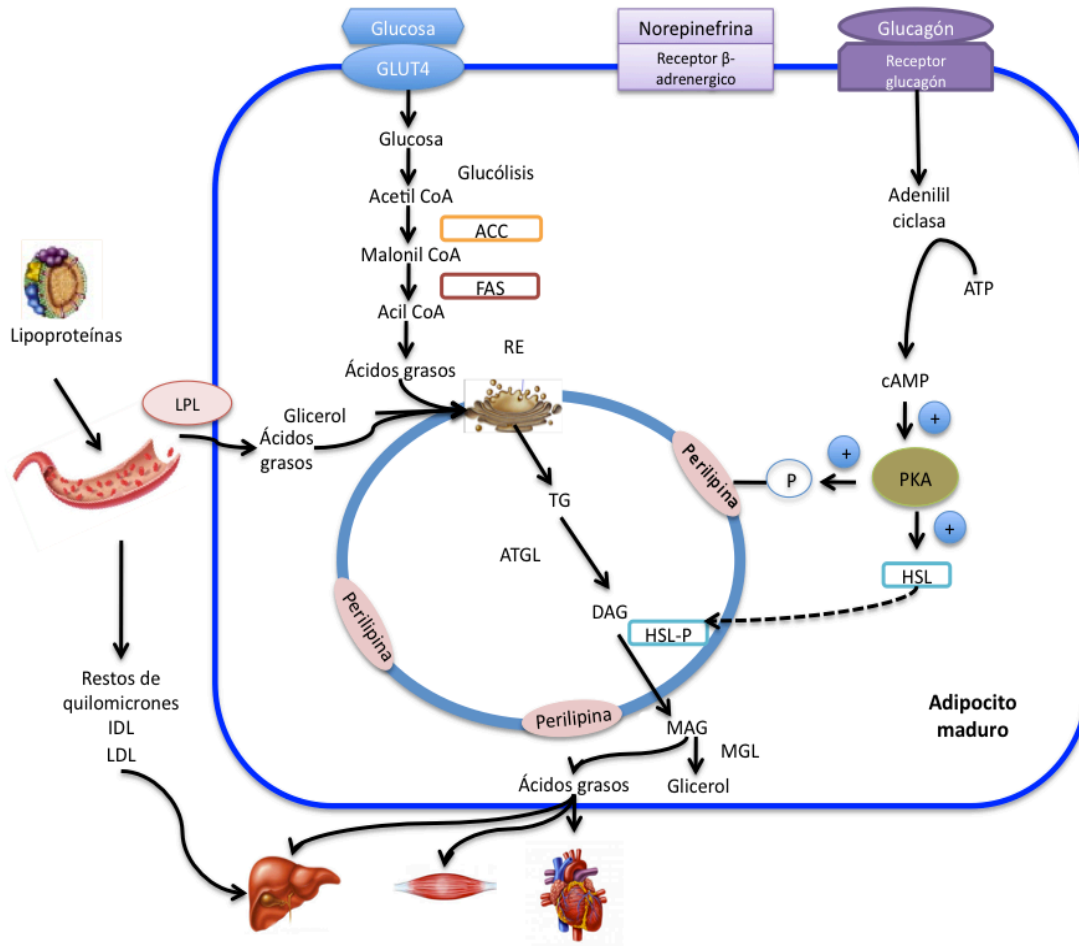


Fig. 4. Lipogénesis y lipólisis. El exceso de glucosa es oxidada a través de la vía glucolítica a acetil-CoA, en el adipocito convirtiéndose posteriormente en acil-CoA, que es esterificada en RE para formar TG, los cuales son almacenados en la gota o droplet lipídico. Los ácidos grasos obtenidos a partir de la hidrólisis de lipoproteínas también son esterificados para formar TG. En condiciones de ayuno, la hidrólisis de los TG inicia con las enzima ATGL, y HSL quien se transloca a la gota de lípidos induciendo la hidrólisis de los DAG a MAG, donde este último producto es hidrolizado por la acción de MGL a AGL y glicerol. Tomado y modificado de Frigolet et al., 2008.

Tejido adiposo y síndrome metabólico

Un incremento en la masa grasa abdominal, ya sea visceral o subcutánea, parece tener un papel importante para la patogénesis no solamente de la resistencia a la insulina sino también de la dislipidemia, intolerancia a la glucosa, hipertensión, estado de hipercoagulabilidad y el riesgo cardiovascular asociándose a un estado de inflamación crónica [Eckel et al., 2005; Kanda et al., 2006; Després y Lemieux, 2006; Frigolet et al., 2008; Vigouroux et al., 2011].

La fisiopatología del síndrome metabólico es compleja y están involucradas diferentes adipocinas en la homeostasis metabólica. Se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias, actúan en hígado, provocando cambios en la producción y la liberación de las lipoproteínas, los factores de coagulación y las moléculas inflamatorias. En particular, inducen el aumento de las lipoproteínas VLDL, apolipoproteína B (apoB) y TG, induciendo efectos aterogénicos [Kershaw y Flier, 2004; Coppak, 2005; Curat et al., 2006; Balistreri et al., 2010; Makki et al., 2013]. Por ejemplo IL-6, una citocina proinflamatoria secretada por TA visceral pero no por el subcutáneo, parece inducir resistencia a insulina por una alteración de la señalización hepática a través de la expresión de los supresores de la señalización de citocinas (SOCS-3), que tienen la capacidad de inhibir a los sustratos del receptor de insulina (IRS-1), e inducir la degradación proteosomal de las proteínas IRS y el factor de transcripción PKB/Akt, además de inducir la secreción hepática de TG y la gluconeogénesis [Cases y Barzilai, 2000; Balistreri et al., 2010]. El TNF- α es otra adipocina proinflamatoria que se encuentra

en niveles altos durante el síndrome metabólico, induce la lipólisis, activa las isoformas inflamatorias de MAPK cinasas y disminuye la actividad de IRS-1 al inducir su fosforilación en residuos serina, la expresión del transportador de glucosa (GLUT4) y los niveles de adiponectina en el TAB al igual que IL-6.

También está descrito que en el síndrome metabólico se presentan cambios en los niveles de leptina, donde su acción puede inhibirse por SOCS-3 y favorecer la inhibición de la entrada de ácidos grasos a la mitocondria y consecuentemente una ausencia de la oxidación de AGL, produciendo el incremento y almacenamiento de TG en tejidos no especializados para su resguardo. En procesos inflamatorios, leptina favorece la actividad fagocítica de los macrófagos y la producción de citocinas proinflamatorias. Otra adipocina, visfatina, incrementa en TA visceral durante el síndrome metabólico, donde estimula el metabolismo lipídico y la respuesta inflamatoria mediante el aumento de los niveles de IL-6 e IL-8 [Eckel et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Curat et al., 2006; Cave et al., 2008; Santos et al., 2012; Bluhër, 2012; Makki et al., 2013].

En contraste, adiponectina, una adipocina antiinflamatoria es considerada como un marcador de resistencia a insulina, puesto que en obesidad causada por resistencia a insulina y dislipidemias, así como en el síndrome metabólico sus niveles se encuentran disminuidos. Un aumento en la concentración de esta adipocina pueden reducir la producción de glucosa en tejido hepático e incrementar la oxidación de AGL, mientras que en músculo aumenta la oxidación de AGL es decir, adopta un papel antidiabético; también, puede incrementar la producción de óxido nítrico en células endoteliales, actuando como un antiinflamatorio. Por último, apelina, puede tener un

pape benéfico en el síndrome metabólico restableciendo la tolerancia a la glucosa, sugiriendo su uso para el tratamiento de resistencia a insulina [Eckel et al., 2005; Sánchez et al., 2005; Curat et al., 2006; Cave et al., 2008; Santos et al., 2012; Bluhër, 2012; Makki et al., 2013].

Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal contaminante ubicuo del ambiente que es ampliamente utilizado en la industria, se considera como un carcinogénico de tipo 1 de acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer [Álvarez et al., 2007, Prozialeck y Edwards, 2010; Kawakami et al., 2010; ATSDR 2012]. El Cd tiene un tiempo de vida media en el organismo de 15 a 20 años [Jin et al., 2004; Klaassen et al., 2009]. Para la población general los alimentos constituyen la fuente mayoritaria de exposición al metal y el consumo de cigarro y la exposición laboral incrementan su acumulación en el organismo. Se ha descrito que la administración crónica y aguda de Cd genera daño en órganos como hígado, riñón, pulmón, testículos, ovarios y sistema nervioso central [Bagchi et al., 1997; Álvarez et al., 2007; Larregle et al., 2008; Wang et al., 2012]. A demás la administración de Cd en animales produce cambios en el metabolismo de carbohidratos y particularmente en los niveles plasmáticos de diferentes lípidos. Diferentes autores han descrito aumentos plasmáticos en los niveles de TG, colesterol, VLDL, LDL y disminución en los niveles de fosfolípidos y HDL [Han et al., 2003; Álvarez et al., 2007; Larregle et al., 2008; Klassen et al., 2009; Rogalska et al., 2009; Kawakami et al., 2010; Lucia et al., 2010; Olisekodiaka et al., 2011; Wang et al., 2012]. En humanos y animales de experimentación produce intolerancia a la glucosa, resistencia a insulina, procesos

diabetogénos, dependiendo de la dosis de exposición, tiempo y vía de administración [Merali y Singhal, 1980; Prozialeck y Edwards, 2010; Lucia et al., 2010]. Además, produce una disminución en la secreción de leptina, adiponectina, resistina, Peg1/Mest y PPAR γ 2 en TA, así como de los receptores GLUT-4 y de insulina, pero aumenta la actividad de fosfodiesterasa y el transporte de glucosa mediado por GLUT-1 en adipocitos de rata [Ezaki et al., 1989; Fickova et al., 2003; Han et al., 2003, Kawakami et al., 2010]. Al parecer el mecanismo de daño incluye la presencia de estrés oxidativo que es mediado por la producción incrementada de especies reactivas de oxígeno (ROS), inflamación, alteraciones en la síntesis de lípidos y lipoperoxidación causada por la acumulación de peróxido de hidrógeno, así como irregularidades en la superficie de las membranas, cambios que conducen a alteraciones en la permeabilidad de las células en diferentes órganos [Harrison et al., 1991; Bagchi et al., 1997; Álvarez et al., 2007; Larregle et al., 2008, Rogalska et al., 2009].

La importancia del efecto tóxico del Cd sobre los lípidos radica en el hecho que éstos son componentes de las membranas celulares que actúan como una barrera entre la célula y su entorno, y también participan en la señalización celular. Estudios previos han descrito que la administración de Cd a ratas produce una disminución en cerebro de colesterol libre, fosfatidiletanolamina y otros lípidos implicados en la mielinización [Kumar, et al., 1996]. Aunado a los cambios en el metabolismo lipídico, se ha mostrado que la exposición aguda de Cd en ratones produce la acumulación del metal en el TA y disminuye la expresión de PPAR γ y C/EBP, datos que sugieren una alteración en la diferenciación de adipocitos, que se ve reflejada en un aumento en el

número (hiperplasia) y una disminución del tamaño de los adipocitos (hipotrofia) [Kawakami et al., 2010].

Los iones Cd se caracterizan por una alta afinidad por los grupos sulfhidrilo de las estructuras biológicas, un alto porcentaje de este metal se encuentra en el organismo (humano o animal) unido a una pequeña proteína rica en aminoácidos cisteína denominada metalotioneína (MT). Las MTs desempeñan un papel de protección cuando se produce un incremento celular de metales divalentes y ROS. Trabajos previos han descrito que el TA es capaz de expresar MT por estímulos adrenérgicos [Trayhurn et al., 2001; Klaassen et al., 2009; Thirumoorthy 2011].

Metalotioneínas

Las MTs son proteínas de bajo peso molecular, menor a 7 kDa, termoestables con capacidad de unir metales. Estas proteínas fueron descubiertas en el año 1957 por Margoshes y Vallee, en riñón de caballo. Tienen como característica en su secuencia aminoacídica, la distribución de residuos cisteinil altamente conservados, presentando enlaces Cys-X-Cys, Cys-Cys y Cys-X-Y-Cys, donde X y Y representan aminoácidos diferentes de cisteína [Brambila y Lozano, 1999; Thirumoorthy et al., 2011; Haynes et al., 2013].

Estructuralmente la proteína se encuentra formada por dos dominios globulares similares denominados α y β , unidos por un *loop* o asa flexible [Vasak y Hasler, 2005]. El dominio α está localizado en el extremo carboxilo terminal que comprende a los

aminoácidos (a.a.) del 31 al 61, contiene 11 Cys capaces de unir 4 átomos de Zn coordinados en forma tetraédrica que se distorsiona en forma de mariposa insertada en dos anillos de 6 átomos sobrepuestos entre sí. El dominio β está localizado en el extremo amino terminal, comprende a los a.a. del 1 al 31, contiene 9 Cys capaces de ligar 3 átomos de Zn formando un triangulo equilátero con un anillo de 6 átomos que se adapta a la configuración de silla (Figura 5) [Winge y Moklossy, 1982; Nielson et al., 1985].

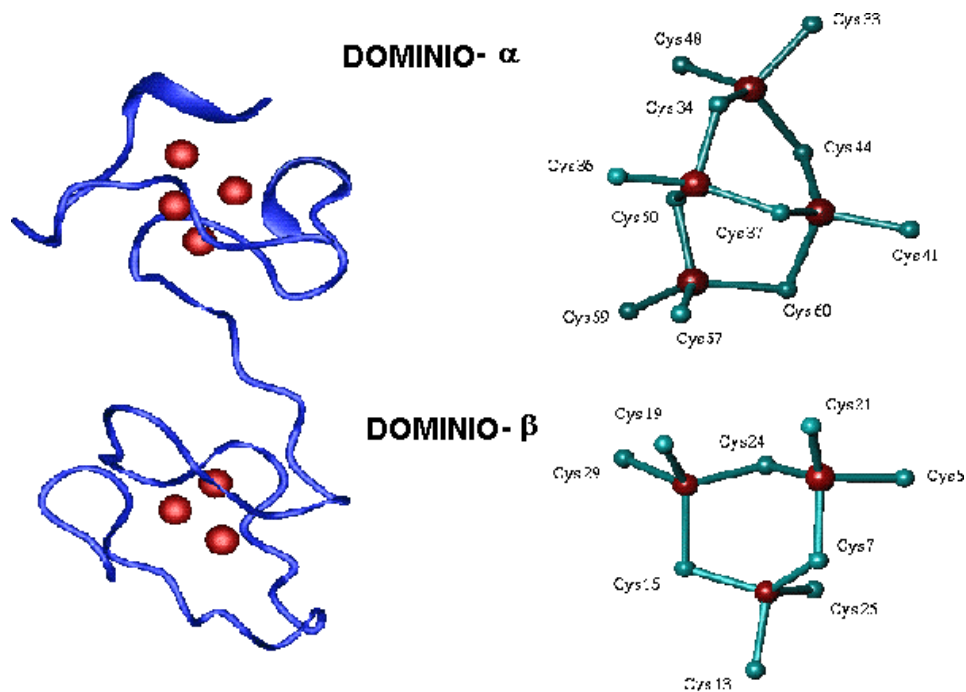


Figura 5 Estructura de los dominios de MT de mamífero. Representación esquemática y tridimensional de Zn_7 -MT. En rojo se observan los átomos de Zn y dos dominios globulares unidos por un puente de aminoácidos. Modificado de Hamer 1986, y tomado y modificado de la página creada por el departamento de bioquímica de la universidad de Zurich. <http://www.zurich.ch/~mtpage/MT.html>.

En los mamíferos las MTs contienen principalmente Zn, pero son capaces de ligar un total de 7 átomos de Zn o Cd, 12 Cu, y de 10-12 de Au y Ag por mol de proteína

en los dominios α y β . Los tejidos que exhiben la mayor concentración de MTs son: hígado, riñón, páncreas e intestino. A nivel celular las MTs se localizan principalmente en el citoplasma, sin embargo, diferentes estudios han mostrado su presencia en el interior de lisosomas y en el núcleo. Su concentración es variable y depende de la influencia de varios factores como tipo de organismo, edad, estado de desarrollo, régimen dietético, historia de exposición a metales y presencia de otros factores por identificar [Brambila y Lozano, 1999; Sabolic et al., 2010].

Una de las clasificaciones dadas para las MTs se basa en la existencia de cuatro isoformas (numeradas del 1 al 4). La MT-1 y la MT-2 se expresan en casi todos los tejidos del organismo siendo particularmente importante su presencia en órganos parenquimatosos como hígado, riñón, intestino, testículos, pulmón, corazón, cerebro y TA. La MT-3 está localizada en sistema nervioso central, encontrándose en cerebro y posee una actividad inhibidora del crecimiento celular en cerebro. La MT-4 es localizada en tejidos córneos, estratificados y escamosos de la piel, así como en lengua, la parte superior del tracto digestivo y tracto vaginal [Brambila y Lozano, 1999; Garcia-Rico et al., 1999; Haynes et al., 2013].

Las MTs son altamente inducidas por metales esenciales (Zn, Cu) y no esenciales (Cd, Pb), glucocorticoides, factores de crecimiento, segundos mensajeros, agentes citotóxicos e inflamatorios, vitaminas y por la vía generadora de radicales libres (ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS)) [Sabolic et al., 2010; Haynes et al., 2013].

Actualmente, no se han definido con certeza todas las funciones bioquímicas de las MT, sin embargo, se ha propuesto que juegan un papel importante en el secuestro

de metales pesados (Au, Pb, Cd, Hg, Pb), almacén de biometales como Zn y Cu, antioxidante, captura y eliminación de radicales libres, modulan el sistema inmune, protección contra el daño a DNA, angiogénesis y previenen el desarrollo de obesidad en dietas hipercalóricas [Garcia-Rico et al., 1999; Klaassen et al., 2009; Sato et al., 2010, Thirumoorthy et al., 2011, Kawakami et al., 2013].

Planteamiento del problema

En diferentes modelos de intoxicación agudas y/o crónicas con Cd, tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado que el metal y las MT se acumulan en tejido adiposo. Sin embargo, se conoce poco acerca del efecto de una intoxicación crónica de Cd sobre el perfil lipídico y como afecta al tejido adiposo en su diferenciación, expansión y secreción de adipocinas. Recientemente, el Cd se ha relacionado con el desarrollo de obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y aterosclerosis, procesos íntimamente relacionados con el tejido adiposo, por lo que alteraciones en el crecimiento, desarrollo y función de este tejido pueden estar relacionadas con dichas patologías.

Con base en lo anterior se planteó la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto de la administración crónica de cadmio sobre el metabolismo lipídico, morfología y diferenciación del tejido adiposo en ratas de la cepa Wistar?

Justificación

El Cd es un contaminante ubicuo del medio ambiente, teniendo como principales fuentes de exposición los alimentos, exposición al metal por actividades ocupacionales, y/o el humo del cigarro, siendo el tiempo de vida media en el organismo de 15 a 20 años, por lo que puede interactuar con una gran cantidad de biomoléculas, causando una amplia variedad de efectos adversos, tales como nefrotoxicidad, hepatotoxicidad e inmunotoxicidad, cambios en el metabolismo de la glucosa y los lípidos en humanos y animales de experimentación.

Existen pocos reportes de los efectos que tiene el Cd sobre el tejido adiposo, sin embargo, se conoce que en administraciones agudas, el metal se acumula en el tejido adiposo disminuyendo la expresión de PPAR γ y C/EBP, factores de transcripción implícitos en la adipogénesis, sugiriendo la existencia de una alteración en la diferenciación de los adipocitos, generando un aumento en el número y una disminución del tamaño de los adipocitos. Dichas alteraciones pueden tener efecto sobre la función, estructura del tejido adiposo, que a su vez podrían conducir a cambios en el metabolismo lipídico sistémico.

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionarán información adicional acerca de los cambios en el metabolismo lipídico sistémico, la morfología y diferenciación del tejido adiposo que pueden ser producidos por una intoxicación crónica con Cd.

Hipótesis

Hipótesis nula

La administración crónica de cadmio no afecta la función y morfología de los adipocitos ni el perfil lipídico sistémicos de ratas de la cepa Wistar.

Hipótesis alternativa

La administración crónica de cadmio si afecta la función y morfología de los adipocitos, así como el perfil lipídico sistémico de ratas de la cepa Wistar.

