



BUAP

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

TESIS:

“Cristalización de Insulina-Zn²⁺- Insulina-Cd²⁺ y el estudio de su efecto biológico en ratas Wistar”

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

LUZ MARÍA GUZMÁN SALINAS

DIRECTORES

D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA

D.C. MARÍA DE GUADALUPE MUÑOZ ARENAS

PUEBLA, PUE

NOVIEMBRE, 2018

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigaciones Químico-Clínicas, del área de Análisis Clínicos de la facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por el Don de la vida
por la fuerza espiritual y por el milagro recibido.

A mi familia

A mi esposito Jaciel por todo el apoyo,
la paciencia y el amor demostrado.

A mi mamita por ser la mejor y ayudarme siempre
Eres una bendición en mi vida.

A mi papi por apoyarme a lograr una carrera y
La confianza siempre en mí.

A mis hijos Pao y Andy porque me han dado motivos de vida
y me obligan a ser mejor persona para darles el mejor ejemplo.

A mi hermanito Luis por hacerme reír siempre y apoyarme
incondicionalmente, eres mi cómplice de aventuras.

A mi hermanito Tony por su apoyo y cariño
A todos los amo.

A mis amigas:

Mi bffita hermosa por ser esa hermana, por tus enseñanzas y por estar conmigo
siempre...Te amo

A Dianita bonita por ser tan buena y maravillosa conmigo, te adoro y sin ustedes dos no hubiera podido salir adelante, son vitales para mí.

A mi Jenny (q.d.e.p) sabes bien que desde que partiste, el dolor nunca se fue pero aprendí a vivir con él y que siempre estás en mis pensamientos, te amo amiga y mis triunfos son también tuyos.

A mi director

Jefecito D.C. Samuel Treviño Mora muchas gracias

Por la oportunidad de haber trabajado con usted,

Por su paciencia y apoyo siempre sin esperar nada a cambio, por su ejemplo y por compartir sus grandes conocimientos conmigo.

Por permitirme aprender de usted y conocer ese maravilloso

Ser humano que es y por la confianza y credibilidad en mí.

A los miembros de la comisión revisora:

M.C. José Ángel Flores Hernández por su cariño y apoyo, ha sido un gran formador profesional conmigo y su sensibilidad humana es impresionante. Lo admiro en lo profesional pero como persona es extraordinario, gracias por esa visita en el momento más crítico de la vida y estar conmigo siempre.

D.C. Alfonso Daniel Díaz Fonseca por su disponibilidad en auxiliarme y por su profesionalismo para conmigo

D.C. Violeta Aburto Luna por la confianza, tiempo y entrega, muchas gracias.

De corazón a corazón, muchas gracias por creer en mí!

“La vida no es sino una continua sucesión de oportunidades para sobrevivir”
-Gabriel García Márquez

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	1
Índice de Figuras.....	3
Índice de Tablas.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Metabolismo y hormonas.....	6
1.2 Función de la insulina	8
1.3 Función de la insulina en tejido.....	9
1.3.1 En hígado.....	10
1.3.2 Tejido Muscular.....	10
1.3.3 Tejido Adiposo.....	11
1.4 Generalidades de la Insulina.....	11
1.4.1 Biosíntesis.....	12
1.4.2 Factores de transcripción.....	12
1.4.3 Resguardo de la Insulina.....	14
1.4.4. Mecanismo de secreción.....	15
1.4.5 Regulación de la secreción de Insulina.....	17
1.4.6 Glucosa y secreción de Insulina.....	18
1.4.7 Aminoácidos y secreción de la Insulina.....	20
1.4.8 Ácidos Grasos y secreción de la Insulina.....	21
1.5 Aminoácidos importantes en la coordinación.....	21
1.5.1 Histidina.....	21
1.5.2 Cisteína.....	22
1.5.3 Ácido Glutámico.....	22
1.6 Insulina-Zn.....	23
1.7 Similitudes entre Zinc y Cadmio.....	26
1.7.1 Propiedades Físicas.....	26
1.7.2 Propiedades Químicas.....	27
1.8 Acción fisiológica del Cadmio.....	27

1.9 Generalidades del Cadmio.....	28
1.10 Química de coordinación del Cadmio y su relevancia biológica.....	30
1.11 Fuentes de exposición al Cadmio.....	32
1.11.1 Exposición ocupacional.....	32
1.11.2 Exposición no ocupacional.....	33
1.12 Vías de entrada, transporte y tráfico de cadmio en el organismo.....	35
1.12.1 Vía de entrada.....	35
1.12.1.1 Pulmones.....	35
1.12.1.2 Tracto Gastrointestinal.....	36
1.12.2 Tráfico, transporte y distribución.....	37
1.13 Cadmio fisiopatología.....	37
1.14 Estado hexamérico de la Insulina.....	38
1.15 Modelos de Estudio.....	39
2. PARTE EXPERIEMANTAL.....	40
2.1 Planteamiento del problema.....	40
2.2 Justificación.....	41
2.3 Objetivos.....	42
2.3.1 Objetivos Generales.....	42
2.3.2 Objetivos Particulares.....	42
2.4 Hipótesis.....	42
2.4.1 Hipótesis Nula.....	42
2.4.2 Hipótesis Alternativa.....	42
2.5 Diseño Experimental.....	43
2.6 Material y Métodos.....	44
2.6.1 Animales de experimentación.....	44
2.6.2 Modelo Insulino dependiente.....	44
2.6.3 Obtención de las muestras biológicas.....	44
2.6.3.1 Muestras sanguíneas.....	44
2.6.3.2 Tejido pancreático.....	45
2.6.4 Ensayos séricos.....	45
2.6.5 Estudios histológicos.....	46
2.6.5.1 Inmunohistoquímica.....	46

2.6.6 Insulina Zinc e Insulina Cadmio.....	47
2.6.6.1 Insulina libre de metales.....	47
2.6.6.2 Insulina Cadmio.....	48
2.6.6.3 Caracterización de Insulina-Zn e Insulina-Cd.....	48
2.6.7 Coordinación de aminoácidos.....	49
2.6.7.1 Histidina, Cisteína y Glutamato coordinados con Zinc.....	49
2.6.7.2 Histidina, Cisteína y Glutamato coordinados con Cadmio.....	49
2.6.7.3 Caracterización de los aminoácidos coordinadores con Zn y Cd.....	50
3. RESULTADOS.....	51
3.1 Análisis espectrofotométrico de los aminoácidos coordinadores de Zn ²⁺ y Cd ²⁺	51
3.2 Análisis espectrofotométrico IR de Histidina, Histidina-Zn e Histidina-Cd.....	53
3.2.1 Histidina.....	53
3.2.2 Histidina-Cd.....	54
3.2.3 Histidina-Zn.....	55
3.3 Análisis espectrofotométrico IR de Glutamato, Glutamato-Zn y Glutamato-Cd.....	57
3.3.1 Glutamato.....	57
3.3.2 Glutamato-Zn.....	58
3.3.3 Glutamato-Cd.....	59
3.4 Análisis espectrofotométrico IR de Cisteína, Cisteína-Zn y Cisteína-Cd.....	61
3.2.1 Cisteína.....	61
3.2.2 Cisteína-Zn.....	61
3.2.3 Cisteína-Cd.....	62
3.5 Análisis espectrofotométrico UV-VIS de los cristales de Insulina-Zn ²⁺ e Insulina-Cd ²⁺	65
3.6 Análisis espectrofotométrico IR de los cristales de Insulina-Zn ²⁺ e Insulina-Cd ²⁺	67
3.7 Cristalización de la Insulina-Zn e Insulina-Cd.....	69
3.8 Administración de Insulina-Zn ²⁺ e Insulina-Cd ²⁺ a un modelo de rata Wistar insulino requerido.....	70
4. DISCUSIÓN.....	77
5. CONCLUSIONES.....	88
6. PERSPECTIVAS.....	89
7. BIBLIOGRAFÍA.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac. Glut	Ácido glutámico o Glutamato
ADP	Adenosín difosfato
AGL	Ácidos grasos libres
ATP	Adenosín trifosfato
Cd	Cadmio
Cys	Cisteína
CREB	Proteína de enlace de elemento sensible
DAG	Diacilglicerol
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
ECV	Enfermedad cardiovascular
ERK1/	Proteína de las cinasas activadas por mitógenos
FFA	Ácidos grasos libres
FFAR	Receptor libre para ácidos grasos
FITR	Espectrometría Infrarroja por transformada de Fourier
FOXO	Factor de Transcripción
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GIP	Polipéptido Inhibidor Gástrico
GGP	Gamma glutamil transpeptidasa
Glut-1	Transportador de Glucosa tipo 1
Glut-2	Transportador de Glucosa tipo 2
Glut-4	Transportador de Glucosa tipo 4
GLP1	Hormona peptídica de 30 aminoácidos de la familia de las incretinas
Gly3P	Glicerol 3-Fosfato

GSK3	Glicógeno sintasa quinasa 3
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
His	Histidina
HTA	Hipertensión arterial
Ins	Insulina
IRS1	Receptor de insulina sustrato-1
IRS2	Receptor de insulina sustrato-2
KATP	Canales sensibles a potasio
MAPK	Proteína de actividad mitógena cinasa
NAD	Nicotidamina adenina dinucleótido
NADPH	Nicotidamina adenina dinucleótido fosfato reducida
RI	Resistencia a la Insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SM	Síndrome metabólico
TG	Tracto Gastrointestinal
TRP	Triptófano
UV-VIS	Espectrometría Ultravioleta-Visible
Zn	Zinc

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Acciones de la insulina.

Figura 2. Ciclo de la insulina tras glucosa en sangre

Figura 3. Redes transcripcionales en la célula β adulta y sus genes blanco

Figura 4. Proceso de secreción de insulina en respuesta a glucosa y papel autocrino de la insulina en la célula β .

Figura 5. Dibujo estéreo de los átomos de la cadena principal del dímero de insulina TR visto a lo largo del eje local 2 veces

Figura 6. Superposición de la cadena B del monómero I (enlaces delgados) sobre la del monómero I1 (enlaces gruesos).

Figura 7. Vistas estereoscópicas del mapa de densidad de electrones

Figura 8. Dibujo esquemático del centro del hexámero de insulina visto a lo largo del eje cristalográfico

Figura 9. Transporte de Cd al enterocito, en azul están representados los transportadores involucrados en el manejo de Zn y en verde los de Ca.

Figura 10. Espectro UV-Visible de Histidina

Figura 11. Espectro UV-Visible de Glutamato.

Figura 12. Espectro UV-Visible de Cisteína.

Figura 13. Espectro IR de la Histidina.

Figura 14. Espectro IR de Glutamato monosódico.

Figura 15. Espectro IR de Cisteína.

Figura 16. Espectro UV-Visible de insulina.

Figura 17. Espectro IR de la insulina.

Figura 18. Cristales de Insulina-Zn e Insulina-Cd.

Figura 19. Concentración de Glucosa e Insulina. (A)

Figura 20. Glucosa e Insulina en animales insulino-requ岸entes con daño β pancreático. (A - C)

Figura 21. Tolerancia a Glucosa y Comportamiento Insulínico en animales insulino-requ岸entes con y sin daño β pancreático. (A - B)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de las hormonas a partir de su mecanismo de acción.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metabolismo y hormonas

En 1902, Bayliss y Starling definieron por primera vez el concepto de hormona, al descubrir la secretina, liberada a la circulación por la mucosa duodenal, y que estimula el flujo pancreático. Estos autores definieron a la hormona como cualquier sustancia producida normalmente en las células de una región del organismo y llevada por el torrente sanguíneo a otras partes, sobre las cuales actúa con efecto favorable para el organismo en conjunto (Gardner et al., 2003).

Las hormonas son sustancias orgánicas producidas por las glándulas y tejidos endócrinos que, por lo general, pasan a la circulación general y ejercen su acción en otros tejidos distantes del lugar de secreción, considerándose como auténticos mensajeros químicos (Jara Albarrán A, 2011).

De forma individual, algunas hormonas poseen funciones vitales de acción inmediata, en horas, como la insulina, o más tardía, en días, como el cortisol. También intervienen en la regulación de crecimiento y el desarrollo, mientras que otras participan en funciones vitales de relación, reacción y defensa. En los humanos, las hormonas son fundamentales para la vida sexual y, por lo tanto, para la reproducción. En las últimas décadas, la consideración de hormona como mensajero químico de acción distante ha rebasado su concepto clásico, de forma que también se denominen como hormonas a otras moléculas que realicen su acción sobre células o tejidos vecinos (paracrina), sobre las propias células o tejido productor (autocrina), sobre glándulas exocrinas (exocrina) o sobre organismos ajenos, a través del medio ambiente. Asimismo, cuando la secreción hormonal sucede en el sistema nervioso se habla de neuroendocrina (similares a endocrina y paracrina). Muchas veces las fronteras entre hormonas, ligandos y meras sustancias químicas de acción local no están claras, pues la misma sustancia puede actuar localmente, en la proximidad o pasar a la circulación para actuar a distancia. Esto ocurre con las hormonas, pero también con neurotransmisores y citoquinas. Además, tejidos normalmente no endócrinos en el sentido clásico como el tejido

adiposo, forman auténticas hormonas, como la leptina, adiponectina y resistina (Goldman L. and Ausiello D., 2009)

De forma genérica, se puede decir que todos los sistemas metabólicos están influenciados directa o indirectamente por el sistema endócrino y que, a su vez, los diferentes tipos de metabolismo influyen en él. Pero existen hormonas cuya regulación principal tiene lugar por vías diferentes a los servomecanismos anteriormente mencionados. Es lo que sucede con las hormonas que intervienen en el metabolismo del calcio: la paratohormona (PTH), la calcitonina (C) y el calcitriol (o vitamina D). La hormona antidiurética (ADH) se relaciona con el metabolismo del agua, y la aldosterona, con el metabolismo del sodio y el potasio. También con la insulina y el glucagón respecto a la glucemia (Jara Albarrán A, 2011).

CUADRO I: CLASIFICACIÓN DE LAS HORMONAS A PARTIR DE SU MECANISMO DE ACCIÓN.
GRUPO I: HORMONAS QUE SE FIJAN A RECEPTORES INTRACELULARES
Andrógenos Calcitriol (1,25-Dihidroxi-D ₃) Estrógenos Glucocorticoides Mineralocorticoides Progestinas Ácido Retinoico Hormonas tiroideas (T3 y T4)
GRUPO II: HORMONAS QUE SE FIJAN A RECEPTORES LOCALIZADOS EN LA SUPERFICIE CELULAR.
A. EL SEGUNDO MENSAJERO ES EL AMPc.
Catecolaminas α_2 -Adrenérgicas Catecolaminas β -Adrenérgicas Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) Angiotensina II Hormona Antidiurética (ADH) Calcitonina Glucagón Lipotropina (LPH) Hormona Luteinizante (LH) Hormona Estimulante de los Melanocitos (MSH) Hormona Paratiroidea (PTH) Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) Hormona Estimulante de los Folículos (FSH) Somatostatina Hormona Estimulante del Tiroides (TSH)
B. EL SEGUNDO MENSAJERO ES EL GMPc
Factor Natriurético Auricular (ANF) Óxido Nítrico (ON)
C. EL SEGUNDO MENSAJERO ES CALCIO O FOSFATIDILINOSITIDO (O AMBOS)
Acetilcolina

Hormona Liberadora de Gonadotropina (GnRH)
 Catecolaminas α_1 -Adrenérgicas
 Oxitocina
 Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF)
 Angiotensina II
 Sustancia P
 Colecistocinina
 Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)
 Gastrina
 Hormona Antidiurética (ADH, Vasopresina)

D. EL SEGUNDO MENSAJERO ES UNA CINASA O LA CASCADA DE FOSFATASAS.

Somatomamotropina Coriónica (CS)
 Factor de Crecimiento Epidérmico (EFG)
 Factor Nervioso de Crecimiento (NGF)
 Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF)
 Factor de Crecimiento derivado de Plaquetas (PDGF)
 Hormona del Crecimiento (GH)
 Prolactina (PRL)
 Insulina

Tabla 1: Clasificación de las hormonas a partir de su mecanismo de acción.

La insulina es una hormona liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas. La incapacidad de las células blanco de responder a la insulina, debido presumiblemente a defectos en su señalización, estado conocido como resistencia a la insulina, es una de las principales características de manifestaciones patológicas asociadas con la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), una de las primeras causas de muerte en México y a nivel mundial (Saltiel AR and Kahn CR, 2001).

1.2 Funciones de la insulina

La insulina es secretada por las células β del páncreas cuando aumentan los niveles de glucosa en sangre. La insulina inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis, estimula la glucolisis y la glucogénesis, estimula la captación e incorporación de aminoácidos en proteínas, inhibe la degradación de proteínas, estimula la lipogénesis y suprime la lipólisis (Figura 1) (Bassett, 1975).



Figura 1. Acciones de la insulina. (Martín, 1983)

1.3 Funciones de la insulina en tejidos

La insulina detiene el uso de los lípidos al inhibir la liberación de glucagón. Se puede considerar una hormona de almacenamiento al promover el movimiento de la glucosa y participa en la dirección del acetato y la absorción de los aminoácidos en los tejidos periféricos.

La insulina es el principal regulador hormonal del metabolismo en reposo (Brockman y Laarveld, 1986; Squires, 2011). En ausencia de insulina, la absorción de glucosa disminuye en los tejidos y aumenta la movilización de lípidos en los adipocitos. En presencia de insulina, la absorción de glucosa aumenta en los tejidos y disminuye la movilización de lípidos en los adipocitos (Frayn, 2009).

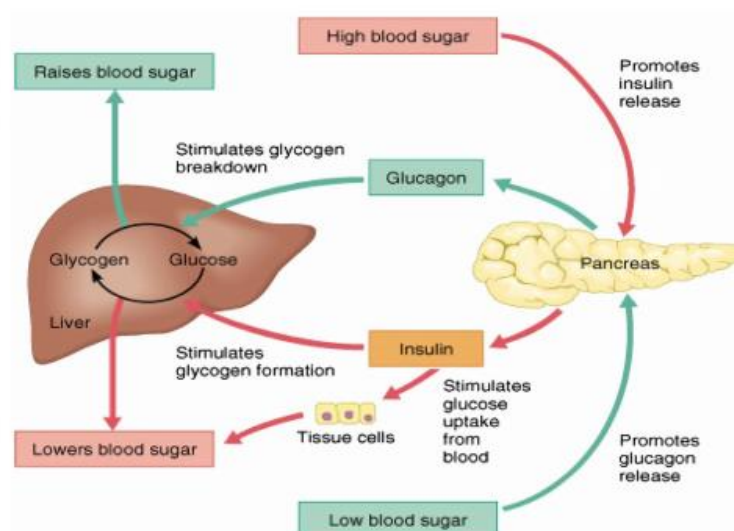


Figura 2. Ciclo de la insulina tras glucosa en sangre (Winter, 2013)

Inmediatamente después de una comida rica en carbohidratos la glucosa absorbida en el torrente sanguíneo causa una rápida secreción de insulina (Figura 2). La insulina a su vez, promueve una rápida captación, almacenamiento y uso de la glucosa sanguínea por casi todos los tejidos del cuerpo directamente (por ejemplo: cerebro, intestino) o indirectamente al afectar la movilización de triglicéridos del tejido adiposo (Dimitriadis, Mitrou, Lambardini, Maratou and Raptis, 2006).

La insulina aumenta el uso de glucosa por la mayoría de las otras células del cuerpo (excepto cerebro) y efectos sobre el transporte y uso de glucosa en las células musculares. Transporta la glucosa a los adipocitos para proporcionar glicerol a las moléculas grasas. Por lo tanto, la insulina promueve el depósito de grasa en estas células. Aumenta el movimiento de la glucosa en muchos tejidos periféricos (West & Passey, 1967) incluyendo músculo (Jarret, Filsell and Ballard, 1974) y tejido graso (Khachadurian, Adrouni and Yacoubian, 1966).

1.3.1 En hígado

Incrementa la actividad y estimula la síntesis de la glucocinasa, favoreciendo la utilización de glucosa, aumenta la vía de las pentosas que aporta NADPH al estimular a la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, aumenta la glucólisis por estimulación de la glucocinasa, fosfofructocinasa I y de la piruvatocinasa, favorece la síntesis de glucógeno, estimulando la actividad de la glucógeno sintetasa (GS), reduce la gluconeogénesis, al disminuir principalmente la síntesis de la fosfo-enol-piruvato-carboxi-cinasa (PEPCK), estimula la síntesis de proteínas, aumenta la síntesis de lípidos, al estimular la actividad de la ATP citrato liasa, acetil-CoA-carboxilasa y de la hidroximel-glutaril-CoA reductasa e inhibe la formación de cuerpos cetónicos (West and Passey, 1967).

1.3.2 En tejido muscular

Estimula la entrada de glucosa (por translocación de los GLUT 4 hacia la membrana), aumenta la glucólisis por estimulación de la fosfofructocinasa I y de la piruvatocinasa, estimula la síntesis de glucógeno al estimular la actividad de la GS, favorece la entrada de aminoácidos a la célula y su incorporación a las proteínas, estimula la síntesis e inhibe el catabolismo de proteínas, estimula la captación y utilización de los cuerpos cetónicos y estimula la bomba Na^+/K^+ , lo que favorece la entrada de K^+ a las células (Jarret, Filsell and Ballard, 1974).

1.3.3 *En tejido adiposo*

Estimula la captación (GLUT 4) y utilización de glucosa por el adipocito, aumenta la vía de las pentosas que aporta NADPH al estimular a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, favorece la captación de ácidos grasos al estimular a la enzima lipoproteínlipasa 1, que degrada los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas, estimula la síntesis de triglicéridos (al promover la glucólisis y la vía de las pentosas) e inhibe los procesos de lipólisis, por lo que se favorece la acumulación de éstos en los adipocitos (Khachadurian, Adrouni y and Yacoubian, 1966).

1.4 Generalidades de la insulina

La insulina es un polipéptido de peso molecular de 5800, compuesto por dos cadenas de aminoácidos, que en total tienen 51 aminoácidos. La cadena A, tiene 21 aminoácidos, y la cadena B tiene 30 aminoácidos. Ambas cadenas se encuentran unidas por 2 puentes de disulfuro ubicados entre los aminoácidos A-7/B-7, Y A-20/B-19. Además la cadena A, tiene también un puente interno de disulfuro entre los aminoácidos A-6/A-11. La integridad de la molécula es indispensable para ejercer las acciones farmacológicas. Las cadenas A o B, separadas luego de la destrucción enzimática de los puentes de disulfuro, carecen completamente de acciones farmacológicas. Los aminoácidos de las posiciones B-22 y B-30, son indispensables para el mantenimiento de las acciones metabólicas de la insulina.

La síntesis de la Insulina, se lleva a cabo en los islotes pancreáticos de Langerhans. En el islote, se han distinguido, por lo menos cuatro tipos celulares: células alfa: secretoras del glucagón pancreático (también es producido por las células argentafines de la mucosa gastrointestinal). Células Beta: productoras de insulina, Células D: secretoras de la somatostanina pancreática, que inhibe a la hormona del crecimiento, la secreción de la insulina, glucagón, renina, gastrina, secretina, pepsina y colescistoquinina (Feling P and Bergman M, 1995).

1.4.1 Biosíntesis

El gen precursor que codifica a la insulina es de 110 aminoácidos, y esta proteína es conocida como preproinsulina. La preproinsulina contiene una señal hidrofóbica N-terminal, que interactúa con partículas de reconocimiento de señal de ribonucleoproteína citosólica (SRP) (Egea PF, Stround RM and Walter P, 2005) SRP facilita la translocación de preproinsulina a través del retículo endoplásmico rugoso (rER). Este proceso ocurre a través del canal de conducción de péptidos (Chan SJ, Keim and Steiner DF, 1976), donde el péptido señal de la preproinsulina se enciende mediante una señal peptidasa para producir proinsulina (Patzelt C et al., 1978).

La proinsulina luego se somete a plegamiento y formación de tres puentes disulfuro (Huang XF and Arvan P, 1995), un proceso que requiere una amplia gama de chaperonas del retículo endoplásmico (ER) tales como la proteína-tiol reductasa (Munro S and Pelham HR, 1987). Después de la maduración de conformación tridimensional, la proinsulina plegada se transporta desde el RE al aparato de Golgi donde la proinsulina entra en las vesículas secretoras inmaduras y se enciende para producir insulina y péptido C. Estos se almacenan en estos gránulos secretores juntos con polipéptido amiloide de islotes (IAPP o amilina) (Steiner, DFKW et al., 1972; Nishi M et al., 1990). Aunque la biosíntesis de la insulina está controlada por múltiples factores, el metabolismo de la glucosa es el evento fisiológico más importante que estimula la transcripción del gen de la insulina y la traducción del RNAm (Poitout V et al., 2006). Además, la glucosa es un factor importante para mantener la estabilidad del RNAm de la insulina. Los estudios han demostrado que en la secuencia entre -340 y +91 es la principal región potenciadora de la transcripción del gen de insulina, que determina la expresión génica de la insulina específica de la célula y regulada por la glucosa (Crowe DT and Tsai MJ, 1989; Whelan J, Poon D, Weil PA and Stein R, 1989).

1.4.2 Factores Transcripcionales

Los factores transcripcionales son proteínas que regulan la transcripción de mRNA al unirse a secuencias específicas en los promotores y otros elementos cis de un gen determinado (Figura 3). Estas secuencias específicas se denominan elementos

de respuesta, y a pesar de ser indispensables para la unión del factor transcripcional al DNA, el efecto activador o represor de los factores transcripcionales sobre sus genes blanco depende de:

- La cantidad, localización y actividad del factor en el núcleo.
- Su interferencia o sinergia con otros factores transcripcionales y/o la maquinaria de transcripción
- El ambiente cromatínico del gen que regulan (Sperling S, 2007)

Dada su participación en la modulación específica de la expresión de proteínas que le otorgan a una célula la capacidad de realizar las funciones características de su tipo celular diferenciado, los factores transcripcionales juegan un papel crucial durante el desarrollo y mantenimiento del fenotipo de un organismo, incluyendo el páncreas (Sperling S, 2007).

La identificación de los factores de transcripción y el estudio del fenotipo que se presenta en modelos de ratones knockout para estas proteínas han permitido ampliar el conocimiento con respecto a las funciones de la célula β adulta y su regulación, revelando que muchos de ellos participan no sólo en la diferenciación sino también en el mantenimiento de las características propias de la célula β adulta (Habener JF, Kemp DM and Thomas MK, 2005). Sus mecanismos de acción y regulación en la célula β apenas comienzan a ser elucidados; sin embargo, se ha encontrado que la gran mayoría se caracterizan por reclutar acetiltransferasas de histonas como CBP o p300 hacia el promotor de su gen blanco, descompactar estructuras cromatínicas o unirse a otros cofactores (Huang H and Tindall DJ, 2007).

