



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DE LA TESIS:

Evaluación de la resistencia a la insulina y activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) en hepatocitos de rata con Síndrome Metabólico.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA EN ALIMENTOS

PRESENTA

Karla Andrea Figueroa Esquivel

MÉXICO, D. F. 2013



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: M. en C. Lucía Cornejo Barrera

VOCAL: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas

SECRETARIO: Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera

1er. SUPLENTE: Dra. María Elena Ibarra Rubio

2° SUPLENTE: Dr. Samuel Canizales Quinteros

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Pediatría, Torre de Investigación, 2° Piso, Laboratorio de Nutrición Experimental.

Insurgentes sur 3700 letra C, Col Insurgentes Cuiculco 04530 Del. Coyoacán, México DF.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Karla Guadalupe Carvajal Aguilera

SUSTENTANTE:

Karla Andrea Figueroa Esquivel

Índice general

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Síndrome Metabólico	14
1.1.1. Obesidad	15
1.1.2. Dislipidemias	15
1.1.3. Diabetes Mellitus	15
1.1.4. Arterioesclerosis	16
1.1.5. Hipertensión	16
1.1.6. Resistencia a la insulina	16
2. ANTECEDENTES	18
2.1. Definición del SM según la OMS	19
2.2. Definición del SM según la NCEP y ATP-III	21
2.3. Definición del SM según la IDF	21
2.4. SM en el mundo	22
2.5. SM en México	25
2.6. Patogénesis del SM	28
2.7. Resistencia a la Insulina	30
2.7.1. Vía de señalización de la Insulina	31
2.8. Metabolismo energético	33
2.8.1. Proteína Cinasa Dependiente de AMP (AMPK)	33
3. JUSTIFICACIÓN	38



4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
4.1. Hipótesis	40
4.2. Objetivo General	40
4.2.1. Objetivos Particulares	40
5. METODOLOGÍA	41
5.1. Obtención del modelo de síndrome metabólico en ratas	42
5.2. Aislamiento de hepatocitos	44
5.3. Estimulación farmacológica de células aisladas	45
5.4. Lisis celular y extracción de la proteína	45
5.5. Cuantificación de la proteína por el método de Bradford	47
5.6. Ensayos de Western-blot (Wb) y revelado por quimioluminiscencia	47
5.7. Análisis estadístico	50
6. RESULTADOS	51
6.1. Evaluación del modelo del Síndrome Metabólico	52
6.2. Viabilidad de los hepatocitos por exclusión de tinción de azul de tripano	54
6.3. Análisis de la activación de AMPK en hepatocitos de rata con SM	56
6.4. Análisis del tratamiento crónico con metformina sobre la activación de AMPK en hepatocitos de rata con SM	58
6.5. Análisis de la vía de la insulina en hepatocitos de ratas con SM por medio de la activación de Akt	60
6.6. Análisis del tratamiento crónico con metformina sobre la vía de la insulina en hepatocitos de rata con SM por medio de la activación de Akt	62
7. DISCUSIÓN	64
7.1. Evaluación del modelo de SM	65
7.2. Evaluación de la activación de AMPK en hepatocitos de rata con SM	67
7.3. Evaluación del tratamiento crónico con metformina sobre la respuesta de la AMPK	68
7.4. Evaluación de la vía de la insulina en hepatocitos de rata con SM por medio de la activación de Akt	69



7.5. Evaluación del tratamiento crónico con metformina en hepatocitos de rata con SM sobre la vía de la insulina por medio de la activación de Akt	70
8. CONCLUSIONES	71
9. PERSPECTIVAS	73
10. BIBLIOGRAFÍA	74
11. APÉNDICE	78
11.0.1. Soluciones	79
11.0.2. Kits utilizados para la medición de glucosa, insulina, triglicéridos, adiponectina y leptina	82
11.0.3. Equipos	84



LISTA DE ABREVIATURAS

SM	Síndrome Metabólico
AMP	Adenosín Monofosfato
AMPK	Proteína Cinasa dependiente de AMP
RI	Resistencia a la Insulina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ATP III	Adult Treatment Panel III
HOMA	Homeostasis Model Assessment
NCEP	National Colesterol Education Program
IDF	International Diabetes Federation
OECD	Organización para la Cooperación del Desarrollo Económico
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
IR	Insulin Receptor
IRS	Insulin Receptor Substrate
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5 phosphate
PDK	Phosphoinositi dedependent kinase
PKB/Akt	Proteín Kinase B or Akt
M	Molar
nM	Nanomolar
mM	Milimolar



mL	Mililitro
L	Litro
dL	Decilitro
G	Gramo
Pg	Picogramo
μ L	microlitro
μ g	microgramo
Fig	Figura
HEPES	Hydroxyethyl piperazine-ethane-sulphonic acid
KCL	Cloruro de Potasio
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
NaF	Floruro de Sodio
NaPPi	Pirofosfato de Sodio
DTT	Dithiothreitol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo



RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es el conjunto de factores de riesgo para la salud, entre los que se encuentran las dislipidemias, la obesidad, la hipertrigliceridemia, la resistencia a la insulina (RI), la diabetes tipo II, la presión arterial alta y la arterioesclerosis.

El constante aumento del síndrome metabólico se ha vuelto un importante problema de salud a nivel mundial y en nuestro país, aunado al aumento de obesidad y más alarmante aún, a la obesidad infantil, de ahí la importancia de su estudio e investigación.

El SM desencadena en diversas enfermedades como la diabetes tipo II e importantes riesgos cardiovasculares que cobran actualmente la vida de miles de personas.

El SM es el resultado de una serie de interacciones complejas y es multifactorial dentro de los cuales se encuentran:

- Factores ambientales
- Factores genéticos
- Factores metabólicos
- Así como el sedentarismo y la alimentación alta en calorías, hábitos propios de cada persona.

Dentro de las complicaciones del síndrome metabólico se encuentran las afectaciones irreversibles en los diferentes tejidos periféricos: hígado, riñón y corazón y las consecuentes alteraciones metabólicas.

Dentro de las principales consecuencias se encuentra la resistencia a la insulina (RI), la cual se produce cuando las células receptoras de insulina pierden sensibilidad ante la presencia de la misma. En cada tejido afecta diferentes niveles, por ejemplo: en músculo altera la



captación de glucosa estimulada por insulina, en hígado disminuye la capacidad para capturar, almacenar y liberar glucosa, así como lipoproteínas de baja densidad, lo que lleva a un desbalance energético; en tejido adiposo aumenta la liberación de ácidos grasos libres y altera la captación y utilización de glucosa.

Está comprobado que la RI altera varias cascadas de señalización, una de ellas es la vía de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) la cual funciona como sensor de la célula en su estado metabólico, nutricional y energético. Uno de los agentes hipoglucemiantes que puede mejorar el balance energético de la célula a través de la activación de esta cinasa es la metformina.

En este trabajo se investigó cómo se ve afectada la vía de señalización de la insulina y la activación de la AMPK en hepatocitos de un modelo de ratas con Síndrome metabólico inducido con una dieta alta en hidratos de carbono. En este estudio se pudo observar que el SM afecta el metabolismo energético en ratas, evaluado por la activación de la AMPK, así también la resistencia a la insulina, la cual es un antecesor de la Diabetes Mellitus tipo II y de importantes riesgos cardiovasculares.

En este trabajo también se observó que al ser tratado el SM con un hipoglucemiante vía oral, como lo es la metformina, se revierten hasta cierto punto las alteraciones metabólicas, pero sin llegar hasta sus niveles normales.

Se puede concluir que en hepatocitos del modelo de SM tienen disminuida la fosforilación de la proteína AMPK, la cual regula el metabolismo energético. También se encuentra afectada la fosforilación de la proteína Akt, la cual es un indicador de la afectación que sufre la vía de la insulina. Las ratas con SM al ser tratadas con metformina restauran la



respuesta de la proteína AMPK y de la proteína Akt.

Palabras clave: Síndrome metabólico, Resistencia a la Insulina, Metabolismo energético, AMPK.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN



1.1. Síndrome Metabólico

El Síndrome metabólico fue descrito inicialmente por Gerald Reaven en 1988 como “Síndrome X”, aunque ya desde años anteriores se había mencionando la posible relación entre obesidad y diabetes, Reaven lo definió como el conjunto de alteraciones en la homeostasis de la glucosa, de la insulina, los bajos niveles del colesterol HDL y la tensión arterial elevada. También sugirió que los cambios presentes en el metabolismo de la insulina (la insensibilidad y los altos niveles de la misma en sangre) representan por sí mismos un factor de riesgo cardiovascular (1).

