

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
Área de Análisis Clínicos



Tesis profesional para obtener el título de Licenciado en Químico FarmacoBiólogo
“El meta-vanadato de sodio como regulador del metabolismo de carbohidratos y
lípidos en ratas con dos modelos de síndrome metabólico inducido”

Presenta:
pQFB Víctor Enrique Sarmiento Ortega

Lugar de realización:
Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Director de y Co-Director de Tesis
D.C. Eduardo Brambila Colombres
cD.C. Samuel Treviño Mora

Octubre 2014

AGRADECIMIENTOS

A dios

Por brindarme lo necesario para salir adelante, por haberme dado una familia tan hermosa y por darme una vida llena de bendiciones y satisfacciones.

A mis padres

Por haberme brindado lo más importante en esta vida; educación, amor y cariño. Por todo su tiempo, esfuerzo y preocupaciones, no tengo como pagárselos.

A mis hermanos

Por su apoyo, consejos y cariño en todos estos años y en todas las etapas de mi vida.

Al DC. Samuel Treviño Mora

Por ser en estos años algo más que mi maestro, más que mi director y asesor de tesis; un amigo. Por brindarme su confianza, apoyo, consejos, amistad y sobre todo por su valioso tiempo en la realización de este proyecto.

Al DC. Eduardo Brambila Colombres

Por brindarme todo su apoyo, su dirección y todas las facilidades para la realización de este proyecto, así mismo el haberme abierto las puertas de su laboratorio de investigación.

Al Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas

Por haberme permitido encontrar a grandes profesionistas, seres humanos, pero sobre todo a grandes amigos y por haberme ayudado a crecer como profesionista y como persona.

A Clau, a mis amigos y a todas esas personas que de una u otra manera me han ayudado a superarme, por brindarme consejos, compartir sus conocimientos conmigo, por su motivación y sus incasables muestras de apoyo.

Contenido

1.- Marco teórico	
1.1 Antecedentes historicos.....	
1.2 Síndrome metabólico.....	
1.3 Factores de riesgo	
1.4 Dinámica celular y bioquímica de la alimentación normocalórica	
1.5 Patologías secundarias.....	
1.6 Tratamiento	
1.7 Metformina	
1.8 Tratamientos alternativos.....	
1.9 Vanadio.....	
1.10 Modelos de estudio.....	
Planteamiento del problema	
Justificación.....	
Objetivos	
Hipótesis	
2. Diseño de la investigación.....	
3. Diagrama de trabajo.....	
4. Metodología.....	
5. Resultados	
6. Discusion de resultados	
7. Conclusiones.....	
8. Bibliografía	
9. Anexos	

ANTECEDENTES HISTORICOS

El concepto de síndrome metabólico (SM) se define como una agrupación de factores asociados a mayor riesgo en el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y riesgo cardiovascular. Alberti y cols., proporcionaron una de las primeras descripciones conjuntamente con Kylin en 1923, cuando lo definieron como un síndrome consistente en hipertensión, hiperglicemia e hiperuricemia; posteriormente a mediados del siglo XX, en 1956, Vague asoció por primera vez a la hipertensión arterial e hiperuricemia con las alteraciones metabólicas, sin embargo, fue hasta 1966 que Welborn en un estudio con pacientes que presentaban hipertensión arterial demostró concentraciones séricas de insulina mayores que en el grupo control, señalando la presencia de hiperinsulinemia y describiéndose así por primera vez las consecuencias de la resistencia a la insulina en el desarrollo del síndrome metabólico.[1]

Vague dentro de sus contribuciones ha subrayado la distribución de obesidad en trastornos metabólicos, sin embargo, no fue hasta la década de los ochenta en que adquirió mayor interés. En 1988, Reaven describió un síndrome que se basa en un conjunto de anomalías con mayor riesgo cardiovascular y propuso el término de síndrome X [6], en el cual describió un cuadro caracterizado por la agrupación de factores de riesgo cardiovascular (aumento de triglicéridos con disminución de colesterol HDL, hipertensión arterial y obesidad abdominal) asociado con resistencia a la insulina. En su hipótesis, la resistencia a la hormona hipoglucemiante juega el papel principal conjuntamente a la obesidad como uno de los factores predisponentes, con fuerte asociación a estados de hipercoagulabilidad, estados pro-inflamatorios y micro albuminuria.

A lo largo de los años se han añadido a la definición otros componentes a la definición de este síndrome, a la vez que comenzó a recibir nuevas denominaciones como fueron la de síndrome X plus, cuarteto mortífero, síndrome plurimetabólico, síndrome de insulinoresistencia, síndrome de OROP (dislipidemia, resistencia a la insulina, obesidad e hipertensión arterial, por sus siglas en inglés) y otros. En 1998, el grupo de trabajo de diabetes de la

Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso un conjunto de criterios para el diagnóstico de SM, el cual debía incluir evidencias clínicas de resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión arterial, obesidad (definida por el índice de masa corporal (IMC) o por la relación cintura-cadera) y micro albuminuria. [2]

En el 2001 el panel de expertos sobre detección, evaluación y tratamiento de la hipercolesterolemia (ATPIII) determinaron los criterios de este síndrome, finalmente en el año 2003; la Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AAEC) unificó y publicó una serie de criterios para establecer el diagnóstico de SM haciendo énfasis en la utilidad de la prueba de tolerancia a la glucosa, y estos nuevos criterios se sumaron a los ya establecidos por la OMS y el ATPIII [3].

SÍNDROME METABÓLICO

A nivel internacional, en la actualidad no existe un criterio único para definir el SM. Desde la aparición de su primera definición oficial, hasta la actualidad, han surgido diferentes propuestas con el objetivo de identificar a los individuos que lo presentan y de estimar su prevalencia en diferentes poblaciones. Esos conceptos muestran diferencias, no solo con relación a los componentes que se proponen para su diagnóstico, sino también con respecto a los puntos de corte fijados para cada uno de ellos. En la literatura existen seis principales organismos internacionales los cuales proporcionan sus criterios diagnósticos, propuestos por sus paneles de expertos: [4]

1. World Health Organization (Organización Mundial de la Salud, OMS)
2. European Group for Study of Insulin Resistance (EGIR)
3. National Cholesterol Education Programme (NCEP-ATP III)
4. International Diabetes Federation Consensus Panel (IDF)
5. American College of Endocrinology (ACE)
6. Asociación Americana del Corazón (AHA) en conjunto con el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y Sangre de los Estados Unidos (NLHBI)

A continuación se describen los diferentes criterios diagnósticos establecidos por dichas organizaciones.

Tabla 1.- Criterios utilizados para el diagnóstico de SM.

Criterios de diagnóstico	OMS	EGIR	NCEP-ATP III (3 de los siguientes)	AHA/NHLBI (3 de los siguientes)	IDF
Insulinorresistencia	GAA, TGA, DM2 o disminución de la sensibilidad a la insulina más de dos de los siguientes	Insulina plasmática mayor al 25% de los valores en ayunas en normodiabéticos *	No lo considera	No lo considera	No lo considera
Obesidad	IMC > 30 y/o relación cintura cadera > 0.9 en varones o > 0.85 en mujeres	Cintura ≥ 94 cm en varones y ≥ 80 cm en mujeres	Cintura ≥120 94 cm en varones y ≥ 88 cm en mujeres	Cintura ≥120 94 cm en varones y ≥ 88 cm en mujeres	Cintura ≥del umbral definido para cada grupo étnico más dos de los siguientes
Dislipidemia	TG ≥ 150 mg/dL y/o HDL < 35 mg/dL en varones o <39 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150 mg/dL y/o HDL < 35 mg/dL en varones o <39 mg/dL en mujeres	TG ≥ 150 mg/dL	TG ≥ 150 mg/dL*	TG ≥ 150 mg/dL*
			o HDL < 40 mg/dL en varones o <50 mg/dL en mujeres	o HDL* < 40 mg/dL en varones o <50 mg/dL en mujeres	o HDL < 40 mg/dL en varones o <50 mg/dL en mujeres
Presión arterial	≥140/90 mmHg	≥140/90 mmHg	≥130/85 mmHg	≥130/85 mmHg*	≥130/85 *mmHg*
Glucemia en ayunas		GAA, TGA O DM2	Glucemia en ayunas >110 mg/dL	Glucemia* en ayunas >100 mg/dL	Glucemia* en ayunas >100 mg/dL
IMC	<24.9	<26	<26.7		<27.1

*o en tratamiento con fármacos: Se refiere a presentar valores normales de los lípidos en el momento del estudio pero está bajo tratamiento por diagnóstico previo; Microalbuminuria positiva se considera cuando la excreción de albúmina ≥20 mg/min o la relación albúmina/creatinina en orina es ≥30 mg/g en 24 Hras.

AHA/NHLBI: Asociación Americana del Corazón/Instituto Nacional del Corazón, Sangre y Pulmón; DM 2: Diabetes Mellitus tipo 2; GAA: glucemia alterada en ayunas; TGA: tolerancia a la glucosa alterada; TG: triglicéridos.

Todas las definiciones, de los organismos anteriormente citados, tienen en común el agrupar una serie de anormalidades en un mismo individuo, que le otorgan un mayor riesgo en el desarrollo de diabetes y de enfermedad cardiovascular, teniendo como base la resistencia insulínica.

La insulinoresistencia es la incapacidad de la insulina tanto endógena como exógena para facilitar la captación, entrada y utilización de la glucosa en los tejidos periféricos, creando un estado constante de hiperinsulinemia, la cual a su vez genera una serie de alteraciones asociadas. Es importante destacar que no todo paciente con hiperinsulinemia e incluso con resistencia a la insulina desarrollará SM ya que para el desarrollo del mismo se requiere defectos metabólicos adicionales como obesidad, dieta hipercalórica rica en grasas y carbohidratos por mencionar algunos. [5]

FACTORES DE RIESGO

El síndrome metabólico (SM) es una entidad compleja y heterogénea, con un fuerte componente genético y cuya expresión está influida por factores sociales, ambientales, económicos y culturales. Engloba una serie de enfermedades cuya prevalencia tanto en México como a nivel mundial son un problema de salud pública y su impacto radica en que involucra un sin fin de factores de riesgo cardiovascular y dentro de estos, la obesidad juega un papel central en la fisiopatología al ser uno de los factores desencadenante de otras alteraciones metabólicas íntimamente relacionadas con el SM, tales como intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensión arterial y dislipidemia principalmente, aunque cabe mencionar que tampoco es un factor decisivo. [6]

Genética

La epidemia del síndrome metabólico que está ocurriendo a través de la sociedad occidental se caracteriza por dos factores importantes. En primer lugar, se ha

producido rápidamente, la escala de tiempo es tan corta que los cambios a gran escala en la estructura genética de la población no puede ser una explicación. Sin embargo, el segundo punto es el hallazgo aparentemente contradictorio de que la variación individual en la obesidad y sus secuelas tienen un alto componente genético. La conclusión inevitable es que la obesidad y las enfermedades crónicas que vienen con él, es el resultado de una interacción entre genes/ambiente (Epigenética). Los individuos de ciertos grupos étnicos, sobre todo los latino, mexicano-americanos y afroamericanos, parecen tener una predisposición genética a la obesidad que se expresa especialmente en el entorno moderno, donde es el resultado de una mala adaptación al estilo de vida y al medio ambiente. [7]

Anteriormente varios investigadores han especulado acerca de los procesos evolutivos que pueden generar esta predisposición genética. Probablemente, la primera exposición de estas ideas fue propuesta por Neel, quien sugirió que la diabetes y la obesidad se derivaron de la selección natural en nuestros ancestros a favor de un "genotipo ahorrador" que permitió un almacenamiento altamente eficiente de la grasa durante los períodos de abundancia de alimentos. Neel argumentó que tal genotipo sería extremadamente ventajoso para el hombre primitivo, que estaba expuesto a períodos de escasez de alimentos, que autorizaba el depósito de las reservas de grasa de manera eficiente para sobrevivir a períodos posteriores. En la sociedad moderna, sin embargo, donde el suministro de alimentos es casi siempre hacer uso - poder, este genotipo ahorrador es perjudicial, ya que promotoras de almacenamiento eficiente de la grasa en la preparación para un período de escasez difícilmente llega. El desarrollo de resistencia a la insulina fue visto como parte de esta adaptación "genotipo ahorrador", ayudando a los primeros seres humanos en el proceso de la deposición eficiente de la grasa. [8]

Condiciones nutrimentales

Otro de los factores de riesgo que últimamente ha causado gran impacto sobre la sociedad, es la parte nutricional, principalmente una dieta hiperglúcida y/o hipercalórica, ya que estudios epidemiológicos recientes, demuestran que la

ingesta del alimento con estas características podría generar trastornos en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, ocasionando así alteraciones que llevan al desarrollo de SM. Las asociaciones enfocadas a la evaluación de las dietas en México, indican que una dieta caracterizada por el alto consumo de refrescos, refinado de cereales, tortillas de maíz, pastas y bajo consumo de productos lácteos, mariscos y granos integrales, se asocia con mayores probabilidades de desarrollar SM en niños, jóvenes y adultos mexicanos. Las estadísticas recientes muestran una prevalencia de la presencia de SM en un 60% en adultos y de un 10-30% de la población infantil. [9]

Estudios epidemiológicos han observado que una ingesta elevada de azúcares simples, de alimentos con alto índice glucémico y de dietas con alta carga glucémica se asocian a resistencia insulínica, DM2, hipertrigliceridemia y cifras bajas de la fracción del colesterol- HDL. Un bajo consumo de grasa saturada a favor de ácidos grasos poli-insaturados y mono-insaturados se ha implicado en una reducción de la incidencia de dichas anormalidades, aunque aún continúa el debate. La fibra dietética de cereales no refinados ha mostrados ser beneficiosa en la reducción del riesgo para el desarrollo de problemas metabólicos que derivan en DM2. Entre los patrones dietéticos de mayor debate, la dieta mediterránea se ha visto relacionada con una menor incidencia de diabetes y con una reducción del riesgo de muerte, sin embargo, cabe mencionar que el factor genético es de suma importancia también. Estudios de intervención para la prevención de DM2 han propuesto dietas hipolipídicas (reduciendo grasa saturada y trans-), con alto aporte de fibra y con bajo índice glucémico [10].

Así mismo, el consumo de azúcares refinados no sólo incrementa las glicemias prandiales y postprandiales, sino que también aumenta el depósito de grasas, principalmente en abdomen y tejido subcutáneo [11]. Se ha mostrado en diversas investigaciones que el consumo elevado de hidratos de carbono favorece estados de hipertrigliceridemia, y consecutivamente condiciona disminución de colesterol HDL, con aumento de la fracción VLDL. Este mecanismo se debe a que los carbohidratos rápidamente digeribles en forma de monosacáridos que saturan las

rutas metabólicas de transporte y metabolismo de los mismos, tienden a exacerbar hiperlipidemia post prandial no quilomicroémica. [11].

Por otro lado, la íntima asociación de SM y RI en sujetos, han mostrado, que la respuesta lipémica postprandial aumenta con las alteraciones metabólicas en las vías de carbohidratos sobre todo cuando se consumen alimentos con alto índice glucémico (IG); en dichos sujetos la alteración metabólica es más profunda, alterando metabolismo de lípidos, aumentando lipogénesis hepática y muscular, con lipólisis adipocitaria mediada por hormonas contrarreguladoras de las rutas insulínicas, lo cual lleva al incremento de la liberación y transporte de ácidos grasos libres a otros tejidos y con ello esteatosis [12].

Obesidad

La obesidad es una causa importante de morbilidad y mortalidad, asociada con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV), SM y ciertas formas de cáncer. La cual normalmente se evalúa clínicamente con la medida sustitutiva de cuerpo índice de masa corporal (IMC). Las personas con un IMC ≥ 30 kg/m² se consideran con obesidad. [8]

La distribución de la grasa corporal, en lugar de la adipocitaria es un factor de riesgo importante para los trastornos relacionados con la obesidad. El exceso de grasa intra abdominal en lugar de la grasa subcutánea (obesidad central vs periférica) está asociado con el SM y ECV. Los mecanismos responsables de esta asociación aún son desconocidos, pero se han formulado varias hipótesis. La primera, propone un efecto directo de los depósitos de tejido adiposo visceral (TA) sobre la resistencia a la insulina, metabolismo de las lipoproteínas, y la presión arterial. Productos metabólicos de la grasa omental y mesentérica de los depósitos de TA se liberan en la vena porta, proporcionando su entrega directa al hígado. La lipólisis generada a partir de la grasa omental y mesentérica liberan ácidos grasos libres (AGL) que pueden inducir resistencia hepática a la insulina y proporcionar los sustratos para la síntesis de lipoproteínas y el almacenamiento de lípidos

neutros en los hepatocitos. Además, las proteínas específicas y las hormonas producidas por el TA omental y mesentérico, tales como moléculas inflamatorias, angiotensinógeno, y cortisol también pueden contribuir al SM y la ECV. Otra hipótesis sugiere que la capacidad limitada de grasa para almacenar el exceso de energía resulta en el desbordamiento de los ácidos grasos a la grasa intra-abdominal y sitios "ectópicos", como hígado, músculo, e islotes de Langerhans en páncreas. En este paradigma, el exceso de la grasa intra-abdominal es "simplemente" un marcador de desbordamiento de ácidos grasos a partir de los depósitos de grasa. [8]

Factores del medio ambiente

Diferentes factores ambientales pueden afectar el desarrollo de SM, uno de los que ha sido reconocido recientemente es el Cadmio (Cd). Este es un metal pesado no esencial, tóxico, que se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente. Las principales fuentes de exposición incluyen la dieta, especialmente el arroz, los cereales, las patatas y otros tubérculos; además el fumar, en donde el Cd está presente en el humo del tabaco pudiendo ser absorbido de manera efectiva en los pulmones. El cadmio tiene efectos tóxicos sobre varios tipos de células y tejidos, además de ser un carcinógeno reconocido en el humano. Tiene una vida media biológica larga en tejidos, sin embargo se puede encontrar en circulación, ser filtrado en riñón, por lo que la concentración urinaria de cadmio es marcador de exposición. Existen reportes que una proporción considerable de la población presenta concentraciones de Cd en la orina y sangre, lo que se ha asociado con un mayor riesgo para el daño renal, osteoporosis o fracturas, enfermedad aterosclerótica, mortalidad cardiovascular y actualmente diabetes y SM [10]. En este sentido, estudios experimentales indican que la exposición de Cd conduce a una intolerancia a la glucosa. Uno de los mecanismos sugeridos es que el Cd tiene un efecto tóxico sobre las células betas pancreáticas lo que conduce a la producción reducida de insulina. [13]

Evaluación en la concentración de Cd en muestras biológicas de pacientes con DM2 ha demostrado que las concentraciones medias de Cd en la sangre de los no

fumadores y fumadores de pacientes diabéticos varones fueron significativamente más altas que en sus respectivos controles. La investigación epidemiológica ha indicado también que el aumento del nivel de glucosa en sangre y la disminución de los niveles de insulina en suero se mostraron en trabajadores expuestos a cadmio en una fundidora, en comparación con el control. Sin embargo, los efectos y mecanismos detallados del xenobiótico en la secreción de insulina, utilización y regulación de la glucosa en la sangre aún no están claros. Hasta ahora, sólo hay unos pocos informes que investigan la relación entre la contaminación por Cd y diabetes. [14]

DINÁMICA CELULAR Y BIOQUÍMICA DE LA ALIMENTACIÓN NORMOCALÓRICA.

El organismo mantiene equilibrio de energía por medio de ciclos de alimentación diarios y a través de períodos en los que la demanda de energía aumenta debido al esfuerzo físico, y cuando el suministro de energía se agota debido a la privación de nutrientes. Durante un día típico, varias comidas son consumidas conduciendo a períodos de tiempo de varias horas postprandiales, donde hay una ganancia neta de energía. Esta situación cambia durante el sueño y durante las interrupciones en la ingesta de comida donde el balance neto de energía, es negativo, es decir, sin ganancia energética por ingesta. Estos son estados rápidos que conducen a la realimentación. La capacidad del cuerpo para mantener el equilibrio de energía, se centra sobre un conjunto de órganos y tejidos periféricos que digieren, convierten, envían y almacenan nutrientes y energía:

- Páncreas.
- Hígado.
- El tejido adiposo.
- Músculo.
- Tracto gastrointestinal.

En el estado de alimentación, nutrientes - hidratos de carbono, grasas y aminoácidos - se absorben, son biotransformados, ocupados y el resto almacenados. Por lo que, en respuesta al aumento de la circulación de glucosa, el

páncreas secreta insulina que sirve como una señal de arranque para diferentes rutas metabólicas en tejidos periféricos. Por una parte mientras el hígado recoge y almacena la glucosa en forma de glucógeno, el remanente de las rutas de obtención energética entra a la biosíntesis de triglicéridos que son empaquetados en partículas grandes, transportables conocidas por sus siglas en inglés como fracciones del colesterol VLDL que los conducen a tejido adiposo y músculo principalmente. [15]

En el estado de ayuno, los nutrientes son tomados de fuentes energéticas que residen en los tejidos periféricos primordialmente adipocitos, movilizándose para mantener la homeostasis energética. Este estado se inicia mediante reguladores hormonales dentro de los que de forma relevante juega un papel importante la liberación de glucagón del páncreas. Mientras que el hígado libera su almacenaje de glucosa/glucógeno e inicia rutas gluconeogénicas, oxidación de ácidos grasos, con generación de cuerpos cetónicos como una alternativa y/o complemento del suministro energético ante la disminución de glucosa. Así mismo, el balance energético es complementado por tejido adiposo el cual degrada triglicéridos proporcionando el suministro de ácidos grasos y glicerol a tejidos periféricos como el músculo, el cual utiliza y oxida a los ácidos grasos, produciendo también cuerpos cetónicos, los cuales son utilizados por corazón, pulmones y cerebro. [15]

Para gestionar adecuadamente la alimentación y el balance de energía, el sistema nervioso central y los tejidos periféricos mantienen una comunicación continua. Señales locales son enviadas y recibidas por las células que residen en el estómago, intestino, páncreas, hígado, tejido adiposo y músculo. Ya que las señales que se envían a través de la circulación neuronal y circulatoria (plasmática) llegan a regiones específicas en el cerebro, este responde con señales reguladoras retroalimentadoras. El cerebro ejerce una influencia considerable sobre la alimentación (estados orexigénico y anorexigénico) por medio de mensajeros celulares como lo son las hormonas secretadas al torrente sanguíneo por páncreas, tejido adiposo, estómago e intestino, las cuales pasan a

través de la barrera hemato-encefálica hacia la región del núcleo arqueado (giro dentado) que es parte del hipotálamo. [15]

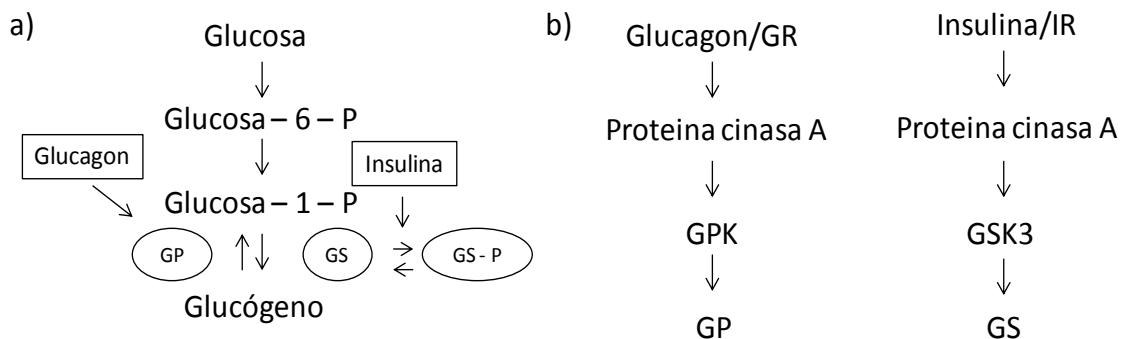
En condiciones clínicamente sanas en el organismo, la mayoría de estas señales orexigénicas y anorexigénicas son coordinadas por insulina y leptina, pero como se discutirá posteriormente a detalle, estas se pueden descoordinar en patologías como el síndrome metabólico. Las alteraciones evocadas en el metabolismo varían con cambios a corto, mediano y largo plazo vinculándose a estados alimentarios rápidos y de sobreingesta, pero también en periodos de larga duración, inicialmente como parte de la estrategia metabólica asociada a estados de salud y enfermedad. [15]

Respuesta hepática ante las señales pancreáticas.

En estado de ayuno, cuando existe una disminución en la concentración de glucosa en sangre, lo cual es censado por las células pancreáticas a lo que responden con secreción glucagón el cual instruye al hígado para liberar glucosa almacenada hacia el torrente sanguíneo. Esto se logra mediante la conversión de glucógeno a glucosa (glucogenólisis), o por la neosíntesis de glucosa a partir de fuentes diferentes a carbohidratos (gluconeogénesis), además se inhibe tanto glicólisis como glucogénesis. Por el contrario, ante el incremento de glucosa sanguínea, páncreas responde liberando al medio la hormona insulina, lo cual implica una contra respuesta hepática, similar pero en menor grado a estados de consumo, en los cuales de forma similar a momentos en donde la alimentación es constante, se conduce a una elevación de la glucosa circulante e insulina dirige acciones para la reabsorción hepática de glucosa su correspondiente almacenaje, de esta manera se puede definir el ciclo homeostático de la glucosa. [15]

Un breve esquema en la cadena de eventos que conducen a la conversión y almacenamiento de glucosa como glucógeno en el hígado se presenta en la siguiente figura. Como se muestra, la glucosa se convierte secuencialmente a glucosa-6-fosfato (por una fosforilasa) y de allí a glucosa-1-fosfato (por una enzima mutasa). Dos enzimas controlan las interconversiones entre la glucosa-1-

fosfato y glucógeno. Una de éstas, es la glucógeno sintasa (GS), la cual cataliza la formación de glucógeno a partir de glucosa-1-fosfato. Esta enzima se inactiva cuando se fosforila y se activa cuando se desfosforila. Otra enzima, la glucógeno fosforilasa (GP) cuando está fosforilada cataliza la conversión de glucógeno en glucosa-1-fosfato. La insulina y glucógeno ejercen sus influencias reguladoras sirviendo como “switchs bioquímicos” sobre la GS y GP en el momento adecuado. [15] Se ha establecido que ante el consumo de Cd durante 45 días se perturba la homeostasis de glucosa en la rata, en donde se reducen los niveles de glucógeno de hígado, estas respuestas incrementan la concentración de glucosa en sangre y aumenta el potencial de la gluconeogénesis de tejido hepático, resultando en hiperglucemias a consecuencia de la toxicidad de Cd en tejido hepático, así como la probable inhibición de alguna de las enzimas fundamentales para estas rutas energéticas. [16]



Tomado y modificado de Martin Beckerman, Cellular Signaling in Health and Disease, biological and medical physics

Metabolismo y catabolismo de lipoproteínas.