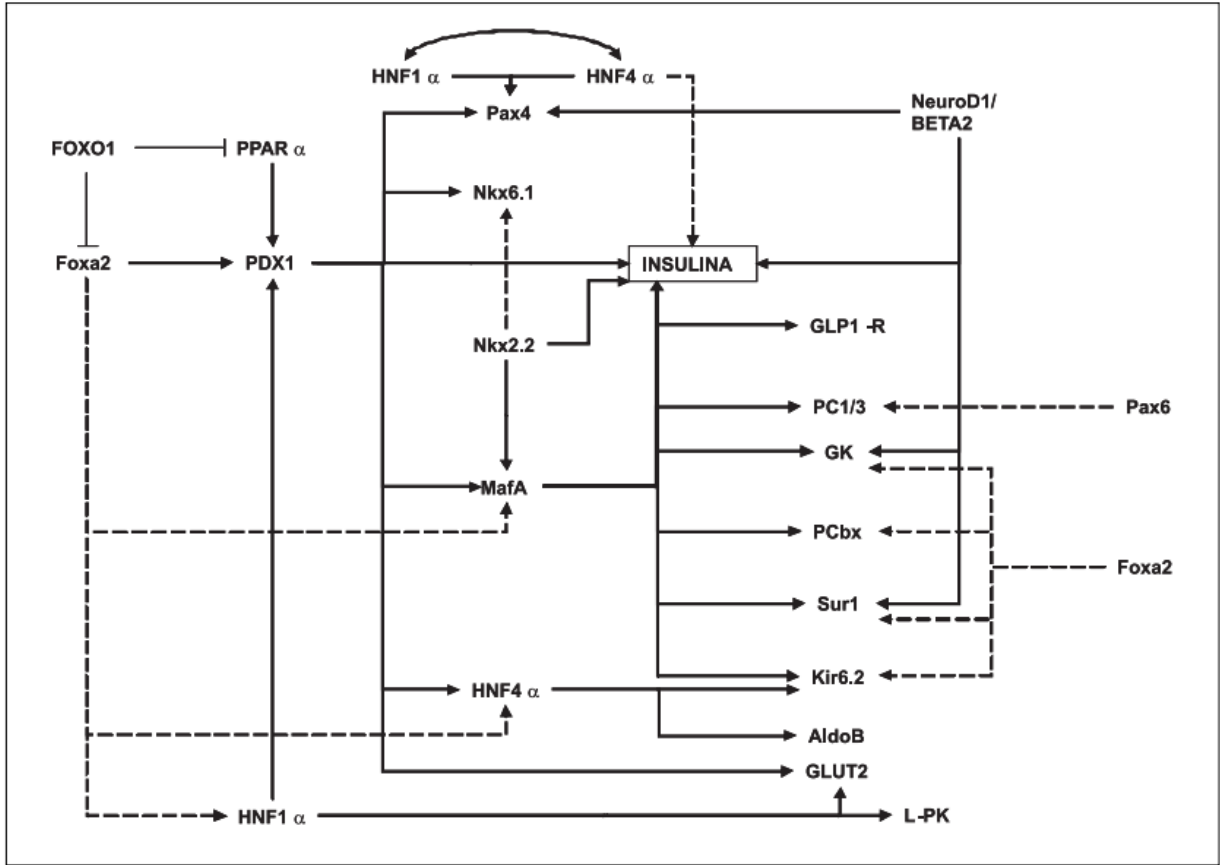


Figura 3. Redes transcripcionales en la célula β adulta y sus genes blanco. Los factores transcripcionales de la célula β se regulan entre ellos, y activan (\rightarrow) o reprimen ($-$) cooperativamente la expresión de genes que participan en la secreción de la insulina en respuesta a glucosa.

1.4.3 Resguardo de la insulina

La insulina es almacenada en las células β se empaqueta en “gránulos” densamente agrupados que consisten en insulina hexamérica cristalina insoluble. La concentración de insulina en estos gránulos es aproximadamente de 40 Mm (De Meyts P, 2004). La forma hexamérica de la insulina consiste en 6 moléculas de insulina dispuestas como 3 dímeros, aunque cada monómero en el dímero consiste en la misma secuencia peptídica, hay algunas diferencias en la conformación espacial de la cadena lateral de tal manera que no hay doble simetría (Pittman I, Philipson L and Steiner D, 2004). Un ejemplo es Phe (Cadena B, residuo 25), que

está orientado hacia el núcleo hidrofóbico del péptido en un lado del dímero, y doblado lejos del péptido en el otro lado del dímero. El hexámero de insulina coordina dos átomos de Zinc con el grupo imidazol de tres residuos de histidina (Cadena B, residuo 10) y tres moléculas de agua. En su estructura cristalina se encuentran 2 átomos de Zinc coordinando a los 6 monómeros formando trímeros. En presencia de altas concentraciones de cloruro en la célula β , se forma una estructura hexamérica con 4 átomos de Zinc coordinando formando dímeros.

Las interacciones entre los dímeros en el hexámero son más débiles que las interacciones dentro del dímero, con mayor separación de las fuerzas de Vander Waals entre los dímeros en el hexámero en comparación con las separaciones entre los monómeros en el dímero (Pittman I, Philipson L and Steiner D, 2004). Por lo tanto, la configuración del hexámero es menos estable y está sujeta a la disociación cuando las concentraciones de insulina fluctúan (por ejemplo, la secreción en el torrente sanguíneo).

1.4.4 Mecanismo de secreción de la insulina

El mecanismo molecular de secreción de insulina en respuesta a las concentraciones plasmáticas de glucosa es un mecanismo complejo que se inicia con la detección de los niveles glucémicos por parte de la célula β (Figura 3). La glucosa entra a la célula β por los transportadores de glucosa GLUT2, en el caso de roedores y principalmente por la isoforma GLUT1 en el humano (De Vos A, Heimberg H and H. Quartier, 1995). Una vez dentro de la célula, es fosforilada para formar glucosas-6-fosfato por la hexocinasa IV o glucocinasa, siendo éste el paso limitante de la glucólisis en la célula β pancreática. El aumento en la relación ATP/ADP debido a la generación de ATP por la glucólisis y el metabolismo mitocondrial provoca el cierre del canal de K^+ sensible a ATP (formado por cuatro subunidades de receptor o sulfonilurea 1 (SUR1) y cuatro unidades del canal rectificador de entrada de K^+ (Kir6.2). Este evento ocasiona una despolarización de la membrana plasmática, la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje y un flujo de calcio extracelular al interior de la célula, proceso que provoca la fusión de los gránulos de insulina con la membrana plasmática y la liberación de

la hormona (Fernández Mejía, 2006). Los canales de sodio participan también en la despolarización de las células β y por tanto, en la secreción de insulina (Hiriart M and Matteson DR, 1988) y se ha sugerido que los canales TRP contribuyen a esta despolarización y a la entrada de calcio a la célula y el flujo de calcio intracelular (Jacobson DA and Philipson, 2007) (Figura 4).

La secreción de insulina en respuesta a la concentración plasmática de glucosa puede ser aumentada o disminuida por neurotransmisores (acetilcolina, noradrenalina, entre otros) y hormonas (GLP-1) por medio de la activación de sus receptores en la célula β pancreática (Flat PR, 1996).

Diversos estudios han demostrado un papel autocrino de la insulina sobre la función y sobrevivencia de la célula β (Aikin R, Hanley S and Maysinger D, 2006). En este proceso, la unión de la insulina a su receptor promueve la autofosforilación del mismo, catalizando a su vez la posterior fosforilación en tirosina de proteínas como IRS (IRS1 e IRS2). Una vez fosforiladas, estas proteínas interactúan con moléculas de señalización, lo cual resulta en una cascada de fosforilaciones en las que se activan secuencialmente PI3K, PDK y Akt una cinasa de serina / treonina que regula procesos como la sobrevivencia celular, la proliferación, el crecimiento y el metabolismo de nutrientes mediante la fosforilación de distintas proteínas como GSK3, FOXO y CREB (Song G, Ouyang G and Bao S, 2005). Tanto el receptor de insulina activado a través de Shc. Como el IRS actúan también sobre la vía de señalización de Ras, y este a su vez sobre las vías de las MAP cinasas ERK1/2, las cuales regulan el crecimiento, diferenciación celular y la síntesis de proteínas (Kahn SE and Hull RL, 2006). Existen además otras vías que modulan la función de las células β . Entre ellas se encuentra la mediada por receptores que activan proteínas Gs y a la adenilato ciclasa, que participa en la regulación de la secreción de insulina por algunos neurotransmisores como la acetilcolina y hormonas como el GLP1. Los ligandos que aumentan la actividad de la adenilato ciclasa y AMPc tienen un efecto positivo sobre la síntesis y secreción de insulina (Sharp GW, 1979), en tanto que los ligandos que disminuyen la actividad de la adenilato ciclasa afectan la secreción de la insulina de manera negativa. Estudios recientes han demostrado que el GLP-1,

una hormona proteica producida por las células endocrinas del intestino, es un factor importante para la síntesis y secreción de insulina y posee un efecto trófico para las células β (Baggio LL and Drucker DJ, 2007). En la célula β también se activan vías de señalización en respuesta al estrés oxidativo ocasionado por altos niveles de glucosa, como la vía de JNK, suprimiendo la síntesis de insulina e interfiriendo con su acción (Kaneto H, Nakatani Y and Kawamori D, 2006).

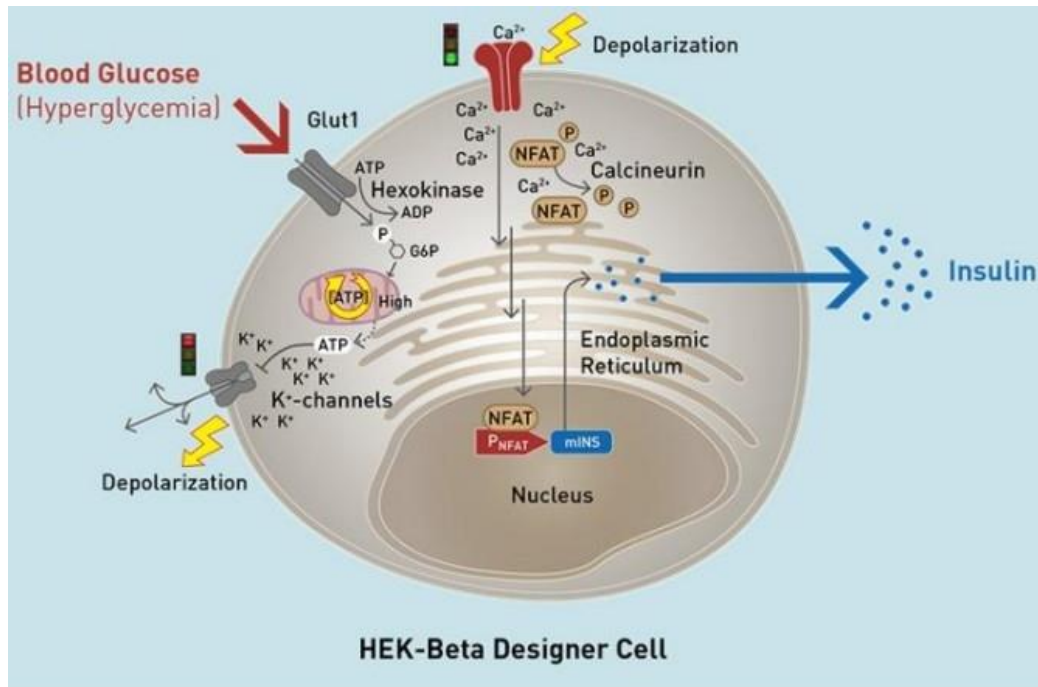


Figura 4. Proceso de secreción de insulina en respuesta a glucosa y papel autocrino de la insulina en la célula β .

1.4.5 Regulación de la secreción de insulina

La insulina es una hormona importante requerida para el metabolismo normal. En sujetos sanos, la liberación de insulina es exacta para satisfacer la demanda metabólica. Específicamente, las células β detectan cambios en la concentración de glucosa en plasma y la respuesta liberando las cantidades correspondientes de insulina (Schmitz O, Rungby J and Edge L, 2008). Para detectar el estado nutricional, las células β se agrupan en islotes que se conectan estratégicamente a la vasculatura. Los islotes forman una red densa con pequeños vasos sanguíneos y reciben 10 veces la cantidad de sangre que las células en las regiones exocrinas circundantes. Los capilares que rodean los islotes muestran una noble cantidad de pequeños poros llamados fenestros que permiten un mayor intercambio

de nutrientes entre la circulación y los tejidos circundantes. Esta estructura mejora la permeabilidad, lo que permite el acceso ilimitado de nutrientes para que las células β puedan detectar el estado nutricional rápidamente. Las fenestraciones también permiten una rápida difusión de insulina al torrente sanguíneo (Suckale J and Solimena M, 2008).

Además de la glucosa, algunos aminoácidos y ácidos grasos también regulan la secreción de insulina. Una ilustración esquemática de la secreción de insulina regulada por nutrientes se muestra en la figura 4.

1.4.6 Glucosa y secreción de insulina

Las células β responden a muchos nutrientes en la circulación sanguínea, incluida la glucosa, otros monosacáridos, aminoácidos y ácidos grasos. La glucosa es, desde el punto de vista evolutivo, el principal estímulo para la liberación de insulina en algunas especies animales, ya que es un componente alimenticio principal y puede acumularse inmediatamente después de la ingestión de alimentos. De hecho, en roedores y humanos, la amplitud de la secreción de insulina inducida por la glucosa es mucho mayor en comparación con la estimulación por proteína o grasa. La ingesta oral de 75 g de glucosa hará que la insulina plasmática aumente desde un nivel basal (20-30 pmol/L) a 250-300 pmol/L en 30 min, mientras que la ingesta de una cantidad similar de grasa o una dieta rica en grasas y proteínas solo aumentará los niveles de insulina en plasma a 50 y 60 pmol/L, respectivamente, en sujetos humanos (Chang TW and Goldberg AL, 1978). Si bien la glucosa es la fuente de combustible obligada para las neuronas (Suckale J and Solimena M, 2008), otras células, incluidas las células β , pueden usar fuentes de combustible alternativas durante breves periodos de inanición, una adaptación que podría predisponerlas a la glucolipototoxicidad.

Las células β no parecen contener receptores de glucosa unidos a la membrana, pero están equipadas con varios dispositivos sensores que miden la glucosa circulante. El transportador de glucosa 2 (GLUT2), expresado constitutivamente en células β , es el primer sensor de glucosa encontrado en estas. La glucosa se equilibra a través de la difusión facilitada mediada por GLUT2. También se expresa en el hígado y, en menor medida, en células de absorción renal e intestinal. A diferencia del GLUT4, que se expresa principalmente en las células musculares y adiposas. La movilización de GLUT2 a la membrana plasmática es independiente de la insulina y la proteína transportadora muestra una baja afinidad por el sustrato, asegurando un alto flujo de glucosa. Después de ingresar

en las células β , la glucosa es fosforilada por la enzima limitante de la velocidad glucocinasa, un subtipo de hexocinasa. La glucocinasa se expresa en solo cuatro tipos de células de mamíferos: células hepáticas, células β , enterocitos y neuronas sensibles a la glucosa (Suckale J and Solimena M, 2008). Existen dos propiedades importantes que permiten que la glucocinasa funcione como un sensor de glucosa en las células β , distinguiéndola de otras hexocinasas. La primera propiedad es su afinidad relativamente menor por la glucosa que otras hexocinasas. Su K_m es solo 6 mmol/L, cayendo en medio del rango normal de glucosa en sangre (4-10 mmol/L), mientras que otras hexocinasas funcionan a la velocidad máxima en esta concentración de glucosa. La segunda propiedad es que no está inhibida por su producto. Esta característica permite su actividad continua a pesar de una alta carga de glucólisis. La glucocinasa es, por lo tanto, el paso limitante en el metabolismo de la glucosa de las células β y se considera que es un importante sensor de glucosa (Suckale J and Solimena M, 2008).

El punto final de la glucólisis es el sustrato metabólico "piruvato" que luego es oxidado a través del ciclo del ácido tricarboxílico por las mitocondrias en las células β para producir ATP. En otros tipos de células, la piruvato deshidrogenasa puede convertir el piruvato en lactato. Sin embargo, debido a que las células β carecen de esta enzima, el piruvato se metaboliza principalmente para producir un acoplamiento metabólico a través de dos rutas: 1) Después de ser metabolizado a acetil-CoA entra en oxidación de glucosa y 2) anaplerosis. La oxidación de piruvato a través del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) por mitocondrias es la principal vía de señalización acoplada a "liberación de insulina dependiente del canal de potasio sensible a ATP" (K_{ATP}), y consecuentemente lleva a la exocitosis de gránulos que contienen insulina. La anaplerosis sirve para reponer el grupo de carbono en el ciclo de TCA. Después de que el ciclo se llena con intermedios, estos carbonos pueden salir por cataplerosis. Algunos productos derivados en estos procesos pueden actuar como señales de secreción de insulina, que incluyen, NADPH, malonil-CoA y glutamato. Estas moléculas pueden amplificar la secreción de insulina dependiente del canal K_{ATP} (Chang TW and Goldberg AL, 1978; Meachler P and Wollheim CB, 1999).

Una tercera señal de glucosa resulta de la formación de glicerol-3-fosfato (Gly3P). Después de que la glucosa se fosforila en glucosa-6-fosfato (G6P) por la glucocinasa, G6P puede entrar en la glucólisis para generar piruvato. También se puede metabolizar en fosfato de dihidroxiacetona (DHAP) parte del camino a través de la ruta para proporcionar Gly3P. El Gly3P es importante para generar factores de acoplamiento metabólico de los lípidos, como

la acil-CoA de cadena larga y el diacilglicerol (DAG) que pueden aumentar la secreción de insulina. El Gly3p/DAG es una ruta alternativa que es independiente del metabolismo mitocondrial de la glucosa para producir factores de acoplamiento metabólico para estimular la liberación de insulina. El Gly3P también puede reponer NAD⁺ para promover la glucólisis de las células β mediante el proceso de transferencia mitocondrial Gly3P NADH, que luego activa el metabolismo de la energía mitocondrial y desencadena la secreción de insulina (Eto K et al., 1999).

1.4.7 Aminoácidos y secreción de insulina

Ciertas combinaciones de aminoácidos en concentraciones fisiológicas superiores pueden aumentar el GSIS (Glucose-Stimulated Insulin Secretion) (Sener A and Malaisse WJ, 1980). Por ejemplo, la glutamina sola no estimula la secreción de insulina, ni mejora el GSIS, sino una combinación de la glutamina con leucina puede mejorar el GSIS en las células β (Dixon G et al., 2003). La leucina puede activar la glutamato deshidrogenasa, que convierte el glutamato en α -cetoglutarato. Glutamina, después de convertido en glutamato por la glutaminasa en el citosol, puede entrar en el ciclo de TCA a través de α -cetoglutarato, que resulta en la producción de ATP, lo que mejora la secreción de insulina (Sener A and Malaisse WJ, 1980). Sin leucina, la glutamina se metaboliza a ácido γ -aminobutírico (GABA) y aspartato. Además, algunos aminoácidos pueden influir indirectamente en la secreción de insulina de las células β . Durante el periodo de ayuno, las proteínas en el músculo esquelético se catabolizan y los aminoácidos se metabolizan posteriormente para generar energía. Los aminoácidos libres, que incluyen alanina y glutamina, se liberan en la sangre y sirven como potentes secretagogos de glucagón. Esto desencadena una elevación en los niveles de glucosa, que luego desencadena la secreción de insulina. Los aminoácidos dietéticos también pueden inducir secreción de insulina a través de mecanismos dependientes de incretinas. Polipéptido inhibidos gástrico (GIP) y el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) son las dos principales hormonas incretinas secretadas por el tracto gastrointestinal. Ingestión de nutrientes en el intestino, incluyendo glucosa y aminoácidos, estimula la secreción de estas hormonas desde las células K intestinales y las células L. Estas hormonas luego actúan directamente sobre las células β uniéndose a sus receptores específicos de superficie celular, aumentando GSIS (Tang-Christensen M et al., 1997; MacDonald PE et al., 2002).

1.4.8 Ácidos grasos y secreción de insulina

Los ácidos grasos libres (AGL) también influyen en las células β en la secreción de insulina. Potencian la secreción de insulina para compensar el aumento de la necesidad de insulina como consecuencia de la resistencia a la insulina en la DM2 (Crespin SR, Greenough WB 3rd and Steinberg D, 1969; Stein DT et al., 1996). Recientemente, se descubrió que las células β tienen un receptor de ácidos grasos libres (FFAR)-1, a través del cual FFA puede influir en la función de las células β (Briscoe CP et al., 2003; Itoh Y et al., 2003). El metabolismo intracelular de FFA es la fuente de síntesis de moléculas de señal lipídica, como acil-CoA de cadena larga (Prentki M et al., 2002) y DAG (Prentki M et al., 2002; Prentki M, 1996). La acil-CoA de cadena larga podría acilar proteínas esenciales en la fusión de gránulos de insulina, como la proteína-25 asociada a sinaptosoma (SNAP-25) y la sinaptogamina (Chapman ER et al., 1996). DAG activa la proteína quinasa C, que está implicada en la secreción de insulina (Prentki M and Matschinsky FM, 1987). También se une a proteína de cebado sináptica Munc-13 para promover la secreción de insulina.

1.5 Aminoácidos importantes en la coordinación

1.5.1 Histidina

Es un alfa-aminoácido con grupo funcional imidazol. Es uno de los 22 aminoácidos proteínogénicos. La histidina fue aislada por primera vez por el médico alemán Albrecht Kossel en 1896. La histidina es un aminoácido esencial en humanos y otros mamíferos. Inicialmente se pensó que solo era esencial para los pediátricos, pero estudios a largo plazo establecieron que también es esencial para los adultos. La histidina es un precursor de la biosíntesis de histamina y carnosina (Serot JM, 2005). La eficacia de la L-histidina es un aminoácido relevante en la estructura de la insulina debido a la capacidad del anillo de imidazol para secuestrar especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por las células durante la respuesta inflamatoria aguda, si dichas especies o metales se unen al anillo imidazólico cambia la estructura hexaédrica de la insulina a romboédrica, por lo tanto su receptor no puede reconocerla trayendo como efecto principal la elevación de glucosa en torrente sanguíneo (Leoni V, 2004).

La histidina en la insulina se ubica en las posiciones B5 Y B10. El papel de la HisB10 está bien definido: aunque no se requiere en la hormona madura para la unión del receptor, en la célula β de los islotes esta cadena lateral actúa al dirigir la proinsulina a los gránulos secretores regulados por glucosa y proporciona sitios axiales de unión a $Zinc^{2+}$ en hexámeros de almacenamiento. Por el contrario, el papel de HisB5 es menos conocido, se sabe que facilitan la alineación de CysA7 y CysB7 (Steiner D.F., 2004).

1.5.2 Cisteína

Es un aminoácido dimétrico no esencial unido covalentemente, formado por la oxidación de la cisteína. Dos moléculas de cisteína se unen mediante un puente disulfuro para formar cistina (Ishwata S & Itoh K, 1995).

No es considerado uno de los 20 aminoácidos esenciales, la cistina es un derivado que contiene azufre obtenido a partir de la oxidación de las cadenas laterales de tiol del aminoácido cisteína. En la insulina funciona como un antioxidante, ya que secuestra especies reactivas de oxígeno (ROS) y metales que puedan cambiar la estructura hexaédrica de la misma. Se encuentra en la insulina en la cadena B consiste en dos cadenas extensas conectadas por el centro de un segmento α helicoidal, B9Ser-B19Cys (Cheng Y et., al, 2011).

La cistina es una forma dimérica oxidada de cisteína. Se forma uniendo dos residuos de cisteína a través de un enlace disulfuro (Cys-S-S-Cys) entre los grupos $-SH$, en la insulina este enlace disulfuro le concede estabilidad en su conformación hexaédrica (Weir TL & Manter DK, 2013).

1.5.3 Ácido glutámico

Es también conocido como glutamato (el anión), es uno de los 20 aminoácidos proteínogénicos. No está entre los aminoácidos esenciales. El glutamato es una molécula clave en el metabolismo celular. En los seres humanos, las proteínas de la dieta se descomponen por digestión en aminoácidos, que sirven como combustible metabólico u otros papeles funcionales en el cuerpo.

En la insulina el ácido glutámico se encuentra en la posición B13 (en la cadena B; posición 13) y tiene cierta afinidad por el Zn^{2+} (Molinari F & Raas-Rothschild A, 2004). El ácido glutámico recobra gran importancia debido a que en recientes investigaciones se sabe que pueden aparecer anticuerpos anti glutamato descarboxilasa (GADA) en la diabetes mellitus tipo 2, una detección de estos puede proporcionar una mejor predicción del requerimiento de tratamiento con insulina a 6 años de seguimiento que las variables clínicas (Robert Turner et., al, 2010).

1.6 Insulina- Zn^{2+}

En presencia de iones zinc, la insulina forma hexámeros. Estas formas agregadas de insulina se usan en preparaciones terapéuticas para el control de la diabetes y también han sido el sujeto de numerosas investigaciones cristalográficas (Bentley y col., 1976,1992; Smith et al., 1984; Baker et al., 1988; Derewenda et al., 1989; Smith y Dodson, 1992).

La estructura cristalina de la insulina se informó por primera vez como romboedro "Forma 2-Zn" (Adams et al., 1969), nombrado de acuerdo a su contenido de zinc (Schlichtkrull, 1958). En múltiples resultados se ha mostrado que un eje triple en el cristal de insulina genera el hexámero de un dímero de insulina. Tienen conformaciones idénticas y son relacionados entre sí por un eje local. La conformación de cada cadena A consiste en dos α hélices antiparalelas conectadas por una extensión corta de A9Ser-A12Ser, mientras que cada cadena B consiste en dos cadenas extensas conectadas por el centro a un segmento α helicoidal, B9Ser-B19Cys. Cada uno de los dos iones zinc se encuentra en un eje cristalográfico de 3 pliegues y está coordinado por las cadenas laterales de tres residuos de histidina B10 relacionados con la simetría

Cada uno de los dos iones de zinc se encuentra en un eje cristalográfico de 3 pliegues y está coordinado por las cadenas laterales de tres residuos de histidina B10 relacionados con la simetría de cada uno de los dos trímeros de insulina. La

adición de un ion cloruro al medio de cristalización produce una segunda forma de cristal romboédrico, que también posee un hexámero 3 veces simétrico.

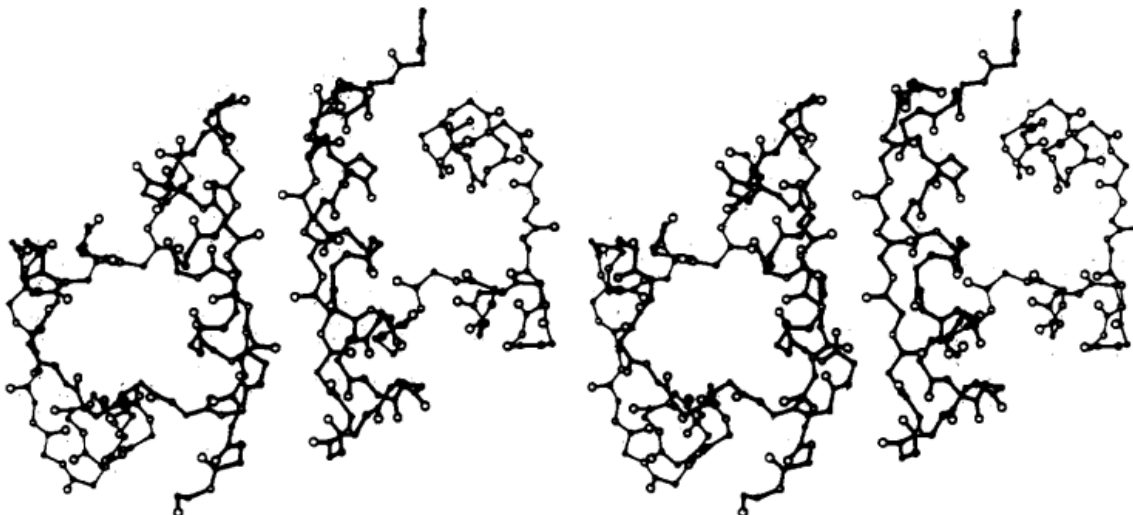


Figura 5. Dibujo estéreo de los átomos de la cadena principal del dímero de insulina TR visto a lo largo del eje local 2 veces. Las cadenas A y B están dibujadas con enlaces delgados y gruesos, respectivamente, y el monómero I (conformación T) está en el lado izquierdo del dímero

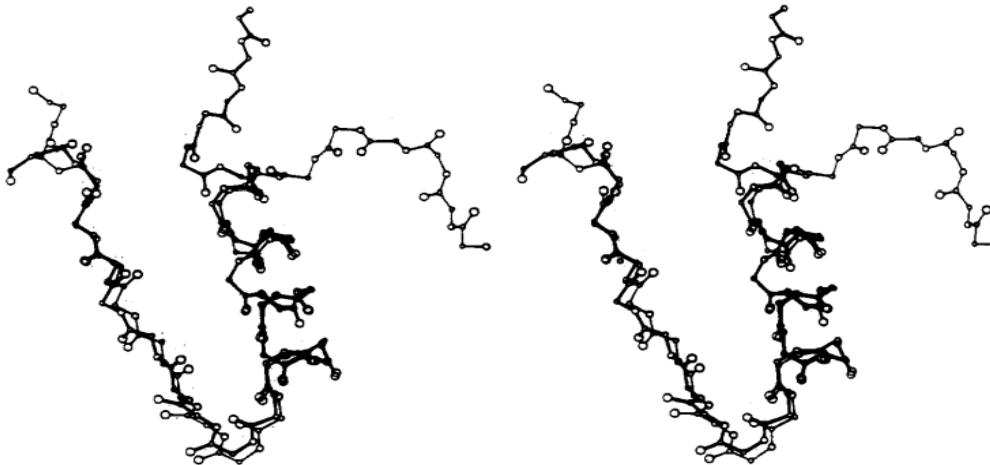


Figura 6. Superposición de la cadena B del monómero I (enlaces delgados) sobre la del monómero I1 (enlaces gruesos).

