



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Efecto de alto consumo de bebidas glucosadas sobre la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y marcadores de estrés en adipocito de rata: intervención con nicotinamida

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
JONATAN AYALA ZARAZÚA**

ASESOR: Dra. MARGARITA DIAZ FLORES
COASESOR: M. en C. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Efecto de alto consumo de bebidas glucosadas sobre la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y marcadores de estrés en adipocito de rata: intervención con nicotinamida

Que presenta el pasante: **Jonatan Ayala Zarazúa**

Con número de cuenta: **302247440** para obtener el Título de: **Químico Farmacéutico Biólogo**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de mayo de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. E. Fernando Flores Benitez	
VOCAL	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
2do. SUPLENTE	M. en C. Tais Nopal Guerrero	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

Aprendí y Decidí...

Y así después de esperar tanto, un día como cualquier otro decidí triunfar.

Decidí no esperar a las oportunidades sino yo mismo buscarlas; decidí ver cada problema como la oportunidad de encontrar una solución; decidí ver cada desierto como la oportunidad de encontrar un oasis; decidí ver cada noche como un misterio a resolver; decidí ver cada día como una nueva oportunidad de ser feliz.

Aquel día descubrí que mi único rival no eran más que mis propias debilidades; y que en éstas, está la única y mejor forma de superarnos.

Aquel día dejé de temer a perder, y empecé a temer a no ganar. Descubrí que no era yo el mejor, y que quizás nunca lo fui; me dejó de importar quién ganara o perdiera, ahora me importa simplemente saberme mejor que ayer.

Aprendí que lo difícil no es llegar a la cima, sino jamás dejar de subir.

Aprendí que el mejor triunfo que puedo tener, es tener el derecho de llamarle a algunos "familia". Descubrí que el amor es más que un simple estado de enamoramiento, "el amor es una filosofía de vida".

Aprendí que debo de dejar de ser un reflejo de mis escasos triunfos pasados, y empezar a ser mi propia luz de este presente.

Aprendí que de nada sirve ser luz, si no vas a iluminar el camino de los demás.

Decidí cambiar tantas cosas...

Aprendí que los sueños son solamente para hacerse realidad.

Desde aquel día ya no duermo para descansar, ahora simplemente duermo para soñar...

Walter Elías Disney

Dedicatoria

Esta tesis se la dedico a Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento. Mi dedicación especial a la virgen de Guadalupe por iluminar mi camino en los momentos de oscuridad que se me presentaron a lo largo de esta etapa en mi vida.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos. Por lo que este trabajo es un homenaje y una recompensa por todo su esmero, desvelos y amor incondicional.

A mis hermanos Maribel, Hugo y Valeria por estar siempre presentes, acompañándome en juegos, sacrificios y lucha. Los cuales me enseñaron a seguir adelante sin importar los tropiezos que pueda tener en la vida y que me han dado palabras de ánimo y gran estímulo motivándome en el largo camino de la vida.

A mi sobrino Andy quien ha sido y es una motivación, inspiración y felicidad. Con la idea más adelante de transmitirle el valor, respeto, compromiso y empeño en todo lo que se proponga.

A cada una de las personas que creyeron en mis capacidades y me sostuvieron con su ánimo, en el peregrinar de estos años, a los que juntos pasamos horas de desvelos entre libros y trabajos. Pero ante todo gracias a la vida por dejarme llegar y disfrutar del éxito.

Gran parte de mis logros se los dedico a las personas, que de manera inconsciente lograron que mis ánimos por seguir adelante y surgir se alimentaran cada día más.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado la oportunidad de formar parte de la máxima casa de estudios y concluir una carrera profesional dentro de las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán la cual no solo me brindo la oportunidad de superarme académicamente si no de forma personal, agradezco a esta grandiosa institución la cual me dejo gratos momentos.

A la Dra. Margarita Díaz Flores no solo por ser mi asesora si no por su calidad humana, paciencia, confianza, liderazgo y sobre todo apoyo incondicional el cual me brindo para dejarme formar parte de su grandioso equipo de trabajo, hizo la realización de esta tesis.

A la M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez por brindarme la confianza y haberme recomendado para realizar mi tesis en este Hospital de Especialidades, además de su apoyo como alumno en la Facultad así como en la realización de esta tesis lo cual me ayudo a mi enriquecimiento profesional.

A mis sinodales por tomarse el tiempo de ayudar a enriquecer este trabajo con sus conocimientos, correcciones, observaciones y comentarios.

A mis compañeras de la unidad de Bioquímica Nayeli Torres Ramírez y Selene Ángeles Mejía por brindarme su amistad, consejos, asesorías y sobre todo por hacer mi estancia junto con la Dra. Margarita algo agradable y divertida.

A todas esas personas que formaron parte dentro de mi etapa como estudiante amigos, compañeros, profesores, familia y gente que conocí que no sé como describirla, la cual me dejaron momentos inolvidables buenos y malos ayudándome a ser una mejor persona venciendo los obstáculos que se me presentaron. Lo único que me queda decirles es un sincero agradecimiento a todas esas personas.



Este trabajo fue realizado en Centro Médico Nacional Siglo XXI, Hospital de Especialidades en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, bajo la dirección de la Doctora Margarita Díaz Flores.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	i
COMPUESTOS QUIMICOS	iv
MEDIDAS Y EQUIVALENCIAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	A
ABSTRACT	C
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Definición de las bebidas azucaradas y sus consecuencias.....	2
1.2 Definición de obesidad.....	3
1.2.1 Distribución anatómica de la obesidad	4
1.2.2 Obesidad y resistencia a la insulina.....	5
1.2.3 Consecuencia de la obesidad.....	8
1.2.3.1 Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.....	8
1.2.3.2 Enfermedades cardiovasculares.....	9
1.2.3.3 Cáncer	9
1.2.3.4 Esteatosis hepática	9
1.3 Síndrome metabólico.....	10
1.3.1 Parámetros para diagnosticar el síndrome metabólico.....	11
1.3.2 Fisiopatología del síndrome metabólico	15
1.4 Tejido adiposo	15
1.4.1 Composición celular del tejido adiposo	16
1.4.2 Tejido adiposo café o marrón.....	17
1.4.3 Tejido adiposo blanco	17
1.4.4 Adipocito.....	18
1.4.5 Ácidos grasos	19
1.4.6 Lipogénesis	21

1.4.7	Lipólisis.....	22
1.4.8	Regulación lipogénesis / lipólisis	23
1.4.9	Hipertrofia e Hiperplasia.....	24
1.5	Resistencia a la insulina en el tejido adiposo	24
1.6	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	26
1.6.1	Importancia de la relación NAD(P)/ NAD(P)H en la obesidad.....	28
1.7	Isocitrato deshidrogenasa.....	29
1.7.1	IDH 1	29
1.7.2	IDH 2	30
1.7.3	IDH 3	30
1.8	Nicotinamida	31
1.8.1	Nicotinamida y diabetes.....	34
1.8.2	Mecanismo de acción de la nicotinamida.....	34
2.	ANTECEDENTES	36
3.	PLANTEAMIENTO	38
4.	JUSTIFICACIÓN	39
5.	HIPÓTESIS	40
6.	OBJETIVOS	41
6.1	Objetivo general.....	41
6.2	Objetivos particulares	41
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	42
7.1	Aspectos éticos de los animales	42
7.2	Diseño experimental	42
7.3	Obtención de muestras sanguíneas y tejidos.....	43
7.4	Perfil bioquímico y función hepática	43
7.5	Actividad específica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	43
7.6	Actividad específica isocitrato deshidrogenasa	44
7.7	Determinación de lipoperoxidación	44
7.8	Determinación de GSH y GSSG	44
7.9	Determinación de ácidos grasos	45
7.10	Datos estadísticos	46

8. RESULTADOS	47
8.1 Perfil bioquímico en suero de rata	47
8.2 Grado de lipoperoxidación en tejido adiposo de rata.....	48
8.3 Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en tejido adiposo de rata	49
8.4 Actividad de la isocitrato deshidrogenasa en tejido adiposo de rata.....	50
8.5 Concentración de glutatión reducido en tejido adiposo de rata	51
8.6 Concentración de glutatión oxidado en tejido adiposo de rata	52
8.7 Relación GSH/ GSSG en tejido adiposo de rata.....	53
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES	57
11. ANEXO	58
11.1 Equipos.....	58
11.2 Reactivos empleados	59
11.3 Cuantificación de malondialdehído	60
11.4 Actividad de la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	62
11.5 Actividad de la isocitrato deshidrogenasa	64
11.6 Determinación de proteínas totales: método de Bradford	66
11.7 Cuantificación de glutatión reducido	68
11.8 Cuantificación de glutatión oxidado.....	71
12. REFERENCIAS	74

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AACE	(Asociación Americana de Endocrinología Clínica).
ACC	(Acetil Co-A Carboxilasa).
ADN	(Ácido desoxirribonucleico).
ADP	(Adenosin Di fosfato).
AGL	(Ácidos grasos libres).
AMP	(Proteína activada cinasa).
AMPK	(Cinasa activa por mono fosfato de adenina).
AQP7	(Acuaporina adipasa).
ARN	(Ácido Ribonucleico).
AR_β	(Receptores β adrenérgicos).
ASP	(Proteína estimuladora de acilación).
ATGL	(Triglicérido adiposo lipasa).
ATP	(Adenosin tri fosfato).
ATP IV	(Panel de tratamiento del adulto).
chREBP	(Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos).
CDC	(Centro de Control y Prevención de Enfermedades).
CT	(Colesterol total).
DAG	(Di acil glicerol).
DM2	(Diabetes mellitus Tipo 2).
ECV	(Enfermedad cardiovascular).
EDTA	(Ácido Etilen Di amino Tetra Benzoico).
EGIR	(Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina).
ERO	(Especies reactivas de oxígeno).
FABP	(Proteína de unión de los ácidos grasos).
FAS	(Ácido graso sintasa).
GLUT-4	(Glucosa transportadora tipo 4).
GR	(Glutación reductasa).
GSH	(Glutación reducido).
GSSG	(Glutación di sulfuro).

G6P	(Glucosa 6 fosfato).
G6PD	(Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa).
GPx	(Glutación peroxidasa).
HDL	(Lipoproteína de elevada densidad).
HSL	(Lipasa sensible a hormonas).
H6PD	(Hexosa-6-fosfato deshidrogenasa).
IAM	(Infarto agudo del miocardio).
IDH	(Isocitrato Deshidrogenasa).
IDF	(Federación Internacional de la Diabetes).
IDL	(Lipoproteínas de densidad intermedia).
IGF-1	(Factor de crecimiento insulínica tipo 1).
IKKβ	(inhibidor del factor nuclear kappa subunidad beta).
IL-6	(Interleucina 6).
IMC	(Índice de masa corporal).
IR	(Insulino resistencia).
IRS-1, 2	(Sustrato del receptor de la insulina).
JNK	(Cinasas C-Jun amino terminal).
LCA-Co A	(Acil-Co A de cadena larga).
LDL	(Lipoproteína de baja densidad).
LPL	(Lipasa de lipoproteínas).
LXR	(Receptor X del hígado)
MAG	(Mono acil glicerol).
MAPK	(Quinasas de proteínas activada por mitógenos).
MDA	(Malondialdehido).
ME	(Enzima málica).
NAD	(Dinucleotido de nicotinamida y adenina).
NADH	(Dinucleotido de nicotinamida y adenina reducido).
NADP	(Dinucleotido de nicotinamida y adenina fosfato).
NADPH	(Dinucleotido de nicotinamida y adenina fosfato reducido).
NAM	(Nicotinamida).
NCEP	(Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol).

NF-κB (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células β).
OMS (Organización Mundial de la Salud).
PDK (Fosfatidil dependiente cinasa).
PI3K (Fosfatidilinositol-3-cinasa).
PKA (Proteína Cinasa A).
PKB (Proteína Cinasa B).
PARP (Poli (ADP) – ribosa polimerasa).
PPAR-γ (Receptor proliferador de peroxisoma activado γ).
RI (Resistencia insulínica).
SIRT3 (Desacetilasa sirtuin-3 dependiente de NAD).
SM (Síndrome metabólico).
SREBP (Regulador de la proteína de unión al elemento de esteroides).
TAG (Triacilglicerol).
TBA (Ácido tiobarbitúrico).
TBARS (Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico).
TGO, TGP (Amino Transferasas).
TG (Triglicéridos).
TNF-α (Factor de necrosis tumoral alfa).
UCHSC (Centro de ciencias de la salud de la universidad de Colorado).
UCP-1 (Proteína desacoplante 1).
VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad).
6-PGD (6- fosfo gluconato deshidrogenasa)

COMPUESTOS QUÍMICOS

Buffer	(Solución amortiguadora).
Ca²⁺	(Calcio).
C₇H₆O₆S	(Ácido sulfosalicílico).
C₇H₁₅NO₄S	(Ácido 3 morfolinopropano 1 sulfónico).
C₁₄H₈N₂O₈S₂	(5-5-ditio-bis-2-nitro-acido-benzoico (DTNB)).
CO₂	(Dióxido de carbono).
DTNB	(Ácido di tio nitro benzoico).
EDTA	(Ácido etilen-di-amino-tetra- acetico).
HCl	(Acido Clorhídrico).
Hg	(Mercurio).
H₂O	(Agua).
H₂O₂	(Peróxido de hidrogeno).
H₃PO₄	(Ácido fosfórico).
KH₃PO₄	(Fosfato de potasio).
Mg²⁺	(Magnesio).
MgCl₂	(Cloruro de magnesio).
Mn²⁺	(Manganeso)
MOPS	(Ácido 3 morfolinopropano 1 sulfónico).
MPA	(Ácido metafosfórico).
M₂VP	(Metil vinil parabeno).
NaOH	(Hidróxido de sodio).
NaPO₄	(Fosfato de Sodio).
NO	(Óxido de nitrógeno).
NOS	(Óxido nítrico sintasa).
O₂	(Oxigeno).
OH⁻	(Hidróxido).
PBS	(Buffer de Fosfatos Salina).
TBA	(Ácido tiobarbiturico).
TEA	(Trietanolamina).
SH⁻	(Sulfuro de hidrogeno).

MEDIDAS Y EQUIVALENCIA

Abs	(Absorbancia).
cm	(Centímetro (unidad de longitud)).
D	(Factor de dilución).
dL	(Decilitro(unidad de volumen)).
G	(Gravedad).
g	(Gramos (unidad de masa)).
gmol	(Gramos mol(unidad de masa)).
Hz	(Hertz (medida de frecuencias)).
hrs	(Hora (unidad de tiempo)).
Kg	(Kilogramo (unidad base de masa)).
KJ	(Kilo joule (mide energía, trabajo o calor)).
L	(Litro (unidad de volumen)).
lb	(libra (unidad de masa)).
M	(Molaridad (medida de concentración)).
m²	(Metro cuadrado(unidad de superficie)).
mg	(Miligramo (unidad de masa)).
min.	(Minuto (unidad de tiempo)).
mL	(Mililitros (unidad de volumen)).
mm	(Milímetros (unidad de longitud)).
mM	(Minimolar (medida de concentración)).
mph	(Millas por hora(medida de velocidad)).
mx	(Pendiente).
N	(Normalidad (medida de concentración)).
nM	(Nanomol (medida de concentración)).
nm	(Nanómetro (unidad de longitud)).
p	(Peso (medida de fuerza)).
pH	(potencial de hidrogeno (medida de acidez o alcalinidad)).
rpm	(Revoluciones por minuto (unidad de frecuencia)).
U	(Unidad).
UV	(Luz ultravioleta (radiación electromagnética)).

Vis..... (luz visible (espectro electromagnético)).
Vol. - v (volumen (magnitud escalar)).
t (Tiempo (magnitud física)).
µg..... (Microgramos (unidad de masa)).
µL (Micro litro (unidad de volumen)).
µM (Micro molar (medida de concentración)).
% (Porcentaje).
σ (Desviación estándar).
°C (Grados centígrados (unidad de temperatura)).
ΔE(Delta E (diferencia entre dos colores)).

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Clasificación de la obesidad de acuerdo a la distribución corporal de grasa.	4
Figura 2. Consecuencias metabólicas del desbalance energético	6
Figura 3. Células que componen al tejido adiposo.	16
Figura 4.A. Corte histológico del tejido adiposo blanco y pardo	18
Figura 4.B. Morfología del adipocito blanco y pardo.	18
Figura 5. Metabolismo de los ácidos grasos.....	20
Figura 6 Resistencia a la insulina (Mecanismo)	25
Figura 7. Estructura de la nicotinamida.	31
Figura 8. Concentración de malondialdehído en tejido adiposo.	48
Figura 9. Actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en tejido adiposo.	49
Figura 10. Actividad de la isocitrato deshidrogenasa en tejido adiposo.	50
Figura 11. Concentración de GSH en tejido adiposo.	51
Figura 12. Concentración de GSSG en tejido adiposo.	52
Figura 13. Relación de GSH/ GSSG en tejido adiposo.	53
Figura 14. Curva estándar de malondialdehído.	61
Figura 15. Curva estándar proteínas totales método de Bradford.	67
Figura 16. Curva estándar GSH.	69
Figura 17. Curva estándar GSSG.	73

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Definición del síndrome metabólico según la OMS.....	12
Tabla 2. Definición del síndrome metabólico según el EGIR.	12
Tabla 3. Definición del síndrome metabólico según el NCEP-ATP IV.	13
Tabla 4. Definición del síndrome metabólico según la AACE.	14
Tabla 5. Definición del síndrome metabólico según la IDF.	15
Tabla 6. Perfil bioquímico.	47
Tabla 7. Curva de calibración de malondialdehído.	60
Tabla 8. Curva de calibración de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.	62
Tabla 9. Curva de calibración de la isocitrato deshidrogenasa.	65
Tabla 10. Curva de calibración de las proteínas totales.	66
Tabla 11. Curva estándar de GSH.	69
Tabla 12. Curva estándar de GSSG.	72

RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial caracterizada por acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo en el organismo. Además de ser componente esencial del síndrome metabólico, también predispone al desarrollo de varias enfermedades entre las que se incluyen enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, apnea del sueño, ictus, osteoartritis, algunas formas de cáncer entre otras. El aumento del tejido adiposo en el organismo es consecuencia de la alteración en el balance entre el ingreso y consumo energético, siendo el ingreso mayor que el consumo, dando como resultado una acumulación de energía en forma de grasa.

La sobrecarga nutricional, en forma de carbohidrato, modifica la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) en tejido adiposo. Ambas incrementan el NADPH^+ el cual altera la síntesis de lípidos, el balance redox intracelular, la síntesis de citocinas pro-inflamatoria y finalmente el desarrollo de resistencia a la insulina. Por ello el objetivo del presente estudio fue evaluar si la nicotinamida a concentración de 5 o 10 mM modifica las actividades de la G6PD y de IDH, disminuye la acumulación de lípidos y la alteración del balance redox en tejido adiposo de rata suplementada con glucosa al 30 % en el agua de beber por 90 días. Los parámetros evaluados fueron: perfil bioquímico (glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL y LDL), marcadores de daño hepático (TGO y TGP) y actividad lipolítica (AGL, ácidos grasos libres) en suero. Además, determinar las actividades de G6PD y de la IDH; así como las concentraciones de glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG) y de malondialdehído (MDA) en tejido adiposo. La concentración de MDA también fue evaluada en suero.

Los resultados mostraron que el consumo de glucosa al 30 % en el agua de beber por 90 días incrementó significativamente el peso corporal, concentración de glucosa, triglicéridos, AGL y MDA. Además de incrementar las actividades de TGO y TGP, disminuyó HDL. Todos estos parámetros comparados con el control. Estas alteraciones

metabólicas fueron revertidas con el tratamiento de nicotinamida a concentración de 5 y 10 mM.

Los decrementos significativos fueron observados en peso corporal; concentraciones de glucosa, Triglicéridos y AGL. Además de las actividades de TGO y TGP, como en la concentración de MDA en los grupos con nicotinamida a concentración 5 y 10 mM, los cuales fueron comparados con el grupo glucosa.

En el tejido adiposo de ratas suplementadas con glucosa al 30% en el agua de beber se observó un aumento significativo de las actividades de la G6PD e IDH y la concentración de MDA. Mientras que disminuyó significativamente la concentración de GSH e incremento GSSG; lo cual se reflejó en el decremento de la relación GSH/GSSH. El suplemento de nicotinamida a concentración de 5 y 10 mM revirtió las alteraciones metabólicas ocasionadas por la glucosa, disminuyendo MDA, las actividades de G6PD y de IDH; así como la concentración de GSSG. Alternó a esto restauró la concentración de GSH.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que la actividad de G6PD inducida por el consumo de glucosa al 30% coincide con el aumento de marcadores de estrés oxidativo y AGL. Además, el suplemento de nicotinamida al regular la actividad de G6PD decrece los marcadores de estrés oxidativo y concentración de AGL.

ABSTRACT

Obesity is a chronic multifactorial disease characterized by excessive accumulation of fat or general hypertrophy of adipose tissue in the body. Besides being an essential component of the metabolic syndrome, also predisposes to the development of various diseases including cardiovascular disease, type 2 diabetes, sleep apnea, stroke, osteoarthritis, some cancers and other are included. Increased adipose tissue in the body is a consequence of the alteration in the balance between income and energy consumption being higher income than consumption, resulting in an accumulation of energy as fat.

Nutritional overload as carbohydrate, modifies the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) and isocitrate dehydrogenase (IDH) in adipose tissue. NADPH + both increase which alters lipid synthesis, intracellular redox balance, synthesis of pro-inflammatory cytokines and finally the development of insulin resistance. Therefore the objective of this study was to assess whether 5 to 10 mM nicotinamide concentration amending activities of G6PD and IDH decreases lipid accumulation and altered redox balance in rat adipose tissue supplemented with 30% glucose in drinking water for 90 days. The parameters evaluated were: biochemical profile (glucose, triglycerides, cholesterol, HDL and LDL), markers of liver damage (SGOT and SGPT) and lipolytic activity (FFA, free fatty acids) in serum. Also, determine the activities of G6PD and IDH; well as the concentrations of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and malondialdehyde (MDA) in adipose tissue. MDA concentration was also evaluated in serum.

The results showed that consumption of 30 % glucose in the drinking water for 90 days significantly increased the body weight, glucose, triglycerides, AGL and MDA. Besides, increasing the activities of TGO and TGP decreased HDL. All these parameters compared to the control. These metabolic changes were reversed by treatment with 5 and 10 mM nicotinamide concentration.

Significant decreases were observed in body weight; concentrations of glucose, triglycerides and AGL. Besides the activities of TGO and TGP, and the concentration of MDA in the groups with 5 to 10 mM nicotinamide concentrations, which were compared with the glucose group.

In adipose tissue significant increase was observed in the activities of G6PD and IDH, and in MDA concentration. While there was a significant decrease of GSH concentration and an increase of GSSG, which was reflected in the decrement of GSH / GSSH relationship. The supplement of 5 to 10 mM nicotinamide concentration reverted metabolic disorders caused by glucose lowering MDA G6PD activities of IDH, and the concentration of GSSG. Besides it restored GSH concentration.

Based on the results it is concluded that the activity of G6PD induced glucose uptake 30% coincides with increased markers of oxidative stress and AGL. In addition, nicotinamide supplementation to regulate the activity of G6PD decreases markers of oxidative stress and AGL concentration.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más comunes asociados al estilo de vida actual, es el exceso de peso debido a la selección de los alimentos; ya sea por su costo monetario, su sabor o la conveniencia en la preparación. Las consecuencias de esta condición crónica colocan a México en el primer lugar de los países con mayor índice de obesidad en su población, por lo que la representación de la OMS colabora de forma activa brindando cooperación técnica al país en la lucha para controlar esta enfermedad, especialmente por la influencia que tiene en la aparición de muchos otros problemas de salud. Por su parte, los países con menor índice de obesidad son Japón y Corea con un 4% respectivamente.