Posteriormente, diferentes investigadores coincidieron en que la pérdida de sensibilidad a la insulina, tanto la insulino resistencia y la hiper-insulnemia, así como la hipertensión, la hiperlipidemia y la arteriosclerosis, son los principales factores de riesgo del SM, razón por la que lo denominaron “Síndrome de la resistencia a la insulina”. Subsecuentemente en 1997, Meigs y colaboradores determinaron que sólo dos parámetros, la insulino resistencia y la hiperinsulinemia, no podían explicar este síndrome, por lo que había que redefinirlo como “Síndrome Metabólico”(SM).

Debido a que el SM tiene un origen múltiple, es difícil establecer con claridad los factores de predisposición y más aun sus alteraciones consecuentes (Figura 1.1). En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido que para diagnosticar a una persona con SM se requiere que estén presentes al menos tres de los de los siguientes criterios característicos (2):

1. Diabetes tipo II
2. Dislipidemias (Hipertriglicéridemias)
3. Obesidad abdominal



4. Resistencia a la insulina (RI)

5. Presión arterial alta

6. Arterioesclerosis.

A continuación se presenta las definiciones de algunos componentes que integran al SM según la OMS.

1.1.1. Obesidad

La obesidad está definida por un elevado índice de masa corporal (IMC) y obesidad central. El IMC es la medida más utilizada en general para determinar a la obesidad y se define por la relación entre el peso y la talla elevada al cuadrado (kg/m²) (3).

Fórmula para calcular el IMC:

$$\text{IMC} = \text{Peso (Kg)} / \text{Estatura}^2 \text{ (m)}$$

$$\text{IMC} = 18 - 25 \text{ ————— Normal}$$

$$\text{IMC} = 25 - 29.9 \text{ ————— Sobrepeso}$$

$$\text{IMC} \geq 30 \text{ ————— Obesidad}$$

1.1.2. Dislipidemias

Las dislipidemias son las alteraciones en las concentraciones de lípidos en la sangre que representan un riesgo para la salud.

1.1.3. Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus tipo II es un estado de hiperglucemia crónica producida por diversos factores cuyos mecanismos fisiopatológicos son complejos, sin embargo el principal factor



para su desarrollo es la deficiencia de la producción y utilización de la insulina, así como la no utilización de la glucosa por los tejidos periféricos (3).

1.1.4. Arterioesclerosis

La arterioesclerosis se define como las alteraciones en la capa íntima de las arterias, y se caracteriza por el acúmulo focal de colesterol y otros lípidos, tejido fibroso, hidratos de carbono complejos, sangre y productos hemáticos (fibrina) que se acompaña de alteraciones más o menos importantes de la capa media (3).

1.1.5. Hipertensión

La hipertensión se define como un aumento de la presión arterial hasta 140/90 mmHg como mínimo. La presión sistólica, corresponde a la presión generada cuando el corazón se contrae y se bombea la sangre hacia las arterias. Después, el corazón se relaja, momento que coincide con la presión arterial diastólica (segundo valor).

1.1.6. Resistencia a la insulina

La Resistencia a la Insulina es la alteración de la respuesta tisular a la acción de la insulina, la cual se refiere a una menor captación de glucosa mediada por insulina (3).

El creciente interés por el estudio del SM está basado en su asociación con el aumento de mortalidad provocado por enfermedades cardiovasculares en la población mundial, la disminución de la esperanza de vida y el costo monetario que implica su tratamiento para las instituciones de salud. De ahí la importancia de invertir en campañas que informen adecuadamente a la población para su prevención y su eventual erradicación.