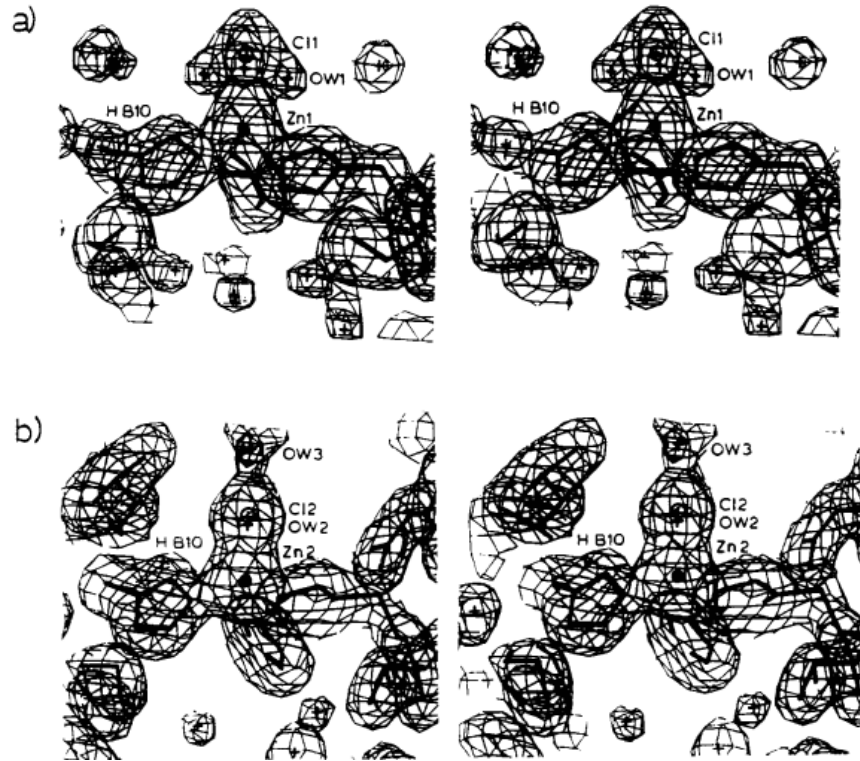


Figura 7. Vistas estereoscópicas del mapa de densidad de electrones 2F0-F superpuesto a los átomos en la vecindad de los conjuntos de unión de iones de zinc en a) el lado T1 y b) el lado R3 del hexámero de insulina T3R3. Los contornos se dibujan en una desviación estándar. Los iones de zinc se representan como círculos llenos, iones de cloruro como círculos cruzados y moléculas de agua como cruces.

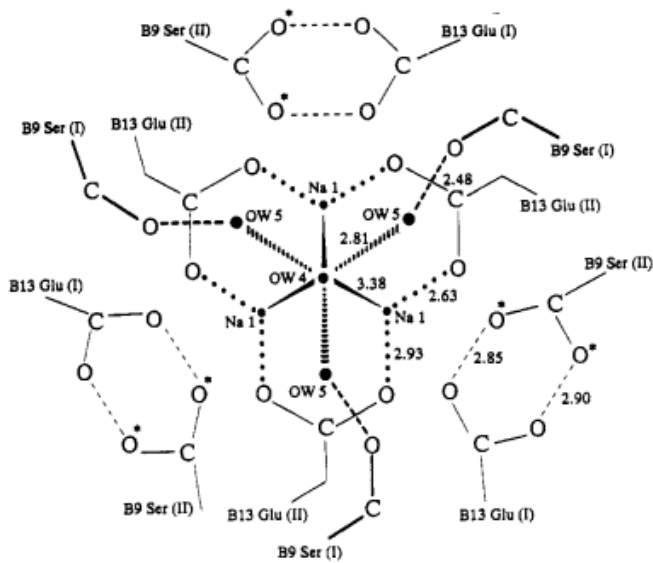


Figura 8. Dibujo esquemático del centro del hexámero de insulina visto a lo largo del eje cristalográfico. Los enlaces de hidrógeno son ilustrados con líneas discontinuas, mientras que las líneas punteadas representan posibles interacciones con el ion sodio. El asterisco se dibuja al lado del grupo hidroxilo de la cadena lateral de B9Ser del monómero 11, que se observa en dos orientaciones discretas.

1.7 Similitudes entre Zinc y Cadmio.

Cadmio y Zinc ambos son metales de transición situados en grupo 12 de la tabla periódica, por lo que las propiedades del Cd^{2+} son análogas a las del Zn^{2+} .

Estos elementos presentan 12 electrones de valencia: 2 electrones s de la última capa y 10 electrones d de la penúltima capa. Estos elementos ostentan un estado de oxidación 2+ en el que los iones tienen una distribución electrónica d^{10} relativamente estable, con una subcapa completa.

Estos metales al presentar una distribución electrónica muy estable, son más nobles que los elementos del grupo 2 (alcalinotérreos), por lo que aumenta este carácter según crece el número atómico. Además presentan puntos de fusión y ebullición muy bajos, mayor carácter covalente en los enlaces, compuestos más insoluble y mayor tendencia a la formación de complejos que los del grupo 2 (N.J.Barrow, J.Gerth & G.W. Brümmer, 1985).

1.7.1 Propiedades físicas

- 1) Poseen brillo metálico. El Zinc es brillante y de color blanco azulado. El Cadmio es de color blanco azulado.
- 2) Son sólidos en su estado natural.
- 3) Son metales duros y frágiles, pero se vuelve maleable entre 100 y 150°C. Presentan bajos puntos de fusión y de ebullición.
- 4) Son conductores de calor y energía aceptables.

1.7.2 Propiedades químicas

- 1) Ambos forman una gran cantidad de aleaciones
- 2) Originan compuestos bastante insolubles
- 3) Forman compuestos de coordinación coloreados, esto debido a su facilidad para formar enlaces covalentes con la participación de electrones d y por su tendencia a reaccionar químicamente en diferentes estado de oxidación estables y a cambiar con relativa facilidad de unos estados de oxidación a otros.

1.8 Acción fisiológica del Cadmio

Los efectos del envenenamiento agudo con cadmio en humanos son muy severos. Entre ellos están la tensión arterial alta, daños en el riñón, destrucción del tejido testicular y destrucción de eritrocitos. Se cree que gran parte de la acción fisiológica del cadmio proviene de su similitud química con el Zn^{2+} (Tanmoy Karak et., al 2005). Específicamente, el Cd^{2+} puede reemplazar el Zn^{2+} en algunas enzimas y proteínas como lo es en el caso de la insulina, alterando la estereoestructura de la enzima y dañando su actividad catalizadora, en el caso de la insulina cambia su conformación evitando así que esta sea reconocida por su receptor. Todo ello da como resultado el desarrollo de diversas enfermedades, como lo es la DM2.

1.9 Generalidades del Cadmio

Entre 1804 y 1817 se descubrió simultáneamente la existencia de Cd^{2+} por diversos investigadores, al cual se le dio diversos nombres (Cadmium, Vestium, Vestalum, Junonium, Melinium y Klaprothium), de todos ellos solo perduro Cadmium nombre otorgado por los alemanes Federico Stronmeyer en Göttingen y por Hermann en Schöneberg, por haberlo encontrado en el mineral Cadmia, el cual es rico en Zn^{2+} . Históricamente todos los episodios ambientales de contaminación con Cd^{2+} ha sido resultado de la contaminación proveniente de la minería y del refinado de materiales no ferrosos. Aunque en la actualidad una de las fuentes de mayor impacto en el aporte del metal al ambiente es el empleo de combustibles fósiles, como carbón y petróleo, también puede ser liberado por el refinamiento de zinc, plomo y cobre (ATSDR, 2008; 2012).

El Cd^{2+} forma parte del grupo XII de la Tabla Periódica, pertenece a los metales de transición y su valencia es de 2, de numero atómico 48 y masa atómica de 112.4 g/mol; posee 4 isótopos naturales y dos radioactivos. Es un metal dúctil, inodoro, plateado suave, que puede mejorarse por medio de aleaciones; posee una densidad de 8.64 g/cm³ y sus vapores son 3.88 veces más pesados que el aire. Debido a que la presión de vapor es relativamente alta, pasa fácilmente a este estado, oxidándose rápidamente a oxido de Cd^{2+} que permanece en el aire. Cuando en la atmosfera hay gases o vapores reactivos como el bióxido de carbono o de azufre, vapor de

agua, trióxido de azufre o ácido clorhídrico, el óxido de Cd^{2+} reacciona con ellos y produce respectivamente carbonato, sulfito, sulfato, hidróxido y cloruro de Cd^{2+} , según datos de la International Agency for Research on Cancer (IARS) (ATSDR, 2008; 2012; IARC 2008).

El Cd^{2+} se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre en una concentración promedio de 0.1 mg/kg; en las rocas sedimentarias las concentraciones son más elevadas. Las condiciones ambientales de erosión, es causa del transporte de grandes cantidades del metal a los océanos, en el que el contenido de este es de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, de tal suerte que los sedimentos oceánicos cerca de áreas con alta actividad humana puede contener concentraciones muy elevadas, asociadas con la descarga de desechos biológicos. Dadas las condiciones anteriores, la flora y la fauna marina pueden ser contaminadas con una gran cantidad de Cd^{2+} , por lo que su ingesta en el humano es una condición “natural” de la adquisición del mineral, siendo los de mayor aporte el pescado, los crustáceos y mariscos (González et al., 1997).

El Cd^{2+} es un elemento relativamente raro en la litosfera, sin embargo entre 1951 y 1980, la emisión antropogénica excedió por mucho la natural, que principalmente es propiciada por la actividad volcánica, la cual es estimada de entre 100 y 500 toneladas anuales. En este periodo el hombre colaboro con 8000 toneladas por años, contaminando primordialmente suelos de cultivo, propiciando la aparición del metal en la dieta del humano y animales de consumo. Debido a las características químicas de este metal, se fija más rápidamente que el plomo a las moléculas y compite fuertemente con metales divalentes como calcio (Ca^{2+}) y Zn^{2+} , distribuyéndose en los diferentes tejidos vegetales y animales (Goyer, 1997).

Adicionalmente, una fuente que contribuye al incremento del metal en plantas, es la utilización de fertilizantes a base de fosfatos, en donde el Cd^{2+} se encuentra en forma iónica como contaminante natural. Aunado, también se encuentra en los lechos de ríos como consecuencia de descargas industriales que contaminan suelos y mantos freáticos. La concentración de Cd^{2+} biodisponible aumenta cuando disminuye el pH del suelo, por lo que la lluvia ácida contribuye al aumento de su

nivel en los elementos (Goyer, 1997; Beyersmann et al., 19997). La fabricación y utilización de cemento por las constructoras ha contribuido fuertemente en la contaminación de suelos, así como, la disposición de residuos sólidos y aguas residuales municipales. Los desechos sólidos se depositan en terraplenes, lo que propicia el aumento del xenobiótico en suelos regionales (IARC, 2008).

El aire también es una vía de propagación del metal; en éste se encuentra unido a partículas de rango respirable. El óxido de Cd^{2+} en el aire es la especie química a la cual se exponen en mayores proporciones tanto animales como vegetales; sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que otras sales como el cloruro de Cd^{2+} usado para estabilizar pigmentos en plásticos, han incrementado la exposición ambiental. También, la incineración de plásticos de forma indiscriminada, así como de llantas, asfalto, combustibles fósiles y algunos otros productos con los que se tiene contacto de forma común, contribuyen al aumento de las concentraciones ambientales (IARC, 2008).

Dadas las condiciones de contaminación del ambiente por el xenobiótico, es inminente su presencia en alimentos de diversa naturaleza, y por lo tanto también en el ser humano. Los alimentos son la fuente de exposición más importante al metal en personas no expuestas de forma ocupacional. Aunque el consumo de alimentos es en general, menos eficiente que el consumo de agua o la exposición al aire contaminado, en los alimentos se une a péptidos y proteínas de bajo y alto peso molecular, lo cual facilita su absorción. El metal se encuentra presente en la mayoría de los alimentos en un amplio intervalo de concentraciones, siendo los productos marinos los que contienen mayor cantidad de Cd^{2+}/g de tejido, seguidos de vísceras de mamíferos y carne de aves, cereales así como en vegetales. Los alimentos con menor contenido son el huevo y la leche (González et al., 1997; ATSDR, 2012; IARC, 2008).

1.10 Química de Coordinación del cadmio y su relevancia biológica

Con un orbital d^{10} completamente lleno, la biología del Cd^{2+} se asemeja a la del Zn^{2+} con respecto a la flexibilidad en la coordinación y la falta de química redox, por lo tanto, el único estado importante en biología es el cadmio (II). El radio iónico del

cristal de Cd^{2+} (109 pm) ciertamente es más grande que el del Zn^{2+} (88 pm), lo cual incrementa el potencial del cadmio para adoptar un mayor número de coordinaciones, con longitudes de enlaces ligeramente más largas en sus compuestos de coordinación. El Cd^{2+} se comporta como un ácido de Lewis más débil que el propio zinc, por lo que presenta estabilidades ligeramente menores en complejos con oxígeno y ligandos nitrogenados (Blindauer and Schmid, 2010). Sin embargo, la afinidad relativa de los dos iones es reversa para ligandos sulfúricos, por lo que el cadmio es considerablemente más tiofílico que el zinc. Este hecho ha sido expresado como una regla de estabilidad conocida como la afinidad en la serie de Irving – Williams (Giedroc and Arunkumar, 2007). La biología del cadmio no está completamente documentada en la literatura, pero quizá la característica más importante del metal para la interpretación de sus efectos biológicos intracelulares, es su química de coordinación con azufre que es típico para condiciones intracelulares, pero no lo es tanto para su coordinación extracelular. Ya que fuera de las células, el potencial de reducción es mayor que en el interior, y la mayoría de los grupos sulfhidrilo son oxidados a disulfuros. Con un relativamente alto número de donantes tiofílicos disponibles intracelularmente, en promedio, el cadmio se une con mayor fuerza que el zinc a estos aminoácidos de las proteínas. En esferas de coordinación biológicas con múltiples ligandos de cisteína, la afinidad se magnifica, claro ejemplo de ello es la metalotioneína (MT), en la que el cadmio es coordinado como un tetratiolato y su unión es tres órdenes de magnitud mayor que la de zinc. A partir de estas consideraciones se puede predecir que el cadmio se une con disminución de afinidad en la serie de sitios tetraédricos de zinc en las proteínas: $\text{ZnS}_4 > \text{ZnNS}_3 > \text{ZnN}_2\text{S}_2$ como se ha comprobado experimentalmente (Méplan et al., 1999). Además el cadmio se une con mayor fuerza a ZnS_4 que a ZnN_2S_2 ya que son sitios característicos de factores de transcripción conocidos como dedos de zinc (Golovine et al. 2010). La elevada afinidad sobre las proteínas propicia que concentraciones bajas de cadmio puedan desplazar a concentraciones más altas de zinc de sus sitios de coordinación, incluso con donadores de oxígeno o nitrógeno. Sin embargo, para lograr la unión en sitios proteicos ZnS_4 , la concentración de los iones cadmio necesitan ser sólo una milésima parte respecto del zinc para lograr

una competición efectiva (Degryse et al., 2012). En un intento de aplicación biológica, la serie de Irving-Williams la cual se basa en los átomos donadores de nitrógeno y oxígeno en ambientes de coordinación similares, el cadmio se une relativamente mejor en comparación con los cationes alcalinotérreos de calcio y de magnesio. En este sentido el cadmio es 6 órdenes de magnitud más afín que el calcio y cerca de nueve órdenes de magnitud más que el magnesio (Prozialeck and Lamar, 1999; Williams, 2002). Por lo que el cadmio también puede competir con calcio, en condiciones celulares la cuales presenten una concentración milimolar o incluso nanomolar, sin embargo, ya que el ambiente celular presenta una gran capacidad amortiguadora conferida por los sitios de coordinación tiolato, los cuales son de alta afinidad para cadmio, y en estos el calcio no presenta unión, por lo que la competencia en estos sitios no se da realmente, sin embargo de forma inversa el cadmio si presenta competencia por los sitios proteicos de unión a calcio ya que el radio iónico de Ca^{2+} (114 pm) es bastante similar al que presenta el Cd^{2+} (109 pm). Bajo estas condiciones, en el terreno teórico el cadmio podría también competir eficazmente con los sitios tiólicos de unión a Cu^+ o hierro, en proteínas Fe-tiólicas, aunque de manera experimental se carece de dicha información (Moulis, 2010).

Un análisis del proteoma bajo diferentes condiciones de exposición a cadmio no se ha realizado, en parte debido a que los compuestos de coordinación no sostienen fácilmente las condiciones empleadas para un análisis proteómico eficiente. Por lo tanto, no se conoce con certeza qué otras proteínas, distintas de MT pueden contener cadmio en condiciones “normales” o de baja exposición. Estas consideraciones tienen aún otras consecuencias importantes. Los iones esenciales de metales de transición son homeostáticamente controlados. En cambio, el cadmio que no es esencial en animales, ni en el hombre y no está del todo bajo dicho control. Tanto los iones metálicos esenciales como los no esenciales son amortiguados en concentraciones que se rigen por la serie de Irving-Williams (Irving and Williams, 1948). Un ion metálico no esencial, como lo es el cadmio, no es amortiguado por un sistema específico, pero puede interactuar con moléculas que participan en el control iónico de metales esenciales de transición. Para entender la coordinación biológica del cadmio, se debe considerar su unión a proteínas en

concentraciones picomolares o incluso menores, principalmente con grupos tiólicos, mismos que amortiguan al zinc intracelular. Bajo estas características, la bioquímica del cadmio está basada en la formación de complejos con proteínas y otras moléculas tales como glutatión (GSH). Cualquier mecanismo celular que involucre iones libres de cadmio (II) como especie citotóxica tendría que postular la ausencia de sitios de unión celular para el metal (Chen et al., 2012).

1.11 Fuentes de exposición a Cadmio.

1.11.1 Exposición Ocupacional

Las áreas más pronunciadas en la contaminación a cadmio se hallan próximas a minas para explotación de zinc. En los años 20's el uso de Cd por la industria era limitado, sin embargo, el uso del metal se incrementó a partir de 1980 año en el cual la producción se incrementó a ~20,000 toneladas por año, la que se ha mantenido hasta la actualidad. China, Corea y Japón son los responsables de más del 50% de la producción de Cd, de este porcentaje alrededor del 80% es usado en la producción de baterías nickel-Cd. El 10% es usado en la elaboración de pigmentos de pintura y plásticos, debido a que posee propiedades no corrosivas, el 5% es consumido por galvanizadoras y en la industria de la aeronáutica, entre muchas otras industrias y actividades que hacen que el metal se exponga constantemente a los humanos, según reportes de la Asociación Internacional de Cadmio (ICdA, por sus siglas en inglés) (WHO, 2010).

Debido al uso que tiene el metal este entra en contacto con el aire, agua y suelos a través de la industria y el mal manejo de los productos domésticos los cuales son vertidos a aguas de riego y mantos freáticos, por la incineración de basura, la quema de combustibles fósiles y la propia erosión de la biomasa. La forma principal de contacto en exposición ocupacional es su forma de óxido, la cual predominantemente es inhalada en el humo de cigarrillos o de polvos emitidos por las industrias, debido a esto los países de mayor industrialización son los que generan una mayor fuente de exposición al metal (Klaassen et al., 2009).

Desde los años 60's, los niveles de Cd en el aire han sido medidos en algunos lugares de trabajo, excediendo $1\text{mg}/\text{m}^3$, niveles tóxicos. Para disminuir este nivel la ATSDR presentó un programa de niveles de riesgos mínimos, para exposiciones agudas (<14 días) o crónicas (> 1 año) a exposición inhalable de Cd de 0.03 y $0.01\ \mu\text{g}/\text{m}^3$, lo cual es significativamente menor a los valores asignados por el departamento de Trabajo, Seguridad Ocupacional y Administración de Salud de los Estados Unidos de América (OSHA, por sus siglas en inglés) el cual dicta que los límites legales de exposición van de $2.5 - 5\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ de exposición a Cd en una jornada de 8 horas de trabajo. Las concentraciones del Cd en aire se estima deben ser $<10\ \text{ng}/\text{m}^3$ ($0.1 - 0.5\ \text{ng}/\text{m}^3$ en zonas rurales y de $2 - 15\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ en áreas urbanas, pero concentraciones varias veces más altas pueden hallarse cerca de fundidoras de plomo o zinc, según datos de la Organización Mundial de la Salud, 2010 (WHO, 2010).

1.11.2 Exposición No Ocupacional

Además del tabaquismo, la principal vía de exposición a Cd para los seres humanos no ocupacionalmente expuestos es a través de alimentos o agua. El Cd en el agua potable contribuye sólo a un bajo porcentaje de la ingesta total del metal [Olsson et al., 2002], con la excepción de las zonas fuertemente contaminadas. Los alimentos son la principal fuente de Cd para la población general, que es particularmente causado por el uso de la roca fosfórica (en comparación con el ácido fosfórico procesados y fertilizantes de fosfato) para fines agrícolas, porque la mayoría de los suelos naturales y agrícolas son deficientes de fosfato, y las plantas lo requieren para su crecimiento. En comparación con los de origen ígneo, los depósitos de roca de fosfato de origen sedimentario contienen altos niveles de Cd y son la materia prima utilizada en la fabricación de la mayoría de los fertilizantes fosfatados comerciales. En 2009, los mayores productores mundiales de fosfato de roca fueron China (~40%), Marruecos (~17%), y los USA (~16%). Su contenido en Cd varía entre <20 y $>200\ \text{mg}$ de Cd/kg de fosfato de roca (ATSDR, 2012).

La absorción de Cd por las plantas depende del tipo de planta, el pH, y la características del suelo (Kirkham, 2006). Complejos solubles e insolubles son

formados con materia orgánica; generalmente, el Cd se une fuertemente a la materia orgánica la cual lo inmoviliza, sin embargo, el pH del suelo es el mayor factor de control sobre la absorción del Cd, ya que disminuye su movilidad con el incremento de la alcalinidad (Holm et al., 2003; Cieccko et al., 2004), por el contrario los suelos habitualmente de mayor acidez propicia la movilización del cadmio e incrementa su concentración en los alimentos (Kirkham, 2006).

Así mismo, otros alimentos también pueden contener altas concentraciones del xenobiótico, tal es el caso de la carne, huevo, leche, pescado y mariscos. Los cereales como el arroz, trigo, verduras de hoja verde y hortalizas de raíz, como la papa, nabo, zanahoria y el apio, acumulan Cd (Järup and Akesson, 2009). Altos niveles de Cd se han encontrado en semillas oleaginosas, cacao, cacahuates, en hongos comestibles, así como en vísceras como hígado y riñones, especialmente de cerdos, ovejas, ganado vacuno y equino. Las vísceras de estos animales puede contener niveles del metal de hasta 50 µg/kg; la concentración en granos de cereales es de 10 – 150 µg/kg y los productos del mar entre 1-2 mg/kg (WHO, 2010; ATSDR, 2012). Por lo que la cantidad de cadmio en la ingesta diaria varía entre 8 – 25 µg/día dependiendo de la concentración hallada en los alimentos (Larsen et al., 2002; Egan et al., 2007). Por encima del 10% del cadmio en los alimentos es absorbido, basado en esta estimación la mayor cantidad del metal absorbido proviene de cereales y vegetales (80%) (Järup et al., 1998; Olsson et al., 2002). Poblaciones con consumo específico de alimentos, por ejemplo, vegetarianos y grandes consumidores de productos marinos presentan un mayor riesgo no ocupacional de contaminación con Cd.

1.12 Vías de entrada, transporte y tráfico de Cd en el organismo.

1.12.1 Vías de entrada

El Cd entra al organismo a través de pulmones y tracto gastrointestinal (GI). La absorción de Cd por los pulmones es mucho más efectiva que en el intestino. Sin

embargo, tracto GI es una ruta continuamente expuesta en los humanos. La inhalación de bajas concentraciones de CdCl₂ 5mg/kg de peso, ha mostrado incrementos en la proliferación celular e inflamación, mientras que concentraciones de exposición mayores a los 80 mg/kg de peso reducen el conteo total de dicha celularidad y causa disfunción del sistema inmune (Kundu et al., 2009; Blum et al., 2014). Por otro lado, el mecanismo completo de absorción del metal en el intestino permanece sin ser dilucidado, sin embargo, se conoce que el xenobiótico puede competir con metales esenciales como el hierro y en la deficiencia de su consumo este puede ser mejor absorbido en el GI, parece ser que el íleon y el duodeno son los sitios de mayor absorción sin embargo este tiene dependencia importante de la edad (Kostial et al., 1991; ParK et al., 2002; Brako et al., 2003; Ohrvik et al., 2013).

1.12.2 Pulmones

Después de la exposición por inhalación, la absorción del Cd varía en gran medida dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de Cd involucrados, del sitio de deposición en los pulmones y el tamaño de partícula (Misra et al., 1996). Entre 50 y 100% de Cd en los alvéolos son transferidos a la sangre. En la población humana promedio, la cantidad de Cd absorbida por los pulmones no es mayor que ~0,2 µg por día basado en la suposición de que hasta el 50% de la Cd retenido es absorbido (Morgan et al., 1997). Basándose en datos de exposición y absorción en los diferentes órganos, se ha calculado que cerca del 50% del Cd contenido en los cigarrillos e inhalado, es absorbido por los pulmones (Masters et al., 1994).

1.12.3 Tracto Gastrointestinal

La otra ruta de ingreso del Cd al organismo ocurre por la vía GI después de una exposición oral. La absorción del metal después de una sola exposición se encuentra en los rangos de 0.5 a 8% (Staessen et al., 1999).

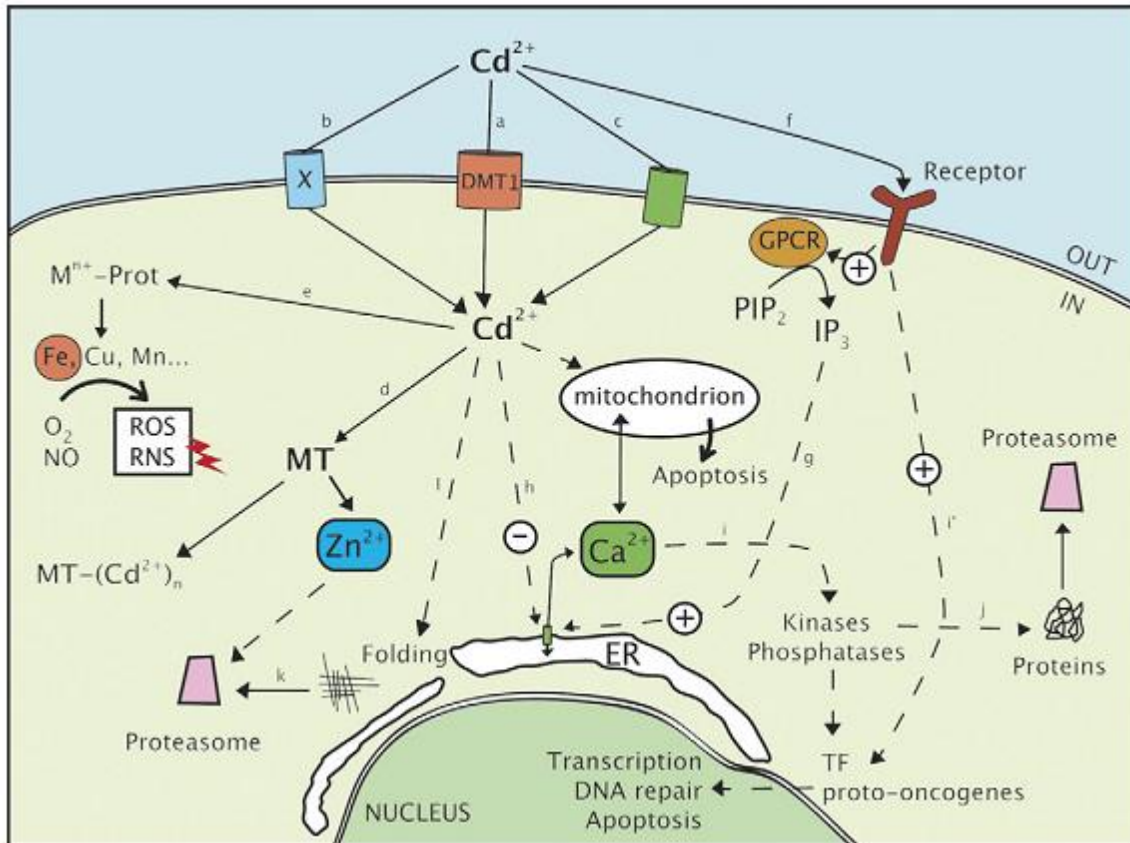


Figura 9. Transporte de Cd al enterocito, en azul están representados los transportadores involucrados en el manejo de Zn y en verde los de Ca . Tomada de Martelli et al., *Biochimie* 88 (2006) 1807–1814.