Actualmente la obesidad infantil es un problema de salud en México y existen más de 4 millones de niños que presentan sobrepeso y obesidad. Uno de cada 5 niños tiene problemas de sobrepeso, lo cual ha llevado a que México ocupe el 1° lugar en obesidad infantil. La persistencia de la obesidad infantil hasta la edad adulta aumenta el riesgo de padecer síndrome metabólico, hígado graso, enfermedad cardiovascular, diferentes tipos de cáncer, hipertensión y diabetes tipo 2, entre otras. Factores como el consumo de bebidas glucosadas contribuyen a la epidemia de la obesidad y estudio recientes comprueban que México es el principal consumidor de bebidas edulcoradas con un promedio de 163 litros por persona al año. (www.who.int)

La obesidad es un problema de desequilibrio de nutrientes que se traduce en un mayor almacenamiento de alimento en forma de grasa que el requerido para satisfacer las necesidades energéticas y metabólicas del individuo. Una variación crónica del consumo hipercalórico y su baja utilización incrementa la acumulación de energía en forma de triacilgliceroles en el tejido adiposo.

El exceso de masa grasa en el tejido adiposo por el consumo de carbohidratos ingeridos deriva en parte de la sobreproducción de NADPH, cofactor esencial para la síntesis de ácidos grasos de *novó* por nuevos adipocitos (adipogénesis) y/o el incremento de triacilgliceroles del adipocito (lipogénesis). NADPH es requerido para la síntesis de lípidos

(Dessi, 1992), (Koh, 2004), (Muntoni, 1992), (Rosk, 2001), (Sackl, 2001), para regenerar la forma reducida del glutatión (GSH), mantener la actividad de la catalasa y regular el estado redox celular por transferir electrones al oxígeno para generar el anión superóxido por NADPH oxidasa. Varias son las fuentes que generan NADPH sin embargo la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa destaca como productora principal de NADPH para los sistemas anti y pro-oxidantes o para la lipogénesis de *novó*.

La G6PD (G6PD, EC1.1.1.49) es una enzima constitutiva que regula la vía de las pentosas fosfato generando NADPH y pentosas fosfato. Es altamente regulada por señales nutricionales, hormonales y de estrés oxidativo. La G6PD es esencial en la sobrevivencia celular y su función como fuente de NADPH para la síntesis de ácidos grasos quedó confirmada al observarse el decremento tanto en la velocidad lipogénica, como en las concentraciones de lipoproteínas en individuos con deficiencia en esta enzima.

Estudios recientes realizados con animales genéticamente obesos o alimentados con una dieta alta en contenido energético revelan que el incremento en la actividad y expresión de G6PD se asocia con aumento del estrés oxidativo y señales inflamatorias. Consistente con esto, la sobre-expresión de G6PD altera la homeostasis de lípidos y decrece la sensibilidad a la insulina en el adipocito. Incluso se ha observado que la G6PD podría ser un aliado fundamental para frenar los desórdenes metabólicos asociados a la obesidad y mejorar la sensibilidad a la insulina. A través de este conocimiento una alternativa terapéutica viable es el uso de la nicotinamida como posible regulador de G6PD durante la lipogénesis de *novo*, debido a su propiedad antioxidante, inmunoreguladora, antiapoptótica y anticancerígena.

1.1 Definición de las bebidas azucaradas y sus consecuencias

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) dictaminó que las bebidas azucaradas son todas aquellas bebidas que contienen azúcar artificial o natural que exceden el promedio de la cantidad recomendada por los médicos para la ingesta sana de niños y adultos que debe representar menos del 10% de la ingesta calórica total diaria. Éstas

incluyen bebidas carbonatadas o gaseosas regulares, es decir que no son de dieta y aquellas bebidas con sabor a frutas, al igual que las conocidas bebidas deportivas. En México la NOM detalla las características que deben tener las bebidas azucaradas (NOM-086-SSA1-1994, NOM-218-SSA1-2011).

Normalmente los ingredientes utilizados para su elaboración son agua y alto contenido de fructosa y jarabe de maíz. Cabe destacar que este grupo de bebidas no incluye los jugos naturales de fruta. El Jarabe de Maíz es un endulzante alto en calorías creado mediante un proceso enzimático a partir del maíz. Su uso se ha incrementado desde hace 30 años y no es un endulzante comercializado sin embargo se le puede encontrar comúnmente en diversas comidas procesadas y en innumerables bebidas, especialmente en gaseosas. La particularidad que presenta el jarabe de maíz y que ha hecho remplazar al azúcar se debe a que tiene un menor costo, se mezcla bien con muchos líquidos y sirve como conservador de muchos alimentos.

Un estudio realizado por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Colorado (UCHSC), avala que el exceso en el consumo del jarabe de maíz aumenta la presión arterial y la posibilidad de sufrir infarto al miocardio, cardiopatías, derrame cerebral, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, entre otras.

1.2 Definición de obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial, caracterizada por la acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo en el organismo. La causa de ello, en gran parte se debe a dietas ricas en calorías y al creciente sedentarismo en los países occidentales (Seidell, 1999). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud el grado de obesidad se define por el índice de masa corporal (IMC, el cual establece la relación entre el peso y la altura al cuadrado (kg/m^2) un IMC igual o mayor a 30 es sinónimo de obesidad (www.who.int). Además de ser componente esencial del síndrome metabólico la obesidad predispone al desarrollo de varias enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, apnea del sueño, ictus,

osteoartritis, algunas formas de cáncer, padecimientos dermatológicos y gastrointestinales (Sullivan, 2008), (Haslam, 2005).

1.2.1 Distribución anatómica de la obesidad

Según la distribución de la grasa en el cuerpo, la obesidad se puede clasificar en:

Obesidad central (visceral o androide). Abdominal o Forma de Manzana. La obesidad androide presenta acumulación de grasa en la parte central del cuerpo, especialmente en la región visceral; este tipo de obesidad se correlaciona con anormalidades diabetogénicas y aterogénico. Se asocia claramente con un aumento del riesgo de desarrollar: Diabetes tipo 2, Aterosclerosis, Hiperuricemia e Hiperlipidemia, Síndrome Metabólico, consecuencia directa del estado de Insulino resistencia (Despres, 2008) (Girard, La fontan, 2008)

Obesidad periférica (subcutánea o ginecoide). Localizada en zona glúteo femoral dando apariencia de pera al cuerpo. La circunferencia de la cadera se correlaciona negativamente con los diferentes factores de riesgo cardiovascular. La obesidad ginecoide se relaciona con alteraciones mecánicas osteoarticulares y trastornos vasculares venosos inferiores (L' Hermitte F, 2003). Se caracteriza por la distribución de grasa en la parte inferior del cerpo (abdomen, cadera, región glútea y muslos), siendo más común en mujeres que en hombres (Figura 1).



Figura 1. Clasificación de la obesidad de acuerdo a la distribución corporal de grasa. (A.D.A.M.'s Health Illustrated Encyclopedia).

La edad resulta un importante indicador, tanto para la terapéutica como para el pronóstico del obeso. Según la edad de su aparición se clasifica en:

Obesidad infantojuvenil. Comienza antes de los 18 años. Es predicativa de la obesidad del adulto. Los niños con sobrepeso tienen mayor probabilidad de ser obesos en la edad adulta. A su vez los adultos obesos que tienen historia de obesidad infantojuvenil sufrirán una obesidad más prolongada (www.fertilab.net).

Obesidad del adulto. Comienza después de los 18 años. En este tipo de obesidad predomina como mecanismo la hipertrofia celular y se asocia más frecuentemente a la obesidad abdominal visceral y sus complicaciones metabólicas (www.fertilab.net), su prevalencia continúa incrementando de manera acelerada, representado uno de los principales problemas a nivel mundial y nacional. La secuela principal de la obesidad es el desarrollo de la condición llamada resistencia a la insulina, que junto con la obesidad promueven el inicio y desarrollo de diversas fisiopatologías, incluidas DM2, síndrome metabólico, hipertensión arterial, dislipidemias, enfermedades cardiovasculares, entre otras (Gutierrez, 2009).

1.2.2 Obesidad y resistencia a la insulina

La etiología de la obesidad es multifactorial. Existe una susceptibilidad genética sobre la cual inciden los diferentes factores ambientales que llevan a un desequilibrio energético (aumento de la ingesta frente al gasto energético) en donde se presenta el almacenamiento del exceso de energía en el tejido adiposo.

El adipocito que almacena el exceso de energía, experimenta hipertrofia e hiperplasia que producirán alteraciones principalmente en su función intracelular a nivel del retículo endoplasmático y mitocondrial (Ferrantis S, 2008). Esta disfunción celular desencadena un estado pro-inflamatorio, con alteración de las adipocinas y liberación de ácidos grasos que a nivel del músculo esquelético promoverán la resistencia a la insulina (Figura 2).

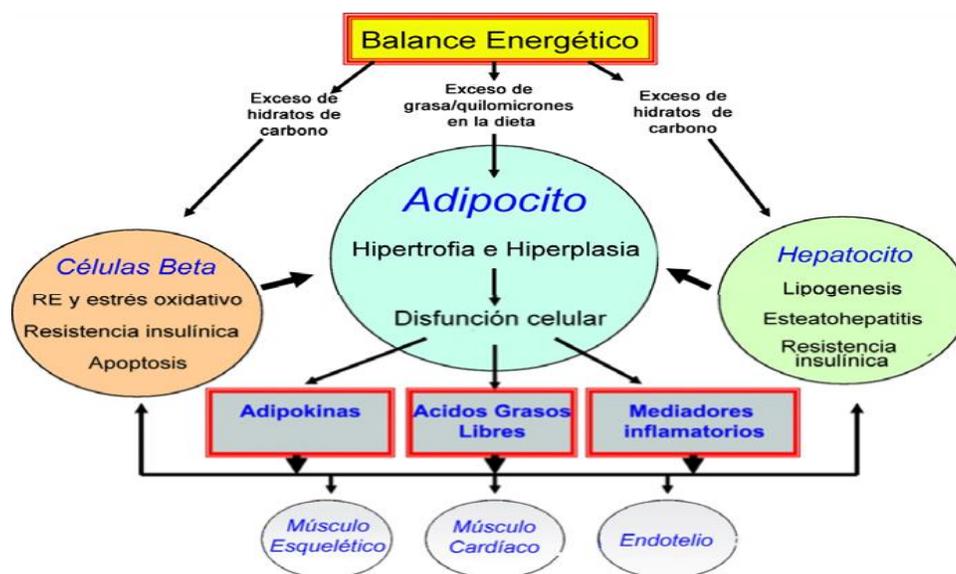


Figura 2. Consecuencias metabólicas del desbalance energético (Ferrantis S, 2008).

Una característica que distingue a la obesidad es la disminución en la sensibilidad a la insulina (Soverini, 2010). Varios son los factores que desencadenan la resistencia a la insulina en la obesidad, sin embargo, las evidencias han demostrado al estrés oxidativo sistémico como factor causal de ésta. En el sujeto obeso, la resistencia a la insulina es reflejo del aumento en la acumulación de lípidos en tejidos periféricos, debido al incremento de ácidos grasos libres a partir del tejido adiposo con hipertrofia (Perseghin, 2003). Durante la hipertrofia el adipocito *per se* llega a ser resistente a la insulina incrementando la liberación de ácidos grasos circulantes a partir del tejido adiposo. Bajo estas circunstancias los ácidos grasos libres en el plasma se encuentran elevados, debido a una escasa capacidad de amortiguamiento por parte del tejido adiposo; en consecuencia el exceso de lípidos se deposita en otros órganos.

El metabolismo del tejido adiposo concomitante con factores derivados del adipocito está involucrado en el control sistémico de la sensibilidad a la insulina. Además de los ácidos grasos, el tejido adiposo también secreta varias sustancias biológicamente activas, como las adipocinas (TNF- α , IL-6, ASP, resistina) que tienen la propiedad de modular la sensibilidad de otros tejidos a la insulina y probablemente participan en la

inducción de la resistencia a la insulina sistémica (Fasshauer, 2003), en el desarrollo de la diabetes tipo 2; así como de elevar el riesgo de enfermedades cardiovasculares asociadas con obesidad (Antuna-Puente, 2008).

En la mayoría de los individuos obesos o en aquellos que padecen diabetes tipo 2 el principal defecto en la acción de la insulina se localiza a nivel post-receptor (Saltier y Kahn, 2008). La acción de la hormona se ve alterada por estímulos que inhiben la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1) en residuos de tirosina (Hotamisligil, 1994). La reducción en la fosforilación del IRS-1 suprime la señalización molecular intracitosólica apropiada de la insulina, causando resistencia a sus acciones (Paz, 1997).

Además de los factores inflamatorios y de estrés también vías endocrinas, neurales, e intracelulares se encuentran alteradas en la obesidad, probablemente uno de estos factores tenga una acción dominante muchos de ellos son independientes y están fusionados a su propia interacción dinámica, y quizás dando soporte a la fisiopatología de la resistencia a la insulina.

Sin embargo, los estudios clínicos y experimentales muestran que el estrés oxidativo sistémico emerge como factor causal de la misma. El término estrés oxidativo se asigna al desbalance entre la producción de las especies moleculares altamente reactivas, principalmente de oxígeno y nitrógeno (O_2 , H_2O_2 , OH^- , NO) y las defensas antioxidantes (Halliwell, 1995), en la obesidad la producción de especies reactivas de oxígeno está correlacionada con acumulación de grasa (Evans, 2002).

La propuesta que la condición oxidante es crítica para el desarrollo de resistencia a la insulina, está respaldada por estudios que hacen patente la presencia de marcadores de estrés oxidativo en el sujeto obeso (Urukawa, 2003) y en roedores (Diniz, 2006).

Otros estudios señalan que revertir el desequilibrio entre pro-oxidante y antioxidantes mejora la acción de la insulina (Haber, 2003), (Furukawa, 2004), (Evans,

2007); ya que frena la activación de las cinasas JNK, p38MAPK y IKKb por especies reactivas principalmente de oxígeno (Wellen y Hotamisligil, 2005), (Blair, 1999), (Aguirre, 2000), (Maddux, 2001), (Yuan, 2001).una de las alternativas recomendadas para revertir este desequilibrio es el mejorar los habitos alimenticios en conjunción con una rutina de ejercicios.

1.2.3 Consecuencia de la obesidad

La obesidad enlaza un gran número de condiciones clínicas que disminuyen la esperanza de vida. Esta asociación puede ser dependiente o independiente de la distribución del tejido adiposo. Además de estar relacionada con el incremento en la prevalencia de desórdenes metabólicos y físicos; dentro de los primeros se encuentra la inflamación, resistencia a la insulina y dislipidemia, que predisponen al desarrollo de diabetes y enfermedades cardiovasculares (Gutiérrez, 2009). En cuanto a las alteraciones físicas están los problemas osteo-articulares y la apnea del sueño.

1.2.3.1 Resistencia a la insulina y diabetes tipo 2

La resistencia a la señal de la insulina, se considera como la capacidad reducida de los tejidos periféricos, en particular del músculo esquelético y el hígado, para responder al estímulo de la insulina. Esta anomalía se refleja en un metabolismo alterado de glucosa, desarrollo de diabetes tipo 2, enfermedad cardiovascular, dislipidemias, hipertensión y otros factores subclínicos, como los protrombótico y antifibrinolíticos. La resistencia a la insulina puede ser diagnosticada 10 ó 20 años antes del inicio de la hiperglucemia (Warram, 1990). En el sujeto obeso, la resistencia a la insulina refleja el aumento de la acumulación de lípidos en tejidos periféricos, debido al incremento de ácidos grasos libres (AGL) a partir de un adipocito con hipertrofia y una escasa capacidad de amortiguamiento por parte del tejido adiposo (Perseghin, 2003).

El deterioro de la sensibilidad de la insulina asociada al exceso de lípidos en el hígado, músculo esquelético y páncreas tiene consecuencias típicas del síndrome

metabólico (Frayn y Summers, 1998). De esta manera, el metabolismo del tejido adiposo concomitante con factores derivados del adipocito está vinculado al control sistémico de la sensibilidad de la insulina.

1.2.3.2 Enfermedades cardiovasculares

La obesidad aumenta el riesgo de infarto al miocardio (IAM), acelera la aterosclerosis, origina hipertensión y dislipidemias. La función que tiene el tejido adiposo como órgano endocrino, lo involucra en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares, debido al incremento en la producción de citocinas pro inflamatorias y de quimiocinas, originando un estado inflamatorio. Además incrementa la secreción de factores pro aterogénicos favoreciendo las complicaciones cardiovasculares (Bogaert - Linas, 2009), (Calabro, 2009).

1.2.3.3 Cáncer

El exceso de peso se ha relacionado con el incremento en la aparición de todo tipo de cáncer, especialmente de mama, endometrio, colon y próstata. Se han realizado experimentos en donde la restricción de calorías mostró reducción en la proliferación celular y aumento en la apoptosis. El incremento del tejido adiposo, cambios en los niveles de hormonas sexuales, alteración del sistema inmune, daño en la señalización de la insulina y aumento de los radicales libres influyen en el proceso de carcinogénesis (Fair y Montgomery, 2009).

1.2.3.4 Esteatosis hepática

Se ha visto que más del 80% de las personas con esteatosis hepática no alcohólica presentan obesidad mórbida. La resistencia a la insulina causada por el aumento de la grasa corporal incrementa la concentración de AGL, originando acumulación de grasa en hígado. Éste sólo es el inicio, ya que después se presenta hiperinsulinemia, lipoperoxidación,

alteración en la producción de citocinas y finalmente estrés oxidativo; que son componentes que finalmente llevan a la esteatosis hepática (Clark y Diehl, 2003), (Shifflet y Wu, 2009).

1.3 Síndrome metabólico

El síndrome metabólico es un conjunto de alteraciones antropométricas, bioquímicas y clínicas que predisponen al desarrollo de la enfermedad cardiovascular y la diabetes mellitus tipo 2 a lo largo de la vida (Ford ES, 2008). La existencia de una serie de factores de riesgo que predisponen a la enfermedad cardiovascular y la diabetes mellitus no es reciente, ya había llamado la atención a diferentes investigadores en los años 20 del siglo pasado. Así Eskil en Suecia, propuso la existencia de un síndrome que abarcaba hipertensión arterial, hiperglucemia e hiperuricemia que se consideró como la primera descripción sobre este síndrome en el siglo XX (Kylin E, 1923).

Por su parte Avogaro realizó una descripción sistemática de los componentes de este síndrome: obesidad, diabetes mellitus e hipertensión, además incluyeron la hiperlipidemia como uno de los componentes claves (Avogaro P, 1967).

Sin embargo fue Gerald Reaven el primero que llamó la atención suficientemente a los investigadores sobre la relación que existía entre la resistencia insulínica, la intolerancia a la glucosa, el aumento de los triglicéridos, la disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la hipertensión arterial (Reaven, 1988).

Todas estas alteraciones actualmente están asociadas con el síndrome metabólico y lo denominó entonces "síndrome X". Originalmente la obesidad no estaba incluida porque existían individuos con IR que no eran obesos. Se denomina síndrome metabólico (también conocido como síndrome X, síndrome pluri metabólico, síndrome de insulino resistencia, síndrome de Reaven o CHAOS) a la conjunción de varias enfermedades o factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan su probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus.

El síndrome metabólico lo presenta una de cada cinco personas este síndrome se presenta en familias con antecedentes y es más común entre las personas afroamericanas, hispanas, asiáticas e indígenas americanas. En todos los grupos, la posibilidad de que ocurra el síndrome aumenta a medida que la gente envejece. La causa exacta del síndrome metabólico no se conoce, pero entre los factores que contribuyen a que se presente esa condición son: la genética, el exceso de grasa (especialmente alrededor de la cintura) y la falta de ejercicio.

Las personas con síndrome metabólico tienen una conjunción de los siguientes factores de riesgo: Obesidad central, Diabetes, Niveles elevados de triglicéridos y niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL o "colesterol bueno") en la sangre, Presión arterial alta (hipertensión arterial).

1.3.1 Parámetros para diagnosticar el síndrome metabólico

A partir de la publicación de Gerald Reaven, numerosos investigadores hicieron referencia al mismo síndrome utilizando diferentes denominaciones o introduciendo nuevos criterios para el SM en la población adulta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1998, fue la primera organización que propuso en forma provisoria y luego definitivamente en 1999 la definición del síndrome metabólico y los criterios para su diagnóstico en la población adulta (Organización Mundial de la Salud, 1999) (Alberti, Zimmet PZ.1998) (Tabla 1).

Esta definición tenía algunos inconvenientes porque exigía la presencia de resistencia a la insulina o alteración del metabolismo hidrocarbonado más otros criterios y por lo tanto presentaba un mayor poder predictivo para la posibilidad de padecer diabetes mellitus tipo 2. Además contemplaba el uso del índice cintura /cadera en lugar de la circunferencia abdominal que está más relacionado con el depósito de grasa visceral y por último la inclusión de la micro albuminuria como criterio para el diagnóstico del síndrome.

Tabla 1. Definición del síndrome metabólico según la OMS (www.who.int).

Debe existir resistencia a la insulina o glucemia basal alterada, intolerancia a la glucosa o diabetes mellitus tipo 2. Más dos de los siguientes criterios:

- ***Obesidad:** $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ un índice cintura/ cadera $> 0,9$ (varones) o $> 0,8$ (mujeres)
- ***Dislipidemia:** triglicéridos $\geq 150 \text{ mg/dL}$ y/o HDL $< 35 \text{ mg/dL}$ (varones) o $< 40 \text{ mg/dL}$ (mujeres)
- ***Hipertensión arterial:** tensión arterial $\geq 140/90 \text{ mm Hg}$ o tratamiento farmacológico
- ***Micro albuminuria:** excreción $\geq 20 \mu\text{g/min}$ o relación albúmina/creatinina $> 30 \text{ mg/g}$

En respuesta a los criterios propuestos por la Organización Mundial de la Salud, el EGIR (Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina) modificó los nuevos criterios propuestos por la OMS principalmente en relación con los puntos de corte que habían considerados. Además se sustituyó la determinación de micro albuminuria por la medición de la glucemia basal y propuso la utilización de la definición de síndrome de resistencia a la insulina en lugar de la denominación de síndrome metabólico (Balkau B, 1999), (Tabla 2).

Tabla 2. Definición del síndrome metabólico según el EGIR (Balkau B, 1999).

Más de dos de los siguientes criterios: resistencia a la insulina*

- ***Obesidad central:** cintura $\geq 94 \text{ cm}$ (varones) o $\geq 80 \text{ cm}$ (mujeres)
- ***Dislipidemia:** triglicéridos $> 180 \text{ mg/dL}$ y/o colesterol HDL $< 40 \text{ mg/dL}$
- ***Hipertensión arterial:** tensión arterial $\geq 140/90 \text{ mm Hg}$ o tratamiento farmacológico
- ***Glucemia basal:** $\geq 110 \text{ mg/dL}$

*Valores de insulina basal $> p 75$ de la población no diabética

En el año 2013 el NCEP (Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol) presentó el Panel de Tratamiento del Adulto (ATP IV) con nuevos criterios del síndrome metabólico como parte de un programa educativo para la prevención de las enfermedades coronarias (JAMA, 2013).

Esta clasificación más simple dejó de considerar la alteración del metabolismo glucídico como criterio indispensable para el diagnóstico del síndrome metabólico y asigno a cada componente del síndrome el mismo valor equiparable. El NCEP-ATP IV, también reconoció que el síndrome se acompañaba de un estado pro inflamatorio y protrombótico.

Esta clasificación más sencilla permitió que fuera usada ampliamente tanto en los trabajos epidemiológicos como en la práctica clínica diaria (Tabla 3).

Tabla 3. Definición del síndrome metabólico según el NCEP-ATP IV (JAMA, 2013).

Tres o más de los siguientes criterios:

- ***Obesidad central:** cintura > 102 cm (varones) o > 88 cm (mujeres)
 - ***Hipertrigliceridemia:** triglicéridos \geq 150 mg/dL
 - ***Descensos del colesterol:** HDL < 40 mg/ dL (varones) o <50 mg/ dL (mujeres)
 - ***Hipertensión arterial:** tensión arterial \geq 130/85 mm Hg o tratamiento farmacológico.
 - ***Glucemia basal:** \geq 110 mg/dL
-

En el año 2013 la Asociación Americana de Endocrinología Clínica (AACE) publicó su posición oficial sobre el síndrome metabólico. Aunque sin proponer una definición específica, dejando el diagnóstico al juicio clínico (Bloomgarden, 2013).