Objetivos

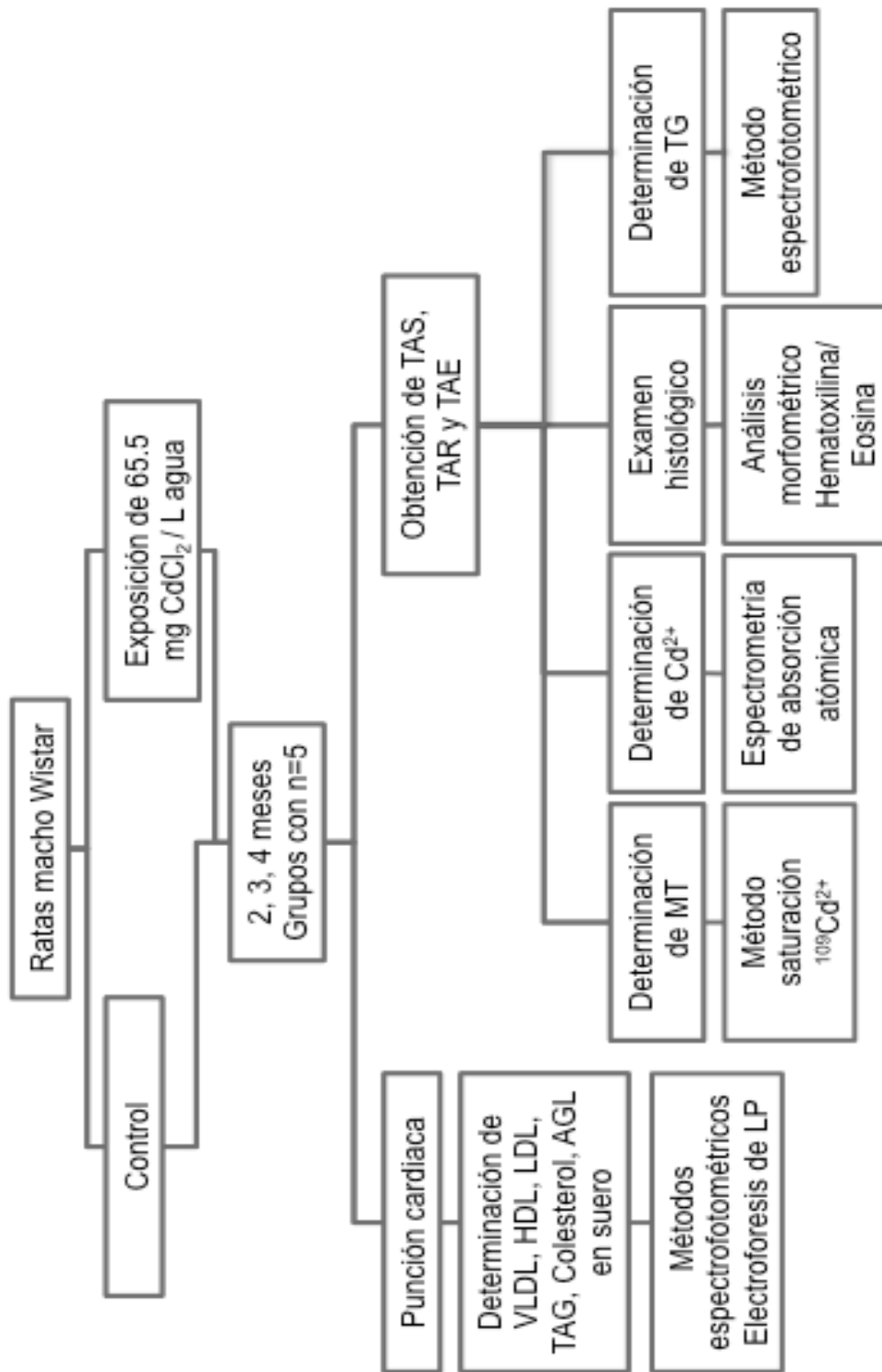
Objetivo general

Evaluar el efecto de la administración crónica de cadmio sobre el metabolismo lipídico sistémico, la morfología y la diferenciación de los adipocitos de ratas de la cepa Wistar.

Objetivos específicos

- Evaluar los niveles de cadmio en tejido adiposo después de la administración crónica del metal a diferentes tiempos.
- Evaluar los niveles de metalotioneína total en tejido adiposo después de la administración crónica de cadmio a diferentes tiempos.
- Determinar si la administración crónica de cadmio tiene efecto sobre la morfología del tejido adiposo.
- Determinar el efecto de la administración crónica de cadmio sobre el metabolismo lipídico sistémico mediante la determinación de los niveles de VLDL, LDL, HDL, colesterol, triglicéridos y ácidos grasos libres en suero.

Diagrama de trabajo



Metodología

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de un mes de edad obtenidas del Bioterio Claude Bernard, BUAP, las cuales fueron alojadas en cajas de policarbonato y lechos de serrín, bajo un ciclo de luz-oscuridad (12-12 h), con encendido de la luz a las 7:00 h, a una temperatura de 21 ± 2 °C y alimento *ad libitum*. Los animales fueron sacrificados a diferentes meses después del tratamiento con CdCl_2 en el agua de consumo, como se indica en el diagrama de trabajo; por cada grupo administrado con Cd se tuvo un grupo al cual no se le administró el metal, denominado grupo control. Todos los procedimientos siguieron las normas de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité institucional para el Cuidado y Uso de Animales. Todos los esfuerzos fueron realizados para minimizar el sufrimiento de los animales.

Una vez que se cumplió el tiempo establecido para la intoxicación crónica con Cd (2, 3 y 4 meses), los animales fueron anestesiados con xilacina/ ketamina, en dosis 0.2 mL/100 g, para poder realizar punción cardiaca y obtener suero y las muestras de tejido adiposo subcutáneo (TAS), perirrenal (TAR) y epididimal (TAE).

Cuantificación de cadmio en tejido adiposo

Para realizar la cuantificación de Cd se pesaron 500 mg de los tejidos adiposos en estudio (TAS, TAR y TAE) y se colocaron en tubos de vidrio 7.5/0.9 cm desionizados; posteriormente se adicionaron 700 μ L de una mezcla 1:1 de ácido nítrico 15.6 M y ácido perclórico al 50 %. Con ayuda de un palillo de madera se mezcló el tejido con los ácidos, incubando la reacción a temperatura ambiente por tres semanas. Por último, 500 μ L de la solución resultante fue diluida con agua desionizada hasta un volumen final de 2 mL para su determinación mediante espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 100). La concentración de Cd fue determinada interpolando la absorción de las muestras en una curva estándar de Cd (0.5, 1.0 y 1.5 ppm de Cd), la cual fue desarrollada paralelamente al ensayo.

Cuantificación de metalotioneína total en tejido adiposo

La cuantificación de MT total se realizó por el método de saturación con ^{109}Cd descrito por Eaton y Toal (1982). Se preparó un homogenizado con 0.5 g de TA en tres volúmenes de Tris-HCl 30 mM, pH 8.0 (Anexo II), después se centrifugó a 12,500 rpm (Eppendorf MiniSpin). En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 100 μ L del sobrenadante del tejido y 100 μ L de una solución de ^{109}Cd (2 μ g de Cd/mL; 3100 μ Ci de ^{109}Cd /mL) y se incubó por 10 min. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de una solución de hemoglobina al 2%. Las muestras fueron incubadas a 100 °C por 1 min y

posteriormente se enfriaron en hielo para ser centrifugadas a 10,000 g (HANIL Micro-12) por un minuto a temperatura ambiente, repitiéndose este procedimiento 2 veces. Al final del análisis el sobrenadante resultante que contiene exclusivamente ^{109}Cd unido a MT, se midió con un lector de centelleo gamma (Perkin Elmer 1470 Automatic Gamma Counter).

Examen histológico

El análisis morfométrico se realizó mediante la tinción de hematoxilina y eosina tanto en tejidos de animales control como animales con 2, 3 y 4 meses de administración de Cd. Las ratas se anestesiaron con xilacina/ketamina y se perfundieron de manera intraventricular con 250 mL de solución salina, se extrajo el TA en estudio (TAS, TAR y TAE) y se mantuvieron en formalina al 10 %.

Análisis morfométrico del tejido adiposo

Inclusión en parafina

Las diferentes muestras de TA fueron procesados en el equipo de inclusión en parafina histoquinette (Leica Microsystems, Walldorf, Germany). Los pasos para el procesamiento de tejido fueron: fijación (formaldehído al 4%), deshidratación con alcoholes (80%, 96% y 100%), aclaramiento (xilol absoluto) y parafina a 56° C. Los tejidos fueron colocados en bloques utilizando casetes de plástico.

Cortes histológicos

Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo rotatorio tipo Minot (Leica RM 2135, Nussloch, Germany), obteniendo cortes de 4 micras de grosor; las preparaciones histológicas se depositaron en portaobjetos con poli-L-lisina y finalmente fueron fijadas con calor en una plancha con termostato a 56-58 °C.

Tinción hematoxilina y eosina (HE)

Antes de realizar la tinción HE se hizo el desparafinado de los cortes histológicos en horno a 60 °C durante 30 min. Las laminillas fueron sumergidas en xilol durante 5 min en dos ocasiones, después en una mezcla 50-50% de alcohol absoluto-xilol, realizando 10 lavados. Posteriormente, las laminillas se lavaron 10 veces en alcohol absoluto, en dos ocasiones, seguido de 10 lavados en alcohol al 96% dos veces. Las laminillas se sumergieron en agua de grifo por 5 minutos, después se dejaron en hematoxilina de Harris por 10 min y se lavaron durante 5 minutos con agua de grifo, seguido de un baño en alcohol ácido (Anexo III). Posteriormente se sumergieron en carbonato de litio (Anexo III) en donde se dejó hasta virar y se lavaron con agua de grifo. Después, se realizaron 20 baños en eosina amarillenta, se enjuagaron en agua destilada; seguido de 10 lavados en alcohol al 96% en dos ocasiones, 10 lavados en alcohol absoluto en dos ocasiones y 10 lavados en

una mezcla 50-50% de alcohol absoluto-xilol, terminando en xilol por 5 minutos en dos ocasiones.

Por último, se colocó una gota de resina Entellan® como medio de montaje, sobre el portaobjetos y se dejó caer en ángulo agudo un cubreobjetos. Las imágenes digitales de los tejidos adiposos en estudio fueron captadas por una cámara digital Celestron acoplada a un microscopio electrónico Carl Zeiss 1,25x. El análisis del tamaño de las células se realizó midiendo el área de 10 células adiposas con ayuda del programa Motic Images PLUS 2.0, analizando tres diferentes tramos del corte por laminilla, de tres muestras y por grupo. Por otro lado, se realizó el conteo de células en las secciones de TA analizando un área de 0.359 mm² determinada en el programa Motic Images PLUS 2. El análisis se realizó en tres diferentes tramos del corte por laminilla por muestra y por grupo con ayuda del programa Image J [Frigolet et al., 2011].

Cuantificación de triglicéridos en tejido

Se realizó una extracción de lípidos totales de los tejidos mediante el método de Folch (1956), donde se homogenizó 0.5 g de tejido (adiposo o hepático) con una solución 2:1 de cloroformo-metanol a una dilución final de 20 veces la muestra de tejido, dicho homogenado fue filtrado con papel libre de grasa. Posteriormente, el extracto crudo fue mezclado con 0.2 su volumen con una solución de cloroformo-metanol-CaCl₂ (Anexo IV) y se centrifugó (Thermo SCIENTIFIC IEC CL40R) por 20 min a 2,400 rpm a 4 °C, como paso final, se retiró cuidadosamente la fase superior, entendiendo que la fase inferior contiene los lípidos totales provenientes del tejido.

La cuantificación de TG se llevó a cabo utilizando el kit de determinación cuantitativa de triglicéridos IVD (SPINREACT, Anexo V).

Evaluación del perfil lipídico sistémico

Para realizar la evaluación del perfil lipídico sistémico se tuvo como muestra suero obtenido de los animales control y problema. La determinación de TG, colesterol, colesterol-VLDL, colesterol-LDL, colesterol-HDL y fosfolípidos se realizaron por métodos enzimáticos (Kits SPINREACT, Anexo V-IX).

Determinación cuantitativa de ácidos grasos libres

La determinación de AGL se realizó siguiendo el método modificado de Soloni y Sardina (1973) [Brunk y Swanson, 1981]. En un tubo de vidrio se colocó 1 mL de cloroformo, 150 μ L de solución de cobre (Anexo XII) y 50 μ L de suero de animales control o problema; se mezcló la reacción por 10 min con ayuda de un vórtex (Thermolyne 37600 Mixer), después se centrifugaron (IEC CL40R, Thermo Scientific) a 4,000 rpm a 4 °C por 10 min. En otro tubo de vidrio se colocó 500 μ L de la fase clorofórmica (fase inferior) y se adicionó 1 mL de reactivo de cuprizona (Anexo XII) mezclando suavemente, después se añadió 100 μ L de solución de amonio y se volvió a mezclar, la reacción se dejó incubar por 10 min a temperatura ambiente. Por último, la reacción se leyó en un espectrofotómetro (Lambda E2150, PerkinElmer) a 620 nm contra un blanco de reacción.

Electroforesis en geles de poliacrilamida para lipoproteínas

La resolución electroforética de las muestras séricas preteñidas con el colorante rojo oleoso O (ORO) se efectuó en un sistema discontinuo de pH en tres geles de diferente concentración de poliacrilamida (Frings et al., 1971). En tubos de 7 × 75 mm se añadió gel al 3.85 % de una mezcla de acrilamida/bis-acrilamida preparado al momento (Anexo X) y posteriormente se colocó cuidadosamente agua destilada en la parte superior del tubo para evitar la formación de un menisco cuando polimeriza el gel. La polimerización se efectuó en un periodo de tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente, después, se invirtieron los tubos y se dejaron secar sobre un papel absorbente. Se añadió el gel al 3.125 % de una mezcla de acrilamida/bis-acrilamida a cada tubo volviendo a recubrir cuidadosamente con agua durante 10 minutos a temperatura ambiente. Completada la polimerización, se invirtieron los tubos y se secaron sobre un papel absorbente. Se depositó 100 µg de lípidos totales (cuantificados mediante el método enzimático de SPINREACT, Anexo XI) de suero y gel superior (Anexo X) en cada tubo, se mezcló cada tubo por inversión y se depositó una capa de buffer de corrimiento electroforético. Los tubos fueron colocados en la cámara electroforética, a la cual se le añadieron alrededor de 200 y 300 mL de buffer de corrimiento electroforético a los compartimientos superior e inferior de la cámara. La migración electroforética se realizó durante 35 minutos a 5 mA por tubo. Los productos de la electroforesis de lipoproteínas fueron analizados por densitometría con el programa Image J.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa Excel 2007 para Windows (Microsoft Office Enterprise 2007). Todos los resultados se presentan como la media \pm EEM. Los datos para la comparación de los estudios se analizaron mediante análisis “*t*” de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

Resultados

Concentración de Cd en tejido adiposo

El contenido de Cd almacenado en los tejidos adiposos en estudio (TAS, TAR y TAE) a los dos, tres y cuatro meses de exposición al metal se encontraron por debajo de los límites de detección (0.1 ppm) del espectrofotómetro de absorción atómica de llama (Perkin Elmer Analyst 100).

Concentración de MT en tejido adiposo

La administración crónica de CdCl_2 (65.5 mg de CdCl_2/L en el agua de beber), produjo un aumento en la concentración de MT a los dos (72.3 %) y cuatro meses (111.3 %) en el TAS (Figura 6A). El TAR siguió el mismo comportamiento que el TAS encontrándose un aumento en los niveles de MT del 110.3% a los dos meses de exposición al metal y de un 46.2 % a los 4 meses de exposición (Figura 6B). Mientras que en TAE únicamente se encontró un aumento del 73.9 % a los cuatro meses de exposición a Cd (Figura 6C). Sin embargo, cabe destacar que los incrementos máximos se encuentran a los dos meses de exposición al metal en los tres tejidos en estudio y que conforme pasa el tiempo de administración de CdCl_2 , hasta llegar a los 4 meses la concentración de MTs tiende a disminuir en los tejidos adiposos viscerales (TAR y TAE).

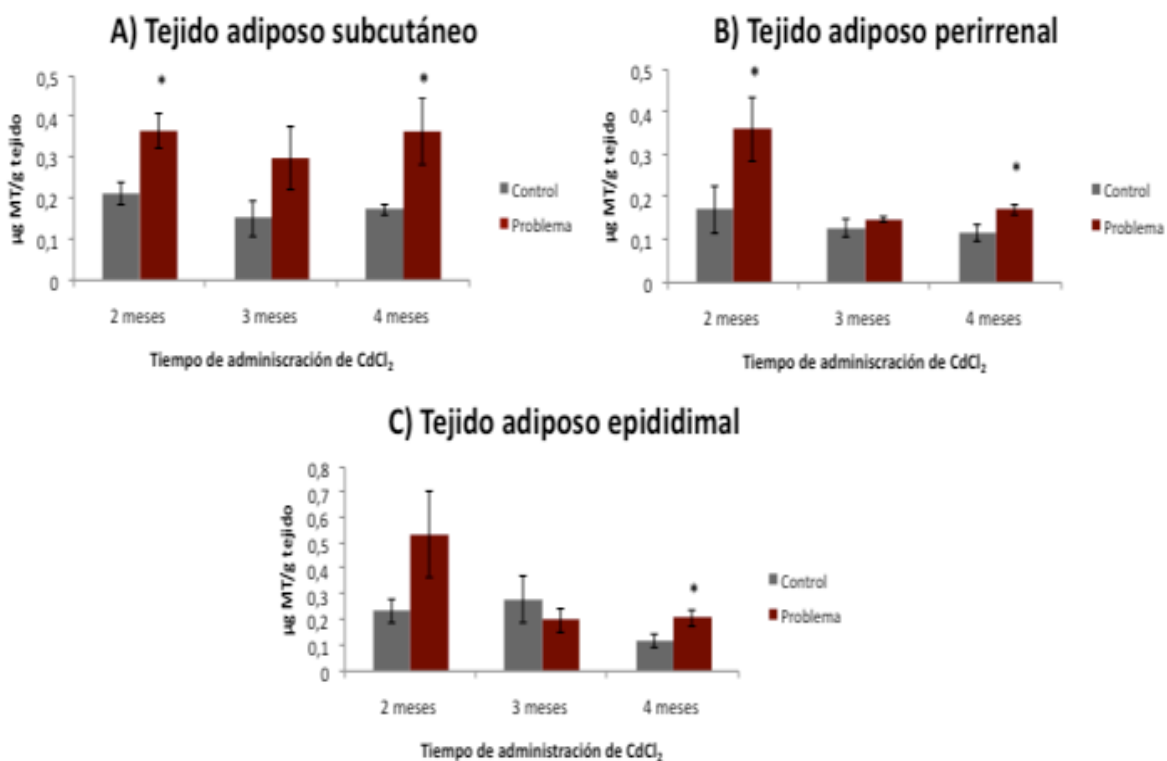


Fig. 6. Efecto de la administración crónica de Cd sobre la concentración de MT total en los diferentes tejidos de estudio. A) En TAS se observa un aumento de la concentración de MT los 2 y 4 meses de exposición al metal. B) En TAR el aumento MT también se presenta a los 2 y 4 meses de exposición al metal. C) En TAE únicamente se presenta aumento en los niveles de MT a los 4 meses de exposición a Cd con respecto a los animales control. Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos \pm el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $p < 0.05$.

Examen histológico

Para caracterizar los cambios en la morfología de los tejidos adiposos ocasionados por la administración de Cd en los animales de experimentación se realizó un análisis morfométrico a partir de secciones de tejido teñidas con hematoxilina/eosina. En la figura 7, se observa que el TAS (Figura A) y el TAR (Figura C) de los animales control a los dos meses de estudio presentan células adiposas con estructura esférica y estructura poliédrica, mientras que los tejidos pertenecientes a los animales con administración con Cd presentan cambios en la morfología, encontrando células esféricas (Figura 7B y 7D). En el TAE, por otro lado, en las muestras de animales control se encuentran células de tipo esférico, y en las muestras de animales con administración con Cd las células adiposas adquieren estructuras poliédricas (Figuras 7E y 7F).