1.12.4 Tráfico, Transporte y Distribución

Como ya se ha descrito, el cadmio en sangre puede estar unido tanto a proteínas séricas y eritrocitarias. El análisis de cadmio en sangre completa es una medida de exposición aguda y reciente. Los principales órganos en donde el cadmio se acumula son el hígado y los riñones, representando conjuntamente alrededor del 50-75% de cadmio corporal (Nordberg and Kjellström, 1979). La concentración y la acumulación más alta en tejido se dan en los riñones. Concentraciones relativamente superiores en comparación con el músculo y el hueso se encuentran en los testículos y bazo. El cadmio se distribuye a la mayoría, pero no todos los órganos, ya que algunos tejidos están protegidos. El cadmio tiene una vida media

biológica muy larga en los tejidos, que ha sido estimado en más de diez años para la mayoría de ellas (Tsuchiya, 1976; Nordberg, 2004).

Para adultos no fumadores que viven en áreas no contaminadas pueden presentar concentraciones entre 0.1 y 1.0 μg de Cd/L en sangre total (1 – 10 nM); mientras que en fumadores la concentración puede variar por debajo de los 5 μg /L; valores por encima de esta concentración son indicativos de vigilancia médica para trabajadores industriales expuestos que todavía no tienen signos de daño renal. (Järup et al., 1983; Thijssen et al., 2007).

1.13 Cadmio fisiopatología.

La presencia de complejos con el xenobiótico en circulación, no sólo afectan las funciones hepáticas y renales, aunque en porcentaje estos dos órganos capturan aproximadamente el 80% del total de Cd circulante. Otros órganos y tejidos expuestos a la presencia del metal también lo pueden recapturar, aunque en menor medida que hígado y riñón. Tal es el caso del corazón, sistema linfático, neuronas, cerebro, corazón, pulmones y páncreas. Siendo éste último un órgano poco estudiado ante los efectos crónicos de la exposición a Cd.

Estudios en animales han demostrado que el Cd puede disminuir la función exocrina y endócrina. En ratas y ratones la presencia del metal ha mostrado daño a la células β pancreáticas, reducción en la tolerancia a glucosa, supresión de la secreción de insulina y efectos diabetógenos (Lei et al., 2007; Chang et al., 2013). El desarrollo de hiperglicemias o diabetes mellitus se ha asociado con el incremento de los niveles de Cd sanguíneo en fumadores, respecto a los no fumadores (Afridi et al., 2008; Chen et al., 2009). El mismo efecto ha sido observado en investigaciones epidemiológicas de trabajadores expuestos a aerosoles o polvos del metal (Lei et al., 2006; 2007).

Particularmente en páncreas, la MT tiene suma importancia ya que éstas resguardan, controlan y proveen el Zn necesario para el buen funcionamiento del órgano, implícito en el mecanismo de la neoformación de insulina. El Cd puede influir directamente sobre las concentraciones de Zn intracelular, ya que como se

ha mencionado anteriormente el xenobiótico es más afín a la MT que el propio metal esencial. La liberación de Zn del complejo MT – Zn, propicia un aumento de este metal en el citoplasma, lo cual ocasiona una redistribución del mismo, ya que la citotoxicidad presenta un efecto adverso para la célula pancreática. La dinámica celular en cuanto a la regulación de los metales presentes en el citosol es finamente regulada, así que cuando aumenta el Zn libre, este se resguarda en vesículas o se importa al espacio extracelular disminuyendo en ambos casos la concentración de Zn citosólico (Maret, 2001; Lee et al. 2003).

La disminución en la secreción de insulina por efectos del Cd se ha tratado de explicar de diferentes formas, una de las teorías con mayor aceptación refiere que al acumularse el metal en la células β -pancreáticas, puede difundir hacia las vesículas de preproinsulina, e incluso en las que contienen insulina, desplazando al Zn de los enlaces disulfuro que unen a ambas fracciones peptídicas (A y B). Este cambio estructural de la hormona produce una insulina no funcional, afectando la regulación de los niveles séricos de glucosa. También se ha descrito que ante una intoxicación crónica, el Cd puede unirse a ciertos aminoácidos, principalmente cisteínas e histidinas que conforman a los transportadores de glucosa tipo 4, disminuyendo su función (Han, et al., 2003).

1.14 Estado Hexamérico de la Insulina

Los estados biológicos reconocidos en los hexámeros de insulina son 3: T6, T3R3 y R6, siendo este último el de mayor presencia en circulación. Dichos estados hacen que la estructura presente sitios anfipáticos que envuelven a los iones de zinc y las histidinas; además forman bolsas hidrofóbicas localizadas en las interfaces de los estados R. Los sitios Ca^{2+} están localizados cercanos al centro del hexámero en el grupo carboxílico del glutamato en la posición 13. Este sitio cobra relevancia ya que estudios con resonancia magnética nuclear (RMN) ha puesto de manifiesto que el Ca^{2+} puede sustituir al Ca^{2+} con gran facilidad, y de la misma manera puede coordinarse con las histidinas que ligan al Zn^{2+} (Sudmeir et al., 1981; Dunn, 2005). La implicación biológica del estado hexamérico, es poco entendida y por lo tanto,

existe un desconocimiento importante al respecto. Así mismo, la interacción de Ca^{2+} tanto con el hexámero como con el monómero de insulina es completamente incomprendida respecto a la implicación biológica y a la importancia del mismo en el desarrollo de problemas metabólicos como la DM2.

1.15 Modelos de estudio

El uso de los animales como modelos de experimentación en el estudio de la fisiopatología de la diabetes ha permitido entender algunas de sus causas y consecuencias, además de obtener avances en el tratamiento y control de este síndrome aun cuando los signos y alteraciones no se reproducen con exactitud. En la literatura se han reportado modelos experimentales de diabetes en diferentes especies que van desde el perro, gato, conejo, cerdo, borrego, ratón hasta la rata (Claypool MD & Entes LJ, 2009).

En animales de laboratorio específicamente en la rata, la diabetes se puede presentar de forma espontánea o inducida experimentalmente por distintos métodos (González E, 2002). En la inducción experimental de diabetes se utilizan sustancias químicas que destruyen en forma selectiva las células β del páncreas como son la alloxana (Alx) y la estreptozotocina (STZ) (Fernández SG, Jardón DA & Figueroa HJL, 2006).

En los modelos experimentales con animales se usa en forma convencional a los machos ya que el comportamiento de ciertos parámetros a lo largo del tiempo tiene menos fluctuaciones debido a que estos no presentan estados fisiológicos como el ciclo estral y el menstrual, la gestación y la lactancia, en lo que cambios hormonales provocan ajustes en el metabolismo (Szkudelski T, 2001).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome metabólico (SM) comprende un conjunto de factores de riesgo caracterizados por dislipidemia aterógena (trastorno de los lípidos que favorece la aterosclerosis), presión arterial (HTA) elevada, resistencia a la insulina (RI) con o sin hiperglicemia, obesidad abdominal, un estado trombotico y un bajo grado de inflamación crónica, que incrementan el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y de enfermedad cardiovascular (ECV).

Este trastorno es más frecuente en personas obesas, en especial de la parte superior del cuerpo, que desarrollan poca actividad física, como los trabajadores de oficina. En México, es un problema de salud pública que aumenta año con año, generando un gasto económico importante al sector salud. Sin embargo, la obesidad no es el único factor, existen otros factores como genéticos y ambientales (metales y metaloides). En los últimos años en diversas investigaciones se ha postulado al cadmio como un metal capaz de promover eventos diabetogénicos. Debido a que se encuentra en el medio ambiente distribuido en alimentos, agua o en personas en constante exposición a cadmio; personas que viven cerca de volcanes, trabajadores de minas e industrias, o bien, fumadores. Los efectos del Cd^{2+} han sido poco estudiados, pero recientes investigaciones demuestran que el Cd^{2+} puede reemplazar el Zn^{2+} en algunas enzimas y proteínas, afectando en rutas metabólicas centrales. Por lo que se plantea la siguiente pregunta científica:

Ante una intoxicación crónica por cadmio ¿El Cd^{2+} puede alterar la conformación de la insulina disminuyendo su función biológica?

2.2. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de hiperglicemias o diabetes mellitus se ha asociado con el incremento de los niveles de Cd sanguíneo en fumadores, respecto a los no fumadores. El mismo efecto ha sido observado en investigaciones epidemiológicas de trabajadores expuestos a aerosoles o polvos del metal. En páncreas, la homeostasis del Zn^{2+} y Ca^{2+} se ve alterada por la presencia de Cd^{2+} , el aumento de éste influye directamente en la dinámica de secreción de insulina y en el manejo de glucosa por el organismo. Mientras incrementa la cantidad de Cd^{2+} en páncreas, la actividad biológica de insulina muestra cambios relevantes en modelos animales. Las causas a las que se han adjudicado dicho efecto son a procesos oxidativos, inflamación, desequilibrio en bioelementos esenciales en las células beta, modificaciones proteicas relacionadas con el sistema antioxidante, el receptor de insulina y modificaciones en los transportadores de glucosa, así como acortamiento del tiempo de vida media de estas proteínas, dejando a los órganos y tejidos desprotegidos del daño causado por el incremento del metal.

Particularmente en páncreas, la homeostasis de Zn^{2+} es de suma importancia para el buen funcionamiento del órgano, implícito también, en el mecanismo de la neoformación de insulina. El Cd^{2+} puede influir directamente sobre las concentraciones de Zn^{2+} intracelular modificando la estructura, función o vida media de la insulina. La disminución en la secreción de insulina por efectos del Cd se ha tratado de explicar de diferentes formas, una de las teorías con mayor aceptación refiere que al acumularse el metal en la células β pancreáticas, puede difundir hacia las vesículas de preproinsulina, e incluso en las que contienen insulina, desplazando al Zn^{2+} de los enlaces disulfuro que unen a ambas fracciones peptídicas (A y B). Este cambio estructural de la hormona produce una insulina no funcional, afectando la regulación de los niveles séricos de glucosa.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la función biológica de insulina-Cd²⁺ unido a aminoácidos relevantes en sus centros de coordinación con Zn²⁺.

2.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Coordinar y caracterizar las interacciones de Zn²⁺ y Cd²⁺ en aminoácidos considerados como centros de coordinación en la insulina.
- ✓ Coordinar y caracterizar las interacciones de insulina-Zn²⁺ e Insulina-Cd²⁺.
- ✓ Evaluar la actividad biológica de insulina-Zn²⁺ e Insulina-Cd²⁺ en un modelo animal insulino requirente.

2.4. HIPOTESIS

2.4.1 HIPOTESIS NULA

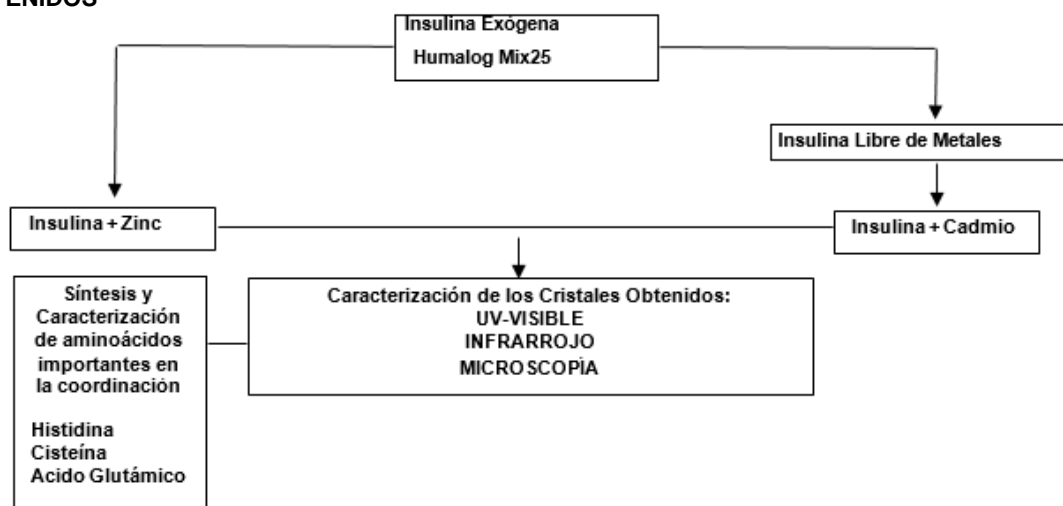
El Cd²⁺ coordinado en la insulina no disminuye su función biológica.

2.4.2 HIPOTESIS ALTERNATIVA

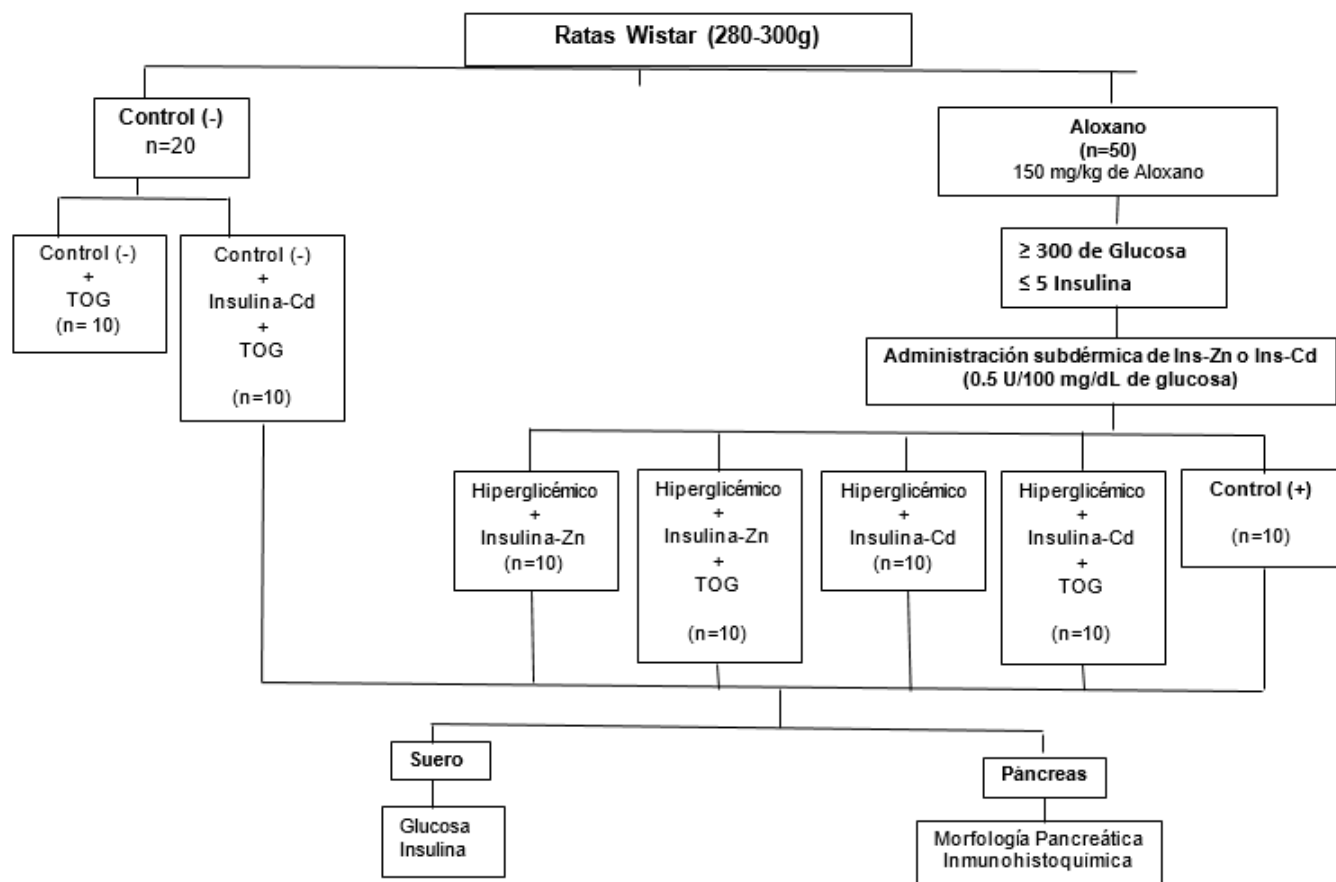
El Cd²⁺ coordinado en la insulina disminuye su función biológica.

2.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

PROTOCOLO CRISTALIZACIÓN DE LA INSULINA-ZN²⁺ E INSULINA-CD²⁺ Y CARACTERIZACIÓN DE LOS CRISTALES OBTENIDOS



PROTOCOLO EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN BIOLÓGICA



2.6 MATERIAL Y MÉTODOS

2.6.1 Animales de experimentación

Para este estudio se emplearon ratas de la cepa Wistar con un periodo de destete de 15 días. Los animales fueron obtenidos del Bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y se mantuvieron bajo condiciones controladas con ciclos de luz – oscuridad de 12 horas y temperatura de 19 – 26°C, en jaulas de polipropileno con una cama de serrín con disponibilidad de alimento y agua “*Ad libitum*”. Todos los procedimientos efectuados siguieron las normas de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales.

2.6.2 Modelo Insulino dependiente

Con la finalidad de valorar si el cadmio genera defectos en la señalización de insulina, se creó un modelo en dependencia de la hormona (diabetes mellitus tipo 1). A 50 ratas macho de la cepa Wistar (280-300g) se le administró Alozano intraperitoneal (150mg/kg de peso) y se les mantuvo con agua glucosada por 3 días, hasta verificar que estos animales alcanzaran niveles de hiperglicemia e hipoinsulinemia. Los animales fueron mantenidos con 0.5U/100mg de insulina Humalog Mix 75/25, hasta que fueron utilizados para el protocolo designado, para lo cual se verificó en ayuno de 6 horas, los niveles de glucosa e insulina, garantizado hiperglicemia ≥ 300 mg/dL e hipoinsulinemia $\leq 5\mu\text{UI/mL}$.

2.6.3 Obtención de las muestras biológicas

2.6.3.1 Muestras sanguíneas

Para el presente protocolo experimental, los animales de los grupos en estudio, fueron anestesiados (Xilasina y Ketamina, 0.1U/kg) e inmovilizados a una charola de disección en posición decúbito dorsal, con la finalidad de realizar una punción cardiaca con una jeringa de insulina de 100U y 27G marca Becton Dickinson, con

la cual se extrajo de 300 – 500 µL de sangre total. Una vez obtenida la sangre total, ésta se colocó en tubos Eppendorf de 1.5mL. En todos los sacrificios al tiempo 90 minutos se recolectaron de 3 – 5 mL de sangre total en tubo dorado marca Becton Dickinson. El espécimen sanguíneo se llevó a centrifugación a 8000 RPM por 10 min, el suero fue separado y se congeló a -70°C hasta su análisis. El suero fue empleado para las determinaciones bioquímicas e inmunoensayos (ELISA).

2.6.3.2 Tejido pancreático

Una vez obtenidas las muestras sanguíneas, los animales fueron perfundidos con solución salina isotónica fría, con la finalidad de retirar el excedente de tejido sanguíneo y preservar en condiciones óptimas al tejido pancreático. Posterior a la perfusión, el páncreas se identificó mediante procedimiento quirúrgico, ubicándolo como una glándula voluminosa anexa al duodeno, situado en el abdomen superior, detrás del estómago, entre el bazo y el duodeno, de coloración blanco grisáceo. La cabeza esta fija por el asa duodenal. Su dirección es horizontal a la derecha y oblicua hacia arriba en la mitad izquierda, es ligeramente curvo, con una concavidad hacia columna vertebral. Posterior a la identificación y ubicación del órgano, se procedió a realizar pancreatectomía, una vez extraído el tejido se disectó transversalmente en dos porciones y se colocó en recipientes perfectamente identificados; uno de los recipientes se almacenó a – 80°C y el segundo se depositó en formalina buferada al 4% para su posterior inclusión.

2.6.4 Ensayos séricos

La cuantificación de glucosa fue analizada en un espectrofotómetro automatizado AutoKemII con reactivos de la marca Spinreact, según las indicaciones del productor. (Ver Anexos).

La concentración de insulina sérica fue determinada por inmunoensayo de ELISA (Diagnóstica Internacional, Mex), el complejo antígeno anticuerpo se mide a una longitud de onda de 415 nm en un lector automatizado Stat fax 2600 (Winerlab, Arg)

la concentración de insulina fue obtenida a partir de una curva estándar con un rango 0 - 20 μ U/mL. Tanto glucosa como insulina fueron cuantificadas a los tiempos 0 minutos (ayuno de 6 horas de los animales de experimentación), 30, 60 y 90 min post carga de glucosa anhidra de 1.75g/kg, con la finalidad de conocer la tolerancia oral al carbohidrato y la respuesta pancreática.

2.6.5 Estudios Histológicos

Los tejidos obtenidos tras la pancreatectomía se fijaron en formalina buferada al 4%. Paso seguido se procedió a la deshidratación de las muestras eliminando gradualmente el agua de los tejidos por medio de baños con xilol y alcohol, estos últimos a diferentes porcentajes, y finalmente se realiza el infiltrado con parafina (Paraplast, Leica) hasta la completa inclusión del tejido, tomando en cuenta la orientación del tejido. Los tejidos fueron cortados en un micrótopo Leica RM2125 a un grosor de 5 μ M y colocados en portaobjetos previamente embebidos en poli-L-lisina al 0.1%, resguardándose hasta su uso.

2.6.5.1 Inmunohistoquímica

Las laminillas con los tejidos se rotularon adecuadamente, se desparafinaron con calor seco en una estufa de 58 – 60°C y se llevó a cabo la hidratación, sumergiendo las muestras en xilol, para quitar el exceso de parafina (5 min), enseguida nuevamente xilol (15 baños), posteriormente alcohol 50%-xilol 50% (15 baños), alcohol absoluto (15 baños), alcohol absoluto (15 baños), alcohol al 96% (15 baños), y por último, se lava con agua destilada (3 lavados) y se mantuvo en hidratación en buffer de fosfatos (PBS 0.1M). Se procedió a la recuperación antigénica, la cual se realizó con Diva Decloaker de BioCare dilución 1:10 a 60°C por 30 min y se dejó enfriar. Una vez realizados los pasos anteriores, se prosiguió con la inactivación de la peroxidasa endógena. A vasos Coplin con las laminillas, se les agregó H₂O₂ al 0.3 %, incubándolo durante 10 min. Se retiró el H₂O₂ y se realizaron tres lavados con agua destilada. Se colocó el bloqueo con una solución de albúmina al 2% en solución salina isotónica en frío. Después de lavar se colocó el anticuerpo primario

diluido en albúmina libre de inmunoglobulina al 1%, por toda la noche, posteriormente se lavó el exceso del anticuerpo primario y se colocó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa en las mismas condiciones de dilución por 2 horas, se lavó el exceso y se procedió al revelado con diaminobencidina (DAM). Para realizar el contraste de coloración de las muestras, se realizó el siguiente procedimiento: 1 baño en hematoxilina (tinción de núcleo); al término, se enjuagaron 3 veces en agua corriente hasta quitar el exceso de hematoxilina. Después, se realizaron 10 baños en carbonato de litio, para un mejor contraste, brillo y nitidez en la coloración de los núcleos. Luego, se llevó a cabo el proceso de deshidratación de las muestras de la siguiente manera: alcohol al 96% (15 baños), alcohol al 96% (15 baños), alcohol absoluto (15 baños), alcohol absoluto (15 baños), alcohol 50%-xilol 50% (15 baños), xilol (15 baños), xilol (15 baños).

2.6.6 Insulina Zinc y Cadmio

Para este protocolo se utilizó insulina exógena, análoga de la insulina humana (Humalog®), la cual fue adquirida de viales estériles en solución lista para ser inyectada. Esta insulina viene en cristales disueltos en un líquido claro, los cuales están coordinados con zinc, por lo que esta insulina provee la insulina-Zn para nuestro protocolo. Cada mililitro contiene 16 mg de glicerina, 1.88 mg de fosfato de sodio dibásico, 3.15 mg de *m*-cresol, óxido de zinc (0.0197), cantidades trazas de fenol y agua libre de pirógenos, ajustados a pH 7.0 – 7.8 con 10% de HCL, 10% NaOH.

2.6.6.1 Insulina libre de metales

Una cantidad de 0.5 gramos de Chelex fue hidratada con 1 ml de Tris-HCl (5 mM) a pH de 8.4 por 8 horas en rotación constante, posteriormente se centrifugó a 4000 RPM por 20 minutos y se separó la fase líquida, dejando únicamente las perlas hidratadas. A tubos eppendorf conteniendo las perlas hidratadas de Chelex se les agregó 1 ml de Insulina HUMALOG® 75/25 y se dejó en movimiento durante 24 horas para producir una insulina libre de metales. Posteriormente, los tubos fueron

centrifugados a 12,000 rpm por 10 minutos y se separó el sobrenadante en donde se halla la hormona.

2.6.6.2 Insulina Cadmio

Al sobrenadante conteniendo insulina libre de zinc se le agregó una solución de CdCl_2 (5 mg de CdCl_2 en 10 ml de agua) para saturar la hormona con Cd; para esto la solución se dejó en agitación por 48 horas. Esta solución se fue utilizada para el protocolo de actividad biológica.

2.6.6.3 Caracterización de Insulina-Zn e Insulina-Cd

Para poner de manifiesto la coordinación de los metales con la insulina, la solución de insulina-Zn e insulina-Cd se cristalizaron y se caracterizaron por microscopía y por el análisis del espectro de infrarrojo. El procedimiento se realizó de la siguiente manera: por cada mL de insulina libre de metales (3.5.8.1) se le adicionaron 350 μL de HCl 0.02 M, 35 μL de CdCl_2 0.6 M, 175 μL de Citrato trisódico al 0.2 M y 105 μL de acetona con 34 μL de agua desionizada. Se ajustó a un pH de 5.8 utilizando HCl al 0.02M y se dejó reposar durante 4 días a temperatura ambiente, posteriormente 23 días en refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta lograr la precipitación de los cristales de la hormona. El mismo procedimiento se siguió para inducir la cristalización con presencia de Zn, para la cual se agregó una solución de ZnCl_2 0.6 M (35 μL), y el pH se mantuvo dentro del rango 7.0 – 7.8.

La caracterización microscópica se llevó a cabo empleando un microscopio óptico en donde el cristal de insulina-Zn tiene una característica cúbica, mientras que los cristales de insulina-Cd presentan una estructura irregular, y tienen condiciones dodecaedricas bipiramidales.

El espectro de IR se logró mezclando en un mortero, KBr con los cristales obtenidos. La mezcla se mantuvo en una estufa a 105°C para eliminar totalmente la humedad y evitar interferencias en el espectro. El procedimiento llevado a cabo consistió en

colocar una pequeña cantidad de la muestra a procesar en el mortero y se trituró hasta formar un talco. Posteriormente una pequeña alícuota del polvo se colocó en un portador de muestra y mediante un sistema de compresión manual se obtuvo una pastilla. La pastilla fue analizada en un espectrofotómetro Frontier FT-IR de PerkinElmer, en un espectro de $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$. Los picos de emisión fueron comparados con las tablas reportadas para su análisis correspondiente.

2.6.7 Coordinación de aminoácidos

2.6.7.1 Histidina, Cisteína y Glutamato coordinados con Zinc

Se utilizaron aminoácidos exógenos de origen industrial. Estos aminoácidos vienen en polvo cristalino blanco o incoloros sólidos, los cuales fueron coordinados con zinc, por lo que estos aminoácidos nos dan la condición de la coordinación en la insulina-Zn para nuestro protocolo.

Se pesó 1 gramo de cada aminoácido y fueron disueltos en 1 mL de agua destilada (Histidina fue disuelta en 500 μL de agua destilada y 500 μL de acetona), ajustados a pH 7.0 – 7.8 con 10% de HCL, 10% NaOH. Se le agregó una solución de ZnCl_2 (5 mg de ZnCl_2 en 10 ml de agua); se dejó en agitación por 72 horas y en reposo durante 23 días a temperatura ambiente.