Además proponía una modificación de los criterios del NCEP-ATP IV, e insistía en la sugerencia de utilizar el término de síndrome de resistencia a la insulina y excluía la diabetes como uno de los componentes del síndrome por considerarlo una consecuencia propia del síndrome y también excluía la obesidad como un criterio propiamente dicho (AACE, 2013) (Tabla 4).

Tabla 4. Definición del síndrome metabólico según la AACE (www.aace.com).

Presencia de al menos uno de los siguientes factores de riesgo:

*Diagnóstico de enfermedad cardiovascular, hipertensión arterial, síndrome de ovario poliquístico, esteatosis hepática no alcohólica o acantosis nigricans.

*Historia familiar de diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial o enfermedad cardiovascular.

*Historia de diabetes gestacional o intolerancia a la glucosa.

*Raza no caucásica.

*Estilo de vida sedentario.

*IMC $> 25 \text{ kg/m}^2$ y/o cintura $> 101,5 \text{ cm}$ (varones) o $> 89 \text{ cm}$ (mujeres).

*Edad > 40 años.

*Más dos o más de los siguientes criterios:

*Triglicéridos $> 150 \text{ mg/dL}$

*Colesterol HDL $< 40 \text{ mg/dL}$ (varones) o $< 50 \text{ mg/dL}$ (mujeres)

*Tensión arterial $> 130/85 \text{ mmHg}$ o tratamiento farmacológico.

*Glucemia basal $110-125 \text{ mg/dL}$ o glucosa 2 horas después de sobrecarga oral entre 140 y 200 mg/dL

La existencia de múltiples definiciones para el síndrome metabólico ha generado una gran confusión. Con el fin de poder realizar comparaciones entre poblaciones de diferentes países sobre la prevalencia del síndrome metabólico, la Federación Internacional de la Diabetes (IDF) reunió entre sus miembros un grupo de expertos con el objetivo de consensuar los criterios para el SM.

Este nuevo consenso puso énfasis en la obesidad abdominal como un componente clave del síndrome, que presentaba una excelente correlación con la resistencia a la insulina y consideró su medición como un requisito imprescindible para el diagnóstico del síndrome (Alberti KG, 2006) (Tabla 5).

Además teniendo en cuenta que el grado de obesidad a partir del cual aumentan los riesgos para las complicaciones metabólicas y cardiovasculares era diferente en las distintas razas, se establecieron para la circunferencia abdominal puntos de corte específicos según los grupos étnicos.

Tabla 5. Definición del síndrome metabólico según la IDF (Alberti KG, 2006).

Obesidad central: incremento del perímetro de cintura según grupo étnico específico*
Más dos de los siguientes criterios:

***Hipertrigliceridemia:** triglicéridos >150 mg/dL o tratamiento para alteración lipídica.

***Descenso de colesterol HDL:** < 40 mg/dL (varones) o < 50 mg/dL (mujeres) o tratamiento por alteración lipídica.

***Hipertensión arterial:** tensión arterial sistólica \geq 130 y/o tensión arterial diastólica \geq 85 mm Hg o tratamiento farmacológico.

***Alteración del metabolismo de la glucosa:** glucemia basal \geq 100 mg/dL o diabetes mellitus tipo2 previamente diagnosticado.

*Si el índice de masa corporales >de $30\text{kg}/\text{m}^2$ se puede asumir que hay una obesidad central y no es necesario medir el perímetro de la cintura.

1.3.2 Fisiopatología del síndrome metabólico

La resistencia a la insulina es clave en la asociación entre la obesidad y los componentes del síndrome metabólico, porque constituye el sustrato fisiopatológico sobre el cual se desarrolla el síndrome metabólico.

1.4 Tejido adiposo

Debido al incremento en el índice de obesidad a nivel mundial y al problema de salud que esto representa, el estudio del tejido adiposo es fundamental para entender las anormalidades metabólicas asociadas al desarrollo de obesidad. Durante varios años el tejido adiposo fue considerado únicamente como un órgano de almacén de energía,

actualmente se reconoce que posee alta actividad metabólica y que es un órgano endocrino capaz de establecer comunicación con el resto del organismo mediante la síntesis y liberación de moléculas activas llamadas adipocinas. Éstas funcionan como señales autocrinas, paracrinas y endocrinas necesarias para el control del metabolismo (Vázquez-Vela, 2008).

En los mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo café o marrón. Ambos, como lo dice su nombre, presentan diferencias en cuanto a coloración, pero más importantes son las diferencias en la morfología, distribución, genes y función.

Cualquier alteración en el tejido adiposo tendrá repercusiones en la salud. Es así como el incremento en la grasa abdominal, ya sea visceral o subcutánea, es importante para la patogénesis, no sólo de la resistencia a la insulina, sino también de dislipidemias, intolerancia a la glucosa, hipertensión y riesgos cardiovasculares (Maritza, 2007).

1.4.1 Composición celular del tejido adiposo

El tejido adiposo contiene distintos tipos celulares, la tercera parte está constituida por adipocitos. El resto del tejido adiposo se encuentra formado por fibroblastos, macrófagos, células del estroma, monocitos y preadipocitos (Figura 3) (Vázquez-Vela y col., 2008). En el desarrollo de la obesidad, se presentan cambios en la composición, ejemplo de esto es la inflamación e infiltración progresiva de macrófagos, proporcional al grado de obesidad.

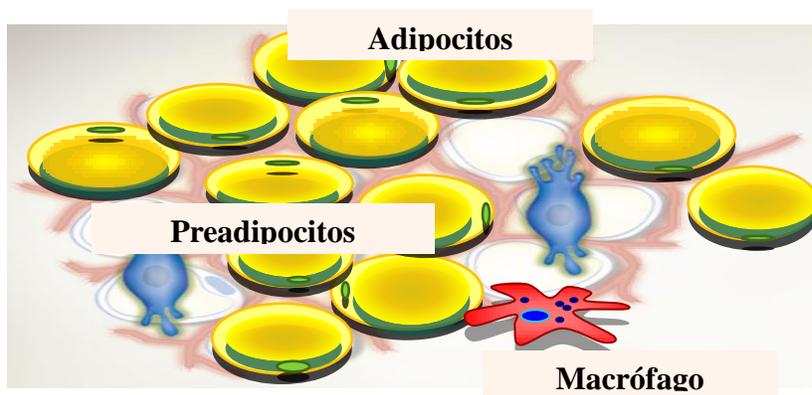


Figura 3. Células que componen al tejido adiposo. (Wellen y Hotamisligil, 2003).

1.4.2 Tejido adiposo café o marrón

Posee adipocitos multiloculares, es decir, presenta varias gotas lipídicas, aunque almacena menos lípidos que el tejido blanco. Otra característica que los distingue es la gran abundancia de mitocondrias. Los adipocitos cafés expresan en su totalidad todos los genes que se expresan en los adipocitos blancos. También expresan, en concentraciones altas, algunos distintos, como la proteína desacoplante 1 (UCP1), responsable de la producción de calor sin la generación de ATP, lo que ocasiona un desacoplamiento metabólico, fenómeno que solamente permite la liberación de energía en forma de calor. El control neurógeno es de tipo adrenérgico, sin embargo, el tejido café recibe mayor inervación que activa a los receptores β_3 membranales, que inducen termogénesis y modificaciones en la eficacia con que se utilizan los sustratos. En el humano, el tejido adiposo café únicamente está presente en el recién nacido para la regulación termogénica (Cortés, 2002), (Rosen y McDougal, 2006). (Figura 4. A,B).

1.4.3 Tejido adiposo blanco

Es el principal sitio de almacén de energía, formado por adipocitos uniloculares, lo que significa que posee sólo una gota lipídica en donde almacena la energía en forma de triacilgliceroles (TAG). La principal función de este tejido es el control de la ingesta de energía y la distribución de la misma a otros tejidos en los periodos interdigestivos. La cantidad de tejido adiposo blanco es dependiente del requerimiento energético del organismo y está finalmente regulado por nutrimentos, señales hormonales y neuronales.

El tejido no sólo responde a hormonas, sino que también produce y secreta moléculas. Mediante estas señales moleculares, el adipocito participa en la regulación de múltiples funciones celulares y se comunica con células de otros tejidos, localizados en órganos distantes, como hipotálamo, páncreas, hígado, músculo esquelético, riñón, hueso, endotelio y sistema inmune. Las moléculas secretadas se encuentran relacionadas con distintos procesos, como la respuesta inmune (TNF α), la regulación de la ingesta y el gasto

energético (leptina y adiponectina), y la función vascular (angiotensina y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1) (Moreno y Martínez, 2002).

Por lo tanto, alteraciones en el crecimiento, desarrollo y función del tejido adiposo blanco, pueden estar implicadas en el desarrollo de diversas patologías tales como la obesidad, la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2, hipertensión y aterosclerosis. Adicional al almacenamiento de combustible, el tejido adiposo blanco puede actuar como un aislante térmico y como protector de órganos. (Figura 4. A,B).

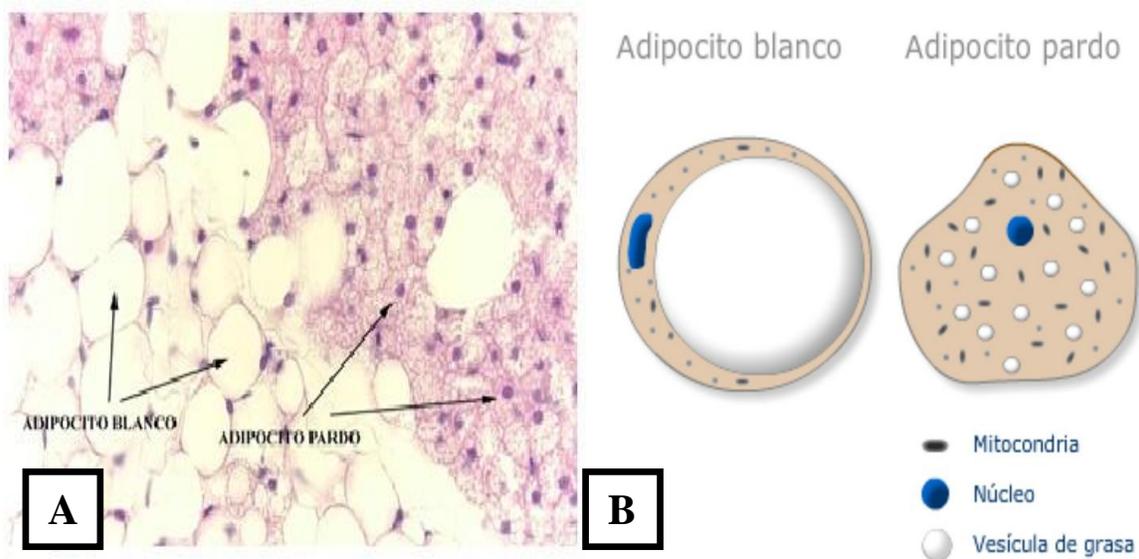


Figura 4.

A. Corte histológico del tejido adiposo blanco y pardo. (Rosa Daza, Medicina IID).

B. Morfología del adipocito blanco y pardo. (<http://modeladocorporal.mex.tl>)

1.4.4 Adipocito

Los adipocitos son células de secreción endocrina derivados de células madre multipotentes de origen mesodérmico con la capacidad de diferenciarse a adipocitos, condrocitos, osteoblastos y miocitos. La célula adiposa contiene todas las enzimas de la lipólisis y de la lipogénesis y es capaz de modificar el tamaño de su diámetro hasta 20 veces y varias veces su volumen. Los adipocitos son células muy activas, producen y

secretan moléculas proteicas y no proteicas que actúan de manera endocrina, paracrina y autocrina (Pagano y Calvo, 2003).

1.4.5 Ácidos grasos

Los ácidos grasos son sustrato para la producción de lipoproteínas en el hígado, moléculas de señalización y fuente de energía (Arner, 2005). Cuando la liberación de ácidos grasos no va de acuerdo al requerimiento energético se origina un desequilibrio entre el almacén y la liberación de energía, originando incremento de los ácidos grasos a nivel plasmático y en su metabolismo, comenzando a almacenarse en tejidos diferentes al adiposo, como por ejemplo el hígado (órgano en el cual es fácil la acumulación debido a que esta comunicado con la grasa visceral mediante la vena porta).

La fuente de los triacilgliceroles (TAG) es a partir de la dieta, de la síntesis hepática o de movilizar los depósitos existentes. La Figura 5 muestra el metabolismo de los TAG de la dieta, los cuales se emulsifican por las sales biliares, fomentando la hidrólisis en la luz del intestino delgado por la lipasa pancreática y otras enzimas. Los ácidos grasos y los monoacilgliceroles, producto de la hidrólisis se absorben por los enterocitos para recombinarse en TAG, que además se combinan con apoproteínas para formar los quilomicrones. Este proceso solubiliza los lípidos y permite su transporte a través de la sangre y la linfa. Los TAG sintetizados en el hígado forman las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Las lipoproteínas transportadas a los tejidos periféricos se hidrolizan en las superficies internas de los capilares, y se catabolizan para producir energía o se recombinan en TAG para almacenarse. En el almacenaje, la lipasa de lipoproteínas (LPL) se encarga de hidrolizar los TAG contenidos en las lipoproteínas, liberando a los ácidos grasos que son rápidamente captados por el tejido adiposo, ingresando al adipocito. La LPL es producida y secretada por el tejido adiposo y el músculo, posteriormente se transporta a las células endoteliales de estos tejidos. La LPL se une a proteoglicanos en la superficie luminal de los capilares donde interactúa con las lipoproteínas. Durante la alimentación, la LPL aumenta en tejido adiposo, disminuyendo en músculo. (Yu y Ginsberg 2005).

Las VLDL dan lugar a las IDL, mientras que la degradación de los quilomicrones origina los restos de quilomicrones. Las HDL desempeñan el principal papel de eliminar el exceso de colesterol de los tejidos y restituirlo al hígado para su metabolismo o excreción.

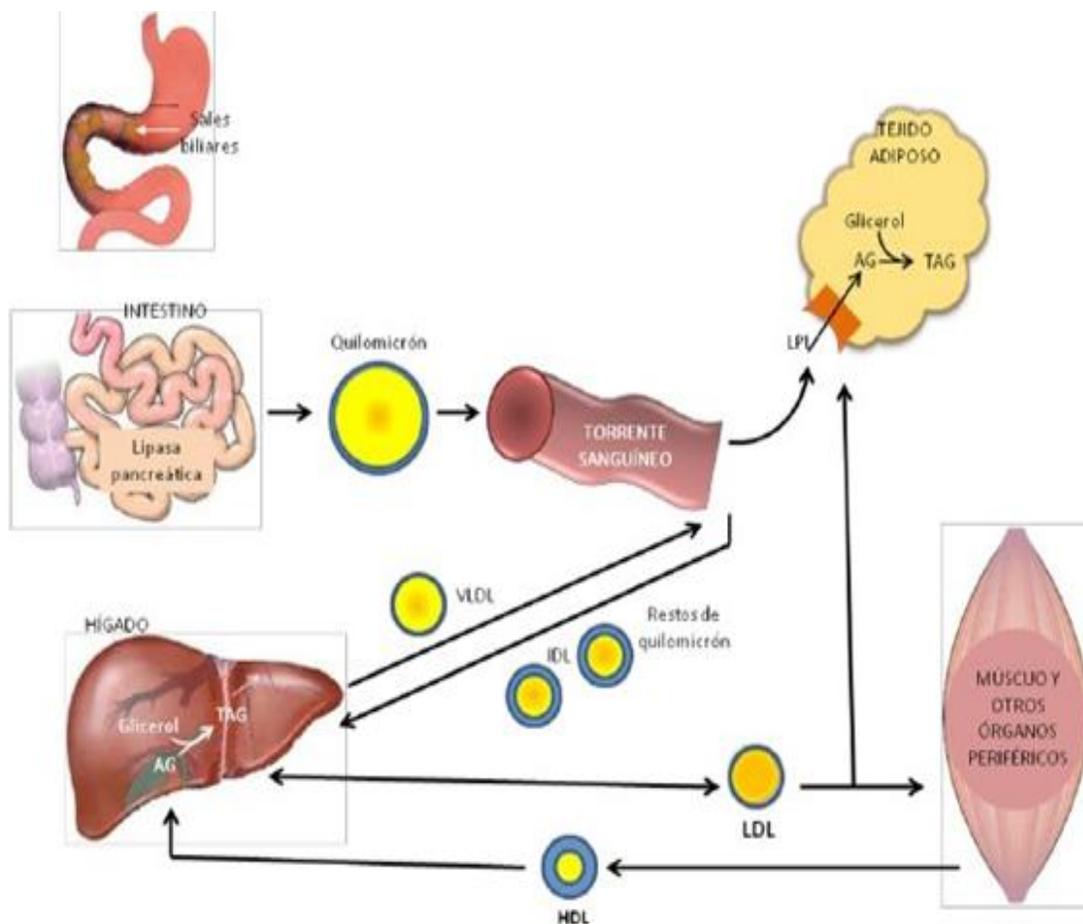


Figura 5. Metabolismo de los ácidos grasos (<http://themedicalbiochemistrypage.org>).

Los TAG ingeridos se hidrolizan en la luz del intestino delgado por la lipasa pancreática y otras enzimas. Los productos de la hidrólisis absorbidos por la mucosa intestinal se recombinan en TAG, que se combinan con apoproteínas para formar quilomicrones. Los TAG sintetizados en el hígado forman las VLDL. Los TAG en ambas lipoproteínas se hidrolizan a glicerol y ácidos grasos en las superficies internas de los capilares en los tejidos periféricos, dando lugar a las IDL y a los restos de quilomicrones.

1.4.6 Lipogénesis

El tejido adiposo blanco es el mayor reservorio de energía, la cual es almacenada en forma de TAG, dentro de una vacuola que representa el 95% del adipocito. La lipogénesis es la síntesis de ácidos grasos esterificados, a partir de carbohidratos o de otras fuentes de energía provenientes de la dieta. Ocurre principalmente en hígado, y en menor grado en tejido adiposo. La síntesis aumenta durante el estado postprandial y después del consumo de carbohidratos y se inhibe con el ayuno.

La acumulación de lípidos en el tejido adiposo depende de los ácidos grasos circulantes. La principal fuente de TAG procede de quilomicrones y VLDL circulantes (Moreno y Martínez, 2002).

Los TAG de las VLDL son hidrolizados hasta ácidos grasos libres (AGL) y glicerol por la LPL. La proteína estimuladora de acilación (ASP) estimula la síntesis de TAG en tejido adiposo. A medida que se generan AGL, simultáneamente se produce ASP, promoviendo la síntesis y depósito de TAG en el adipocito. Una vez en el interior de la célula, los ácidos grasos son re esterificados para formar TAG.

La proteína que se une a ácidos grasos (FABP), también conocida como a P2 se encarga de movilizar los AGL en la fase acuosa del citosol y los dirige a los organelos membranosos intracelulares, para su esterificación (Hita, 2002). Los ácidos grasos plasmáticos unidos a albúmina también pueden ser captados por los adipocitos y re esterificados a TAG.

La lipogénesis *de novo* se refiere a la síntesis de ácidos grasos a partir de sustratos no lipídicos, primordialmente carbohidratos. La glucosa es el principal sustrato para la lipogénesis *de novo* (Large, 2004). La glucosa ingresa al adipocito mediante GLUT-4, controlado por insulina, donde es oxidada vía glicolítica a acetil-CoA, para ser transformada a malonil-CoA por la Acetil-CoA carboxilasa (ACC). Finalmente la FAS la convierte a acil-CoA, para ser esterificada en retículo endoplásmico a TAG. Finalmente,

los TAG son translocados al interior de la gota lipídica. La FAS es una enzima que requiere $\text{NADPH} + \text{H}^+$, aportado primordialmente por la G6PD y en menor grado por la ME (Fonseca-Alaníz, 2007).

1.4.7 Lipólisis

Una alta demanda de energía, como el ayuno, ejercicio y situaciones de estrés, las enzimas lipolíticas son encargadas de proporcionar ácidos grasos y glicerol a otros tejidos tales como el hígado, músculos esquelético, riñón y miocardio (Carmen, 2006), (Vázquez-Vela, 2008). Durante la lipólisis, los TAG almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados hasta ácidos grasos y glicerol. El paso limitante de la lipólisis está controlado por la lipasa sensible a hormonas (HSL), ésta hidroliza a los TAG a diacilglicerol (DAG) y monoacilglicerol (MAG). Los MAG son finalmente hidrolizados a AGL y glicerol por la monoacilglicerol lipasa. La HSL se activa por fosforilación en serina por la proteína cinasa A (PKA), la cual es activada mediante AMP cíclico. La lipólisis es estimulada por hormonas como glucagón y catecolaminas, que al unirse a su receptor activa a proteínas G estimulantes y, por tanto a la adenilato ciclasa para la formación de AMP ciclico. Además de PKA, la lipólisis puede ser estimulada por MAPK y por cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK).

Los AGL se unen a proteínas acarreadoras para ser transportados al espacio intersticial y a la circulación. Existen varias proteínas acarreadoras, sin embargo, la más importante es la albúmina. El transporte de glicerol al exterior del adipocito, necesario para la gluconeogénesis, es llevado a cabo por una proteína integral formadora de canales de la membrana celular, la acuaporina adiposa 7 (AQP7) (Funahashi, 2006).

La inhibición de la lipólisis se da por hormonas cuyo receptor se encuentra asociado a la adenilato ciclasa a través de proteínas G inhibitorias. Esto provoca una menor producción de AMP ciclico y una menor activación de la PKA y por lo tanto de la HSL (Moreno y Martínez, 2002).

1.4.8 Regulación lipogénesis/ lipólisis

La desregulación de la lipogénesis y la lipólisis puede dar lugar a anormalidades metabólicas. Cuando hay un incremento en la actividad lipogénica, puede originar acumulación de TAG dentro del tejido adiposo. Sin embargo, si aumenta el nivel lipolítico, incrementan los AGL, acumulándose en tejidos y órganos diferentes al adiposo. Todas estas anormalidades están relacionadas con el desarrollo de resistencia a la insulina. Por lo tanto, la regulación de la lipogénesis y la lipólisis es esencial tanto para mantener la homeostasis energética, como para prevenir enfermedades metabólicas. Ambos procesos se encuentran regulados por hormonas, cuya secreción está bajo regulación nutricional (Jaworski, 2007).

Las catecolaminas (adrenalina, noradrenalina, dopamina), principales hormonas que estimulan la lipólisis, se unen mediante receptores β adrenérgicos (β_1 AR y β_2 AR), éstos a su vez se unen a proteínas G (G_{os}) activando la cascada lipolítica (Langin, 2006).

Las catecolaminas al unirse al receptor α_2 AR, éste se une a proteína G_{oi} provocando disminución de AMP cíclico, y por consiguiente un efecto antilipolítico. La desnutrina/ATGL forma parte de la familia de proteínas implicadas en la lipólisis en tejido adiposo y está regulada por factores como la alimentación (Zulet, 2007). Los glucocorticoides se encargan de inducir la expresión de desnutrina/ATGL, por lo tanto estimulan la lipólisis.

La insulina, contrario a catecolaminas y glucocorticoides, es una hormona lipogénica. La insulina activa a la fosfodiesterasa reduciendo el AMP cíclico; además desfosforila a de HSL mediante la fosfatasa 1.

1.4.9 Hipertrofia e Hiperplasia

Una variación crónica del consumo calórico y su baja utilización agranda el almacén de energía en forma de TAG del adipocito. El exceso de masa grasa en el adipocito, se manifiesta en aumento de lípidos intracelulares, mayor tamaño (hipertrofia) y número (hiperplasia) de adipocitos. La hipertrofia evidente en individuos con sobrepeso y en pacientes con diabetes tipo 2 fue considerada la única ruta a través de la cual la masa del tejido adiposo se expande en el adulto (Bahceci, 2007). Sin embargo, la hiperplasia se suma al ensanchamiento del tejido adiposo en la obesidad.

La hipertrofia y la hiperplasia están asociadas con anormalidades intracelulares en la función del adipocito, particularmente del retículo endoplásmico y el estrés mitocondrial. Esto tiene consecuencias intracelulares y sistémicas incluyendo, resistencia a la insulina, producción de adipocinas y AGL. La hiperplasia ocurre en dos pasos, primero hay un incremento en el número de preadipocitos y posteriormente su diferenciación a adipocitos maduros. Estudios in vitro muestran que los adipocitos hipertróficos en presencia de TNF α e IGF-I estimulan la hiperplasia. Además, cambios asociados con hipertrofia parece favorecer la disfunción celular del adipocito (De Ferranti, 2008).