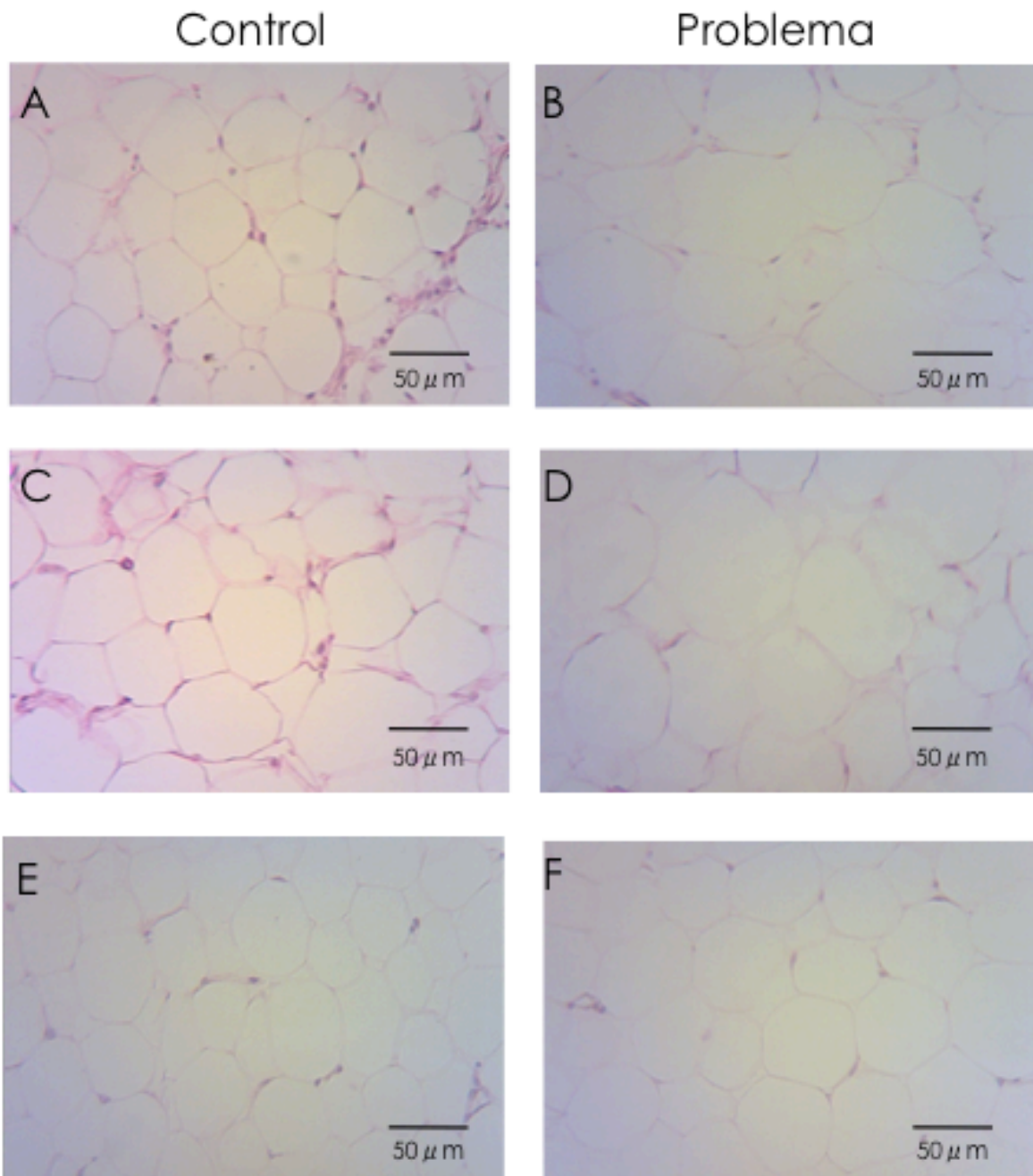


Fig. 7. Efecto de la administración crónica de Cd durante 2 meses sobre la morfología de los tejidos adiposos en estudio. Imágenes microscópicas representativas de los tejidos en estudio teñidas con hematoxilina y eosina, analizadas a 10X. A) tejido adiposo subcutáneo control, B) tejido adiposo subcutáneo problema, C) tejido adiposo perirrenal control, D) tejido adiposo perirrenal problema, E) tejido adiposo epididimal control, F) tejido adiposo epididimal problema.

A los dos meses de administración de Cd no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de adipocitos en los tejidos en estudio (Figura 8A), por otro lado, el tamaño de los adipocitos aumenta en TAS, en un 64.9 % en el área de los adipocitos, mientras que en TAR el aumento es del 61.5 % en el área de los adipocitos en comparación con muestras del tejido control (Figura 8B).

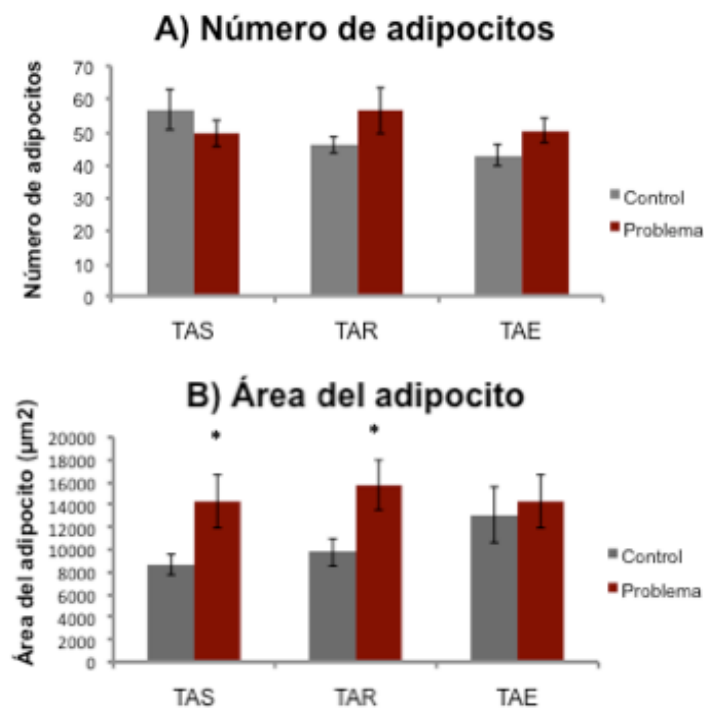


Fig. 8. Efecto de la administración crónica de Cd durante 2 meses sobre el número y área de los adipocitos. A) número de adipocitos presentes en un área de 0.359 mm^2 de los tejidos en estudio de animales control y administrados crónicamente con Cd, B) Área de los adipocitos de los diferentes TA en estudio, tanto de animales control como de animales con administración crónica del metal. Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos \pm el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $p < 0.05$.

En la figura 9, se presentan las fotografías de los tejidos adiposos subcutáneo y epididimal de los animales control a los tres meses de estudio (Figuras 9A y 9E). Nuestros resultados indican que sus adipocitos tienen formas esféricas y poliédricas; mientras que en las muestras de TAR los adipocitos son alargados y poliédricos (Figura 9C). Por otra parte, en las muestras de animales administrados durante 3 meses con Cd, los adipocitos del TAS son casi esféricos (Figura 9B). Por otra parte, los adipocitos de TA viscerales (TAR y TAE) presentan estructuras de tipo poliédricas (Figuras 9D y 9F).

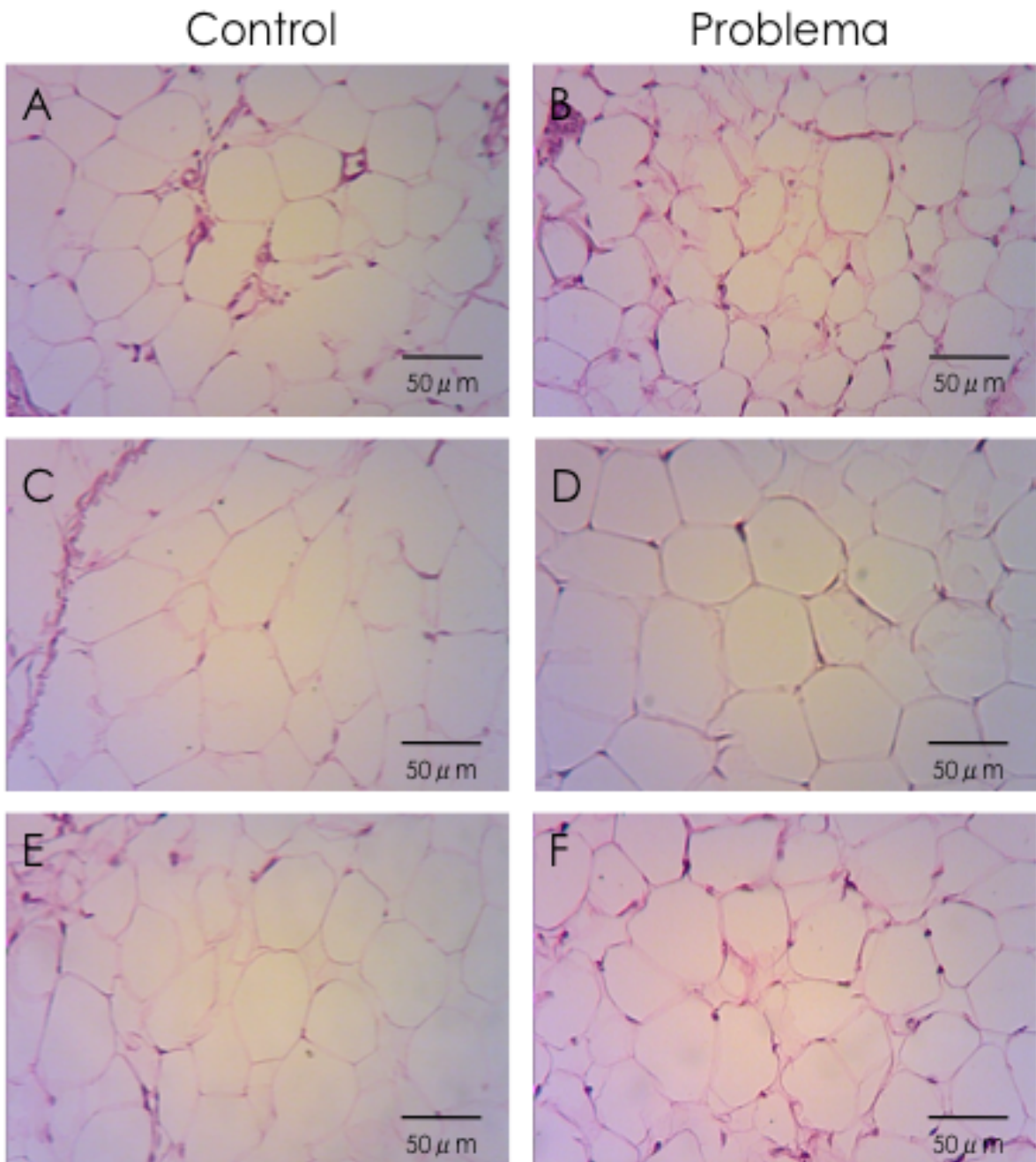


Fig. 9. Efecto de la administración crónica de Cd durante 3 meses sobre la morfología de los tejidos adiposos en estudio. Imágenes microscópicas representativas de los tejidos en estudio teñidas con hematoxilina y eosina, analizadas a 10X. A) tejido adiposo subcutáneo control, B) tejido adiposo subcutáneo problema, C) tejido adiposo perirrenal control, D) tejido adiposo perirrenal problema, E) tejido adiposo epididimal control, F) tejido adiposo epididimal problema.

A los tres meses de administración crónica de Cd se encontró un aumento del 43.2 % en el número de adipocitos en TAS, mientras que en los tejidos adiposos viscerales no se encuentran cambios en el número de células adiposas. En cuanto al tamaño de los adipocitos nuestros resultados indican un aumento del 93 % en el diámetro de los adipocitos de TAR, mientras que en TAS y TAE no se presentan cambios (Figura 10).

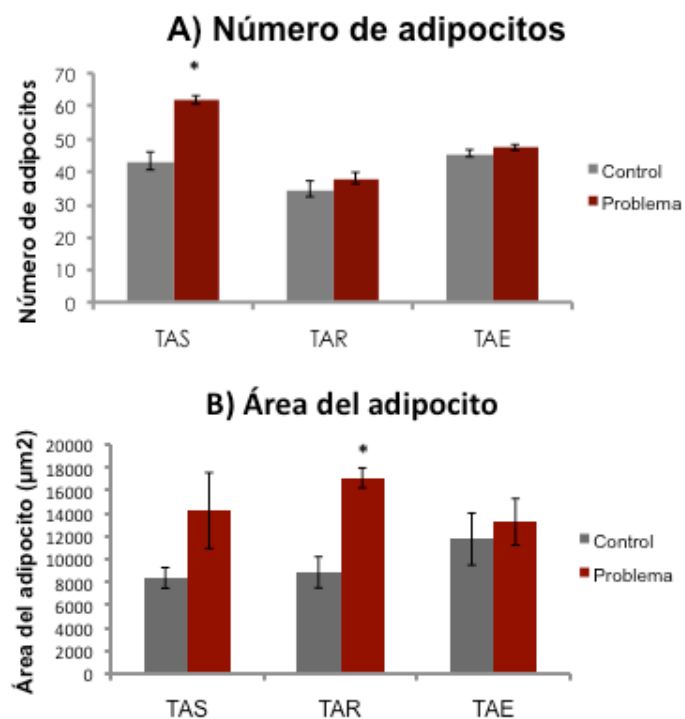


Fig. 10. Efecto de la administración crónica de Cd durante 3 meses sobre el número y área de los adipocitos. A) número de adipocitos presentes en un área de 0.359 mm^2 de los tejidos en estudio de animales control y administrados crónicamente con Cd, B) Área de los adipocitos de los diferentes TA en estudio, tanto de animales control como de animales con administración crónica del metal. Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos \pm el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $p < 0.05$.

En la figura 11 se presentan los resultados obtenidos de los tejidos adiposos en estudio a los 4 meses. Los adipocitos del TAS de animales control presentan células con estructura poliédrica (Figura 11A); por otro lado las muestras obtenidas de animales administrados crónicamente con el metal cambian su morfología, encontrando células con estructura poliédrica (Figura 11B). Además, se observa un cambio morfológico muy marcado en el TAR y el TAE, los adipocitos adquieren formas irregulares tanto en animales sin la administración de Cd, como en animales administrados con el metal, lo que sugiere que estos cambios pueden estar más relacionados con la edad de los animales (Figuras 11C, 11D, 11E y 11F).

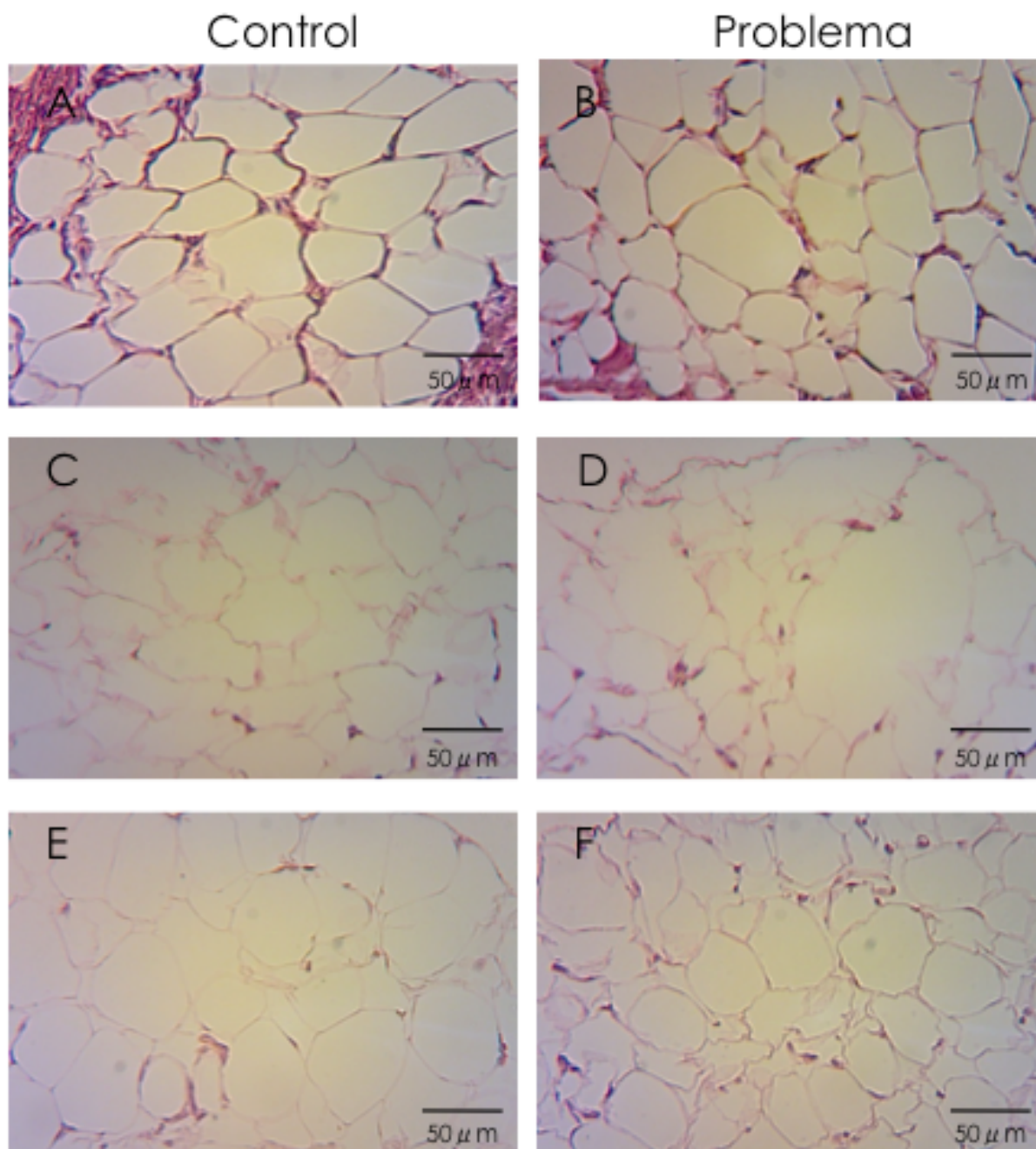


Fig. 11. Efecto de la administración crónica de Cd durante 4 meses sobre la morfología de los tejidos adiposos en estudio. Imágenes microscópicas representativas de los tejidos en estudio teñidas con hematoxilina y eosina, analizadas a 10X. A) tejido adiposo subcutáneo control, B) tejido adiposo subcutáneo problema, C) tejido adiposo perirrenal control, D) tejido adiposo perirrenal problema, E) tejido adiposo epididimal control, F) tejido adiposo epididimal problema.

Por otra parte, se encontró un aumento en el número de adipocitos en los tres tejidos en estudio, en TAS se presenta un aumento del 20.3 % en el número de adipocitos de animales expuestos, en TAR un 11.7 % y en TAE el aumento del número de adipocitos fue de 16.9 % (Figura 12A). En cuanto al tamaño de los adipocitos nuestros resultados indican un aumento del 25.5 % en el área de los adipocitos de TAR y un 25.8 % en TAE de animales expuestos en comparación con animales que no fueron expuestos al metal (Figura 12B).

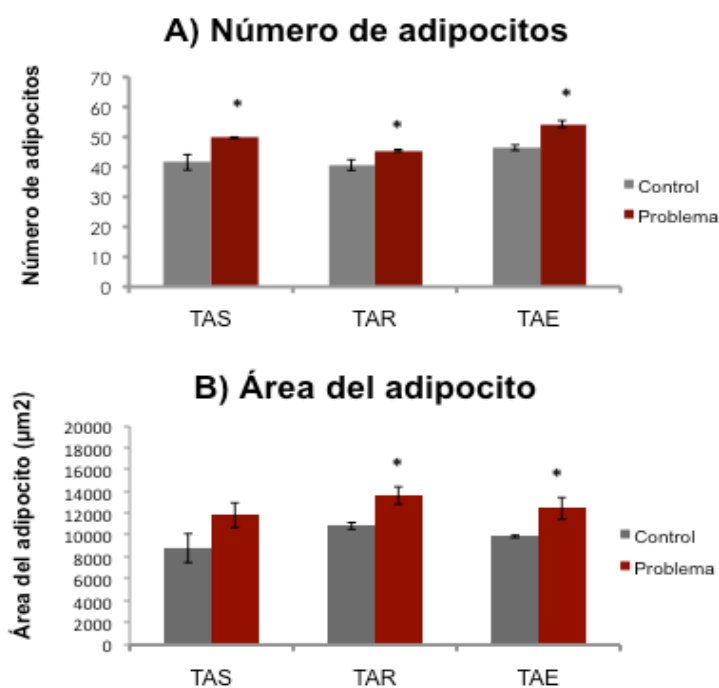


Fig. 12. Efecto de la administración crónica de Cd durante 4 meses sobre el número y área de los adipocitos. A) número de adipocitos presentes en un área de 0.359 mm² de los tejidos en estudio de animales control y administrados crónicamente con Cd, B) Área de los adipocitos de los diferentes TA en estudio, tanto de animales control como de animales con administración crónica del metal. Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos ± el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas p<0.05.

Concentración de triglicéridos en el tejido adiposo

En la figura 13, se observa que a lo largo de los meses de administración crónica de Cd los niveles de TG incrementan en los tres tejidos en estudio. En TAS se encuentran aumentos en un 13.5 %, 46.1 % y 32.9 % a los dos, tres y cuatro meses de administración de Cd, respectivamente. En TAR aumentos en un 46.9 %, 22.9 % y 15.9 % a los diferentes tiempos de estudio. Por último, se observa un incremento de 9.6 %, 22.9 % y 30.6 % a los dos, tres y cuatro meses de administración del metal en TAE. Las diferencias más evidentes se encuentran a los tres y cuatro meses de exposición al metal en TAS y TAR, mientras que en TAE solo se presenta a los cuatro meses de administración a Cd, en comparación con los tejidos de animales control.