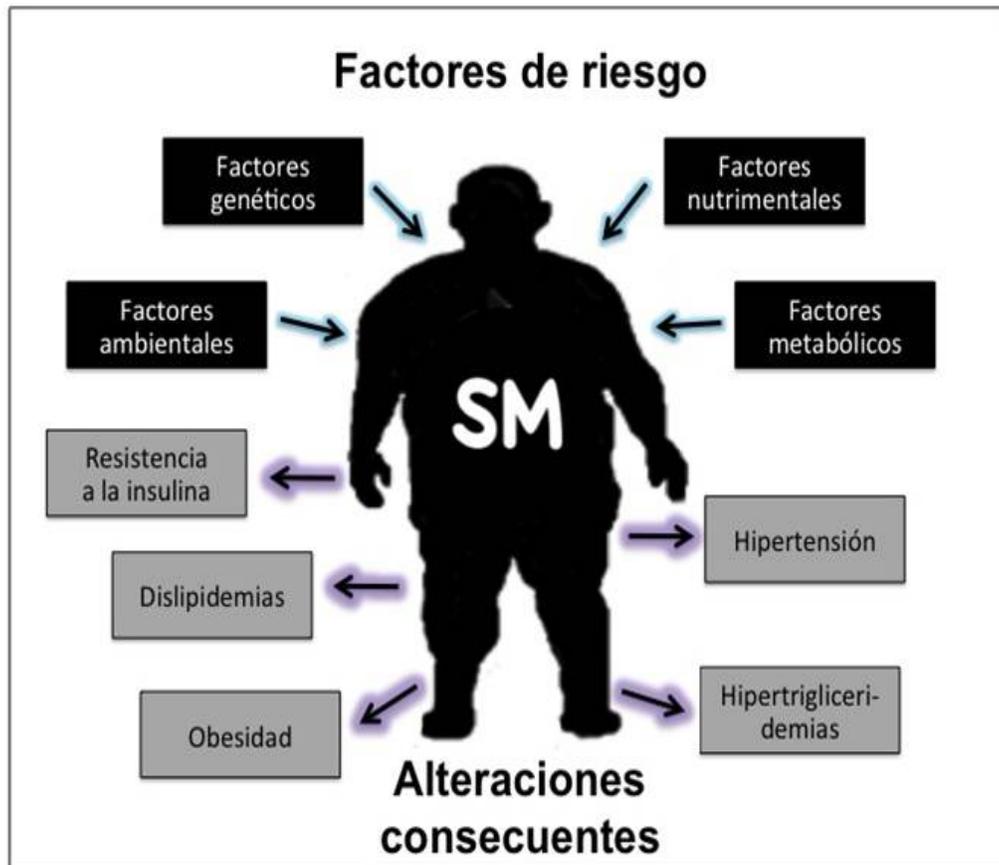


Figura 1.1: Factores de riesgo y alteraciones consecuentes del Síndrome Metabólico.

Capítulo 2

ANTECEDENTES



2.1. Definición del SM según la OMS

En 1998, la OMS proporcionó los siguientes criterios para determinar si un individuo presenta el Síndrome Metabólico:

Presentar Diabetes tipo II, Hiperglicemia o Hiperinsulinemia, y dos de las características presentadas en la Cuadro 2.1 (4). En ésta se incluye otro factor llamado microalbuminuria (MA), que se define como la elevación persistentes de albúmina en la orina y es un factor de riesgo importante para las enfermedades cardiovasculares ya que presenta un alto riesgo para la mortalidad cardiovascular temprana tanto en la diabetes tipo 2 como en la hipertensión arterial. La MA también implica presencia de arterioesclerosis (5).

Entre los pacientes no diabéticos, con hipertensión arterial, la MA se relaciona con presiones sanguíneas elevadas, colesterol sérico total elevado y lipoproteínas de alta densidad-colesterol disminuidas.



Diabetes tipo II, alteración de la tolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y/o glucemia basal > 110 mg/dL y/o HOMA* anormalmente elevados; y dos de los siguientes criterios:		
Parámetro	Hombres	Mujeres
Proporción cintura/cadera	> 0.90 m	> 0.85 m
Triglicéridos en suero	≥150 mg/dL (8.3 mmol/L)	
Colesterol HDL	< 35 mg/dL (1.9 mmol/L)	< 39 mg/dL (2.2mmol/L)
Índice de excreción de albúmina en orina	>20 µg/min	
Tensión arterial	≥140/90 mmHg	

Cuadro 2.1: **Definición de la OMS del síndrome metabólico.** *HOMA (Homeostasis Model Assessment, por sus siglas en inglés): Es el modelo homeostático, utilizado para evaluar los niveles de insulina en ayunas en personas con tolerancia normal a la glucosa. $HOMA = (Insulina \mu U / mL \times glucosa \text{ mmol/L}) / 22,5$. De acuerdo a este método, un elevado índice de HOMA significa una baja sensibilidad a la insulina (6).



2.2. Definición del SM según la NCEP y ATP-III

En el año 2001, el Programa de Educación Nacional de Colesterol (NCEP por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos y el Panel de Tratamiento de Adultos III (ATP-III) establecieron los parámetros para definir si un individuo presenta SM. En éste estudio se establece que una persona con SM debe presentar tres de las siguientes cinco características presentadas en la Cuadro 2.2 (7).