Los adipocitos con hipertrofia presentan mayor lipólisis, debido a la menor sensibilidad a insulina, y por lo tanto mayor activación de AMP cíclico, llevando a un incremento de la activación del factor lipolítico PKA-HSL (Guilherme, 2008).

1.5 Resistencia a la insulina en el tejido adiposo

La resistencia a la insulina en el tejido adiposo es importante en la fisiopatología del síndrome metabólico (Reaven, 1988) (Eckel RH, 2005). En condiciones normales la insulina inhibe la lipólisis del tejido adiposo, sin embargo cuando existe IR la lipólisis no se puede suprimir y aumenta el volumen de ácido graso libre (AGL) liberado al plasma. Este proceso está mediado por la HSL (lipasa sensible a hormonas) que junto con el ATGL

(triglicérido adiposo lipasa) son responsables del 95% de la hidrólisis de los triglicéridos (Schweiger, 2006) (Kraemer, 2002).

En los sujetos obesos la hiperinsulinemia y la IR están fuertemente asociados con el ARNm y la expresión de la proteína de HSL y ATGL independientemente de la masa grasa (Jocken, 2007). La resistencia a la insulina aumenta los niveles de AGL que producen a su vez aumento de la IR (Boden G, 2008). Así mismo el depósito de tejido adiposo visceral contribuye al aumento del volumen de AGL. Por otra parte el drenaje venoso del tejido adiposo visceral va directamente al sistema porta y se ha hipotetizado que en la obesidad visceral el hígado recibe una sobrecarga de ácidos grasos y por consiguiente se vuelve resistente a la insulina (teoría portal) (Eckel, 2005).

El tejido adiposo también contribuye a la fisiopatología del síndrome metabólico a través de la liberación excesiva de citocinas proinflamatorias. Dichas citocinas parecen proceder de los adipocitos y/ o de los macrófagos derivados de los monocitos y pueden modificar la acción de la insulina de forma paracrina en el tejido adiposo o de forma endocrina a nivel de otros tejidos, como el hígado, músculo esquelético o hueso (Sopasakis, 2004). (Figura 6).

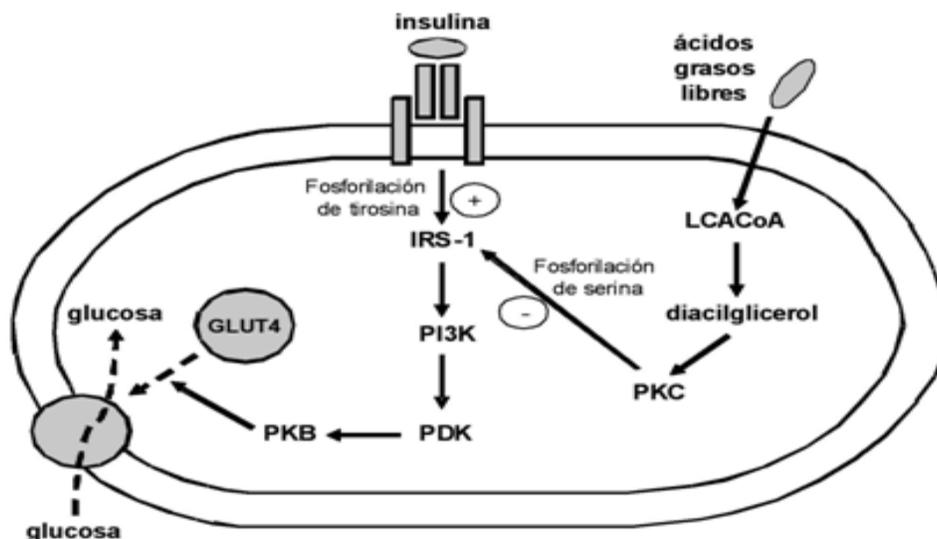


Figura 6. Resistencia a la insulina (Mecanismo) (McGarry JD, 2002).

IRS-1: sustrato 1 del receptor de insulina, LCoA: acil-CoA de cadena larga, PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa, PDK: fos-fatidil-dependiente cinasa, PKB: proteína cinasa B, PKC: proteína cinasa C

1.6 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzima presente en todas las células, dado que limita el flujo de carbono a través de la vía de las pentosas fosfato, generando NADPH y pentosas fosfato. Su gen se localiza en el cromosoma X, tiene una extensión de 18 kb y contiene 13 exones.

La G6PD es la enzima limitante en la vía de las pentosas fosfato, cataliza la oxidación de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona con la producción de equivalentes reductores en forma de NADPH + H⁺.

Aunque la G6PD se expresa en todas las células, sólo en hígado, tejido adiposo, pulmón y glándula mamaria, se regula su síntesis en respuesta a la dieta y hormonas, dentro de las que se encuentran la insulina, 17-b-estradiol, dehidroepiandrosterona, adrenalina, cortisona, que inducen la expresión del gen de la enzima (Kletzien RF, 1994). La ingesta de ácidos grasos inhibe su actividad. Por otra parte, los carbohidratos de la dieta incrementan la síntesis de G6PD, en especial la glucosa, la magnitud del aumento depende de la cantidad de los carbohidratos consumidos.

Por otra parte, los carbohidratos de la dieta incrementan la síntesis de G6PD, en especial la glucosa, la magnitud del aumento depende de la cantidad de los carbohidratos consumidos. En el caso de los glucocorticoides incrementan el mRNA de G6PD en presencia o ausencia de insulina, mientras que la síntesis no se ve afectada. Esto indica que el control traduccional puede activarse por insulina pero no por los glucocorticoides (Kletzien, 1994).

Diversos estudios sobre el efecto de la reducción de la actividad de G6PD en diferentes tejidos, revelan que disminuye la supervivencia celular, induce estrés oxidativo, incrementando la producción de especies reactivas y apoptosis (Díaz-Flores, 2006), (Zhang, 2010), (Filosa, 2003). Además de disminuir tanto la proliferación como la secreción de insulina (Xu, 2005). Aunque también existen estudios que sustentan la deficiencia de G6PD

como una ventaja para aquellos que padecen malaria, ya que favorece un ambiente adverso para el desarrollo del parásito, con la desventaja de incrementar la susceptibilidad a oxidantes como alimentos, fármacos y químicos (Wajcman, 2004).

Por otro lado, en algunos tejidos el incremento en la actividad de G6PD se ha asociado a disfunción endotelial y vascular en diabetes. Además, trabajos realizados en tejido adiposo y adipocitos, indican que el incremento en la actividad de G6PD altera la homeostasis lipídica y favorece la resistencia a la insulina e inflamación (Gupte, 2006), (Park, 2006).

Contrario a esto, a pesar de que diversas señales y eventos metabólicos pueden ser importantes en regular la muerte celular, el estado redox, en particular, se ha demostrado que tiene un papel crítico. Destacando la intervención de la G6PD en la muerte celular inducida por H_2O_2 , durante la cual ocurre el decremento de la G6PD y la producción de ERO, la sobre-actividad de la G6PD hace que las células sean resistentes al H_2O_2 . De igual manera, el inhibir a la deshidrogenasa lleva a la muerte celular programada y a su degradación. Durante la inhibición de la G6PD se originan cambios en la fosforilación de las MAPK similares a los vistos con H_2O_2 . Por lo tanto, la G6PD tiene un papel crítico en la muerte celular al modificar el potencial redox (Tian, 1999).

En tejido adiposo, la G6PD tiene una función importante al proveer NADPH, el cual es requerido durante la lipogénesis. En tejido adiposo de diferentes modelos de obesidad, la actividad de G6PD aumenta significativamente.

En la obesidad, los adipocitos presentan un aumento en la actividad de la G6PD, así como en la relación de $NADPH/NADP^+$ estimulando los genes marcadores de adipocitos, el aumento de ácidos grasos libres, de TAG y la liberación de ácidos grasos en el medio (Park, 2005).

La sobre-actividad de G6PDH exacerba el estrés oxidativo y las señales inflamatorias, lo que permite el reclutamiento e infiltración de macrófagos en dicho tejido

(Park, 2007). El paciente con deficiencia de la enzima, presenta un decremento en la velocidad lipogénica y en las concentraciones de lipoproteínas, de aquí la importancia de la G6PD en la síntesis de ácidos grasos (Dessi, 1986), (Dessi, 1992).

El hecho de que la sobre-actividad de la G6PD en adipocitos se asocie con obesidad, resistencia a la insulina, estrés oxidativo inflamación, y la posibilidad de reducir su actividad la ubica como blanco para frenar la obesidad y los desordenes metabólicos asociados. Un estudio previo informó que la dehidroepiandrosterona, inhibidor de la G6PD, interfiere con la adipogénesis al reducir la relación $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ (Gordon, 1986).

1.6.1 Importancia de la Relación NAD^+/NADH en la Obesidad

La obesidad genera estrés oxidativo celular, el cual conduce a alteraciones del estado redox intracelular. En este contexto se ubica el incremento en las formas reducidas sobre las oxidadas de los nucleótidos de nicotinamida: $\text{NADH} + \text{H}^+/\text{NAD}^+$ y $\text{NADPH} + \text{H}^+/\text{NADP}^+$. Debido a que enzimas y factores transcripcionales relacionados con la patogénesis de los desórdenes metabólicos vinculados con la obesidad son dependientes de las concentraciones de $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$. A nivel enzimático se cuenta con la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y la NADPH oxidasa en vías pro oxidantes.

Además la relación $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ refleja el estado metabólico y redox de la célula, siendo utilizados por las enzimas de la glicólisis, vía de pentosas fosfato, fosforilación oxidativa, síntesis de ATP, síntesis de ácidos grasos, entre otros. Por lo que $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$ se han establecido como moléculas importantes involucradas en la señalización fisiológica y patofisiológica, así como en vías de muerte celular.

Las enzimas encargadas de la reducción de NADP^+ a $\text{NADPH} + \text{H}^+$ son la G6PD, 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), enzima málica (ME), isocitrato deshidrogenasa (IDH) y hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PD). De este grupo de enzimas la G6PD es la principal productora de $\text{NADPH} + \text{H}^+$, además de ser la enzima limitante de la vía de las pentosas fosfato.

La G6PD desempeña una función clave en el mantenimiento del potencial redox y la supervivencia celular mediante la producción de NADPH + H⁺ y pentosas fosfato (Tian, 1999). El efecto de la producción de NADPH + H⁺ sobre la célula es específico para las condiciones de cada tejido. Los efectos nocivos de la sobreexpresión de G6PD se encuentran relacionados con la producción de NADPH + H⁺.

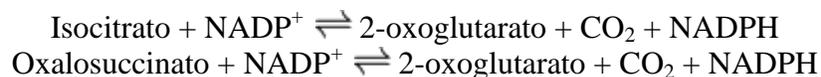
En ratones obesos la G6PD se expresa principalmente en tejido adiposo (Park, 2005). Entre el 50 y 70% del NADPH + H⁺ utilizado en la biosíntesis de ácidos grasos y colesterol es aportado por la G6PD, por lo que la sobreproducción de la coenzima puede ocasionar incremento en la lipogénesis, generando hiperlipidemia en la obesidad (Amir-Ahmady, 2001).

1.7 Isocitrato deshidrogenasa

La enzima Isocitrato deshidrogenasa (IDH) es una enzima importante del metabolismo de los carbohidratos participante en el ciclo de Krebs que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato en 2-oxoglutarato. La IDH es dependiente del NAD⁺ o NADP⁺. En los eucariotas existen al menos tres isozimas de la IDH.

1.7.1 IDH 1

La IDH1 cataliza las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalosuccinato utilizando exclusivamente NADP⁺ como aceptor de electrones. El oxalosuccinato es uno de los intermedios de reacción del isocitrato.



La proteína humana tiene una longitud de 414 aminoácidos y se presenta en homodímeros que necesitan por cada uno la unión de un catión magnesio o manganeso. Su localización celular es el citoplasma o el peroxisoma.

1.7.2 IDH 2

La IDH 2 es la variante mitocondrial de la IDH 1. Cataliza las reacciones de descarboxilación oxidativa del isocitrato y del oxalosuccinato utilizando también exclusivamente NADP^+ como aceptor de electrones. La proteína humana tiene una longitud de 452 aminoácidos y se presenta en homodímeros que necesitan por cada uno la unión de un catión magnesio o manganeso.

Participa en el metabolismo intermedio y en la producción de energía estando estrechamente asociada o interaccionando con el complejo piruvato deshidrogenasa.

1.7.3 IDH 3

La IDH 3 solamente cataliza la reacción de descarboxilación oxidativa del isocitrato utilizando exclusivamente NAD^+ como aceptor de electrones.



Su localización celular es la mitocondria y se presenta en heteroligómeros de las subunidades alfa, beta y gamma en un ratio 2:1:1. Cada heteroligómero necesita de la unión de un catión magnesio o manganeso. La IDH 3 se regula alostéricamente.

El cambio de energía libre para la reacción catalizada por la IDH es de $-8,4 \text{ kJ/gmol}$, por tanto se puede considerar una reacción irreversible con lo que debe ser regulada cuidadosamente para evitar un consumo excesivo de isocitrato y una acumulación de 2-oxoglutarato. La reacción es estimulada por el mecanismo simple de disponibilidad de sustrato (isocitrato, NAD (P)^+ , $\text{Mg}^{+2} / \text{Mn}^{+2}$), inhibida por producto (2-oxoglutarato y NAD (P) H) e inhibida por ATP por inhibición competitiva *feedback*.

1.8 Nicotinamida

La amida del ácido nicotínico es la nicotinamida o niacinamida; pertenece al grupo de vitaminas hidrosolubles del complejo B, siendo conocida como vitamina B3 (Kolb y Burkart, 1999). La figura 7 muestra la estructura de la nicotinamida (NAM) que consiste de un anillo de piridina con un grupo amida en la posición tres.

Las fuentes dietéticas de NAM más importantes son carnes, cereales, legumbres, semillas, leche, vegetales verdes y pescado, y la dosis diaria recomendada en adultos es de 20 mg (0.2 mmol), su deficiencia da lugar a la enfermedad pelagra, caracterizada por dermatitis, diarrea y demencia (Knip, 2000).

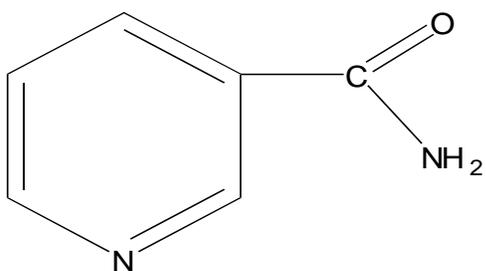


Figura 7. Estructura de la nicotinamida. Consiste de un grupo amida unido a la posición 3 de un anillo de piridina. (es.wikipedia.org)

La importancia biológica de la nicotinamida reside en ser precursora de los nucleótidos de nicotinamida: NAD (P)⁺ y NAD (P) H, además del triptófano y del ácido nicotínico.

La actividad biológica de la NAM es muy variada, incluyendo su acción antioxidante, inmunoreguladora, antiapoptótica y anticancerígena. Se ha utilizado a altas dosis farmacológicas sin presentar citotoxicidad, efectos teratogénicos u oncogénicos su efecto farmacológico depende de la concentración empleada. En distintos modelos de diabetes tipo 1, se ha comprobado que la NAM evita la destrucción de las células β , disminuye la producción de citocinas proinflamatorias y la actividad de la óxido nítrico sintasa inducible.

La acción protectora de la NAM se atribuye a la inhibición de poli-ADP-ribosil polimerasa (PARP) o de la formación del óxido nítrico, los cuales ocasionan muerte de la célula β . Como precursora de NAD⁺ indirectamente activa a la AMPK, vía sirtuínas, y en consecuencia inhibe proteínas involucradas en el metabolismo lipídico, como son la lipasa sensible a hormonas, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa. En cardiomiocitos la NAM incrementa la concentración de NAD⁺, ATP y enzimas antioxidantes, y al mismo tiempo disminuye la necrosis y las especies reactivas de oxígeno (ERO). En ratón con DM2 y una dieta alta en grasa, la nicotinamida mononucleótido (intermediario en la síntesis de NAD⁺ a partir de NAM), indujo el aumento de la poza de NAD⁺, mejorando la sensibilidad a insulina al disminuir la expresión de genes relacionados con estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y actividad de sirtuinas.

Sobre esta base evaluamos si la NAM al disminuir la actividad de G6PD modifica el balance redox y la acumulación de lípidos, donde la actividad se encuentra incrementada. Además evaluar el mecanismo de acción de NAM sobre G6PD.

La función del NAD (P)⁺ y del NAD (P) H en el metabolismo radica en ser las coenzimas requeridas para una gran variedad de enzimas que catalizan reacciones de oxidación-reducción. NAD⁺ y NADP⁺ son aceptores de electrones durante la eliminación enzimática de átomos de hidrógeno procedentes de sustratos específicos. Un átomo de hidrógeno del sustrato se transfiere en forma de ión hidruro a la región de la nicotinamida de las formas oxidadas de NAD⁺ y NADP⁺, resultando las coenzimas reducidas NADH y NADPH, respectivamente. Las coenzimas NAD⁺/NADH y NADP⁺/NADPH, son pares de los nucleótidos de nicotinamida y su proporción y efecto biológico es determinado por el estado redox de la célula.

Las enzimas dependientes del par NAD⁺/NADH actúan preferentemente en vías catabólicas; mientras las que actúan en rutas anabólicas utilizan el par NADP⁺/NADPH.

Dicho de otra manera, las enzimas que oxidan (deshidrogenasas) sustratos utilizan NAD⁺, mientras las que reducen (reductasas) emplean generalmente NADPH. Una excepción son la G6PDH y la 6 fosfo gluconato deshidrogenasa, enzimas de la vía de las

pentosas fosfato, que convierten el NADP^+ en NADPH y constituye la principal ruta de síntesis del nucleótido reducido.

La nicotinamida ha sido objeto de numerosos estudios, se mencionan varios de ellos, utilizando distintos modelos; aunque debido a la trascendencia, varios de ellos se comentan a continuación: en célula β -pancreática tanto en aisladas como en el paciente diabético, se evaluó el efecto en la sobrevivencia y función, encontrando que la NAM inhibe la apoptosis, permitiendo así la producción de insulina (Polo y Pontiroli, 1998). En diabetes experimental, se ha observado que previene el daño de la célula β pancreática (Hu, 1996) y lo más importante es que frena o detiene la insulinitis asociada con la enfermedad (Yamada y Tarui, 1982).

El ácido nicotínico ha sido empleado durante varios años para el tratamiento de pacientes con problemas en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, los cuales representan la principal causa de enfermedades cardiovasculares. Esto es por su propiedad para incrementar el contenido de colesterol HDL acompañada por un decremento en las lipoproteínas aterogénicas (VLDL, LDL) al igual que los AG y TAG.

El ácido nicotínico también incrementa los niveles de adiponectina, lo cual puede resultar como atero protección adicional. El mecanismo molecular de protección de la nicotinamida se atribuye a que es un potente inhibidor de la poli (ADP)- ribosa polimerasa (PARP), enzima asociada con la reparación del ADN, diferenciación celular y daño celular. Así mismo, modula al calcio y puede mejorar el estado de energía e inhibir la muerte celular en tejidos isquémicos. Considerando a la nicotinamida como inhibidor de PARP se han empleado dosis altas de la vitamina afectando reacciones de ADP-ribosilación en la célula β así como en la célula inmune y el endotelio. Como consecuencia, vías de muerte celular y patrón de expresión de genes son modificados para mejorar la sobrevivencia y el balance inmuno regulador alterado (Kolb y Burkart, 1999). Otro mecanismo propuesto es reducir el estrés oxidativo en páncreas al contribuir en incrementar la poza de NAD^+ (Kishore, 2008).

1.8.1 Nicotinamida y diabetes

En sujetos con diabetes tipo 1, la NAM se ha usado a dosis que van desde 200 mg/día hasta 3.5 g/día. La administración de NAM combinada con el tratamiento con insulina, reduce de manera significativa la hemoglobina glicosilada (Crino, 2005). En pacientes con falla renal disminuye la absorción de fosfato, previniendo el desarrollo de hiperfosfatemia y de la disfunción renal (Eto, 2005). Aunque en humanos no se ha encontrado disminución en la concentración de glucosa sanguínea por efecto de la NAM, ésta sí puede mantener la función residual de las células β (Pozzilli, 1996).

En modelos animales con diabetes inducida la administración de NAM disminuyen la hiperglucemia (Hu, 1996). Esto debido a que tanto la NAM inhiben a PARP, al contrario del ácido nicotínico, evitando así la destrucción de la célula β , siendo el único precursor de NAD⁺. La célula β activa a la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), enzima encargada de la reparación del DNA y que utiliza NAD⁺ como sustrato, lo que lleva a agotar el NAD⁺ de la célula, disminuyendo el ATP y finalmente a la muerte celular.

1.8.2 Mecanismo de acción de la nicotinamida

Hasta el momento no existe información sobre el uso de nicotinamida para disminuir la actividad de la G6PD, por tal motivo no se ha elucidado un mecanismo posible de acción. Es sabido que la 6-aminonicotinamida, análoga de la NAM, mediante la NAD-glicohidrolasa forma el complejo 6-amino-NADP⁺, impidiendo que la G6PD utilice a la coenzima, sin embargo la NAM no lleva a cabo así su inhibición. Por otra parte se conoce que la fosforilación en residuos serina inhibe a la G6PD, esta fosforilación puede ser llevada a cabo por la proteína cinasa A (PKA). Además la NAM activa a la proteína cinasa B (PKB) y posiblemente a la cinasa dependiente de AMP (AMPK) (Xu, 2005), (Chong, 2004), (Hoane, 2008).

Para que la NAM ejerza algún efecto en la célula, primero ingresa a través de los mismo receptores del ácido nicotínico, una vez que la NAM ingresa, puede ser

transformada a NAD^+ o en sus metabolitos de desecho, siendo NAD^+ capaz de aumentar la actividad de AMPK mediante la activación de SIRT3 (Pillai, 2009).

Cualquier estrés metabólico que inhiba la producción de ATP o que acelere su consumo ocasionará un incremento de AMP/ATP, tal como el ejercicio o el ayuno. AMPK actúa como sensor de energía celular, debido a que es activada ante el aumento del AMP (Towler y Hardie, 2008). Su activación inhibe vías que consumen energía (lipogénesis) y estimula aquellas que son productoras de energía (glicólisis, β -oxidación).

2. ANTECEDENTES

Según un estudio realizado por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Colorado, el exceso en el consumo de bebidas altas en glucosa aumenta el riesgo de hipertensión, aumento de la presión arterial que puede provocar todo tipo de problemas de salud aumentando el riesgo de infarto, cardiopatías, derrame cerebral, síndrome metabólico, obesidad, etc.

La obesidad representa un problema prioritario de salud pública que requiere atención inmediata, con la finalidad de minimizar las complicaciones tardías de la enfermedad así como los gastos que esta genera.

La protección de la Nicotinamida restaura la deficiencia de insulina. Paralelo a esto, también disminuir el estrés oxidativo involucrado con el daño a tejidos. A la fecha se cuenta con estudios que demuestran que el suplemento de Nicotinamida es útil por tener varios efectos benéficos en lo experimental y en el humano. La nicotinamida se ha asociado con la prevención de DM tipo2 y que tiene una función antioxidante.

Además de las evidencias mencionadas acerca de los efectos de la Nicotinamida es probable que su administración, además de provocar la actividad de la G6PD y esto contribuya de manera importante a su acción benéfica. La G6PD inducirá a la producción de NADPH esencial para la actividad de enzimas antioxidantes y a su vez frenaría la producción de especies oxidantes.

La acción benéfica de la Nicotinamida se atribuye al incremento del GSH y de NADPH + H⁺. La Nicotinamida conduce también a un aumento en la actividad de la G6PDH y esto contribuye de manera importante, a su acción benéfica en los organismos; ya que a la G6PDH favorecería la reducción de NADP⁺ y esto a su vez a la regeneración de GSH a través de la GR.