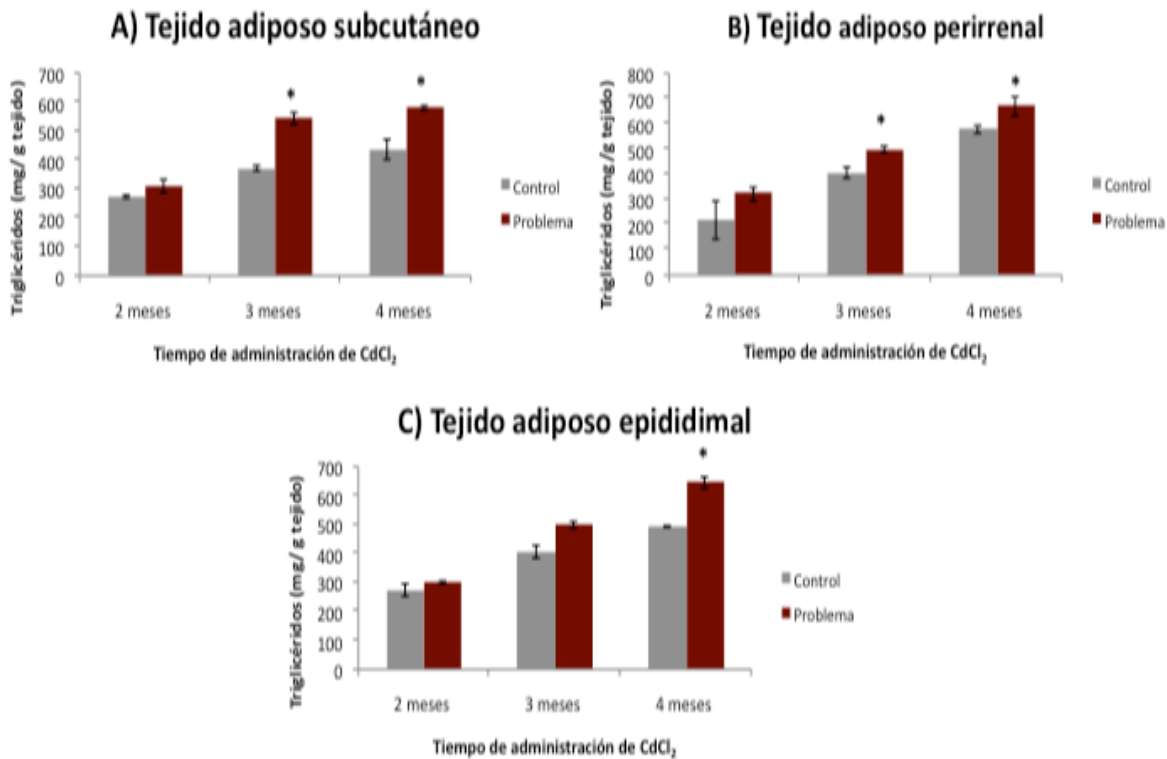


Fig. 13. Efecto de la administración crónica de Cd sobre las concentraciones de TG en TAS, TAR y TAE. Se realizó la extracción de lípidos de los diferentes tejidos adiposos mediante el método de Folch 1968 y posteriormente se realizó la determinación de TG. En los tres tejidos en estudio A)TAS, B) TAR C)TAE se observa un aumento en las concentraciones de TG dependiente del tiempo de administración de Cd, Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos \pm el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $p < 0.05$.

Evaluación del perfil lipídico sistémico

El perfil lipídico sistémico mostró cambios en los animales administrados de forma crónica con Cd (Figura 14). Los resultados obtenidos mostraron un aumento en los niveles de colesterol total (17.2 %, 23.3 % y 30.9 %), TG (52.6%, 89.8 % y 68.3 %) y las lipoproteínas LDL (16.1 %, 27.4 % y 41.22 %) y VLDL (59 %, 85.8 % y 167.4 %) de los animales con exposición al metal a los dos, tres y cuatro meses de estudio respectivamente, comparados con sus grupos control. Los niveles de ácidos grasos libres aumentaron en un 43.6 % y 54.8 % a los 2 y 4 meses de administración de Cd. Por otro lado, se presentó una disminución en los niveles de fosfolípidos a los dos (27.3 %), tres (9 %) y cuatro (8.8 %) meses de estudio, mientras que los niveles de la lipoproteína HDL disminuyeron en un 17.5 %, 16.7 % y 33.7 % a los diferentes meses de administración del metal respectivamente evitando el retorno del colesterol no esterificado hacia hígado para su resguardo o excreción.

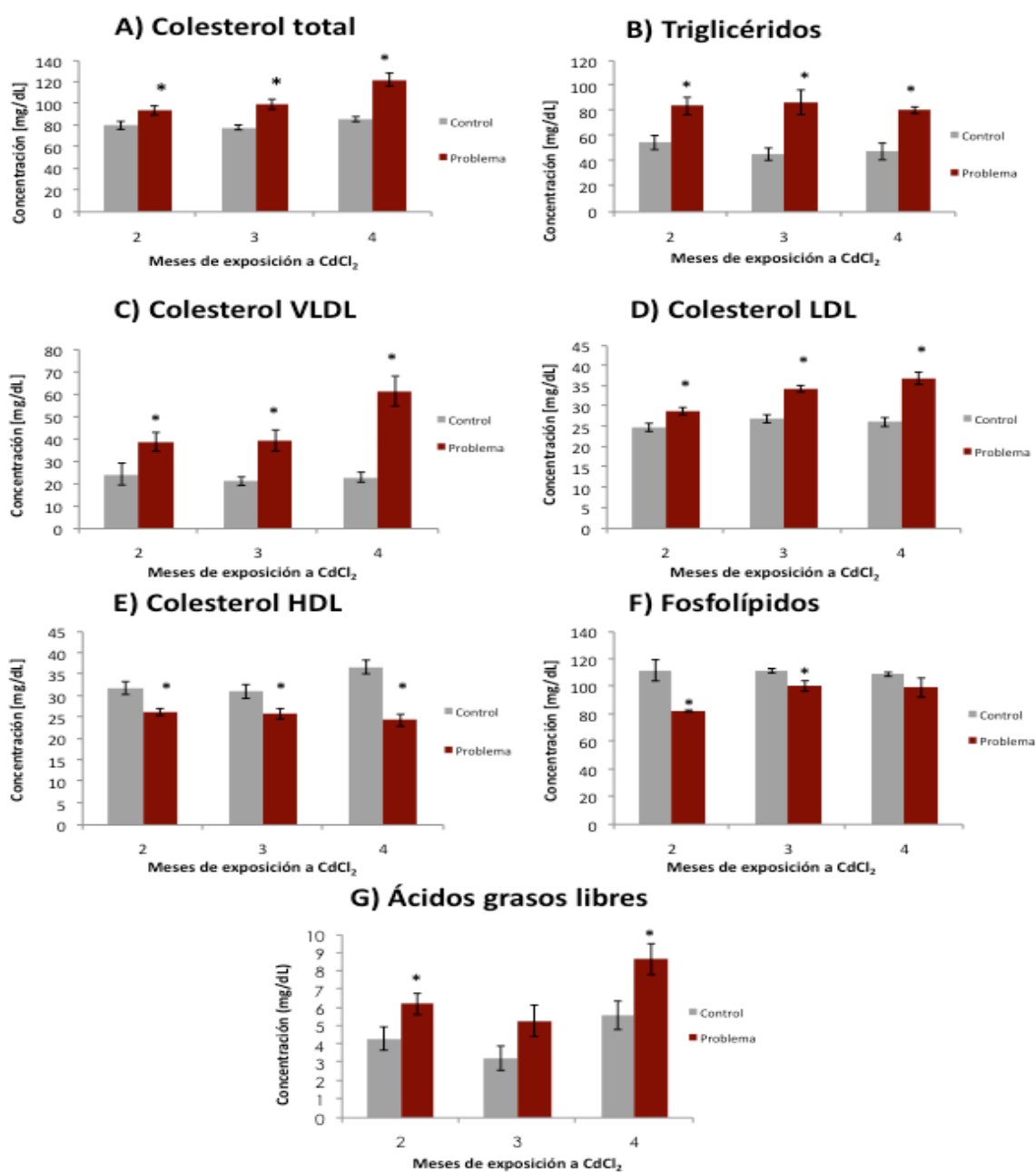


Figura 14. Efecto de la administración crónica de Cd sobre el perfil lipídico sistémico. Se presenta un aumento en las concentraciones séricas de colesterol (A), TG (B), y las lipoproteínas VLDL (C) y LDL (D) dependiente del tiempo de administración de Cd. Las concentraciones séricas de lipoproteína HDL (E) y fosfolípidos (F) disminuyen en los tres diferentes meses de estudio; por último, la concentración de ácidos grasos libres circulantes aumenta dependiendo del tiempo de administración de Cd (G). Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos \pm el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $p < 0.05$.

Otra forma de verificar los cambios producidos por la administración crónica de Cd sobre las lipoproteínas plasmáticas fue con la realización de una electroforesis en disco en geles de poliacrilamida. En la figura 15, se puede observar los patrones de corrimiento representativos de las muestras séricas de animales control (AC2m, BC3m y CC4m) y animales con administración crónica de Cd (AP2m, BP3m, CP4m) a los tres diferentes meses de estudio, teniendo el siguiente comportamiento de migración: los quilomicrones permanecen en el origen (en la carga del gel), seguido de VLDL o lipoproteína prebeta, LDL o lipoproteína beta y HDL o lipoproteína alfa que migra en la posición más avanzada [Frings et al., 1971; Muñiz, 1977, Beaumont et al., 2007, Fernández et al., 2007]. De acuerdo al estudio densitométrico (Figura 15B, D y F), estos resultados muestran que las lipoproteínas VLDL así como las LDL exhiben un aumento en los grupos de exposición a Cd en comparación con el grupo control, mientras que las lipoproteínas HDL disminuyen en los grupos con exposición al metal, resultados que coinciden con los obtenidos mediante las determinaciones bioquímicas.

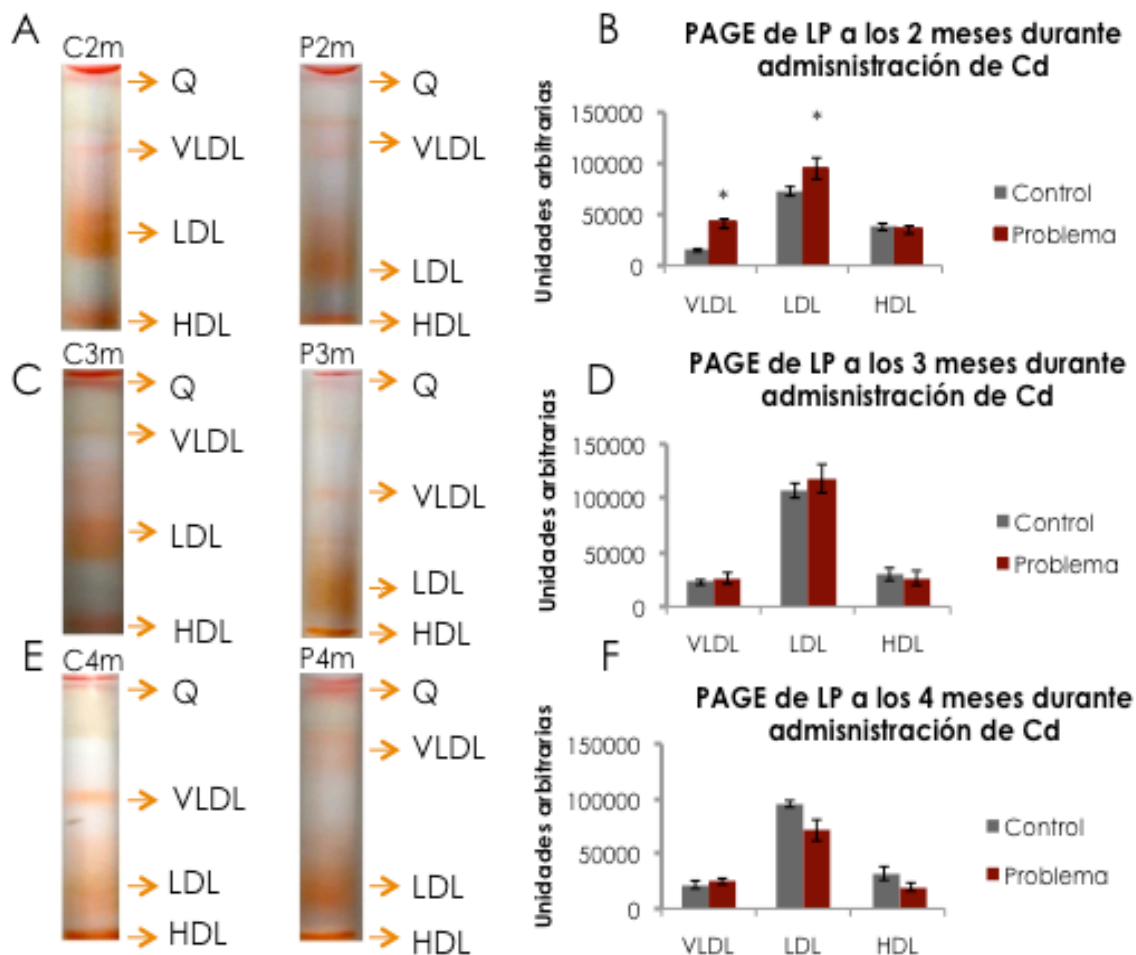


Fig. 15. Efecto de la administración crónica de Cd sobre los perfiles electroforéticos de lipoproteínas. Se realizó electroforesis en gels de poliacrilamida por el método modificado de Frings et al, 1971. (A, C y E) Se utilizaron 100 µg de lípidos totales séricos encontrando el siguiente patrón de corrimiento: quilomicros (Q), VLDL, LDL y HDL. (B, D y F) El análisis densitométrico del corrimiento electroforético se realizó con el programa Image J. Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos ± el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas p<0.05.

Con la finalidad de determinar la movilización de TG, se realizó su cuantificación en tejido hepático, bajo el mismo procedimiento de aislamiento de lípidos totales en tejido, descrito anteriormente. En la figura 16 se muestran los resultados de la

concentración de TG en hígado, en donde es evidente que existe un incremento en el resguardo de TG del 45.1 %, 20 % y 88.2 % a los dos, tres y cuatro meses de administración con Cd respectivamente; condicionando a un proceso de esteatosis hepática de forma dependiente del tiempo de administración del metal.

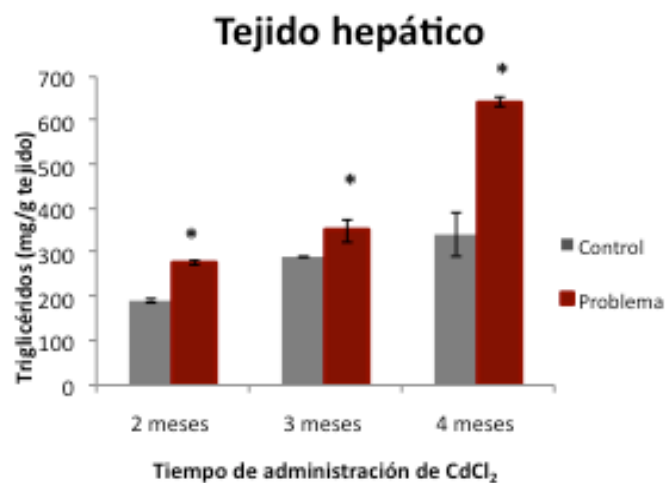


Fig. 16. Efecto de la administración crónica de Cd sobre las concentraciones de TG en tejido hepático. Se realizó la extracción de lípidos de hígado mediante el método de Folch 1968 y posteriormente se realizó la determinación de TAG. Se puede observar que el resguardo de TG aumenta de forma dependiente al tiempo de administración de Cd. Los datos presentados corresponden a la media de los valores medidos \pm el EEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticas $p < 0.05$.

Por último, se inició con el análisis de los niveles del mRNA de PPAR γ 2 obteniendo los resultados preliminares descritos en el anexo I.

Discusión de resultados

Los informes de los efectos de la administración crónica de Cd sobre el metabolismo lipídico sistémico y los cambios en TA son escasos. Se ha demostrado que Cd produce un amplio espectro de efectos toxicológicos y disfunciones bioquímicas, altera el metabolismo de la glucosa y de lípidos, y la composición lipídica en diferentes órganos como hígado y testículos; siendo el mecanismo propuesto de daño el aumento de la toxicidad celular dependiendo del tiempo, dosis y vía de administración del metal [Han et al., 2003, Álvarez et al., 2007, Milton et al., 2013].

En el presente estudio, la cantidad de Cd cuantificado en el TA en animales expuestos crónicamente a 65.5 mg/L de Cd en el agua de beber se encontró por debajo del límite de detección del equipo de absorción atómica empleado (0.1 ppm), estos resultados muestran que el TA no es capaz de acumular cantidades significativas del metal, como ocurre en hígado y riñones con las mismas dosis [Larregle et al., 2008; Kawakami et al., 2010; Treviño, 2011; Kawakami et al; 2013].

Estos resultados están de acuerdo con los estudios realizados por Kawakami et. al., quienes mostraron que después de una administración aguda de Cd, por vía intraperitoneal solo se acumulan cantidades mínimas del metal (en un rango de 0.1 ppm a 0.4 ppm) en TAE. El transporte de Cd hacia el interior de las células está mediado por canales dependientes de calcio (Ca) y transportadores de membrana que participan en el intercambio de metales divalentes como hierro (Fe) y zinc (Zn), en donde Cd utiliza un mecanismo de mimetismo iónico interactuando en el sitio de unión de estos iones en

los distintos órganos [Bridges y Zalups, 2005]. Hasta el momento, se ha reportado solo la presencia de los transportadores de Zn de la familia ZnT, que están encargados de la exportación del metal y de la familia ZIP, que tienen como función el importe del metal hacia el espacio intracelular, los estudios realizados por otros investigadores solo han descrito al transportador ZIP 1, el cual se encuentra expresado principalmente en TAS y ZIP 8 se expresa en mayor proporción en TA visceral [Smidt et al., 2007].

Una vez que el Cd se encuentra en los organismos, este es capaz de interactuar con un número de moléculas biológicas, particularmente induce la síntesis de MT y forma complejos con la misma, para reducir la toxicidad del metal. Además de esta función de protección con metales pesados, se han propuesto otras funciones biológicas para las MTs. En 2010, Sato et al., mostraron que las MTs tienen un papel preventivo en el desarrollo de obesidad inducida por la dieta, en sus estudios muestran que ratones knockout a MT ($MT^{-/-}$) con una dieta alta en grasa aumentan de peso considerablemente en comparación con animales que expresan normalmente MTs, lo cual demuestra la importancia de la funcionalidad de estas proteínas en el metabolismo del TA [Sato et al., 2010]. Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que los animales expuestos a Cd presentan un incremento en la concentración de MTs totales en los diferentes tejidos en estudio (TAS, TAR y TAE), en comparación con animales no expuestos (Figura 6). Debido a que el TA no acumula cantidades significativas de Cd en animales crónicamente expuestos, los incrementos de MTs pueden ser consecuencia de una inducción en su síntesis por la presencia de factores no metálicos como citocinas (IL-6), estímulos adrenérgicos o ROS, protegiendo a este tejido del estrés

inflamatorio que puede ocasionar la administración de Cd [Trayhurn et al., 2000; Klaassen et al., 2009; Thirumoorthy et al., 2011].

Por otro lado, en el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas se ha descrito que la administración crónica de 65.5 mg/L de CdCl₂ en el agua de beber a ratas produce cuadros de hiperinsulinemia e hiperglucemia en los animales, sugiriendo el desarrollo de un cuadro similar al síndrome metabólico [Treviño Mora S, 2011]. El incremento observado en la concentración de MTs en TA puede estar relacionado con los cuadros hiperglucémicos y la hiperinsulinemia que presentan los animales expuestos a Cd, ya que se ha descrito que los incrementos de glucosa pueden inducir la síntesis de MT en TA [Haynes et al., 2012].

El desarrollo del fenotipo bioquímico: hiperinsulinémico con insulinoresistencia o disminución de la sensibilidad a insulina implican una variedad de órganos, incluyendo el hígado, páncreas, glándula suprarrenal y el TA, por ejemplo, cambios en el número, el tamaño y el resguardo de TG en este tejido están relacionadas con síndrome metabólico [Kawakami et al., 2013]. En este estudio, la administración crónica de Cd a los animales causó cambios en la morfología de los adipocitos en los diferentes TA. En las figuras 7 y 8 se observa que a los dos meses de administración del metal, el TAS contiene adipocitos esféricos y tras la administración de Cd este tejido sufre un aumento en el área de los adipocitos (hipertrofia). En el TAR se encontró un mayor porcentaje de adipocitos esféricos con hiperplasia (aumento en el número de adipocitos) e hipertrofia (aumento en el tamaño del adipocito) en las muestras de tejido con exposición a Cd. Por su parte, se encontró que los adipocitos que forman al TAE

son células con estructura poliédrica que sufren hiperplasia e hipertrofia en comparación con las muestras de animales sin administración del metal.