Una vez saturado el sistema de resguardo de glucógeno, insulina en hígado promueve la lipogénesis de *novo*. En donde el hígado sintetiza continuamente TAG, a partir de 2 fuentes: 1) Reesterificando los AGL tomados del plasma con glicerol y 2) A partir de Acetil-CoA proveniente principalmente de hidratos de carbono. Estos TAG se secretan en forma de VLDL nacientes (VLDLn), impidiendo

así la esteatosis hepática. Esta lipoproteína está constituida por la fracción Apo-B100, Apo-C y Apo-E estas moléculas apo-proteicas son sintetizadas por los ribosomas del RER de la célula. En el plasma esta lipoproteína recibe más Apo-C (en especial Apo-CII) cedida por las HDL, convirtiéndose en VLDL “maduras” y de esta forma se transforma en el sustrato ideal para interaccionar con la lipoproteína lipasa (LPL) en la superficie del endotelio capilar. Enzima que hidroliza TAG (en presencia de la tríada de activación) produciendo los remanentes de VLDL (VLDLr) que se dirigen al hígado para su catabolismo. [18]

Como es el mismo caso de los Quilomicrones (QM) a medida que va actuando la enzima LPL se pierden algunos lípidos y apoproteínas y otros son transferidos a las HDL por medio de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) y la proteína transferidora de fosfolípidos (PLTP). Al igual que en el metabolismo de los QMr, las VLDLr conservan a Apo-E, que posteriormente puede ser depurada a nivel renal e incluso promover severos trastornos en tejido cerebral. Las VLDLr pueden proseguir 2 caminos: 1) Ser endocitados por las células hepáticas tras unirse a los receptores específicos por medio de la Apo-E, con la posterior degradación de sus componentes. 2) Permanecer en el plasma continuando su catabolismo por acciones sucesivas de las LPL1, perdiendo más TAG y consecutivamente contenido de Apo-C, dando como resultado a las *Intermediate Low density lipoprotein* (IDL). Posteriormente, sobre las IDL actúa la isoforma LPL2 sobre el resto de los TAG. La LPL2 o LH no precisa de Apo-CII como cofactor, por lo que el resultado de esta reacción enzimática es la formación de la fracciones de baja densidad (LDL) o B-lipoproteína, de menor tamaño que la VLDL, con alto contenido en colesterol y bajo en TAG, y con un contenido apoproteico casi exclusivo en Apo B100. [17]

Mientras las VLDL se catabolizan en pocas horas las LDL lo hacen lentamente a lo largo de 1 o 2 días. Estas últimas se forman en el plasma como producto de la degradación de la VLDL, carece de Apo-C, por lo tanto permite la actividad de la LPL2, cuya acción es independiente del cofactor Apo-CII. En el postprandio

aumenta progresivamente la concentración de IDL en el plasma después de un ayuno de 12 a 14 hrs. Y secundariamente se forman LDL's, ésta se encarga de acarrear el colesterol a los tejidos periféricos donde es requerido, para ello es reconocida por diversas células del organismo por medio de receptores específicos que permiten regular el equilibrio intracelular del colesterol. [18]

Los estudios realizados por Goldstein y Brown en cultivos de fibroblastos humanos, permitieron conocer el tipo de degradación que sufren las LDL y explicar el defecto de la hipercolesterolemia familiar. Estos investigadores comprobaron que el catabolismo de la LDL es mediado por receptores de membrana sensibles a la Apo-B. Estos receptores extra hepáticos se ligan a la LDL por intermedio de las Apo-B pero también son aptos para unirse a la Apo-E; es por eso que se los denomina receptores B/E (receptores duales). Una prueba de ello es la capacidad de unión a estos receptores de la fracción de HDL rica en Apo-E. Después de unirse al receptor, la LDL es internalizada incorporándose a las células por endocitosis. La vesícula endocítica es atacada por las enzimas hidrolíticas de los lisosomas. El componente proteico es degradado a aminoácidos y los ésteres de colesterol son hidrolizados por una lipasa ácida, la colesterol éster hidrolasa que actúa a pH 4, generando colesterol libre. Este es utilizado para la síntesis de membranas celulares, pero principalmente tiene tres funciones reguladoras: 1) Inhibe la Enzima 3-hidroxi-3metil-Glutaril-CoA-Reductasa, que es la enzima clave en la síntesis del colesterol. 2) Activa a la Enzima Acil-CoA-Aciltransferasa (ACAT) que reesterifica el colesterol para su almacenamiento en forma de ésteres de colesterol. 3) Inhibe la síntesis de más receptores para la LDL, frenando así la toma de más LDL. Estas acciones reguladoras previenen la sobrecarga de colesterol en las células. Para ser liberado de la célula el colesterol esterificado es hidrolizado por la colesterol éster hidrolasa que actúa a pH 7. En los últimos años cobró mucha importancia el camino "scavenger" o vía alternativa de degradación de LDL, por la cual la lipoproteína es tomada por los macrófagos por medio de receptores diferentes; no específicos B/E. Estos macrófagos toman la LDL, la digieren y aproximadamente la mitad del colesterol queda depositado en el

espacio citoplasmático apreciándose en el microscopio electrónico como células espumosas. Este camino constituye el 15 % de la degradación de las LDL, siendo la vía predominante en el caso de la hipercolesterolemia familiar homocigota. [18]

Por su parte las HDL que son sintetizadas y secretadas por el hígado y en una menor proporción por el intestino, representa un grupo heterogéneo de partículas, constituidas por las HDL2 que son las de mayor tamaño en comparación a las HDL3 que son más pequeñas. También se conoce otra subfracción: la HDL1 o HDLc o Apo-E HDLc, que por su tamaño y densidad es similar a la subfracción HDL2 difiriendo con esta solo en la afinidad por los receptores de la LDL, debido a que las partículas de HDL carecen de Apo-E. La HDLc se encuentra tanto en animales con alto contenido en colesterol y grasas saturadas. Las HDL tienen como función: 1) constituir el reservorio de Apo-C y Apo-E, necesarias en el metabolismo de las proteínas ricas en triglicéridos (PRTG). 2) Transportar el colesterol de los tejidos periféricos al hígado, esto se conoce como “Transporte Reverso de Colesterol”. [17]

Finalmente, se puede mencionar que estas lipoproteínas que son secretadas en forma de HDL nacientes (HDLn), son partículas discoidales compuestas por una bicapa de fosfolípidos y colesterol libre rodeada de Apo-A (en especial de AI y II), Apo-E y Apo-C. Cabe aclarar que las HDLn de origen intestinal no contienen Apo-C y Apo-E. La Apo-C es sintetizada en el hígado y transferida a las HDL intestinales cuando éstas entran al plasma. Son lipoproteínas de suma importancia e impacto metabólico ya que actúan como “capacitadoras” de las VLDL, además juegan un rol cooperativo en la inducción de óxido nítrico endotelial, compartiendo rutas de actividad con insulina. Y en situaciones de sobre inducción de formación de las fracciones de muy baja densidad, las apoproteínas que las conforman disminuyen en producción y síntesis, por lo que su concentración plasmática tiende a decrecer, por lo que al mismo tiempo las proteínas de alto transporte en TAG permanecen por más tiempo, lo cual constituye uno de los principales marcadores de disfunción metabólica o SM. [18]

Respecto al intercambio lipídico en el cual también participan activamente, una vez que se encuentran en el plasma, sobre las HDL_n actúa la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT). Esta enzima para poder actuar, se incorpora a una fracción de las HDL y en presencia de Apo-AI como cofactor, esterifica el colesterol libre de la superficie de la lipoproteína y el proveniente de las células de los tejidos. Este colesterol esterificado se ubica en el centro de la partícula convirtiendo su forma discoidal o naciente en esférica o madura representado por las HDL₂ (más grandes, menos densas y ricas en colesterol esterificado). El colesterol recién esterificado es distribuido hacia las PRTG y recibiendo a cambio TAG, todo esto es mediado por la CETP, este proceso tiene por objeto enriquecer levemente a las HDL en TAG permitiendo así la acción de la LH (que ataca los TAG del interior de las HDL) esto induce el remodelado de las HDL; las HDL₂ se transforman en HDL₃. Las HDL₃, por su tamaño más pequeño, son más aptas para atravesar la pared de los capilares sanguíneos y recaptar el colesterol excedente desde los tejidos periféricos que nuevamente por acción de la LCAT se forma colesterol esterificado que se localizará en el centro de la partícula y formándose nuevamente la HDL₂. De este proceso dinámico resulta un continuo intercambio de colesterol, desde las HDL a las PRTG, promoviendo el desplazamiento de ese colesterol al hígado para que pueda hidrolizarse y excretarse como ácidos biliares o incorporarse a otras lipoproteínas hepáticas. De esto se deduce el rol antiaterogénico de las HDL. Por último, no puede dejarse de mencionar otra fracción de HDL que solo contiene Apo-E o HDL_c. Se origina inducida por dietas ricas en colesterol. Esta HDL_c tiene como función redistribuir el colesterol a los tejidos periféricos que posean receptores B/E o llevar el colesterol directamente al hígado para su excreción [17]. Estudios de modelos con intoxicaciones con Cadmio proponen desregulaciones lipídicas, en la elevación de la concentración de triglicéridos relacionado con la disminución de la actividad de LPL, simultáneamente la elevación de Colesterol a expensas de la fracción VLDL + LDL, evento resultado de disminución en la remoción de VLDL por la poca actividad de LPL, aunado a esto se han reportado disturbios en las rutas

lipogénicas así como incrementos en la actividad de enzimas clave para estas rutas metabólicas. [19-20]

PATOLOGÍAS SECUNDARIAS

Riesgo cardiovascular e hipertensión

El aumento del riesgo cardiovascular asociado al SM puede deberse a la suma de los componentes que constituyen factores de riesgo independientes:

- Consumo de dietas hipercalóricas
- Disglucemia.
- Dislipemia.
- Obesidad.
- Resistencia a la insulina.
- Exposición a Cd.

El perfil arterogénico, con aumento de VLDL, disminución de HDL y presencia de LDL con partículas pequeñas y densas se asocia a un aumento en el riesgo de enfermedad coronaria cardíaca. El evento inicial de la aterosclerosis lo constituye la disfunción endotelial; como consecuencia de ello aumenta la permeabilidad a monocitos circulantes y a LDL nativas, los que ingresan a la pared vascular. Una vez en el interior, el monocito se transforma en macrófago y la LDL nativa es oxidada. El macrófago expresa receptores scavenger que capta con alta afinidad las LDL oxidadas y acumula colesterol en forma no regulada, conduciendo a la formación de células espumosas, que van a constituir la estría lipídica. La estría, impregnada en células espumosas secreta gran cantidad de proteínas proinflamatorias que van a desencadenar un estado inflamatorio crónico. Las LDL, que ingresan por el aumento en la permeabilidad vascular, se oxidan y son captadas por los macrófagos. El macrófago activado libera TNF alfa e interleucinas, lo que desencadenará un estado proinflamatorio. Finalmente se activará el proceso de coagulación, la producción de factores de crecimiento y la proliferación de células musculares lisas. La hipertensión ha sido incluida como

criterio diagnóstico en todas las definiciones de SM, desde que a este último se ha relacionado significativamente con riesgo cardiovascular el evento final; el rompimiento de una placa inestable desencadenaría el evento coronario. [21]

Cadmio (Cd) ha demostrado ser un potencial factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardio vasculares (ECV), El Cd que puede provocar aterosclerosis a consecuencia de la desregulación lipídica mostrada por la intoxicación con Cd siendo la arterosclerosis la base de la mayoría de las ECV [22].

Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es el tipo más común de diabetes, y es la conclusión más frecuente de la cronicidad del síndrome metabólico. Por lo general se presenta en adultos, pero cada vez más se observa en niños y adolescentes. En la DM2, el organismo es capaz de producir insulina, sin embargo, la cantidad o la calidad de ésta no es suficiente, por lo que no hay una respuesta eficiente a sus efectos (también conocidos como resistencia a la insulina), estas condiciones conducen a una acumulación de glucosa en la sangre. Muchos individuos con diabetes tipo 2 no son conscientes de su enfermedad y los síntomas pueden tardar años en aparecer o ser reconocidos, durante este tiempo el organismo está siendo dañado por el exceso de glucosa en la sangre, y suelen manifestarse sólo cuando complicaciones de la diabetes ya se han desarrollado. Aunque las razones para el desarrollo de la DM2, todavía no se conocen completamente, existen factores importantes de riesgo para su desarrollo, estos incluyen:

- Síndrome metabólico.
- Resistencia a Insulina.
- Obesidad.
- Mala alimentación.
- Inactividad física.
- Edad avanzada.
- Antecedentes familiares de diabetes.
- Etnia.
- Exposición a metales pesados.
- Entre otros.

Un grupo de pacientes son capaces de gestionar su condición a través de una dieta sana y una mayor actividad física o medicación oral. Sin embargo, si no son capaces de regular sus niveles de glucosa en la sangre, se requiere prescribir insulina. El número de personas con DM2 va creciendo rápidamente en todo el mundo, este aumento se asocia con el desarrollo económico, el envejecimiento de las poblaciones, la creciente urbanización, cambios en la dieta, la reducción de la actividad física y los cambios en el estilo de vida. [23 -24]

TRATAMIENTO

El diagnóstico del SM a menudo se retrasa, y 20 % a 50 % de las personas desarrollan DM2 por lo que a corto, mediano o largo plazo presentan complicaciones microvasculares y/o macrovasculares en el momento del diagnóstico. Cuando las intervenciones en el estilo de vida no logran controlar los niveles de glucosa en sangre de manera adecuada, el tratamiento farmacológico se vuelve necesario. [25]

Debido a que la población que padece SM lo conforman un grupo heterogéneo, los regímenes de tratamiento y los objetivos terapéuticos deben ser individualizados. Ya que el SM se caracteriza por resistencia a la insulina y la continua disminución de la función de las células beta, es probable que los niveles de glucosa empeoren con el tiempo, por lo que el tratamiento debe ser dinámico. El principal tratamiento para el SM es por medio de agentes hipoglucemiantes los cuales son más disponibles y en número amplio, lo que requiere que el clínico considere muchos de los siguientes factores al elegir: los medicamentos, el grado de hiperglucemia, el riesgo de hipoglucemia, efectividad de los medicamentos en la reducción de las complicaciones microvasculares de la diabetes (y/o macrovasculares), efectos secundarios de medicamentos, condiciones médicas concomitantes, capacidad de adherirse a régimen y las preferencias del paciente. Se debe seguir haciendo hincapié en la modificación del estilo de vida, incluyendo la terapia nutricional y la actividad física. Mientras que la

en farmacoterapia se utilizan, muchas clases de agentes terapéuticos, estos pueden causar aumento de peso como efecto secundario. [25]

Tratamiento hipoglucemiante.

Muchos pacientes en monoterapia con la adición tardía de otro agente antihiper glucémico no pueden alcanzar fácilmente los niveles de glucosa en sangre adecuados, utilizando otras clases de agentes que tienen diferentes mecanismos de acción haciendo uso simultáneo de agentes dentro de la misma clase y/o de diferentes clases, pero con mecanismos de acción similares (por ejemplo, sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de la α -glucosidasa, activadores de hormona o péptido similar a insulina-1 y tiazolidinas). Existe un debate sobre cuál es el agente antidiabético (incluyendo insulina) que debe ser utilizado inicialmente y cuales agentes deben ser empleados posteriormente. También existe debate sobre qué agentes dentro de un determinado tiempo pueden ocasionar efectos secundarios. [25]

METFORMINA

La recomendación de utilizar la Metformina como el agente inicial en la mayoría de los pacientes se basa en su eficacia en la reducción de glucosa sérica, su perfil relativamente nulo de efectos secundarios, su historial de seguridad a largo plazo, su riesgo insignificante de la hipoglucemia y nulo efecto en el aumento de peso. El beneficio cardiovascular demostrado en pacientes con sobrepeso también es citado como una razón para seleccionar Metformina como tratamiento de primera línea, pero las evidencias más recientes han sido contradictorias al respecto. Mientras que la monoterapia con la tiazolidinadiona (TZD) rosiglitazona produce el control glucémico más duradero en comparación con la Metformina o la terapia gliburida, producen edema, aumento de peso, el riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), aumento del riesgo de fracturas y datos inconsistentes en relación con el de riesgo de infarto de miocardio limitan significativamente la utilidad clínica de esta clase de fármacos. [25]

Mecanismo acción Metformina

La Metformina se ha utilizado clínicamente durante más de 50 años, pero su mecanismo molecular de acción no se entiende bien. Su acción hipoglucemiante se debe en gran parte a la mejora en la resistencia a la insulina hepática que conduce a una reducción en hepática de la salida de glucosa, principalmente como resultado de la reducción en la gluconeogénesis. La Metformina también aumenta la captación de glucosa en el músculo, sin la producción de lactato extra, y aumenta la unión de la insulina a sus receptores (IR), mientras que el aumento de la fosforilación y la actividad tirosina quinasa de la IR. En células hepáticas, la Metformina aumenta la activación del receptor de insulina independientemente de la insulina, actuando principalmente a través del sustrato del receptor de insulina 2 (IRS2). [26]

Un posible mecanismo importante desarrollado por la Metformina es la activación del AMP proteína quinasa (AMPK), un sensor de energía celular activado en estrés metabólico. La activación de AMPK inhibe la producción de glucosa por el hígado, mejora la sensibilidad a la insulina y la glucosa, favorece la captación por el músculo e induce la oxidación de ácidos grasos. La fosforilación de treonina 172 es necesaria para esta activación y el gen *LKB1* supresor de tumores es la principal quinasa. El objetivo principal en la cascada de señalización río abajo del AMPK es la proteína blanco o diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), una quinasa cuya actividad es muy importante en los procesos de crecimiento celular y que es inhibida por AMPK, conduciendo a la reducción de la síntesis de proteínas. AMPK puede ser activado por el ejercicio, hormonas, citoquinas y algunos fármacos. La Metformina activa al AMPK en dosis dependiente, lo que resulta en la inhibición de la hepática la producción de glucosa, el aumento de la captación de glucosa por el músculo, además propicia la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa, trayendo como consecuencia una disminución de la expresión de la sintasa de ácidos grasos libres en hepatocitos de rata y posiblemente, aumento de la utilización de glucosa en el hígado a través de rutas insulino dependientes. [26]

Ya que el fármaco no influye en la fosforilación directa del AMPK por LKB1 como se ha mostrado en ensayos libres de células, hay pruebas de que la activación de AMPK por la Metformina es secundaria a su efecto en la mitocondria, el objetivo principal de la droga. Uno de los avances más significativos en la comprensión de los mecanismos celulares de la Metformina fue el realizado en la década de los 2000 por dos grupos de investigación independientes que informaron por primera vez que este miembro de la familia de las biguanidas indujo inhibición suave y específica de la cadena respiratoria mitocondrial complejo 1 [27]. La primera observación se hizo en hepatocitos de roedores, pero luego se expandió a otros tejidos, incluyendo el músculo esquelético, células endoteliales, células beta del páncreas, y neuronas. Aunque el mecanismo exacto por el cual la Metformina inhibe el complejo de cadena respiratoria 1 sigue siendo desconocida. Además se sugiere que, debido a diferentes propiedades físico-químicas, su respectivo sitio de acción difiere en una o varias de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria 1. Por ejemplo, la carga positiva de la Metformina se propuso para dar cuenta de su acumulación dentro de la matriz de la mitocondria energizada, impulsada por el potencial de membrana ($\Delta\psi$) [26]. Además, el hidrocarburo de cadena lateral apolar de la droga también podría promover su unión a estructuras hidrofóbicas, especialmente los fosfolípidos de las membranas mitocondriales. [27]

Curiosamente, se ha demostrado recientemente que la Metformina, también ejerce un efecto inhibitor sobre la producción de ROS mitocondrial bloqueando selectivamente el flujo inverso de electrones a través del complejo de cadena respiratoria 1. Aún se requieren más investigaciones para aclarar el mecanismo (s) por el cual la Metformina modula el complejo respiratorio de cadena 1 de una manera única. También vale la pena mencionar que la Metformina ejerce probablemente también algunos efectos no mitocondriales ya que se ha demostrado que afectan el metabolismo de los eritrocitos, una célula

amitocondrial, por lo que en estas ha mostrado ejercer una modulación de la fluidez de membrana [27].

TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS

En la última mitad del siglo 20, varios metalo-fármacos clínicamente útiles, tales como, el cisplatino contra el cáncer, la auranofina, medicamento para la artritis que contiene oro, el aluminio y el zinc medicamentos empleados contra la úlcera, scralfate y polaplezinc, respectivamente, han sido desarrollados. En este contexto, el papel esencial de los iones metálicos y sus compuestos biomoleculares en el desarrollo y funcionamiento de los seres vivos ha estimulado un creciente interés en el campo de los metalo-fármacos con actividad antidiabética. [28]

Desde 1899 se ha incrementado el interés en los valores nutritivos de los elementos traza y su correlación con la DM, se ha estudiado con un enfoque en micronutrientes de los pacientes con DM y los efectos terapéuticos de los oligoelementos. Muchos estudios han puesto de manifiesto los cambios en el estado de oligoelementos en pacientes con DM. Se han encontrado deficiencias en algunos elementos que se correlaciona con el desarrollo de la patología, así como la presencia de complicaciones diabéticas. [29]

Sin embargo, el hallazgo más interesante ha sido el tratamiento o la mejora de los síntomas de ambos tipos de DM por iones metálicos y sus complejos. Desde 1899, iones metálicos, incluyendo vanadio (V), cromo (Cr), manganeso (Mn), cobalto (Co), zinc (Zn), selenio (Se), molibdeno (Mo), y el tungsteno (W), y sus complejos han sido reportados que muestran actividad insulino-mimética en experimentos *in vitro*, y que ejercen efectos positivos en el tratamiento de animales de experimentación y en sujetos con DM. Las formas químicas eficaces de los iones metálicos y complejos con actividad antidiabética se resumen en la Tabla 2. [28]

Tabla 2. Iones metálicos y complejos con actividad antidiabética en animales experimentales y sujetos con DM.

Metal	Forma iónica	Complejo
V	Vanadil sulfato (VO_2SO_4)	Bis (metil cisteinato) oxovanadio (IV)
	Vanadato de sodio (NaVO_3)	Bis (malato) oxovanadio (IV)
Cr	---	Bis (picolinato) oxovanadio (IV)
		Bis (picolinato) cromo (III)
		Polinicotianato de cromo
Mn	Cloruro de manganeso (MnCl_2)	--
Co	Cloruro de cobalto (CoCl_2)	--
Zn	Cloruro de Zinc (ZnCl_2)	Bis (picolinato) Zinc (II)
		Bis (maltolato) Zinc (II)
Se	Selenito de sodio (NaSeO_3)	--
Mo	Molibdato de sodio (Na_2MoO_4)	--
W	Selenito de sodio (Na_2WO_3)	--

VANADIO

El vanadio es un oligoelemento que posee una amplia variedad de funciones bioquímicas y fisiológicas. Tanto el vanadil (VO^{2+} , el estado de oxidación +4) y vanadato (VO_4^{3-} y VO_3 complejos, estado de oxidación +5) han sido reportado como efectores tipo insulina y fármacos candidatos para el tratamiento de la diabetes tipo 2 en modelos animales y seres humanos. Los mecanismos funcionales de los complejos de vanadio han demostrado que estimulan la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno, y la lipogénesis, así como la inhibición de la lipólisis y la gluconeogénesis. La administración oral de complejos de vanadio han recuperado la expresión del gen y proteína GLUT4 en el músculo esquelético, suprimiendo la expresión de la G6Pasa y genes PEPCK en el hígado de modelos animales con estreptozotocina (STZ), diabetes tipo - 1 inducida. [30]

Los compuestos de vanadio se pueden utilizar como medicamentos disponibles por vía oral, para mejorar la mayoría de los síntomas de la diabetes: nivel alto de azúcar en la sangre, niveles elevados de lípidos, y las complicaciones secundarias que cada vez son más perjudiciales, incluyendo enfermedades del corazón, cataratas, enfermedad renal, y neuropatías periféricas. Algunos complejos de

vanadio han demostrado actividad tanto *in vivo* y/o en ensayos *in vitro*. Aunque los efectos miméticos de insulina de vanadio están bien establecidos, todavía hay diferencias de opinión entre los investigadores con relación al mecanismo de acción que conduce a estos efectos. Posibles modos de acción para la actividad potenciadora de la insulina de los compuestos de vanadio están involucrados en la acción de múltiples mecanismos intracelulares. [31]

Mecanismo de acción

Aunque actualmente existe un debate en el mecanismo de acción de Vanadio, los estudios realizados al respecto muestra que la mayor actividad mostrada ha sido sobre las proteínas tirosina fosfatasa (PTPasa), fosfatidil inositol-3-quinasa (PIP3), transportador de glucosa (GLUT), proteína kinase B (PKB), y la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE) [31]. Siendo el primero en el que se centra todo el peso hacia la función biológica del metal.

Debido a que las sales de vanadio son potentes inhibidores de proteína tirosina fosfatasas (PTPasas) y aumentan la fosforilación de la tirosina del IR- β -subunidad, se ha sugerido que el vanadio causa la activación de IR-PTK mediante la prevención de la desfosforilación de la IR- β -subunidad. De hecho, un estudio ha demostrado que el vanadato estimula la fosforilación de tirosina del IR- β -subunidad en adipocitos de rata y también se ha demostrado que el tratamiento con orto-vanadato de sodio revirtió parcialmente la disminución de la fosforilación de la tirosina del IR- β -subunidad en ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ) sin afectar significativamente la actividad de PTK-IR en el hígado. Estos resultados indican que la fosforilación de tirosina del IR- β -subunidad y la activación IR-PTK puede no ser los primeros eventos que conducen a los efectos similares a la insulina de sales de vanadio [32]

En la búsqueda de un posible mecanismo de acción de Vanadio así como de sus sales, se ha llevado la investigación hasta estudios en subórganos como

mitocondria que es el centro metabólico energético, siendo el más importante productor de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos estudios han demostrado la asociación de Vanadio con la producción de ROS mitocondrial. El complejo I, II y III se consideran los sitios de mayor producción de estas especies. Zhe Shi y su grupo de estudio en 2011 describe que concentraciones bajas de V inducen la producción de ROS, pero el aumento de las concentraciones de el metal se ve inhibida esta producción, sus resultados concluyen que compuestos de vanadio como NaVO_3 inhiben la actividad de los complejos I y III mitocondriales [33].

Modelos de estudio

Los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados a diversas enfermedades metabólicas. Una gran parte de las investigaciones se desarrollan en roedores (ratones y ratas principalmente), dada su similitud biológica con el hombre; y el conocimiento que se tiene en el campo genético, molecular y enzimático [34].

Uno de los recursos científicos con los que se ha podido establecer el impacto de las dietas hipercalóricas en humanos son los modelos murinos, ya que estos son útiles en el entendimiento de las rutas bioquímicas y el comportamiento celular de diversos órganos afectados. Dentro de dichos modelos, se han creado diversas mutaciones, las cuales conllevan a la disminución o sobre expresión de elementos claves en el desarrollo de SM, incluso modificaciones las dietas proporcionan datos fidedignos y con poca variabilidad lo que ha ayudado a la comprensión del proceso en el cual se establecen dichas entidades. En cuanto a las dietas existentes para la inducción de las patologías, se tienen dietas con alto contenido lipídico que conducen a la manifestación de los signos y síntomas reconocidos por los organismos internacionales como SM y DM2. Sin embargo, este tipo de dietas no son reflejo fiel de lo que sucede en la población mundial, ya que son los carbohidratos los que se consumen mayoritariamente, y un sobre consumo de los

mismos provoca alteraciones fenotípicas característico de las enfermedades en estudio. [35]

Por otro lado, estudios previos han demostrado que la exposición en el agua de beber *ad libitum* en animales de laboratorio a compuestos de cadmio (65.5 mg/L) aumentó la concentración de glucosa en la sangre además de establecer un estatus dislipidémico. Así mismo, varios estudios han demostrado que la hiperglucemia inducida por cadmio está asociada con un aumento de la peroxidación de lípidos, disminución de la liberación de insulina, aumento de la activación de las enzimas de la gluconeogénesis y receptores deficientes de insulina [10]. Además, Murugavel y Pari informaron de un aumento significativo de los lípidos plasmáticos, incluyendo el colesterol total, colesterol de baja densidad (c-LDL), triglicéridos (TAG), ácidos grasos libres y fosfolípidos después de la administración subcutánea de 3.0 mg Cd/kg de peso corporal a ratas durante un período de 3 semanas, además de una reducción significativa de colesterol de alta densidad (c-HDLC). [36]

Como estos ejemplos se encuentran innumerables investigaciones y descubrimientos que se podrían mencionar en este apartado, sin embargo, con ello se justifica la importancia del uso de modelos animales para la investigación clínica y médica, que ayuda al estudio de enfermedades o de los posibles tratamientos o terapias e incluso el desarrollo de curas para las enfermedades

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia del SM es variable dependiendo de los criterios diagnósticos empleados, en general los datos estadísticos muestran su presencia en el 23.7% de la población mundial; esta puede variar ampliamente en diferentes poblaciones siendo de hasta 58.3% en poblaciones México-Americanas, siendo su principal consecuencia el desarrollo de patologías secundarias en las cuales se encuentran alteraciones cardiovasculares y DM2. Se han asociado diversos factores de riesgo en el curso temporal del desarrollo de SM, estando entre los principales el consumo de dietas hipercalóricas y la exposición a contaminantes ambientales como el Cd, que se encuentra ampliamente distribuido en agua de consumo, de riego y por lo tanto en los alimentos. El tratamiento farmacológico utilizado actualmente para el tratamiento de dichas patologías se asocia a menudo con efectos secundarios o disminución en la respuesta tras su uso prolongado, lo que ha llevado a plantear alternativas para el control de SM, como lo son micronutrientes como el Vanadio.

Por lo que se plantea la siguiente pregunta científica:

¿Cuál es el efecto del meta-vanadato de sodio en la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos en el síndrome metabólico inducido por diferentes factores?