De lo antes mencionado se puede proponer que la G6PD es parte de un mecanismo de respuesta celular al estrés oxidativo. Además, esto sustenta la hipótesis de que la enzima es la que controla la potencia reductora intracelular ($\text{NADPH} + \text{H}^+$) al elevar el contenido intracelular de GSH y propiciar un ambiente reductor trayendo consigo la protección celular contra el daño oxidativo.

Además se ha demostrado que la acción protectora de la G6PD contra el estrés oxidativo involucra la generación de di nucleótidos de piridina reducidos, NADPH y NADH a partir de NAD^+ . La generación de esos equivalentes reducidos depende de un suministro adecuado de NAD^+ . Los niveles de NAD^+ intracelular pueden ser efectivamente incrementados por la adición de precursores de NAD^+ , ácido nicotínico y nicotinamida. Estudios anteriores sugieren que una terapia antioxidante, como la nicotinamida que se propone con este trabajo, adjunto a una medida terapéutica para la diabetes puede ser considerada como prevención y ayuda a las complicaciones en la obesidad.

El NAD^+ y el NADP^+ , tienen una función vital en el metabolismo como coenzimas para una amplia variedad de proteínas que catalizan reacciones de oxido-reducción, estas coenzimas, unidas a deshidrogenasas apropiadas, funcionan como oxidantes al aceptar electrones e hidrógeno provenientes de sustratos y, así, quedar reducidas. Los nucleótidos piridina reducidos (NADH y NADPH), a su vez, se re oxidan mediante las flavo proteínas.

El nivel de NAD^+ , que también es precursor de NADPH, en los tejidos es principalmente regulado por la concentración extracelular de nicotinamida.

La forma acida de la Nicotinamida ha sido empleada durante varios años para el tratamiento de pacientes con problemas en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas, que representan una de las principales causas de enfermedades cardiovasculares. Esto es por sus propiedades para incrementar el contenido de colesterol HDL acompañada por un decremento en las lipoproteínas aterogénicas VLDL, LDL al igual que los ácidos grasos y triacilgliceridos.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El exceso del consumo de alimentos y bebidas con alto contenido de glucosa favorecen el aumento del tamaño y proliferación del tejido adiposo, debido a una alteración de la relación $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ ocasionando acumulación de lípidos y estrés oxidativo. Las fuentes principales en aportar NADPH son G6PD y la isocitrato deshidrogenasa (IDH), ambas inducidas por carbohidratos. En este contexto, la NAM por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, inmunoreguladoras, citoprotectoras, regulador del flujo de Ca^{+2} e inhibidor del proceso de apoptosis pudiera ser un agente potencialmente atractivo para procesos metabólicos como lo puede ser la obesidad y el síndrome metabólico. Con estos argumentos decidimos determinar si la administración de NAM al reducir las actividades de G6PD y de IDH disminuye las alteraciones metabólicas y estrés oxidativo.

4. JUSTIFICACIÓN

Los malos hábitos de alimentación, el exceso en el consumo de bebidas con alto contenido de glucosa y la vida sedentaria que caracteriza al estilo de vida actual son los principales responsables de la alta incidencia de obesidad, resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes que afectan a la población mexicana.

Aunque la obesidad es una condición clínica individual se ha convertido en un serio problema de salud pública que va en aumento. La obesidad tiene gran relevancia en México por lo que es de gran importancia para el sector salud por todo lo que conlleva, debido a que es un factor para iniciar y exacerbar diversas enfermedades.

La obesidad forma parte del síndrome metabólico siendo un factor de riesgo conocido, es decir predispone, para varias enfermedades, particularmente cardiovasculares, diabetes mellitus, apnea del sueño, ictus, osteoartritis, así como a algunas formas de cáncer, padecimientos dermatológicos y gastrointestinales.

La observación, aprendizaje y conocimiento de los mecanismos bioquímicos asociados a la obesidad nos dará las bases para prevenir y evitar los factores asociados a este desorden metabólico. El aumento del estrés oxidativo está asociado a esta patología además de un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno con los sistemas antioxidantes los cuales son regulados por la relación intracelular de $[NADPH]/[NADP^+]$.

Una de las funciones que realiza el NADPH es la de funcionar como cofactor para la reducción de GSSG a GSH, ya que el GSH es uno de las vías antioxidantes más importantes para la célula. No obstante de estas evidencias se desconoce en qué medida el incremento alterado de NADPH en la vía de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa repercute sobre el ciclo de redox y la homeostasis del glutatión en el adipocito. Lo anterior acrecentaría el ambiente reductor, tanto por la relación $[NADPH]/[NADP^+]$ como en la relación $[GSH]/[GSSG]$.

5. HIPÓTESIS

Al suministrar nicotinamida decrece la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa inducida por alta glucosa, disminuyendo la acumulación de lípidos y estrés oxidativo en el tejido adiposo además de reducir la producción de NADPH originando cambios en la relación [GSH]/ [GSSG].

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Evaluar los efectos producidos por el alto consumo de bebidas glucosadas en la actividad de la Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa y marcadores de estrés en el tejido adiposo suplementados con nicotinamida.

6.2 Objetivos Particulares

Observar los efectos de la administración de nicotinamida en sangre y tejido adiposo, posteriores al suministro de glucosa.

Evaluar las modificaciones presentadas en el perfil bioquímico (glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL, LDL, TGO, TGP y AGL), ante el empleo de glucosa y nicotinamida.

Analizar los cambios metabólicos (grado de lipoperoxidación, Concentraciones y relación GSH - GSSG), en tejido adiposo provocados con la ingesta de glucosa.

Examinar las variaciones inducidas en la actividad de G6PD e IDH, tras la administración de la glucosa y nicotinamida.

Determinar si la utilización de nicotinamida puede ser empleada como alternativa terapéutica para revertir el daño ocasionado por la glucosa en dichos tejidos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Los compuestos químicos empleados fueron obtenidos de la compañía Sigma (St. Louis, MO, USA). El kit para la determinación de ácidos grasos libres fue obtenido de la compañía BioVision (Milpitas, USA).

7.1 Aspectos éticos de los animales

Los animales fueron mantenidos de acuerdo con las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2014). Los animales fueron proporcionados por el Bioterio del Centro Médico Nacional S. XXI, y mantenidos en cuartos con ventilación adecuada que permitan el recambio de aire, en condiciones controladas de temperatura (22.5 °C), humedad (50%) y periodos de luz/oscuridad luz (12/12 hrs). Los animales estuvieron en jaulas de acrílico con bordes redondeados y tapa de acero inoxidable, teniendo cuidado de que siempre estuvieran limpias y secas. Para sus camas se utilizo viruta previamente esterilizada. Tuvieron libre acceso a agua potable y alimento balanceado especial para roedores (Formulab Chow 5008, Purina).

7.2 Diseño experimental

Veinte ratas macho Sprague Dawley con un peso de 250 ± 5 g bajo condiciones de temperatura controlada con un fotoperiodo de luz/oscuridad de 12 hrs, agua y alimento (Purina ratchow) *ad libitum* fueron distribuidas al azar en 4 grupos de la siguiente manera: 1. control; 2. glucosa; 3. glucosa-NAM 5 mM; 4. glucosa-NAM 10 mm. El carbohidrato fue administrado al 30% en el agua de beber por 90 días; 30 días iniciado el tratamiento todas las mañanas (9 am) se retiró los bebedero por 5 h para administrar la nicotinamida (NAM)10 mM en el agua de beber finalizado este tiempo se reinició el tratamiento con los carbohidratos, ambos tratamientos *ad libitum*. Aquellos animales con marcadores de daño renal alterados (TGO y TGP), así como valores altos de triglicéridos, colesterol total y

concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) fueron seleccionados para el estudio.

7.3 Obtención de muestras sanguíneas y tejidos

Finalizados los tratamientos, los animales fueron pesados y sacrificados bajo anestesia (Ketamina 25 mg/kg), para la obtención de sangre total. Posteriormente, se perfundieron con solución salina al 0.9 % a través de la aorta abdominal para eliminar restos de sangre. Se extrajeron fragmentos de adipocitos de epidídimo para determinar la actividad de la G6PD y marcadores de estrés (TBARS, GSH y GSSG).

7.4 Perfil bioquímico y función hepática

El perfil bioquímico fue determinado por métodos de laboratorio clínico de rutina, entre ellos glucosa, TG, CT, lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL). Además de las actividades de TGO y TGP utilizando el equipo ILab 350 equipos (Instrumentación Laboratory SpA, Barcelona, España).

7.5 Actividad específica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

Homogeneizados de adipocitos de epidídimo al 10 % (p/v) en PBS 0.1M, pH 7.5 fueron centrifugados a 15 000 g a 4 °C durante 30 min en una centrífuga BECKMAN Avanti™. La actividad se determinó en los sobrenadantes mediante la producción de NADPH (Rudack et al., 1971) en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda 25) a una longitud de onda de 340 nm. La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976) en el sobrenadante del homogenizado de tejido adiposo. La actividad específica se expresa como unidad de enzima por mg de proteína.

7.6 Actividad específica de la isocitrato deshidrogenasa

Se prepararon homogenizados de tejido adiposo al 10% (p/v) en un amortiguador de PBS 0.1M, pH 7.5. Posteriormente fue centrifugado a 15 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. En los sobrenadantes se analizará la actividad de IDH por la producción de NADPH en un espectrofotómetro Perkin Elmer (Lambda 25) a una longitud de onda de 340 nm cada minuto durante 10 minutos. La determinación de proteínas se realizó en el sobrenadante del homogenizado del tejido adiposo por el método de Bradford (1976) se determinó mediante el cambio que produce en la absorbancia dado por la producción de NADPH + H⁺.

7.7 Determinación de lipoperoxidación

El fundamento del método se basa en la reacción producida entre el TBA y el producto de lipoperoxidación, malondialdehído, lo que origina TBARS los cuales son medibles mediante espectrofotometría a 595 nm. La cuantificación de MDA se basa en la reacción producida entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el producto de lipoperoxidación, malondialdehído, lo que origina especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) los cuales son medibles mediante un espectrofotómetro de luz visible a 535 nm. La determinación de MDA se realizó en una alícuota del lisado celular, la cual fue incubada con ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.11 M y ácido acético 0.2 M a 95°C durante 60 min, finalmente se adicionó butanol y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. Finalmente se toma una alícuota del sobrenadante y se lee a una longitud de onda de 535 nm.

7.8 Determinación de GSH y GSSG

La cuantificación de GSH se basa en la reacción producida entre el reactivo de Ellman (DTNB) y los grupos sulfihriilo (-SH) presentes en el GSH, el cual origina un color amarillo claro en las muestras, que es medible mediante un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 412 nm. Para la determinación de GSH se realiza un tratamiento

previo en una alícuota de 100 μL de homogeneizado total, al cual se le añade 200 μL de ácido metafosfórico al 5% se mezcla vigorosamente y se centrifuga a 15 000 rpm a 4 °C durante 20 minutos. Una alícuota (200 μL) del sobrenadante se agrega 700 μL de amortiguador de KH_3PO_4 , 50 μL de DTNB preparado fresco e hidratado con metanol y finalmente 2 mL de amortiguador de KH_3PO_4 .

La reacción se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, las absorbancias se registran en un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 410 nm. En el caso de GSSG se prepararán homogeneizados de tejido adiposo al 10 % (p/v) en un amortiguador de PBS 0.1 M, pH 7.5. Alícuotas de los sobrenadantes serán tratados con 1-metil-2-trifluorometanosulfonato vinylpiridinium1 (M_2VP) 10 mM y almacenados a -70°C hasta su uso. La determinación se realizará mediante un método enzimático (Tietze, 1969). El cual emplea M_2VP , reactivo que secuestra grupos tioles sin interferir con la enzima glutatión reductasa (GR) presente en el ensayo. GSSG es determinado por la reducción a GSH, que a su vez es cuantificado con el reactivo de Ellman (5-5'-ditiobis (2-nitro ácido benzoico), DTNB).

La reducción es catalizada por la GR en presencia de NADPH a 412 nm. El ensayo utiliza el cambio en el desarrollo de color durante la reacción, la velocidad de reacción es proporcional a las concentraciones de GSH y GSSG.

7.9 Determinación de ácidos grasos

Las concentraciones de ácidos grasos libres fueron medidas en suero utilizando el *kit* para la cuantificación de ácidos grasos libres (BioVision, Milpitas, USA) respectivamente, de acuerdo al protocolo de los fabricantes. Se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas de 96 pocillos de la marca Multiscan Labsystems EX (Helsinki, Finlandia).

7.10 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media $\pm \sigma$. La evaluación estadística se realizó a través del análisis de varianza (ANOVA). Los parámetros que con esta prueba resultaran ser significativamente diferentes se les aplicarán la prueba de Tukey-Kramer. Además se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn. Una $P < 0.05$ fue considerada significativa.

8. RESULTADOS

8.1 Perfil bioquímico en suero de rata

El consumo de glucosa 30 % en el agua de beber por 90 días incrementó significativamente el peso corporal (60 %), concentración de glucosa (104%), triglicéridos (317%), AGL (139 %) y MDA (353%). Además de incrementarlas actividades de TGO y TGP (11.44 y 51.69 %, respectivamente) disminuyó HDL (28%). Todos estos parámetros comparados con el control. Estas alteraciones metabólicas fueron revertidas con el tratamiento de nicotinamida a concentraciones 5 y 10 mM. Los decrementos significativos fueron observados en peso corporal (6.85 - 3.10%, respectivamente); concentraciones de glucosa (18.51-21.86%, respectivamente), Triglicéridos (8.50 - 24.68%, respectivamente) y AGL (67.77– 79.01 %, respectivamente). Además de las actividades de TGO (47.61 – 23.32%, respectivamente) y TGP (11.90 y 13.75%, respectivamente), y en las concentraciones de MDA (67.7 - 64.7%, respectivamente) todos comparados con el grupo glucosa.

Tabla 6. Perfil Bioquímico.

	<i>Control</i>	<i>Glucosa</i>	<i>Glucosa + NAM 5 mM</i>	<i>Glucosa + NAM 10 mM</i>
<i>Ganancia de peso (g).</i>	172.33	277 ^a	258 ^b	268.4 ^c
<i>Glucosa (mg / dL).</i>	112.5 ± 9.19	229.5 ± 2.12 ^a	187 ± 43.30 ^b	179.33 ± 20.79 ^c
<i>Triglicéridos (mg/ dL).</i>	38.5 ± 0.70	160.66 ± 18.77 ^a	147 ± 45.21 ^b	121 ± 29.81 ^c
<i>Colesterol (mg/ dL).</i>	64 ± 4.58	72.5 ± 12.87	73 ± 6.92	54.75 ± 0.95
<i>HDL (mg/ dL).</i>	39.66 ± 2.08	28.5 ± 2.51 ^a	37.33 ± 1.52 ^b	24.4 ± 1.94 ^c
<i>LDL (mg/ dL).</i>	24.33 ± 3.51	23.66 ± 4.50	17 ± 2	17 ± 1
<i>TGO (U/ L).</i>	116.06 ± 11.86	129.34 ± 12.30 ^a	67.75 ± 2.16 ^b	99.17 ± 12.98 ^c
<i>TGP (U/ L).</i>	33.6 ± 4.47	50.97 ± 4.93 ^a	44.9 ± 3.01 ^b	43.97 ± 7.01 ^c
<i>AGL (nmol).</i>	11.58 ± 6.92	27.68 ± 1.48 ^a	8.92 ± 6.36 ^b	5.81 ± 0.28 ^c
<i>TBARS (nM).</i>	7.78 ± 0.92	35.28 ± 0.70 ^a	11.37 ± 0.5 ^b	12.42 ± 3.14 ^c

Representa la media y desviación estándar. Lote de 5 animales por grupo.

a: comparado con el grupo control; **b:** comparado con el grupo de glucosa; **c:** comparado con el grupo de glucosa. Estas determinaciones fueron medidas en suero.

8.2 Grado de lipoperoxidación en tejido adiposo de rata

La concentración de malondialdehído, marcador de lipoperoxidación, en tejido adiposo mostro un incremento del 80 % con respecto al grupo control. Un efecto opuesto y significativo se presentó al suministrar nicotinamida a las concentraciones 5 y 10 mM (decrementos del 17.85 y 33.92 %, respectivamente) en comparación con el grupo de glucosa (Figura 8).

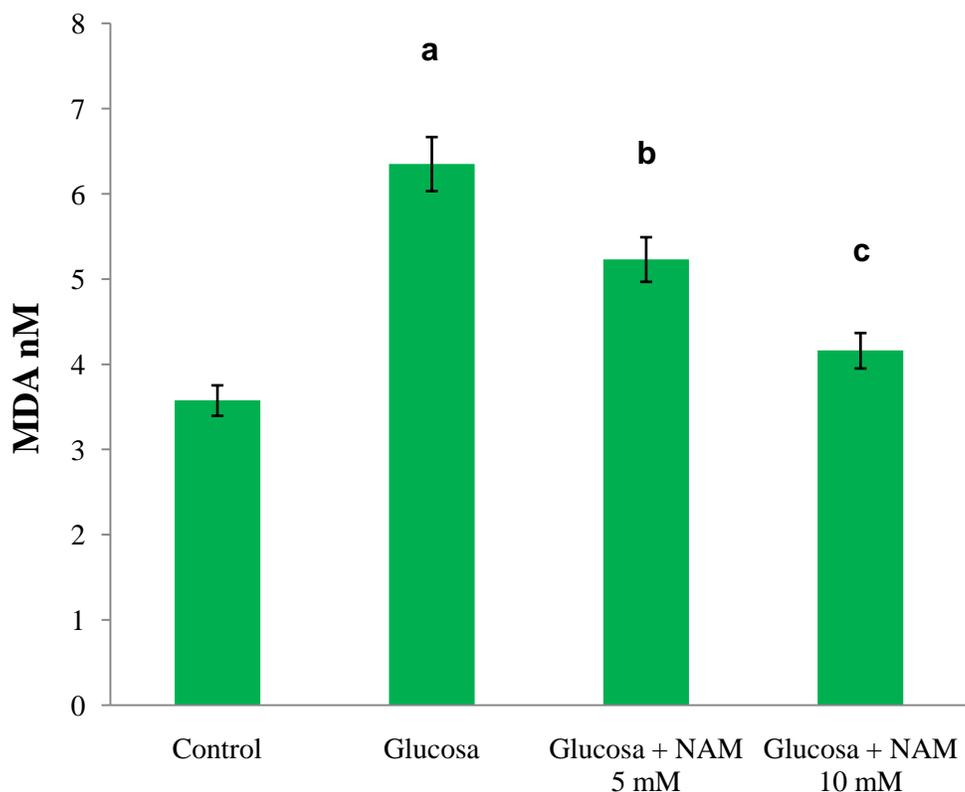


Figura 8. Concentración de malondialdehído en tejido adiposo.

Las barras representan la media y desviación estándar de 5 animales por grupo. **a:** $P < 0.05$ comparado con el grupo control; **b:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa; **c:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa. Las concentraciones se expresan en mM.

8.3 Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en tejido adiposo de rata

La administración de glucosa al 30 % en el agua de beber durante 90 días incrementó marcadamente la actividad de G6PD en tejido adiposo de rata (103 %) con respecto al grupo control. Este incremento fue revertido por la administración de nicotinamida tanto a la concentración de 5 como 10 mM (22.64 y 41.50 %, respectivamente) (Figura 9).

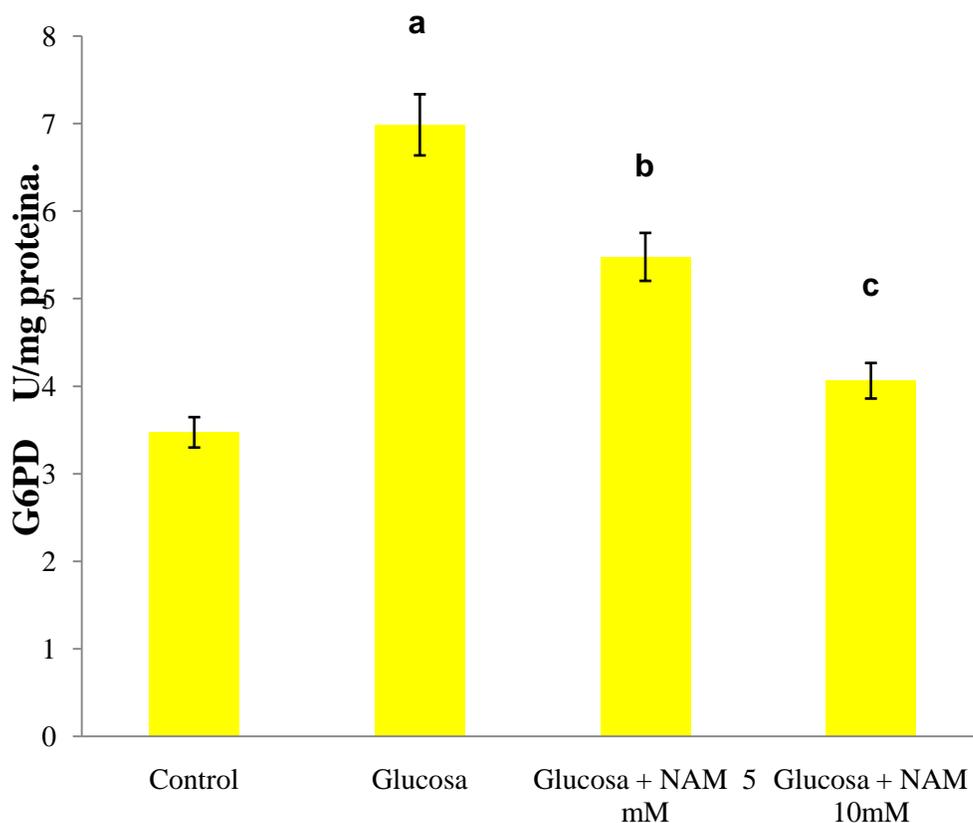


Figura 9. Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en tejido adiposo. Las barras representan la media y desviación estándar de 5 animales por grupo. **a:** $P < 0.05$ comparado con el grupo control; **b:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa; **c:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa. La actividad de G6PD se expresa en unidades por mg de proteínas.

8.4 Actividad de la isocitrato deshidrogenasa en tejido adiposo de rata

Un comportamiento similar a la G6PD mostró la IDH en el tejido adiposo. La administración de glucosa al 30% incrementó significativamente la actividad de la IDH (118%) con respecto al grupo control. Una respuesta inversa se observó con el suplemento de nicotinamida a las dosis empleadas 5 y 10 mM (23 y 38.98 %, respectivamente con respecto al grupo de glucosa (Figura. 10).

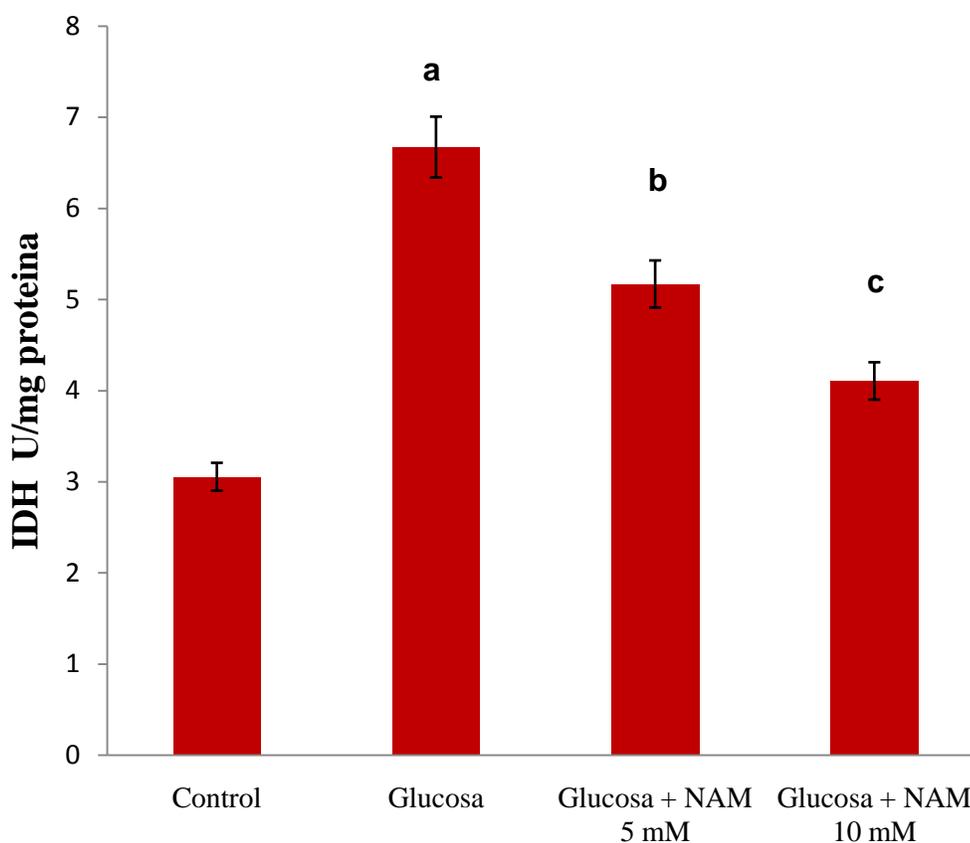


Figura 10. Actividad de la isocitrato deshidrogenasa en tejido adiposo.