2.6.7.2 Histidina, Cisteína y Glutamato coordinados con Cadmio

Se utilizaron aminoácidos exógenos de origen industrial. Estos aminoácidos vienen en polvo cristalino blanco o incoloros sólidos, los cuales fueron coordinados con cadmio, por lo que estos aminoácidos nos dan la condición de la coordinación en la insulina-Cd para nuestro protocolo.

Se pesó 1 gramo de cada aminoácido y fueron disueltos en 1 mL de agua destilada (Histidina fue disuelta en 500 μL de agua destilada y 500 μL de acetona), ajustados a pH 7.0 – 7.8 con 10% de HCL, 10% NaOH. Se le agregó una solución de CdCl_2 (5 mg de CdCl_2 en 10 ml de agua); se dejó en agitación por 72 horas y en reposo durante 30 días a temperatura ambiente con la finalidad de evaporar el agua.

2.6.7.3 Caracterización de los aminoácidos coordinadores con Zinc y Cadmio

El espectro de IR se logró mezclando en un mortero, KBr con los aminoácidos coordinados obtenidos. El KBr se mantuvo en una estufa a 105°C para eliminar totalmente la humedad y evitar interferencias en el espectro. El procedimiento llevado a cabo consistió en colocar una pequeña cantidad de la muestra a procesar en el mortero y se trituró hasta formar un talco. Posteriormente una pequeña alícuota del polvo se colocó en un portador de muestra y mediante un sistema de compresión manual se obtuvo una pastilla. La pastilla fue analizada en un espectrofotómetro Frontier FT-IR de PerkinElmer, en un espectro de 400 – 4000 cm^{-1} . Los picos de emisión fueron comparados con las tablas reportadas para su análisis correspondiente.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis espectrofotométrico UV-VIS de los aminoácidos coordinadores de Zn²⁺ y Cd²⁺

Fue realizada un espectroscopía de la región ultra-violeta de las diferentes condiciones de los aminoácidos coordinadores de metales (Zn²⁺ ó Cd²⁺). De acuerdo a la cromatografía de Rayos X de la insulina, se sabe que uno de los aminoácidos coordinadores de metales es la Histidina. Por ende fue realizada su coordinación con los dos metales de interés para este trabajo. Se ha descrito que el espectro de histidina contiene una gran variedad de bandas, sin embargo, la banda de emisión a 210 nm se ha asociado con el estado transicional de los enlaces π - π^* del anillo imidazólico, por lo que la formación de complejos con iones metálicos incrementa la frecuencia de los carbonos 4 y 5 alargando la banda característica para el aminoácido (Figura 10).

Se realizó la coordinación con los dos metales (Zn²⁺ y Cd²⁺), con el segundo aminoácido importante en la coordinación. Se ha descrito en el espectro del glutamato que el grupo carboxilo presenta transición $n \rightarrow \pi^*$ en la longitud de onda de 205-220 nm y en el grupo amino presenta transiciones $n \rightarrow \pi^*$ en la longitud de onda 210 nm (Figura 11). De acuerdo al espectro obtenido, hay un desplazamiento en la longitud de onda 220 a 235 nm, lo cual sugiere una coordinación del metal en lo grupos carboxílicos.

Finalmente se realizó la coordinación con los dos metales (Zn²⁺ y Cd²⁺), el tercer aminoácido importante en la coordinación. Se ha descrito en el espectro de la cisteína que el grupo carboxilo presenta transición $n \rightarrow \pi^*$ en la longitud de onda de 205-220 nm, en el grupo amino presenta transiciones $n \rightarrow \pi^*$ en la longitud de onda 210 nm y en el grupo sulfhidrilo presenta transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ en la longitud de onda 236 nm (Figura 12). De acuerdo al espectro obtenido, hay un desplazamiento en la longitud de onda de 230 a 240 nm, lo cual sugiere una coordinación del metal en el grupo sulfhidrilo.

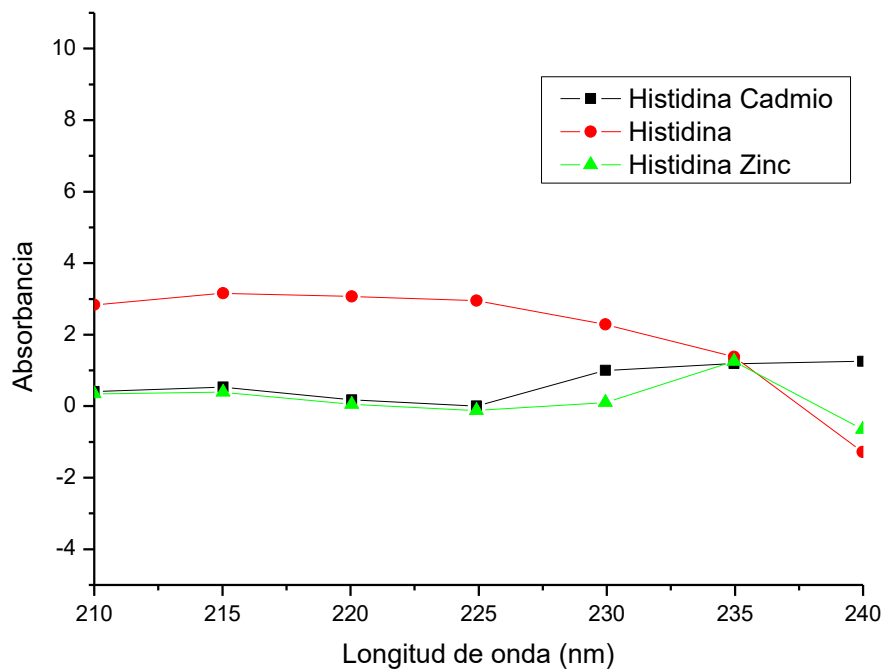


Figura 10. Espectro UV-Visible de Histidina. Estudio del aminoácido bajo diferentes condiciones Ligando-Ligante. El (■) muestra la Histidina coordinada con Cadmio; el (●) muestra la histidina sin coordinación y el (▲) muestra la Histidina coordinada con Zinc.

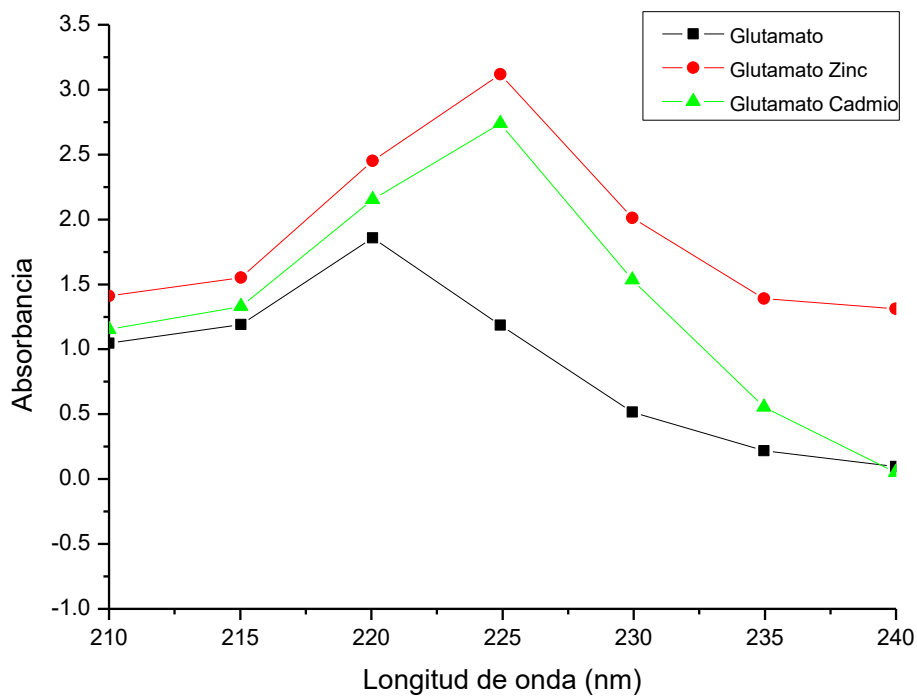


Figura 11. Espectro UV-Visible de Glutamato. Estudio del aminoácido bajo diferentes condiciones Ligando-Ligante. El (■) muestra el Glutamato a coordinado con Cadmio; el (●) muestra el Glutamato sin coordinación y el (▲) muestra el glutamato coordinado con Zinc.

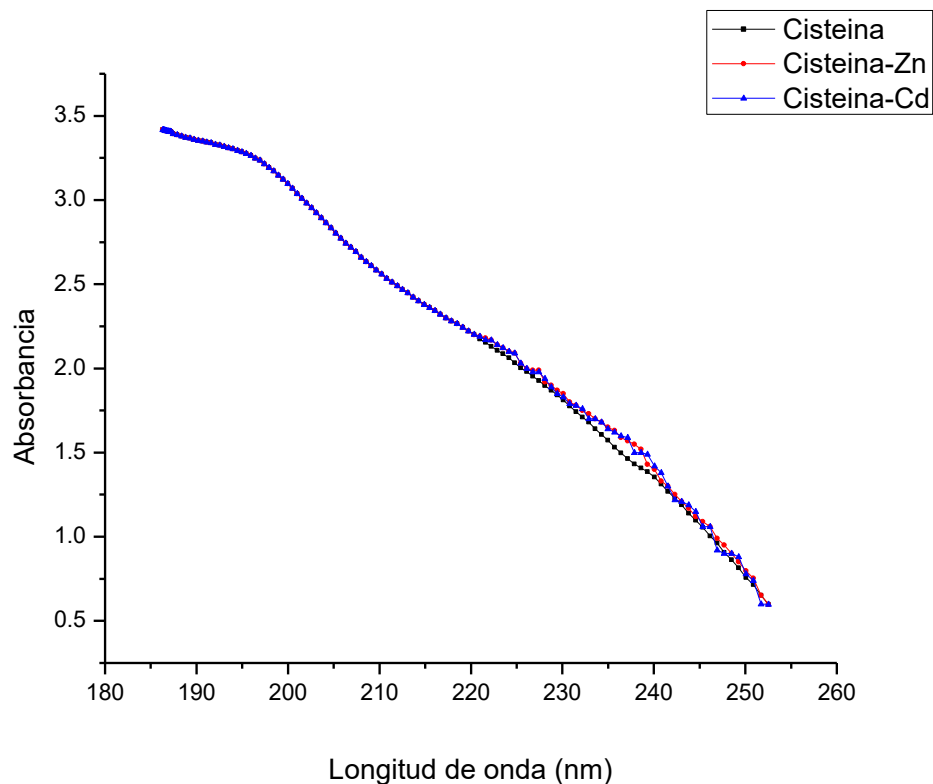


Figura 12. Espectro UV-Visible de Cisteína. Estudio del aminoácido bajo diferentes condiciones Ligando-Ligante. El (■) muestra la Cisteína sin coordinación; el (●) muestra la Cisteína coordinada con Zinc y el (▲) muestra la Cisteína coordinada con Cadmio.

3.2 Análisis espectrofotométrico IR de Histidina, Histidina-Zn e Histidina-Cd

Se realizó una espectroscopia del infrarrojo de los aminoácidos coordinadores de los metales en estudio (Histidina, Cisteína y Glutamato). Esta técnica se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Por lo que, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan a absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al infrarrojo.

3.2.1 Histidina

Se sabe que la histidina puede servir como donante de un enlace de hidrógeno como un aceptor, esto es en función de la sensibilidad del anillo imidazólico en la forma estructural. En diversos estudios se ha demostrado que el estiramiento C-C

del anillo de imidazol tiene diferentes frecuencias observadas en IR cuando su estructura geométrica cambia.

En el espectro IR obtenido para Histidina (Figura 13) se observa un pico cercano a la región 500 cm^{-1} correspondiente a la torsión del C-NH₂ propio del anillo imidazólico. Los dos picos correspondientes a la región cercana a 800 cm^{-1} y 900 cm^{-1} indica la presencia del NH₂ libre. En la región 1090 cm^{-1} se observa el alargamiento C-NH₂ y al enlace con CH, mientras que en la región 1200 cm^{-1} corresponde al enlace C-H y N-H. Otra banda vista cerca de 1280 cm^{-1} puede asignarse como curva parcial de CH₂ y estiramiento de C-N de anillo imidazólico. El pico observable en la región 1400 cm^{-1} corresponde a la flexión de tijera de CH₂ y al estiramiento C-N en el anillo de imidazol mezclado con el estiramiento C-C. El valor teórico correspondiente es de 1379 cm^{-1} . Los dos picos que aparecen en la región 1600 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} , corresponden a la flexión de tijera de NH₂ y al alargamiento asimétrico del COO⁻. En la región 3000 cm^{-1} y 3100 cm^{-1} se observan otros dos picos los cuales muestran el alargamiento simétrico y asimétrico del CH₂ y el alargamiento simétrico del CH. El doble pico observable en la región 3400 cm^{-1} y 3500 cm^{-1} corresponde al alargamiento simétrico y asimétrico del NH₂.

3.2.2 Histidina-Cd

En el espectro IR obtenido para Histidina-Cd (Figura 13) se observa un pico cercano a la región 500 cm^{-1} correspondiente a la torsión del C-NH₂ propio del anillo imidazólico. Los dos picos correspondientes a la región cercana a 800 cm^{-1} y 900 cm^{-1} indica la presencia del NH₂ libre. En la región 1090 cm^{-1} se observa el alargamiento C-NH₂ y al enlace con CH, mientras que en la región 1200 cm^{-1} corresponde al enlace C-H y N-H. Otra banda vista cerca de 1280 cm^{-1} puede asignarse como curva parcial de CH₂ y estiramiento de C-N de anillo imidazólico. El pico observable en la región 1400 cm^{-1} corresponde a la flexión de tijera de CH₂ y al estiramiento C-N en el anillo de imidazol mezclado con el estiramiento C-C. Los dos picos que aparecen en la región 1600 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} , corresponden a la flexión de tijera de NH₂ y al alargamiento asimétrico del COO⁻. En la región 3000 cm^{-1} y 3100

cm^{-1} se observan otros dos picos los cuales muestran el alargamiento simétrico y asimétrico del CH_2 y el alargamiento simétrico del CH . Aparece un pico adicional en la región 3200 cm^{-1} que en el espectro de Histidina no se observó y esta señalización corresponde al alargamiento de CH . Se observa un pico en la región 3400 cm^{-1} correspondiente al alargamiento simétrico del NH_2 .

3.2.3 Histidina-Zn

En el espectro IR obtenido para Histidina-Zn (Figura 13) se observa un pico cercano a la región 500 cm^{-1} correspondiente a la torsión del C-NH_2 propio del anillo imidazólico. Los dos picos correspondientes a la región cercana a 800 cm^{-1} y 900 cm^{-1} indica la presencia del NH_2 libre. En la región 1090 cm^{-1} se observa el alargamiento C-NH_2 y al enlace con CH , mientras que en la región 1200 cm^{-1} corresponde al enlace C-H y N-H . Otra banda vista cerca de 1280 cm^{-1} puede asignarse como curva parcial de CH_2 y estiramiento de C-N de anillo imidazólico. El pico observable en la región 1400 cm^{-1} corresponde a la flexión de tijera de CH_2 y al estiramiento C-N en el anillo de imidazol mezclado con el estiramiento C-C . Aparece un pico en la región 1650 cm^{-1} , corresponden a la flexión de tijera de NH_2 y no aparece el pico de la región 1600 cm^{-1} , es decir, no se observa el alargamiento asimétrico del COO^- . En la región 3100 cm^{-1} se observan un pico el cual muestra el alargamiento simétrico del CH_2 , perdiéndose la señalización en la región 3000 cm^{-1} correspondiente al alargamiento asimétrico del CH_2 que aparece en la Histidina el alargamiento simétrico del CH . Se observa un pico en la región 3400 cm^{-1} correspondiente al alargamiento simétrico del NH_2 , perdiéndose la señalización asimétrica del NH_2 que aparece en la Histidina.

Es importante resaltar la banda observada en ambos espectros (Figura 13) en el número de frecuencia 2100 cm^{-1} suele aparecer en carbonilos metálicos, es decir, cuando el carbono se encuentra interaccionando con algún metal, en este caso Zn^{2+} y Cd^{2+} , que debido a sus similitudes puede interaccionar con ambos.

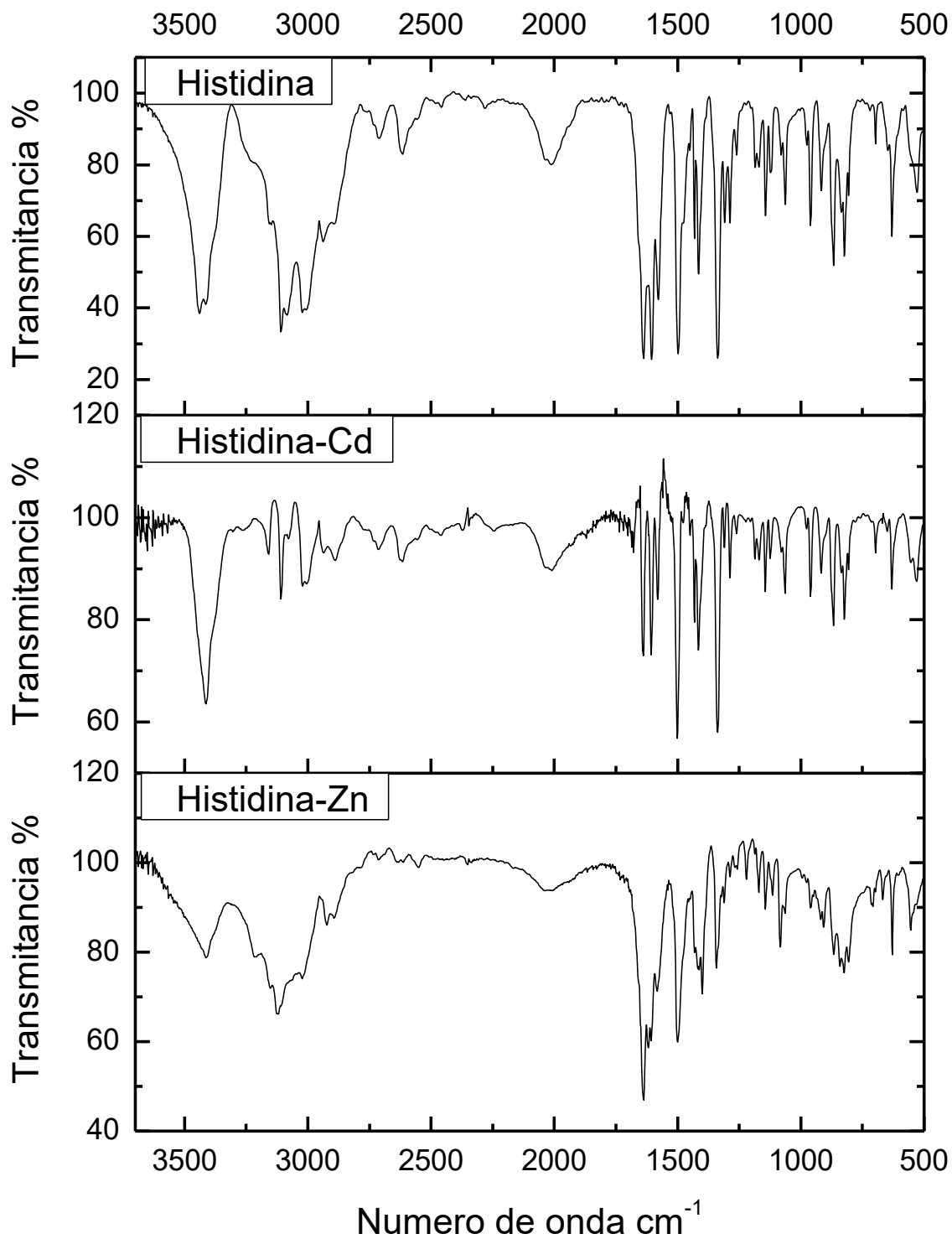


Figura 13. Espectro IR de la Histidina. Estudio del aminoácido bajo diferentes condiciones Ligando-Ligante. El primer espectro muestra la histidina, el segundo la histidina coordinada con Cadmio y el tercer espectro muestra la histidina coordinada con Zinc.

3.3 Análisis espectrofotométrico IR Glutamato, Glutamato-Zn y Glutamato-Cd.

3.3.1 Glutamato

En el espectro IR obtenido para Glutamato (Figura 14) se observa un pico cercano a la región 600 cm^{-1} correspondiente a la flexión de COOH. La frecuencia observable en la región 650 cm^{-1} corresponde a la flexión fuera del plano de NH_2 . Las correspondientes frecuencias en la región 750 cm^{-1} y 800 cm^{-1} pertenecen al balanceo de CH_2 y al movimiento del $\text{OH} + \text{CH}_2$ respectivamente. Los picos observables en la región 900 cm^{-1} corresponden a la flexión fuera del plano de HOCC más el movimiento del CH_2 y a los estiramientos de C-C y C-O respectivamente. La frecuencia observable en la región 1000 cm^{-1} corresponde al movimiento del OH y al movimiento de CH_2 más el estiramiento de C-C. Las frecuencias correspondientes a la región $1050 - 1100\text{ cm}^{-1}$ corresponden al alargamiento de C-N más la flexión fuera del plano del OH, al alargamiento de C-C más el movimiento del CH_2 , el alargamiento de CO y la flexión fuera del plano de NH_2 . Los picos observables en la región de 1150 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} corresponde al enlace C- CH_2 -C, al alargamiento C-C y al enlace OH más la torsión del CH_2 más el alargamiento de C-N. El pico observable en la región 1250 cm^{-1} corresponde al alargamiento asimétrico del C-OH en el grupo carboxílico y al alargamiento de C-N. La frecuencia observable correspondiente a la región 1300 cm^{-1} corresponde a la torsión del CH_2 más la flexión en el plano de NH_2 . Las frecuencias correspondientes a la región 1350 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} pertenecen al alargamiento C-O+ la torsión del CH_2 y al alargamiento del C-C el alargamiento de C-O respectivamente. El pico observable en la región 1550 cm^{-1} corresponde a la flexión en el plano del C-H. Las frecuencias observables en la región 1600 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} corresponden al enlace C-H más el enlace H-C-H y al alargamiento del C=O respectivamente. El pico observable en la región 2600 cm^{-1} corresponde al enlace N-H-N más el alargamiento del C=O. La frecuencia correspondiente a la región 2900 cm^{-1} corresponde al alargamiento simétrico del CH_2 . El pico observable en la región 3100 cm^{-1} pertenece al alargamiento del C-H en el CH_2 . Finalmente, las frecuencias correspondientes a las regiones 3250 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} corresponden al alargamiento del OH.

3.3.2 *Glutamato-Zn*

En el espectro IR obtenido para Glutamato-Zn (Figura 14) se observa un pico cercano a la región 600 cm^{-1} correspondiente a la flexión de COOH. La frecuencia observable en la región 650 cm^{-1} corresponde a la flexión fuera del plano de NH_2 . Las correspondientes frecuencias en la región 750 cm^{-1} balanceo de CH_2 , cabe destacar que se muestra más alargado respecto al IR del Glutamato y desapareciendo así la señalización de 800 cm^{-1} correspondiente al movimiento del OH. Los picos observables en la región 900 cm^{-1} corresponden a la flexión fuera del plano de HOCC más el movimiento del CH_2 y a los estiramientos de C-C y C-O respectivamente. La frecuencia observable en la región 1000 cm^{-1} corresponde al movimiento del OH y al movimiento de CH_2 más el estiramiento de C-C. Las frecuencias correspondientes a la región $1050 - 1100\text{ cm}^{-1}$ corresponden al alargamiento de C-N más la flexión fuera del plano del OH, al alargamiento de C-C+ el movimiento del CH_2 , el alargamiento de CO y la flexión fuera del plano de NH_2 . El pico observable en la región 1150 cm^{-1} corresponde al enlace C- CH_2 -C, cabe destacar que la señalización correspondiente al alargamiento del C-C se pierde y permanece la señalización correspondiente al enlace OH más la torsión del CH_2 más el alargamiento de C-N en la región 1200 cm^{-1} . El pico observable en la región 1250 cm^{-1} corresponde al alargamiento asimétrico del C-OH en el grupo carboxílico y al alargamiento de C-N. La frecuencia observable correspondiente a la región 1300 cm^{-1} corresponde a la torsión del CH_2 más la flexión en el plano de NH_2 . Las frecuencias correspondientes a la región 1350 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} pertenecen al alargamiento C-O más la torsión del CH_2 y al alargamiento del C-C el alargamiento de C-O respectivamente. El pico observable en la región 1550 cm^{-1} corresponde a la flexión en el plano del C-H. Las frecuencias observables en la región 1600 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} corresponden al enlace C-H + el enlace H-C-H y al alargamiento del C=O respectivamente. El pico observable en la región 2600 cm^{-1} corresponde al enlace N-H-N más el alargamiento del C=O. Finalmente, en la región de $2900\text{ cm}^{-1} - 3400\text{ cm}^{-1}$ se pierde la señalización del enlace C-H + el enlace H-C-H, el alargamiento del C=O, el alargamiento simétrico del CH_2 , el alargamiento del C-H en el CH_2 y el alargamiento del OH, por una probable humedad en la muestra.

3.3.3 *Glutamato-Cd*

En el espectro IR obtenido para el Glutamato-Cd (Figura 14) se observa un pico cercano a la región 600 cm^{-1} correspondiente a la flexión de COOH. La frecuencia observable en la región 650 cm^{-1} corresponde a la flexión fuera del plano de NH_2 . Las correspondientes frecuencias en la región 750 cm^{-1} y 800 cm^{-1} pertenecen al balanceo de CH_2 y al movimiento del OH más CH_2 respectivamente. Los picos observables en la región 900 cm^{-1} corresponden a la flexión fuera del plano de HOCC más el movimiento del CH_2 y a los estiramientos de C-C y C-O respectivamente. La frecuencia observable en la región 1000 cm^{-1} corresponde al movimiento del OH y al movimiento de CH_2 más el estiramiento de C-C. Las frecuencias correspondientes a la región $1050 - 1100\text{ cm}^{-1}$ corresponden al alargamiento de C-N más la flexión fuera del plano del OH, al alargamiento de C-C+ el movimiento del CH_2 , el alargamiento de CO y la flexión fuera del plano de NH_2 . Los picos observables en la región de 1150 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} corresponde al enlace C- CH_2 -C, al alargamiento C-C y al enlace OH más la torsión del CH_2 más el alargamiento de C-N. El pico observable en la región 1250 cm^{-1} corresponde al alargamiento asimétrico del C-OH en el grupo carboxílico y al alargamiento de C-N. La frecuencia observable correspondiente a la región 1300 cm^{-1} corresponde a la torsión del CH_2 más la flexión en el plano de NH_2 . Las frecuencias correspondientes a la región 1350 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} pertenecen al alargamiento C-O+ la torsión del CH_2 y al alargamiento del C-C el alargamiento de C-O respectivamente. El pico observable en la región 1550 cm^{-1} corresponde a la flexión en el plano del C-H. Las frecuencias observables en la región 1600 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} corresponden al enlace C-H más el enlace H-C-H y al alargamiento del C=O respectivamente. El pico observable en la región 2600 cm^{-1} corresponde al enlace N-H-N más el alargamiento del C=O. La frecuencia correspondiente a la región 2900 cm^{-1} corresponde al alargamiento simétrico del CH_2 . El pico observable en la región 3100 cm^{-1} pertenece al alargamiento del C-H en el CH_2 . Finalmente, las frecuencias correspondientes a las regiones 3250 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} corresponden al alargamiento del OH.