JUSTIFICACION

El encontrar nuevos tratamientos que coadyuven o complementen las terapias para el control de patologías con impacto socio-económicos, como lo es la pandemia del SM se ha convertido una tarea esencial, ya que esta afecta a un alto porcentaje de la población mundial, siendo México uno de los países que lo presenta en mayor cantidad.

Vanadio, un elemento del grupo de metales de transición de la tabla periódica, encontrado como elemento traza en animales y humanos en concentraciones de 10 a 20 mmol y sus compuestos derivados, han demostrado efectos en el control glicémico y sus características insulino miméticas, las cuales recientemente han mostrado potencial acción en la regulación del metabolismo en modelos animales de diabetes tipo I y II, así como en personas diabéticas. Por lo que es de suma importancia investigar cuales pueden ser los efectos de su administración, a nivel sérico, como tisular en modelos establecidos previamente con síndrome metabólico inducido por dietas hipercalóricas y exposiciones crónicas a Cd.

OBJETIVO GENERAL

Conocer el papel del meta-vanadato como regulador del metabolismo de carbohidratos y lípidos en 2 modelos de síndrome metabólico inducido en ratas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Inducir modelos de síndrome metabólico en ratas Wistar, uno por consumo de una dieta hipercalórica-hiperglúcida, y otro por exposición crónica de Cd.
- Monitorear el comportamiento sérico de carbohidratos y lípidos durante la administración de meta-vanadato de sodio.
- Caracterizar el comportamiento tisular de glucógeno y triglicéridos durante la administración de meta-vanadato de sodio.

HIPÓTESIS

Hipótesis nula

El meta-vanadato de sodio no regula el metabolismo de carbohidratos y lípidos en modelos con síndrome metabólico.

Hipótesis alternativa

El meta-vanadato de sodio regula el metabolismo de carbohidratos y lípidos en modelos con síndrome metabólico.

DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Tipo de estudio

Prospectivo, analítico, observacional, de cohorte, transversal y experimental.

Definición del universo

90 ratas macho Wistar

Tamaño de la muestra

90 ratas macho Wistar

Criterios de selección

Criterios de inclusión

Ratas macho sanas (normotolerancia, normolipémicas y de zoometría dentro de los parámetros referenciados para cada una de las cepas), de entre 3 y 4 semanas de edad.

Criterios de exclusión

Ratas machos que presenten alguna enfermedad (hiperglicemias o dislipidemias y de zoometría fuera de los parámetros referenciados para cada una de las cepas) antes del proceso de inducción.

Criterios de eliminación

Ratas macho que presenten alguna malformación física o enfermedades no metabólicas previas o durante el proceso de inducción con la dieta hiperglúcida-hipercalórica.

Definición del grupo control

Grupo control conformado por 15 ratas macho de la cepa Wistar las cuales serán alimentadas durante todo el curso experimental con dieta balanceada (Harlan 5001).

2.5 Variables y definición de variables

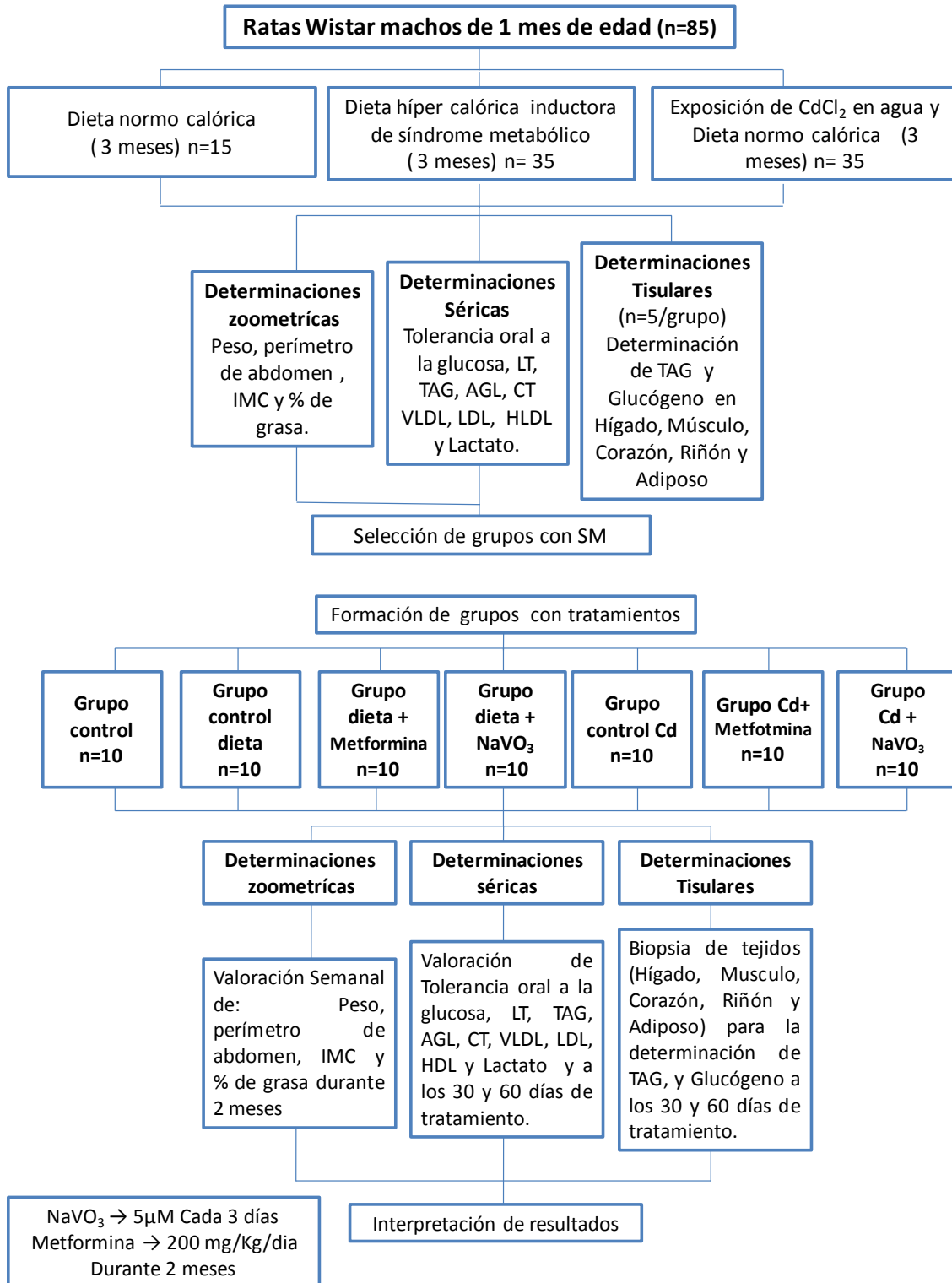
Independientes: Edad y sexo.

Dependientes: Valores de glucosa basal y durante la administración de una carga del carbohidrato, lípidos totales, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, AGL, Lactato, peso, IMC, perímetro de abdomen y talla.

2.6 Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas

Se utilizara análisis estadístico de t de student.

DISEÑO EXPERIMENTAL



METODOLOGÍA

Animales y Caracterización Zoométrica.

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio Claude Bernard de la BUAP, los animales fueron alojados en el mismo con condiciones de temperatura de 24 ± 2 °C y porcentaje de humedad de $50\pm 10\%$, con ciclos de luz/obscuridad de 12/12 horas. Los animales se acondicionaron con dieta normocalórica hasta los 100 g, aproximadamente 15 días post-destete.

Al alcanzar el peso de inicio del estudio se separaron aleatoriamente en los grupos dieta NC, dieta HC y la exposición a CdCl_2 . Los tres grupos, se sometieron a diferentes condiciones de alimentación, es decir, al grupo control se mantuvo con una dieta a base de pellet balanceada (LabDiet 5001) y agua a libre consumo “*Ad libitum*”. El grupo HC, fue sometida con la dieta Hiperglúcida – Hipercalórica y agua “*Ad libitum*” y el Tercer grupo fue sometido a una dieta balanceada (LabDiet 5001) “Normo calórica” y agua con 2 mg/L de CdCl_2 “*Ad libitum*”, este acondicionamiento para todos los grupos fue por el tiempo de 3 meses. Una vez transcurrido ese periodo, se les midió peso, perímetro del abdomen y talla desde la punta de la nariz a la base de la cola con ayuda de una cinta métrica; con los datos obtenidos se calculó el IMC y % de grasa corporal (índice de Lee).

Los grupos experimentales (grupo HC y grupo Cd) se subdividieron en 3 grupos, el grupo metformina (administración diaria durante 2 meses de metformina por vía oral en concentración 200 mg/kg en un volumen de 10ml/kg), el grupo NaVO_3 (administración cada 3 días de metavanadato de sodio durante 3 meses por vía oral en una concentración de $5\mu\text{M}$) y los grupos controles positivo (HC y Cd).

Determinaciones séricas

Para la obtención de las muestras sanguíneas se suspendió el consumo de agua y alimento de 4 a 5 horas antes de realizarse el procedimiento. Se anestesiaron a

los animales (en una dosis de ketamina+xilazina 0.2 ml/100 g. via intraperitoneal). Las muestras se tomaron mediante punción intracardiaca y se les extrajo 700 μ L de sangre (aproximadamente) se recogió en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Así mismo, se procedió a realizar curvas de tolerancia oral a la glucosa en ayuno. Se recolectaron la muestra en un tubo eppendorf, a los 0, 30, 60 y 90 minutos después de una carga de gluosa de 75g/100mL/70kg de peso. Las muestras se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 10 minutos, se separó el suero y se congeló a -70°C hasta su análisis.

El suero de los tiempos 30, 60 y 90 min, se les cuantificó la concentración de glucosa, mientras que el suero de la condición basal (ayuno), se utilizó para la medición de glucosa, triglicéridos, lípidos y colesterol total, HDL-col, LDL-col y VLDL-col; por medio de el kit comercial de SPINREACT y cuantificadas por espectrofotometría en un analizador BTS-350 de BioSystems. El lactato fue medido por el método de Slide VITROS DT LAC y el Kit de VITROS Chemistry Products DT calibrador de sistemas de química VITROS DT60/DT60 II y cuantificado en un analizador VITROS DT-60 de ABBOT por reflectrometría. Finalmente, los ácidos grasos libres (AGL) fueron extraídos con cloroformo y evidenciados por reactivo de cobre – cuprizona y revelados por una fuente amoniacal, la concentración fue determinada en un espectrofotómetro PerkinElmer modelo Lambda EZ150 a una longitud de onda de 620 nm.

Determinaciones tisulares

Las biopsias de tejidos (hígado, músculo, corazón, riñón, y adiposo) fueron extraídas, finalizada la punción cardiaca y per fundidos con solución salina isotónica fría y se almacenaron a -70°C para la posterior determinación de triglicéridos y glucógeno. 100 mg de tejido fueron homogenizados en 800 μ l de SSI se resuspendió el homogenizado y se procedió a realizar el protocolo para la determinación de glucógeno mediante la técnica descrita por Bennett en el 2007. Así mismo, del homogenado se hizo una dilución 1:2 antes estandarizada para

optimizar los valores de la linealidad de la reacción y se siguió el protocolo descrito por el fabricante para el kit de SPINREACT de triglicéridos.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (EEM) y evaluados e interpretados por una prueba estadística de T de Student a un nivel de significancia de $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

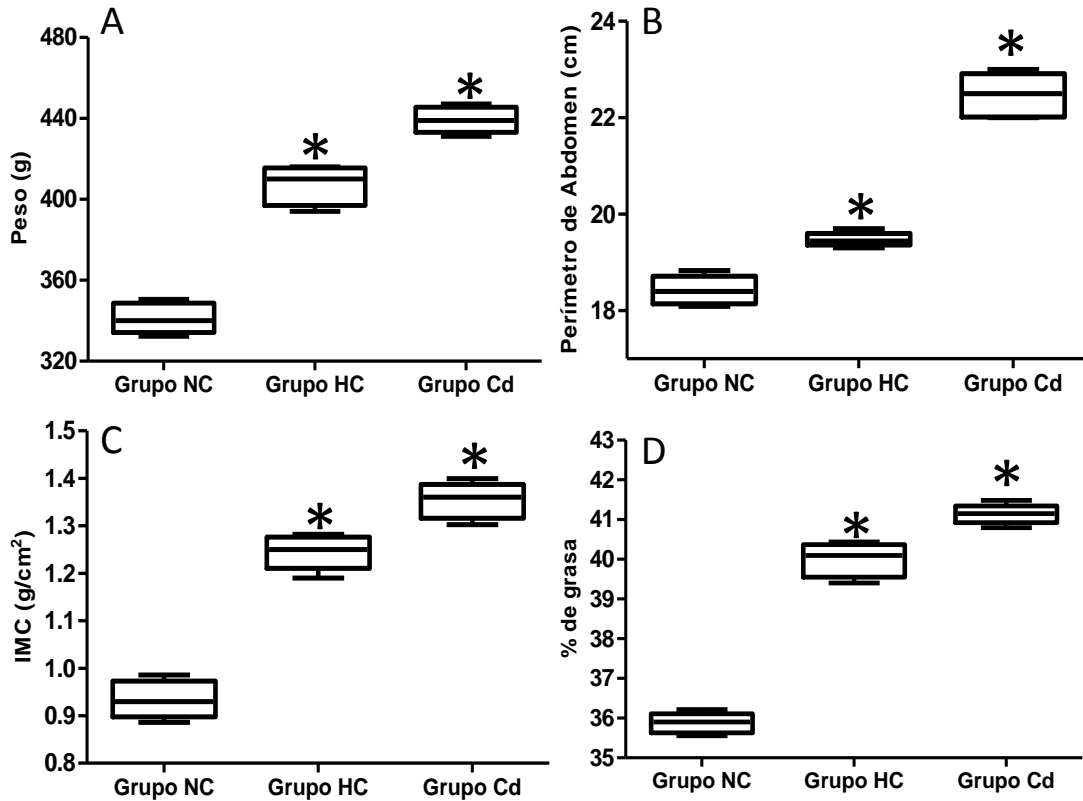


Figura 1.- Determinaciones zoométricas post-acondicionamiento. A) Pesos. **B)** Perímetros de abdomen **C)** Índice de masa corporal (IMC) **D)** Porcentaje de grasa. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica $p < 0.05$ por una t de student.

Se ha reconocido que tanto la alteración en las condiciones zoométricas (como antropométricas en el hombre) son causa importante de desarrollo de síndrome metabólico, dentro de las que se destacan el peso, el índice de masa corporal (IMC), perímetro de abdomen en modelos animales (acumulación grasa central), y el porcentaje de grasa corporal, como los más citados. El peso de los grupos expuestos al consumo de dieta hiper calórica y CdCl_2 se presentan en la Figura 1A, los cuales muestran un incremento del 18 y 28% respectivamente respecto al grupo con dieta normo calórica; este parámetro es un factor de riesgo para el desarrollo de sobrepeso y obesidad central, delimitado por el perímetro de abdomen. En este sentido, el perímetro de abdomen se muestra en la Figura 1B, la cual incrementó 6% en el grupo con dieta hiper calórica y 21% el grupo con exposición a CdCl_2 respectivamente frente al grupo con dieta normo calórica.

Otro parámetro derivado del peso respecto de la talla de un individuo es el IMC, siempre asociado a un mayor riesgo de desarrollo de SM y DM2. En la Figura 1C, se muestra el IMC del grupo dieta hiper calórica y el grupo CdCl₂, los cuales muestran un incremento del 31 y 44% respectivamente. El incremento del IMC puede deberse a masa magra proteica o lipídica, por lo que se decidió investigar la dependencia del mismo mediante el índice de Lee (específico y validado en modelos murinos). Los resultados (Fig. 1D) muestran una dependencia directa del incremento de IMC, con el % de grasa del 11.4% y del 15% respectivamente. Los resultados zoométricos mostraron un claro desbalance del resguardo energético (Lipídicos), en los animales de exposición a carbohidratos, en los cuales presentaron una distribución con menos dependencia del tejido adiposo central a diferencia de los animales con dieta normo-calórica y exposición al xenobiótico que el resguardo pudo observarse principalmente en esta zona de resguardo. Sin embargo, en ambos casos pudo observarse las alteraciones clásicas de la problemática metabólica.

Los paneles de expertos para el estudio de alteraciones metabólicas, mencionan que ante la presencia de parámetros antropométricos o zoométricos alterados o sobre expresados como en este caso, coexisten alteraciones metabólicas de algunas macromoléculas plasmáticas involucradas en el balance y distribución energético en el organismo; tal es el caso de Lípidos Totales (LT), Triglicéridos (TAG), Colesterol Total (CT), así como de sus fracciones de lipoproteínas transportadoras; las cuales en conjunto llevan al diagnóstico preciso de fenotipos bioquímicos como el SM.

Metabolito (mg/dL)	Grupo NC	Grupo HC	Grupo NC+ Cd
Panel lipídico:			
<i>Lípidos Totales</i>	184 ± 12	216.1 ± 9.8 *	243.6 ± 5.1*
<i>AGL</i>	2.18 ± 0.03	5.02 ± 0.07*	11.2 ± 1.1*
<i>Triglicéridos</i>	64.4 ± 2.5	98.2 ± 3.5*	106.78 ± 3.1*
<i>Colesterol total</i>	103.1 ± 7.5	98.75 ± 10.5	106.84 ± 6
<i>Fracciones de Colesterol</i>			
VLDL-col	13.5 ± 1.5	19.65 ± 3.5*	37.65 ± 1.2*
LDL-col	24.2 ± 4	44.7 ± 2.8*	47.85 ± 3.1*
HDL-col	65.4 ± 2	34.4 ± 4.3*	21.34 ± 1.5*

Panel Carbohidratos:			
<i>Glucosa basal</i>	98.7 ± 4.5	150.3 ± 9.3*	165 ± 5.3*
<i>Lactato (mmol/L)</i>	120.6 ± 12	155.7 ± 19*	197.3 ± 20*
<i>TOG (Figura 2)</i>			

Tabla 1.- Determinaciones séricas post-acondicionamiento. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica $p < 0.05$ por una t de Student.

En la tabla 1 se muestran los niveles de diferentes metabolitos séricos analizados en los grupos de experimentación a 3 meses de acondicionamiento, en donde se observa un incremento significativo en el grupo de exposición hipercalórica en los niveles de LT, AGL, TAG, VLDL-col, LDL-col, Glucosa basal y Lactato de 17, 130, 52, 45, 84, 208 y 29% respectivamente y disminuida la fracción HDL-col (colesterol bueno) en un 47 % frente al grupo control dieta normo calórica. Así mismo, el grupo dieta normo-calórica y cadmio evidenció el mismo comportamiento metabólico, encontrándose elevadas significativamente las concentraciones de LT, AGL, TAG, VLDL-col, LDL-col, Glucosa basal y Lactato en un 32, 413, 65, 178, 97, 238 y 63% respectivamente y disminuida la fracción HDL-col, en un 67% frente al grupo dieta normo calórica. Cabe destacar que los animales expuestos a Cd, presentan una mayor alteración metabólica que los inducidos por dieta hipercalórica. El colesterol total no mostró diferencias de los grupos experimentales respecto al control NC.

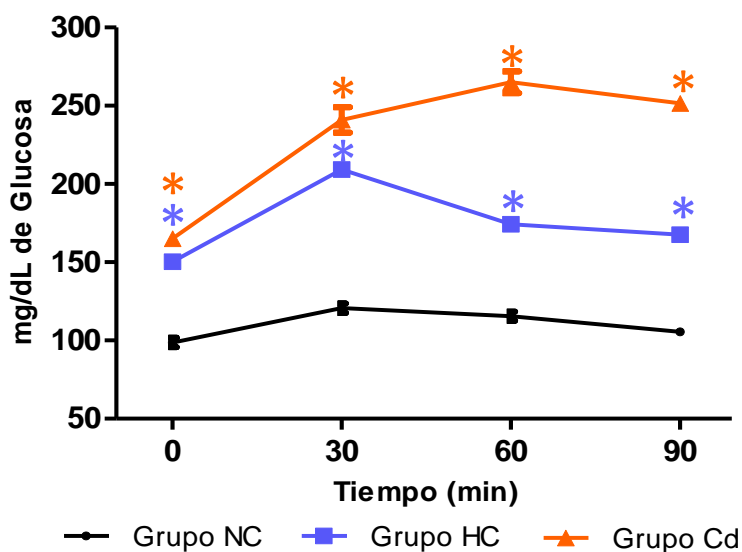


Figura 2. - Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa post-acondicionamiento. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalorica $p < 0.05$ por una t de Student.

Para completar el panel de carbohidratos se realizaron pruebas de tolerancia a glucosa (TOG), para evidenciar el comportamiento del manejo de glucosa en el consumo (post-prandio) con una carga administrada por vía oral de 75g/100mL/70kg de peso del animal. La figura 2, muestra la capacidad de utilizar la glucosa por diferentes tejidos tanto dependientes como independientes de insulina. El grupo hiper calorico presentó un pobre manejo del carbohidrato con incremento de glucosa en condiciones basales y post carga a los 30, 60 y 90 min presentando concentraciones mayores que el grupo normocalorico de 73, 50 y 58 % respectivamente, siendo el punto de 30 min el de mayor concentración con una media de 209.3 mg/dL. Por su parte, el grupo de exposición a Cd mostró un incremento de la concentración de glucosa de tanto basal como post carga a los 30, 60 y 90 min. del 99, 129 y 138 % respectivamente, siendo el punto de 90 min el de mayor concentración con un promedio de 251.5 mg/dL, por lo que estos resultados indican que los modelos de desregulación de carbohidratos en animales se pudo establecer.

Los resultados observados en los grupos experimentales, tanto en la zoometría como en el comportamiento metabólico pudieron evidenciar el fenotipo reconocido como síndrome metabólico, siendo el grupo de exposición al metal el que muestra una mayor desregulación en todos los rubros. En condiciones metabólicamente

sanas debe existir una fina regulación entre el balance lipídico y de carbohidratos. El incremento plasmático de cualquiera de ellos repercute recíprocamente en el otro. En este sentido, el manejo, distribución y resguardo de triglicéridos exógenos o endógenos es llevado hacia tejido adiposo y mínimamente a tejido no adiposo, como miocardio, hígado y páncreas. Las condiciones de hiperlipidemia por triglicéridos, han sido reportadas como una limitante de la absorción de glucosa y por consiguiente de sus rutas de manejo intracelular, esto sucede posterior o concomitante a la desregulación en la señalización de insulina, hormona importante en el manejo de lípidos y glúcidos intracelulares. Al presenciar la desregulación en el manejo plasmático de ambos componentes (triglicéridos y glucosa) en los animales de experimentación, fue sugerente de modificaciones metabólicas en rutas energéticas o de resguardo en tejidos dependientes o independientes de la acción de la hormona; por lo que se investigó el resguardo de glucosa (glucógeno) y de lípidos (triglicéridos), tanto en tejidos especializados para ello, como en tejidos que no lo fuesen, músculo, corazón, riñón e hígado, estos dos últimos si presentan cierto manejo y resguardo.

La figura 3 muestra las concentraciones de TAG en los tejidos ya mencionados como una medida para establecer la severidad de la desregulación metabólica. El grupo con exposición a la dieta hipercalórica mostró un incremento en el resguardo de TAG significativo respecto al grupo control NC, fenómeno conocido como esteatosis. Esta se presentó en hígado, músculo, corazón, corteza y medula renal, con un porcentaje de incremento del 19, 104, 78, 62 y 87% respectivamente; mientras que el aumento en tejido adiposo apenas fue del 12%. De forma similar, el grupo expuesto a Cd mostró un incremento significativo en la acumulación de TAG respecto al grupo NC en hígado, músculo, corazón, corteza y medula renal, además del tejido adiposo del 39, 198, 78, 112, 53 y 26%. Estos resultados confirman el compromiso metabólico de desregulación lipídica observada séricamente.

Así mismo, el glucógeno principal fuente de resguardo de glucosa en diferentes tejidos, mostró alteración divergente en los grupos de inducción. La concentración

de este, fue medida en los diferentes tejidos de estudio (Figura 4). Por su parte, el grupo de exposición hipercalórica, el cual se encontró expuesto a altas concentraciones de carbohidrato y a partir de ello mostró sus complicaciones metabólicas, observando incrementos significativos en hígado, músculo, corazón, corteza renal y medula renal de 169, 183, 41, 45 y 154% respectivamente, sin cambio en tejido adiposo. Por su parte, el grupo expuesto a Cd presentó una dinámica diferente en el contenido de glucógeno, disminuyendo significativamente con respecto al grupo normocalórico en tejidos como hígado, músculo, corazón y corteza renal del 30, 104, 36 y 52% respectivamente, sin embargo no mostraron cambios la médula renal y el tejido adiposo. Por lo que con este resultado podemos inferir que las vías por las cuales se llega a desregular el metabolismo son diferentes y dependientes del inductor, sin embargo presentan coincidencias metabólicas características del síndrome metabólico.

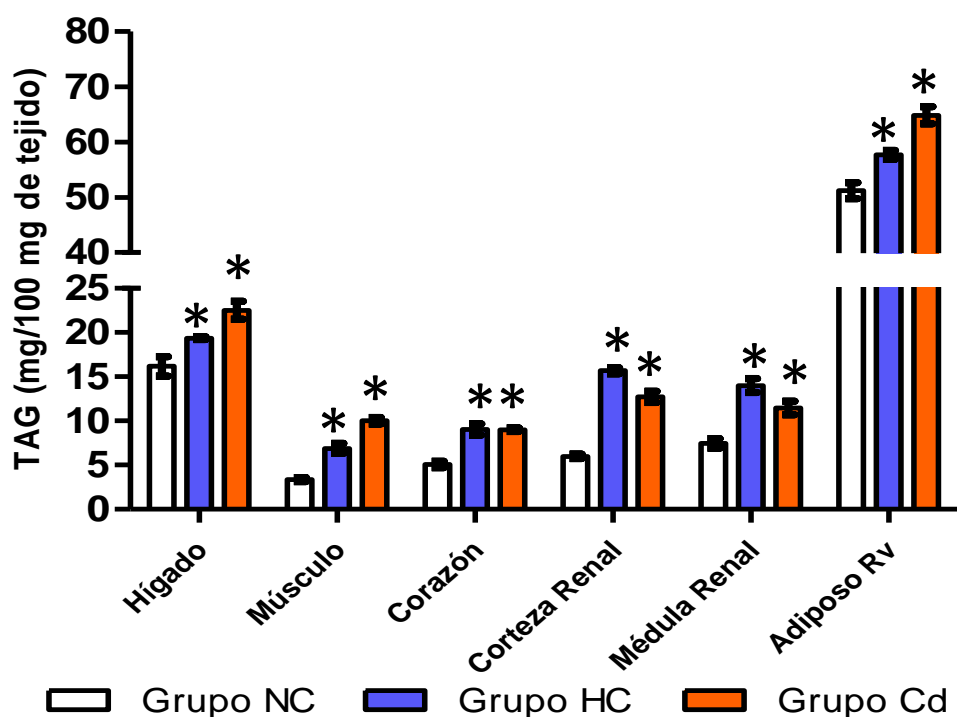


Figura 3. - Concentración de triglicéridos en diferentes tejidos post-acondicionamiento. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica $p < 0.05$ por una t de Student.