Las barras representan la media y desviación estándar de 5 animales por grupo. **a:** $P < 0.05$ comparado con el grupo control; **b:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa; **c:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa. Las concentraciones se expresan en unidades por mg de proteínas

8.5 Concentración de glutatión reducido en tejido adiposo de rata

Un decremento significativo en la concentración de GSH (54 %) se presentó en tejido adiposo con respecto al control. Esta caída en la concentración de GSH fue simultánea con los incrementos observados en las actividades de G6PD y de la IDH inducido por la administración de glucosa al 30%. El suplemento de nicotinamida incrementó las concentraciones de GSH a las dosis empleadas 5 y 10 mM (36 y 80 %, respectivamente) cuando se comparó con el grupo de glucosa. Estos aumentos se presentaron cuando las actividades de G6PD y la IDH disminuyeron (Figura 11).

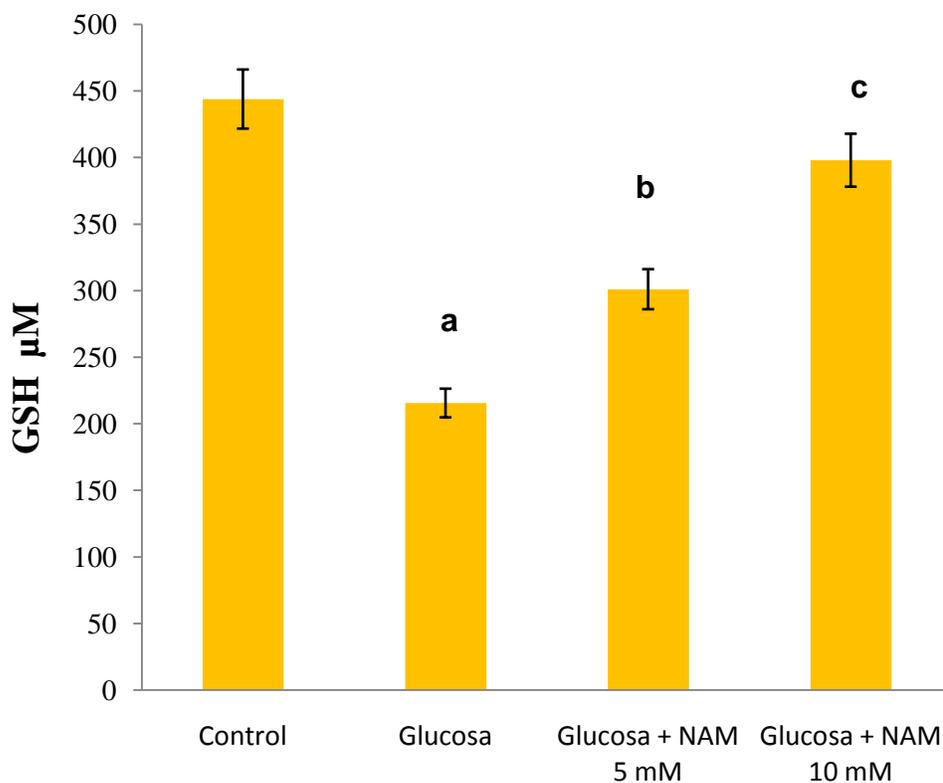


Figura 11. Concentración de GSH en tejido adiposo.

Las barras representan la media y desviación estándar de 5 animales por grupo. a: $P < 0.05$ comparado con el grupo control; b: $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa; c: $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa. Las concentraciones se expresan en μM .

8.6 Concentración de glutatión oxidado en tejido adiposo de rata

Un efecto opuesto en la concentración de GSSG se observó con respecto al GSH. Mientras GSH disminuyó la concentración de GSSG incrementó significativamente (180 %) en el grupo de glucosa con respecto al grupo control. Este incremento fue abatido con el suplemento de nicotinamida a las dosis empleadas 5 y 10 mM (28.57 y 51.78 %, respectivamente) cuando se compara con el grupo de glucosa. El decremento de GSSG fue simultáneo con los incrementos de GSH (Figura 12).

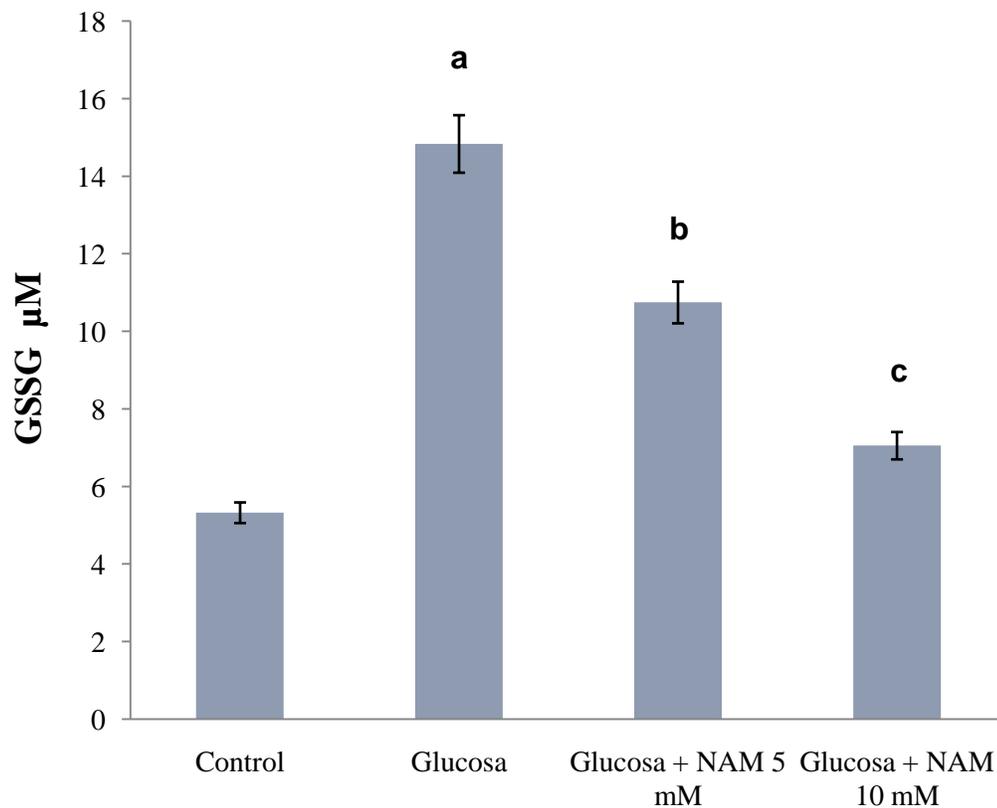


Figura 12. Concentración de GSSG en tejido adiposo.

Las barras representan la media y desviación estándar de 5 animales por grupo. **a:** $P < 0.05$ comparado con el grupo control; **b:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa; **c:** $P < 0.05$ comparado con el grupo de glucosa). La concentración de GSSG se expresa en μM .

8.7 Relación GSH/GSSG en tejido adiposo de rata

La relación GSH/GSSG en el tejido adiposo mostró un decremento del 84 % con respecto al grupo control; lo cual fue consistente con el decremento de GSH y el aumento de GSSG. Paralelo a esto el suplemento de nicotinamida incrementó las relaciones GSH/GSSG a las dosis 5 y 10 mM (211 y 411 %, respectivamente) comparado con el grupo glucosa. Los incrementos inducidos por nicotinamida fueron reflejo del aumento de GSH junto con el decremento de GSSG (Figura.13).

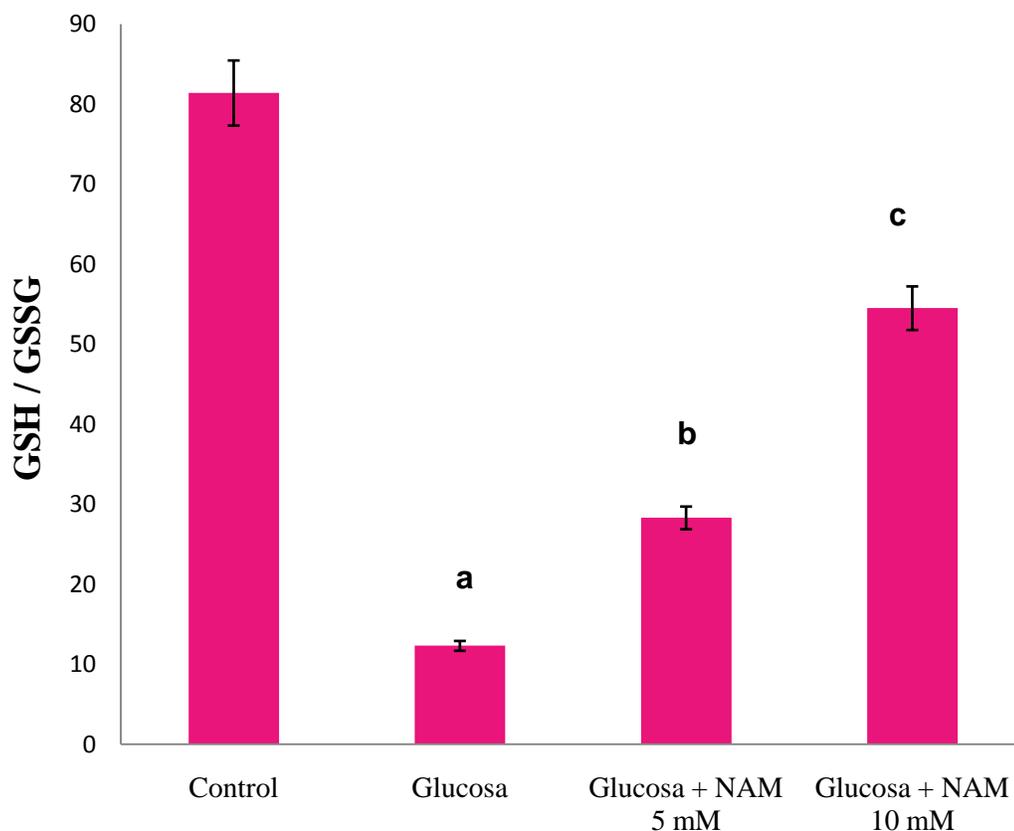


Figura 13. Relación de GSH/GSSG en tejido adiposo.

Las barras representan la media y desviación estándar de 5 animales por grupo. **a:** P < 0.05 comparado con el grupo control. **b:** P < 0.05 comparado con el grupo de glucosa. **c:** P < 0.05 comparado con el grupo de glucosa.

9. DISCUSIÓN

Con la finalidad de evaluar las propiedades anti-lipogénicas y anti-oxidantes de la vitamina hidrosoluble B3 o nicotinamida; el presente estudio desarrolló un modelo de obesidad en ratas macho inducida con glucosa al 30 % en el agua de beber. Las evidencias significativas que arrojó el estudio fueron que el consumo crónico de glucosa provoca un desequilibrio metabólico y celular reflejado en ganancia significativa de peso corporal, aumento en la concentración de glucosa, triacilgliceroles, AGL; alteración de la función hepática (TGO y TGP), marcadores de estrés (GSSG y MDA), así como en la actividad de G6PD. Además de un decremento en HDL y de GSH. Todas estas alteraciones fueron abatidas con la administración de NAM a las diferentes dosis empleadas.

Las investigaciones orientadas en explicar el efecto de los AGL sobre el fenómeno de resistencia a la insulina han demostrado que la disponibilidad de AGL circulantes interfiere con la señal de la insulina y la captación de glucosa por el músculo; debido a la formación de metabolitos tipo, acil-graso CoA o di-acil-glicerol. El incremento de estos intermediarios pueden estimular la fosforilación de la serina del sustrato del receptor a la insulina (IRS-1) y posiblemente del IRS-2, vía activación de la proteína cinasa C (Yu C, 2002), (Itani, 2002). Alternativo a esto la fosforilación del inhibidor de $k\beta$ cinasa (IKK β) conduce a su degradación y a la translocación del factor nuclear $k\beta$ (NF- $k\beta$) al núcleo, siendo importante en el desarrollo de resistencia a la insulina estimulada por ácidos grasos. Con esta apreciación, la ganancia de peso y el incremento de AGL circulantes en el grupo con glucosa evidencian el desarrollo de resistencia a la insulina. Lo cual justifica el incremento de glucosa sanguínea en el grupo con glucosa; similar a estos resultados fueron observado en ratas alimentadas con una dieta alta en fructosa (Alini Schultz, 2013).

El aumento intracelular de ácidos grasos en los hepatocitos vía lipólisis / lipogénesis induce la actividad del citocromo P450 y enzimas pro-oxidantes (NADPH oxidasa y óxido nítrico sintasa) generando 4-hidroxi-nonanal y malonaldehido (MDA), ambos productos de la peroxidación de lípidos y altamente tóxicos. Lo que altera el citoesqueleto del hepatocito perdiendo su forma cuboidal, adquiriendo forma balonoide. Por otra parte, también la

presencia de agregados intracelulares amorfos que constituyen los cuerpos hialinos o de Mallory contribuye a la deformación hepática. Estas alteraciones lo hacen permeable, y permite la salida de biomoléculas explicando el porqué de los incrementos observados de TGO, TGP y MDA séricos en el grupo con glucosa. Además, la producción y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) esta incrementada generando hipertrigliceridemia, concentraciones bajas de HDL e incremento de LDL. La fuente que abastece crónicamente las concentraciones de ácidos grasos es el tejido adiposo, el cual contribuye al contenido de triacilgliceroles hepáticos (Donnelly KL, 2005).

Cuando excede el consumo de carbohidratos en relación al requerimiento calórico y la capacidad para almacenarlo en forma de glucógeno, el exceso es utilizado como sustrato para la síntesis de ácidos grasos e incorporados en triacilgliceroles y almacenados posteriormente en el tejido adiposo (Hudgins L, 1996). Si bien el tejido hepático es el sitio principal de síntesis de ácidos grasos *de novo* a partir de carbohidratos; la vía lipogénica también está presente en tejido adiposo. En este contexto, el grupo que consumió glucosa al 30% de manera crónica incrementó marcadamente las actividades de G6PD y de la IDH, resultados consistentes con lo previamente demostrado (Salati y Amir-Ahmady, 2001), (Lin, 2005), (Park, 2005) Si bien las dos enzimas suministran NADPH, la de mayor aporte es la G6PD (Dessi, 1992), (Muntoni, 1992), (Koh, 2004). Esta respuesta se observa sólo en tejidos lipogénicos, como es hígado (Gupte, 2009) y tejido adiposo, a causa del exceso de glucosa. Opuesto a esto, en células epiteliales la alta glucosa decrece la actividad de la G6PD asociada con muerte celular (Zhang, 2012). En cardiomiocitos el decremento de G6PD incrementa el estrés oxidativo promoviendo la falla cardiaca.

El mecanismo que medía los incrementos de G6PD y de IDH en respuesta a la ingesta crónica de glucosa es a través de aumentar la secreción de insulina, que a su vez promueve la activación transcripcional de factores lipogénicos como el Receptor X-hepático (LXR) y la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides (SREBP-1c) (Fauveau, 2004). Evidencias tempranas demostraron que LXR aumenta los mRNA que codifican para SREBP-1c y para la proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos (ChREBP) (Robinson, 2006). Alternativo a esto, el aumento del flujo de glucosa en el hepatocito hepática

generaxilulosa-5-fosfato, vía pentosas fosfato; que a su vez activa enzimas tipo fosfatasa activando al ChREBP al ser desfosforilado (Tsatsos NG, 2006). Juntos SREBP-1c, LXR y ChREBP inducen la transcripción de genes lipogénicos y glucolíticos. El gen de G6PD tiene sitios de respuesta para hormonas y nutrientes, así como para SREBP y ChREBP forma parte del grupo de genes lipogénicos.

El incremento de G6PD coincidió con los decrementos de GSH y de la relación GSH/GSSG. El sistema del glutatión es el principal mecanismo intracelular antioxidante, que depende de la concentración de GSH, de la relación GSH/GSSG y del potencial redox del GSH. Todos ellos regulados por la síntesis *de novo* del glutatión y del ciclo redox del glutatión en el que participan la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). La función del ciclo redox del glutatión es eliminar hidroperóxidos y finales de la peroxidación de lípidos, conocidos como lipoperóxidos, además de regenerar el GSH. En este ciclo, la acción coordinada de la GPx y la glutatión reductasa GR conduce primero a una reducción de hidroperóxidos a expensas de la oxidación de GSH para formar GSSG, posteriormente GSSG es transformado a GSH mediante la reacción catalizada por GR, ambas enzimas requieren de NADPH. Lo anterior indica que el aporte de NADPH producido por la G6PD fue consumido preferentemente para la síntesis de ácidos grasos; y la caída del pool de GSH en tejido adiposo obedece a una mayor utilización de GSH para contrarrestar el aumento de especies reactivas de oxígeno, y la falla en la eficiencia de la vía redox del glutatión para mantener su forma reducida a falta de NADPH.

Los tratamientos con nicotinamida a las diferentes dosis abatieron las alteraciones metabólicas y celulares generadas por la glucosa al 30% administrada de forma crónica. La nicotinamida al decrecer la actividad de la G6PD también disminuyó la producción de NADPH, coenzima necesaria para la NADPH oxidasa y la óxido nítrico sintasa, así como para la lipogénesis *de novo*. A finales de los 1980 se demostró el efecto inhibitorio de la nicotinamida sobre la G6PD de manera dosis dependiente en preadipocitos y adipocitos (Pyzhik, 1989), consistente con nuestras observaciones. Finalmente, la administración de nicotinamida decreció la dislipidemia y la resistencia a la insulina, a través de modular la actividad de G6PD.

10. CONCLUSIONES

El elevado consumo de glucosa 30 mM generó cambios en el organismo lo cual modificó el perfil bioquímico, marcadores de estrés y la relación entre [GSH]/ [GSSG]. Además de incrementar las actividades de G6PD y de IDH.

Todas estas alteraciones fueron corregidas significativamente por la administración de nicotinamida la cual reguló la actividad de G6PD modificó la acumulación de lípidos y el estrés oxidativo como también la regulación de la relación total de glutatión [GSH]/ [GSSG].

Los resultados de este trabajo nos hacen pensar en la nicotinamida como una alternativa terapéutica a mediano plazo, ya que previene notablemente los efectos causados por la ingesta de glucosa en animales de experimentación y hasta hoy no ha demostrado ser toxica.

11. ANEXO

11.1. Equipos

- **Balanza Harvard Trip 2 Kg – 5 lb.**
Ohaus
No.19805.
- **Bloque multi -temperatura.**
Voltaje: 115 V, Frecuencia: 50 – 60 Hz.
Lab - Line Instruments, Inc.
No. 2093.
- **Centrifuga, Benchtop, Sorvall ST 40R.**
Máxima velocidad 15 200 rpm/ 25 314 fuerzas G.
Voltaje: 120 V, frecuencia: 60 Hz, Capacidad 4 x 750 mL.
Thermo Scientific.
- **Espectrofotómetro de celda, Lambda 25.**
Longitud de onda: 190 nm – 1100 nm.
Voltaje: 100 - 120 V, frecuencia: 60 Hz.
Perkin Elmer, Lambda 25 UV/ Vis Systems.
No.101N5071704
- **Espectrofotómetro de microplaca, Multiskan FC 357.**
Longitud de onda: 340 nm – 850 nm.
Voltaje: 100 - 120 V, frecuencia: 60 Hz.
Thermo Scientific, Multiskan FC 357.
No. 51119000.
- **Espectrofotómetro de placa, Multiskan EX 355.**
Longitud de onda: 340 nm – 690 nm.
Voltaje: 100 - 120 V, frecuencia: 60 Hz.
Thermo Scientific Multiskan EX, Cat.
- **Polytron PT 1200 CL (Homogenizador).**
Voltaje: 115 V, Frecuencia: 50 – 60 Hz.
Cinemática.
- **Potenciómetro modelo 76.**
Voltaje: 115 V, frecuencia: 60 Hz.
Beckman Expandomatic 55 – 2.
- **Vortex – Genie, modelo K-550.**
Voltaje: 120 V, frecuencia: 50 – 60 Hz.
Scientific Industries No.27014

11.2. Reactivos empleados

Actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

- Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) Masa molar: 95,211 g/mol [Sigma – aldrich].
- Dinucleotido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (NADP) [Sigma – aldrich].
- Glucosa 6 Fosfatos (G_6P) 35 mM [Sigma – aldrich].
- Trietanolamina (TEA), Masa molar: 149.188 g/mol [Sigma – aldrich].

Actividad de la isocitrato deshidrogenasa.

- Ácido-3-Morfolinopropano-1-Sulfónico (MOPS) $C_7H_{15}NO_4S$, Masa molar: 209.2633 [Sigma – aldrich].
- Adenosin di Fosfato (ADP) [Sigma – aldrich].
- Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) Masa molar: 95,211 g/mol [Sigma – aldrich].
- Dinucleotido de Nicotinamida y Adenina Fosfato (NADP) [Sigma – aldrich].
- Isocitrato [Sigma – aldrich].
- Trietanolamina (TEA), Masa molar: 149.188 g/mol g/mol [Sigma – aldrich].

Cuantificación de glutatión reducido (GSH).

- Ácido Etilen-di Amino-Tetra-Acético (EDTA) [Sigma – aldrich].
- Ácido Metafosfórico (MPA).
- 5-5-ditio-bis-2-nitro-acido-benzoico (DTNB), $C_{14}H_8N_2O_8S_2$, Masa molar: 396.35g [Sigma – aldrich].
- Fosfatos de Potasio (KH_3PO_4) 0.4 M.
- Patrón de glutatión [Sigma – aldrich].

Cuantificación de glutatión oxidado (GSSG).

- Ácido Clorhídrico (HCL), Masa molar: 36,46094 g/mol, [Sigma – aldrich].
- Ácido Etilen-di Amino-Tetra-Acético (EDTA) [Sigma – aldrich].
- di Nucleótido de Nicotinamida y Adenina Fosfato Reducido (NADPH) [Sigma – aldrich].
- 5-5-ditio-bis-2-nitro-acido-benzoico (DTNB), $C_{14}H_8N_2O_8S_2$, Masa molar: 396.35g [Sigma – aldrich].
- Enzima GR 173 U/mg proteína [Sigma – aldrich].
- Fosfato de Sodio ($NaPO_4$) [Sigma – aldrich].
- Patrón de GSSG [Sigma – aldrich].

Cuantificación de malondialdehído (MDA).

- Ácido fosfórico (H_3PO_4) [Sigma – aldrich].
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) [Sigma – aldrich].
- Patrón de Malondialdehido (MDA) [Sigma – aldrich].

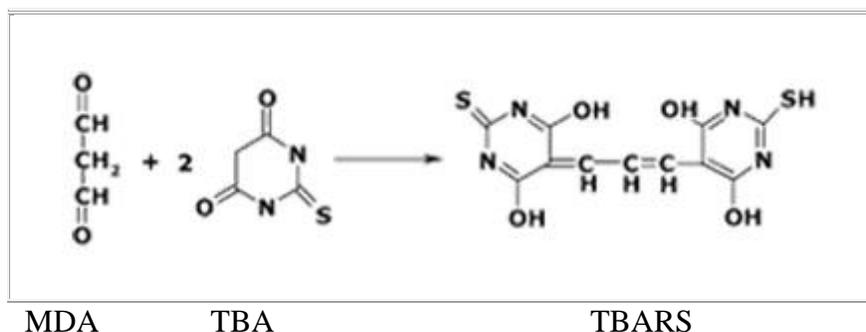
Determinación de proteínas totales (método de Bradford).