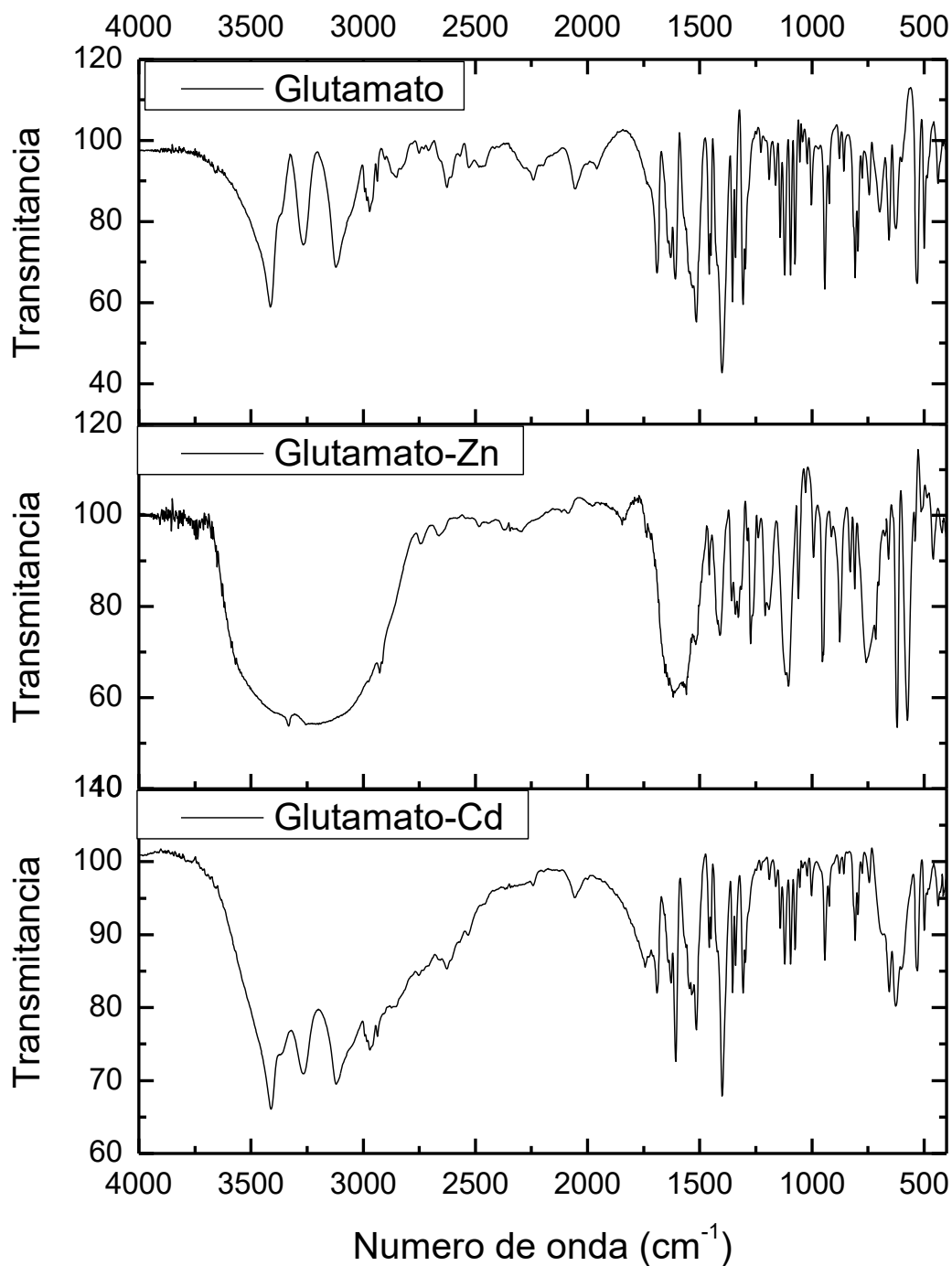


Figura 14. Espectro IR de Glutamato monosódico. Estudio del aminoácido bajo diferentes condiciones Ligando- Ligante. El primer espectro muestra el glutamato sin coordinación; el segundo muestra el glutamato coordinado con Zinc y el tercer espectro muestra el glutamato coordinado con Cadmio.

3.4 Análisis espectrofotométrico IR Cisteína, Cisteína-Zn y Cisteína-Cd.

En la molécula de cisteína el átomo de nitrógeno de la amina actúa como un donante en los enlaces de hidrógeno en el que los átomos de oxígeno del carboxilato que pertenecen a moléculas adyacentes son los aceptadores.

3.4.1 Cisteína

El espectro IR obtenido para Cisteína (Figura 15) se observa la frecuencia torsional simétrica de NH_2 en la región 450 cm^{-1} y $1,300\text{ cm}^{-1}$. Las frecuencias de oscilación en la región 580 cm^{-1} y 800 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace C-C. El pico observable en la región 700 cm^{-1} puede asignarse al alargamiento del enlace C-S. La flexión del CH_2 corresponde a la región 760 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} . Un pico cercano a la región 950 cm^{-1} , sugiere un modo torsional de SH en la molécula. Las frecuencias correspondientes al enlace C-H se observa en la región 1100 cm^{-1} y 2900 cm^{-1} . El pico registrado en la región 1200 cm^{-1} corresponde a la torsión del CH_2 . Los dos picos observables en la región 1600 cm^{-1} corresponden al alargamiento asimétrico del NH_2 . En la región 2600 cm^{-1} en el espectro IR se debe al modo de estiramiento SH. Las frecuencias de oscilación en la región 3000 cm^{-1} pueden representar el alargamiento simétrico del CH_2 .

Las vibraciones de alargamiento en forma de una banda espectral ancha que aparece en el número de onda 3400 cm^{-1} en el espectro de IR, corresponde al alargamiento de O-H. Cabe destacar que aunque en la estructura existe este grupo funcional en el ácido carboxílico es bien conocido que en estado sólido y aún en soluciones relativamente diluidas existen como dímeros y no muestran la absorción del grupo O-H (Figura 15).

3.4.2 Cisteína-Zn

En el espectro IR obtenido para Cisteína-Zn (Figura 15). se observa la frecuencia torsional simétrica de NH_2 en la región 450 cm^{-1} y $1,300\text{ cm}^{-1}$. Las frecuencias de oscilación en la región 580 cm^{-1} y 800 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace C-C. El pico observable en la región 700 cm^{-1} puede asignarse al alargamiento del

enlace C-S. La flexión del CH₂ corresponde a la región 760 cm⁻¹ y 1400 cm⁻¹. Un pico cercano a la región 950 cm⁻¹, puede asignarse al modo torsional de SH en la molécula. Las frecuencias correspondientes al enlace C-H se observa en la región 1100 cm⁻¹ y 2900 cm⁻¹.

El pico observable en la región 1200 cm⁻¹ corresponde a la torsión del CH₂. Los dos picos observables en la región 1600 cm⁻¹ corresponden al alargamiento asimétrico del NH₂. En la región 2600 cm⁻¹ en el espectro IR se debe al modo de estiramiento SH, debido a que el pico se intensifica esto puede tomarse como una prueba de que el átomo de hidrógeno del tiol estaba completamente sustituido por la presencia del metal . Las frecuencias de oscilación en la región 3000 cm⁻¹ pueden asignarse al alargamiento simétrico del CH₂. Las vibraciones de alargamiento en forma de una banda espectral ancha que aparece en el número de onda 3400 cm⁻¹ en el espectro de IR, corresponde al alargamiento de O-H, debido a la presencia de humedad en la muestra.

3.4.3 Cisteína-Cd

En el espectro IR obtenido para Cisteína- Cd (Figura 15) se observa la frecuencia torsional simétrica de NH₂ en la región 450 cm⁻¹ y 1,300 cm⁻¹. Las frecuencias de oscilación en la región 580 cm⁻¹ y 800 cm⁻¹ corresponden al estiramiento del enlace C-C. El pico observable en la región 700 cm⁻¹ puede asignarse al alargamiento del enlace C-S. La flexión del CH₂ corresponde a la región 760 cm⁻¹ y 1400 cm⁻¹. Un pico cercano a la región 950 cm⁻¹, puede asignarse al modo torsional de SH en la molécula. Las frecuencias correspondientes al enlace C-H se observa en la región 1100 cm⁻¹ y 2900 cm⁻¹.

El pico observable en la región 1200 cm⁻¹ corresponde a la torsión del CH₂. Los dos picos observables en la región 1600 cm⁻¹ corresponden al alargamiento asimétrico del NH₂. En la región 2600 cm⁻¹ en el espectro IR se debe al modo de estiramiento SH, debido a que el pico se curva esto puede aludirse a una torsión asimétrica ya que el átomo de hidrógeno del tiol estaba completamente sustituido por la presencia del metal. Las frecuencias de oscilación en la región 3000 cm⁻¹ pueden asignarse al alargamiento simétrico del CH₂. Las vibraciones de alargamiento en forma de una

banda espectral ancha que aparece en el número de onda 3400 cm^{-1} en el espectro de IR, corresponde al alargamiento de O-H, debido a la presencia de humedad en la muestra.

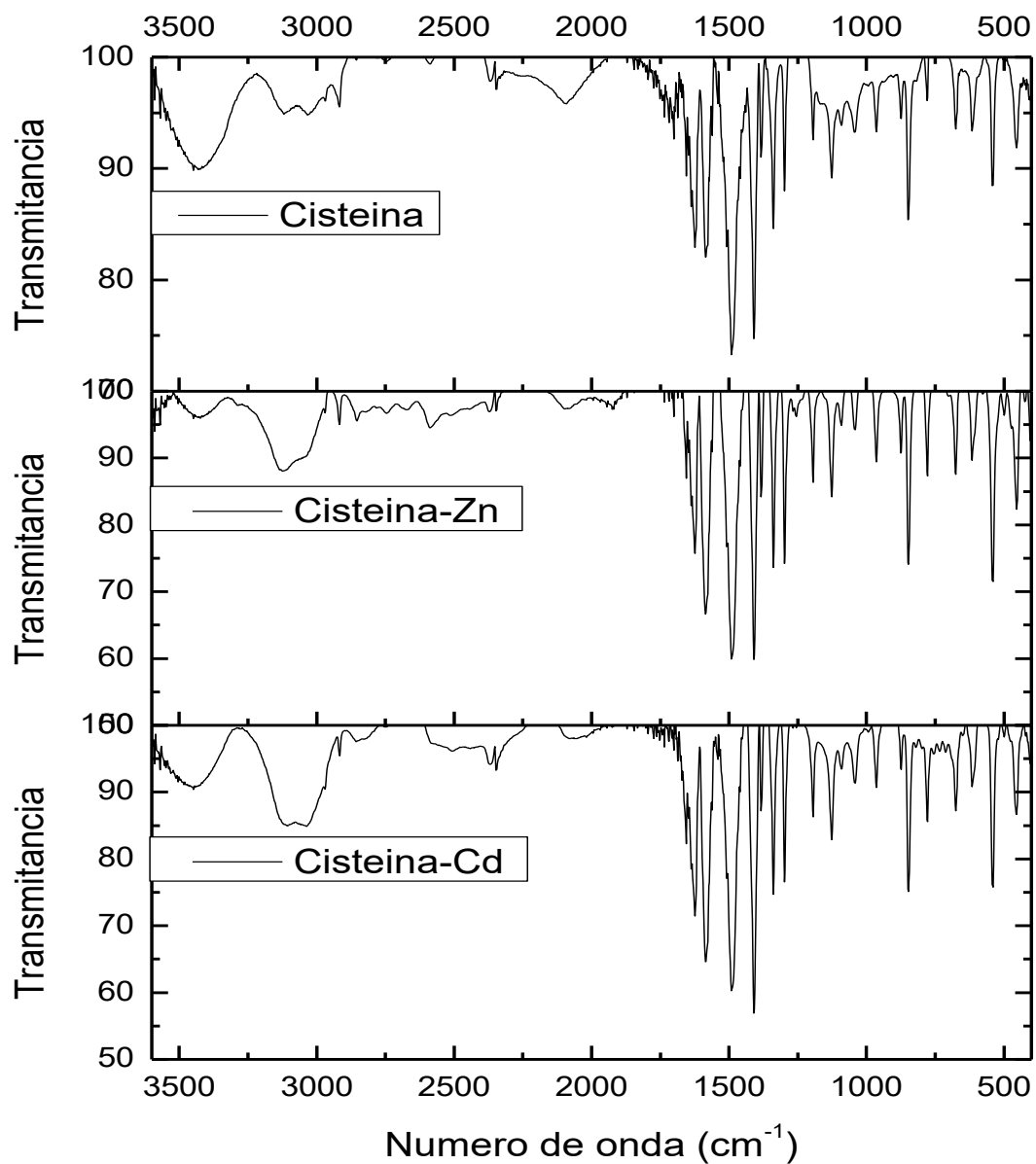


Figura 15. Espectro IR de Cisteína. Estudio del aminoácido bajo diferentes condiciones Ligando- Ligante. El primer espectro muestra la cisteína sin coordinación; el segundo muestra la cisteína coordinado con Zinc y el tercer espectro muestra la cisteína coordinada con Cadmio.

3.5 Análisis espectrofotométrico UV-VIS de los cristales de insulina-Zn²⁺ e Insulina-Cd²⁺

Por otro lado, fue realizada una espectroscopia de la región ultra-violeta de las diferentes condiciones de insulina. La banda que pudo ser observada en los diferentes espectros presentados en la figura en donde la insulina libre de metales (eliminados con Chelex), se pudo observar la banda característica del imidazol a 210 nm (línea con ■), mientras que cuando se realizó el espectro con la insulina Humalog® intacta (línea con ●), la cual se encuentra coordinada por Zn y fenoles, se pudo observar el alargamiento del espectro y un desplazamiento hasta 220 nm, sugiriendo fuertemente la coordinación con Zn (Figura 16). Así mismo, bajo las condiciones señaladas se realizó el análisis del espectro para la insulina a la cual previamente se le retiraron los metales y posteriormente se coordinó con Zinc como se indica en la sección.

En esta se pudo evidenciar la coordinación de las histidinas con el Zn extendiendo el hombro en el espectro desde 210 – 235 nm. Por último la insulina-Cd también sugiere fuertemente la coordinación con histidinas ya que presenta la máxima absorción desde 210 – 225.

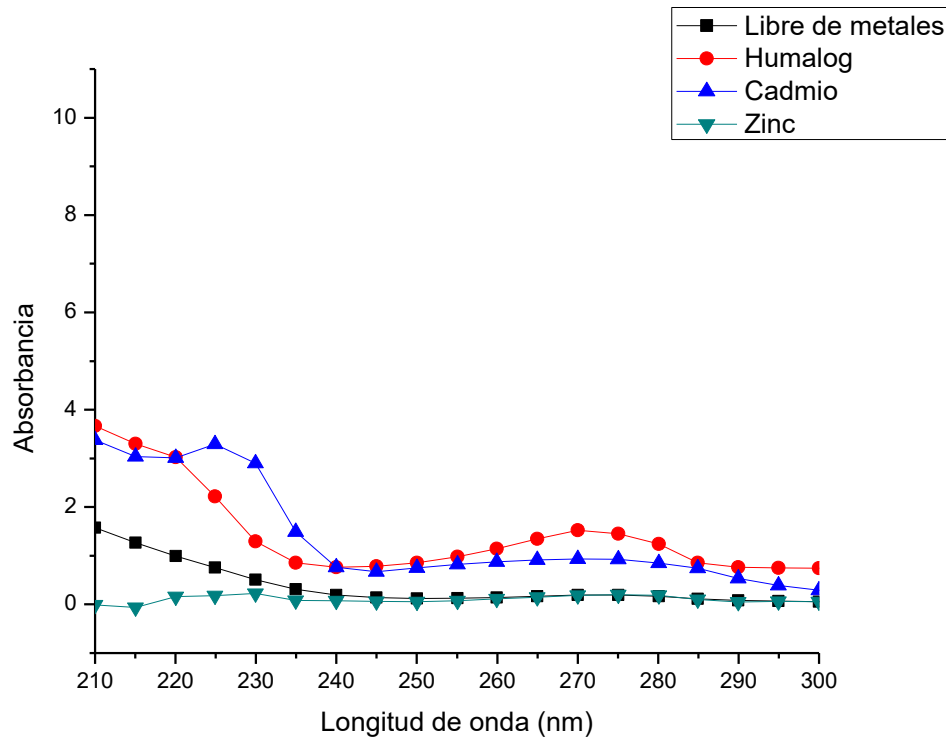


Figura 16. Espectro UV-Visible de insulina. Estudio de la proteína insulina bajo diferentes condiciones Ligando- Ligante. El (■) muestra la proteína libre de metales; el (●) muestra la hormona en su forma comercial como Insulina Humalog © 75/25; el (▼) muestra la insulina-Zn; el (▲) muestra la insulina-Cd.

Por otro lado, las proteínas usualmente presentan su máximo de absorción entre 275 y 280 nm, la cual es debida a una absorción por aminoácidos aromáticos como triptófano y tirosina principalmente, y en menor medida por los puentes disulfuro de la cistina. La absorción tanto de tirosina como de triptófano dependen del microambiente en el cual se halle la proteína, por esta razón sufre un ligero desplazamiento a la derecha del espectro cuando se transfieren desde un ambiente polar a un entorno no polar, tal como en el interior de una proteína globular. Una mayor joroba en la longitud 275 a 280 nm indica tanto la presencia de estos aminoácidos en entornos proteicos globulares o lineales. En el caso de la coordinación de la insulina esta es una proteína tipo amiloide, es decir está formada por dos subunidades unidas entre sí por puentes disulfuro, el contenido de los aminoácidos antes mencionados son 3 triptófanos, 4 tirosinas y 3 cistinas. En el caso de la coordinación con metales propicia el incremento de los aminoácidos en la zona de lectura, es por esta razón que la insulina libre de metales presenta una

absorción de 0.1924 unidades de absorbancia, mientras que las insulinas Humalog® e insulina-Zn, presentan una absorbancia de 1.4494 unidades de absorbancia, es decir 753% más que la insulina libre de metales; finalmente la insulina-Cd, presenta una absorbancia de 0.9291 unidades, lo cual corresponde a un incremento de 483%, así mismo presenta una pico a 260nm lo cual se relaciona con la existencia de puentes disulfuro formados por cisteínas. Estos resultados sugieren que los metales se coordinan con insulina primordialmente en residuos de histidina.

3.6 Análisis espectrofotométrico IR de los cristales de insulina-Zn²⁺ e Insulina-Cd²⁺

Se realizó una espectroscopia del infrarrojo de las diferentes condiciones de insulina.

De acuerdo al espectro IR obtenido para Insulina (Figura 17) la banda de absorción a 1540 cm⁻¹ se atribuye a la banda Amida-I (80% del alargamiento de C=O, 10% del enlace N-H y 10% del alargamiento C-N). La banda espectral en 1490 cm⁻¹ se atribuye a la Amida II (60% del enlace N-H, 40% del alargamiento del C-N) a partir de las vibraciones de flexión N-H que están fuertemente acopladas a la vibración de estiramiento del C-N del grupo amida de la proteína. La intensidad de las bandas de proteínas alrededor de 1540 cm⁻¹ Amida I y 1490 cm⁻¹ Amida II varían considerablemente, lo que indica que la proteína se ha coordinado con los metales (Zn²⁺ y Cd²⁺) en comparación con el espectro IR de insulina. La frecuencia observable en la región 3100 cm⁻¹ para el espectro de insulina y 3300 cm⁻¹ para los espectros de Insulina-Zn e Insulina-Cd corresponden a la Amida A (alargamiento del N-H) y la vibración de alargamiento de O-H.

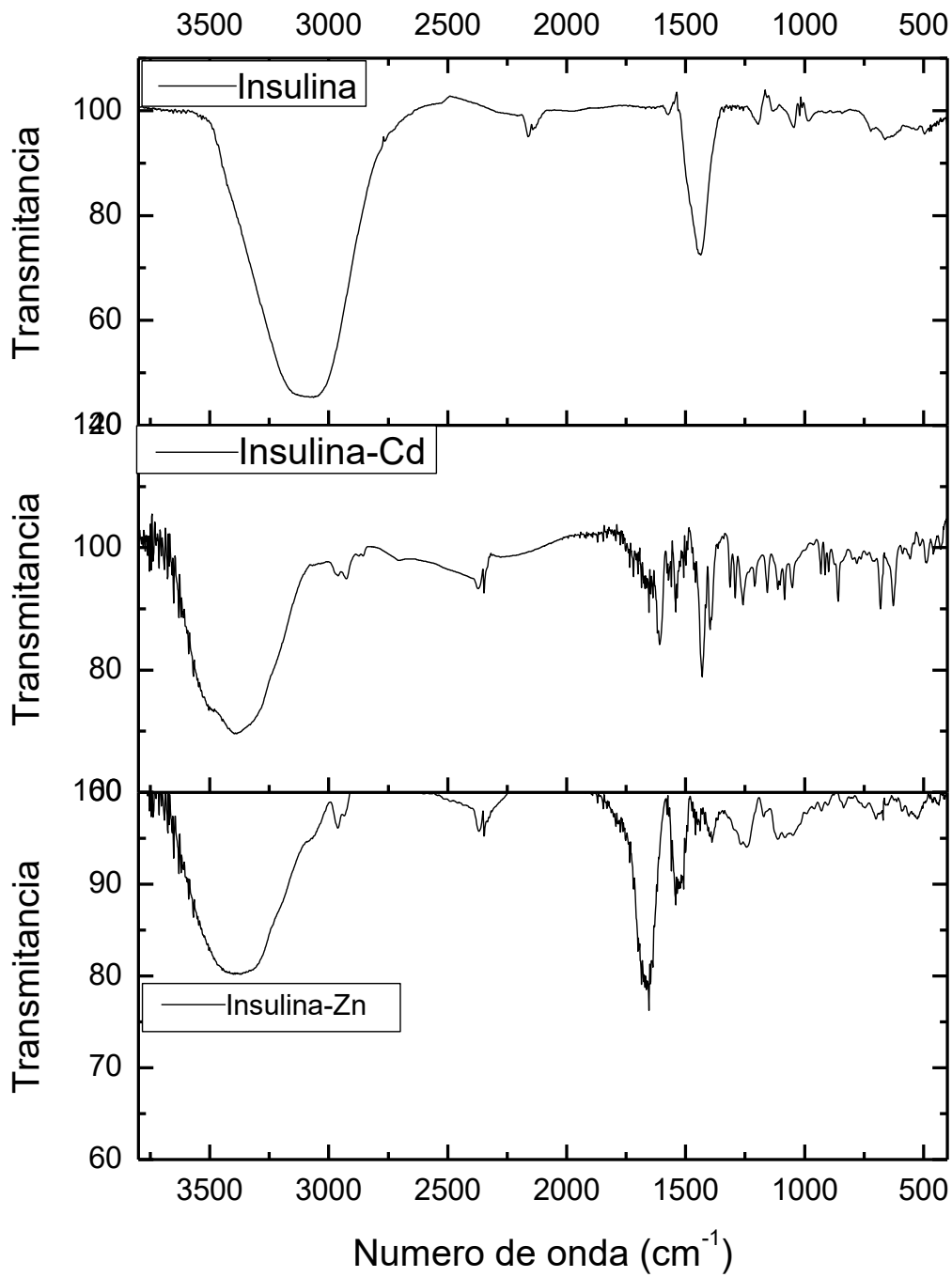


Figura 17. Espectro IR de la insulina. Estudio de la proteína insulina bajo diferentes condiciones Ligando-Ligante. El primer espectro muestra a la hormona en su forma comercial como Insulina Humalog® 75/25; el segundo muestra a la Insulina-Cd y el tercer espectro muestra a la Insulina-Zn.

3.7 Cristalización de la Insulina-Zn e Insulina-Cd

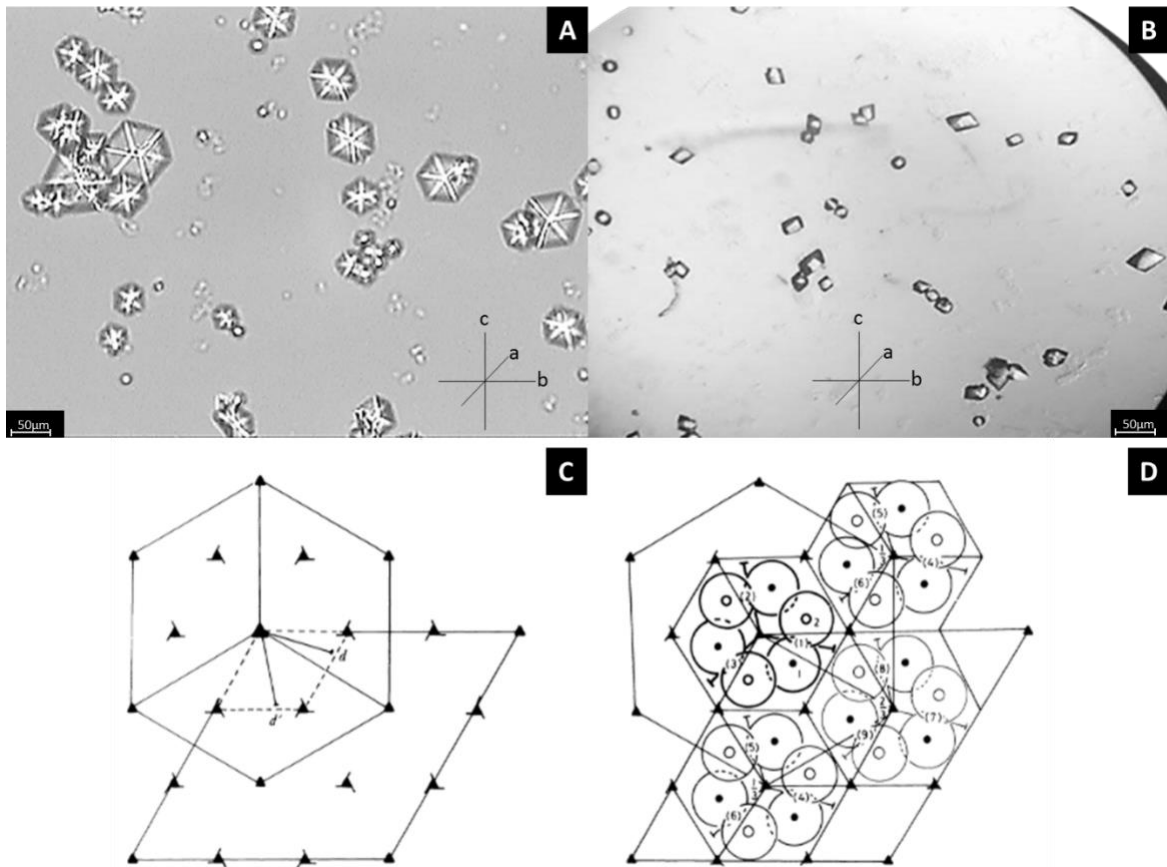


Figura 18. Cristales de Insulina-Zn e Insulina-Cd. Estudio en microscopía óptica del hábito de crecimiento cristalino de insulina-Zn e Insulina-Cd, obtenidas posterior al protocolo de cristalización para cada especie. **(A)** Se muestran fotomicrografías representativas de cristales Insulina-Zn con un objetivo de 40X. **(B)** Se muestran fotomicrografías representativas de cristales Insulina-Cd con un objetivo de 40X. **(C)** Esquema de hexaedro regular de celdilla de unidad hexagonal. **(D)** Esquema de hexaedro irregular (paralelepípedo oblicuo) de celdilla de unidad hexagonal, que lleva a la formación del octaedro. C y D fueron tomadas de Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 319, 369-456 (1988). Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio Leica con cámara digital usando el software XnView-Win, con el objetivo de 40X.

En la figura 18A muestra un sistema cristalográfico regular Insulina-Zn, también denominado cúbico o isodiamétrico, cuya característica simétrica es poseer cuatro ejes ternarios equidistantes entre sí, que dan origen a tres ejes binarios normales y equidistantes de los ternarios. El poliedro (cubo) se reconoce como una forma cerrada cristalina integrada por seis caras equidistantes y equivalentes, con ejes cuaternarios normales; sus aristas son ejes cristalográficos del sistema, las cuales forman ángulos rectos, por lo que $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. En la Figura 18B se muestran los cristales de insulina-Cd obtenidos, y su estructura característica es determinada por el hábito de crecimiento octaédrico de forma paramétrica cuyas caras normales a

los ejes ternarios, forman ángulos iguales a los del cubo, de manera similar a la relación paramétrica en donde $a:b:c = 1$. Sin embargo, este sistema es de tipo romboédrico lo cual hace una diferencia importante en los ejes cristalográficos al ser un derivado del cubo con 6 caras y doce aristas culminantes tres a tres en los vértices superior e inferior, por lo que forman ángulos idénticos entre sí y distintos a 90° : $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$. La cara fundamental es el pinacoide básico que trunca a este vértice y corta a los tres ejes. No obstante, debido a que aparecen en este sistema formas hexagonales, y con el fin de no orientar la misma forma cristalina de manera distinta, se adoptan, para el estudio morfológico, los ejes del sistema hexagonal.