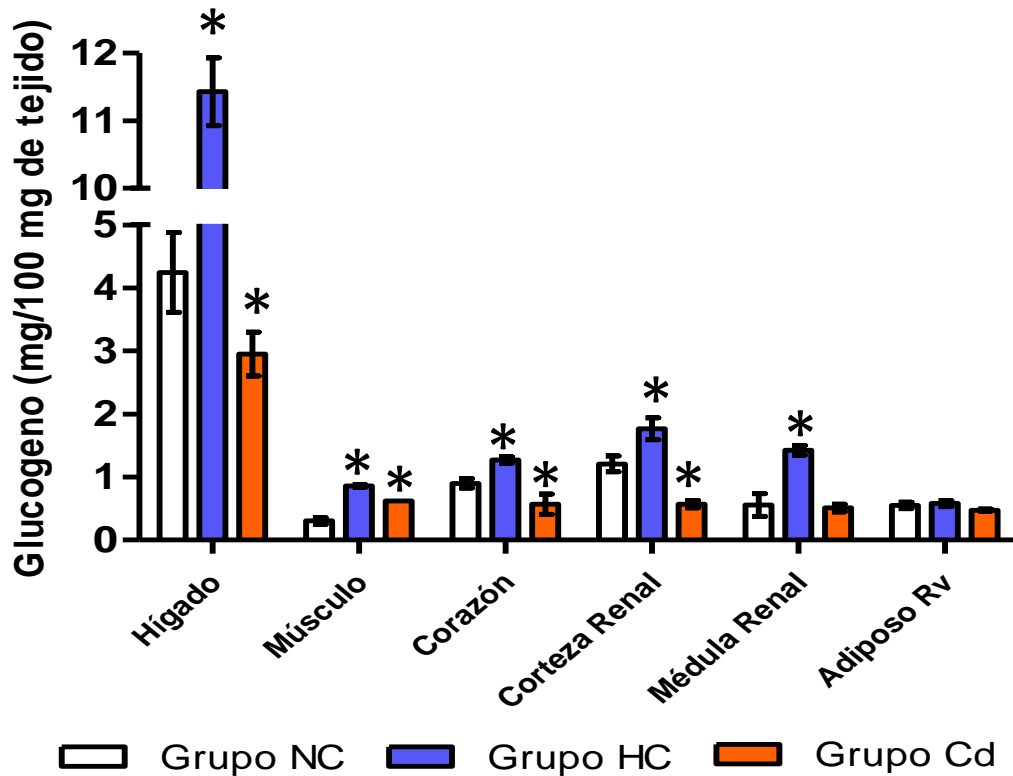


Figura 4. - Concentración de Glucógeno en diferentes tejidos post-acondicionamiento. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica $p < 0.05$ por una t de Student.

Una vez establecidos los modelos animales con fenotipo similar a SM por exposición a una dieta hipercalórica y a CdCl₂ en agua de beber a libre consumo, fueron separados de manera aleatoria en sub-grupos, los cuales fueron divididos de la siguiente manera según

El protocolo experimental 2: grupos dieta normocalórica (NC), grupos dieta hipercalórica (HC), grupo exposición a cadmio (Cd), grupo dieta hipercalórica – Metformina (HC-Met), grupo exposición a cadmio – Metformina (Cd-Met), grupo dieta hipercalórica – NaVO₃ (HC-NaVO₃) y grupo cadmio – NaVO₃ (Cd-NaVO₃). Dado que el estudio está enmarcado en el potencial de vanadio como un restablecedor metabólico, se decidió utilizar uno de los fármacos más usados en estos menesteres como lo es Metformina, que al ser administrado, se espera presente condiciones similares al Control Normocalorico, por lo que los grupos con

el fármaco servirán como control de la acción del meta vanadato de sodio. Por su parte, los grupos de exposición a los desreguladores fungirán como un control de los animales que entraran al protocolo con el tratamiento farmacológico y de suplementación con el bioelemento.

A los grupos que se les administro Metformina y NaVO_3 durante 2 meses, fueron monitoreados en cuanto a sus características zoométricas. Los resultados del grupo expuesto a la dieta HC y con protocolos de tratamiento se muestran en la figura 5. El incremento de peso del grupo control normocalórico y del grupo control hipercalórico se muestran en la Figura 5A, los cuales presentan un comportamiento similar, sin embargo, el control HC presenta una tendencia a incrementar de peso en promedio 11% con respecto al grupo NC; El grupo administrado con Metformina, presentan una disminución significativa con respecto al control HC durante el curso de la administración del fármaco, así mismo, disminuye entre el 5 al 13% con respecto al grupo NC. Por su parte, los animales administrados con NaVO_3 , también presentan dicho comportamiento con respecto al grupo HC, sin embargo, son similares al control NC (sin diferencia significativa). Respecto a este rubro se logró disminuir uno de los factores de riesgo de SM, tanto con el fármaco como con el biometal a pesar del consumo de la dieta HC.

De la misma forma se presentó una reducción en el perímetro de abdomen (Figura 5B), donde el grupo HC muestra un incremento este parámetro en promedio 8% por semana comparado contra el grupo NC. El tratamiento con Metformina impacta sobre este parámetro ya que reduce entre el 6 al 12% con respecto al grupo NC. Los animales administrados con NaVO_3 , presentaron disminución respecto al grupo HC, sin embargo, respecto al control NC no tuvo diferencias significativas en la mayor parte del tratamiento. Un segundo factor de riesgo mostró regulación ante la suplementación con vanadio.

El IMC, otro parámetro importante en la zoometría característica del SM, fue evaluado durante la administración de los tratamientos (Figura 5C). Los animales tratados con Metformina reducen su IMC por debajo del control NC en un 15 al

32%. Mientras el grupo NaVO₃ no presentó diferencias significativas con respecto al grupo NC. El grupo HC se mantuvo con un IMC incrementado significativamente durante el transcurso del estudio. Los datos mostrados evidencian la regulación de uno de los factores más relevantes en la desregulación metabólica.

Finalmente, el último parámetro zoométrico evaluado correspondió al porcentaje de grasa corporal, el cual mostró dependencia directa del peso de los animales y secundariamente al IMC. El grupo HC permaneció significativamente incrementado respecto al control NC durante las 8 semanas de monitoreo. Mientras que el grupo administrado con Metformina logró regular dicho parámetro, no mostrando diferencias significativas con respecto al grupo NC. Por su parte el grupo administrado con NaVO₃, mostró mejoras en el indicador respecto al grupo HC (9%), pero no alcanzó los parámetros mostrados por el grupo NC, manteniéndose significativamente incrementado ($P \leq 0.05$) a lo largo del estudio.

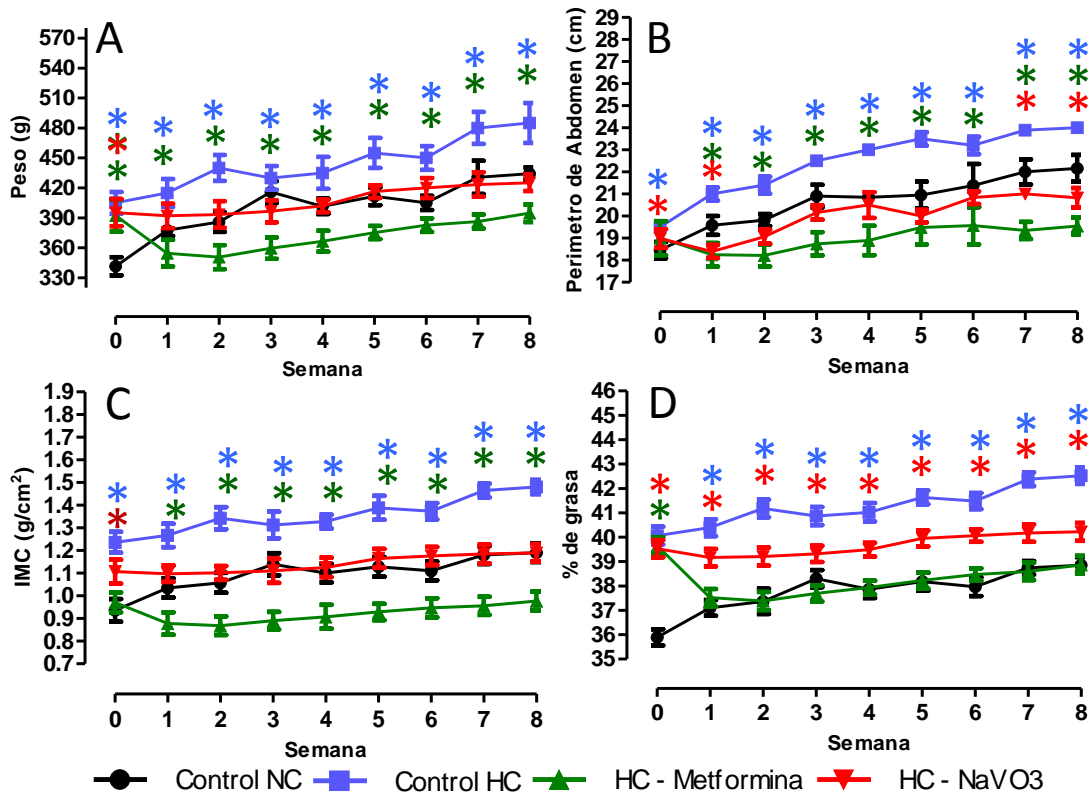


Figura 5.- Determinaciones zoométricas del Grupo Control HC durante 8 semanas de tratamiento. A) Pesos. B) Perímetros de abdomen C) Índice de masa corporal (IMC) D) Porcentaje de grasa. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica $p < 0.05$ por una t de Student.

La evaluación de la zoometría a lo largo de los dos meses de tratamiento en el grupo expuesto a CdCl_2 se muestra en la Figura 6, El grupo control Cd mostró un incremento concomitante a la desregulación metabólica en la etapa de pre-acondicionamiento en cuanto al peso, perímetro de abdomen, IMC y porcentaje de grasa en promedio del 18, 19, 33 y 11% respectivamente respecto al grupo NC. La evaluación del peso en el curso temporal del tratamiento con Metformina y NaVO_3 se muestra en la Figura 6A, en donde se observan disminuciones significativas en los grupos con los tratamientos designados con respecto al grupo Cd, sin embargo, el grupo NaVO_3 no recuperó completamente el peso respecto al grupo NC, mostrando a lo largo del tratamiento un peso mayor significativamente en un 4%. Mientras el grupo tratado con Metformina pudo recuperar el peso de los animales aún con la exposición a Cd. Los resultados en este rubro sugieren que el suplemento con vanadio, no es del todo eficiente, si la vía por la cual se desarrolló SM es a través de la exposición a un metal pesado como lo es Cd.

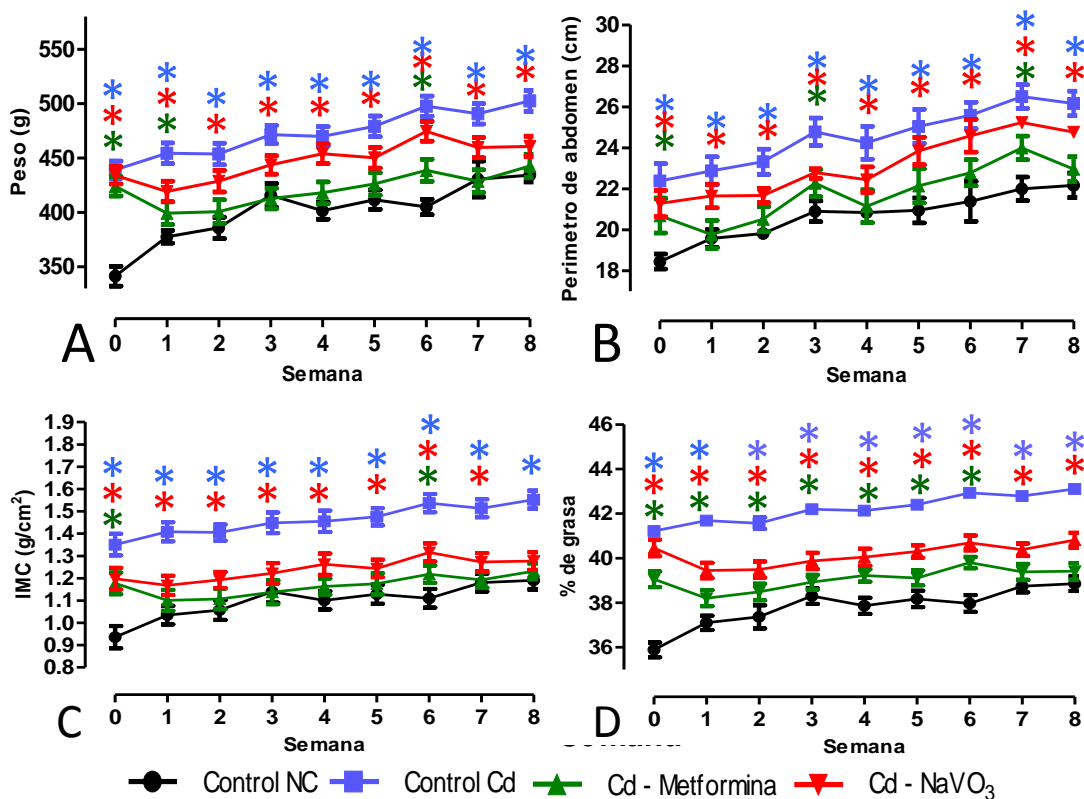


Figura 6.- Determinaciones zoométricas del Grupo Control Cd durante 8 semanas de tratamiento. A) Pesos. **B)** Perímetros de abdomen **C)** Índice de masa corporal (IMC) **D)** Porcentaje de grasa. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica $p < 0.05$ por una t de student.

En lo que respecta al perímetro de abdomen (Figura 6B) tanto el grupo con Metformina y el grupo NaVO₃ tuvieron cambios significativos con respecto al grupo Cd. Al respecto el grupo administrado con el fármaco mostró la mejor recuperación de este parámetro, sin embargo, se mantuvo en promedio 1.6% más alto que el grupo NC; por su parte, el promedio de las diferencias significativas del grupo suministrado con NaVO₃ fue de 6.24% en este rubro también mostró mejora, pero no alcanza la completa regulación, como en los animales del grupo Cd-Metf o los animales del grupo HC- NaVO₃.

El IMC mostrado en la figura 6C, presentó en los diferentes tratamientos regulación de este parámetro con respecto al grupo Cd. En promedio, el grupo tratado con NaVO₃ mantuvo un exceso del IMC del 9% respecto al grupo NC, el cual fue significativamente elevado. Mientras que, el grupo administrado con Metformina reguló adecuadamente el indicador. Por último, en lo que se refiere al porcentaje de grasa mostrado en la Figura 6D, ambos tratamientos mostraron mejoras significativas respecto al grupo Cd. Sin embargo, ninguno de los tratamientos fue del todo eficiente en la regulación del parámetro, ya que permanecieron significativamente incrementados (Cd-Metf, 2 y Cd - NaVO₃, 6%) con respecto al grupo NC. Resumiendo la eficacia del tratamiento con Metformina mostró una buena regulación zoométrica, sin embargo no logró regular el porcentaje graso lo cual refiere la importancia de la vía de inducción del SM. Evidencia que resalta con el suplemento con NaVO₃, ya que con la dosis que logró regular al grupo HC, no fue tan eficiente para el grupo Cd.

Una vez analizada la zoometría como factores relevantes del SM y observando que los tratamientos tanto farmacológico como con el suplemento con el biometal presentan diferentes comportamientos en cuanto al porcentaje de mejora en los diferentes parámetros, se procedió a revisar el efecto en los indicadores séricos, que caracterizan al SM. En la Tabla 2, se muestran los niveles de diferentes metabolitos séricos analizados en los grupo HC a 4 semanas de tratamiento, en donde se puede observar que el grupo HC se mantuvo desregulado y mostró incrementos significativos en los niveles de LT, AGL, TAG, VLDL-col, LDL-col,

glucosa basal y lactato correspondientes al 28, 109, 97, 96, 30, 132 y 17% respectivamente, y permanentemente disminuida la concentración fracción HDL-col (colesterol bueno) en un 47%, esto fue analizado respecto al grupo control con dieta NC.

En cuanto a los grupos con tratamientos, la administración de Metformina refirió disminución significativa en la mayoría de los metabolitos desregulados incluso por debajo de los valores mostrados por el grupo NC (LT 24%, TAG 33%, CT 22% y sus fracciones VLDL 33% y LDL20%), la fracción HDL-col recuperó 21% en relación al grupo HC, pero no llega los valores referentes por el grupo NC. Los niveles de AGL no mostraron cambios, a pesar de la regulación de lipídica mostrada. La glucosa basal mejoró notablemente con el fármaco hasta condiciones similares a la del control NC, sin embargo el lactato un indicador de glicólisis en anaerobiosis o afección mitocondrial severa, se vio un incremento del 26% respecto al grupo HC y 48% respecto al grupo NC. El fármaco muestra mejoras en los parámetros bioquímicos más comunes, pero también presenta consecuencias bioquímicas secundarias como la progresión a acidosis metabólica evidenciada por el lactato.

Mientras que el grupo suplementado con NaVO_3 mostró mejor regulación en algunos parámetros bioquímicos que el grupo HC-Metf. Las concentraciones de LT, TAG, CT, VLDL-col y LDL-col disminuyeron significativamente en un 36, 45, 29, 46 y 32% respecto al grupo NC. La fracción de HDL-col también mejoró, sin embargo no recuperó al 100% respecto a la concentración observada en el grupo NC. La concentración de glucosa mostró una mejoría del 23%, pero no alcanzó valores similares al grupo NC. Mientras que los AGL permanecieron incrementados significativamente (92%) respecto al grupo NC. Por su parte el lactato incremento significativamente 26% versus el grupo HC y un 47% respecto al grupo NC. La suplementación con vanadio dos veces por semana 600 veces menor a la dosis de Metformina, mostró una regulación positiva de los parámetros bioquímicos, sin embargo mantiene elevadas las concentraciones de AGL y lactato, lo que está íntimamente relacionado con la presencia de acidosis

metabólica. Además los datos sugieren que el modo de acción del metal está íntimamente relacionado con el del fármaco de primera elección.

Tabla 2. Comportamiento metabólico de los animales con diferentes tratamientos y dieta HC (primer mes de tratamiento)

Metabolito (mg/dL)	Control NC	Control HC	HC - Metformina	HC - NaVO ₃
Panel lipídico:				
<i>Lípidos Totales</i>	187.2 ± 9.6	240.1 ± 7.3*	140.76 ± 12.4*	118.3 ± 10.6 4*
<i>AGL</i>	2.85 ± 0.2	5.96 ± 0.09*	5.75 ± 0.29*	5.48 ± 0.07*
<i>Triglicéridos</i>	33.6 ± 6	66.3 ± 5.3*	22.3 ± 2*	18.4 ± 4*
<i>Colesterol total</i>	113.62 ± 5.6	103.7 ± 8.1	88.46 ± 6.3*	80.3 ± 8.4*
<i>Fraciones de Colesterol</i>				
VLDL-col	6.72 ± 1.6	13.2 ± 2.3*	4.46 ± 1*	3.6 ± 0.4*
LDL-col	36 ± 3.5	47 ± 2.5*	28.5 ± 2.5*	24.2 ± 4.5*
HDL-col	70.9 ± 4.6	43.5 ± 8*	55.5 ± 8*	52.5 ± 4.5*
Panel Carbohidratos:				
<i>Glucosa basal</i>	80.9 ± 3.6	123 ± 2.3*	86 ± 4.1	94 ± 2.1*
<i>Lactato (mmol/L)</i>	131.4 ± 7	153.9 ± 3*	195.3 ± 5.15*	194.4 ± 6.2*
<i>TOG (Figura 7)</i>				

Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalorica p < 0.05 por una t de Student.

La figura 7 muestra el comportamiento del manejo de glucosa post-carga de 75 gr de glucosa/100mL/70 kg de peso del animal, con los diferentes tratamientos ante la exposición las dietas NC y HC. Los resultados muestran que el grupo control HC presentó un incremento de glucosa en condiciones basales y post carga a los 30, 60 y 90 min con respecto al control NC del 34, 25, 42 y 58% respectivamente, mostrando combinación en alteraciones reconocidas sobre el metabolismo de la glucosa, conocidas como intolerancia a glucosa (post-carga) y alteración en la glucosa basal. Por su parte, el grupo administrado con Metformina por 4 semanas mostró una importante mejoría en la respuesta al carbohidrato en ayuno y presentando únicamente intolerancia a la glucosa, manteniendo como diferencias con respecto al NC de 6, 13, 22 y 45% a los 0, 30. 60 y 90 min respectivamente. El tratamiento con NaVO₃ mostró un comportamiento similar, sin embargo el manejo de glucosa post-carga fue pobre mostrando diferencias significativas de 20, 16 y

54% con respecto al grupo NC a los tiempos de 30, 60 y 90 min, siendo este último en donde se presenta la mayor concentración de glucosa (178mg/dL).

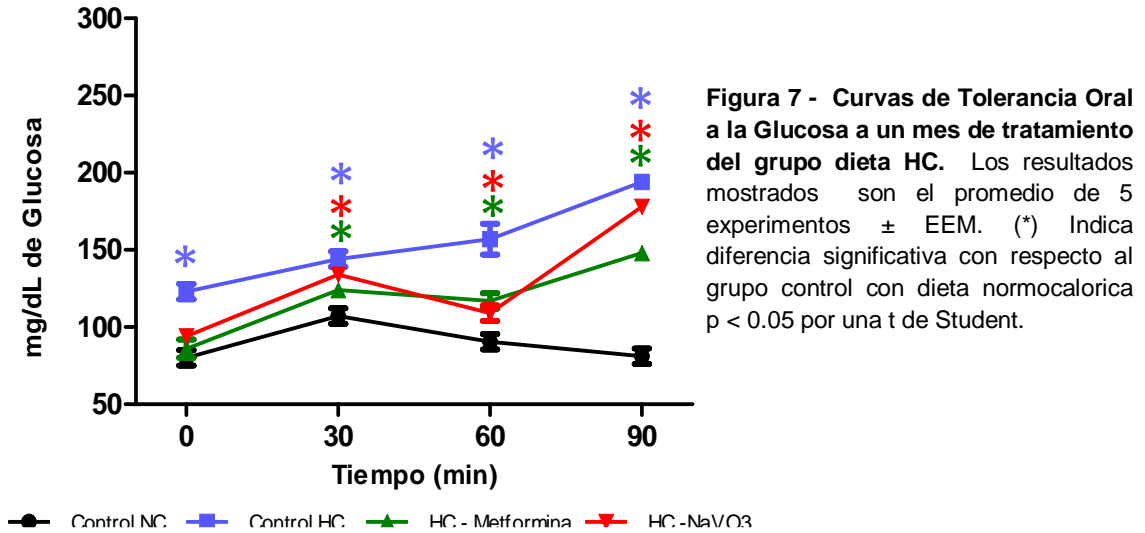


Tabla 3. Comportamiento metabólico de los animales con diferentes tratamientos expuestos a Cd. (Primer mes de tratamiento)

Metabolito (mg/dL)	Control NC	Control Cd	Cd - Metformina	Cd - NaVO3
Panel lipídico:				
Lípidos Totales	187.2 \pm 9.6	253.6 \pm 4.5*	232 \pm 6.1 *	231 \pm 5.2*
AGL	2.85 \pm 0.2	10.96 \pm 0.14*	7.1 \pm 0.08*	7.48 \pm 2*
Triglicéridos	33.6 \pm 6	112.3 \pm 4.5*	83.13 \pm 3.3*	111.75 \pm 4.3*
Colesterol total	113.62 \pm 5.6	111.3 \pm 6.7	103.3 \pm 5	114.66.9 \pm 5
Fraciones de Colesterol				
VLDL-col	6.72 \pm 1.6	22.46 \pm 2.3*	16.6 \pm 1*	22.36 \pm 0.4*
LDL-col	36 \pm 3.5	54.8 \pm 1.7*	46 \pm 2.1*	56.1 \pm 1.5*
HDL-col	70.9 \pm 4.6	34.1 \pm 2.5*	40.7 \pm 2.6*	36.2 \pm 1.8*
Panel Carbohidratos:				
Glucosa basal	80 \pm 3.6	135 \pm 2.1*	80.7 \pm 4.3	112.7 \pm 3.5*
Lactato (mmol/L)	131.4 \pm 7	216 \pm 7*	189 \pm 10*	203.4 \pm 4*
TOG (Figura 8)				

Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo sin exposición a Cd $P \leq 0.05$ por una t de Student.

En la tabla 3 se muestran los niveles de diferentes metabolitos séricos después de tratamiento de los grupos expuestos a Cd y administrados con Metformina y meta vanadato de sodio. Se pudo observar un incremento significativo en el grupo de exposición crónica a 65.5 mg/L de Cd en los niveles de LT, AGL y TAG correspondiendo a 35, 284, 234% respectivamente. Mientras que la cuantificación de CT no presentó cambios respecto al control sin Cd, sus fracciones si la evidenciaron el VLDL-col y LDL-col incrementaron significativamente en un 96 y 52%, en dependencia a decremento de la fracción HDL-col (51%). Por su parte, la glucosa basal y lactato incrementaron respecto al control sin Cd en 155 y 64%. Los resultados muestran una profunda desregulación metabólica ante la exposición a Cd a pesar de consumir dieta normocalórica.

En cuanto a los grupos con tratamiento, el grupo Cd-Metf mostró mejorías al grupo Cd, pero no así respecto a su grupo control. LT, AGL y TAG permanecieron significativamente incrementados en un 23, 149, 147%. El CT no mostro cambios significativos respecto al grupo sin Cd, no asi sus fracciones VLDL-col y LDL-col que siguen aumentadas en un 147 y 27% respectivamente respecto al control, mientras que HDL-col recupero un 42% respecto al grupo control. Glucosa basal reguló hasta valores similares a los del control, mientras lactato mostró el mismo comportamiento que en la dieta HC manteniéndose incrementado significativamente en un 43%.

El grupo NaVO₃ mostro un comportamiento similar al grupo Metformina manteniéndose la desregulación metabólica en los niveles de LT, AGL, y TAG, que correspondieron a 23.4, 162.5, 232.7 respectivamente versus el grupo sin Cd. El colesterol total no mostro cambios significativos ($p \leq 0.05$). Y las fracciones de este se comportaron divergentemente, es decir, la fracción LDL incrementó en un 55.8%, mientras que las fracciones de alta y muy baja densidad disminuyeron significativamente en un 48.9 y 46.5%. Estos resultados sugieren fuertemente que los triglicéridos están siendo transportados mayormente en las fracciones de baja y alta densidad, lo cual es condicionante a la formación de estructuras pequeñas, densas y oxidadas propias de condiciones aterogénicas. En lo que respecta a

glucosa mostró cierto grado de recuperación pero se mantuvo significativamente más alta que el grupo ausente de Cd en un 40.9%, lo mismo que el lactato con 33%, sugiriendo estados metabólicamente ácidos.

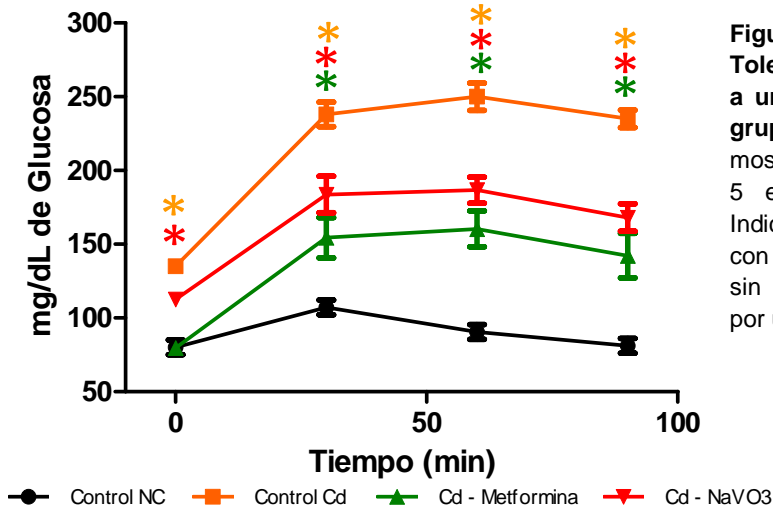
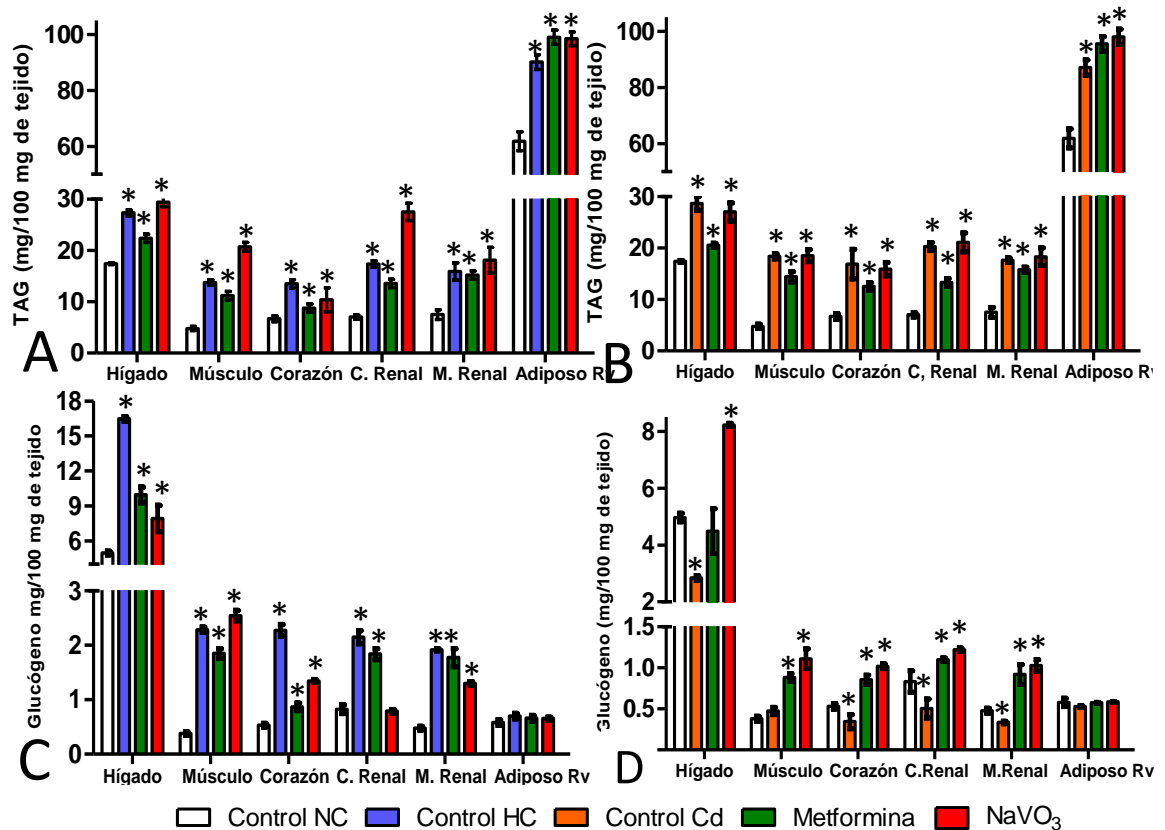


Figura 8 - Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa a un mes de tratamiento del grupo Cd. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control sin exposición a Cd $p < 0.05$ por una t de Student.