Presentar 3 de los 5 criterios para definir al SM		
Parámetro	Hombres	Mujeres
Obesidad abdominal: circunferencia de cintura	> 102 cm	> 88 cm
Triglicéridos en suero	>150 mg/dL (8.3 mmol/L)	
Colesterol HDL	< 35 mg/dL (1.9 mmol/L)	< 45 mg/dL (2.2mmol/L)
Glucosa en ayunas	> 110 mg/dL	
Tensión arterial	>130/85 mmHg	

Cuadro 2.2: **Definición del SM por la NCEP-ATP III.**

2.3. Definición del SM según la IDF

La Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) solicitó a un grupo de epidemiólogos, pertenecientes a diferentes organizaciones del mundo, establecer una



nueva definición mundial de SM, pidiendo que estableciera los criterios con los que se pudiera diagnosticar a los pacientes con SM, tanto en el ámbito epidemiológico como en el clínico, de una manera sencilla para su pronto tratamiento. Después de su estudio, la IDF estableció que un paciente con SM debería presentar obesidad abdominal y más de 2 de los criterios enlistados en la Cuadro 2.3 (8).

Obesidad abdominal más de 2 de los siguientes criterios:		
Parámetro	Hombres	Mujeres
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL (8.3 mmol/L)	
Colesterol HDL	< 40 mg/dL (1.03mmol/L)	< 50 mg/dL (1.29mmol/L)
Glucosa en ayunas (o DM2)	≥ 100 mg/dL (5.6mmol/L)	
Tensión arterial	$\geq 130/85$ mmHg	

Cuadro 2.3: **Definición del SM por la IDF.**

2.4. SM en el mundo

En el mundo industrializado en el que vivimos, el estilo de vida sedentario es común para poblaciones urbanas. Además el tipo de alimentación basado en comida rápida ha propiciado que la tasa de obesidad se triplique de una generación a otra y como consecuencia



aumente el riesgo a desarrollar síndrome metabólico (9).

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES) 1999-2002, en Estados Unidos se mostró que el SM se desarrolla según las diferentes etnias y con ello la ATP III y la IDF determinaron que el índice de prevalencia de SM en su población es el siguiente: en hombres blancos la prevalencia de SM es de 35 % (IDF 42.6 %), mientras que en los hombres afro-americanos fue de 21.6 % (IDF 24.2 %) (9). En ese estudio se observó que las mujeres de origen mexicano tienen la mayor prevalencia de SM con un 37.8 % (39.2 % IDF), mientras que las mujeres blancas y las afro-americanas es de 33.7 % y 33.8 % respectivamente (36.9 % y 35.8 % IDF) (8).

La NHANES también reveló que a pesar que no se cuenta con suficientes cifras para establecer la prevalencia de otros grupos étnicos, sí se conoce que en las poblaciones Indio-americano, Hawaianos, Filipinos y Polinesios tienen un mayor riesgo a padecer SM que la población de descendencia europea (9). Por otra parte, de acuerdo con un estudio reportado por Lee y colaboradores (2006), se revela que de los niños que habitan en los Ángeles California con la tendencia a desarrollar obesidad, los latinos encabezan la lista con un 24 %, seguidos por los descendientes de las islas del pacífico con un 19 %, en tercer lugar los indoamericanos con un 16 % y al último aparecen los asiáticos con un 10 % de obesidad infantil. Los mismos autores consideran que estos valores pueden ser asignados para la población mundial.

También es importante mencionar que en países que forman parte de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD por sus siglas en inglés) la tasa de obesidad y sobrepeso se ha incrementado en la última década. En la figura 2.1 puede observarse la prevalencia de obesidad en el mundo de acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad 2012 (12). En este estudio realizado por la OECD sobre la



prevalencia de la obesidad 2012, Estados Unidos y México son los dos países con las poblaciones con mayor tasa de sobrepeso y obesidad con un 33.8% y 30% respectivamente del total de sus habitantes, y en contraste se encuentran países como Japón y Corea con un 4% de obesidad en su población (11). Dicho estudio también revela que México ocupa el primer lugar a nivel mundial en obesidad infantil, seguido de Grecia, Estados Unidos e Italia. Finalmente, otros países que han incrementado significativamente la problemática de obesidad en su población se encuentran Canadá, Irlanda y Estados Unidos con un aumento de entre el 4.0 y 5.0%, en la última década (13).