3.8 Administración de insulina-Zn²⁺ e insulina-Cd²⁺ a un modelo de rata Wistar insulino requerido

Una vez que se sustentó la evidencia de que insulina puede hallarse coordinada por metales y especialmente por cadmio, se procedió a realizar el tercer protocolo del presente trabajo en el cual se contó con 70 ratas macho de la cepa Wistar de ~300 gr de peso, a las cuales se les cuantificó sus niveles basales de glucosa e insulina. A 50 de estos animales se les administró por vía intraperitoneal 150 mg/kg de peso de Aloxano (2, 4, 5, 6 - pirimidinatetrona) para producir una hiperglucemia. Posterior a la administración de Aloxano se observó un incremento de glucosa en plasma en promedio de 400 mg/dL, con una disminución significativa de la concentración de insulina (~6 $\mu\text{U}/\text{mL}$), como se puede observar en las Figura 19 A - B.

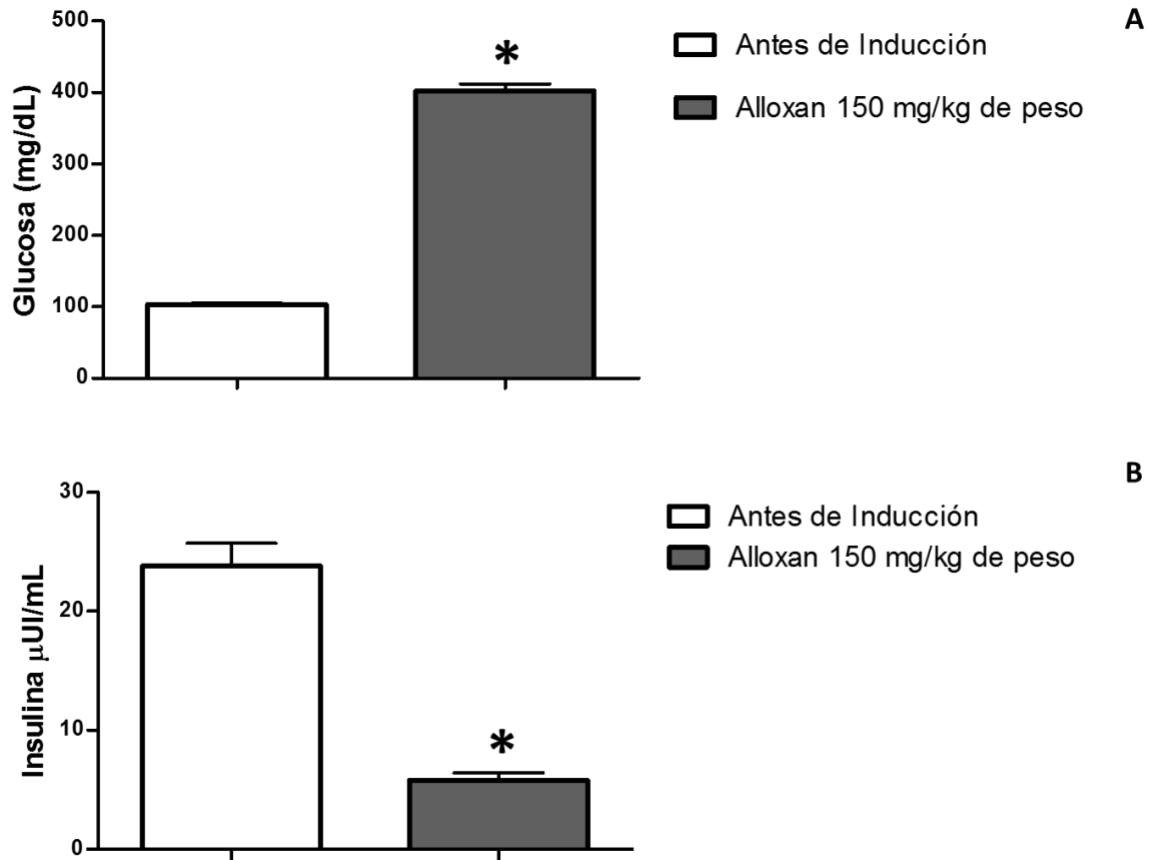


Figura 19. Concentración de Glucosa e Insulina. (A) Concentración de glucosa antes y después de la inducción de hiperglicemia mediante aloxano 150 mg/kg de peso (n = 70). (D - F) Concentración de insulina antes y después de la inducción de hiperglicemia mediante aloxano 150 mg/kg de peso (n = 50). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$.

Una vez logrado el modelo insulino-requiere, se procedió a administrar insulina-Cd e insulina Humalog® (la cual se consideró como una insulina-Zn) a los grupos de animales hiperglicémicos, con la finalidad de conocer el efecto de ambas insulinas en los animales insulino-requiere, a los tiempos basal, 30 min, 60 min y 90 min.

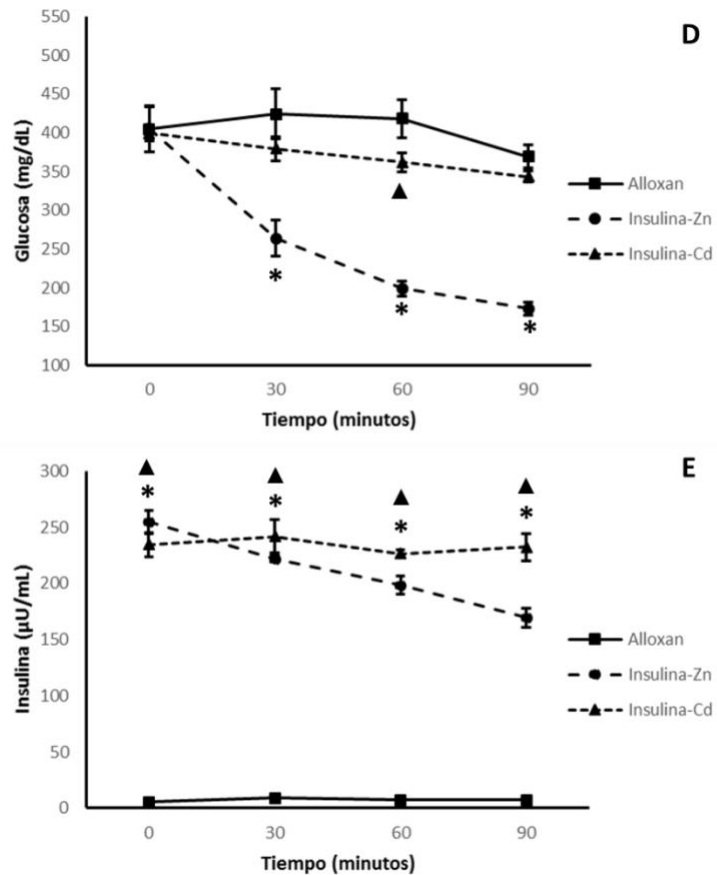
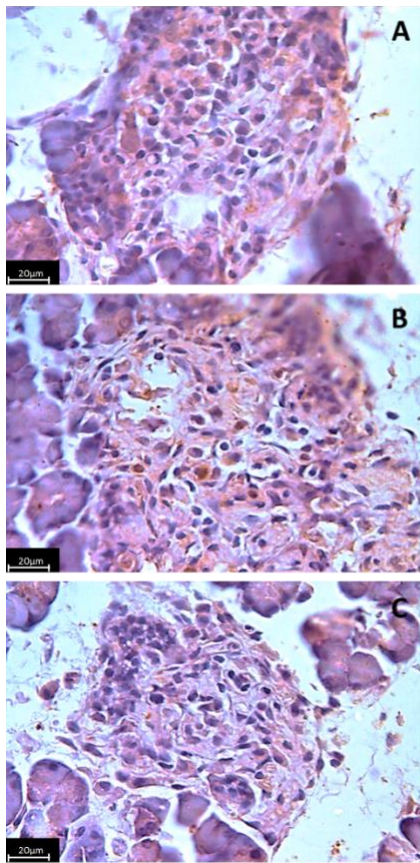


Figura 20. Glucosa e Insulina en animales insulino-requiereentes con daño β pancreático. (A - C) Inmunohistoquímica para insulina en islotes de Langerhans, 3 días posteriores a la administración I.P. de aloxano 150 mg/kg de peso, en los grupos Aloxano, Aloxano + Insulina-Zn y Aloxano + Insulina-Cd (n = 10, por grupo). (D) Concentración de glicemia en los grupos Aloxano (línea -■-), Aloxano + Insulina-Zn (línea -●-) y Aloxano + Insulina-Cd (línea -▲- con n = 10, por grupo). (E) Concentración de insulina sérica en los grupos Aloxano (línea -■-), Aloxano + Insulina-Zn (línea -●-) y Aloxano + Insulina-Cd (línea -▲- con n = 10, por grupo). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$ entre el grupo control hiperglucémico (Aloxano) y el grupo insulina-Zn. (▲) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$ entre el grupo control hiperglucémico (Aloxano) y el grupo insulina-Cd.

Los resultados obtenidos mostraron que la administración de aloxano indujo un daño selectivo a los islotes de Langerhans, como lo muestran las figuras 20 A – C, en donde el inmunomarcaje para la hormona fue bajo en los animales del grupo control hiperglucémico, insulina-Zn e insulina-Cd. El gráfico 20D muestra la glicemia observada en los animales control no administrados con insulina (línea continua) y en los animales administrados con insulina-Zn (línea discontinua larga), en donde pudo observarse una disminución progresiva y significativa de glucosa con respecto al tiempo. El grupo de animales con 400 mg/dL de glucosa sérica en un inicio,

después de la administración de 8U de insulina-Zn exógena a los animales hiperglucémicos, éstos presentaron una disminución del 37% a los 30 min, del 52% a los 60 min y del 53% a los 90 min, finalizando con una glucosa promedio de 173 mg/dL. Para garantizar que la administración subdérmica de insulina presentase efecto, se cuantificó de la hormona presente en suero. Los resultados mostraron (Figura 20 E) que los animales inducidos con aloxano y sin tratamiento (línea continua), presentan niveles muy bajos de la hormona $\sim 7 \mu\text{U}/\text{mL}$, mientras que los animales administrados con insulina-Zn 15 min antes de iniciar el estudio (por protocolo) llegaron a un máximo sérico al tiempo basal de $255 \mu\text{U}/\text{mL}$., a los 30 min de $221 \mu\text{U}/\text{mL}$., a los 60 min de $198 \mu\text{U}/\text{mL}$. Y finalmente a los 90 min de $170 \mu\text{U}/\text{mL}$. Lo cual indica que la insulina administrada está ejerciendo su acción al disminuir la concentración de glucosa y al mismo tiempo permanece en circulación por más tiempo ejerciendo actividad biológica.

En los animales tratados con aloxano e insulina-Cd (8U subdérmica), mostraron una disminución del 10% a los 30 min la cual no fue significativa, a los 60 min del 13% y a los 90 min del 7%, sin mostrar una actividad relevante como hipoglucemiante (Figura 20 D). Al cuantificar la hormona en circulación se pudo observar la presencia de la misma, presentando una concentración basal a los 15 min post administración de $235 \mu\text{U}/\text{mL}$., a los 30 min de $242 \mu\text{U}/\text{mL}$, a los 60 min de $227 \mu\text{U}/\text{mL}$ y finalmente a los 90 min de $232 \mu\text{U}/\text{mL}$. Estos resultados muestran que la insulina-Cd no presenta actividad biológica, a pesar de encontrarse en circulación.

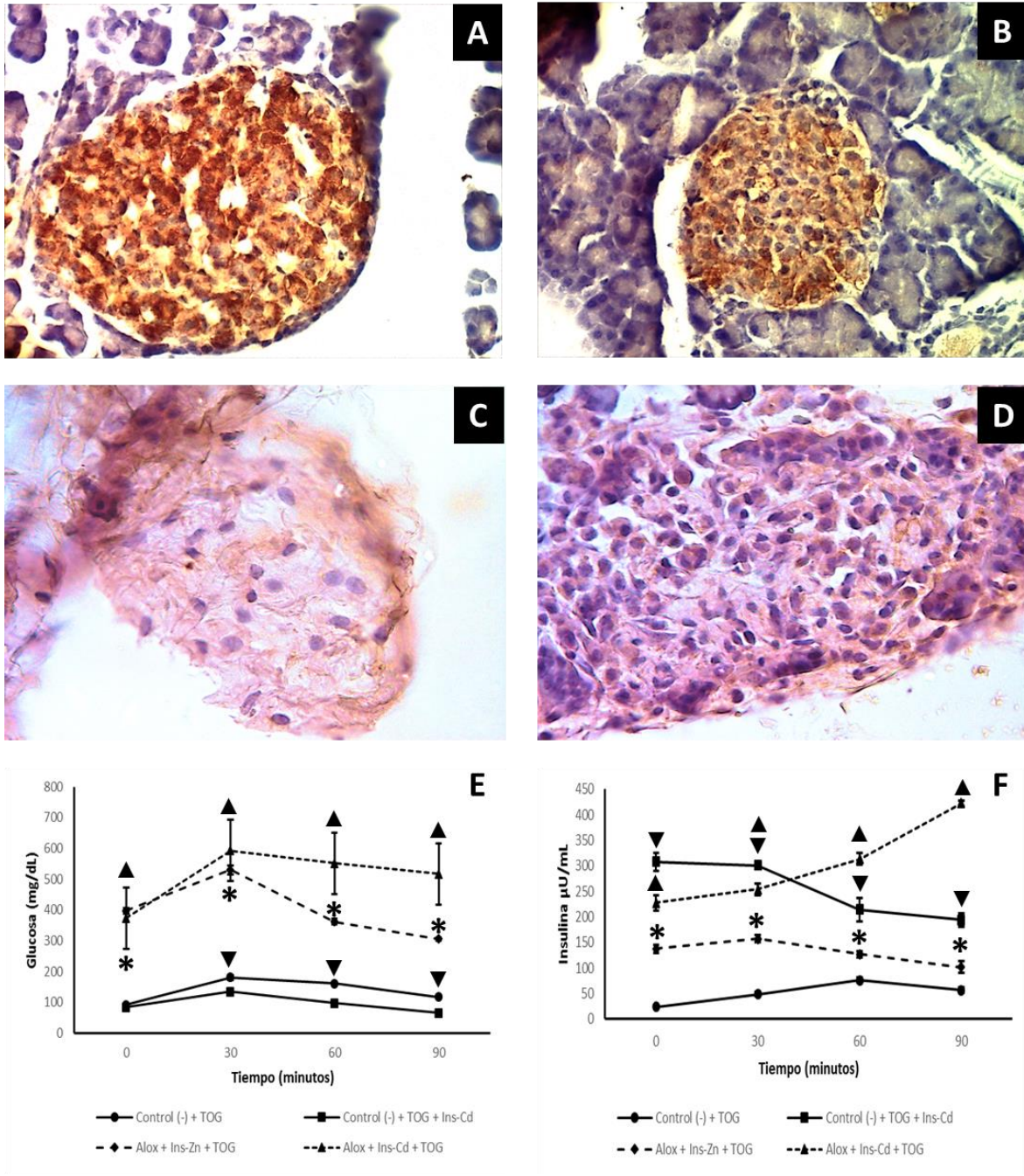


Figura 21. Tolerancia a Glucosa y Comportamiento Insulínico en animales insulino-requ coastantes con y sin daño β pancreático. (A - B) Inmunohistoquímica para insulina en islotes de Langerhans de animales intactos (control negativo n = 10, por grupo). (C - D) Inmunohistoquímica para insulina en islotes de Langerhans, 3 días posteriores a la administración I.P. de aloxano 150 mg/kg de peso, en los grupos Aloxano + Insulina-Zn + TOG y Aloxano + Insulina-Cd + TOG (n = 10, por grupo). (E) Concentración de glicemia en los grupos Intacto + TOG (línea -●-), Intacto + Insulina-Cd + TOG (línea -■-), Aloxano + Insulina-Zn + TOG (línea -◆-) y Aloxano + Insulina-Cd + TOG (línea -▲-) (n = 10, por grupo). (F) Concentración de insulina sérica en los grupos Intacto + TOG (línea -●-), Intacto + Insulina-Cd + TOG (línea -■-), Aloxano + Insulina-Zn + TOG (línea -◆-) y Aloxano + Insulina-

Cd + TOG (línea -▲-) (n = 10, por grupo). Los datos presentados son la media de los valores medidos \pm el EEM (Error Estándar de la Media). Las comparaciones entre grupos se realizaron por la prueba de "t" de Student. (*) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$ entre el grupo control Normogluicémico y el grupo aloxano + insulina-Zn + TOG. (▲) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$ entre el grupo control Normogluicémico y el grupo aloxano + insulina-Cd + TOG. (▼) Indica diferencia significativa a $P < 0.05$ entre el grupo control Normogluicémico y el grupo Control (-) + insulina-Cd + TOG.

Con la finalidad de corroborar la actividad de las diferentes insulinas, se realizó una prueba de tolerancia oral a la glucosa para conocer la respuesta insulínica con Zn y Cd ante un estímulo de glucosa. En la figura 21 A y B se pueden observar las fotomicrografías de los islotes de Langerhans de los grupos control intacto, sin y con previa exposición a insulina-Cd, respectivamente, las cuales no muestran alteración en cuanto a estructura y concentración de la hormona. La figura 21 C y D, por su parte son representativas de los grupos con requerimiento de insulina, en donde se puede apreciar, una disminución marcada y significativa de la hormona. En la Figura 21 E se muestra el comportamiento glicémico de los diferentes grupos; el grupo control intacto + TOG (línea -●-) presentó una glucosa basal promedio de 91.6 mg/dL, un incremento de 180 mg/dL a 30 min, 160 mg/dL a 60 min y un regreso en la concentración de glucosa a 90 min de 117 mg/dL. Mientras que a los animales a los que se les indujo una hiperglicemia con aloxano, y se le administró una carga de 8U de insulina-Zn, 15 min antes de la exposición a la TOG (línea -◆-), iniciaron con 397 mg/dL de glucemia, llegando a un máximo de 530 mg/dL a los 30 min, disminuyendo a los 60 min a la concentración de 362 mg/dL y 305 mg/dL a los 60 min; datos que muestran la actividad biológica esperada de la hormona. Con relación a la actividad biológica de la hormona, cuando se encuentra coordinada con Cd, a un grupo intacto de animales se le administró 8U de insulina-Cd y se realizó una TOG (línea -■-), mostró concentración basal de 84 mg/dL, a los 30 min incrementó su contenido de glucosa a 135 mg/dL, a los 60 min post carga presentó 97 mg/dL y finalizó a los 90 min con 65 mg/dl del carbohidrato, indicando que la administración de insulina-Cd, con una mayor demanda de la hormona presentó ligera actividad biológica. Sin embargo, cuando se retó dicha actividad en un grupo hipergluicémico insulino-requiere, el cual se le administró 8U de insulina-Cd, 15 minutos antes de la carga de glucosa (línea -▲-), mostró hiperglicemia basal (374

mg/dL), a los 30 min 592 mg/dL, a los 60 min 551 mg/dL y a los 90 min 516 mg/dL; lo cual confirma la baja actividad biológica de la hormona en combinación con Cd.

Finalmente, se cuantificó la presencia sérica de insulina en los diferentes grupos de estudio Figura 20 F. El grupo control negativo (intacto que recibió la TOG, línea -●-), mostró de manera basal 24 $\mu\text{U}/\text{mL}$, en respuesta a la carga de glucosa a los 30 min incrementó a 49 $\mu\text{U}/\text{mL}$, a los 60 min 76 $\mu\text{U}/\text{mL}$ y a los 90 min se observó un regreso a 57 $\mu\text{U}/\text{mL}$. Mientras que su similar hiperglucémico con administración insulina-Zn (línea -◆-), presentó 137 $\mu\text{U}/\text{mL}$, 157 $\mu\text{U}/\text{mL}$, 126 $\mu\text{U}/\text{mL}$ y 101 $\mu\text{U}/\text{mL}$ a los tiempos 0 min, 30 min, 60 min y 90 min, respectivamente. El grupo intacto al cual se le administró insulina-Cd y se realizó la TOG (línea -■-), promedió 308 $\mu\text{U}/\text{mL}$, 300 $\mu\text{U}/\text{mL}$, 213 $\mu\text{U}/\text{mL}$ y 194 $\mu\text{U}/\text{mL}$ en los tiempos correspondientes, lo cual confirmó que la insulina-Cd no se aclara con la misma velocidad que su homólogo con Zn del suero en los animales administrados. Por último, el grupo aloxano administrado con 8U de insulina-Cd y retado con una carga de glucosa de 1.75g/kg de peso, mantuvo concentraciones elevadas de la hormona es suero, con poca actividad biológica, las cuales correspondieron a 228 $\mu\text{U}/\text{mL}$, 254 $\mu\text{U}/\text{mL}$, 313 $\mu\text{U}/\text{mL}$ y 422 $\mu\text{U}/\text{mL}$ a los tiempos de 0 min, 30 min, 60 min y 90 min, respectivamente. Sugiriendo fuertemente que la coordinación de la hormona con Cd, modifica la actividad hipoglucemiante tanto en los animales requirentes como en dependientes a la misma.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El Cadmio (Cd^{2+}) está estrechamente relacionado con el Zinc (Zn^{2+}) y ambos metales se encuentran en abundancia en la naturaleza. Aunque el Cd^{2+} y el Zn^{2+} tienen propiedades químicas similares, cada elemento afecta el organismo mamífero de manera diversa y por ello se maneja de manera diferente. El Zinc es un elemento necesario para el mantenimiento de la normalidad en las funciones bioquímicas y cuya absorción está regulada de manera homeostática (Halsted, Smith and Irwin, 1974).

El Cadmio, por otro lado, es un producto altamente tóxico, no es un elemento esencial no obedece a la homeostática, acumulándose en el organismo con la edad (Schroeder y Balassa, 1961; Cotzias, Borg y Selleck, 1961).

Recientemente se ha demostrado que el Cd^{2+} afecta el metabolismo de los carbohidratos hepáticos y la adenosina cíclica 3',5'-monofosfato (AMP cíclico) (Sporn, Dinu and Stoonescu, 1970; Stowe, Wilson and Goyer, 1972) así como la función pancreática en el ratón, la rata y el ser humano (Merali and Singhal, 1975). Dichos estudios sugieren que el Cd^{2+} produce daños a las células β , produciendo una disminución de la liberación insulínica (Chang et al., 2013; Edwards and Prozialeck; 2009). Sin embargo, el mecanismo o los mecanismos por los cuales el Cd^{2+} induce el desarrollo de estados hiperglicémicos no es completamente comprendido. El propósito del presente estudio fue demostrar si ante una intoxicación con Cd^{2+} se puede alterar la conformación de la insulina disminuyendo su función biológica. Demostramos que ante una mayor concentración de Cd^{2+} desplaza al Zn^{2+} por su similitud aumentando la posibilidad de la interacción del Cd^{2+} con la insulina en la coordinación misma.

Algunos mecanismos han sido propuestos para explicar estados hiperglucémicos incluyendo alteraciones en el receptor de insulina (Bratusch-Marrain et al., 1986; Gavin et al., 1974). Esta hipótesis postula que el receptor de insulina disminuye su afinidad a la hormona por fenómenos de ocupación, esto es conocido como una cooperación "negativa" (Rizza et al., 1985), durante este proceso se produce una reducción en el número de receptores en la parte superficie celular, debido a que

estos se internalizan y degradan cuando son ocupados por la hormona (Bratusch-Marrain et al., 1986). Independientemente de la causa que lleva a una hiperinsulinemia, la hiperfunción sostenida de las células β puede conducir a una alteración en su capacidad de regular la tasa de secreción de insulina (DeFronzo, 2004).

El cadmio se encuentra regularmente en los minerales junto con el zinc, el cobre y el plomo. Por lo tanto, la actividad volcánica es una razón natural para un aumento temporal en las concentraciones ambientales de cadmio. Este dato es de interés en la Ciudad de Puebla, sobre todo de las comunidades cercanas al volcán Popocatepetl, ya que la actividad volcánica es un factor que puede afectar a la población.

Entre otros factores, se sabe que el cadmio se usa ampliamente en procesos industriales, por ejemplo, como agente anticorrosivo, como estabilizador en productos de PVC, como pigmento, como absorbente de neutrones en centrales nucleares y en la fabricación de baterías de níquel-cadmio. Los fertilizantes fosfatados también muestran una gran carga de cadmio. Aunque algunos productos que contienen cadmio se pueden reciclar, una gran parte de la contaminación general de cadmio es causada por el vertido y la incineración de desechos contaminados con cadmio (Jarup. L, 2003). Algunas evidencias sugieren que la exposición crónica de bajo nivel a Cd^{2+} en el medio ambiente puede estar asociada con un mayor riesgo de desarrollar disglucemia y diabetes mellitus (Figura 21) (Schwartz et al., 2003). Desde un punto de vista biológico, Cd^{2+} es de interés en la biología de las células β , dada su similitud con zinc (Zn^{2+}) y la importancia de este en la fisiología de las células β . Tanto Cd^{2+} como Zn^{2+} , son miembros del mismo grupo en la tabla periódica y por lo tanto exhiben características químicas similares. En múltiples tipos de células, Cd^{2+} , se ha demostrado que compite con Zn^{2+} con diversas proteínas citoplasmáticas y transportadoras (Antala and Dempksi, 2010; Muayed et al., 2012).

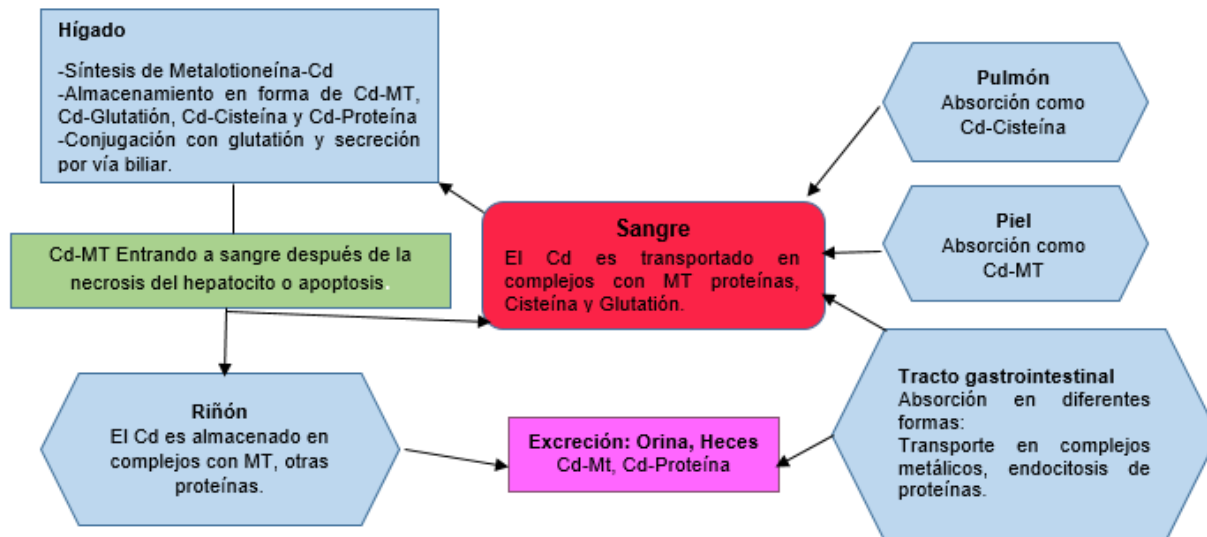


Figura 21. Manipulación de cadmio en cuerpo humano. Metabolismo, almacenamiento y excreción de cadmio en el cuerpo humano (Tomado y modificado de Johannes Godt et al., 2006).

Se ha determinado que las células β contienen altas concentraciones de Zn y este metal es esencial para la producción de insulina (Bosco et al., 2014). El Zn puede ser importante en varias etapas en la síntesis y almacenamiento de la insulina en las células beta, especialmente en la formación de hexámeros de proinsulina en el aparato de Golgi y en la formación de los cristales de insulina madura en las vesículas secretoras (Ravier and Rutter, 2005). La forma hexamérica de la insulina consiste en 6 moléculas de insulina dispuestas como 3 dímeros, aunque cada monómero en el dímero consiste en la misma secuencia peptídica, hay algunas diferencias en la conformación espacial de la cadena lateral de tal manera que no hay doble simetría (Pittman I, Philipson L and Steiner D, 2004).