Completando el entorno del manejo de glucosa en las ratas expuestas al xenobiótico, en la Figura 8 se muestran las curvas resultantes al análisis de tolerancia oral a la glucosa. Observándose que el grupo control Cd, presentó un incremento de glucosa en condiciones basales y post carga a los 30, 60 y 90 min con respecto al control sin exposición de 68, 162, 198 y 191% respectivamente. El grupo Cd-Metf mostró una regulación de la concentración de glucosa basal, pero en el postprandio permaneció incrementada significativamente en 58, 86, y 76% a los tiempos 30, 60 y 90 min respectivamente, con lo que se elimina el estado de glucosa en ayuno alterada, pero permanece la intolerancia al carbohidrato. Mientras que los animales con suplementación de NaVO_3 , mostraron una pobre mejoría manteniendo incrementada la concentración plasmática en 40, 95, 120 y 107% con respecto al grupo sin Cd, presentando tanto alteración en la glucosa de ayuno, como alteración a la tolerancia del carbohidrato. Los datos muestran que en presencia de Cd, el vanadio no mejora las condiciones metabólicas ni de lípidos, ni de glúcidos.



En la figura 9 se muestran las concentraciones de TAG y Glucógeno en los tejidos analizados de ambas desregulaciones metabólicas con tratamiento de Metformina y NaVO₃ después de 1 mes tratamiento. Se pudo observar que los TAG en ambos casos incrementaron significativamente. El consumo de la dieta HC (9A) respecto al grupo NC, presentó acumulación en hígado, músculo, corazón, corteza renal, medula renal y tejido adiposo, con un porcentaje de incremento del 56, 186, 101, 146, 111 y 45%, mostrando la continuidad de la severidad de la desregulación metabólica ante el consumo de una dieta HC. El tratamiento en el grupo HC-Metf mostró mejorías respecto al grupo HC, no siendo así respecto al grupo NC. Los niveles de TAG en hígado, músculo, corazón, corteza y medula renal permanecieron incrementados significativamente en un 28, 133, 30, 93 y

102% respectivamente, observándose una movilización de TAG hacia tejido adiposo donde su concentración se incrementó en 196% respecto al grupo. Por su parte el grupo HC - NaVO₃, no mostró cambios respecto al grupo de exposición a Cd y sin tratamiento alguno correspondiendo a 68, 331, 54, 290, 140 y 200%. Sin embargo, movilizó TAG a tejido adiposo donde este valor se ve incrementado en un 200%. Lo cual confirma lo observado en la caracterización bioquímica en donde a 30 días de la administración de vanadio no existieron cambios importantes, por lo que su efecto de regulador metabólico en periodos cortos no es eficiente del todo.

De forma similar, el grupo intoxicado con Cd mostró un incremento significativo en la acumulación de TAG respecto al grupo sin exposición a Cd (9B) en hígado, músculo, corazón, corteza y medula renal, además del tejido adiposo del 64, 283, 151, 188, 134 y 40% mostrando la continua desregulación metabólica ante la exposición al metal. En lo que se refiere al grupo Cd – Metf, este mostró recuperación en el resguardo mejoras comparado con el grupo Cd sobre todo en hígado, sin embargo respecto al grupo control sin cadmio mantuvo concentraciones incrementadas del lípido en hígado, músculo, corazón, corteza renal, medula renal y adiposo correspondientes al 17, 200, 86, 89, 110 y 114% respectivamente. En cuanto al tratamiento con la sal de vanadio el grupo Cd - NaVO₃, no mostro mejoras significativas con respecto al grupo Cd, manteniendo incrementos del 55, 285, 136, 200, 143 y 87% en hígado, musculo, corazón, corteza renal, medula renal y adiposo respectivamente. Estos resultados evidencian el papel en la regulación metabólica de TAG en tejidos tópicos como ectópicos con el consumo de Metformina en ambos modelos de regulación siendo más evidente en el sobre consumo calórico; por otro lado, el tratamiento con NaVO₃ muestra un efecto lento en la regulación metabólica y prácticamente nulo cuando esta es por exposición a Cd.

Respecto a la regulación del glucógeno ante la administración de ambos tratamientos durante la exposición a dieta hipercalórica se muestra en la Figura 9C, donde se observa que el grupo HC mantiene incrementos significativos en

hígado, músculo, corazón, corteza renal y medula renal de 231, 502, 327, 160 y 300 % respectivamente. En lo que concierne al grupo HC – Metf, este mostró disminución significativa con respecto al grupo HC, pero aun así mantuvo incrementada su concentración de glucógeno en un 100, 388, 63, 122 y 270% en el orden tisular descrito. Por su parte, el grupo HC – NaVO₃ presentó mejoras significativas en hígado, corazón y riñón del 59, 152 y 171%, con cantidades similares al grupo NC en corteza renal y tejido adiposo; mientras que en músculo incrementó aún más que el grupo HC (571.5%). Fue de resaltar que el tejido adiposo retroventral de todos los grupos con y sin tratamiento no mostró cambios importantes en la concentración de glucógeno.

En cuanto a la dinámica en el contenido de glucógeno (Figura 9D) ante la exposición a CdCl₂, mostró valores disminuidos significativamente con respecto al grupo sin exposición al metal en los tejidos analizados (hígado, corazón medula y corteza renal), correspondiendo al 42, 35, 39 y 29% respectivamente, sin embargo no mostraron cambios en músculo ni en tejido adiposo; estos resultados sugieren fuertemente que la exposición a Cd interviene directamente en el resguardo de glucosa, y por lo tanto también en la dinámica sérica, como se pudo observar en el gráfico de la Figura 8. Después de un mes de recibir tratamiento con Metformina el grupo Cd – Metf mostró recuperación en la concentración de la molécula en hígado respecto al grupo control sin exposición; Mientras que exhibió un sobre resguardo en músculo, corazón, corteza y medula renal con valores incrementados en un 133, 60, 31 y 92% respectivamente. En cuanto al tratamiento con NaVO₃ se pudo observar un sobre resguardo en todos los tejidos monitoreados, mostrando un 65, 192, 91, 46 y 115% respectivamente. Mientras que el tejido adiposo se manejó en forma similar a lo observado en el modelo de desregulación por carbohidratos. Por lo que el vanadio mostró ser un regulador de la ruta de síntesis de glucógeno, al corregir sobre manera su concentración acumulada en los tejidos, esto también pone de manifiesto que injiere directamente sobre los lípidos acumulados, deteniendo la vías de sobreacumulación, sin embargo, esta readecuación mostrada en el sistema

parece no ser tan eficiente a nivel sérico, en cuanto al manejo del carbohidrato (Fig. 8).

Tabla 4. Comportamiento metabólico de los animales con diferentes tratamientos expuestos a HC. (Segundo mes de tratamiento)

Metabolito (mg/dL)	Control NC	Control HC	HC - Metformina	HC - NaVO3
Panel lipídico:				
<i>Lípidos Totales</i>	192.19 ± 13	290.87 ± 14.9*	199 ± 6.5	194.78 ± 4.5
<i>AGL</i>	3.49 ± 0.12	6.27 ± 0.16*	6.33 ± 0.1*	5.76 ± 0.08*
<i>Triglicéridos</i>	50.5 ± 5.8	126 ± 5*	51.1 ± 12	35.1 ± 10
<i>Colesterol total</i>	98.2 ± 10.8	122.6 ± 8.1*	119.5 ± 6.2	123.9 ± 14.5*
<i>Fracciones de Colesterol</i>				
VLDL-col	10.1 ± 1.8	25.2 ± 0.8*	10.2 ± 1.2	7.02 ± 1.3
LDL-col	39 ± 7	60.8 ± 3.5*	29.2 ± 4	46.2 ± 4.4
HDL-col	49.1 ± 2	36.6 ± 4.2*	80.1 ± 1*	70.7 ± 8.4*
Panel Carbohidratos:				
<i>Glucosa basal</i>	72.9 ± 7.5	106.1 ± 4.4*	61 ± 3.8*	85.8 ± 5.5
<i>Lactato</i>	166.68 ± 12	193.5 ± 9.4*	241.2 ± 10.4*	203.4 ± 11*
<i>TOG (Figura 10)</i>				

Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalórica $p < 0.05$ por una *t* de Student.

La progresión en regulación de metabolitos séricos se siguió hasta el segundo mes con ambos tratamientos ante el consumo de una dieta HC, valores que se muestran en la tabla 4, en donde se observa al grupo HC sigue incrementado la desregulación y manteniendo incrementados los niveles de LT, AGL, TAG, CT, VLDL-col, LDL-col, glucosa basal y lactato con respecto al grupo NC en 51, 79, 149, 24, 149, 55, 45 y 16% respectivamente con una caída permanente de HDL-col en un 25%; cabe mencionar que aunque la concentración de glucosa es mayor que la del control NC, esta se encuentra dentro de los valores de referencia para la cepa. El grupo administrado con Metformina evidenció regulación casi completa de las condiciones séricas en los diferentes metabolitos como LT, TAG, VLDL-col, LDL-col y HDL-col (este último regulándolo positivamente hasta un 63%, por encima del control NC), incluso mostrando valores en la glucosa basal por debajo de los valores mostrados por el grupo NC, sin embargo, los niveles de AGL no

mostraron cambios con respecto al grupo HC, manteniendo valores por encima del grupo NC en un 81%. Por otro lado, el lactato mantuvo incrementada su concentración sérica del 24% respecto al grupo HC y 44% respecto al grupo NC. La acción de Metformina muestra mejoras en los parámetros bioquímicos más comunes, pero también presenta consecuencias bioquímicas secundarias como la elevación de AGL y lactato, lo cual implica por un lado que se hallan favorecidas las rutas oxidativas de glúcidos y lípidos, y por otro lado, que se encuentre activa la novosíntesis de triglicéridos y su resguardo en diferentes tejidos.

Por el otra parte el grupo administrado con NaVO_3 mostró a dos meses de administración de una dosis 24,000 veces menor a la de Metformina una regulación contundente, la cual se pudo evidenciar por una completa recuperación en las concentraciones de LT, TAG, VLDL-col, LDL-col y glucosa basal con respecto al grupo NC. Los niveles de CT se encontraron incrementados con respecto al grupo NC, esto gracias a la mejora que tiene hacia el incremento de los niveles de HDL-col (colesterol bueno) donde muestra mejoras significativas (44%). Interesante fue encontrar que la concentración de AGL y lactato, siguen incrementados significativamente en un 65% y 22% respectivamente comparados contra el grupo NC, sin embargo, la concentración del segundo muestra que el estatus oxidativo se halla finamente regulado y posiblemente ocupe rutas similares a las descritas para Metformina.

Corroborando esta hipótesis, en la Figura 10 se muestra el comportamiento del manejo de glucosa post carga con ambos tratamientos a lo largo de 8 semanas y ante la exposición a la dieta HC. Donde se puede observar un incremento de glucosa tanto basal como postcarga del grupo HC a los 0, 30, 60 y 90 min con respecto al grupo NC de 45, 51, 103 y 48% respectivamente. El grupo HC – Metfor mostro mejoría en la regulación de la glucosa basal incluso por debajo de los valores de grupo NC, presentando únicamente intolerancia a la glucosa mostrando una mínima diferencia entre la concentración valuada a los 30, 60 y 90 min de 24, 21 y 21%, respectivamente. El tratamiento con NaVO_3 mostró un comportamiento similar, sin embargo el manejo de glucosa basal como post-carga fue menor

mostrando diferencias significativas del 96, 37 y 31% con respecto al grupo NC a los tiempos 30, 60 y 90 min, siendo al minuto 30 donde se muestra la mayor concentración de glucosa (183mg/dL), lo cual sugiere que las rutas glucogénicas se hallan aún fomentadas o consecuentemente la regulación gluconeogénica no está del todo coordinada en los tejidos independientes de la acción de insulina.

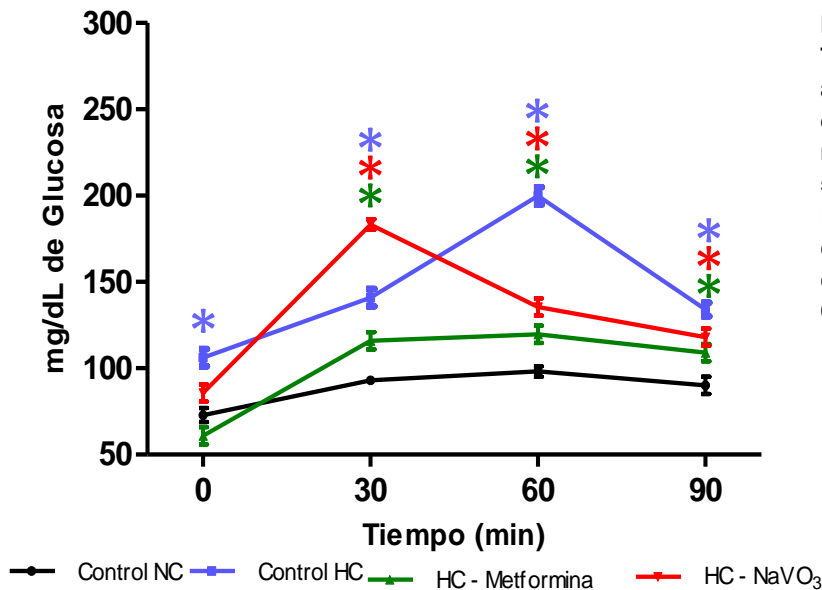


Figura 10 - Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa a dos meses de tratamiento del grupo HC. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control con dieta normocalorica $P \leq 0.05$ por una t de Student.

Mientras que en el grupo con evidencias bioquímicas de SM por exposición a Cd, mostró en la tabla 5 que permaneció crónicamente desregulado en su comportamiento metabólico de los niveles de LT, AGL y TAG correspondiendo a 23, 215, 141% respectivamente. La concentración de CT no presentó cambios respecto al control NC, pero las fracciones VLDL-col y LDL-col muestran incrementos del 140 y 29% con decrementos en la fracción HDL-col (39%), lo que sugiere modificaciones en cuanto al transporte de colesterol esterificado y no esterificado, cambiando este tipo de transporte por triglicéridos principalmente y por lo tanto también modificando el tamaño de partícula. En lo que se refiere a la desregulación de carbohidratos, la glucosa basal y lactato incrementaron respecto al control sin exposición al metal en un 63 y 61%. En lo que se refiere al grupo con tratamiento con Metformina, el grupo Cd-Metf, permaneció sin mejorías significativas respecto al grupo Cd en LT, VLDL-col, LDL-col y Lactato, pero si

mínimas mejorías en AGL, TAG, HDL-col y glucosa basal. Las diferencias con respecto al grupo sin exposición al xenobiótico son en LT, AGL, TAG, VLDL-col y lactato permaneciendo incrementados en un 16, 49, 124, 124 y 57%. Mostrando el decremento en la concentración de la fracción HDL-col en un 53%. El grupo administrado con NaVO₃ corroboró lo mostrado a un mes de tratamiento en el cual no existieron mejoras en las concentraciones de los metabolitos analizados; después de dos meses de tratamiento se mantuvo esta tendencia metabólica e incluso incrementan los niveles de estos parámetros tanto para el grupo expuesto a Cd y por consecuencia para el control sin exposición. Las concentraciones de LT, AGL, TAG, VLDL-col, LDL-col, glucosa basal y lactato presentaron un 35, 163, 171, 167, 40, 40 y 114% respectivamente y en comparación al control sin cadmio. Mientras que la fracción buena de colesterol (HDL-col) mantuvo su decremento en un 35%. Estos resultados evidencian que el Cd afecta a la bioquímica celular en puntos claves en los cuales actúa el fármaco para efectuar condiciones de regulación metabólica; y también pone de manifiesto que el vanadio está vinculado con las rutas metabólicas que regula el fármaco, y que en presencia de otro metal, puede coadyuvar en la alteración metabólica celular.

Tabla 5. Comportamiento metabólico de los animales con diferentes tratamientos expuestos a Cd. (Segundo mes de tratamiento)

Metabolito (mg/dL)	Control NC	Control Cd	Cd - Metformina	Cd - NaVO ₃
Panel lipídico:				
<i>Lípidos Totales</i>	192.19 ± 13	237.07 ± 8.5*	223.69 ± 5.3*	259.675 ± 6*
<i>AGL</i>	3.49 ± 0.12	11 ± 0.16*	8.99 ± 0.7*	9.2 ± 0.7*
<i>Triglicéridos</i>	50.5 ± 5.8	121.75 ± 2.1*	113.6 ± 4.5*	137.25 ± 5*
<i>Colesterol total</i>	98.2 ± 10.8	104.32 ± 5.2	101.1 ± 7.1	113.2 ± 4.3*
<i>Fracciones de Colesterol</i>				
VLDL-col	10.1 ± 1.8	24.3 ± 1.2*	22.72 ± 2.5*	27 ± 2.5*
LDL-col	39 ± 7	50.5 ± 2.7*	43.52 ± 4.7	54.6 ± 1.77*
HDL-col	49.1 ± 2	29.525 ± 2.4*	34.86 ± 1.4*	31.6 ± 0.5*
Panel Carbohidratos:				
<i>Glucosa basal</i>	72.9 ± 7	119.5 ± 5.9*	85 ± 5.5	102.5 ± 7*
<i>Lactato</i>	166.68 ± 12	270 ± 9.3*	255.6 ± 11*	358.2 ± 10.3*
<i>TOG (Figura 11)</i>				

Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control sin exposición a Cd P≤0.05 por una t de Student.

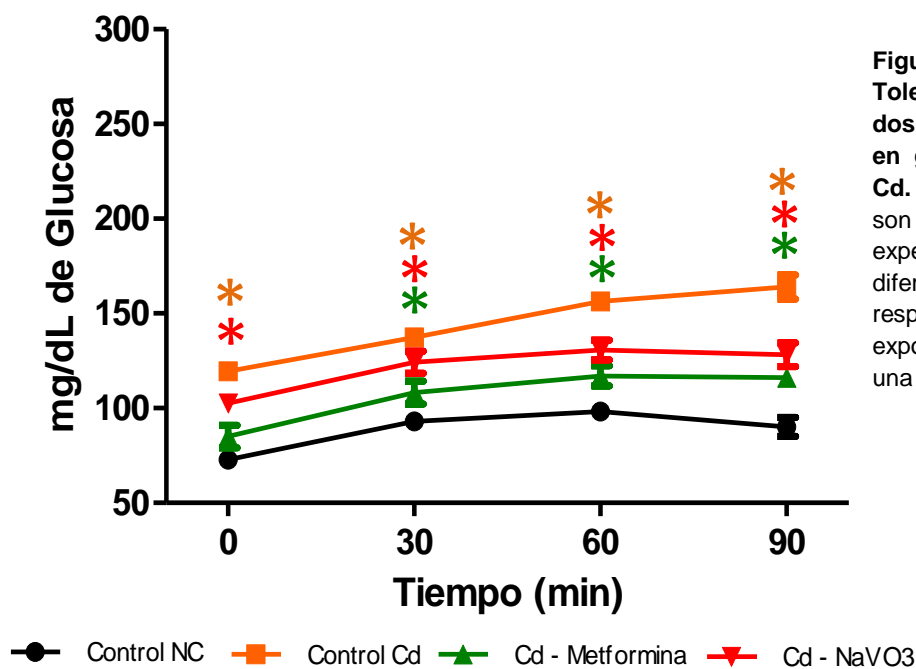


Figura 11 - Curvas de Tolerancia Oral a la Glucosa a dos meses de tratamientos en grupos con exposición a Cd. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos \pm EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control sin exposición con una $P \leq 0.05$ por una t de Student.

La acción farmacológica de ambos tratamientos sometidos a la intoxicación crónica con el metal (Cd), ante una post-carga de glucosa se muestra en la figura 11. En la cual se pudo observar la permanente alteración del grupo Cd a los 0, 30, 60 y 90 min con respecto al grupo sin tratamiento de 63, 47, 59 y 82%, manteniendo tanto alteración de glucosa basal como intolerancia a la glucosa. Por su parte el grupo Cd – Metf mostró mejora en la TOG, en la concentración basal de glucosa menos eficiente en la post-carga con valores incrementados del 16, 19 y 29% a los 30,60 y 90 min, mejorando la regulación y manejo de la glucosa tanto por tejidos dependientes como no dependientes de insulina. El tratamiento con el suplemento con V mostró un comportamiento similar al observado por Metformina, sin embargo la regulación de la glucosa es menos eficiente ya que permanecieron concentraciones elevadas a lo largo de la prueba del 40, 33, 33 y 42% a los 0, 30 60 y 90% con respecto al grupo sin exposición a Cd. El análisis de datos en cuanto al comportamiento de las curvas, sugieren que el fármaco logra mejorar el manejo de glucosa en tejidos dependientes de insulina, mismo efecto que la parecer promueve el Vanadio.

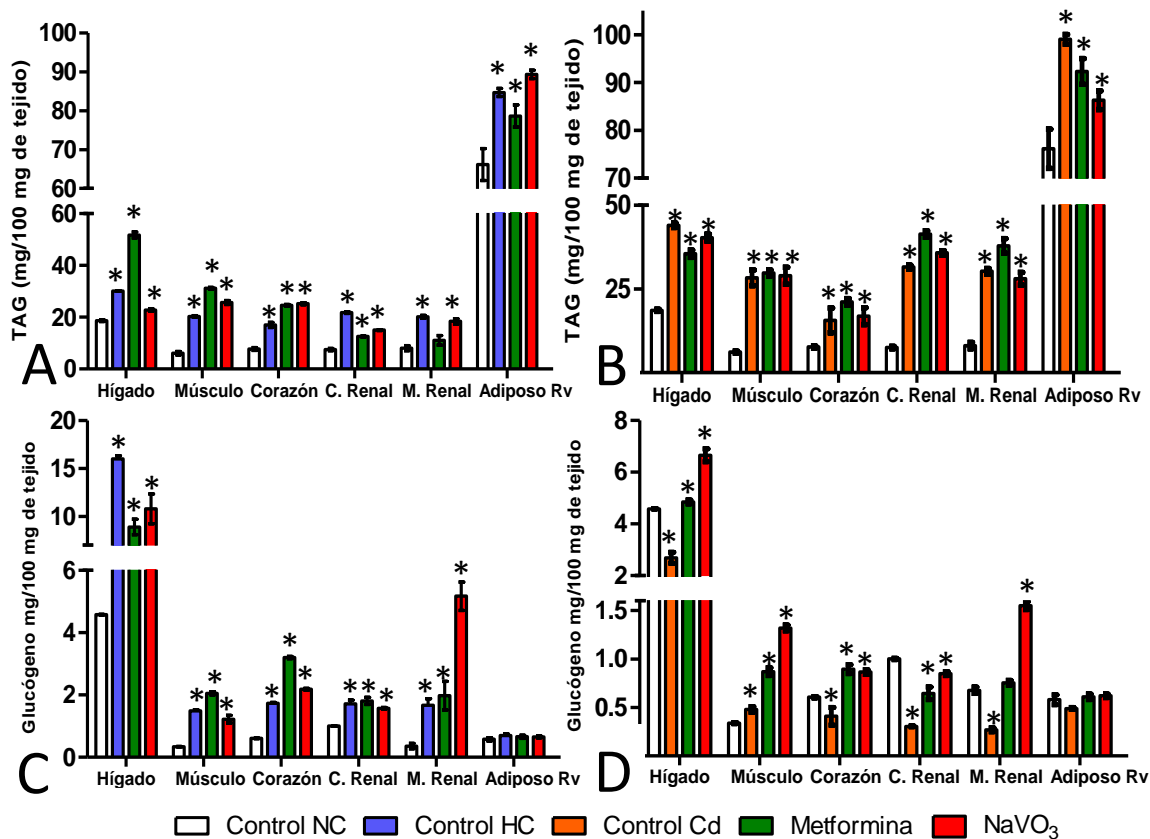


Figura 12 - Concentración de TAG y Glucógeno en diferentes tejidos a 2 meses de tratamientos. A) Concentración de TAG, grupo dieta HC. B) Concentración de TAG, grupo exposición a Cd C) Concentración de glucógeno, grupo dieta HC D) Concentración de Glucógeno, grupo exposición a Cd. Los resultados mostrados son el promedio de 5 experimentos ± EEM. (*) Indica diferencia significativa con respecto al grupo control de cada uno de los modelos de SM con una $P \leq 0.05$ por una t de Student.

Para concluir el análisis de las acciones farmacológicas de ambos tratamientos ante los modelos de desregulación se muestran los niveles de TAG y glucógeno en los diferentes tejidos analizados en la figura 12. En el panel 12A se muestran las concentraciones de TAG en los tejidos de estudio ante el consumo de la dieta hiper calórica observándose incrementos del 61, 229, 121, 189, 149 y 50% en el grupo HC comparado con el grupo NC en hígado, músculo, corazón, corteza, medula renal y adiposo respectivamente pudiéndose notar una continua desregulación metabólica y el aumento en el resguardo de TAG a 5 meses de consumo de la dieta. En lo que respecta al grupo administrado con Metformina por 8 semanas de tratamiento mostrando un efecto dual en el resguardo de TAG, ya que ante una administración crónica en hígado, músculo y corazón fomenta el

incremento del lípido 177, 406, 220%, inversamente a lo observado en el primer mes de la administración efecto adverso observado al primer mes de tratamiento. Por otro lado, en medula y corteza renal, así como en tejido adiposo exhibió una disminución importante respecto al grupo HC, aunque no alcanzó valores similares a los del grupo NC, manteniendo incrementos del 67, 36 y 37% respectivamente. Por su parte el grupo HC - NaVO₃ mostró una notable regulación del resguardo de TAG en tejido hepático, donde solo se presentan diferencias del 22% respecto al grupo NC. Mientras que se observó un incremento en el resguardo de TAG en músculo, corazón, medula y corteza renal del 316, 228, 100 y 127% respectivamente contra el grupo NC. Tanto la administración con Metformina como con vanadio fomentó la redistribución del contenido lipídico a su tejido de resguardo natural, siendo el que observa mayor resguardo, el tratamiento con el biometal.

En el modelo de desregulación por la exposición a cadmio mostró alteraciones en el resguardo de TAG (Figura 12B), en el cual el segundo mes de exposición presentó las siguientes condiciones en el grupo crónicamente expuesto a 65.5 mg/L de CdCl₂ en el agua de consumo, 136% más lípidos en hígado, 360% en músculo, 103% en corazón, en riñón 320 y 275%, respetivamente en corteza y médula renal y 36% en tejido adiposo. El grupo administrado con Metformina mostró una ligera reducción del lípido en el tejido hepático respecto al grupo administrado con Cd, sin embargo no recuperó favorablemente en respecto al grupo sin exposición, permaneciendo incrementado significativamente en un 90%. Sin embargo, en los otros tejidos fomentó el resguardo en músculo 385%, en corazón 175.5%, en corteza renal 451%, mientras que en médula incrementó 369%, y el tejido adiposo del 36% pasó a un 61.6%. El grupo NaVO₃ ante la administración por 60 días presentó estatus esteatótico en todos los tejidos evaluados en el orden presentado, 116, 370, 120, 376, 247 y 44%, respectivamente hígado, músculo, corazón, corazón y médula renal, además de tejido adiposo.