A los tres meses de administración de Cd la morfología de los adipocitos continuó cambiando; en TAS se encontró adipocitos esféricos con hiperplasia e hipertrofia. El TAR, sin embargo, modifica su morfología al presentar adipocitos hipertróficos e hiperplásicos con estructura poliédrica. Por otro lado, el TAE al igual que el TAR, presenta adipocitos hipertróficos e hiperplásicos con estructura poliédrica (Figuras 9 y 10).

Después de cuatro meses de administración de Cd se encontró que los adipocitos del TAS adquieren estructuras poliédricas con hiperplasia, e hipertrofia. Mientras que en TAR y TAE el fenotipo de los adipocitos cambia a estructuras irregulares con hipertrofia e hiperplasia sugiriendo que estos cambios pueden estar relacionados con la edad de los animales (Figuras 11 y 12).

Se ha descrito que en un estado inflamatorio crónico de baja intensidad, se producen etapas secuenciales de hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos que conforman al TA, favoreciendo obesidad androide o central. En donde la hiperplasia es debida a la diferenciación de adipocitos a partir de preadipocitos y la hipertrofia de las células es inducida por dos factores: el aumento del almacenamiento de grasa en los adipocitos diferenciados y el aumento en la expresión de mediadores proinflamatorios, por otro lado, los adipocitos hipertróficos aumentan la producción de adipocinas proinflamatorias [Canello y Clément, 2006; Sato et al., 2010; Balistreri et al., 2010; Fuentes et al., 2013], favoreciendo la resistencia hepática y periférica a insulina [Gregoire et al., 1998], al drenar al sistema venoso portal AGL que provienen de la lipólisis inducida por

catecolaminas y al secretar diferentes adipocinas lo que produce una llegada masiva de estos lípidos al hígado y otros tejidos [Lefebvre et al., 1998; Eckel, et al., 2005].

Otro cambio importante que sucede posterior a la administración crónica de Cd, es la inducción de desajustes en el resguardo de TG en los adipocitos, produciendo la aparición de alteraciones lipídicas a nivel sérico y tisular. Como se muestra en la figura 13, los resultados de los niveles de TG determinados en los tres tipos de TA muestran una acumulación dependiente del tiempo de estos lípidos neutros. A demás se puede observar la presencia de esteatosis hepática en los animales expuestos a Cd (Figura 16), lo cual sugiere una movilización y el resguardo anormal de lípidos en tejidos no especializados para ello, resultados similares han sido reportados previamente [Larregle et al., 2008, Kawakami et al., 2010].

A nivel plasmático, la administración crónica de Cd modifica el perfil lipídico en los animales, produciendo un incremento en los niveles de TG (Figura 14B), uno de los mecanismos involucrados podría estar relacionado con el incremento en la actividad de las enzimas α -glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), quien participa en la síntesis de TG proporcionando el sustrato 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato y FAS, enzima requerida en la síntesis de ácidos grasos. Estas enzimas participantes de manera muy importante en la síntesis de TG, en animales con una exposición con Cd incrementan significativamente su actividad [Álvarez et al., 2007; Larregle et al., 2008]. Los TG sintetizados *de novo* son transportados por las lipoproteínas VLDL, las que también mostraron un aumento en sus niveles séricos a lo largo de la administración crónica de Cd (Figura 14C). A nivel tisular el aumento de VLDL puede favorecer la llegada de una mayor cantidad de TG al adipocito. Aunado al proceso anterior, el incremento en los niveles de acetil-CoA debido

a la oxidación del exceso de glucosa en los animales expuestos con Cd puede entrar a la vía lipogénica para así almacenarse como TG en el adipocito o en tejido hepático [Yamamoto et al., 1984; Larregle et al., 2008; Wang et al., 2012]. Un segundo factor involucrado en el incremento de TG puede relacionarse con la inhibición de LPL por Cd y consecuentemente la disminución de la hidrólisis de TG séricos promoviendo el aumento en los niveles de estos lípidos neutros [Frigolet et al., 2008, Larregle et al., 2008, Lucia et al., 2010].

Al mismo tiempo, se presenta un aumento en los niveles de colesterol total en los animales con administración crónica de Cd (Figura 14A), que están asociados con el aumento de las fracciones de lipoproteínas LDL, generando un cuadro de hipercolesterolemia en el organismo (Figura 14D). Los aumentos de colesterol pueden ser explicados por la capacidad que tiene Cd para aumentar la actividad de la enzima hidroxil-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMG-CoA) a través de la liberación de citocinas inflamatorias e interleucinas, como TNF- α e interleucina 1 β . Otro mecanismo por el cual puede explicarse el aumento en los niveles de colesterol es que Cd disminuye la captación de colesterol por macrófagos quienes desempeñan un papel importante en el procesamiento de colesterol [Milton et al., 2013]. El aumento en los niveles de AGL (Figura 14G) pueden explicarse por la inhibición del proceso de β -oxidación mediada por Cd y el aumento en la concentración de AGL en las mitocondrias y su posterior liberación a la circulación [Milton et al., 2013].

Por otro lado, la disminución de los niveles plasmáticos de fosfolípidos (Figura 14F) es causada por el aumento de la actividad de fosfolipasa A₂, quien aumenta después de la administración de Cd [Milton et al., 2013]. Por último, los niveles de HDL

disminuyen a lo largo de la administración crónica de Cd (Figura 14E), teniendo como consecuencia el aumento en el resguardo de lípidos en tejidos no aptos para ello, produciendo esteatosis y aterogénesis [Álvarez et al., 2007; Larregle et al., 2008; Rogalska et al., 2009; Olisekodiaka et al., 2011; Lucia et al., 2010; Kawakami et al., 2010].

Con la finalidad de confirmar los resultados bioquímicos obtenidos para la determinación de lipoproteínas séricas, éstas se evaluaron mediante electroforesis en gradiente de gel no desnaturizante, conocida también como electroforesis en disco.

En la figura 15, se muestran los corrimientos electroforéticos representativos de las lipoproteínas confirmando que las lipoproteínas VLDL así como las LDL tienen una tendencia a aumentar en los grupos de exposición a Cd en comparación con el grupo control, mientras que las lipoproteínas HDL tienden a disminuir en los grupos con exposición a Cd [Frings et al., 1971].

En la figura 17 se esquematiza el posible mecanismo de toxicidad por el cual el Cd puede generar un cuadro similar al de síndrome metabólico al alterar el metabolismo lipídico sistémico y la morfología del TA.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se puede postular el siguiente mecanismo de toxicidad por el cual el Cd puede favorecer la presencia de un cuadro similar al síndrome metabólico. La administración de Cd produce cambios en el metabolismo lipídico, aumentos en los niveles plasmáticos de TG, colesterol, las fracciones lipoproteicas de VLDL y LDL, además de disminuir los niveles de fosfolípidos y la fracción lipoproteica HDL; condicionando a riesgos aterogénicos, además de la hipertrigliceridemia puede favorecer el resguardo excesivo de estos lípidos en tejido adiposo y hepático (tejido no especializado para el almacenamiento de TG),

contribuyendo a la hipertrofia de los adipocitos. Por otro lado, la expresión de MT en tejido adiposo puede estar contrarrestando la toxicidad producida por Cd.

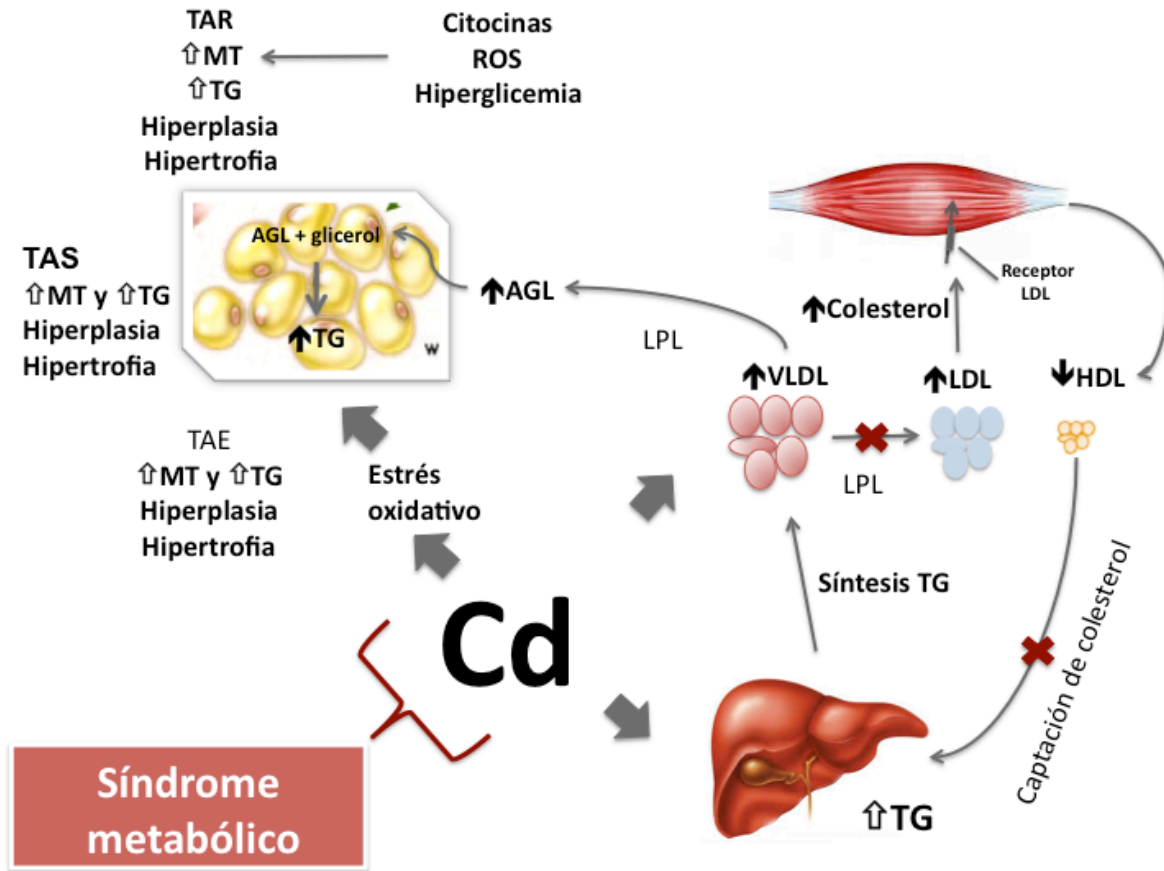


Figura 17. Mecanismo de toxicidad del Cd sobre el perfil lipídico sistémico y la morfología del tejido adiposo.

Conclusiones

Posterior a la administración crónica de cadmio se encontró que:

El tejido adiposo no es capaz de acumular cantidades significativas del metal.

Se incrementa la expresión de proteínas con función antioxidante, como Metalotioneína en tejido adiposo.

Los adipositos sufren hiperplasia e hipertrofia.

Se presenta un aumento los niveles de TG, colesterol, AGL y las fracciones lipoproteicas VLDL y LDL y una disminución de los niveles de fosfolípidos y la fracción lipoproteica HDL ratas de la cepa Wistar.

Como conclusión final la administración crónica de 65,5 mg de CdCl₂/L en el agua de beber de los animales modifica el metabolismo de los lípidos séricos y hepáticos, además, genera cambios en la morfología y almacenamiento de TG en tejido adiposo, lo que sugiere que podría ser un mecanismo de toxicidad del Cd para favorecer la aparición de un cuadro similar al síndrome metabólico.

Perspectivas

Determinar sí existe acumulación de Cd en tejido adiposo mediante un espectrofotómetro de absorción atómica con cámara de grafito.

Evaluar sí existen cambios en el proceso de adipogénesis mediante el análisis de los mRNA de los factores de transcripción PPAR γ , C/EBP α , y Mest1 en tejido adiposo.

Determinar sí existen cambios en los niveles de mRNA y en los niveles proteicos de las adipocinas leptina, adiponectina, TNF- α , visfatina, IL-6 en tejido adiposo implícitas en síndrome metabólico.

Bibliografía

- Alvarez, S. M., Gómez, N. N., Scardapane, L., Fornes, M. W., Giménez, M. S., 2007. Effects of chronic exposure to cadmium on prostate lipids and morphology. *Biometals*. 20(5):727-741.
- ATSDR. 2012. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA.
- Bagchi D., Vuchetich P. J., Bagchi M., Hassoun E. A., Tran M. X., Tang L., Stohs S. J., 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats. *Free Radic Biol Med*. 22(3):471-478.
- Balistreri C., Caruso C., Candore G., 2010. The role of adipose tissue and adipokines in Obesity-related inflammatory diseases. *Mediators Inflamm*. 2010:(802078).
- Barak Y., Nelson M. C., Ong E. S., Jones Y. Z., Ruiz-Lozano P., Chien K. R., Koder A., Evans R. M. 1999. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell*. 4(4):585–595.
- Beaumont J. L., Carlson L. A., Cooper G. R., Fejfar Z., Fredrickson D. S., Strasser T., 1970. Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. *Bull World Health Organ*. 43(6):891–915.
- Bluhër M., 2012. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab. J*. 36(5): 317-327.

- Brambila E., Lozano P., 1999. Metalotioneinas, Bioquímica y Funciones Propuestas. Boletín de Educación Bioquímica. 18(1):21-27.
- Bridges C. C., Zalups R. K., 2005. Toxicol Appl Pharmacol. 204(3):274-308.
- Brunk S. D., Swanson J. R., 1981. Colorimetric method for free fatty acids in serum validated by comparison with gas chromatography. Clin Chem. 27(6):924-926.
- Cancello R., Clément K., 2006. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. BJOG. 113(10):1141-1147
- Cases J. A., Barzilai N., 2000. The regulation of body fat distribution and the modulation of insulin action. Int J Obes Relat Metab Disord. 24(4):S63–S66.
- Cave M. C., Hurt R. T., Frazier T. H., Matheson P. J., Garrison R. N., McClain C. J., McClave S. A., 2008. Obesity, inflammation, and the potential application of pharmaconutrition. Nutr Clin Pract. 23(1):16-34.
- Chomczynski P, Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162:156–159.
- Coppack S. W., 2005. Adipose tissue changes in obesity. Biochem Soc Trans. 33(Pt 5):1049-52.
- Curat C. A., Wegner V., Sengenés C., Miranville A. Tonus C., Busse R., Bouloumié A., 2006. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. Diabetologia. 49(4):744–747.

- Després J. P., Lemieux I., 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 444(7121):881-887.
- Eaton DL, Toal BF., 1982. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol Appl Pharmacol*. 66(1):134–142.
- Eckel R. H., Grundy S. M., Zimmet P.Z., 2005. The metabolic syndrome. *Lancet*. 365(9468):1415-1428.
- Ezaki, O., 1989. IIB group metal ions (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) stimulate glucose transport activity by post-insulin receptor kinase mechanism in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 264(27):16118–16122.
- Fernández Carriera R. A.; González García S., Lara Rodríguez R. F., Vicente Valdés I.; González-Quevedo Monteagudo A., 2007. Electroforesis de lipoproteínas séricas en pacientes con enfermedad cerebrovascular isquémica *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 38(3):209-213.
- Fickova M., Eybl V., Kotyzova D., Mickova V., Mostbok S., Brtko J., 2003. Long lasting cadmium intake is associated with reduction of insulin receptors in rat adipocytes. *Biometals*. 16(4):561–566.
- Folch J., Less M., Sloane-Stanley G. H., 1968. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J Biol Chem*. 226(1):497–50.
- Frigolet M. E., Torres N., Uribe-Figueroa L., Rangel C., Jimenez-Sanchez G, Tovar A. R., 2011. White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte

metabolic functions alter soy protein consumption in rats. *J Nutri Biochem.* 22(2):118-129.

Frigolet Vázquez-Vela M. E., Torres N., Tovar A. R., 2008. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res.* 39(8):715-728.

Frings C. S., Foster L. B., Cohen P. S., 1971. Electrophoretic separation of serum lipoproteins in polyacrylamide gel. *Clin Chem.* 17(2):111-114.

Fuentes E., Fuentes F., Vilahur G., Badimon L., Palomo I., 2013. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2013:136584.

García-Rico L., Robles-Burgueño M., Valenzuela-Soto E., 1999. Las Metalotioneínas y su relación con la toxicidad del Cadmio en los mimeferos. *Rev Int Contam Ambient.* 15(2):113-120.

Geneser F. Tejido adiposo. En: Geneser F. *Histología sobre bases moleculares*, Ed. Panamericana, Munksgaard:Copenhagen. (9):227-233, 2000.

González Hita M, Bastidas Ramírez B, Ruiz Madrigal B, Godínez S, Panduro A., 2002. Funciones endocrinas de la célula adiposa. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 10(3):140-146.

Gregoire F., Smas C., Sul H., 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiological Reviews.* 78(3):783-801.

Han J. C., Park S. Y., Hah B. G., Choi G. H., Kim Y. K., Kwon T. H., Kim E. K., Lachaal M., Jung C. Y., Lee W., 2003. Cadmium induces impaired glucose tolerance in rat by down-regulating GLUT4 expression in adipocytes. *Arch Biochem Biophys.* 413(2):213-220.

- Harrison S. A., Buxton J. M., Clancy B. M., Czech M. P., 1991. Evidence that erythroid-type glucose transporter intrinsic activity is modulated by cadmium treatment of mouse 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.* 266(29):19438–19449.
- Haynes V., Connor T., Tchernof A., Vidal H., Dubois, S., 2013. Metallothionein 2a gene expression is increased in subcutaneous adipose tissue of type 2 diabetic patients. *Mol Genet Metab.* 108(1):90-94.
- Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. 2007. Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 293(1):G1-G4.
- Jin T., Wu X., Tang Y., Nordberg M., Bernard A., Ye T., Kong Q., Lundstrom N.G., Nordberg G.F., 2004. Environmental epidemiological study and estimation of benchmark dose for renal dysfunction in a cadmium-polluted area in China. *Biometals.* 17(5):525–530.
- Kanda H., Tateya S., Tamori Y., Kotani K., Hiasa K. I., Kitazawa R., Kasuga, M. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest.* 116(6):1494-1505.
- Kawakami T., Hiroyuki S., Furuichi R., Kadota Y., Inoue M, Setsu K., Suzuki S., Sato M., 2010. Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue. *Toxicology.* 267(1-3):20-26.
- Kawakami T., Nishiyama K, Kadota Y., Sato M., Inoue M., Suzuki S., 2013. Cadmium modulates adipocyte functions in metallothionein null mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 272(3):625-636.

- Kershaw E. E., Flier J. S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6):2548-56.
- Klaassen C., Liu J., Diwan B., 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 238(3):215-220.
- Kumar R., Agarwal A. K., Seth P. K., 1996. Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol Lett.* 89(1):65-69.
- Langin D., 2006. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. *Pharmacol Res.* 53(6):482-91.
- Large V., Peroni O., Letexier D., Ray H., Beylot M., 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30(4):294-309.
- Larregle, E. V., Varas, S. M., Oliveros, L. B., Martinez, L. D., Antón, R., Marchevsky, E., Giménez, M. S., 2008. Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food and Chem Toxicol.* 46(5):1786-1792.
- Lefebvre A. M., Laville M., Vega N., Riou J. P., van Gaal L., Auwerx J., Vidal H., 1998. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes.* 47(1):98-103.
- Lucia M., André J. M., Gonzalez P., Baudrimont M., Bernadet M. D., Gontier K., Davail S., 2010. Effect of dietary cadmium on lipid metabolism and storage of aquatic bird *Cairina moschata*. *Ecotoxicology.* 19(1):163-170.

- Makki K., Froguel P., Wolowczuk I., 2013. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* 22(2013):139239.
- Mathews C.K, van Holde K.E., Ahern K.G. En: *Bioquímica 3ª Edición*. Ed. Pearson Educación S. A. (18):701-745, 2002.
- Medina-Gomez G., Gray S. L., Yetukuri L., Shimomura K., Virtue S., Campbell M., Curtis R. K., Jimenez-Linan M., Blount M., Yeo G. S., Lopez M., Seppänen-Laakso T., Ashcroft F. M., Oresic M., Vidal-Puig A. 2007. PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripherals lipid metabolism. *PLoS Genet.* 3(4):e64.
- Merali Z., Singhal R. L., 1980. Diabetogenic effects of chronic oral cadmium tration to neonatal rats. *Br. J. Pharmac.* 69:151-157.
- Milton Prabu S., Muthumani M., Shagirtha K., 2013. Quercetin potentially attenuates cadmium induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 17(5):582-95.
- Moreno M., Martinez J., 2002. El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *ANALES Sis San Navarra.* 25(1):29-39.
- Muñiz N., 1977. Measurement of plasma lipoproteins by electrophoresis on polyacrilamide gel. *Clin. Chem.* 23(10):1826-1833.
- Nakagami H., 2013. The mechanism of white and brown adipocyte differentiation. *Diabetes Metab J.* 37(2):85-90.