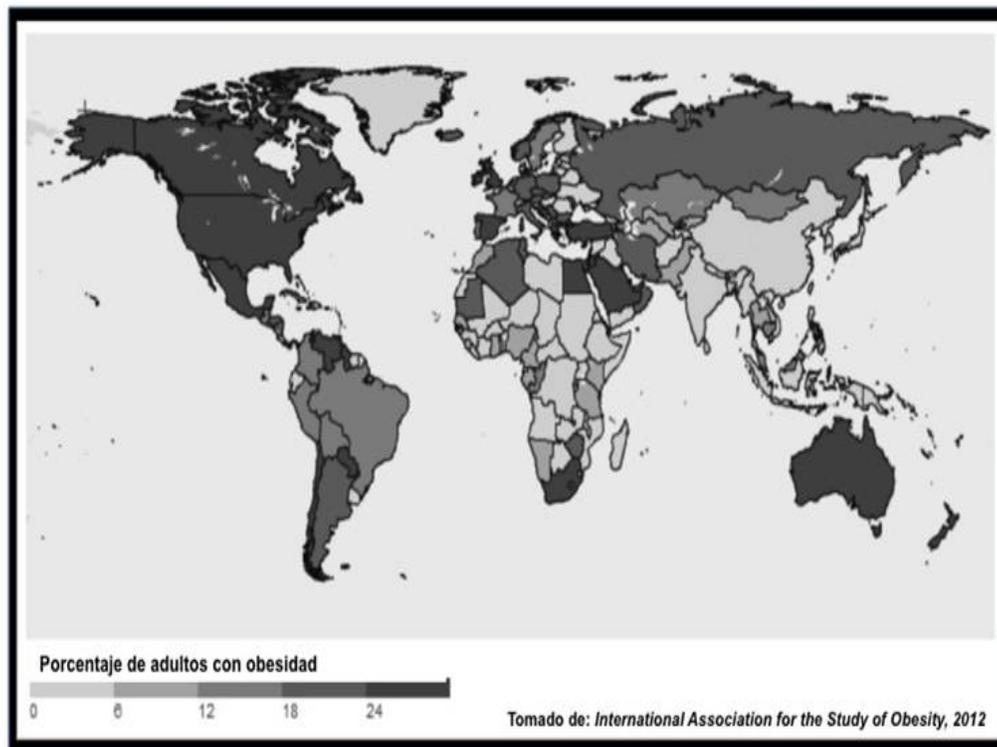


Figura 2.1: **Prevalencia de obesidad en el mundo.** Tomado de: International Association for the study of obesity (12).



2.5. SM en México

De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud realizada en el año 2000, se encontró que la población mexicana mayor de 20 años presenta una prevalencia del 24 % en obesidad, ponderada para edad y género. En la misma encuesta se reportó una prevalencia del 11 % para la Diabetes Mellitus tipo II (DM2) y de un 30 % para la hipertensión arterial (14).

Por otra parte, los estudios sobre la prevalencia nacional de SM reportados por el ATP III, e IDF indican que los adultos mayores de 20 años de edad presentan el SM en un 36.8 % para el ATP III, y 49.8 % para la IDF, siendo las mujeres las más afectadas que en los hombres. Lo anterior se explica por el hecho de que las mujeres tienen un mayor porcentaje de obesidad. La prevalencia de SM aumentó conforme a la edad y fue ligeramente mayor en la población que reside de las áreas metropolitanas o en la región centro-occidente del país y con el menor nivel de escolaridad.

En suma, una gran proporción de la población mexicana presenta SM, el cual es considerado como antecedente de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular; dos de las principales causas de mortalidad en población adulta en México. Por lo tanto la búsqueda intencionada de los componentes para desarrollar el SM podrá ayudar a identificar a la población en diferentes niveles de riesgo y proporcionar el tratamiento adecuado de cada componente que permitiría prevenir o retardar la aparición de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares.

Por otro lado, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) del 2006 publicó que a nivel nacional la prevalencia de la circunferencia de cintura considerada como obesidad abdominal, fue del 83.6 % para las mujeres y 63.8 % para los hombres. Destacando que en los estados de Colima, Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Baja California Sur



y Tamaulipas 7 de cada 10 hombres sufren sobrepeso y obesidad.

En el caso de las mujeres, se encuentra esta misma proporción (prevalencia combinada de sobrepeso más obesidad superior a 70 %) se halló en 23 de los 32 estados que conforman el país, es decir, en 72 % del territorio nacional. El estado con la mayor prevalencia de mujeres con sobrepeso y obesidad, combinada, fue Baja California Sur, donde 8 de cada 10 mujeres adultas padecen este exceso de peso (80.9 %) (16).