La figura 12C muestra el efecto de ambos tratamientos durante el consumo de la dieta hiper calórica hacia la regulación de glucógeno en los tejidos de estudio pudiéndose observar incrementos del grupo HC con respecto al grupo NC de 249, 339, 186, 71 y 369% en hígado, músculo, corazón, corteza y medula renal. El tejido adiposo no muestra cambios significativos. Estos incrementos mantuvieron conservados y continuamente aumentados hasta el final de la exposición a la dieta. Por otra parte el grupo HC – Metf mostró una disminución con respecto al grupo HC, efecto que evidencia la profunda desregulación entre la glucogénesis y gluconeogénesis. Sin embargo, promovió el resguardo de la molécula en músculo y corazón en concentraciones por encima incluso del grupo HC, con incrementos del 339 y del 186% respectivamente comparado con el grupo NC. Tanto la corteza como la medula renal no muestran cambios significativos respecto al grupo HC, pero respecto al grupo NC presentaron 81 y 455% incrementado la acumulación. En lo que respecta el grupo HC – NaVO₃ presentó un comportamiento similar al grupo tratado con Metformina en cuanto a la regulación de la concentración de glucógeno hepático incrementando la concentración del glúcido en un 135%; mientras que en músculo y corazón disminuyó su concentración comparada con el grupo HC, mientras que respecto al grupo NC presentó niveles incrementados en un 261 y 118%. Mientras que el riñón observó el efecto dual en el resguardo del glúcido ante el tratamiento con vanadio, mientras la corteza apenas presentó un 57% más que el control NC, disminuyendo de forma sustancial respecto al grupo HC, la medula renal incrementó el resguardo de glucógeno en 1349% respecto al grupo NC. El tejido adiposo no mostró cambios significativos durante los diferentes tratamientos. Por lo que podemos decir que el vanadio, mostró efectos reguladores del imbalance metabólico por la dieta HC, de forma eficiente si lo observamos desde el punto de vista sérico, y al cercar el entorno celular de los tejidos que participan en la homeostasis, la eficiencia no es la esperada, sin embargo es mejor que la mostrada por Metformina.

Por otra parte los resultados de la intoxicación crónica con Cd, así como sus tratamientos se muestran en la Figura 12D. Mostrando que el grupo Cd, sigue manteniendo la disminución de esta molécula en tejidos de manera significativa

respecto al grupo NC, en tejidos como hígado, músculo, corazón, corteza y medula renal, además de tejido adiposo del 41, 32, 69, 60 y 15.5% respectivamente, mientras que el tejido muscular incrementó el contenido de glucógeno significativamente en un 42%. Al segundo mes de tratamiento el grupo Cd – Metf, no muestra diferencias significativas en el almacenamiento de glucógeno en tejido hepático, medula renal ni tejido adiposo, pero si incrementos del 289 y 42% en músculo y corazón respecto al grupo NC, mientras que corteza renal disminuyó 36% respecto al grupo de control. El tratamiento con NaVO_3 mostro una regulación de glucógeno tisular hacia el incremento en hígado, músculo, corazón y médula renal de un 45, 289, 42 y 129 respectivamente, mientras que la corteza renal disminuyó un 15% y el tejido adiposo permaneció sin cambios. Los resultados confirman que el vanadio ante la presencia de cadmio, puede parar los efectos esteatóticos, fomentando el resguardo glucogénico, por lo que su regulación en estas condiciones es limitada por el efecto del xenobiótico. Mientras que Metformina fomenta ambos estados de resguardo.

Discusión de Resultados.

Inducción de SM por los dos modelos de desregulación; Ingesta de una dieta hiper – calórica e Intoxicación crónica con CdCl₂

Las desregulaciones metabólicas se han caracterizado por la asociación de diferentes parámetros específicos como son: antropométricos y bioquímicos, citados por diversas organizaciones como a la ATPIII. Los cuales se les ha caracterizado por la influencia de diferentes factores ambientales que influyen en el trascurso temporal de la aparición de dichas patologías, Como son el consumo de dietas hipercálóricas e intoxicaciones con CdCl₂. [Fermin., et al 2006; Anca et al., 2000; Treviño et al., 2009, 2011] Por un lado, se ha reconocido que la alteración en las condiciones zoométricas de los modelos animales para su estudio es parte importante del desarrollo de un fenotipo similar al síndrome metabólico, dentro de las que se destacan el peso, el índice de masa corporal (IMC), perímetro de abdomen en animales (acumulación grasa central), y el porcentaje de grasa corporal, como los más citados [Paredes et al., 2009; Lifshitz et al., 2012; Dirks and Leeuwenburgh, 2006].

Nuestros resultados muestran incremento del peso de los grupos expuestos al consumo de dieta hipercalórica durante 3 meses, resultados que coinciden con lo reportado por otros autores siempre en asociación a incremento lipídico derivado por el consumo alto en grasas o carbohidratos [Fermin et al., 2006; Michael et al., 1985]. El mismo efecto fue mostrado ante la exposición de CdCl₂ en agua de consumo, presentando este incremento en mayor proporción que al mostrado por el consumo de la dieta. Esta característica solo es observada en intoxicaciones crónicas con el metal que presentan del mismo modo que la dieta dislipidemia, ya que dicho parámetro diferentes autores en protocolos de intoxicaciones agudas mencionan un descenso importante [Ethel et al., 2008; Milton et al., 2013].

La ganancia de peso es un parámetro importante en el desarrollo de sobrepeso y obesidad, ambos relacionados íntimamente con el desarrollo de obesidad central, en el caso de los modelos murinos esta característica es medida por el incremento

en el perímetro de abdomen; Dicha correlación fue observada en ambos modelos, en los animales expuestos a la dieta hipercalórica, dicho efecto es atribuible a la respuesta natural al incremento en el consumo de carbohidratos presentes en la dieta, los cuales son controlados por secreciones de insulina, estimulando su absorción a diferentes tejidos, jugando un rol preponderante el tejido hepático y adiposo, en este último se ha reportado que diferentes rutas metabólicas incrementan el resguardo de triglicéridos, además de que la hormona promueve adipogénesis, diferenciación y proliferación [Vickers et al., 2000, 2001, 2002]; mientras que en el caso de la intoxicación con Cd, estos efectos son observados probablemente por el incremento de la lipogénesis hepática ante el desvío, desregulación o inhibición de vías metabólicas relacionadas con la biosíntesis de dichas macromoléculas, por lo que es observable un continuo transporte de TAG hacia tejido adiposo central [Kawakami et al., 2010].

Otro parámetro de suma importancia siempre asociado con un mayor riesgo de desarrollo DM2 y SM es el IMC (índice de masa corporal), el cual deriva de la relación entre el peso respecto de la talla de un individuo, nuestros resultados mostraron incremento de este parámetro en ambos modelos de desregulación. El incremento en el IMC no solo pueden deberse a la acumulación lipídica en tejido adiposo sino también al incremento de masa muscular proteica, por lo que se investigó la dependencia del mismo mediante el porcentaje de grasa o índice de Lee (específico y validado en modelos murinos). Los resultados para ambos grupos mostraron dependencia directa del IMC en correlación con el resguardo en tejido adiposo aumentando el índice de Lee en los grupos de experimentación, siendo siempre en mayor porcentaje el aumento de estos parámetros el grupo intoxicado con Cd respecto el grupo con la dieta hipercalórica [Johan et al., 2011; Lifshitz et al., 2012]. En conjunto, los resultados zoométricos sugieren desbalance en resguardo energético probablemente lipídico en los grupos de exposición lográndose alterar su conducta metabólica y en consecuencia sus características corporales.

Dentro de las condiciones bioquímicas las cuales son parte de la caracterización de la patofisiología del SM, es bien conocida la dependencia de las respuestas neuroendócrinas en el metabolismo celular, en cuyo caso al presentar alteraciones en sus vías de señalización impactan sobre la homeostasis de macromoléculas como glucosa y lípidos a nivel sérico, y viceversa. Por lo que, los paneles de expertos contemplan dichas alteraciones de algunas macromoléculas plasmáticas involucradas en el balance y distribución energético en el organismo; tal es el caso de lípidos totales (LT), triglicéridos (TAG), ácidos grasos libre (AGL) colesterol total (CT), así como de sus fracciones de lipoproteínas transportadoras, glucosa y lactato; las cuales en conjunto llevan al diagnóstico preciso de fenotipos bioquímicos como el SM .[ATPIII, OMS, FDI, AHA]

En este sentido, en ambos modelos de desregulación metabólica, presentaron fenotipos bioquímicos característicos del síndrome metabólico con incremento plasmático en los mesurandos LT, AGL TAG y CT, evidenciando dislipidemias y definiéndose la severidad de las mismas por incremento de las fracciones LDL y VLDL-col con disminución de la fracción HDL-col. Así como alteración en la glucosa basal; a pesar que ambos modelos presentaron los fenotipos de SM, la mayor alteración de los componentes plasmáticos fue observada en la intoxicación con el metal. Por lo que los resultados mostrados son consistentes con lo reportado tanto para el consumo de dietas hipercalóricas [Jan et al., 2013; Anca et al., 2000], como para la intoxicación con Cd en el cual se ha descrito la presencia de dislipidemias, y desarrollo de DM2, [Gümüslü et al., 1996; Ethel et al., 2008; Milton et al., 2013; Olisekodiaka et al., 2013]. Los cuales relacionan la interferencia del metal con el funcionamiento de enzimas clave en las rutas metabólicas en la producción y el resguardo de lípidos.

En los modelos con fenotipo bioquímico de síndrome metabólico se han descrito dos alteraciones esenciales: la disminución en la captación de glucosa e incremento en la absorción y metabolismo de AGL en el músculo, además de la pérdida en la supresión para la liberación de AGL y glicerol desde los adipocitos [Lelliot and Vidal Puig, 2004; Olefsky, 1976; Molina et al., 1989; Carnie et al.,

1979]. El aumento de AGL en suero conlleva al hígado a sintetizar mayor cantidad de triglicéridos, evento coadyuvado por la mayor cantidad de glúcidos de consumo, por lo que más fracciones de VLDL son vertidas al plasma; algunas sub fracciones de VLDL tardan mayor tiempo en ser eliminadas de plasma lo que fomenta el incremento de la fracción LDL y disminución hepática de la producción de HDL, [Guerín et al 1996]. La lipogénesis y la oxidación de los AGL son procesos con una alta integración y se consideran señales permisibles que ante un aumento de las grasas, también se eleve fisiológicamente la actividad de la maquinaria oxidativa, por lo que los AGL intervienen en el fenómeno de insulinoresistencia tanto a nivel muscular como hepático, lo que conlleva a una menor absorción de glucosa y también a alteración en la biosíntesis de glucógeno, así como inhibición en la supresión de la glucogenólisis, lo cual afecta la tolerancia a la glucosa [Boden, 2003].

Por esta razón la necesidad de realizar una prueba de tolerancia a glucosa (TOG), donde se puede evidenciar el comportamiento del manejo del carbohidrato en el consumo (post-prandio). Los grupos expuestos a ambos modelos de regulación presentan alteración combinada de glucosa en ayuno alterada y post-carga evidenciando una intolerancia al manejo de glucosa; ambas alteraciones se han descrito como estados pre-diabéticos, caracterizados por insulino resistencia. [DeFronzo, 2004].

Para el caso del grupo alimentado con la dieta hipér-calórica, se ha descrito que una de las primeras causas de insulino resistencia es el exceso en el aporte calórico, esta se deriva de la sobre compensación pancreática que censa niveles incrementados del carbohidrato circulante y compensa con hiperinsulinémias, que repercuten en la dinámica muscular, el cual en el feedback de respuesta causa desregulación en hígado [DeFronzo, 2004]. En el caso del grupo expuesto al consumo de $CdCl_2$ se ha descrito el disturbio en la homeostasis de glucosa ocasionada por la desregulación en la producción de las concentraciones de insulina o una producción disfuncional de dicha hormona. Tanto la desregulación lipídica genera resistencia a insulina, como la resistencia a insulina genera

alteración lipídica, por lo que se convierte en un circuito redundante y progresivo que manifiesta tanto alteraciones séricas como tisulares (Shanik et al., 2008).

Una gran parte de la preocupación por el vínculo entre la disfunción adipocitaria y el SM se refiere a que existe evidencia de que las grasas se sitúan en órganos y tejidos no preparados para su depósito, en lugar de hacerlo en su sitio natural: el tejido adiposo. Esos depósitos grasos se ubican en órganos magros como los músculos esqueléticos, el miocardio, los vasos sanguíneos, el hígado, el riñón y el páncreas. Así, por ejemplo se ha descrito que se encuentra aumentado el contenido de triglicéridos dentro del músculo esquelético de obesos y diabéticos, constituyendo un fortísimo predictor de insulina resistencia [Kelley and Goodpaster, 2001].

Por ello se analizó el resguardo ectópico de triglicéridos y su el impacto sobre la regulación en el balance glucogénico. En condiciones metabólicamente sanas debe existir una fina regulación entre el balance lipídico y de carbohidratos, se ha observado que el incremento plasmático de cualquiera de ellos repercute recíprocamente en el otro. En este sentido, el manejo, distribución y resguardo de triglicéridos exógenos o endógenos es llevado hacia tejido adiposo y mínimamente a tejido no adiposo, como miocardio, hígado y páncreas. [Danno H et al., 1992] Al presenciar la desregulación en el manejo plasmático de ambos componentes (triglicéridos y glucosa) en los animales de experimentación, fue sugerente de modificaciones metabólicas en rutas energéticas o de resguardo en tejidos dependientes o independientes de la acción de la hormona, tanto en tejidos especializados para ello, como en tejidos que no lo fuesen, músculo, corazón, riñón e hígado, estos dos últimos si presentan cierto manejo y resguardo.

Los resultados mostraron evidencia del acúmulo de TAG de resguardo en todos los órganos de estudio en ambos modelos de desregulación; el modelo del consumo de $CdCl_2$ lo presentó con mayor severidad, esta evidencia permiten establecer la presencia de esteatosis en diversos tejidos periféricos, siendo el tejido de mayor alteración el músculo, seguido del corazón y riñón, lo cual puede

traer consecuencias graves de función multiorgánica. La esteatosis conlleva a lipotoxicosis por lo que se afecta rutas de obtención energética naturales como la del glucógeno, principal fuente de resguardo de glucosa en diferentes de tejidos. Por otro lado, también se ha descrito que durante el SM y DM2 se deteriora el metabolismo hepático de glucosa y se ha relacionado fuertemente con resistencia a insulina [Mitrakou et al., 1992; Rossetti et al., 1993]. Por lo que también se investigó las condiciones glucogénicas en los tejidos antes mencionados.

El contenido de glucógeno ante el consumo de la dieta hipercalórica mostró incrementos y por lo tanto se pudo evidenciar resguardo de esta molécula, este grupo mostró desregulación en el carbohidrato circulante y ácidos grasos libres, complicaciones en el resguardo tanto de lípidos como de glúcidos, mostrándose incrementos significativos de glucógeno a consecuencia del incremento de la vía glucogénica y probablemente gluconeogénica. Por su parte el grupo expuesto a Cd mostro el efecto contrario, en donde los niveles de glucógeno se ven disminuidos respecto al grupo control. Este efecto sugiere que el efecto del metal está involucrado en el desvío de las rutas metabólicas, probablemente como consecuencia de la modificación o inhibición de enzimas clave en la ruta glucogenogénicas, así como de las lipogénicas, lo cual se empata con lo mostrado en los estudios de Merali y Shingal en 1980, donde encuentran decrementos en los niveles de glucógeno de hepático ante la exposición crónica a Cd, lo que conlleva al incremento de la concentración de glucosa en sangre y aumentando el potencial de la gluconeogénesis de tejido hepático, esto debido al aumento en la concentración de AMPc, el cual juega un papel importante en el control del metabolismo de hidratos de carbono, promueve rutas metabólicas por las cuales se eleva la glicemia, así como potencia las rutas gluconeogénicas y glucogenolíticas en hígado.

En resumen, la ingesta elevada de glucosa en la dieta, así como la intoxicación con CdCl₂ en consumo de agua, presentan estados progresivos con alteración en la tolerancia a glucosa (observada en las curvas de respuesta al carbohidrato), asociadas a dislipidemias en los individuos lo cual es reconocido como síndrome

metabólico. Particularmente, estas alteraciones indican que en los individuos existen defectos en el resguardo que se vinculan a estatus de glucotoxicidad y lipotoxicidad especialmente en hígado y músculo, aunque otros tejidos también se hallan involucrados [DeFronzo, 2004].

Tanto las teorías de la glucotoxicidad y lipotoxicidad han sido soportadas bajo la observación que existen mejoras en el control lipo-glicémico ante la administración de hipoglucemiantes [Vague and Moulin, 1982; Kosaka et al., 1980]. La Metformina una de las biguanidinas con potencial antidiabético más utilizadas en el mundo, aunque alternativas son biometales se han ido implementando ya que la posología es menor, como lo han demostrado los compuestos con base vanadio, los cuales también han mostrado su eficacia en el control metabólico [Sakurai et al., 2008; Chatkon et al., 2014]. Por lo que una vez obtenidos y caracterizados los modelo de desregulación metabólica por medio del consumo de la dieta HC y la intoxicación crónica con Cd, se procedió a conformar los grupos de trabajo considerando este el tiempo cero administración y a los cuales se procedió a aplicar las condiciones de tratamientos descritos en la sección de metodología, y a los cuales se monitoreó de la misma manera que en el apartado de desregulación a los tiempo de corte de 1 y 2 meses.

modelo de la dieta HC, en la intoxicación crónica por Cd la acción farmacológica de la Metformina fue menos eficaz, y por ende la actividad del metavanadato de sodio.

La reducción mejora en la zoometría corporal se encuentra fuertemente asociada a una mejora sistémica y metabólica. El consumo de Metformina está ampliamente relacionado con estas características de reducción de peso, talla, mejora del índice de masa corporal, y poco menos asociada con la mejora del tejido adiposo abdominal [Harborne et al., 2005; Srinivasan et al., 2006; Wilson et al., 2010; Ibáñez et al., 2008; Yanovski et al., 2011]. Mientras que las sales de vanadio siendo la más estudiada la sal (NaVO_3), presentan características insulinomiméticas, también han mostrado mejoras considerables en la zoometría o antropometría de los sujetos que las consumen, sin embargo poseen particularidades que no permiten un completo restablecimiento del sistema [Srivastava, 2000; Goldwaser et al., 2000]. Lee y Morley (1998), reportan que la asociación de pérdida de peso y disminución en el perímetro de abdomen ante la administración de Metformina se encuentran íntimamente relacionados con mecanismos asociados a la disminución del consumo alimenticio por mecanismos en los cuales se involucra la regulación de la saciedad.

Considerando la regulación en las características zoométrica, y tomando en cuenta que dicha regulación estuvo asociada a la pérdida de peso, y este a su vez a la pérdida de masa adipocitaria, la cual presenta un alto contenido de triglicéridos, se puede deducir que la pérdida del metabolito presenta un indicio de regulación en el balance energético. Por lo que se procedió al análisis sérico de los parámetros asociados con la desregulación metabólica de las primeras 4 semanas post-tratamientos. En donde Metformina mostró una mejora eficaz de las condiciones metabólicas del sistema reflejadas a nivel sérico ante el consumo de una dieta hipercalórica, esto es asociado a los efectos hipoglucemiantes y anti-lipémicos que posee el fármaco. Metformina, tiene como mecanismo de acción la reducción de síntesis de glucosa hepática, así como disminución en la lipogénesis, aumentando la beta oxidación así como la glucólisis en tejidos periféricos [Benoit

et al., 2012], Nuestros resultados concuerdan en la disminución de la glucosa en ayuno, así como en la disminución de lípidos séricos, los cuales mediante el mecanismo de acción del fármaco pueden ser oxidados a nivel mitocondrial, siendo esta la principal característica observada en el modelo de la dieta hipercalórica

Por otro lado, las condiciones de beta oxidación mitocondrial involucran la quema de ácidos grasos libres en regulación y producción de acetil-CoA que incrementa su flujo en el ciclo de Krebs y por lo tanto en la cadena respiratoria puede existir un incremento en el flujo de NADH y FADH [Nagle et al., 2009], esto trae como consecuencia que el piruvato obtenido de la ruta glicolítica y tomando en cuenta que esta ruta se encuentra sumamente favorecida tanto por la dieta hipercalórica como por el consumo de Metformina [Harborne et al., 2005], por lo que al saturarse las rutas de obtención energética, existe un desvío de la rutas metabólicas y el piruvato se puede biotransformar por acción del NADH a lactato, el cual es vertido a plasma incrementando sus niveles y al mismo tiempo ingresando a rutas novositéticas de triglicérido [Sondermeijer et al., 2013]. Como pudo observarse en los grupos expuestos al fármaco. Así mismo, se ha relacionado la sobre producción de lactato en condiciones tisulares de hipoxia y con la que Metformina se ha asociado controversialmente ya que los pacientes que la consumen reportan este hecho en menos del 1% de los casos [Salpeter et al., 2003; Mahmood et al., 2013].

Otro parámetro que se vio influenciado por el consumo del fármaco fueron los AGL, estas moléculas potencialmente energéticas provienen tanto de la dieta como del procesos metabólicos relacionados con la lipólisis de células adipocitarias, en las cuales este modelo permanecen sin cambios séricos, sin embargo, de acuerdo a los resultados zoométricos la actividad lipolítica fue la que condujo a la disminución de dichos parámetros. Por lo que los AGL aparentemente se encuentra ingresando a ciclos de beta oxidación y quema calórica, efecto relacionado con la actividad de leptina en relación a la señalética celular a nivel mitocondrial. Se ha asociado que uno de los efectos en el consumo de Metformina

es la regulación en la sensibilidad a leptina por la acción del fármaco y consecutivamente insulina, adiponectina y resistina, hormonas involucradas en el control, distribución, quema y resguardo lipídico a diferentes niveles [Kim et al., 2006]. La reducción de los niveles lipídicos trae como consecuencia la regulación hepática y sérica directa de las fracciones lipoproteicas transportadoras como se pudo observar en el grupo administrado con el fármaco, estos efectos han sido ampliamente reportados [Harborne et al., 2005; Srinivasan et al., 2006; Wilson et al., 2010; Ibáñez et al., 2008; Yanovski et al., 2011]

Por otro lado en la desregulación inducida por la intoxicación con CdCl_2 , la cual mostró complicaciones más severas que la inducida por la dieta HC, el efecto de la administración con Metformina presentó una recuperación porcentualmente menor a la de su grupo de comparación con SM por dieta, sin embargo este comportamiento lo podemos atribuir a que estos animales presentaban complicaciones de mayor severidad por lo que el tiempo de recuperación en las condiciones energéticas y homeostáticas presumiblemente se pueden hallar prolongadas. Sin embargo, confirmó que el fármaco como control positivo de la regulación metabólica es eficiente, ya que disminuye las concentraciones de lípidos y glucosa hasta valores casi normales correspondientes a su grupo NC. Por otro lado, se debe considerar que la intoxicación crónica con Cd presenta disturbios metabólicos ya que altera fundamentalmente estructuras, funciones y rutas metabólicas celulares, inhibiendo la acción de diferentes enzimas de las vías de homeostasis de lípidos y glucosa, además de incrementar sobremanera la cantidad de pro-oxidantes y especies reactivas de oxígeno, y mantener ocupado el sistema antioxidante [Prabu et al., 2013], por lo que la Metformina también reduciría los sitios blanco en donde podría actuar el xenobiótico.

En cuanto a la actividad del vanadato, los animales del grupo HC - NaVO_3 presento un efecto similar en la mejora de estos parámetros bioquímicos comparado con el efecto de Metformina, por lo que probablemente presenten acciones celulares sobre blancos específicos similares. En este sentido y a diferencia de metformina, Vanadio inhibe el complejo III mitocondrial, En este se

llevan a cabo acciones finas sobre la oxidación y obtención energética, pero no interfiere en la oxidación del NADH o FADH, sino en la ocupación de electrones donados a los dioxígenos que son los aceptores finales, por lo que su mecanismo de acción a diferencia de la Metformina que impide la máxima obtención energética ya que NADH no puede ser oxidado, y por lo tanto las células se encuentran requirientes energéticamente y con esto aceleran la quema de componentes metabólicamente activos, Vanadio regula a los precursores de la formación de superóxidos por los citocromos, permitiendo un paso lento en la oxidación mitocondrial, pero más seguro hablando celularmente, siempre que se mantengan dosis bajas de consumo, ya que al incrementarlas presenta acciones contrarias incrementando el daño celular [Hossein et al., 2013].

Por lo que el tratamiento con vanadio al primer mes de administración no mostró los efectos esperados respecto a la administración de Metformina, sin embargo es destacable que impacta sobre la zoometría de los animales expuestos a Cd y por lo tanto se debe considerar las consecuencias metabólicas favorables. En contexto, el Cd puede desestabilizar a un sistema biológico por varias vías dependientes del tiempo de exposición y de la cantidad del xenobiótico acumulado, por lo que es bien reconocido que a diferentes niveles es un inductor de estrés oxidante, se ha establecido que puede depletar al sistema enzimático por cambios conformacionales de las proteínas o por sustitución de los cofactores metálicos que poseen [Latinwo et al., 2006]. Las enzimas involucradas en la detoxificación de radicales libres se encuentran en diferentes organelos sub-celulares, sin embargo la reducción de oxigénica sucede en la mitocondria, lo cual genera especies reactivas de oxígeno como ion superóxido y peróxido de hidrógeno (este último es únicamente un precursor), la acumulación de estos agentes en la mitocondria lleva a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, por inhibición de la transferencia electrónica [Wang et al., 2004]. En este sentido, el vanadio contenido en las especies vanadato puede interactuar en los complejos mitocondriales I y II, pero sobre todo con el complejo III, también conocido como citocromo c, el cual presenta tres componentes principales polipéptidos, protoporfirina y fierro, este último ligado al grupo hémico por cuatro

enlaces mientras que el quinto y sexto enlace que presenta el hierro se halla asociado a residuos de histidinas de los polipéptidos citocromales, y por lo tanto se puede establecer como ligando del oxígeno [Davison et al., 1994]. En este sentido el vanadio ha mostrado que acelera la reactividad de la torre molecular del ferrocitocromo hacia el oxígeno inhibiendo la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), aunque también presenta grados de inhibición en los complejos I y II [Shi et al., 2011], por lo que con esto en pequeñas cantidades disminuye la producción de ROS, generando un ambiente celular regulado en los proceso redox, sin necesidad de la actividad de la batería enzimática, por lo que en este sentido, la acción reguladora del metabolismo es más lenta como se pudo observar en el modelo de SM por consumo de Cd.

La inhibición de los complejos mitocondriales, mostrados por los efectos tanto de Metformina como de los complejos a base de vanadio han sido descrito ampliamente; en el caso de Metformina, la privación de obtención energética mitocondrial trae como consecuencia el incremento en la formación de AMPK estimula a diferentes tejidos a captar de mejor manera a la glucosa como es el caso de músculo (sin afectar directamente el número de transportadores [Goldwaser et al., 2000]) e hígado [Bailey, 1992; Hundal et al., 1992; Zhou et al., 2001], por lo que en ambos modelos se observó al primer mes de tratamiento mejoras en el manejo del carbohidrato y por lo tanto en la tolerancia del mismo al ser retada con una carga de glucosa, en los animales tratados con el fármaco tanto en el modelo de exposición a la dieta como a Cd. Los mecanismos relacionados con este comportamiento que se han descrito son la inhibición de gluconeogénesis hepática [Owen et al., 2000], y el estímulo de la recaptura de glucosa en músculo con dos vías predominantes en dicha acción como lo son glucólisis y glucogénesis, en esta última la dieta per se induce la acumulación de glucógeno muscular, sin en cambio la exposición a Cd inhibe dicha formación y al administrar el fármaco se presenta una recuperación importante de la vía [Musí, 2006]. En cuanto a la primera vía de estimulación glucolítica, y la inhibición del complejo I mitocondrial tanto por la Metformina como por lo descrito para vanadio, el ambiente celular provee un exceso en la concentración de NADH, y

secundariamente del piruvato, ya que este es reducido a lactato por medio de la enzima lactato deshidrogenasa favorecida por el incremento de NADH propiciado por la inhibición del complejo I mitocondrial, como se pudo observar en el modelo de SM por dieta HC; de forma interesante se ha descrito que el Cd puede interactuar tanto con el complejo I como con el complejo III, por lo que la formación de lactato se pudo observar como una ruta asociativa de las acciones de la intoxicación propia del xenobiótico [Belyaeva et al., 2012].