- Nielson K. B., Atkin C. L., Winge D. R., 1985. Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J. Biol. Chem.* 260(9):5342-5350.
- Niemelä S., Miettinen S., Sarkanen J., Ashammakhi N. Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. En: *Topics in tissue Engineering*, Vol 4. Ed. N Ashammakhi, R Reis, & F Chiellini. 2008.
- Nogueiras R., Veyrat-Durebex C., Suchanek P. M., Klein M., Tschöp J., Caldwell C, Woods S. C., Wittmann G., Watanabe M., Liposits Z., Fekete C., Reizes O., Rohner-Jeanrenaud F., Tschöp M. H., 2008. Peripheral, but not central, CB1 antagonism provides food intake-independent metabolic benefits in diet-induced obese rats. *Diabetes.* 57(11):2977-91.
- Olisekodiaka M. J., Igbeneghu C. A., Onuegbu A. J., Oduru R., Lawal A. O., 2011. Lipid, lipoproteins, total antioxidant status and organ changes in rats administered high doses of cadmium chloride. *Med Princ and Pract.* 21(2):156-159.
- Ouchi N., Parker J., Lugus J., Walsh K., 2011. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11(2):85-97.
- Prozialeck W. C., Edwards J. R., 2010. Early biomarkers of cadmium exposure and nephrotoxicity. *Biomaterials.* 23:793–809
- Rogalska, J., Brzóska, M. M., Roszczenko, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2009. Enhanced zinc consumption prevents cadmium-induced alterations in lipid metabolism in male rats. *Chemi Biol Interact.* 177(2):142-152.

- Ross M. H., Pawlina Wojciech. Tejido adiposos. En: Histología, texto y atlas color con Biología celular y molecular 5ª edición, Ed. Panamericana, (9):258-267, 2007.
- Sabolić I., Breljak D., Skarica M., Herak-Kramberger C. M., 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*. 23(5):897-926.
- Sánchez F., García-Macedo R., Alarcón-Aguilar F., Cruz M., 2005. Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gac. Méd. Méx.* 141(6):505-512.
- Santos M. P., de França S. A., Santos J. T. F., Buzelle S. L., Bertolini G. L., Garófalo M. A. R., Kawashita, N. H., 2012. A low-protein, high-carbohydrate diet increases fatty acid uptake and reduces norepinephrine-induced lipolysis in rat retroperitoneal white adipose tissue. *Lipids*. 47(3):279-289.
- Sato M, Kawakami T., Kondoh M., Takiguchi M. , Kadota Y., Himeno S., Suzuki S., 2010. Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice. *FASEB J*. 24(7):2375-2384.
- Shinohara H., Wu J., Kasai M., Aoyama T., 2006. Randomly interesterified triacylglycerol containing medium- and long-chain fatty acids stimulates fatty acid metabolism in White adipose tissue of rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(12):2919-2926.
- Smidt K., Pedersen S.B., Brock B., Schmitz O, Fisker S., Bendix J., Wogensen L., Rungby J., 2007. Zinc-transporter genes in human visceral and subcutaneous adipocytes: lean versus obese. *Mol Cell Endocrinol*. 264(1-2):68-73.

- Soloni, F. G., and Sardina, L. C., 1973. Colorimetric microdetermination of free fatty acids. *Clin Chem.* 19(4):419-424.
- Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M., 2011. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol.* 20:9-54.
- Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 79(7):1147–1156.
- Trayhurn P., Duncan J., Wood A., Beattie J., 2000. Metallothionein gene expression and secretion in white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279(6), R2329-R2335.
- Treviño Mora S. Estudio de la administración crónica de cadmio y su interacción con proteínas aisladas de hígado, riñón y páncreas de ratas Wistar. Tesis de maestría, 2011.
- Valenzuela A, Sanhueza J., 2009. El tejido adiposo: algo más que un reservorio de energía. *Grasas y Aceites.* 60 (5):437-450.
- Vasak M., Hasler D.W., 2005. Metallothioneins: new functional and structural insights. *Curr Opin Chem Biol.* 4(2):177-83.
- Vigouroux C, Caron-Debarle M, Le Dour C, Magré J, Capeau J., 2011. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* 43(6):862-876.
- Wang Ju, Pan Ying, Hong Ye, Zhang Q.Y., Wang X. N., Kong L. D., 2012. Quercetin protects against cadmium-induced renal uric acid transport system alteration and

lipid metabolism disorder in rats. *Evid Based Complement Alternat Med.*
2012:548430.

Winge D. R, Miklossy K. A., 1982. Domain nature of metallothionein. *J Biol Chem.*
257(7):3471-3476.

Xu D., Yin C., Wang S., Xiao Y., 2013. JAK-STAT in lipid metabolism of adipocytes.
JAKSTAT. 2(4):e27203.

Yamamoto A., Wada O., Ono T, Ono H., Manabe S, Ishikawa S., 1984. Cadmium-
induced stimulation of lipogenesis from glucose in rat adipocytes. *Biochem J.*
219(3):979-84.

Anexos

I. Secuencia nucleotídica de los genes en estudio, diseño de oligonucléotidos en PerlPrimer v1.1.21 y resultados preliminares del efecto de la administración crónica de dos meses de Cd sobre los niveles de mRNA de PPAR γ 2 en tejido adiposo

Formato FASTA de PPAR γ 2, obtenido de NCBI. En fondo amarillo y letras rojas se encuentran los primers diseñados, los cuales flanquean la región a amplificar mediante la técnica de PCR.

Rattus norvegicus peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg), transcript variant 2, mRNA

NCBI ReferenceSequence: NM_001145366.1

LOCUS NM_001145366 1830 bp mRNA linear ROD 29-JUL-2013
DEFINITION Rattusnorvegicusperoxisomeproliferator-activated receptor gamma (Pparg), transcriptvariant 2, mRNA. ACCESSION NM_001145366 VERSION NM_001145366.1 GI:223941853 KEYWORDS RefSeq. SOURCE Rattusnorvegicus (Norwayrat) ORGANISM [Rattusnorvegicus](#)Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae; Rattus.

G **CAGAAACTGGGAGTAGCCTG**GGCTGC TTTTATATAAGGGACTCGAGGAGGTCAAGAAGGGGCCTGGACCTCTGCTGG
TGATCAGAAGGCTGCAGCGCTAAATTCATCTTAACTCCCATTTGAGTAGATTTGAAAGAA**GCTGTGAACCACTAATATC**
CAAGGACATTTTTGAAAACAAGGACTACCC TTTACTGAAATTACCATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCCACC
AACTTCGGAATCAGCTCTGTGGACCTCTCTGTGATGGATGACCAC TCCCATTCCTTTGACATCAAACCC TTTACCACG
GTTGATTTCTCCAGCATTTCTGCTCCACACTATGAAGACATCCC GTTCACAAGAGCTGACCCAATGGTTGCTGATTAC
AAATATGACCTGAAGCTCCAAGAATACCAAAGTGGGATCAAAGTAGAGCCTGCGTCCCCGCC TTTATTATTC TGAAAAA
ACCCAAC TCTACAACAGGCCACATGAAGAGCCTTCAAAC TCCCTCATGGCCATCGAGTGCCGAGTCTGTGGGGATAAA
GCATCAGGCTTCCACTATGGAGTCCATGCTTGTGAAGGATGCAAGGGTTTTTTCCGAAGAACCATCCGATTGAAGCTT

ATTTATGATAGGTGTGATCTTAACTGTCCGATCCACAAAAGAGTAGAAATAAATGTCAGTACTGTCGGTTTCAGAAG
 TGCCTTGCTGTGGGGATGTCTCACAATGCCATCAGGTTTGGGCGAATGCCACAGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTGGCG
 GAGATCTCCAGTGATATCGACCAGCTGAACCCAGAGTCTGCTGATCTGCGAGCCCTGGCAAAGCATTGTTGATGACTCA
 TACATAAAGTCCCTCCCGCTGACCAAAGCCAAGGCGAGGGCGATCTTGACAGGAAAGACAACAGACAAATCACCATTT
 GTCATCTACGACATGAATTCCTTAAATGATGGGAGAAGACAAAATCAAGTTCAAACATATCACCCCCCTGCAGGAGCAG
 AGCAAAGAGGTGGCCATCCGCATTTTTTCAAGGGTGCAGTTTCGATCCGTGGAAGCTGTGCAAGAGATCACAGAGTAT
 GCCAAAAATATCCCTGGTTTCATTAACCTTGACTTGAATGACCAAGTGACTCTGCTCAAGTATGGTGTCCATGAGATC
 ATCTACACCATGCTGGCCTCCCTGATGAATAAAGATGGAGTCCCATATCAGAGGGACAAGGATTCATGACCAGGGAG
 TTCTCAAAGCCTGCGGAAGCCCTTTGGTGACTTTATGGAGCCTAAGTTTGAGTTTGTGCTGTGAAGTTCAATGCACCTG
 GAATTAGATGACAGTGACTTGGCCATATTTATAGCTGTCATTTATCTCAGTGGAGACCGCCAGGCTTGTGTAACGTG
 AAGCCCATCGAGGACATCCAAGACAACCTGCTGCAGGCCCTGGAACCTCAGCTGAAGCTGAACCACCCGGAGTCTCC
 CAGCTGTTGCGCAAGGTGCTCCAGAAGATGACAGACCTCAGGCAGATTGTCACAGAGCACGTGCAGCTACTGCATGTG
 ATCAAGAAGACGGAGACAGATATGAGCCTTACCCCTGCTCCAGGAGATCTACAAGGACTTGTATTAGCAGAAAAGT
 CCCAGTCGCTGACAAAGTGTTCCTTCTATCGATTGCACATTTATTTTGGAGGGAAAAAATCTGACACCTAAGAAATT
 TACTGTGAAAAAAGCATTAAAAAACAAAAGTTTTAGAACATGATCTATTTTATGCATATTGTTTATAAAGATACATT
 TACAATTTACTTTTAATATTAATAATTAACCACTA

Resultados obtenidos del programa PerlPrimer v1.1.21

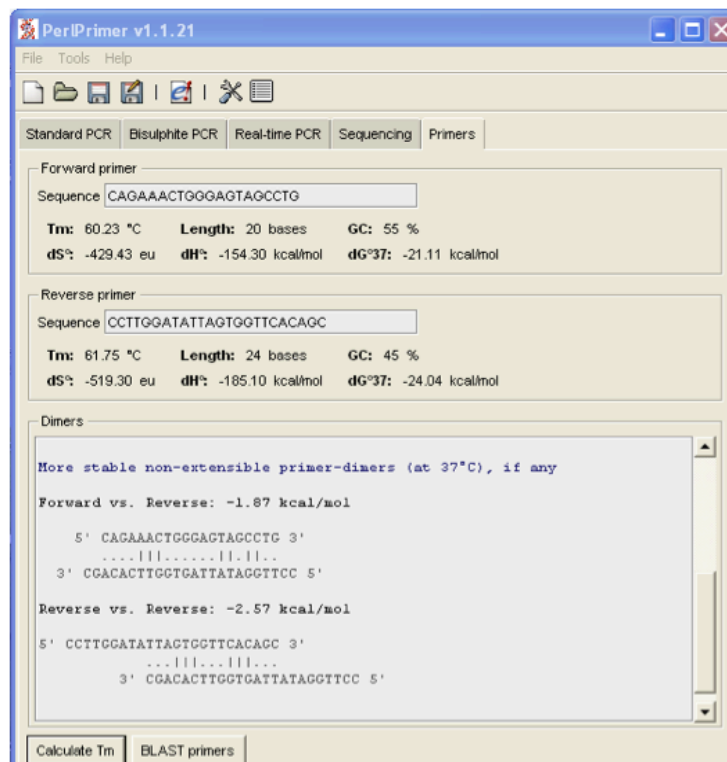
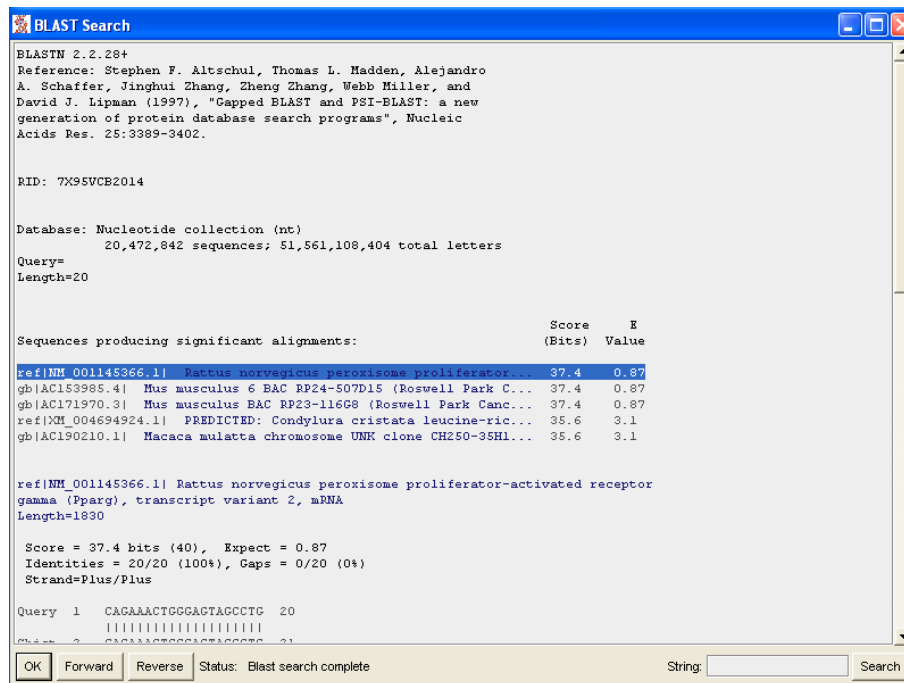


Fig. 18. Diseño de oligonucleótidos para PPAR γ . El oligonucleótido sentido tiene la secuencia CAGAAACTGGGAGTAGCCTG teniendo longitud de 20 pb, una Tm de 60.23; y 55 % GC. El oligonucleotido antisentido tiene la secuencia CCTTGGATATTAGTGTTACAGC con longitud de 24 pb, Tm igual a 61.75 y 45 % GC.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Rattus norvegicus peroxisome proliferator-activated receptor gamma (Pparg), transcript variant 2, mRNA	40.1	40.1	100%	0.085	100%	NM_001145366.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus 6 BAC RP24-507D15 (Roswell Park Cancer Institute (C57BL/6J Male) Mouse B)	40.1	40.1	100%	0.085	100%	AC153985.4
<input type="checkbox"/> Mus musculus BAC RP23-116G8 (Roswell Park Cancer Institute (C57BL/6J Female) Mouse B)	40.1	40.1	100%	0.085	100%	AC171970.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Condylura cristata leucine-rich repeat-containing protein LOC400891-like (LOC100400891)	38.2	38.2	95%	0.33	100%	XM_004694924.1
<input type="checkbox"/> Macaca mulatta chromosome UNK clone CH250-35H12, complete sequence	38.2	38.2	95%	0.33	100%	AC190210.1
<input type="checkbox"/> Dioctentomys labrax chromosome sequence corresponding to linkage group 1, top part, complete sequence	36.2	64.4	95%	1.3	100%	FQ310506.3
<input type="checkbox"/> Schistosoma mansoni strain Puerto Rico chromosome 1, complete genome	34.2	90.7	90%	5.2	100%	HE601624.1
<input type="checkbox"/> Wolbachia endosymbiont of Culex vishnui surface protein-like (wsp) gene, partial sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	GQ469981.1
<input type="checkbox"/> Zebrafish DNA sequence from clone CH211-22C7, complete sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	CU179657.6
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus BAC CH230-8L10 complete sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	AC132998.5
<input type="checkbox"/> Mus musculus chromosome 5, clone RP23-415E17, complete sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	AC111030.11
<input type="checkbox"/> Mus musculus BAC clone RP24-82B7 from chromosome 16, complete sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	AC132349.3
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus 13 BAC CH230-157O1 (Children's Hospital Oakland Research Institute) complete sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	AC109707.5
<input type="checkbox"/> Mus musculus BAC clone RP23-308L3 from chromosome 16, complete sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	AC161816.5
<input type="checkbox"/> Mus musculus chromosome 5, clone RP23-262J12, complete sequence	34.2	34.2	85%	5.2	100%	AC102372.8

Fig. 19. Alineamiento del oligonucleótido sentido CAGAACTGGGAGTAGCCTG.

Resultados obtenidos del alineamiento de secuencias para el oligonucleótido sentido obtenido de BLAST del programa de PerlPrimer y BLAST de NCBI.

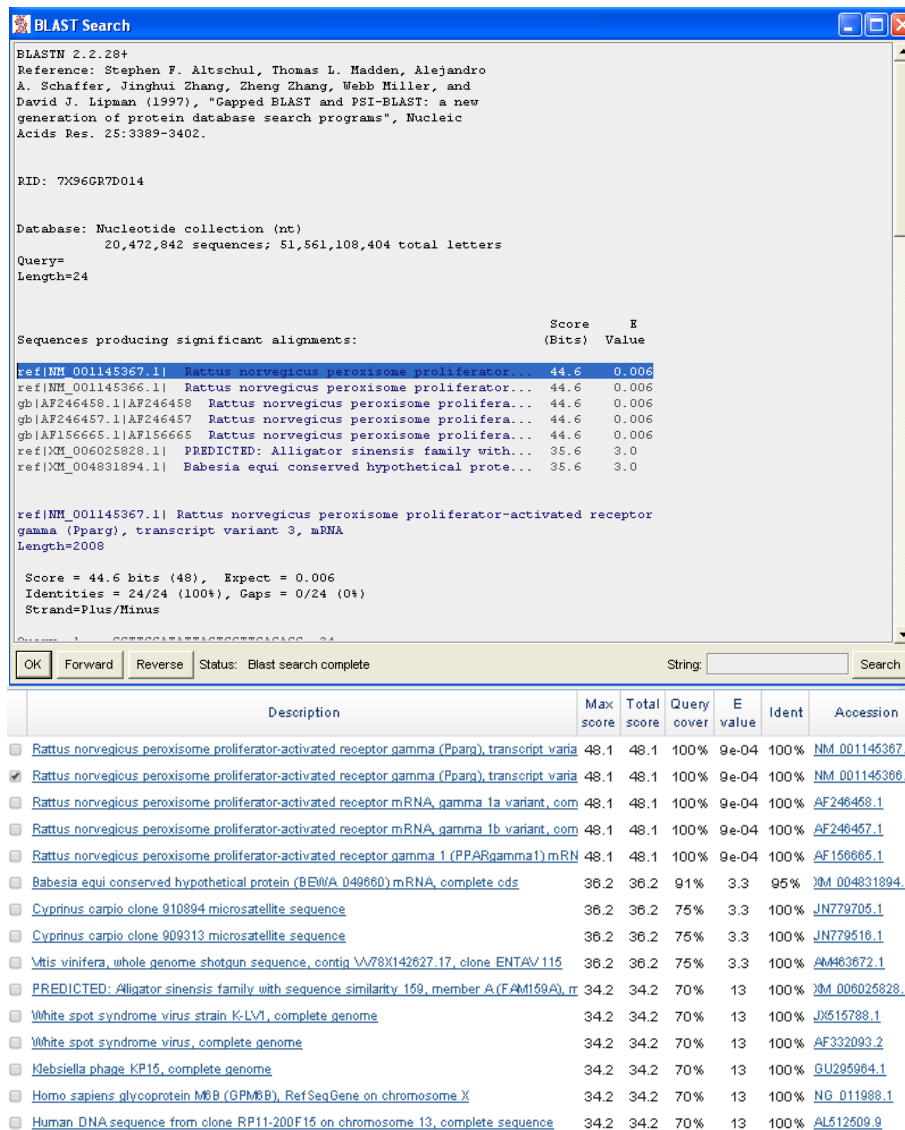


Fig. 20. Alineamiento del oligonucleótido antisentido CCTTGGATATTAGTGGTTCACAGC.

Resultados obtenidos del alineamiento de secuencias para el oligonucleótido antisentido obtenido de BLAST del programa de PerlPrimer y BLAST de NCBI.

Formato FASTA de la proteína ribosomal S29, obtenido de NCBI. En fondo amarillo y letras rojas se encuentran los oligonucleótidos diseñados, los cuales flanquean la región a amplificar mediante la técnica de PCR.