De acuerdo con Aguilar-Salinas y colaboradores en su estudio realizado en el 2003, en una población mexicana donde participaron 2, 158 personas de ambos géneros en un rango de edad de 20-69 años y tras un periodo de ayuno de 9-12 horas, observaron que la prevalencia del SM en México era del 13.61 % según los criterios de la OMS y del 26.6 % de acuerdo con la definición de la NCEP-II y la prevalencia para sujetos con diabetes fue de 9.2 % (según OMS) y 21.4 % (según NCEP-II). Es interesante mencionar que el 35 % de los casos eran personas menores a los 40 años. Para el diagnóstico el criterio que se utilizó en el 90 % de personas fue el sobrepeso y/o la obesidad.

Por otro lado, según los criterios de la OMS se encontró que el 61 % de sujetos incluidos en este estudio, se encontraban con una presión arterial mayor a 140 / 90 mmHg. Y se concluyó que 42.1 % de los sujetos en estudio necesitarían modificar su estilo de vida y el 18.9 % requerirían empezar un tratamiento con medicamentos (17).

De acuerdo con la Secretaría de Salud, México ocupa el primer lugar en índices de obesidad infantil y el segundo en adulta, así como el primer lugar en diabetes infantil. La diabetes y las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en nuestro país, asociadas frecuentemente a la obesidad y al sobrepeso (Figura 2.2).

De acuerdo con la última Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 52.2 millones de mexi-



canos sufren de sobrepeso y obesidad. Enfermedad que disminuye 6 años el promedio de vida de las mujeres y 7.2 años el de hombres.

Alrededor de 4 millones y medio de niños de entre cinco y once años tiene sobrepeso. En la última década, el sobrepeso tuvo un incremento del 77% en infantes con este rango de edad.

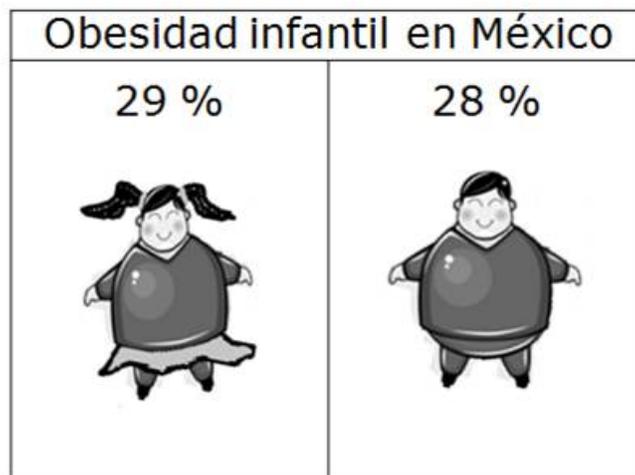


Figura 2.2: **Porcentaje de obesidad infantil en México de acuerdo con la OECD (2010).**

La Secretaría de Salud afirma que de continuar estas tendencias en 2015 la obesidad puede representar una carga financiera superior a los 100 mil millones de pesos, de los cuales 70 mil corresponderían a gastos médicos.

La prevalencia del SM en la población mexicana ha ido en aumento, debido a que es un síndrome de múltiples factores, y existe una correlación muy estrecha entre el aumento de sobrepeso y obesidad con el aumento de la DM2. Y es alarmante como a través de los años estas enfermedades han ido en aumento considerablemente, volviéndose uno de los



principales problemas de salud en nuestro país.

2.6. Patogénesis del SM

El Síndrome Metabólico por tener una estrecha relación con la resistencia a la insulina fue también conocido como Síndrome de la Resistencia a la Insulina, dentro de sus factores de riesgo se puede relacionar la inactividad física con la obesidad, desórdenes y alteraciones en el tejido adiposo, así como la alimentación alta en grasas y en hidratos de carbono con diversas alteraciones a nivel molecular, pero al ser un síndrome multifactorial también tiene consecuencias múltiples (11).

La disminución de la sensibilidad a la insulina conduce a un menor ingreso de glucosa al músculo y tejido graso y posteriormente a la hiperglucemia que estimula a las células beta pancreáticas a producir más insulina y finalmente, el agotamiento de éstas con la aparición de hiperglucemia e hiperinsulinemia (Diabetes tipo II).