Al observarse inhibidas rutas de adquisición energética, tanto por la dieta como por la exposición a Cd, otras rutas de obtención de ATP son fomentadas, por ejemplo, la beta oxidación, esta ruta accesoria se halla en tejidos musculares como hepáticos, siendo uno de los más regulados en este último. En este caso se presenta formación de graso acil-CoA, la cual es rápidamente convertida a acil carnitina la cual entra en la ruta oxidativa a nivel mitocondrial, siendo metabolizadas por deshidrogenasas que son relativamente específicas dependiendo del tamaño de cadena y que finalmente tienen como producto la formación de acetil-CoA el cual entra a la ruta de los ácidos tricarbóxicos para su completa oxidación formando NADH y FADH que entran a la cadena respiratoria [Nagle et al., 2009]. Como se ha podido observar en el la caracterización sérica, tanto la exposición a la dieta HC como al Cd, provocaron desregularización lipídica, sin embargo al administrar Metformina, se pudo observar quema de grasa tanto por las condiciones zoométricas como por la cuantificación de lípidos, ya que los niveles de TAG disminuyeron considerablemente, lo cual está en relación a la oxidación mitocondrial de los mismos [Mahmood et al., 2013]. Mientras que en el SM por dieta la acción de Metformina mostró una regulación a la baja en la concentración de esta biomolécula, en el grupo de SM por Cd no fue así, de hecho el incremento del marcador biológico de SM fue acentuado, hecho que se encuentra en relación a los efectos mitocondriales que mantiene el xenobiótico, el sustento de este hecho está en relación a la saturación de la ruta del ciclo de Krebs, ya que el exceso de formación de acetil-CoA, lleva al desvío de la ruta en el punto del citrato que al incrementarse sirve como sustrato de la acetil-CoA carboxilasa fomentando la rutas de síntesis de ácido grasos libres y por lo tanto de

la formación de TAG y su empaquetamiento en VLDL, tal y como se pudo observar en dicho modelo [Gibbons et al., 2004; Coleman and Lee, 2004]. Así mismo, efectos similares en los animales administrados con vanadio fueron observados, por lo que la correlación en las vías de ocupación de Metformina parece ser similares a las que ocupa el biometal.

Hasta este punto se puede mencionar dadas las características zoométricas, séricas y de respuesta a la tolerancia oral de la glucosa de ambos modelos de desregulación, y que nuestros datos sugieren que el tratamiento con NaVO_3 puede tener efecto directo sobre los tejidos de manejo y resguardo energético, el conocer la concentración de glucógeno y de triglicéridos (esteatosis) en ambos modelos de SM, podría esclarecer el modo de acción de ambos tratamientos, ya que se ha observado que los mecanismos funcionales de complejos a base de vanadio han demostrado la mejora y estimulación de la captación de glucosa en tejidos periféricos así como la inhibición de la lipólisis y la gluconeogénesis [Hiromura et al., 2007], lo cual es sugerente que el vanadio ocupa rutas similares a las de Metformina para lograr este control, y por las cuales se le atribuye características insulino-cooperadoras o insulino-miméticas.

Se ha descrito que ante un aumento en la concentración de glucosa sérica existe incremento importante en los depósitos de glucógeno, mientras que ante el resguardo incrementado la oxidación de los carbohidratos es insuficiente, por lo que dicho exceso se convierte a grasa, es decir, existe lipogénesis de novo [Acheson K et al., 1988; Essén-Gustavsson and Tesch, 1990]. Dada la conversión de glucosa a TAG, se investigó la probable acumulación en los diferentes tejidos. Al primer mes de tratamiento con Metformina nuestros resultados muestran tendencia hacia la disminución en el resguardo de TAG en la mayoría de los tejidos no propios para ello, por lo que se limitan las condiciones esteatóticas, sin embargo, a este punto cohorte el fármaco no logró a las mismas concentraciones que el control negativo normocalórico.

En ambos modelos de desregulación se presenta esta característica ante la administración de Metformina, sin embargo, muestran disminución con respecto a

los grupos HC y Cd, estos efectos podrían ser resultado de la quema lipídica por beta oxidación mitocondrial antes descrita primordialmente en músculo e hígado, así como del incremento de glucolisis, inhibiendo el paso de lipogénesis hepática, lipolisis con incremento circulante de AGL por tejido adiposo, condiciones observadas en ambos modelos de SM; en este sentido, algunos autores han puesto de manifiesto la regulación positiva hacia la activación del receptor de activadores proliferantes de peroxisomas tipo alpha, PPAR α (por sus siglas en inglés de peroxisome proliferator-activated receptors) [Jalving et al., 2010; Hutchinson et al., 2008; Barnea et al., 2012; Benoit et al., 2012]. Observándose una movilización de TAG hacia tejido adiposo, evento favorable, ya que el tejido adiposo es el órgano por excelencia de resguardo de esta molécula.

Por su parte la administración de NaVO₃ no presenta una respuesta adecuada “aparentemente” respecto al nivel mostrado por el fármaco, ya que las condiciones tisulares no tienen diferencia respecto a los grupos positivos en el modelo de desregulación por la intoxicación crónica con Cd, sin embargo, la regulación en la zoometría indica que se está llevando a cabo la regulación de forma gradual, por lo que se vuelve preponderante realizar un análisis completo del sistema biológico y no resultados aislados. Así mismo, ante la inducción por el consumo de la dieta hiper-calórica el efecto de la sal de vanadio mostró tendencias hacia el incremento en el resguardo lipídico en músculo, riñón y en menor grado hígado, este comportamiento parecería adverso ya que los tejidos se mantienen esteatóticos, lo que puede conllevar a lipotoxicosis [Listenberger et al., 2003], la cual está íntimamente relacionado con el desarrollo de DM2. Estas evidencias son sugerentes de fenómenos de redistribución lipídica, los cuales están íntimamente relacionados a la beta oxidación que al primer mes de administración de vanadio, muestra ser más lenta que la observada por Metformina, lo cual propicia un “embotellamiento” del lípido y por lo tanto resguardo del mismo, por lo que la homeostasis lipídica a pesar de la dislipidemia, sugiere estar en coordinación con fenómenos de resguardo y producción energética; los resultados también muestran que esta redistribución se presenta en dirección a tejido adiposo que

aunque disminuyó en cantidad (evidenciado por la zoometría), presenta máxima saturación en el resguardo de TAG.

Así mismo y como ya se ha discutido, los excesos de glucosa sérica llevarán a un incremento en la formación de glucógeno, lo cual fue confirmado en el modelo SM con la dieta HC; el efecto bioquímico de Metformina evidenció decrementos en el depósito de esta molécula, confirmando que el principal motivo de control farmacológico se encuentra asociado a su oxidación. Mismo caso por lo encontrado en los efectos con el tratamiento con vanadio, sin embargo para este caso, la promoción de la glucogenólisis con oxidación lenta de la glucosa como resultado presenta condiciones de gluconeogénesis, lo que puede explicar los resultados de las glucosas basales incrementadas así como el comportamiento de los niveles de glucosa en el resto de la tolerancia oral a la glucosa.

En el modelo de SM por intoxicación con cadmio se encontró disminuida la concentración de glucógeno, resultado de la disminución de la glucogénesis y el aumento de la neo formación de glucosa tomando como base lo reportado por Merali & Singhal en 1980, y el incremento de AMPc incrementado según sus propios estudios; por lo que la acción de Metformina se centra en la reducción de las concentraciones de AMPc [Ida Pernicova & Márta Korbonits 2014] el cual tiene como efectos principales la regulación de las vías glucogénicas, llevándose a cabo la disminución de la producción de glucosa hepática, así como el aumento en la glucogénesis, resultando en el regreso de la concentración de glucógeno tisular. Datos que se pueden extrapolar a lo ocurrido en la TOG, donde la respuesta hepática ante el consumo de la carga de glucosa disminuye la glucosa basal para la formación de glucógeno, no así el resto de la curva en la TOG. Por su parte la administración de Vanadio en este modelo de SM propone un mecanismo similar al de metformina elevando los depósitos de glucógeno tisular lo cual también puede ser observado en la TOG. Se ha reportado que vanadio en combinación con la mejora en la actividad de insulina mejora la actividad de la glucógeno sintasa (GS), la cinasa de esta proteína (GSK) también mejora su actividad además de la proteín fosfatasa tipo 1 (PP1) en modelos diabéticos inducidos por

estreptozotocina, en donde dichos efectos se reportaron en músculo e hígado, por lo que se ha reportado que el vanadio presenta actividad glucoreguladora [Semiz., et al., 2002].

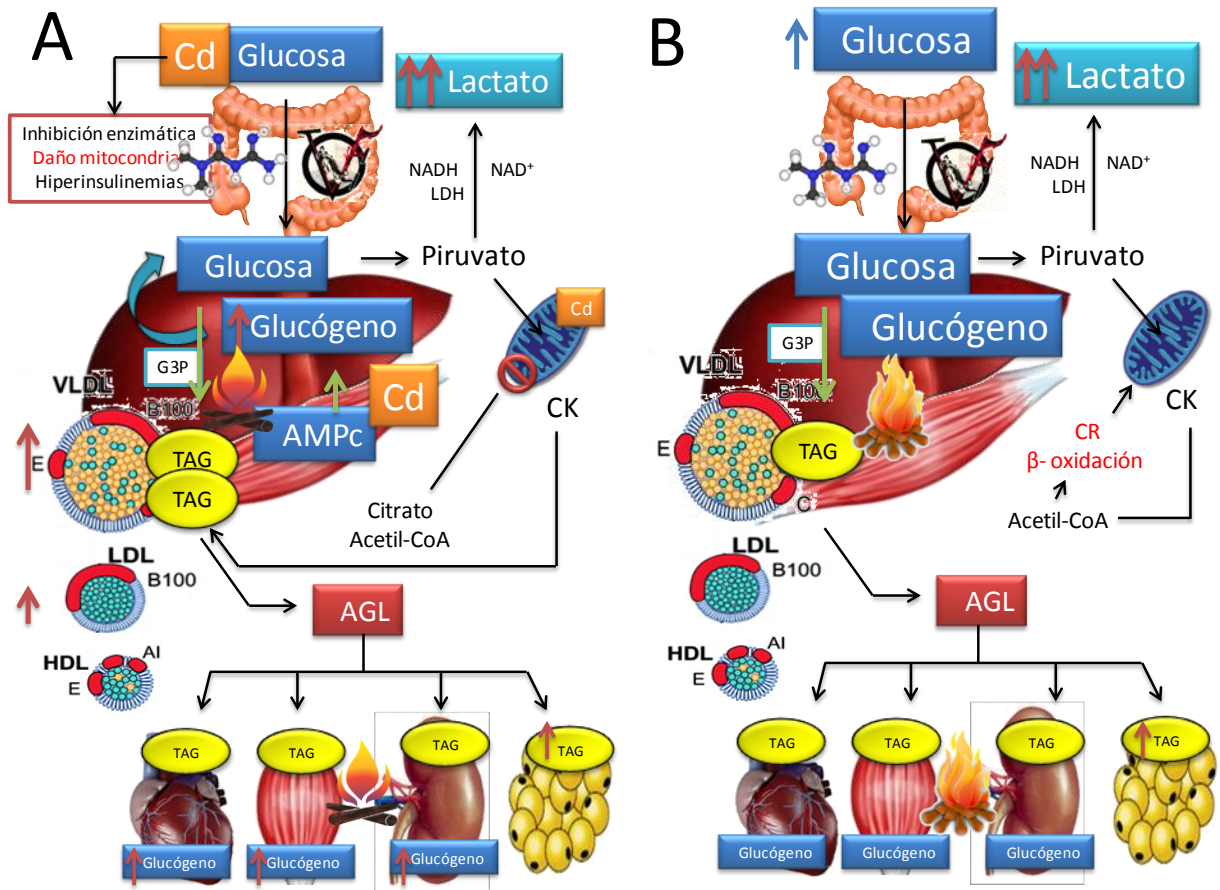


Figura 14 - Propuesta de la regulación metabólica de Metformina y Vanadio en Carbohidratos y lípidos en ambos modelos de inducción de SM. A) Tratamientos ante la Intoxicación crónica con CdCl₂ en agua de consumo con dieta normo-calórica, debido ambiente desfavorable celular y al daño mitocondrial promovido por Cd, el blanco farmacológico de ambos tratamientos se ve inhibido por lo tanto sus acciones regulatorias principalmente de lípidos. **B)** Tratamientos ante el Consumo de una dieta híper-calórica, ambos tratamientos son favorables para la regulación tanto de carbohidratos como de lípidos. Sin embargo en ambos modelos de SM, el tratamiento con Metformina fue mas rápido y agresivo hacia la oxidación de carbohidratos y lípidos al mostrado por vandio donde su acción fue mas lenta fina y favorable.

desregulación hacia el segundo mes.

Para la segunda mitad del seguimiento zoométrico (de la semana 4 – 8) de los modelos de desregulación metabólica se evidencio una consistente estabilización de los parámetros evaluados (peso, perímetro de abdomen, IMC y porcentaje de

grasa), y que en las primeras 4 semanas de administración ya mostraban recuperación, y en el caso de los animales administrados con Metformina, se pudo observar un mayor efecto farmacológico. Esto sugiere la hipótesis de que los tratamientos al segundo mes de administración mantienen dichos efectos y que probablemente estos permiten la estabilización de los modelos ahora en regulación, sin embargo no se debe descartar la idea que puede existir saturación farmacológica la cual lleve en consecuencia la disminución del efecto regulatorio. Ya que se ha puesto de manifiesto y evidenciado que el mecanismo de acción de Metformina así como del vanadio, se basan primordialmente en inhibición de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales, la cronicidad en la administración podría causar una disminución del número disponibles de mitocondrias, de la viabilidad o de una limitación biológica – bioquímica para llevar a cabo la regulación del sistema en cuanto a la oxidación lipídica.

La administración crónica con Metformina en modelos de desregulación metabólica es poco estudiada, sin embargo en años recientes se ha puesto de manifiesto que parte de mecanismo farmacológico a periodos largos de consumo del fármaco puede repercutir sobre incretinas endógenas, tal es el caso de la hormona péptido tipo glucagón 1 (GLP-1), la cual incrementa su concentración plasmática en presencia de monoterapia farmacológica, lo cual regularía consecuentemente a la hormona grelina un potente inductor orexigénico el resultado de dicha acción es limitar el apetito y con ello el consumo calórico, lo cual conllevaría a formar parte del mecanismo de acción en el mantenimiento del peso corporal, lo cual se ha observado tanto en modelos animales como en humanos [Thondam et al., 2012]. El incremento de GLP-1 en modelos animales se ha correlacionado con la plus-regulación del receptor del PPAR- α , lo cual está íntimamente ligado al incremento de la beta oxidación y el control lipídico [Maida et al., 2011]. GLP-1 también se ha vinculado localmente a nivel intestinal con señales neuroreguladoras a nivel hipotalámico, las cuales traen como consecuencia secreción insulínica [Holst and Deacon., 2005].

La regulación insulínica aunque no fue medida en este modelo, puede verse reflejada en la mejoría de la actividad bioquímica del sistema; claro ejemplo de ello está en la evidencia de lipólisis continua, observada por la regulación y estabilidad en las mediciones del perímetro de abdomen y porcentaje de grasa corporal, además a nivel circulatorio puede evidenciarse por la cuantificación de AGL en relación de la concentración TAG, los cuales se hallan en equilibrio a pesar del consumo continuo de la dieta HC, sugiriendo que la hidrólisis de triglicéridos y liberación de AGL por los adipocitos, presenta retorno hepático y síntesis de novo de TAG, así como redistribución a diferentes tejidos de ambos componentes (TAG y AGL) para continuar con la beta oxidación de los mismos, por lo que la activación de PPAR- α es indispensable para los sistemas hepáticos, musculares, cardíaco y renal, ya que la regulación mencionada hacia este componente molecular activa la expresión de genes involucrados en la recaptura de los AGL, además de las proteínas de transporte a peroxisomas para su posterior catabolismo por medio β -oxidación [Shulman et al., 2005; Yki, 2004]. Inicialmente este ambiente es ideal ya que en el puede observarse el regreso prácticamente al 100% a la tolerancia de la glucosa y el manejo de la misma, con incremento en el resguardo glucogénico, sin embargo en medio de este proceso, se pudo observar también la sobre saturación de la vía glucolítica, con incremento importante de lactato. En la cronicidad del tratamiento con Metformina, sin embargo, esto conlleva a depleción del sistema ya que en el contexto del continuo consumo hipercalórico los PPAR- α coordinan la maquinaria metabólica de resguardo lipídico descentralizado de los adipocitos [Ip et al., 2003, 2004]. Dichos efectos pudieron observarse precisamente en el modelo de SM por dieta HC, ya que el resguardo en hígado, músculo y corazón regresó a condiciones esteatóticas ya que su concentración fue más alta que la del mismo control positivo sin previo tratamiento.

El vanadio por su parte parece tomar causas diferentes para el control sistemático del metabolismo, siempre aunado a la mejora en la sensibilidad a insulina por lo que mantiene efectos similares y de acuerdo a ello se le ha propuesto como insulino-mimético [Shechter, 1990]. Respecto a la mejoría en la sensibilidad se ha

observado que uno de los efectos más contundentes es en músculo potenciando las acciones de la hormona sin presentar cambios en el número de transportadores [Brichard et al., 1992]. Así mismo, otro de los efectos en tejidos dependientes pero también independientes de la acción insulínica mostrados por el vanadio, es la inhibición de las protein fosfotirosin fosfatasas (PTPasa), la cual se encarga de la desfosforilización de los residuos tirosínicos del receptor de insulina, inicialmente el mecanismo de acción estaba enfocado al bloque de la enzima por parte del bioelemento actuando de manera independiente a la insulina, sin embargo, diferentes modelos de desregulación metabólica han mostrado el incremento de la enzima sin actividad de la misma sobre el receptor de insulina [Shechter, 1990]. En ese sentido, pero de manera inversa la protein tirosin cinasa encargada de la fosforilacion sobre el receptor de tirosinico de insulina es activada por vanadio [Goldwaser et al., 2000]. Por lo que podemos observar, tanto en músculo como en hígado presenta mejoría en el manejo metabólico de la glucosa datos respaldados por la mejora en la glucosa de ayuno, así como de la tolerancia a la misma en respuesta a la carga de 75g, aunque cabe mencionar que el punto 30 min es característico de la baja sensibilidad a la insulina.

Mientras que la glucosa en los grupos administrados con vanadio presentó con dosis muy por debajo a las administradas con Metformina (en total 96,000 veces menos en 60 días de tratamiento) una mejoría considerable, el impacto sobre los lípidos es completamente evidente no sólo por presentar valores similares a los animales del grupo normocalórico en cuestión de lípidos totales, triglicéridos y colesterol, sino incluso la fracción de HDL se encuentran por encima del valor del grupo de comparación, lo cual no sólo disminuye el riesgo de la complicaciones propias del SM, también disminuye dicho parámetro para el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas, diabetes mellitus tipo 2, alteraciones cardiovasculares, complicaciones aterogénicas [Brown et al., 1993; Ohta et al., 1993; Pascot et al., 2002; Despres et al., 2000]. Mientras este parámetro pudo observarse en mejoría, del mismo modo las fracciones VLDL y LDL también corrigieron de manera simultánea, por esta razón se observó abatimiento casi completo de la acumulación en hígado y riñón de triglicéridos respecto al grupo

tiempo cero y a un mes de tratamientos. La regulación de lípidos por parte del vanadio está en relación a la estimulación de hexosas en tejido adiposo, con posterior oxidación, fomentación de adipogénesis y translocación de factores reguladores de características proliferadoras y metabólicas como lo es el factor de crecimiento similar a insulina, influjos cálcicos y otros más en tejido adiposo y músculo [Shechter, 1990].

Por su parte, en los animales del modelo desregulación por la intoxicación con CdCl₂ y tratados Metformina, muestran una marcada disminución en la regulación de la oxidación de lípidos mostrados la que había sido eficiente durante el primer mes del tratamiento, a consecuencia de la exacerbada oxidación de carbohidratos. Al respecto, la caracterización metabólica de carbohidratos presenta continua regulación tanto en plasma como en tejidos con una recuperación incluso por encima del control no expuesto al metal, lo cual es indicativo de la mejora de las vías glucogénicas que ya se han discutido y del incremento en el estatus glicolítico, lo cual mejora también la respuesta prostprandio en el manejo del carbohidrato, sin embargo, a pesar de ya que desde el primer mes de administración en este modelo de SM existía un control glicémico progresivamente se pudo observar un incremento en la concentración de lactato, lo cual indica una sobre saturación del ciclo de Krebs [Veeravenkata and Ochs, 2013], y derivado de esto se puede dar incrementos en la concentración de intermediarios como citrato en mitocondria, el cual al combinarse con acetil-CoA en presencia de acetil coenzima A carboxilasa genera flujos de malonil-CoA, actividad de la sintasa de ácidos grasos y de la enzimas mono y diacilglicerol aciltransferasas y con ello se crea un ambiente novoformador de triglicéridos por lo que se ve favorecida la formación hepática de la fracción VLDL y desfavorecida la síntesis de HDL, además de que este tipo de microambientes hepáticos inhiben la actividad de PPAR- α , fomentando redistribución a otros tejidos pero con la característica de que Metformina redujo presuntivamente el número de adipocitos, por lo que el resguardo se da a nivel de músculo, corazón y riñón como se pudo observar en dicho modelo [Nagle et al., 2009; Coleman and Lee, 2004; Grefhorst et al., 2002; Guerre-Millo et al 2001].

Por su parte el tratamiento con vanadio en este modelo de SM por exposición a Cd, exhibió un patrón similar al mostrado por la administración del fármaco, en el cual su actividad sobre la inhibición mitocondrial y fomentación de la beta oxidación sigue siendo evidente, ya que la ruta de saturación de piruvato antes discutida es recurrente y fomentada hacia la derivación del exceso de lactato, probablemente en músculo y tejido hepático como principales productores, indicando que el ambiente glucolítico es de tipo anaeróbico, lo cual está en regulación en la coordinación de la ruta glicolítica y la oxidación a nivel mitocondrial a nivel de la cadena respiratoria como ya se ha discutido anteriormente donde vanadio ha mostrado el mayor efecto, sin embargo no se debe descartar la idea que dicho defecto (hoperlactacidemia), en aerobiosis es resultado de la sobre actividad de las bombas $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPasa}$. Para explicar esta característica, se ha propuesto que los grupos de enzimas que consisten en la cascada de glicolítica completa pueden estar asociados con las membranas en la proximidad de transportadores de iones, ya que las bombas reciben ATP preferencialmente derivado de las reacciones glicolíticas, por lo que generan incrementos de ADP que aumentan la actividad de enzimas como las fosfofructocinasas acelerando la glicólisis aeróbica, evidencias mostradas tanto en músculo, como en corazón, así como en eritrocitos [Parker et al., 1967, Paul et al., 1989; Luchette et al., 1998]. A pesar de estas condiciones las rutas de generación de glucógeno se perciben evidentemente glucogénicas ya que la concentración de glucógeno no sólo es recupera sino que incrementa en su resguardo. Y las el resguardo de lípidos con vanadio siguen fomentándose, lo cual también es indicativo que la oxidación mitocondrial esta inhibida y muy probablemente la que se halle favorecida es la oxidación de tipo peroxisomal.

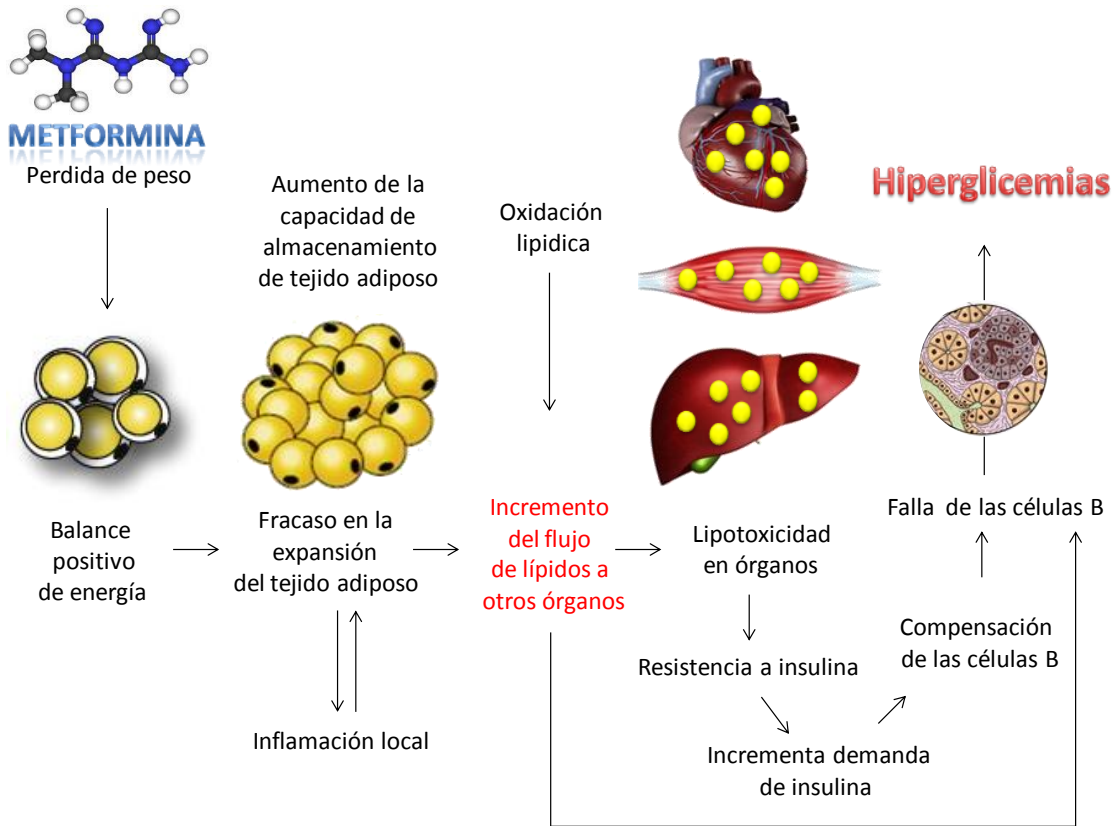


Figura 15 - Propuesta de la regulación metabólica de Metformina hacia el segundo mes de tratamiento. La acción de Metformina en la regulación de carbohidratos y lípidos séricos como tisulares es favorable en el primer de tratamiento, sin embargo hacia el segundo mes se observan efectos no deseados a nivel tisular donde se presenta incremento en el acumulo de Triglicéridos (esteatosis) debido probablemente al fracaso de la expansión del tejido adiposo presentado en el primos de tratamiento y su posterior redistribución de TAG hacia tejidos no propios para su resguardo. La figura fue tomada y modificada de Sam Virtue., 2010.

Conclusiones:

Los resultados mostrados a lo largo de nuestro trabajo de investigación, nos llevan a concluir que las rutas por las cuales se lleva a cabo la desregulación metabólica con implicación hacia SM por la ingesta de una dieta hipercalórica y por la intoxicación crónica con Cd son mecanísticamente diferentes en cuanto a sus vías de inducción. De acuerdo a lo anterior, se pudo evidenciar que el mecanismo regulatorio del metabolismo tanto sérico como tisular por la administración de metavanadato de sodio, es similar al mostrado por Metformina, sin embargo la acción mostrada por la administración 24,000 veces menor de Vanadio al día y 84,000 veces menor al mes y segundo mes, es más fina, regulada y lenta por lo que las rutas homeostáticas celularmente hablando permiten que el tejido se adapte a las señales de respuesta más adecuadamente.

Por lo que, se debe considerar que la respuesta al tratamiento de los modelos de SM va a depender fundamentalmente a la vía de desregulación efectuada por las condiciones de inducción (dieta hipercalórica y Cd), así como el tipo de respuesta y regulación observada en este sentido, lo cual permite sugerir que pacientes que presentan esta alteración metabólica, se debe conocer la vía o vías de adquisición y progresión de las mismas, ya que dependiendo de ello el tratamiento permitirá mejorar la condición metabólica celular y por lo tanto el reflejo sérico será más fidedigno a la interpretación de eficacia y eficiencia del tratamiento.