Rattus norvegicus ribosomal protein S29 (Rps29), mRNA

NCBI ReferenceSequence: NM_012876.1

LOCUS NM_012876 318 bp mRNA linear ROD 18-APR-2013
DEFINITION Rattusnorvegicusribosomalprotein S29 (Rps29), mRNA. ACCESSION
NM_012876 VERSION NM_012876.1 GI:6981489 KEYWORDS RefSeq. SOURCE
Rattusnorvegicus (Norwayrat) ORGANISM [Rattusnorvegicus](#)Eukaryota; Metazoa;
Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia; Sciurognathi; Muroidea;
Muridae; Murinae; Rattus.

CTCGTTCCTTTTTCTCCTTGGGC**GTCTGAAGGCAAGATGGGTC**ACCAGCAGCTCTACTGGAGTCACCCGCGGAAGTT
CGGCCAGGGTTCCTCGCTCTTGCCGCGTCTGCTCTAACCGCCACGGTCTGATCCGTAAATACGGGCTGAACATGTGCCG
ACAGTGCTTCGTCAGTACGCGAAGGACATAGGCTTCATTAAGTTGGACTAAGCGACCTGAAT**GGATGATTCGACTGT**
CTACCCAATGAAACCAACTGTCTACCCTGTGATACCAATCATGCTAGTCTTTGCGCACACAGAATAAAAAACTGAAGG
CCTCTA

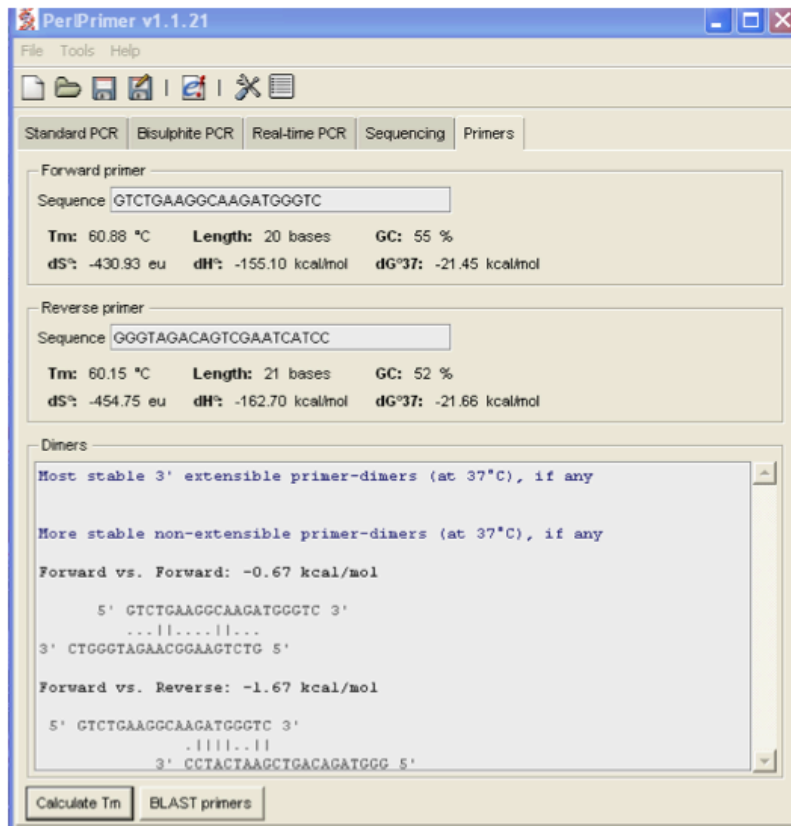
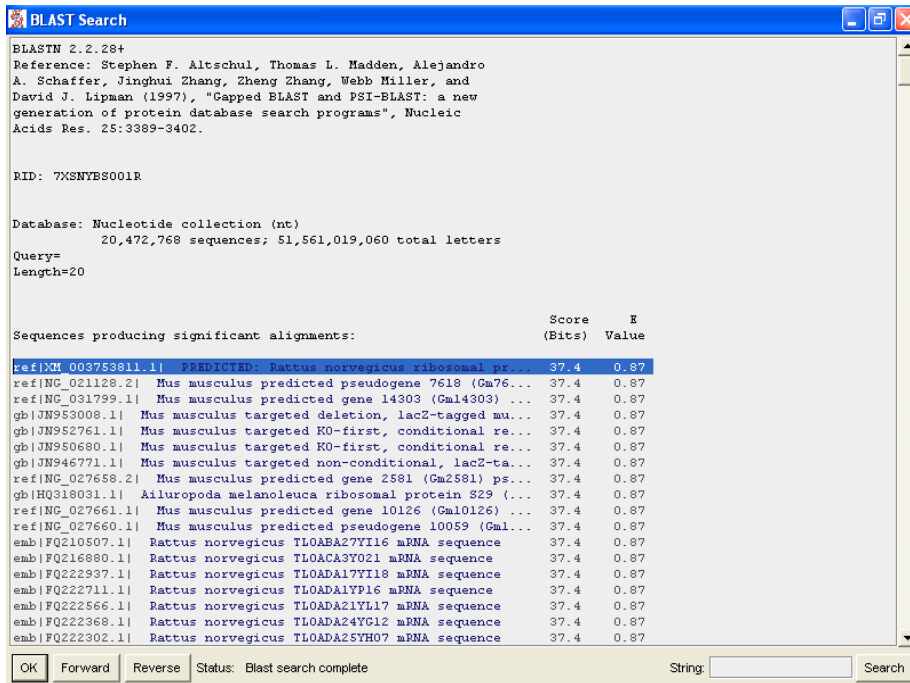


Fig. 21. Diseño de oligonucleótidos para la proteína ribosomal S29. El oligonucleótido sentido tiene la secuencia GTCTGAAGGCAAGATGGGTC teniendo longitud de 20 pb, una Tm de 60.88; y 55 % GC. El oligonucleótido antisentido tiene la secuencia GGGTAGACAGTCGAATCATCC con longitud de 21 pb, Tm igual a 60.15 y 52 % GC.



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus ribosomal protein S29-like (LOC100363434), mRNA >ref XM_003753811.1	40.1	40.1	100%	0.085	100%	XM_003753811.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus predicted pseudogene 7618 (Gm7618) on chromosome 6	40.1	40.1	100%	0.085	100%	NG_021128.2
<input type="checkbox"/> Mus musculus predicted gene 14303 (Gm14303) pseudogene on chromosome 2	40.1	40.1	100%	0.085	100%	NG_031799.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus targeted deletion, lacZ-tagged mutant allele Rps29tm1(KOMP)Mtsj;transgenic	40.1	40.1	100%	0.085	100%	JN953008.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus targeted KO-first, conditional ready, lacZ-tagged mutant allele Rap2c:tm1ar(KO)	40.1	40.1	100%	0.085	100%	JN952761.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus targeted KO-first, conditional ready, lacZ-tagged mutant allele Cdc14b:tm1a(EL)	40.1	40.1	100%	0.085	100%	JN950680.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus targeted non-conditional, lacZ-tagged mutant allele Cdc14b:tm1e(EUCOMM)Mtsj	40.1	40.1	100%	0.085	100%	JN946771.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus predicted gene 2581 (Gm2581) pseudogene on chromosome 15	40.1	40.1	100%	0.085	100%	NG_027658.2
<input type="checkbox"/> Ailuropoda melanoleuca ribosomal protein S29 (RP529) mRNA, complete cds	40.1	40.1	100%	0.085	100%	HQ318031.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus predicted gene 10126 (Gm10126) pseudogene on chromosome 13	40.1	40.1	100%	0.085	100%	NG_027661.1
<input type="checkbox"/> Mus musculus predicted pseudogene 10059 (Gm10059) on chromosome 5	40.1	40.1	100%	0.085	100%	NG_027660.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOABA27YI16 mRNA sequence	40.1	40.1	100%	0.085	100%	FQ210507.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOACA3Y021 mRNA sequence	40.1	40.1	100%	0.085	100%	FQ216880.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA17YI18 mRNA sequence	40.1	40.1	100%	0.085	100%	FQ222937.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA1YI16 mRNA sequence	40.1	40.1	100%	0.085	100%	FQ222711.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA21YL17 mRNA sequence	40.1	40.1	100%	0.085	100%	FQ222566.1

Fig. 22. Alineamiento del oligonucleótido sentido GTCTGAAGGCAAGATGGGTC.

Resultados obtenidos del alineamiento de secuencias para el oligonucleótido sentido obtenido de BLAST del programa de PerIPrimer y BLAST de NCBI.

BLAST Search

BLASTN 2.2.28+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 7XSR29SR014

Database: Nucleotide collection (nt)
20,472,768 sequences; 51,561,019,060 total letters

Query=
Length=21

Sequences producing significant alignments:

	Score	E
	(Bits)	Value
ref XM_003753811.1 PREDICTED: Rattus norvegicus ribosomal pr...	39.2	0.25
emb FQ210507.1 Rattus norvegicus TLOABA27YI16 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ216880.1 Rattus norvegicus TLOACA3Y021 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ222937.1 Rattus norvegicus TLOADA17YI18 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ222711.1 Rattus norvegicus TLOADA1YI16 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ222566.1 Rattus norvegicus TLOADA21YL17 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ222368.1 Rattus norvegicus TLOADA24YG12 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ222302.1 Rattus norvegicus TLOADA25YH07 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ222293.1 Rattus norvegicus TLOADA25YI04 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ2228730.1 Rattus norvegicus TLOADA52YF16 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ222143.1 Rattus norvegicus TLOADA28YD14 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ2228434.1 Rattus norvegicus TLOADA8YI03 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ221942.1 Rattus norvegicus TLOADA2YM02 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ221875.1 Rattus norvegicus TLOADA30YK15 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ224820.1 Rattus norvegicus TLOACA53YF10 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ221707.1 Rattus norvegicus TLOADA32YN03 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ221661.1 Rattus norvegicus TLOADA33YF14 mRNA sequence	39.2	0.25
emb FQ221640.1 Rattus norvegicus TLOADA33YJ17 mRNA sequence	39.2	0.25

OK Forward Reverse Status: Blast search complete String: Search

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Rattus norvegicus ribosomal protein S29-like (LOC100363434), mRNA >ref XM_003753811.1	42.1	42.1	100%	0.021	100%	XM_003753811.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOABA27YI16 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ210507.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOACA3Y021 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ216880.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA17YI18 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ222937.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA1YI16 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ222711.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA21YL17 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ222566.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA24YG12 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ222368.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA25YH07 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ222302.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA25YI04 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ222293.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA52YF16 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ2228730.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA28YD14 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ222143.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA8YI03 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ2228434.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA2YM02 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ221942.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA30YK15 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ221875.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOACA53YF10 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ224820.1
<input type="checkbox"/> Rattus norvegicus TLOADA32YN03 mRNA sequence	42.1	42.1	100%	0.021	100%	FQ221707.1

Fig. 23. Alineamiento del oligonucleótido antisentido GGGTAGACAGTCGAATCATCC.

Resultados obtenidos del alineamiento de secuencias para el oligonucleótido antisentido obtenido de BLAST del programa de PerlPrimer y BLAST de NCBI.

En la tabla I, se describen las secuencias de los oligonucleótidos de la proteína ribosomal S29 y PPAR γ 2.

Gen	Gen ID	Secuencia	Amplicon
Proteína ribosomal S29	NM_012876.1	GTCTGAAGGCAAGATGGGTC	216 pb
		GGGTAGACAGTCGAATCATCC	
PPAR γ 2	NM_001145366.1	CAGAACTGGGAGTAGCCTG	160 pb
		CCTTGGATATTAGTGGTTCACAGC	

Tabla I. Oligonucleótidos de la PCR para los genes en estudio. Se muestra el número de acceso (ID) en GenBank, la secuencias para el oligonucleótido sentido en la parte superior y el oligonucleótido antisentido en la parte inferior, el tamaño de amplicón. El diseño se realizó con el programa Perl Primer V.1.1.19-1 (graphical desing of primer for PCR); también se realizó un alineamiento utilizando la base de datos Clustal W.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizo utilizando el kit comercial PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific). En un microtubo para PCR se coloco 5 μ L de PCR Master Mix (2X), 0,5 μ L de oligonucleótido sentido, 0,5 μ L de oligonucleótido antisentido y 1 μ g de cDNA agregando agua libre de nucleasa hasta obtener un volumen final de 10 μ L. Los protocolos de termociclado para los genes de interés se reportan en las siguientes tablas:

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	95 °C	3 min	Desnaturalización
35	95 °C	30 s	Desnaturalización
	59,1 °C	30 s	Alineamiento
	72 °C	20 s	Extensión
1	72 °C	10 min	Extensión final
	4 °C	∞	Almacenamiento

Tabla II. Programación de los parámetros experimentales en el termociclador para el gen de la proteína PPAR γ .

Ciclos	Temperatura	Tiempo	Proceso
1	95 °C	3 min	Desnaturalización
33	95 °C	30 s	Desnaturalización
	59.1 °C	30 s	Alineamiento
	72 °C	20 s	Extensión
1	72 °C	10 min	Extensión final
	4 °C	∞	Almacenamiento

Tabla III. Programación de los parámetros experimentales en el termociclador para el gen de la proteína ribosomal S29.

Los productos de PCR fueron verificados en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio. Los análisis de densitometría se realizaron con el programa Image J. Los valores de densitometría fueron normalizados con respecto a los valores del control interno (proteína ribosomal S29), los valores se expresaron en valores normalizados.

Resultados preliminares del efecto de la administración crónica de dos meses de Cd sobre los niveles de m RNA de PPAR γ 2 en tejido adiposo

Los niveles de mRNA de PPAR γ 2 en TAS a los dos meses de administración de Cd no fueron detectados en las condiciones establecidas por el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas.

En la figura 24A se muestran los resultados obtenidos en nuestro estudio para TAR, indicando que existe una regulación negativa (en un 6.9 %) en los niveles de mRNA de PPAR γ después de la administración de dos meses de Cd en comparación con animales no administrados.

En el grupo de TAE, por su parte, no presenta modificación en los niveles de mRNA de PPAR γ 2 después de la administración de dos meses de Cd (Figura 24B).

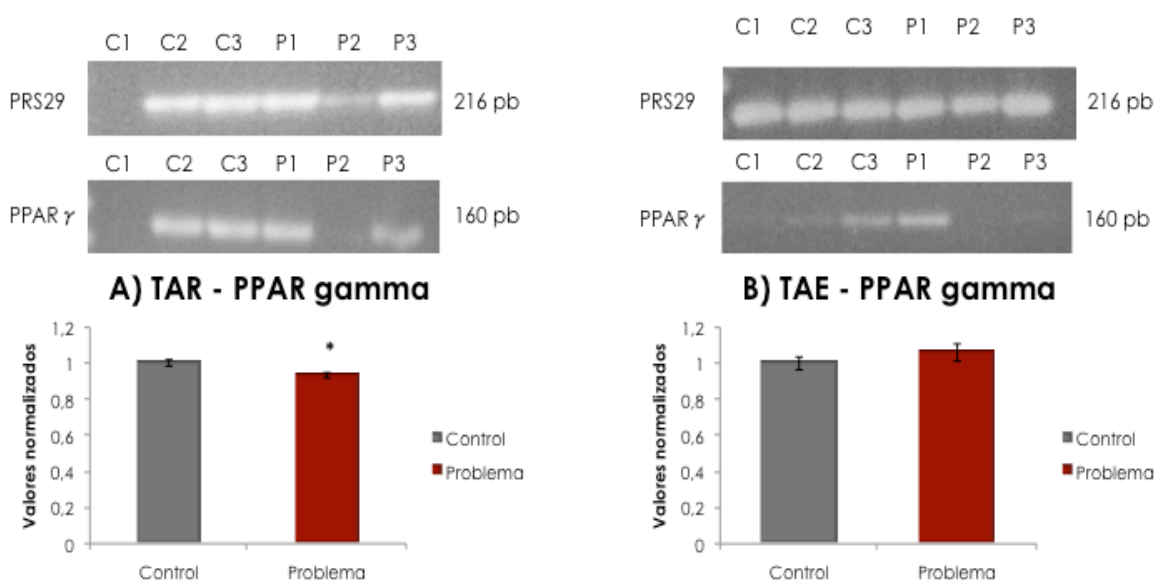


Fig. 24. Efecto de la administración crónica de dos meses de Cd sobre los niveles de mRNA de PPAR γ 2 en tejido adiposo. Se observa el análisis del mRNA de PPAR γ 2 mediante ensayo de RT-PCR de muestras sin administración de Cd y tres muestras con administración crónica de dos meses del metal en TAR (A) y TAE (B). En la parte superior se muestra el patrón de corrimiento electroforético representativo del producto de PCR. Los datos presentados corresponden a la media \pm EEM de 3 ratas evaluadas por triplicado.

II. Preparación de Tris-HCl 30 mM, pH 8.0

Se utilizó la sal **TRIS** (Tris(hidroximetil)aminometano) 99.9 % de pureza y PM 121.1 SIGMA, lote 11K5430.

Tris	0.3633 g
Agua destilada	100 mL

Adicione los componentes en 80 mL de agua destilada y agite hasta disolver. Para ajustar el pH, se prepara una solución 1:5 de ácido clorhídrico con dH₂O. Aforar a 100 mL.

III. Soluciones para el análisis histológico del tejido adiposo

Formalina al 10%

Formalina 37%	108.108 mL
PBS 10X, 50mM, pH 7,4	100 mL

En un matraz con capacidad para 1,000 mL colocar la formalina y el PBS 10X y aforar con agua destilada.

Solución de alcohol ácido

Ácido clorhídrico	5 mL
Alcohol al 70%	500 mL

En un matraz con capacidad para 500 mL colocar el ácido clorhídrico y aforar con alcohol al 70%.

Solución saturada de carbonato de litio

Carbonato de litio	5 g
Agua destilada	500 mL

Adicionar el carbonato de litio en un matraz y aforar con agua destilada a 500 mL.

Solución Eosina / floxina

Eosina al 1%	100 mL
Floxina 1%	15 mL
Alcohol 96 %	780 mL
Ácido acético glacial	4 mL

Mezclar los componentes en un matraz de 1 L y aforar con agua destilada.

IV. Soluciones para la extracción de lípidos por el método de Folch

Solución cloroformo metanol

Cloroformo	200 mL
Metanol	100 mL

Mezclar los disolventes y almacenar en una botella ámbar de vidrio.

Solución fase superior y cloruro de calcio

Cloroformo	1.5 mL
Metanol	24 mL
Agua destilada	23.5 mL
CaCl₂ 0.02%	0.98 g

Mezclar los componentes y almacenar en una botella de vidrio ámbar.

V. Determinación de triglicéridos



TRIGLYCERIDES

Trigliceridos

GPO-POD. Enzimático colorimétrico

Determinación cuantitativa de triglicéridos IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

Los triglicéridos incubados con lipoproteína lipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerol fosfato deshidrogenasa (GPD) 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 dihidroacetona 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 del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada^{1,2,3}.

SIGNIFICADO CLINICO

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre.

Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos puede elevar los niveles de triglicéridos.

Su aumento es relativamente inespecífico. Diversas dolencias, como ciertas disfunciones hepáticas (cirrosis, hepatitis, obstrucción biliar) o diabetes mellitus, pueden estar asociadas con su elevación^{1,6,7}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Tampón	GOOD pH 7,5	50 mmol/L
	p-Clorofenol	2 mmol/L
R 2 Enzimas	Lipoprotein lipasa (LPL)	150000 U/L
	Glicerol quinasa (GK)	500 U/L
	Glicerol-3-oxidasa (GPO)	2500 U/L
	Peroxidasa (POD)	440 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,1 mmol/L
	ATP	0,1 mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL Patrón primario acuoso de Triglicéridos 200 mg/dL.		

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en un frasco de R 1 Tampón.

Ref: 1001310 Reactivo de trabajo (RT): Reconstituir (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en 10 mL de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

RT Estabilidad: 6 semanas en nevera (2-8°C) o una semana a 15-25°C.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

TRIGLYCERIDES CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm $\geq 0,14$.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero y plasma heparinizado o EDTA¹. Estabilidad de la muestra: 5 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 505 (490-550) nm
 - Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ^(min1,2) (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 min. a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CALCULOS

$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times 200 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de triglicéridos en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0113 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Hombres: 40 – 160 mg/dL
Mujeres: 35 – 165 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,7 mg/dL hasta el límite de linealidad de 1000 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

Media (mg/dL)	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	118	216	119	215
SD	0,67	0,94	2,17	2,91
CV (%)	0,60	0,43	1,83	1,36

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0012 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,996.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,00x + 0,0743.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con bilirrubina hasta 170 µmol/L y hemoglobina hasta 10 g/L¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de los triglicéridos^{4,5}.