- *Kit* para Bradford. [Bio Rad]

11.3. Cuantificación de malondialdehído

Fundamento: La cuantificación de MDA se basa en la reacción producida entre el ácido tiobarbitúrico (TBA) y el producto de lipoperoxidación, malondialdehído, lo que origina especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) los cuales son medibles mediante un espectrofotómetro de luz visible a 535 nm.

La reacción es la siguiente:



Preparación de las Soluciones:

- ❖ Ácido fosfórico (H_3PO_4) 0.2 M: tomar 339.1 μ L y aforar con 25 mL agua destilada.
- ❖ Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.11 M: pesar 0.396 g de TBA y disolver en 25 mL de agua destilada.
- ❖ Patrón de Malondialdehido (MDA) 30 nM: se toma 5 μ l del estándar de MDA posteriormente se diluye en 50 mL de agua destilada y se toma una alícuota de 50 μ L la cual se lleva al aforo con 850 μ L de agua destilada.

Tabla 7. Curva de calibración de malondialdehído.

Reactivos μ L	Tubos						Muestra.
	1	2	3	4	5	6	
[MDA] nM.	0	0.25	0.5	1	2	3	-----
μ L Std.	0	7.5	15	30	60	90	-----
μ L H_2O	200	192.5	185	170	140	110	200
H_3PO_4	200	200	200	200	200	200	200
TBA	25	25	25	25	25	25	25
Muestra	----	-----	----	----	----	----	200
Mezclar e incubar durante 1 hora. Posteriormente deje enfriar.							
n-Butanol	400	400	400	400	400	400	400
Mezclar y centrifugar a 6000 rpm a 4 C durante 10 minutos.							

Procedimiento:

- Preparar 7 tubos agregando los reactivos en el orden en la tabla.
- Mezclar en el vortex e incubar a la temperatura indicada de 90 °C durante 60 minutos.
- Dejar enfriar y adicionar n-butanol, se mezcla en el vortex y se lleva a centrifugar a 6000 rpm a 4 °C, durante 10 minutos.
- Finalmente se toma una alícuota del sobrenadante y se lee a una longitud de onda de 535nm.
- Con los resultados construir una curva patrón graficando nmol de MDA vs. Absorbancia.

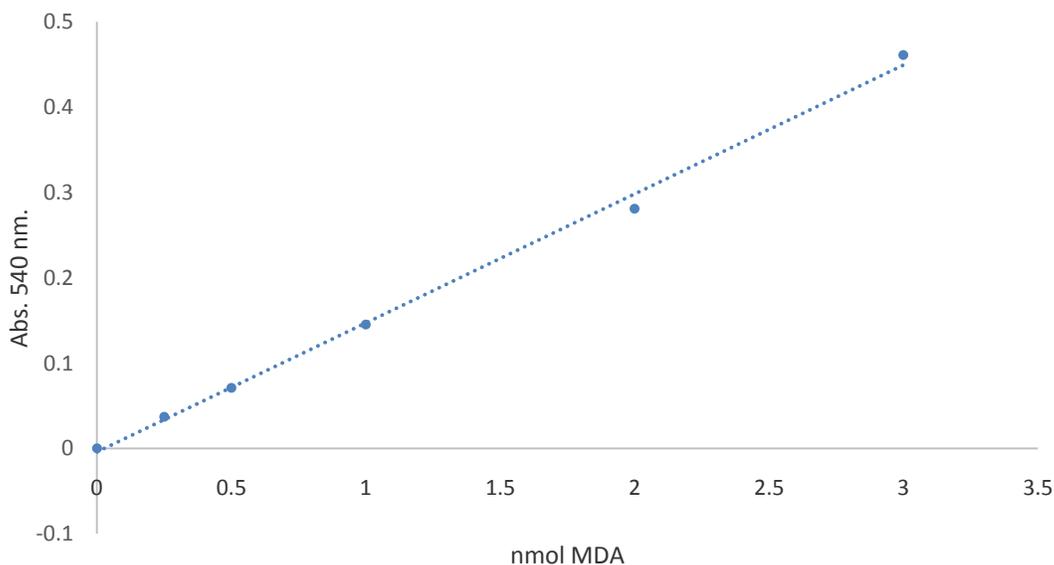


Figura 14. Curva estándar de malondialdehído.

Cálculos: Total [MDA] = $\frac{[Abs\ 1 - Abs\ 0]}{Vol.}$

[mx]

Donde:

MDA: Concentración de malondialdehído expresado en nM/mL.

Abs 1: Absorbancia de la muestra problema.

Abs 0: Absorbancia del blanco.

mx: Pendiente de la curva estándar

Vol.: Volumen de la muestra en mL.

11.4. Actividad de la glucosa- 6 -fosfato deshidrogenasa

Fundamento: por el método de Rudack (1971), se determinó la actividad de G6PD. En el sobrenadante de la muestra se determinó la actividad mediante el cambio que se produce en la absorbancia dado por la producción de NADPH + H⁺. La absorbancia se mide a 340nm cada minuto durante 10 minutos. La actividad se expresa en U/ mg de proteínas en las condiciones del ensayo. La U es igual a mol de NADPH producido por minuto.

La reacción es la siguiente:



Preparación de soluciones:

- Amortiguador de trietanolamina hidrociorada (TEA) 0.1 M, pH 7.6: pesar TEA 1.8 g y disolver en agua destilada 100 mL, ajustar el pH a 7.6 con NaOH 0.1 N.
- Solución de cloruro de magnesio (MgCl₂ * 6 H₂O) 0.1 M: pesar MgCl₂ * 6H₂O 2g y disolver en agua destilada 100 mL.
- Solución de glucosa 6 fosfato (G₆P) 35 mM: pesar G₆P 10 mg y disolver en amortiguador de TEA 1 mL.
- Solución de dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP) 11 mM: pesar NADP 10 mg y disolver en amortiguador de TEA 1 mL.

Tabla 8. Curva de calibración de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.

Reactivos	Volumen.	[mM] final
Trietanolamina (TEA)	2.6 mL	86 mM
Cloruro de magnesio (MgCl ₂)	0.2 mL	6.9 mM
Glucosa 6 fosfato (G ₆ P)	0.1 mL	1mM
NADP ⁺	0.1 mL	0.39mM
Mezclar		
Muestra	0.01 mL	-----

Después de realizar las lecturas calcular la actividad específica.

Cálculos: Volumen de actividad = $\frac{3.00}{6.22 \times 1.0 \times 0.01} \times \Delta E / \text{min.} = \text{U/mL de muestra.}$

3.00: Volumen final en la celdilla.

6.22: Absorbancia.

1.0: Paso de la luz por la celdilla.

0.01: Volumen de la muestra.

ΔE : Cambio en la absorbancia.

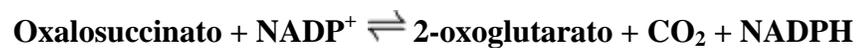
Actividad específica = $\frac{\text{Actividad (U/mL)}}{\text{Concentración de proteínas (mg/mL)}} = \text{U/mg de proteína.}$

11.5 Actividad de la isocitrato deshidrogenasa

Fundamento: se determinó la actividad de IDH, en el sobrenadante de la muestra. Se determino la actividad mediante el cambio que se produce en la absorbancia dado por la producción de NADPH. La absorbancia se mide a 340 nm cada minuto durante 10 minutos.

La actividad se expresa en U/ mg de proteínas en las condiciones del ensayo. La U es igual a mol de NADPH producido por minuto.

La reacción es la siguiente:



Preparación de Soluciones:

- Amortiguador de trietanolamina hidrociorada (TEA) pH 7.2: pesar TEA 2.06 g y disolver en agua destilada 250 mL, ajustar el pH a 7.2 con NaOH 0.1 N.
- Solución de Ácido 3 morfolinopropano 1 sulfónico (MOPS): pesar MOPS 8.673 g y disolverlo en 25 mL de agua destilada.
- Solución de Isocitrato: pesar 0.967 g de isocitrato y disolver en 25 mL de TEA.
- Solución de Adenosin-di-Fosfato (ADP): pesar 0.02562 g y disolver en 2 mL de TEA.
- Solución de dinucleotido de nicotinamida y adenina fosfato (NADP): pesar NADP 1 mg y disolverlo en TEA 1 mL.
- Solución de cloruro de magnesio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) 0.1 M: pesar $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2g y disolver en agua destilada 50 mL.

Tabla 9. Curva de calibración de la isocitrato deshidrogenasa.

Reactivos.	[μ M] Final	Volumen.
TEA.	35.5 μ M	1640 μ L
MOPS.	50 μ M	100 μ L
Isocitrato	5 μ M	1000 μ L
NADP	2 μ M	50 μ L
ADP	1 μ M	100 μ L
MgCl ₂	2 μ M	100 μ L

Mezclar

Muestra	-----	10 μ L
---------	-------	------------

Cronometrar cada minuto la absorbancia durante 10 minutos.

Cálculos:

$$\text{Volumen de actividad} = \frac{3.00}{6.22 \times 1.0 \times 0.01} \times \Delta E / \text{min.} = \text{U/mL de muestra.}$$

3.00: Volumen final en la celdilla.

6.22: Absorbancia.

1.0: Paso de la luz por la celdilla.

0.01: Volumen de la muestra.

ΔE : Cambio en la absorbancia.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad (U/mL)}}{\text{Concentración de proteínas (mg/mL)}} = \text{U/mg de proteína.}$$

11.6 Determinación de proteínas totales: método de Bradford

Fundamento: el método de Bradford es un método colorimétrico muy eficiente para la cuantificación de proteínas totales, se basa en el empleo del colorante azul brillante de Coomassie G-250 el cual en un principio posee un color rojizo. Las moléculas del colorante se unen a los grupos cargados de los aminoácidos que componen las proteínas; con estas uniones se produce una mezcla de color azul cuyo máximo de absorción es a los 595 nm.

Preparación de soluciones:

- Reactivo de Bradford: pesar azul brillante de Coomassie (G-250) 100 mg y disolver en etanol al 95 %, 50 mL. Agregar lentamente ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85%, 100 mL. Aforar con agua destilada a 1000 mL. Filtrar 3 o 4 veces y guardar en frasco ámbar.
- Patrón de albúmina sérica de bovino 1 mg/mL: pesar albúmina de bovino 10 mg, agregar un poco de agua destilada, disolver lentamente para no producir espuma. Aforar con agua destilada a 10 mL y almacenar en refrigeración.

Procedimiento:

- Preparar 7 tubos agregando los reactivos como se muestra en la tabla
- Mezclar bien cada tubo y mantenerlos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Calibrar el espectrofotómetro con el tubo 1 (blanco) a 595nm y hacer las lecturas de los demás tubos.
- Con los resultados construya una curva patrón graficando μg de proteínas vs. Absorbancia.

Tabla 10. Curva de calibración de las proteínas totales.

	Tubos						
Reactivos (μL)	1	2	3	4	5	6	7
Agua destilada	1	0.990	0.980	0.960	0.940	0.920	0.990
Muestra problema	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0.01
Reactivo de Bradford	5	5	5	5	5	5	5
Patrón de albúmina	0	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1

Método de Bradford (*kit*)

Tubo	Estándar	Diluyente (H ₂ O)	Reactivo de Bradford
1	100 µL	0	250 µL
2	100 µL	50 µL	250 µL
3	100 µL	100 µL	250 µL
4	100 µL	100 µL	250 µL
5	100 µL	100 µL	250 µL
6	100 µL	100 µL	250 µL
7	100 µL	100 µL	250 µL
8	0	100 µL	250 µL

Se hace una dilución 1:10 (50 µL muestra + 450 µL PBS. De esta solución se toman 5 µL y se agregan 250 µL de reactivo de Bradford).

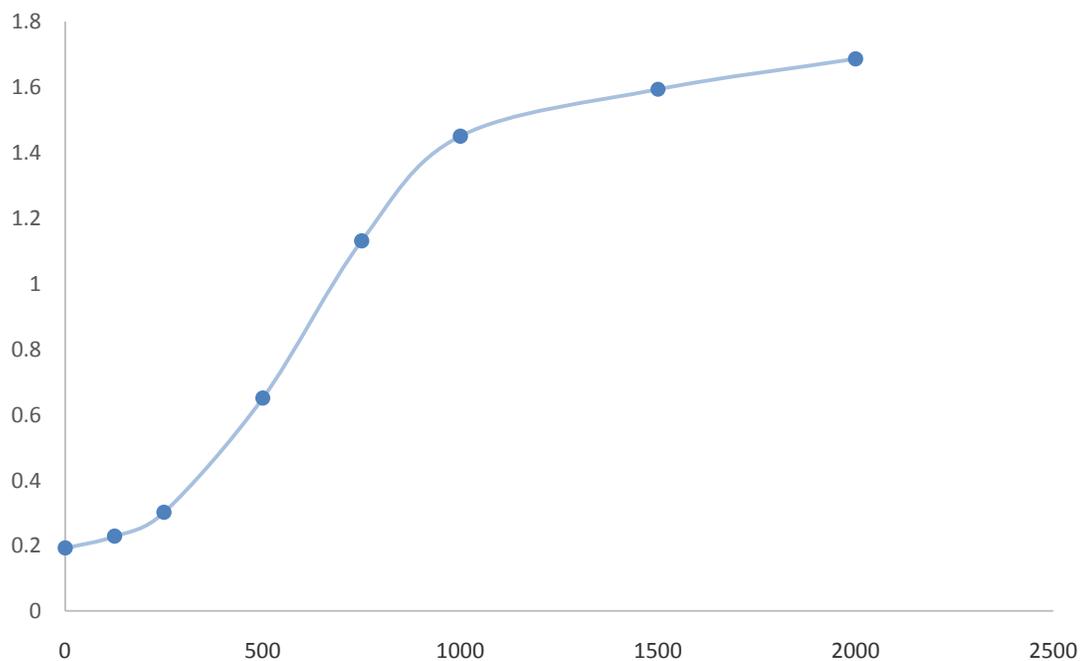
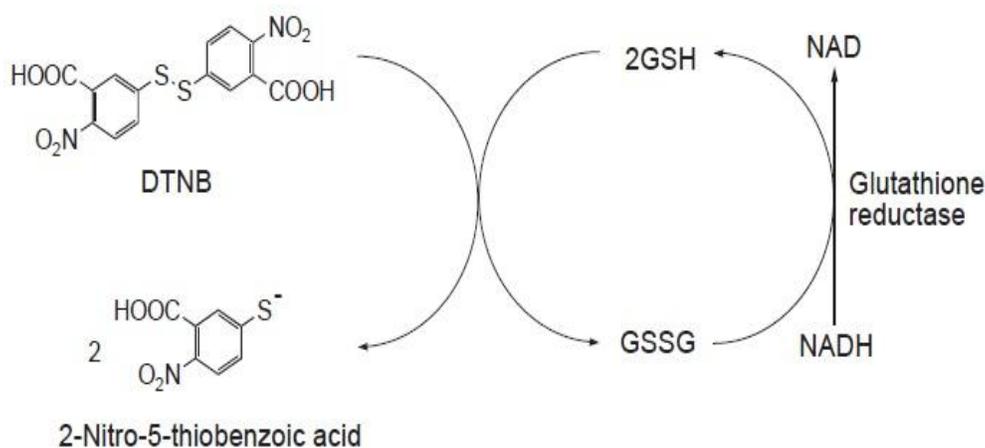


Figura 15. Curva estándar proteínas totales: método de Bradford.

11.7 Cuantificación de glutatión reducido

Fundamento: la cuantificación de GSH se basa en la reacción producida entre el reactivo de Ellman (DTNB) y los grupos sulfihirilo (-SH) presentes en el GSH, el cual origina un color amarillo claro en las muestras, que es medible mediante un espectrofotómetro de luz visible a una longitud de onda de 412 nm.

La reacción es la siguiente:



Preparación de las soluciones:

- Amortiguador de fosfatos de potasio (KH₃PO₄) 0.4 M, con ácido etilén-diamino-tetra-acético (EDTA) 0.2 M, pH 8.9: pesar 54.40 g de KH₃PO₄ y 7.6 g de EDTA, disolver ambos reactivos en 600 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8.9 utilizando hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N. aforar a 1 litro con agua destilada y guardar en refrigeración.
- Patrón de glutatión 0.5 mM: pesar 0.004 g de GSH, disolver con ácido metafosfórico (MPA) al 5 %, aforar a 25 mL en un matraz y guardar en refrigeración.
- 5-5-ditio-bis-2-nitro-acido-benzoico (DTNB) 0.01 M: pesar 0.0198 g de DTNB y disolver en 5 mL de metanol absoluto. Para cada medición el reactivo se prepara en fresco.

Tabla 11. Curva estándar de GSH.

<i>reactivos</i>	Tubos					
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
[GSH] $\mu\text{M} / \text{L}$	0	20	40	60	80	100
Buffer (μL)	900	860	820	780	740	700
GSH 0.5 mM / L (μL)	0	40	80	120	160	200
Buffer de fosfatos (mL)	2	2	2	2	2	2
DTNB	50	50	50	50	50	50

<i>Reactivos</i>	<i>Muestra</i>
Muestra de tejido adiposo (μL)	100
Acido sulfosalicilico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$)	400
Resuspender y centrifugar a 15000 rpm a 4 °C, durante 20 minutos. Tomar una alícuota de 200 μL del sobrenadante.	
Buffer de fosfatos (μL)	700
DTNB	50
Buffer de fosfatos (mL)	2

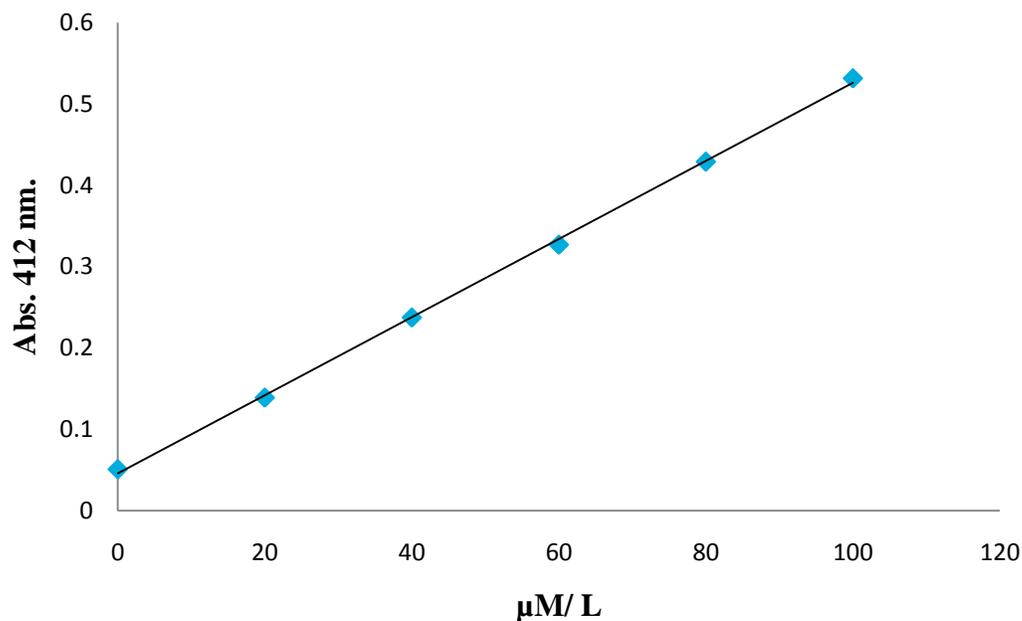


Figura 16. Curva estándar GSH.

Cálculos:

$$\text{Total [GSSG]} = \frac{\text{Abs1} - \text{Abs 0}}{\text{mx}} \times \text{D}$$

Donde:

[GSH]: Concentración de GSH expresado en μM .

Abs 1: Absorbancia de la muestra problema.

Abs 0: Absorbancia del blanco.

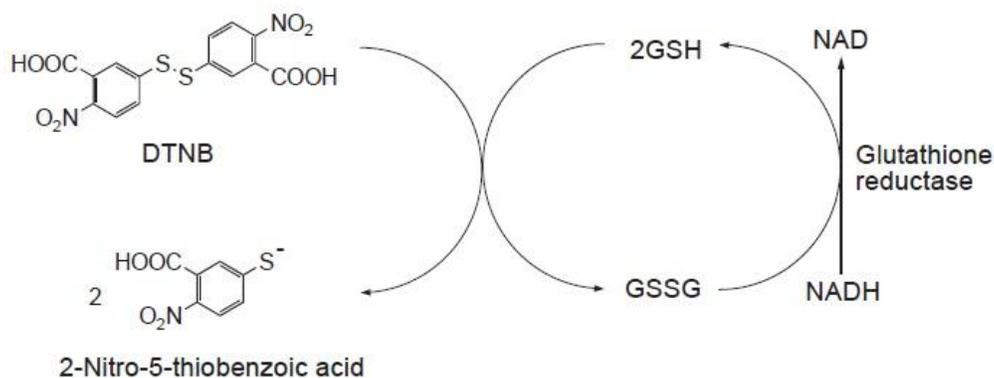
mx: Pendiente de la curva estándar.

D: Factor de dilución (15).

11.8 Cuantificación de glutatión oxidado

Fundamento: la determinación se realiza mediante un método enzimático (Tietze, 1969), el cual emplea 1-metil-2-trifluorometanosulfonato vinilpiridinium 1 (M2VP) para derivatizar al GSH sin interferir con la GR presente en el ensayo. GSSG es reducido a GSH y a su vez cuantificado con el reactivo de Ellman (DTNB). La reducción es catalizada por la GR en presencia de NADPH. El ensayo utiliza el cambio de color durante la reacción, el cual es proporcional a las concentraciones de GSH y GSSG. Las mediciones se realizan en un espectrofotómetro a 412 nm.

La reacción es la siguiente:



Preparación de soluciones:

- Amortiguador de fosfato de sodio (NaPO_4) 143mM y ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA) 6 mM, pH: 7.5. Pesar NaPO_4 54.36 g. y EDTA 2.28 g disolver el NaPO_4 en agua destilada 600 mL y posteriormente agregar el EDTA, ajustar el pH a 7.5 con ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N. Aforar con agua destilada a 1000 mL y guardar en refrigeración.
- Solución stock de dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido (NADPH) 0.248 mg/mL: pesar el NADPH 2 mg y disolver en amortiguador de NaPO_4 1 mL, de la solución anterior tomar 0.125 mL y adicionar amortiguador de NaPO_4 0.875mL. Concentración final de 0.218 mM.
- Patrón de GSSG 4.9 mM: pesar GSSG 3mg y aforar con amortiguador de NaPO_4 a 10mL.

- Enzima GR 173 U/mg proteína: tomar la enzima GR 0.005 mL y disolver en amortiguador de NaPO₄ 2mL.
- DTNB 6 mM: pesar el DTNB 0.011 g. y disolver en amortiguador de NaPO₄ 5 mL
Para cada medición el reactivo se prepara en fresco.

Procedimiento:

- 1.- Preparar 5 tubos agregando los reactivos como se muestra en la tabla.
- 2.- Mezclar bien y tomar una alícuota de 50 µL.
- 3.- Agregar 50 µL del reactivo de DTNB preparado en fresco.
- 4.- Agregar 5 µL de la enzima de GR y 45 µL del amortiguador de NaPO₄.
- 5.- Dejar reposar durante 5 minutos aproximadamente.
- 6.- Agregar 50 µL de la solución *stock* de NADPH.
- 7.- Leer en el espectrofotómetro a longitud de onda de 412 nm.
- 8.- Construir con los datos obtenidos una curva patrón.

Tabla 12. Curva estándar de GSSG (Kit).

Reactivo µL.	Stock 1	Stock 2	Stock 3	Stock 4	Muestra
GSSG	5	10	20	30	-----
Amortiguador	395	390	380	370	-----
Muestra	-----	-----	-----	-----	200

	Blanco	1	2	3	4	Muestra
Stock	-----	50	50	50	50	-----
Amortiguador	50	-----	-----	-----	-----	-----
Muestra	-----	-----	-----	-----	-----	50
DTNB	50	50	50	50	50	50
Amortiguador	45	45	45	45	45	45
Enzima	5	5	5	5	5	5
NADPH	50	50	50	50	50	50

Leer a 412nm.