En cuanto al metavanadato de sodio como regulador metabólico podemos concluir que:

Influye directamente en la regulación de las condiciones zoométricas de ambos modelos que se indujeron a SM, mostrando condiciones similares a la de los controles intactos.

Actúa como un estimulador de la absorción de glucosa y sus rutas metabólicas (independientemente del inductor), conduciendo a estados totales o parciales de normoglicemia en ayuno o post absorción. Restauró las respuestas tisulares de las vías glucogénicas, particularmente depletadas por la acción de Cd.

Incrementó la quema lipídica, mejorando con ello el funcionamiento multiorgánico en cuanto a síntesis, distribución y resguardo de la macromoléculas. Este efecto es de suma importancia ya que al tener esta característica mejora las condiciones séricas de las fracciones lipoproteicas del colesterol que son fundamentales en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del síndrome metabólico.

6.- Bibliografía

- 1.- Alberto Campos, Síndrome Metabólico: un problema de salud con múltiples definiciones, Rev Méd Electrón [Internet]. 2012 Mar-Abr [citado: fecha de acceso];2012, 34(2). 200-209
- 2.- Horacio Carbajal y Martín R. Salazar, SÍNDROME METABÓLICO: ASPECTOS CLÍNICOS. SU TRATAMIENTO pág 1-2
- 3.- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes. 1988;37:1595-607. PubMed; PMID: 3056758
- 4.- Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 1998;15(7):539-53. PubMed; PMID: 9686693.
- 5.- Alberto Campos, Síndrome Metabólico: un problema de salud con múltiples definiciones, Rev Méd Electrón [Internet]. 2012 Mar-Abr [citado: fecha de acceso];2012, 34(2). 200-209
- 6.- Mariela E. López, et.al., SINDROME METABOLICO, Revista de Posgrado de I 14 a VIa Cátedra de Medicina. N° 174 , 2007, (pág 1).
- 7.- John R Speakman. Thrifty genes for obesity and the metabolic syndrome -- time to call off the search?. Diabetes and Vascular Disease Research 2006 3: 7. DOI: 10.3132/dvdr.2006.010
- 8.- E. Maury, S.M. Brichard. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. Molecular and Cellular Endocrinology 314 (2010) 1–16 doi:10.1016/j.mce.2009.07.031
- 9.- Niels Wachter-Rodarte ,Epidemiología del síndrome metabólico, Gac Méd Méx Vol. 145 No. 5, 2009
10. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et al. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and alternative definition of an insulin resistance syndrome. Diabetes Metab. 2002;28:364-76. PubMed; PMID: 12461473.
- 11.- Yolanda Jimenes et cols. A Low-Fat, High-Complex Carbohydrate Diet Supplemented with Long-Chain (n-3) Fatty Acids Alters the Postprandial Lipoprotein Profile in Patients with Metabolic Syndrome. J Nutr. 2010 Sep;140(9):1595-601. doi: 10.3945/jn.109.120816. Epub 2010 Jul 14.
- 12- Antonio González-Chávez et cols. Prevalencia del síndrome metabólico entre adultos mexicanos no diabéticos, usando las definiciones de la OMS, NCEP-ATPIIIa e IDF, Rev.Méd.del hospital gral. Vol. 71, Núm. 1 Ene.-Mar. 2008 pp 11– 19

- 13.- Cadmium exposure in relation to insulin production, insulin sensitivity and type 2 diabetes: A cross-sectional and prospective study in woman. *Environmental Research* 121 (2013) 104–109.
- 14.-Ya Wen Chen et al. Heavy metals, islet function and diabetes development ,*Islets* 1:3, 169-176; November/December 2009; © 2009 Landes Bioscience
- 15.- Martin Beckerman, Cellular Signaling in Health and Disease, biological and medical physics, biomedical engineering, DOI 10.1007/978-0-387-98173-4 2009
16. Z. Merali and R.L. Singhal, Diabetogenic Effects of chronic oral Cadmium administration to neonatal rats, *Br. J. Pharmac.* (1980), 69, 151-157
- 17.- Ira J. Goldberg , Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis, *Journal of Lipid Research* Volume 37,1996
- 18.- Erez F. Scapa, Keishi Kanno and David E. Cohen, Lipoprotein metabolism, Functions on the liver, *metabolism* . 2002.
- 19.- Ethel V. Larregle, Silvia M. Varas, Liliana B. Oliveros, Luis D. Martinez , Rosa Antonio, Eduardo Marchevsky , Mara S. Gimenez, Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium. *Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 1786–1792
- 20 ., S. Milton prabu, m. Muthumani, k. shagirtha, Quercetin potentially attenuates cadmium induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rat, *European review for medical and pharmacological sciences*, 2013; 17: 582-595
- 21.- Carlos Calvo M., Lípidos y Riesgo Cardiovascular, Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis, Universidad de Concepción, 2012
- 22.- Messner B and Bernhard D, Cadmium and cardiovascular diseases: cell biology, pathophysiology, and epidemiological relevance, *Biometals*. 2010 Oct; 23(5):811-22. doi: 10.1007/s10534-010-9314-4. Epub 2010 Mar 7.
- 23.- International Diabetes Federation, Atlas 6th edition, 2013
- 24.- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837e53.
- 25.- Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee. *Canadian Journal of Diabetes*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjcd.2013.01.021>
- 26.- P. Andujar-Plata a and cols. **Metformin effects revisited** Review. *Diabetes research and clinical practice* (2012) doi:10.1016/j.diabres.2011.09.022
- 27.- Benoit Viollet and cols. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview *ClinSci (Lond)*. 2012 March; 122(6): 253–270. doi: 10.1042/CS20110386

- 28.- Hiromu sakurai. A new concept: the use of vanadium complexes in the treatment of Diabetes mellitus. The Chemical Record, Vol. 2, 237–248 (2002). The Japan Chemical Journal Forum and Wiley Periodicals, Inc.
- 29.- Z.M. Villena y cols. Complejos de cinc como potenciales metalofármacos antidiabéticos: avances recientes en su desarrollo y mecanismo molecular de acción. Rev soc quím perú. 78 (4) 2012
- 30.- Makoto Hiromura et al. Action mechanism of bis(allixinato)oxovanadium(IV) as a novel potent insulin-mimetic complex: regulation of GLUT4 translocation and FoxO1 transcription factor. J Biol Inorg Chem (2007) 12:1275–1287. DOI 10.1007/s00775-007-0295-x
- 31.- Tirtha Mukherjee et al. Oxidovanadium(IV) Schiff Base Complex Derived from Vitamin B6: Synthesis, Characterization, and Insulin Enhancing Properties. Inorg. Chem. 2011, 50, 4349–4361. dx.doi.org/10.1021/ic102412s
- 32.- Mohamad Z. Mehdi, Sanjay K. Pandey, Jean-François Théberge, and Ashok K. Srivastava, Insulin Signal Mimicry as a Mechanism for the Insulin-Like Effects of Vanadium, Cell Biochemistry and Biophysics 73 Volume 44, 2006
- 33.- Zhe Shi, Hui-Xue Liu, Xiao-Da Yang, Vanadium stimulates mitochondrial ROS production in different ways, Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences 20 (2011) 498–504
- 34.- Ayala I., Fernández-Pardo J. y Colaboradores, MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE HÍGADO GRASO Y SÍNDROME METABÓLICO,. AN. VET. (MURCIA) 24: 5-16 (2008).
- 35.- André F. Nascimento; Mário M. A Hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. Arq Bras Endocrinol Metab vol.52 no.6 São Paulo Aug. 2008
- 36.- M.J. Olisekodiaka et al. Lipid, Lipoproteins, Total Antioxidant Status and Organ Changes in Rats Administered High Doses of Cadmium Chloride. Med Princ Pract 2012;21:156–159. DOI: 10.1159/000333385
- 37.- Nagle CA, Klett EL and Coleman R. 2009. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. J Lipid Res. 50: S74-S79.
- 38.- Brigitte M. Sondermeijer, Suzanne Battjes, Theo H. van Dijk Mariëtte T. Ackermans, Mireille J. Serlie, Max Nieuwdorp, Albert K. Groen Geesje M. Dallinga-Thie, Erik S.G. Stroes. Lactate increases hepatic secretion of VLDL-triglycerides in humans. Atherosclerosis 228 (2013) 443e450
- 39.- Kim YW, Kim JY, Park YH, Park SY, Won KC, Choi KH, Huh JY and Moon KH. 2006. Metformin restores leptin sensitivity in high fat fed obese rats with leptin resistance. Diabetes. 55(3): 716-724.

- 40.- Prabu SM., Muthumani M and Shagirtha K. 2013. Quercetin potentially attenuates cadmium induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17: 582-595
- 41.- Hossein MJ, Shaki F, Ghazi-Khansari M ,Pourahmad J. 2013 Toxicity of vanadium on isolated rat liver mitochondria: a new mechanistic approach. *Metallomics* 5(2): 152 – 166
- 42.- Lekan m. Latinwo, veera I. Badisa, christopher o. Ikediobi, caroline o. Odewumi, ayuktakem t. Lambert and ramesh b. Badisa. Effect of cadmium-induced oxidative stress on antioxidative enzymes in mitochondria and cytoplasm of cri-1439 rat liver cells. *International journal of molecular medicine* 18: 477-481, 2006
- 43.- Wang Y, Fang J, Leonard SS and Rao KM: Cadmium inhibits the electron transfer chain and induces reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36: 71434-71443, 2004.
- 44.- Davison AJ, Wu Q, Moon J, Stern A. Among a range of transition metals and ligands vanadium.desferroxamine excels in accelerating reactivity of ferrocytochrome c toward molecular oxygen. *Biochem Cell Biol.* 1994; 72(5-6):169-174.
- 45.- Zhe Shi, Hui-Xue Liu and Xiao-Da Yang
Vanadium stimulates mitochondrial ROS production in different ways.
Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences 20 (2011) 498–504
- 46.- Bailey, C. J. (1992) Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care* 15, 755–772.
- 47.- Hundal, H. S., Ramlal, T., Reyes, R., Leiter, L. A., and Klip, A. (1992) Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology* 131, 1165–1173.
- 48.- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., and Moller, D. E. (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174
- 49.- Owen, M. R., Doran, E., and Halestrap, A. P. (2000) Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348, 607–614.
- 50.- Musi, N. (2006) AMP-activated protein kinase and type 2 diabetes. *Curr. Med. Chem.* 13, 583–589
- 51.- Elena A. Belyaeva, Tatyana V. Sokolova, Larisa V. Emelyanova, and Irina O. Zakharova. Mitochondrial Electron Transport Chain in Heavy Metal-Induced Neurotoxicity: Effects of Cadmium, Mercury, and Copper Volume 2012 (2012), Article ID 136063, 14 pages
- 52.- Cynthia A. Nagle, Eric L. Klett, and Rosalind A. Coleman. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance *J Lipid Res.* Apr 2009; 50(Suppl): S74–S79.
- 53.- Gibbons G. F., D. Wiggins, A. M. Brown, and A. M. Hebbachi. 2004. Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* 32 59–64.

- 54.- Coleman R. A., and D. P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43 134–176.
- 55.- Semiz S1, Orvig C, McNeill JH. 2002. Effects of diabetes, vanadium, and insulin on glycogen synthase activation in Wistar rats. *Mol Cell Biochem.* 2002 Feb;231(1-2):23-35.
- 56.- S. K. Thondam, a. Cross, d. J. Cuthbertson, j. P. Wilding¹ and c. Daousi. 2012. Effects of chronic treatment with metformin on dipeptidyl peptidase-4 activity, glucagon-like peptide 1 and ghrelin in obese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 29, e205–e210.
- 56.- Maida a, lamont bj, cao x, drucker dj. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia* 2011; 54: 339–349. Holst jj, deacon cf. Glucagon-like peptide-1 mediates the therapeutic actions of dpp-iv inhibitors. *Diabetologia* 2005; 48: 612–615.
- 57.- Shulman ai, mangelsdorf d. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N engl j med.* 2005;353:604–615. Yki-jarvinen h. Thiazolidinediones. *N engl j med.* 2004;351:1106–1118.
- 58.- Ip e, farrell gc, robertson g, hall p, kirsch r, leclercq i. Central role of ppar α -dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2003; 38:123–132.
- 59.- Ip e, farrell g, hall p, robertson g, leclercq i. Administration of the potent ppar α agonist, wy-14,643, reverses nutritional fibrosis and steatohepatitis in mice. *Hepatology.* 2004;39:1286–1296.
- 60.- Yoram shechter. 1990. Insulin-mimetic effects of vanadate: possible implications for future treatment of diabetes *Diabetes* january 1990 vol. 39 no. 1 15
- 61.- Brichard, s.m., assimakopoulos-jeannet, f., jeanrenaud, b. Vanadate treatment markedly increases glucose utilization in muscle of insulin-resistant fa/fa rats without modifying glucose transporter expression. *Endocrinology* Volume 131, issue 1, 1992, pages 311-317.
- 62.- Shechter y. Insulin-mimetic effects of vanadate. Possible implications for future treatment of diabetes. *diabetes.* 1990 jan;39(1):1-5.
- 63.- Ltzhak goldwaser, Dov gefel, eytan gershonov, mati fridkin, yoram shechter. 2000. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *Journal of inorganic biochemistry* 80 (2000) 21–25
- 64.- Brown sa, hutchinson r, morrisett j, boerwinkle e, davis ce, gotto am jr, patsch w: plasma lipid, lipoprotein cholesterol, and apoprotein distributions in selected us communities. The atherosclerosis risk in communities (aric) study. *Arterioscler thrombosis* 1993, 13(8):1139-1158.

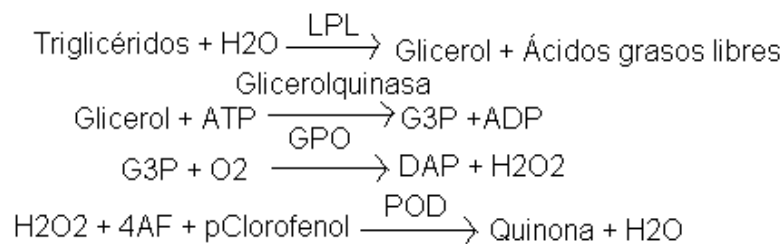
- 65.- Ohta t, hattori s, murakami m, nishiyama s, matsuda i: age- and sex-related differences in lipoproteins containing apoprotein a-i. *Arterioscler (dallas, tex)* 1989, 9(1):90-95.
- 66.- Pascot a, lemieux i, bergeron j, tremblay a, nadeau a, prud'homme d, couillard c, lamarche b, despres jp: hdl particle size: a marker of the gender difference in the metabolic risk profile. *Atherosclerosis* 2002, 160(2):399-406.
- 67.- Despres jp, lemieux i, dagenais gr, cantin b, lamarche b: hdl-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk: the quebec cardiovascular study. *Atherosclerosis* 2000, 153(2):263-272.
- 68.- Veeravenkata s. Vytla and raymond s. Ochs. 2013. S, Metformin increases mitochondrial energy formation in l6 muscle cell cultures. *Biological chemistry*, 288,20369-20377 Coleman r. A., and d. P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid res.* 43 134–176.
- 70.- Grefhorst a., b. M. Elzinga, p. J. Voshol, t. Plösch, t. Kok, v. W. Bloks, f. H. Van der sluijs, i. M. Havekes, j. A. Romijn, h. J. Verkade, et al. 2002. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver x receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* 277 34182–34190.
- 71.- Guerre-millo m., c. Rouault, p. Poulain, j. André, v. Poitout, j. M. Peters, f. J. Gonzalez, j. C. Fruchart, g. Reach, and b. Staels. 2001. Ppar-alpha-null mice are protected from high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes*. 50 2809–2814. Jc parker, jf hoffman, the role of membrane phosphoglycerate kinase in the control of glycolytic rate by active cation transport in human red blood cells, *j gen physiol*, 50 (1967), pp. 893–916.
- 72.- Uptake in smooth muscle plasma membrane vesicles by an endogenous glycolytic cascade, *faseb j*, 3 (1989), pp. 2298–2301
- 73.- Fa lchette, la friend, cc brown, rk upputuri, jh james, increased skeletal muscle na+, k+-atpase activity as a cause of increased lactate production after hemorrhagic shock, *j trauma*, 44 (1998), pp. 796–801

ANEXO "A"

Determinación de la concentración de triglicéridos.

Fundamento

La concentración sérica de triglicéridos, se realiza por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponde a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, en la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-aminoantipirina y 4- clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es mediada a una longitud de onda de 505 nm.



Método (Glicerolfosfato deshidrogenasa- Peroxidasa)

Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

1. Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

2. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.
3. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 30min.

CALCULOS

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

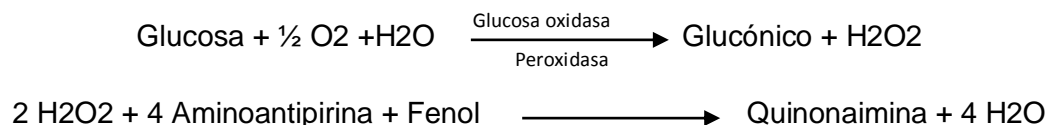
$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} = C \text{ muestra}$$

ANEXO "B"

Determinación de la concentración de glucosa sérica

Fundamento

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



Método (Glucosa Oxidasa/Peroxidasa)

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
2. Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Patrón (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 min. a temperatura ambiente o durante 5 min. a 37°C.
4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 500 nm frente al blanco. El color es estable durante al menos 2 hrs.

CALCULOS

La concentración de glucosa en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula.

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

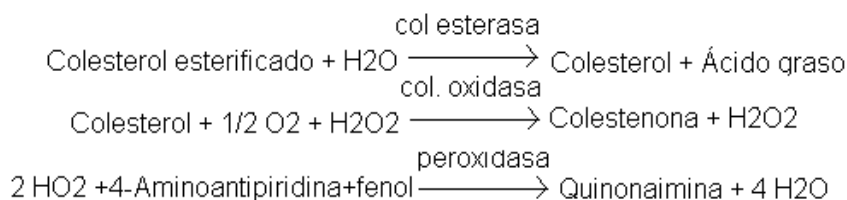
ANEXO "C"

Determinación de Colesterol LDL reactivo precipitante

Fundamento

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

Método (Polivinil Sulfato/ Polietilenglicol)



Precipitación

1.- Pipetear en un tubo

Muestra	0.4 ml
Reactivo (Col LDL)	0.2 ml

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

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

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	20 µL		
Patrón Colesterol (S)		20 µL	
Sobrenadante Muestra			20 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	10 µL

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

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

Calculos

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

$$A \text{ muestra} \times \frac{C \text{ patrón}}{A \text{ patrón}} \times \text{Factor de dilución de muestra} = C \text{ Sobrenadante}$$

La concentración de colesterol LDL en la muestra se calcula

$$\text{Colesterol LDL} = \text{colesterol total} - \text{colesterol en sobrenadante}$$

ANEXO "D"

Determinación del Colesterol HDL reactivo precipitante

Fundamento

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

Método

Precipitación

1.- Pipetear en un tubo

Muestra	0.2 ml
Reactivo (Col HDL)	0.5 ml

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

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

4.- Recoger con cuidado el sobrenadante

Colorimetría

5.- Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.

6.- Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Agua destilada	100 µL		
Patrón Colesterol HDL (S)		100 µL	
Sobrenadante Muestra			100 µL
Reactivo de colesterol(A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

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

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

CALCULOS

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

$$\frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times C \text{ patrón} \times \text{Factor de dilución de muestra} = C \text{ Muestra}$$

ANEXO "E"

Determinación de Lípidos totales

La concentración de lípidos totales existentes en el suero o plasma de las muestras colectadas, pueden ser medidas por espectrofotometría, posterior a la extracción de la fracción lipídica por medio de una semidigestión ácida con H₂SO₄, la cual libera a lípidos unidos a proteínas y por medio de un gradiente de densidad se encuentran en la fase superior del homogenado (colesterol total, triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos libres principalmente), esta fase se hace reaccionar con ácido vainillínico, el cual por reacciones acopladas genera un compuesto coloreado, que de acuerdo a su absorbencia proporcionan la concentración contenida en el espécimen primario.

Método (Sulfo-fosfo vainillina. Colorimétrico)

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
2. Pipetear en un tubo de ensayo:

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
SO ₄ H ₂ (mL)	2.5	2.5 µL	2.5
Patrón (uL)		100	
Muestra (uL)			100

3. Mezclar energéticamente con ayuda de un agitador mecánico.
4. Incubar 10 min en un baño de agua hirviendo (100°C).
5. Enfriar en baño de agua frío y dosificar en cubetas.

	BLANCO	PATRON	MUESTRA
Fosfovainillina (mL)	1.0	1.0	1.0
Hidrolizado muestra (uL)			50
Hidrolizado calibrador (uL)		50	

6. Mezclar energéticamente con ayuda de un agitador mecánico.
7. Incubar 15 min. a 37°C.
8. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 520 nm frente al blanco. El color es estable como mínimo 1 hora.

CALCULOS

$$\frac{A \text{ muestra} \times 750 \text{ (Conc, del calibrador)}}{A \text{ patrón}} = \text{mg/DI de lípidos tot de la muestra}$$

ANEXO "F"

Determinación de Lactato

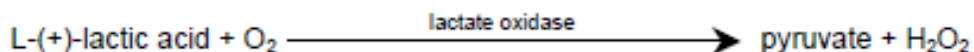
El lactato es el producto final del metabolismo anaeróbico de la glucosa. La concentración de lactato en la sangre depende de la tasa de producción en las células musculares y los eritrocitos y la tasa de metabolismo en el hígado. La acidosis láctica generalmente resulta de la sobreproducción o la subutilización de lactato. Niveles de lactato elevados pueden ocurrir como un resultado de la hipoxia tisular; diabetes mellitus; terapia fenformina; malignidades; glucogenosis; etanol, metanol, o la ingestión de salicilato; y acidosis metabólica.

Condiciones

Tipo de prueba	Módulo VITROS	Tiempo incubación	Temperatura	Longitud de onda	Muestra volumen
Colorimétrica	DT60/DT60 II	5 minutos	37 ° C	555 nm	10 µl

Fundamento y Procedimiento

El método Slide VITROS DT LAC se realiza utilizando la Slide VITROS DT LAC y el Kit de VITROS Chemistry Products DT calibrador de sistemas de química VITROS DT60/DT60 II. El Slide VITROS DT LAC es un elemento de múltiples capas, analítico revestido sobre un soporte de poliéster. Una gota de muestra del paciente se deposita sobre el portaobjetos y se distribuye de manera uniforme por la capa de extensión de las capas subyacentes. Lactato en la muestra se oxida por lactato oxidasa para piruvato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno generado oxida la 4-aminoantipirina, sistema de colorante 1,7-dihidroxi-naftaleno en una reacción de peroxidasa de rábano picante-catalizada y los resultados en un complejo de colorante. El portaobjetos se incubó y la intensidad del complejo de colorante se mide espectrofotométricamente.



ANEXO "G"

Determinación de Ácidos grasos libres

Reactivos

- Cloroformo
- Reactivo de cobre: Consiste en $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 40,0 g/litro; trietanolamina 99%, 120,0 ml/litro (135,0 g/litro). Se disuelve el nitrato cúprico en 500 ml de agua destilada, agregue la trietanolamina, y diluir a 1 litro con agua destilada.
- Reactivo cuprizona. Este consiste de ácido oxálico-bis (cyclohexylidenehydrazide), 0.40 g/litro de isopropanol. Disolver el cuprizone en 10 ml de cloroformo y se diluye con isopropanol para 1 litro. esta solución es estable durante al menos tres meses a temperatura ambiente.
- Reactivo amoníaco. 100 ml de una solución al 58% de NH_4OH (concentrado) se diluye hasta 1 litro con agua destilada agua.

Procedimiento

1. Añadir 50 μL de suero en un tubo de ensayo
2. A un tubo semejante, se añaden 50 μl de estándar de ácido oleico.
3. Para otro tubo de ensayo añadir 100 μl de agua, este será el blanco de reactivo.
4. Para todos los tubos de añadir 150 μl de reactivo de cobre y 1 ml de cloroformo.
5. Coloque los tubos verticalmente en un vortex y agite por 10 min.
6. Centrifugar los tubos 10 minutos a 1500 rpm.
7. Extraer las fases de cloroformo en otros tubos de ensayo cuidando el no extraer la fase acuosa de color azul.
8. De cada tubo, pipetear 500 μl de extracto de cloroformo y colocar en un nuevo tubo, la evaporación debe mantenerse a un mínimo.
9. A cada tubo, añadir 450 μl de reactivo cuprizona, tapar y agitar suavemente.
10. A cada tubo, añadir 50 μl de solución de amoníaco, tapar y agite suavemente.
11. Lea la absorbancia a 620 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 10 mm después de agitar con la solución de amoníaco.
Si aparece un precipitado azul, agitar la cubeta enérgicamente para redispersarlo y leer la absorbancia.

Cálculo

El ácido graso libre (FFA) contenido se calcula:

$$\text{Concentración en mg/dl} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs estándar}) \times 8.6 \text{ mg/dl}$$

ANEXO "H"

Determinación de Triglicéridos en tejidos

Homogenizar 100 mg de tejido en 800 μ l de SSI se re suspendió el homogenizado y se procedió al seguimiento del protocolo utilizado para las determinaciones sanguíneas. Para el caso de tejido adiposo una vez realizado el homogenizado se hizo una dilución 1:2 del mismo y se siguió el mismo protocolo.

ANEXO "I"

Determinación de Glucógeno en tejidos

Reactivos

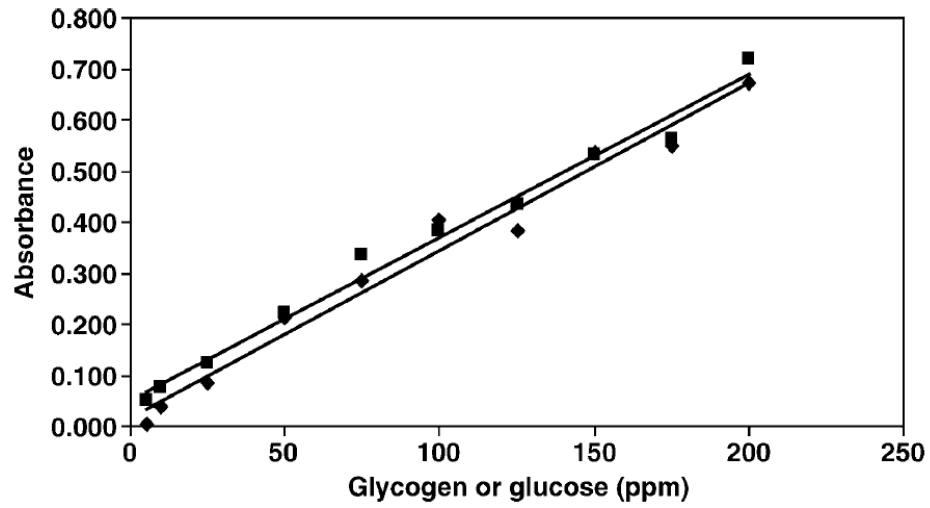
- Acido perclórico al 10 %
- Etanol concentrado
- Agua destilada
- Fenol al 5 %
- Ácido sulfúrico concentrado

Procedimiento

- 1.- Homogenizar 125 mg de tejido con 1 ml de HClO₄.
- 2.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.
- 3.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 1)
- 4.- Re suspender el pellet de tejido con 1 ml de HClO₄.
- 5.- Centrifugar a 1450 rpm durante 15 minutos.
- 6.- Extraer el sobrenadante y guardar. (Sobrenadante 2)
- 7.- Combinar el sobrenadante 1 y 2. (Sobrenadante 3)
- 8.- Agregar 2.5 ml de etanol al sobrenadante 3, agitar fuertemente.
- 9.- Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- 10.- Extraer el sobrenadante (Sobrenadante 4)* y guardar, en el fondo del tubo se observara un precipitado blanco.
- 11.- Re suspender el precipitado blanco con 1 ml de agua destilada.
- 12.- Tomar una alícuota de la disolución de glucógeno (no. 11) de 100 μ L
- 13.- Añadir 200 μ L de fenol y agitar.
- 14.- Agregar 1 ml de ácido sulfúrico y agitar.
- 15.- Leer la absorbancia a 490 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 30 min después de agitar con el ácido sulfúrico.

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

Cálculos



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

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