NOTAS

- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19 (5): 476-482.
- Fossati P et al. Clin. Chem 1982; 28(10): 2077-2080.
- Kaplan A et al. Tryglycerides. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1206.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001310	5 x 10 mL
Ref: 1001311	10 x 20 mL
Ref: 1001312	10 x 50 mL
Ref: 1001313	4 x 125 mL

IMPORTADORES EXCLUSIVOS : LAB CENTER DE MEXICO S.A. DE C.V.
Calle de las Tomas #35 Fracc. Boulevardes Naucalpan Edif. de Mexico C.P. 53140
TEL: 01 (55) 5393-8772 LADA SIN COSTO 01 800 500 SPIN (7746)
www.spinreact.com.mx info@spinreact.com.mx



VI. Determinación de colesterol



CHOLESTEROL

Colesterol

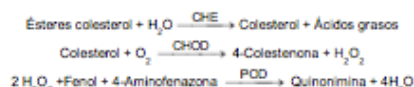
CHOD-POD. Enzimático colorimétrico

Determinación cuantitativa de colesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

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



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del colesterol es uno de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular^{3,4}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	PIPES pH 6,9	90 mmol/L
Tampón	Fenol	26 mmol/L
R 2	Colesterol esterasa (CHE)	300 U/L
Enzimas	Colesterol oxidasa (CHOD)	300 U/L
	Peroxidasa (POD)	1250 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,4 mmol/L

CHOLESTEROL CAL	Patrón primario acuoso de Colesterol 200 mg/dL
------------------------	--

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en 1 frasco de R 1 Tampón.
Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
Estabilidad (RT): 4 meses en nevera (2-8°C) o 40 días 15-25°C.
Mantener protegido de la luz

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm $\geq 0,1$.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm (500-550).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma^{1,2}; Estabilidad de la muestra 7 días a 2-8°C y varios meses si se mantiene la muestra congelada (-20°C).

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (500-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura 37°C /15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (NIST) (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C ó 10 min. a temperatura ambiente.

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

CALCULOS

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times 200 \text{ (Conc. Patrón)} = \text{mg/dL de colesterol en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0258= mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Evaluación del riesgo^{5,6}:

Menos de 200 mg/dL	Normal
200-239 mg/dL	Moderado
240 o más	Alto

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,6 mg/dL hasta el límite de linealidad de 600 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	90,1	305	90,4	301
SD	0,64	3,30	1,12	2,30
CV (%)	0,71	1,08	1,24	0,76

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,002 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,995.

Ecuación de la recta de regresión: y= 1,004x - 0,931.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias de hemoglobina hasta 5 g/L y bilirrubina hasta 10 mg/dL⁷.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Colesterol^{8,9}.

NOTAS

- CHOLESTEROL CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
- LCF (Lipid Clearing Factor) está integrado en el reactivo.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Naito H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1194-11206 and 437.
- Melatti F. et al. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. Clin Chem 1978; 24 (12): 2161-2165.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N.W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001090	R1, R2 (Lio.): 10 x 50 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001091	R1, R2 (Lio.): 10 x 20 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001092	R1, R2 (Lio.): 4 x 125 mL, CAL: 1 x 5 mL
Ref: 1001093	R1, R2 (Lio.): 4 x 250 mL, CAL: 1 x 5 mL

BS/S11-E 21/06/11



SPINREACT, S.A. / S.A.U. Ctra.Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (G) SPAIN
Tel. +34 972 69 06 00 Fax +34 972 69 00 99. e-mail: spinreact@spinreact.com

VII. Determinación de colesterol-LDL



LDLc-D

Colesterol LDL
Enzimático colorimétrico. Líquido

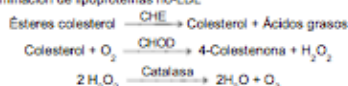
Determinación cuantitativa de colesterol LDL IVD

Conservar a 2-8°C

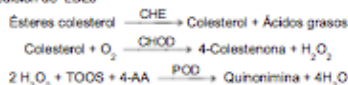
PRINCIPIO DEL METODO

Determinación directa del LDLc (colesterol de lipoproteínas de baja densidad) sin necesidad de pre-tratamiento o centrifugado de la muestra. La determinación se realiza en dos pasos:

1-ª Eliminación de lipoproteínas no-LDL



2-ª Medición de LDLc



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

SIGNIFICADO CLINICO

Las partículas de LDLc son lipoproteínas que transportan el colesterol a las células. Niveles elevados de colesterol LDL son un factor de riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, a menudo se le denomina "colesterol malo". Niveles altos de colesterol LDL están relacionados con obesidad, diabetes y nefrosis^{1,5,6}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Enzimas	PIPES pH 7.0 (20°C)	50 mmol/L
	Colesterol esterasa (CHE)	≥600 U/L
	Colesterol oxidasa (CHOD)	≥500 U/L
	Catalasa	≥600 KU/L
R 2 Enzimas	PIPES pH 7.0	50 mmol/L
	4 - Aminoantipirina (4-AA)	4 mmol/L
	Peroxidasa (POD)	≥4 KU/L
	Patrón. Suero humano liofilizado	

PRECAUCIONES

HDLe/LDLc CAL: Todos los componentes de origen humano han resultado ser negativos para el antígeno HBs, HCV y para el anti-HIV (1/2). Sin embargo, deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

TRAZABILIDAD: Los valores se asignan de acuerdo a los requisitos del Protocolo del Método de Evaluación US National Reference System CRMUN.

PREPARACION

R 1 y R 2: Listos para su uso.

HDLe/LDLc CAL: Reconstituir el contenido de un vial con 1 mL de agua destilada. Tapar el vial y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación.

R 1 y R 2: Una vez abiertos son estables 4 semanas a 2-8°C.

HDLe/LDLc CAL: Una vez reconstituido es estable 2 semanas a 2-8°C o 3 meses a -20°C. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 600 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero⁷: Procesar la muestra sin demora. Evitar la congelación y descongelación repetida de la muestra. Estabilidad: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 600 (590-700) nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C

- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en tubos de ensayo:

	Bianco	Patrón	Muestra
R 1 (µL)	300	300	300
Patrón (µL)	--	4	--
Muestra (µL)	--	--	4

4. Mezclar e incubar 5 min a 37°C

5. Añadir:

R 2 (µL)	100	100	100
----------	-----	-----	-----

6. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C.

7. Leer la absorbancia (A), frente al Blanco de reactivo.

CALCULOS

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

Factor de conversión: mg/dL x 0,02586 = mmol/L
1 g/L = 100 mg/dL

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINREACT H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210)

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA^{1,5,6}

Óptimo < 100 mg/dL
Bueno 100-129 mg/dL
Moderadamente alto 130-160 mg/dL
Alto > 160 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 7 mg/dL hasta el límite de linealidad 1000 mg/dL. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

Media (mg/dL)	Intraenserie (n= 20)			Interenserie (n= 20)		
	71.7 5	108.6	177.6	98	153	207
SD	0.44	1.05	1.93	2.44	3.39	3.63
CV (%)	0.62	0.96	1.09	2.5	2.21	1.75

Comparación con otros métodos: Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 54 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r): 0,99

Ecuación de la recta de regresión: y = 0,9634x + 5,35

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No interfieren concentraciones de ácido ascórbico hasta 50 mg/dL, hemoglobina hasta 500 mg/dL, bilirrubina hasta 30 mg/dL, factores reumatoideos hasta 1000 U/mL y muestras lipémicas hasta 1200 mg/dL.

Muestras lipémicas con concentración de triglicéridos mayor a 1200 mg/dL, se deben diluir 1/10 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Kaplan A et al. Lipoproteins. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 574-577.
- Okada M et al. Low-density lipoprotein cholesterol can be chemically measured. J. Lab. Clin. Med. 1998; 132, 195-201.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACION

Ref. 41023

Cont.	R 1: 1 x 30 mL
	R 2: 1 x 10 mL
	CAL: 1 x 1 mL



VIII. Determinación de colesterol-HDL



CE HDLc-P

Colesterol HDL Reactivo precipitante

Reactivo precipitante de HDL colesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL) del suero o plasma, se precipitan con fosfotungstato en presencia de iones magnesio. Tras su centrifugación, el sobrenadante claro conteniendo las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se emplea para determinar el colesterol HDL^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

El colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a menudo se denomina "colesterol bueno", ya que niveles elevados están relacionados con un menor riesgo cardiovascular. Un nivel bajo de colesterol HDL es considerado uno de los principales factores de riesgo cardiovascular^{3,4,5}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	Ácido fosfotúngstico	14 mmol/L
Reactivo precipitante	Cloruro magnésico	2 mmol/L
Opcional	Cholesterol	Ref. 1001092 Ref. 1001093

PRECAUCIONES

Corrosivo (C): R35: Provoca quemaduras graves.

PREPARACION

El reactivo está listo para su uso.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm (500-550).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma¹.

No utilizar muestras hemolizadas. Separar el suero de los hematies lo antes posible.

Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

Precipitación ^{NOTA 1}

1. Dosisificar en tubos de centrifuga:

R (µL)	100
Muestra (mL)	1,0

- Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 20 min a 4000 r.p.m. ó 2 min a 12000 r.p.m.
- Recoger el sobrenadante y determinar el HDL Colesterol.

Ensayo

Proceder según lo indicado en las instrucciones de trabajo del reactivo de Colesterol.

CÁLCULOS

- Con Calibrador:

$$\frac{(A) \text{Muestra}}{(A) \text{Calibrador}} \times (\text{Conc. Calibrador}) = \text{mg/dL HDLc en la muestra}$$

- Con Factor:

$A_{505 \text{ nm}} \text{ Muestra} \times 320 = \text{mg/dL HDLc en la muestra}$
 $A_{505 \text{ nm}} \text{ Muestra} \times 475 = \text{mg/dL HDLc en la muestra}$

Cálculo LDL-colesterol

Se calcula mediante la fórmula de Friedewald

$$\text{LDL colesterol} = \text{Colesterol total} - \frac{\text{Triglicéridos}}{5} - \text{HDL colesterol}$$

CONTROL DE CALIDAD

Proceder según lo indicado en las instrucciones de trabajo del reactivo de Colesterol.

VALORES DE REFERENCIA³

HDL-colesterol:

	Hombres	Mujeres
Riesgo menor	> 55 mg/dL	> 65 mg/dL
Riesgo normal	35-55 mg/dL	45-65 mg/dL
Riesgo elevado	< 35 mg/dL	< 45 mg/dL

LDL-colesterol:

Valores sospechosos a partir de	: 150 mg/dL
Valores elevados a partir de	: 190 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 1,57 mg/dL hasta el límite de linealidad de 275 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	75,8	33,9	95,2	182
SD	0,89	0,85	2,59	3,04
CV (%)	1,18	2,51	2,72	1,68

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0015 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: $y=0,9944x - 1,2346$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con triglicéridos hasta 4 g/L¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Colesterol HDL^{1,3}.

NOTAS

- El procedimiento de precipitación también se puede realizar usando la mitad del volumen del reactivo y muestra.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Abdo H K. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem: The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1207-1213 and 437.
- Grove T H. Effect of reagent pH on Determination of HDL Cholesterol by precipitation with Sodium Phosphotungstate-magnesium. Clin Chem 1979; 25:560.
- US National Cholesterol Education Program of the National Institutes of Health.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC 2001.
- Burts A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001095 Cont. R: 4 x 5 mL



IX. Determinación de fosfolípidos



PHOSPHOLIPIDS

Fosfolípidos

CHO-POD. Enzimático colorimétrico

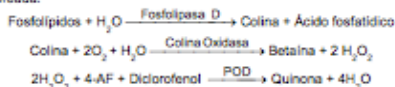
Determinación cuantitativa de fosfolípidos

IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

Los fosfolípidos son hidrolizados por la fosfolipasa D y la colina liberada es secuencialmente oxidada por la colina oxidasa (CHO) a betaina, con la simultánea producción de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el peróxido de hidrógeno acepta oxidativamente a la 4-Aminofenazona (4-AF) y al diclorofenol formando una quinonamina colorada:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fosfolípidos presentes en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

Los fosfolípidos son moléculas lipídicas que contienen fosfatos. Su función como componente principal de las membranas celulares hace de los fosfolípidos un elemento esencial para las células. La determinación de fosfolípidos en suero es un indicador clínico importante para el diagnóstico de alteraciones del hígado, fundamentalmente ictericias obstructivas^{1,2}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,55	50 mM
Tampón	Diclorofenol	2,1 mM
R 2	Fosfolipasa D	400 U/L
	Colina oxidasa (CHO)	2200 U/L
Enzimas	Peroxidasa (POD)	3600 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	1 mmol/L
PHOSPHOLIPIDS CAL.	Patrón primario acuoso de Fosfolípidos	300 mg/dL

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Reconstituir (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en 10 mL de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

Estabilidad del reactivo reconstituido: 3 semanas en nevera (2-8°C) o 7 días a 15-25°C.

Mantener protegido de la luz.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

PHOSPHOLIPIDS CAL.

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm \geq 0,16.

MATERIAL ADICIONAL.

- Espectrofotómetro ó analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma.
Estabilidad de la muestra: 3 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ¹ (2) (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CALCULOS

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times 300 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de fosfolípidos en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0129 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINCONTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA³

La concentración normal de fosfolípidos en suero es similar a los valores del colesterol total. La relación entre colesterol y fosfolípidos es 1/1. Cualquier cambio en los valores del colesterol corresponde un cambio en los valores de los fosfolípidos en la misma dirección.
Adulto: 125-275 mg/dL.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 2,54 mg/dL hasta el límite de linealidad de 600 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	121	221	126	225
SD	2,12	2,03	2,92	4,61
CV (%)	1,74	0,91	2,31	2,05

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0014 A.

Exactitud: Los reactivos de SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con ácido ascórbico, glucosa, bilirrubina, ácido úrico o hemoglobina, en concentraciones normales².

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de fosfolípidos^{3,4}.

NOTAS

- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Naito K N, Lipids, Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 918-919 and 570-572.
- Takayama M, et al. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. Clin Chem 1977; Acta 78; 93-98.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC 2001.
- Burtis A, et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref:1001140 Cont. 5 x 10 mL

BSDTT14 Ed.2002



SPINREACT,S.A. Cta.Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99. e-mail: spinreact@spinreact.com

X. Soluciones para electroforesis en geles de poliacrilamida para lipoproteínas

Tris-N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED)

Tris	36,6 g
TEMED	0,23 mL
HCl 1N	48mL
Agua destilada	200 mL

Disolver tris y TEMED en aproximadamente 100 mL de agua destilada. Añadir HCl 1N y diluir a 200 mL con agua destilada. La solución adquiere un pH 8,9. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, esta solución es estable durante 3 meses.

Tris-TEMED

Tris	5.98 g
TEMED	0,46 mL
HCl 1N	48mL
Agua destilada	100 mL

Disolver el tris y TEMED en agua. Añadir HCl 1N y diluir a 100 mL con agua destilada. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, esta solución es estable durante 3 meses.

Acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida	15 g
Bisacrilamida	0,4 g
Agua destilada	100 mL

Disolver acrilamida y bisacrilamida en agua y completar a 100 mL. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, esta solución es estable durante 3 meses.

Acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida	20 g
Bisacrilamida	5 g
Agua destilada	200 mL

Disolver acrilamida y bisacrilamida en agua y diluir a 200 mL con agua. Conservar en una botella ámbar a 4 °C, esta solución es estable durante 3 meses.

Sacarosa

Sacarosa	200 g
Agua destilada	500 mL

Disolver 200 g de sacarosa en agua y diluir a 500 mL con agua.

Persulfato de amonio

Persulfato de amonio	0,14 g
Agua destilada	100 mL

Disolver 0,14 g de persulfato amónico en agua y completar a 100 mL. Estable durante una semana a 4°C en frasco ámbar.

Solución colorante

Rojo oleoso O	0,05 g
isopropanol	10 mL

Añadir 0,05 g de rojo oleoso O a 10 mL de isopropanol. Mezclar bien. Filtrar y conservar en un frasco ámbar. Estable un mes a temperatura ambiente.

Gel inferior al 3,85%

Mezclar las soluciones 1, 3 y 7 a razón 1:1:2 (V/V). Preparar aproximadamente 1,2 mL por cada gel a separar. Antes de mezclar las soluciones dejar que a temperatura ambiente.

Gel medio al 3,125%

Mezclar las soluciones 2, 4, 5 y 6 a razón de 1:2:1:4 (V/V), respectivamente. Conservar en frasco ámbar. Estable durante un mes a 4°C.

Gel superior

Añadir 8 volúmenes de gel medio a 2 volúmenes de solución colorante. Mezclar suavemente por inversión. Preparar este gel inmediatamente antes de su empleo.

Solución tampón

Tris	6 g
Glicina	28,8 g
Agua destilada	1 L

Disolver tris y 28,8 de glicina en aproximadamente 850 mL de agua. Si hace falta, ajustar el pH a 8,3 con tris o con glicina. Diluir con agua destilada hasta 1 litro.

Preparación de los geles en el soporte

En tubos 7 × 75 mm colocar los diferentes geles de acuerdo al siguiente esquema:



XI. Determinación de lípidos totales



TOTAL LIPIDS

Lípidos totales Sulfo-fosfo vainillina. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de lípidos totales IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

Los lípidos insaturados reaccionan con el ácido sulfúrico en caliente con formación de iones carbonio.

En una segunda etapa, éstos, en presencia de fosfovainillina dan una coloración rosada.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de lípidos totales presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

Los lípidos son compuestos orgánicos cuya función más importante es la de actuar como combustible.

Poseen un extraordinario rendimiento, favorecido por la posibilidad de almacenarse en notables cantidades como tejido adiposo. Otras funciones: son constituyentes de las membranas biológicas, forman estructuras adiposas protectoras de los órganos internos, y proveen compuestos importantes en la formación de diversas hormonas.

Gran parte del interés en el estudio del aumento de estos compuestos se debe a la conexión entre hiperlipemia y arteriosclerosis, diabetes y enfermedad cardíaca^{3,4}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	Fosfovainillina	235 mmol/L
TOTAL LIPIDS CAL	Patrón primario acuoso de Lípidos Totales 750 mg/dL	
Reactivo adicional: Ácido sulfúrico p.a. (SO ₃ H ₂)		

PREPARACION

Reactivo y calibrador listos para su uso.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

TOTAL LIPIDS CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 520 nm \geq 0,32.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 520 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma^{1,2}.

Estabilidad de la muestra: Los lípidos totales son estables 24 h a temperatura ambiente (15-25°C) o 3 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 520 (490-550) nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Patrón	Muestra
SO ₃ H ₂ (mL)	2,5	2,5	2,5
Patrón ^{100x10} (µL)	--	100	--
Muestra (µL)	--	--	100

- Mezclar enérgicamente con ayuda de un agitador mecánico.
- Incubar 10 minutos en un baño de agua hirviendo (100°C).

- Enfriar en baño de agua fría y dosificar en cubetas:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Hidrolizado muestra (µL)	--	--	50
Hidrolizado Calibrador (µL)	--	50	--

- Mezclar enérgicamente con ayuda de un agitador mecánico.

- Incubar 15 minutos a 37°C.

- Leer la absorbancia (A) del calibrador y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 1 hora.

CALCULOS

$\frac{(A)Muestra}{(A)Calibrador} \times 750$ (Conc. Cal.) = mg/dL de lípidos totales en la muestra

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:

450 - 800 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 7,7 mg/dL hasta el límite de linealidad de 1500 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (mg/dL)	555	919	553	919
SD	15,9	6,47	7,62	5,87
CV (%)	2,87	0,70	1,78	0,63

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,00066 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de los lípidos totales^{1,2}.

NOTAS

- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Kaplan A et al. Lipids. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St. Louis. Toronto. Princeton 1984: 918-919.
- Cottet M.J. et al. Dosage des lipides sériques par la méthode sulfo-phosphovanillique (1) de E Chabrol et R. Charonnet. Académie Nationale de Médecine. 1965; 149: 331-338.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001270 Cont. 2 x 150 mL

BSDT27 Ed. 2004



SPINREACT, S.A. Ctra. Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel. +34 972 69 06 00 Fax +34 972 69 00 99 e-mail: spinreact@spinreact.com

XII. Soluciones para la determinación de ácidos grasos libres

Solución de cobre

Cu(NO₃)₂·2H₂O	4 g
Trietanolamina	12mL
Agua destilada	100 mL

Disolver el Cu(NO₃)₂·2H₂O en 50 mL de agua destilada, añadir la trietanolamina y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución de cuprizona

Cuprizona	0,04 g
Isopropanol	12mL
Cloroformo	1 mL

Disolver la cuprizona (ácido óxalico bis-(ciclohexilidenehidrazida)) en 1 mL de cloroformo y aforar a 100 mL con isopropanol.

Solución de amonio

Hidróxido de amonio 28.4 %	20,4 mL
Agua destilada	100 mL

Colocar en un matraz de aforación el hidróxido de amonio y aforar a 100 mL con agua destilada.