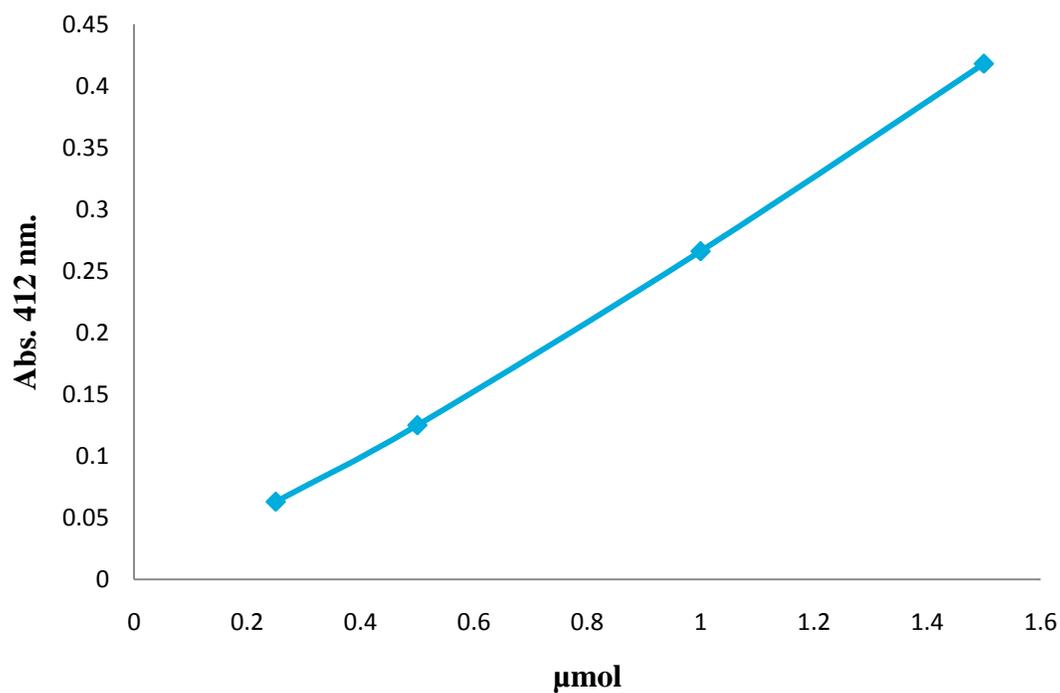


Figura 17. Curva estándar GSSG.

Cálculos:

$$\text{Total [GSSG]} = \frac{\text{Abs 1} - \text{Abs 0} \times D}{mx} \div t$$

[GSSG]: Concentración de GSSG expresado en μM

Abs1: Absorbancia de la muestra problema

Abs 0: Absorbancia del blanco

mx: Pendiente de la curva estándar

D: Factor de dilución

t: Tiempo

12. REFERENCIAS

- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. (2000). *The c-Jun NH (2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser (307)*. J Bio Chem. Vol. 275. Pag. 9047-9054.
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. (2006). *Metabolic syndrome a new world-wide definition .A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. Diabet Med. Vol. 23. Pag. 469-480.
- Alberti KG, Zimmet PZ. (1998). *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications.Part1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet. Med. Vol. 15. Pag. 539-553.
- American Diabetes Association. (1993). *Consensus statement: role of cardiovascular risk factor in prevention and treatment of macro-vascular disease in diabetes*. Diabetes Care. Vol. 1. Pag. 72-78.
- Amir-Ahmady B, Salati LM. (2000). *Regulation of the processing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA by nutritional status*. J Biol Chem. Epub Dec 21.Vol. 105. Pag. 14-23.
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard JP. (2008). *Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity*. Diabetes Metab. Vol. 34. Pag. 2-11.
- Arner P. 2005. *Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab Vol. 19(4). Pag.471-482.
- Avogaro P, Crepaldi G, Enzi G, Tiengo A. (1967). *Associazione diiperlipidemia ,diabetomellito e obesita di mediogrado*. Acta Diabetol Lat. Pag. 36-41.
- Bahceci M, Gokalp D, Bahceci S, Tuzcu A, Atmaca S, Arikan S. (2007). *The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha,interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults*. J Endocrinol Invest. Vol. 30. Pag. 210-214.

- Balkau B, Charles MA. (1999). *Commenton the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*. Diabet. Med. Vol. 16. Pag. 442-443.
- Blair AS, Hajdуч E, Litherland GJ, Hundal HS. (1999). *Regulation of glucose transport and glycogen synthesis in L6 muscle cells during oxidative stress. Evidence for cross-talk between the insulin and SAPK2/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. J Biol Chem. Vol. 274. Pag. 36293-36299.
- Bloomgarden ZT. (2003). *American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC*. Diabetes Care. Vol. 26. Pag. 1297-1303.
- Boden G. (2008). *Obesity and free fatty acids*. Endocrinol. Metab Clin North Am. Vol. 37. Pag. 635-646.
- Bodor ET, Offermanns S. (2008). *Nicotinic acid: an old drug with a promising future*. Br J Pharmacol. Vol. 153 Suppl 1. Pag. 68-75.
- Bogaert YE, Linas S. (2009). *The role of obesity in the pathogenesis of hypertension*. Nat Clin Pract Nephrol. Pag. 101-111.
- Carmen GY, Victor SM. (2006). *Signalling mechanisms regulating lipolysis*. Cell Signal Vol. 18. Pag. 401-408.
- Clark JM, Diehl AM. (2003). *Defining nonalcoholic fatty liver disease: implications for epidemiologic studies*. Gastroenterology. Vol. 124. Pag. 248-250.
- Chong ZZ, Lin SH, Maiese K. (2004). *The NAD⁺ precursor nicotinamide governs neuronal survival during oxidative stress through protein kinase B coupled to FOXO3a and mitochondrial membrane potential*. J Cereb Blood Flow Metab. Pag. 728-43.
- Crinó A, Schiaffini R, Ciampalini P, Suraci MC, Manfrini S, Visalli N, Matteoli MC, Patera P, Buzzetti R, Guglielmi C, Spera S, Costanza F, Fioriti E, Pitocco D, Pozzilli P; IMDIAB Group. (2005). *A two year observational study of nicotinamide and intensive insulin therapy in patients with recent onset type 1 diabetes mellitus*. J Pediatr Endocrinol Metab. Pag. 749-54.

- De Ferranti S , Mozaffarian D. (2008). *The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences*. Clin Chem. Vol. 54. Pag. 945-955.
- Després JP, Arsenault BJ, Côté M, Cartier A, Lemieux I. (2008). *Abdominal obesity: the cholesterol of the 21st century*. Can J Cardiol. Vol. 24. Pag. 7D-12D.
- Dessi S, Cocco PL, Avateneo G, Picchiri GF, Heineman EF. (1989). *Glucose-6-phosphate deshydrogenase deficiency and cancer in a Sardinian male population: A case-control study*. Carcinogenesis. Vol. 10. Pag. 813.
- Díaz-Flores M, Ibáñez-Hernández MA, Galván RE, Gutiérrez M, Durán-Reyes G, Medina-Navarro R, Pascoe-Lira D, Ortega-Camarillo C, Vilar-Rojas C, Cruz M, Baiza-Gutman LA. (2006). *Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADP+ ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat*. Life Sci. 2006 Apr 25;78(22):2601-7. Epub 2005 Dec 2.
- Díaz Flores M. *Efecto de la nicotinamida sobre la actividad de glucosa 6- fosfato deshidrogenasa y la vía redox del glutati6n en diabetes experimental*. Tesis. Pag. 18-21.
- Dincer Y, Akcay T, Alademir Z, Ilkova H. (2002). *Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. Metabolism. Vol. 51. Pag. 1360-1362.
- Diniz YS, Rocha KK, Souza GA, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Novelli Filho JL, Cicogna AC, Novelli EL. (2006). *Effects of N-acetylcysteine on sucrose-rich diet-induced hyperglycaemia, dyslipidemia and oxidative stress in rats*. Eur J Pharmacol.
- Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. (2005). *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest. Pag. 1343-1351.
- Dubois SG, Heilbronn LK, Smith SR, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E; Look AHEAD Adipose Research Group. (2006). *Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes*. Obesity (Silver Spring) Vol. 14. Pag. 1543-1552.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. (2005). *The metabolic syndrome*. Lancet. Vol. 365. Pag. 1415- 1428.

- Eto N, Miyata Y, Ohno H, Yamashita T. (2005). *Nicotinamide prevents the development of hyperphosphataemia by suppressing intestinal sodium-dependent phosphate transporter in rats with adenine-induced renal failure.* Nephrol Dial Transplant. Pag. 1378-1384.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. (2002). *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes.* Endocr Rev. Vol. 23. Pag. 599-622.
- Evans JL. (2007). *Antioxidants: Do they have a role in the treatment of insulin resistance.* Indian J Med Res. Vol. 125. Pag. 355-372.
- Fauveau V, Magnuson MA, Girard J, Postic C. (2004). *Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression.* J Biol Chem. Vol. 279. Pag. 20314–20326.
- Fair AM y Montgomery K. (2009). *Energy balance, physical activity, and cancer risk.* Methods Mol Biol. Vol. 472. Pag. 57-88.
- Fasshauer M y Paschke R. (2003). *Regulation of adipocytokines and insulin resistance.* Diabetologia. Vol. 46. Pag.1594-1603.
- Finkel T, Holbrook NJ. (2000). *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.* Nature. Pag. 239-247.
- Friedman JM. (2000). *Obesity in the new millennium.* Nature. Pag. 632-634.
- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. (2007). *Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice.* J Pediatr (Rio J). Vol. 83(5Suppl). Pag. 192-203.
- Ford ES, Li C. (2008). *Defining the metabolic syndrome in children and adolescents: Will the real definition please stand up.* J. Pediatr. Vol. 152. Pag. 160-164.
- Funahashi T, Nagasawa A, Hibuse T, Maeda N. (2006). *Impact of glycerol gateway molecule in adipocytes.* Cell Mol Biol. Vol. 52. Pag. 40-45.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. (2004). *Increased*

- oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J Clin Invest. Vol. 114. Pag. 1752-1761.
- Girard J y La fontan M. (2008). *Impacto of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism*. Diabetes Metab. Vol. 34. Pag. 439-445.
 - Gordon G, Mackow MC, Levy HR. (1995). *On the mechanism of interaction of steroids with human glucose 6-phosphate dehydrogenase*. Arch Biochem Biophys. Vol. 318(1). Pag. 25-29.
 - Grifith OW. (1999). *Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis*. Free Radic Biol Med. Vol. 27. Pag. 922-935.
 - Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. (2008). *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nat Rev Mol Cell Biol 9(5). Pag.367-377.
 - Gupte SA, Levine RJ, Gupte RS, Young ME, Lionetti V, Labinsky V, Floyd BC, Ojaimi C, Bellomo M, Wolin MS, Recchia FA. (2006). *Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart*. J Mol Cell Cardiol. Pag. 340-349.
 - Gupte SA. (2008). *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases*. Curr Opin Investig Drugs. Pag. 993-1000.
 - Gutierrez DA, Puglisi MJ, Hasty AH. (2009). *Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia*. Curr Diab. Pag. 26-32.
 - Haber CA, Lam TK, Yu Z, Gupta N, Goh T, Bogdanovic E, Giacca A, Fantus IG. (2003). *N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress*. Am J Physiol Endocrinol Metab. Pag. 744-753.
 - Halliwell B. (1995). *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. Free Radic Biol Med 18. Pag. 125-126.
 - Hita ME, Bastidas BE, Ruiz B, Godínez SA, Panduro A. (2002). *Funciones endocrinas de la célula adiposa*. Revista de Endocrinología y Nutrición Vol. 10. Pag. 140-146.

- Hoane MR, Pierce JL, Holland MA, Anderson GD. (2008). *Nicotinamide treatment induces behavioral recovery when administered up to 4 hours following cortical contusion injury in the rat.* Neuroscience. 154(3). Pag. 861-868
- Hoane MR, Pierce JL, Kaufman NA, Beare JE. (2008). *Variation in chronic nicotinamide treatment after traumatic brain injury can alter components of functional recovery independent of histological damage.* Oxid Med Cell Longev. Pag. 46-53.
- <http://emecolombia.foroactivo.com/t1045-tejido-adiposo-rosa-daza-iid-medicina>.
- <http://es.wikipedia.org>.
- <http://modeladocorporal.mex.tl>
- <http://themedicalbiochemistrypage.org>.
- <http://www.aace.com> (AACE, 2013).
- <http://www.fertilab.net>.
- <http://www.who.int>.
- Hu Y, Wang Y, Wang L, Zhang H, Zhang H, Zhao B, Zhang A, Li Y. (1996). *Effects of nicotinamide on prevention and treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats.* Chin Med J (Engl). Vol. 109(11). Pag. 819-822.
- Hudgins L.C. (1996). *'Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet'.* J. Clin. Invest Vol. 97. Pag. 2081-2091
- Hunt J, Smith C, Wolf SP. (1990). *Autoxidative glycosylation and possible involvement of preoxides and free radicals in LDL modification by glucose.* Diabetes Vol39:1420-1424.
- Itani, Ruderman, Schmieder, Boden G. (2002). *Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, Protein kinase C, and IκB-α.* Diabetes. Vol. 51. Pag. 2005–2011.
- JAMA2013. *Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol Adults (Adult Treatment Panel IV).* Vol. 285. Pag. 2486-2497.

- Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. *Regulation of triglyceride metabolism. IV. 2007. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293(1). Pag. G1-G4.
- Jocken JW. (2007). *Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state.* J. Clin. Endocrinol Metab. Vol. 92. Pag. 2292-2299.
- Kakkar R, Jawahar K, Subrahmanyam V, Prasad M K. (1995). *Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats.* Mol and Cell Biochem Vol. 151. Pag. 113-119.
- Kamanna VS, Kashyap ML. (2008). *Mechanism of action of niacin.* Am J Cardiol. Vol. 101(8A). Pag. 20B-26B.
- Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. (1994). *Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress.* FASEB J.8. Pag. 174-181.
- Koh S., Lee S.-C., Kim M.-K., Koh J.H., Lee S., An G., Choe S., Kim S.-R. (2007). *T-DNA tagged knockout mutation of rice OsGSK1, an orthologue of Arabidopsis BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses.* Plant Mol. Biol. Vol. 65. Pag. 453-466.
- Kolb H, Burkart V. (1999). *Nicotinamide in Type 1 Diabetes.* Diabetetes Care 22. Pag. B16- B20
- Kraemer FB, Shen WJ. (2002). *Hormone-sensitive lipase: control of intra cellular tri-(di-)Acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis.* J.Lipid Res Vol. 43. Pag. 1585-1594.
- Kylin. (1923). *Estudie nueber das hypertonie- hypeglykämie- hyperurikämiesyndrom.* Zentral blattfuer Innere medizin. Pag. 105-127.
- L'Hermitte F, Behar A, Pariès J, Cohen-Boulakia F, Attali JR, Valensi P. (2003). *Impairment of lymphatic function in women with gynoid adiposity and swelling syndrome.* Metabolism. Vol. 52(7). Pag. 805-809.
- Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. (2004). *Metabolism of lipids in human white adipocyte.* Diabetes Metab. Vol. 30(4). Pag. 294-309.

- Langin D. (2006). *Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome*. *Pharmacol* Vol. 53(6). Pag. 482-491.
- Lin C, Tsai C, Lin S. (2005). *Effects of soy components on blood and liver lipids in rats fed high-cholesterol diets*. *World J. Gastroenterol.* Vol. 11(35). Pag. 5549-5552.
- Lu SC. (2000). *Regulation of glutathione síntesis*. *Curr Top. Cell Regul.* Vol. 36. Pag. 95-116.
- Maddux BA, See W, Lawrence Jr. JC, Gold fine AL, Gold fine ID, Evans JL. (2001). *Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of α -lipoic acid*. *Diabetes*. Vol. 50. Pag. 404-410.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. (2003). *Diabetes, oxidative stress, and antioxidants*. A review *J Bio chem Mol Toxicol* Vol. 17. Pag. 24-38.
- Maritza PM. (2007). *El adipocito como órgano endocrino. Implicaciones fisiopatológicas y terapéuticas*. *Rev Med* Vol. 15(002). Pag. 225-242.
- McGarry JD. (2002), *Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes*. *Diabetes* Vol.51, Pag. 7-18.
- Moreno MJ y Martinez JA. (2002). *Adipose tissue: a storage and secretory organ*. *An Sist Sanit Navar* Vol. 25. Pag. 29-39.
- Muntoni S, Muntoni S, Meloni L, Manca MR, Loddo I, Cioglia G, Cocco P, Schwartz A. (2008). *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency protects against coronary heart disease*. *J Inherit Metab Dis* vol. 31. Pag. 412–417,
- Murakami K, Kondo T, Ohtsuka Y, Fujiwara Y, Shimada M, Kawakami Y. (1989). *Impairment of glutathione metabolism in erythrocytes from patients with diabetes mellitus*. *Metabolism* Vol. 38. Pag. 753-758.
- NOM-062-ZOO-1999.
- NOM-086-SSA1-1994.
- NOM-218-SSA1-2011.

- Olaiz-Fernández G, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. (2006). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Pagano E, Calvo JC. (2003). *Erb B2 and EGFR are down modulated during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes*. J Cell Bio Chem Vol. 90(3). Pag. 561-572.
- Park J, Choe SS, Choi AH, Kim KH, Yoon MJ, Suganami T, Ogawa Y, Kim JB. (2006). *Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals*. Diabetes. Vol. 55(11). Pag. 2939-2949.
- Park J, Chung JJ, Kim JB. (2007). *New evaluations of redox regulating system in adipose tissue of obesity*. Diabetes Res Clin Pract. Vol. 77 Suppl 1. Pag. 6-11.
- Park J, Rho HK, Kim KH, Choe SS, Lee YS, Kim JB. (2005). *Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity*. Mol Cell Biol. Vol. 12. Pag. 5146-5157.
- Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. (1997). *A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/ threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxta membrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem Vol. 272. Pag. 29911-29918.
- Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. (2003). *Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation*. Int J Obes Relat Metab Disord. Vol. 27 Suppl 3. Pag. 6-11.
- Pillai VB, Sundaresan NR, Kim G, Gupta M, Rajamohan SB, Pillai JB, Samant S, Ravindra PV, Isbatan A, Gupta MP. (2009). *Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway*. J Biol Chem. Vol. 285(5). Pag. 3133-3144.
- Pozzilli P, Browne PD, Kolb H. (1996). *Meta-analysis of nicotinamide treatment in patients with recent-onset IDDM. The Nicotinamide Trialists*. Diabetes Care. Vol. 12. Pag. 1357-1363.
- Pyzhik, T.N, (1989). "The role of niacin in regulating the pentosophosphate pathway and production of NADP-H in fatty tissue". Vopr Pitan Vol. 5. Pag. 53-55.

- Reaven GM. (1988). *Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes Vol. 37. Pag. 1595-1607.
- Rivera-Dommarco J, Barquera S, Campirano F, Campos-Nonato I, Safdie M, Tovar V. (2002). *The epidemiological and nutritional transition in Mexico: rapid increase of non-communicable chronic diseases and obesity*. Public Health Nutr Vol. 14. Pag. 113-122.
- Robinson LN, Towle HC. (2006). *ChREBP**Mlx* is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver*. J Biol Chem Vol. 281. Pag. 28721–28730.
- Rossmesl M, Flachs P, Brauner P, Sponarova J, Matejkova O, Prazak T, Ruzickova J, Bardova K, Kuda O, Kopecky J. (2004). *Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores*. Int J Obes Relat Metab Disord. Vol. 28 Suppl 4. Pag. 38-44.
- Salati LM y Amir-Ahmady B. (2001). *Dietary regulation of expression of glucose - 6- phosphate dehydrogenase*. Annu Rev Nutr. Vol. 21. Pag.121-140.
- Saltiel AR, Kahn CR. (2001). *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature Vol. 414. Pag. 799-806.
- Schwartz AG, Pashko LL. (2004). *Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and longevity*. Ageing Res Rev. Vol. 3(2). Pag. 171-187.
- Schweiger M.(2006). *Adipose triglyceride lipase and hormone- sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism*. J. Biol Chem Vol. 281. Pag. 40236-40241.
- Seidell JC. (1999). *Obesity: a growing problem*. Acta Paediatr Suppl. 88(428). Pag. 46-50.
- Sopasakis V, R.etal. (2004). *High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator*. Obes Res Vol. 12. Pag. 454-460.
- Soverini V, Moscatiello S, Villanova N, Ragni E, Di Domizio S, Marchesini G. (2009). *Metabolic Syndrome and Insulin Resistance in Subjects with Morbid Obesity*. Obes Surg.

- Sullivan PW, Ghushchyan VH, Ben-Joseph R. (2008). *The impact of obesity on diabetes, hyperlipidemia and hypertension in the United States*. Qual Life Res Vol. 17. Pag. 1063-1071.
- Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC. (1999). *Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death*. Am J Physiol. Vol. 276(5 Pt 1). Pag. 1121-1131.
- Tian WN, Braunstein LD, Pang J, Stuhlmeier KM, Xi QC, Tian X, Stanton RC. (1998). *Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth*. J Biol Chem. Vol. 273(17). Pag. 10609-10617.
- Tian zheng Y, James L, Robotham, Yisang Y. (2006). *Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology*. Proc Natl Acad Sci (En prensa).
- Tietze F. (1969). *Enzimatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total an oxidized glutathione*. Analytical Biochem Vol. 27. Pag. 502-522.
- Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. (2002). *Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 10; 99(25). Pag. 16309-16313.
- Tsatsos NG, Towle HC. (2006). *Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism*. Biochem Biophys Res Commun 340. Pag. 449–456.
- Ungerstedt JS, Blömbäck M, Söderström T. (2003). *Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines*. Clin Exp Immunol. Vol. 131(1). Pag. 48-52.
- Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, Maruyama N, Kitagawa N, Tanaka T, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. (2003). *Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men*. J Clin Endocrinol Metab. Vol. 88(10). Pag. 4673-4676.

- Van Haaften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A. (2003). *Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes*. Drug Metab 35. Pag. 215-253.
- Vázquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR. (2008). *White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity*. Arch Med Res Vol. 39(8). Pag. 715-728.
- Wajcman H, Galactéros F. (2004). *Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: a protection against malaria and a risk for hemolytic accidents*. C R Biol. Vol. 327(8). Pag. 711-720.
- Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. (1990). *Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents*. Ann Intern Med 113(12). Pag. 909-915.
- Wellen KE y Hotamisligil GS. (2003). *Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue*. J Clin Invest 112. Pag. 1785-1788.
- Wolff SP, Dean RT. (1987). *Glucose autoxidation and protein modification the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes*. Biochem J 245. Pag. 243-250.
- World Health Organization. (1999). *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications*. Geneva. ed. World Health Organization.
- Xu Y, Osborne BW, Stanton RC. (2005). *Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex*. Am J Physiol Renal Physiol. 289(5). Pag.1040-1047.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. (2002). *Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nat Med. 8(11). Pag. 1288-1295.
- Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelsen SE. (2001). *Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption*. Science. Vol. 293. Pag. 1673-1677.

- Yu, C., Chen, Y., Cline, G.W., Zhang, D.; Zong, H.; Wang, Y.; Bergeron, R.; Kim, J.K.; Cushman, S.W.; Cooney, G.J.; Atcheson, B.; White, M.F.; Kraegen, E.W. y Shulman, G.I. (2002). *Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) associated phosphatidylinositol-3-kinase activity in muscle*. The J. of biological chemistry, 277 (52). Pag. 50230-50236.
- Zhang Z, Liew CW, Handy DE, Zhang Y, Leopold JA, Hu J, Guo L, Kulkarni RN, Loscalzo J, Stanton RC. (2009). *High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and {beta}-cell apoptosis*. FASEB J.
- Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K, Mangelsdorf DJ. (2001). *Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXR alpha and LXR beta*. J Biol Chem 276(46). Pag. 43018-43024.
- Zhi Xu, Kaushik P, Patel, Marjorie F, Lou, Gerorge J, Rozanski. (2002). *up regulation K channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione*. Cardiovascular Res 53. Pag. 80–88.
- Zulet M.A, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez Hernández JA. (2007). *Bio marcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas*. Nutrición Hospitalaria 22(5). Pag. 511-527.