Dado que se ha establecido la interrelación de los transportadores presentes en las células β , el incremento en cuanto a resguardo del xenobiótico y la disminución de Zn en estas, nosotros exploramos la posibilidad de que el Cd, pueda estar interactuando con la insulina, inclusive en coordinación con la misma. Debido a que cuando la proinsulina se convierte a la insulina, se almacena inicialmente como un monómero y luego forma dímeros de insulina en concentraciones más altas en los gránulos secretorios. En presencia de iones Zn^{2+} que se transportan a los gránulos secretores, la insulina se somete a un proceso de maduración para formar

complejos hexaméricos con 2 átomos de Zn^{2+} (Glodman and Carpenter, 1974; Steiner, 2011; Dunn, 2005). La conversión de monómero o dímeros a hexámeros coordinados por Zn, disminuye significativamente la solubilidad de este dando paso a su cristalización dentro de los gránulos. Por lo tanto, los gránulos maduros tienen un núcleo denso-cristalino. La insulina madura resultante se almacena dentro de gránulos, y al recibir una señal estimuladora es exocitado de la célula β a la circulación (Li, 2014). En nuestro protocolo, la posibilidad de un cambio en la conformación hexamérica se comprobó a través de la cristalización de la insulina, evaluando también que cuando el Cd^{2+} se encuentra en mayor concentración que el Zn^{2+} compite por el sitio de coordinación, causando un desplazamiento y sustitución del Zn^{2+} . Los cristales de insulina-Zn mostraron un sistema cristalográfico cúbico mientras que los cristales de insulina-Cd obtenidos tuvieron una forma octaédrica, no aparecieron formas hexagonales.

Se propone que la vía de ensamble del hexámero de insulina involucra la formación de dímeros de insulina seguido por la combinación de dos dímeros con dos iones de zinc para dar un tetrámero $(Zn^{2+})_2(Ins)_4$, que luego se combina con otra unidad dimérica para dar la insulina hexamérica (Dunn, 2005). Insulinas monoméricas y diméricas no tienen sitios quelantes fuertes para iones metálicos divalentes.

La estructura cristalina de la insulina se informó por primera vez como romboedro "Forma 2-Zn" (Adams et al., 1969), nombrado de acuerdo a su contenido de zinc (Schlichtkrull, 1958). La conformación de cada cadena A consiste en dos α hélices antiparalelas conectadas por una extensión corta de A9Ser-A12Ser, mientras que cada cadena B consiste en dos cadenas extensas conectadas por el centro a un segmento α helicoidal, B9Ser-B19Cys. Cada uno de los dos iones zinc se encuentra en un eje cristalográfico de 3 pliegues y está coordinado por las cadenas laterales de tres residuos de histidina B10 relacionados con la simetría de cada uno de los dos trímeros de insulina. La adición de un ion cloruro al medio de cristalización produce una segunda forma de cristal romboédrico, que también posee un hexámero 3 veces simétrico (Bentley y col., 1976,1992; Smith et al., 1984; Baker et al., 1988; Derewenda et al., 1989; Smith y Dodson, 1992).

Así mismo, se ha reconocido que el hexámero de insulina puede presentar formas alostéricas que están respecto de la forma de reconocimiento del ligando, por lo que pueden generarse tres estados conformacionales designados como T_6 , T_3R_3 y R_6 (Kaarsholm et al., 1989; Derewenda et al., 1989).

La naturaleza alostérica del hexámero de insulina se observó por primera vez por Schlichtkrull (1958) cuando se encontró una segunda forma de cristal romboédrico que se produce cuando el contenido de iones cloruro supera al 6% en los medios de cristalización. Esta forma de la insulina fue originalmente llamada insulina 4-zinc (Bentley et al., 1976) ya que contenía cuatro iones de zinc por hexámero en comparación con dos bloques de zinc observados en la estructura de la insulina hexamérica original (Adams et al., 1969). Acompañando el incremento en el contenido de zinc en la estructura 4-zinc fue un cambio conformacional desde la α -Helicoidal extendida en los residuos 4 - 8 en las cadenas β en un trímero de insulina.

Los sitios Zn dentro de una unidad R presentan distancias entre 16 y 20 Å, sin embargo, cuando interactúan con otros aniones dentro de la coordinación en B10 esta distancia se ve reducida de forma importante (6 - 8 Å). Los sitios calcio por su parte están ubicados en el centro del hexámero donde se coordinan con los grupos carboxilo de los Glu en B13, posicionados en pares alrededor del centro de un diámetro de ~ 12 Å, este sitio fue descrito por primera vez en una serie de estudios realizados por Sudmeier en 1981, mostrando que $^{113}\text{Cd}^{+2}$ puede sustituir a Zn^{2+} de los sitios B10 y a Ca^{2+} de los sitios B13, siendo en este último el que resulta ser mayormente desplazado en relación a B10 (Sudmeier et al., 1981). En el presente estudio, logramos las coordinaciones con Zn^{+2} y Cd^{2+} en ausencia de Ca^{+2} , por lo que suponemos la interacción con ambos sitios B10 y B13.

Los estudios de difracción de rayos X han mostrado que Cd en derivados hexámeros se une a seis carboxilatos en Glu B13 en tres posiciones simétricamente relacionadas, estrechamente espaciados en el centro del hexámero. Debido a la estrecha separación de estos sitios, esta cavidad puede acomodar sólo un único ion metálico divalente en cualquier momento, por lo tanto, hay una población aleatoria de las tres posiciones a lo largo de la red cristalina (Storm and Dunn 1985). Al

respecto se ha determinado que Cd puede coordinarse en complejos monoméricos y poliméricos con diferentes aminoácidos, mientras exista un agua involucrada en dicha coordinación, se ha reconocido el comportamiento octaédrico de Cd con dos aguas interactuando en la esfera de coordinación con L-glutamato, por lo que en este tipo de compuestos es reconocido que el aminoácido puede llegar a coordinar hasta 3 iones de Cd usando sus 5 átomos donadores. Los grupos α -carboxilato pueden actuar como un ligando-quelante junto con el grupo amino como un *anti-syn* puente bidentado para un centro Cd, mientras el grupo γ -carboxilato actúa como quelante bidentado (Flook et al., 1973). En cuanto a Histidinas se refiere, el modo de coordinación de Cd está en relación a una coordinación cuasi-planar de tipo bidentada con el anillo imidazólico actuando como quelante, siendo completamente coplanar cuando se combina con oxígenos (Wang et al., 2005). En el presente estudio se puso en evidencia la coordinación de los metales con los aminoácidos principales (Histidina, Glutamato y Cisteína), analizando los espectros obtenidos para la histidina se propone que el Cd^{2+} interactúa en la posición B10 y B13 de la insulina con la Histidina, se observaron desplazamientos evidentes en la región 1600 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} (Figura 13) que corresponden a la flexión de tijera de NH_2 y al alargamiento asimétrico del COO^- , que sugieren que tanto el Cd^{2+} como el Zn^{2+} interactúan con el NH_2 libre de la Histidina para formar la coordinación, debido a que en el espectro IR es la única región donde hay desplazamientos y alargamientos de los picos, significa que lo demás permanece idéntico y en este sitio donde los metales se coordinan causan una flexión de tijera en el NH_2 . Se confirma con el espectro de IR obtenido para insulina en la coordinación con Zn^{2+} y Cd^{2+} ya que la intensidad de las bandas de proteínas alrededor de 1540 cm^{-1} Amida I y 1490 cm^{-1} Amida II varían considerablemente, lo que indica que la proteína se ha coordinado con dichos metales en comparación con el espectro IR de insulina.

Por otro lado con el Glutamato (Figura 14), a pesar de que en el pico observable en la región 2600 cm^{-1} , el cual corresponde al enlace N-H-N + el alargamiento del C=O, tiene ligeros desplazamientos, no podemos asegurar que el Cd^{2+} se encuentre coordinando con el NH_2 libre, incluso con el propio Zn^{2+} la coordinación no fue tan evidente, la presencia de humedad pudo ser un factor importante en la

afección para la señalización espectral del IR que no nos permite ver con claridad el sitio de coordinación con los metales.

Finalmente el último aminoácido en ponerse en evidencia para la coordinación con los metales fue la Cisteína (Figura 15). De acuerdo a los espectros de IR obtenidos para el aminoácido evaluado en comparación con los espectros IR de Cisteína-Zn y Cisteína-Cd en los picos cercanos a la región 950 cm^{-1} correspondiente al modo torsional de SH y en la región 2600 cm^{-1} que corresponde al estiramiento del SH, existen desplazamientos evidentes que sugieren la interacción de los metales (Zn^{2+} y Cd^{2+}) con el grupo tiólico de este aminoácido. A pesar de esta evidencia, al hacer el comparativo con el espectro IR de Insulina-Zn e Insulina-Cd esta señalización no es observable, por ende Histidina sigue siendo el aminoácido preferencial en coordinación con estos metales en la posición B10 y B13 en la Insulina.

Las implicaciones biológicas de la liberación de insulina-Cd no habían sido abordadas hasta este momento. La siguiente estrategia fue crear un modelo en el cual no existiera interferencia con insulina-Zn propia de la secreción pancreática, por lo que Aloxano fue administrado a rata machos Wistar para crear un modelo insulino independiente y evaluar el impacto biológico de la insulina-Cd.

El Aloxano, induce a diabetes mellitus en animales destruyendo selectivamente las células β pancreáticas productoras de insulina sin afectar a otras células de los islotes. Se ha sugerido que el efecto citotóxico que este fármaco ocasiona, implica una rápida absorción, generando radicales libres y peróxidos, que sensibilizan a la célula β incrementando así la generación de necrosis (Gorus et al., 1982; Szkudelski, 2001). De manera similar el Aloxano también tiene lugar en el hígado. Sin embargo, el hígado y otros tejidos son más resistentes a especies reactivas del oxígeno en comparación con las células β pancreáticas y esta resistencia los protege contra la toxicidad del Aloxano. La formación de especies reactivas del oxígeno es precedida por reducción del Aloxano. En las células β del páncreas su reducción se produce en la presencia de diferentes agentes reductores que contienen grupos tiol (SH-), como el glutatión reducido (GSH), la cisteína y grupos sulfhidrilo unidos a proteínas (incluyendo enzimas que contiene SH) son muy

susceptibles a su acción (Lenzen and Munday 1991). El ácido dialúrico se forma como resultado de la reducción de Aloxano, es entonces, cuando se re-oxida de nuevo a Aloxano, estableciéndose un ciclo redox para la generación de radicales superóxido de manera constante (Munday, 1988). La reacción entre el Aloxano y ácido dialúrico es un proceso en el que los radicales Aloxano intermedios ($HA\bullet$) son formados. Este última aparece cuando Aloxano es reducido por GSH (Sakurai and Ogiso 1991). En el presente trabajo, los resultados obtenidos mostraron que la administración de Aloxano indujo un daño selectivo a los islotes de Langerhans (Figura 20), como pudo observarse en los resultados con inmunnomarcaje la hormona disminuyo en los animales del grupo control hiperglicémico, insulina-Zn e insulina-Cd. En cuanto a la morfología de los islotes de Langerhans pudo apreciarse un cambio de la misma, de una forma ovoide a una forma esférica con una disminución de tamaño, lo cual es indicativo de una disminución en la producción de la hormona. Mientras tanto, las células acinares perdieron la morfología poligonal o piramidal que las caracteriza, sin apreciación del vértice dirigido hacia la luz central del acino, pudo observarse claramente una disminución de los núcleos por la destrucción causada por el Aloxano. Para garantizar que la administración subdérmica de insulina presentase efecto, se cuantificó de la hormona presente en suero. Los resultados mostraron (Figura 20 E) que los animales inducidos con Aloxano y sin tratamiento (línea continua), presentan niveles muy bajos de la hormona, mientras que los animales administrados con insulina-Zn llegaron a un máximo sérico al tiempo basal.

En relación a la hiperglicemia e hipoinsulinemia, estos son parámetros que validaron el modelo. La administración de Insulina-Zn exógena propició la normoglicemia de los animales. La insulina utilizada en el presente proyecto fue seleccionada de acuerdo a su modo de acción, en el cual se ha mostrado que regímenes con análogos de acción corta mejoran la concentración de la glucemia postprandial (Mortensen et al., 2000). Además, este tipo de insulinas de acción corta y ultracorta pueden regular la concentración en circulación preprandial. Particularmente, la insulina lispro (Humalog) es un análogo de insulina que difiere de la insulina humana en la secuencia de aminoácidos, sin embargo se une a los receptores de insulina y

por lo tanto funciona de una manera similar a la insulina humana. En concreto, la lisina en la posición 29 se une con prolina en la posición 28 para formar la insulina que no se degrada en solución (Herbst and Hirsch, 2002), esta característica fue de suma importancia debida a los diferentes tratamientos a los que fue sometida antes de su administración. La afinidad de la insulina Humalog es tanto para su receptor, como para el receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1. Así mismo, su actividad se halla dentro de los primeros 15 minutos posteriores a su aplicación, presentando un pico de la actividad máxima el cual se ha reportado en un rango de 60 a 90 minutos, y presenta una duración de acción de 3-5 horas. Otra de las características del manejo de esta insulina es que presenta un porcentaje bajo de episodios hipoglucémicos en comparación con insulinas regulares (Vajo et al., 2001; Bode and Strange, 2001; Anderson et al., 1997).

Los animales hiperglicémicos administrados con insulina-Zn observaron una disminución de los niveles de glucosa plasmática (Figura 21), una conducta similar se pudo registrar respecto a la concentración de insulina. La captación y degradación de insulina es una característica de todos los tejidos sensibles a la hormona (Sonne, 1986; Canas et al., 1995). A concentraciones fisiológicas, la captación está mediada principalmente por el receptor de la insulina con una menor contribución de procesos no específicos. En concentraciones más altas, procesos los cuales no involucran al receptor asumen mayor importancia. La insulina tiene una semivida plasmática corta (4-6 min), en relación a la necesidad de responder rápidamente a los cambios en la glucosa en sangre (Duckworth, 1988; Morishima et al., 1992).

En condiciones normales, casi toda la insulina se degrada intracelularmente o, al menos por procesos asociados con la membrana celular, en donde cantidades significativas de insulina se pueden degradar debido principalmente a la enzima degradadora de insulina (Shearer et al., 1997). Durante muchos años la degradación de la insulina ha sido vista como un proceso en el cual se halla íntimamente involucrado la regulación del metabolismo. Ahora está claro que la eliminación de la insulina y la degradación son procesos regulados y que las

anomalías en el aclaramiento de insulina son parte integral de enfermedades como la DM2. Por otra parte, la degradación de la insulina está inextricablemente ligada a su acción. Todos los tejidos sensibles a la insulina degradan la hormona, y el primer paso en la degradación involucra su unión al receptor. Este vínculo ha llevado a la sugerencia de que la degradación de la insulina unida al receptor es parte de la señal de “apagado” para la terminación de la acción de la insulina (Seta and Roth, 1997; Roth et al., 1992).

Insulina Lispro existe como ya se ha mencionados en hexámeros que se estabilizan con iones Zn^{2+} y conservantes fenólicos para asegurar dos años de vida útil a 4°C. Estructuralmente, la formulación de lispro se diferencia de otros análogos de la insulina debido a que su complejo hexámero se disocia en subunidades monoméricas de manera prácticamente instantánea después de la inyección subcutánea, resultando en un incremento de absorción plasmática indistinguible de la de una insulina monomérica pura secretada por páncreas. Sin embargo, al colocar a la insulina en presencia de Chelex, este es capaz de quelar al Zn^{2+} y en su lugar nosotros logramos coordinar a Cd^{2+} , el cual parece estabilizar en un complejo a insulina de tal manera que la hace poco disponible biológicamente. Insulina-Cd mostró baja eficiencia biológica en cuanto a su capacidad hipoglucemiante, más sin embargo, la presencia de la hormona pudo ser detectada a nivel sérico, que mostraron hiperinsulinemias y simultáneamente hiperglicemias. Este mismo comportamiento fue observado en animales los cuales fueron retados con una carga de glucosa oral a la cual no presentaron tolerancia, lo cual corroboró la baja eficiencia biológica del complejo insulina-Cd.

El Zinc es un metal importante en los sistemas biológicos, ya que es un ácido de Lewis fuerte, forma un ion Zn^{2+} estable y puede existir en varias geometrías de coordinación, son también requeridos para el ensamblaje de especies poliméricas, como la insulina para conservar su estructura hexamérica (Derewenda et al., 1989). En general, los sitios adoptan un arreglo tetraédrico formado por cadenas de Histidina, Cisteína y ocasionalmente Aspartato o Glutamato. En la insulina, interactúa con las histidinas que están al interior en la posición B10 y B13. Debido

a que el Cd^{2+} es muy similar al Zn^{2+} , ante una mayor concentración de Cd^{2+} puede reemplazarlo introduciéndose en el sitio coordinador y cambiando su conformación a una estructura tetraédrica. En el presente trabajo fue puesto en evidencia a través de la cristalización de la Insulina-Zn e Insulina-Cd cambiando su conformación estructural como se muestra en los resultados (Figura 18). Dicho cambio trae como consecuencia que la insulina no pueda ser reconocida por su receptor y no desencadena la señalización para la expresión de los GLUT's, de tal manera que la glucosa pueda ser introducida a las células para ser metabolizada causando estados hiperglicémicos. Aquí evidenciamos que después de los estados de hiperglicemia en los animales a consecuencia del Aloxano. Se les realizó una administración subdérmica de Insulina-Cd, los resultados mostraron que no disminuyeron los niveles séricos de glucosa a diferencia de los animales que se les administró Insulina exógena Humalog (Insulina-Zn).

5. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se concluye que la Histidina puede coordinar al Zn^{2+} y Cd^{2+} en el NH_2 libre bajo las condiciones de pH y temperatura para este trabajo. Mientras tanto, el Glutamato no coordinó a ninguno de los dos metales en estudio. Finalmente la cisteína fue capaz de coordinar a Zn^{2+} y Cd^{2+} en el grupo tiólico bajo las condiciones de pH y temperatura en las que se trabajó.

En la insulina el Zn^{2+} y Cd^{2+} se coordinaron en la Histidina en la posición B10 y B13, debido a que bajo las condiciones de pH y temperatura empleadas en este trabajo permitieron que el NH_2 libre de este aminoácido se desprotonara y pudiera coordinar a los metales en estudio y con la Cisteína y Glutamato no pudo hacerlo posiblemente porque las condiciones no favorecieron la exposición de sitios coordinadores.

Bajo las condiciones de este estudio *in vitro* nos llevó a comprobar la hipótesis generada para este proyecto. Al cristalizar la insulina-Cd e insulina-Zn, se comprobó que hay un cambio en la conformación hexamérica de la hormona, este cambio conformacional.

In vivo, el modelo deficiente de insulina permitió comprobar que la insulina coordinada con cadmio no posee efecto biológico sobre el estado hiperglicémico inducido.

En el estudio histológico pudo comprobarse que el Aloxano causó un daño selectivo en los islotes de Langerhans, a través de inmunomarcaje se puso en evidencia los niveles bajos de la hormona y al cuantificar la hormona en circulación no hubo una disminución de la misma al paso del tiempo sin mostrar una actividad relevante como hipoglucemiante.

Con base a los resultados obtenidos de este trabajo se puede concluir que la exposición crónica a Cd debe ser considerado un factor de riesgo en el desarrollo de alteraciones relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, y progresión a diabetes, el cual es un problema de salud pública, siendo una de las principales causas de muerte en nuestro país.

5. PERSPECTIVAS

- Utilizar técnicas más específicas de cristalografía para identificar, con certeza el punto exacto de coordinación de Insulina-Cd
- Incrementar el tamaño del cristal para que mediante Cristalografía de Rayos X, se definan los sitios coordinadores.
- Evaluar en pacientes con exposición crónica a Cd (Fumadores, personas cercanas a los volcanes activos, mineros, etcétera) sus niveles séricos de carbohidratos y lípidos, como medida preventiva al desarrollo de un síndrome metabólico.

BIBLIOGRAFIA

1. Adams MJ, Blundell TL, Dodson GG, Dodson E, Vijayan M, Baker EN, Harding MM, American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37, S81–S90.
2. Aikin R, Hanley S and Maysinger D, (2006). Autocrine insulin action activates Akt and increases survival of isolated human islets. *Diabetologia*. 2900–2909
3. Annison, E., & Armstrong, D. (1970). Volatile fatty acid metabolism and energy supply. *Physiology of digestion and metabolism in the Ruminant*. Newcastle Upon Tyne: Oriel Press Ltd.
4. Antonio Jara A. (2011). Endocrinología Diabetes y Metabolismo, 2° Edicion. Panamericana
5. Baggio LL and Drucker DJ, (2007). Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology. Volume 132, Issue 6, Pages 2131-2157
6. Bassett J. (1972). Plasma glucagon concentrations in sheep: Their regulation and relation to concentrations of insulin and growth hormone. *Australian Journal of Biological Sciences*, 25, 1277–1288.
7. Bassett J. (1975). Dietary and gastrointestinal control of hormones regulating carbohydrate metabolism in ruminants, 338-398. In Mc DONALD I. W., WARNER A. C. L, *Digestion and metabolism in the ruminant*. Univ., New England.

8. Bassett, J. (1974). Early changes in plasma insulin and growth hormone levels after feeding in lambs and adult sheep. *Australian Journal of Biological Sciences*, 27, 157–166.
9. Bassett, J. (1975). Dietary and gastro-intestinal control of hormones regulating carbohydrate metabolism in ruminants. *Digestion and Metabolism in the Ruminant*, 10.383–398.
11. Berglund M, Akesson A, Bjellerup P and Vahter M. 2000. Metal-bone interactions. *Toxicol Lett.* 112-113:219-225.
12. Blum JL, Rosenblum LK, Grunig G, Beasley MB, Xiong JQ, Zelikoff JT. 2014. Short-term inhalation of cadmium oxide nanoparticles alters pulmonary dynamics associated with lung injury, inflammation, and repair in a mouse model. *Inhal Toxicol.* 26(1):48-58.
13. Briscoe CP, M Tadayyon, JL Andrews, et al. (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*; 278(13): 11303-11.
14. Brockman, R. P., & Laarveld, B. (1986). Hormonal regulation of metabolism in ruminants; a review. *Livestock Production Science*, 14, 313–334.
15. Crespin SR, WB Greenough, 3rd, D Steinberg. (1969). Stimulation of insulin secretion by infusion of free fatty acids. *J Clin Inves*; 48(10): 1934-43.
16. Crowe DT, Tsai MJ. (1989). Mutagenesis of the rat insulin II 5'-flanking region defines sequences important for expression in HIT cells. *Mol Cell Biol.*

17. De Vos A, Heimberg H and H. Quartier. (1995). Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *The Journal of Clinic investigation*.
18. Dimitriadis, Mitrou, Lambardini, Maratou and Raptis, 2006 Insulin action in adipose tissue and muscle in hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*
19. Egea PF, Stround RM and Walter P. (2005). Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol*.
20. Chapman ER, J Blasi, S An, et al. (1996). Fatty acylation of synaptotagmin in PC12 cells and synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun*; 225(1): 326-32.
21. Chan SJ, Keim P, Steiner DF. (1976) Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
22. Chang TW and Goldberg AL, (1978). The Metabolic Fates of Amino Acids and the Formation of Glutamine in Skeletal Muscle. Department OfPhysiology, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 253, pp. 3685-3695, 1978
23. De Meyts P (20004). Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays* Volume26, Issue12. Pages 1351-1362

24. Dixon G. et al. (2003). A comparative study of amino acid consumption by rat islet cells and the clonal beta-cell line BRIN-BD11- The functional significance of L-alanine. *Journal of endocrinology*
25. Feling P and Bergman M (1995). The endocrine pancreas: Diabetes mellitus. In: Feling P Baxter JD and Frohman A (Eds). *Endocrinology and Metabolism*. 3th edn. McGraw Hill. New York. 1107-1250.
26. Fernandez Mejia C. (2006). Molecular basis of type-2 diabetes. In: Joseph-Bravo P (Ed.). *Molecular Endocrinology*. Kerala, India: Signpost; p. 87-108.
27. Flatt, P. R. (1996). Hormonal and neural control of endocrine pancreatic function. In *Textbook of Diabetes* 2nd ed. 9.1–9.17 Pickup, J. C. and Williams, G. Oxford: Blackwell
28. Frayn KN, Tan GD, Karpe F. (2007). Adipose tissue: a key target for diabetes pathophysiology and treatment? *Horm Metab Res*, 39(10):739-742.
29. Henquin, J.-C., Boitard, C., Ferrannini, E., Steiner, D. F., & Efendic. (2004). Impact of treatment on islet function in type 2 diabetes. *Diabetes*, 53, S1–S5.
- 30.2 diabetes. *Diabetes*, 53, S1–S5.
31. Hodgkin DC, Rimmer B, Sheats S. (1969). Structure of rhombohedral 2-Zinc insulin crystals. *Nature*.
32. Huang XF, Arvan P. (1995). Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. *J Biol Chem*. 270(35):20417–23.

33. Jarrett, I., Filsell, O., & Ballard, F. (1974). Metabolic and endocrine interrelationships in normal and diabetic sheep. *Hormone and metabolic research*. 111–116.
34. Jacobson DA and Philipso. (2007). Action potentials and insulin secretion: new insights into the role of Kv channels
35. Eto K et al., (1999). Role of NADH Shuttle System in Glucose-Induced Activation of Mitochondrial Metabolism and Insulin Secretion. *Science*. Vol. 283, Issue 5404, pp. 981-985
36. Kahn SE and Hull RL, (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature, International Journal of science*.
37. Kaneto H, Nakatani Y and Kawamori D, (2006). Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal kinase in pancreatic β -cell dysfunction and insulin resistance. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* Volume 38, Issues 5–6, Pages 782-793E
38. Khachadurian, Adrouni and (1966). Metabolism of adipose tissue in the fat tail of the sheep in vivo. *Journal of Lipid Research* 7(3):427-36.
39. Larsen, P. J., Tang-Christensen, M., Holst, J. J., & Orskov, C. (1997). Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*, 77, 257–370.
40. Leighton, B., Dimitriadis, G. D. (1989). Effects of insulin on glucose metabolism in skeletal muscle from septic and endotoxaemic rats. *Clinical Science*, 77, 61–67.

41. Martin, D. W. (1983). Insulin and glucagon. Actions of insulin. Arper's Review of Biochemistry (pp. 257–274). New York, NY: Lange Medical Publications.
42. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell. 1987; 48(5):899–907.
43. Patzelt C, Labrecque AD, Duguid JR, Carroll RJ, Keim PS, Heinrikson RL, Steiner DF. (1978). Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci U S A.
44. Pittman I, Philipson LH, Steiner DF. (2004.) Insulin biosynthesis, secretion, structure, and structure-activity relationships, Disponible on line: http://www.endotext.org/diabetes/diabetes3_new/diabetesframe3.htm.
45. Prentki M, E Joly, W El-Assaad, R Roudit (2002). Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. Diabetes. Suppl 3: S405-13.
46. Rossetti, L., & Giaccari, A. (1990). Relative contribution of glycogen synthesis and glycolysis to insulin-mediated glucose uptake. A dose-response euglycemic clamp study in normal and diabetic rats. Journal of Clinical Investigation, 85, 1785.
47. Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. (2001) Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414, 799-806
48. Sharp GW, (1979). Defective calcium handling and insulin release in islets from diabetic Chinese hamsters. Biochemical Journal
49. Schmitz O, Rungby J and Edge L. (2008). On high-frequency Insulin oscillations. Ageing Res Rev; 7(4): 301-5.

50. Shulman, G., Rossetti, L., Rothman, D., Blair, J., & Smith, D. (1987). Quantitative analysis of glycogen repletion by nuclear magnetic resonance spectroscopy in the conscious rat. *Journal of Clinical Investigation*, 80, 387.
51. Song G, Ouyang G and Bao S, (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of cellular and molecular medicine*.
52. Squires, E. J. (2011). Chapter 3: Manipulation of growth and carcass composition. In *Applied animal endocrinology* (2nd ed., pp. 89–155). Guelph: Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph.
53. Starling EH. Croonian Lecture. (1905). On the chemical correlation of the functions of the body. *Lancet*. 339–41.
54. Steiner, DFKW.; Clark, JL.; Oyer, PE.; Rubenstein, A. (1972). The biosynthesis of insulin. In: Steiner, DF.; Freinkel, N., editors. *Handbook of physiology, Section 7 Endocrinology I*. Williams & Wilkins; Baltimore: p. 175-198.
55. Suckale J and Solimena M, (2008). Pancreas islets in metabolic signaling - focus on the beta-cell. *Experimental Diabetology, School of Medicine, Dresden University of Technology, Dresden, Germany. Frontiers in Bioscience* 13, 7156-7171.
56. West & Passey, (1967). Effect of glucose load and of insulin on the metabolism of glucose and of palmitate in sheep *Biochem J*.
57. Winter, G. (2013). Blood sugar insulin cycle graphic. Retrieved from <http://www.allthingsgym.com/>