Otro de los factores que están involucrados en el SM son las alteraciones inducidas por obesidad y riesgos cardiovasculares. El tejido adiposo es el encargado de secretar numerosas adipocinas, que están relacionadas con el metabolismo de lípidos y de glucosa. Algunas de estas adipocinas se encuentran también involucradas en la sensibilidad de la insulina y la modulación de su vía.

La resistencia a la insulina está fuertemente vinculada con la grasa abdominal más que en otros sitios adiposos. El tejido adiposo, siendo una fuente de reserva de energía para el cuerpo, juega también un papel importante en la modulación de la actividad de la insulina. Regulado por múltiples señales, el tejido adiposo secreta varias moléculas con actividad



hormonal conocidas como adipocinas, entre ellas la adiponectina y la leptina (18, 19).

La adiponectina es una adipocina antiinflamatoria producida por los adipocitos que regula el balance de energía y el metabolismo del tejido adiposo periférico, el mecanismo molecular por el cual media principalmente la sensibilidad a la insulina parece estar relacionado con el aumento de la oxidación de ácidos grasos y la utilización de glucosa vía la activación de AMPK entre otras proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y la vía de la insulina (20).

En el hígado la adiponectina inhibe la expresión de las enzimas gluconeogénicas y disminuye la producción de glucosa endógena.

La leptina se produce y se expresa casi exclusivamente por el tejido adiposo blanco. Ésta regula el peso corporal y la actividad de la insulina, el metabolismo y la función reproductiva (20).

En un estudio se comprobó que a mayores niveles de triglicéridos y de leptina en sangre el riesgo de desencadenar una enfermedad cardiovascular aumenta. A la leptina se la relacionó con una probabilidad mayor de desarrollar diabetes, siendo también mayor el riesgo en mujeres que en varones (21).

La Leptina interviene en el control de la saciedad en el diencéfalo y la alteración en sus niveles produce hiperfagia y obesidad, sus valores están elevados en las personas que presentan SM, lo que podría implicar un defecto de su actividad.



2.7. Resistencia a la Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica formada de 2 cadenas: La cadena α compuesta de 21 aminoácidos y la cadena β compuesta de 30 aminoácidos. Esta hormona es producida por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y es distribuida de forma endocrina por la sangre al resto del organismo, su principal función es la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono (23).

La resistencia a la insulina (RI) es una condición donde los tejidos no responden adecuadamente a la insulina en circulación, es decir disminuye la sensibilidad de sus receptores, puede definirse también como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos periféricos, como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo. La RI afecta principalmente al transporte intracelular, a las vías metabólicas de la glucosa y al metabolismo de lípidos. Cualquier alteración en la vía de señalización de la insulina puede producir resistencia a la insulina. También pueden verse afectadas otras acciones de la insulina, como la captación y transporte de aminoácidos, la síntesis de proteínas, la regulación de la función endotelial, la estimulación del crecimiento y la proliferación celular o la expresión de numerosos genes reguladores de estas diferentes funciones (24).

El principal contribuyente en el desarrollo de RI es el exceso de ácidos grasos libres (AGL) circulantes que derivan de las reservas del tejido adiposo (TA) o de la lipólisis de lipoproteínas ricas en el TA. Al desarrollarse la RI, aumenta la liberación de AGL en el tejido adiposo que, a su vez, inhiben los efectos antilipolíticos de la insulina. Los AGL suponen un exceso de sustrato para los tejidos sensibles a la insulina y provocan alteraciones del



sistema de señales que regulan el metabolismo de la glucosa.

La RI puede ser producto de varios factores que producen el Síndrome Metabólico y a consecuencia de esto se presentan alteraciones en cualquiera de las etapas de la vía de señalización de la insulina, provocando así una hiperinsulinemia (20).

2.7.1. Vía de señalización de la Insulina

El receptor de Insulina (IR) es un tetrámero, formado por dos sub-unidades α (extracelulares) y dos sub-unidades β transmembranales e intracelulares, unidas entre sí por puentes disulfuro.

La vía de señalización de la insulina es activada cuando la insulina se une al receptor de insulina (IR) y éste sufre un cambio conformacional, esta señal activa a la cinasa del receptor de insulina (IRK) produciéndose una autofosforilación cruzada del IR β .

La activación del IR β fosforila a la tirosina del sustrato de receptor de insulina 1 y 2 (IRS 1 y 2), el cual reconoce estos residuos fosforilados, la subunidad β del receptor de insulina (IR β) fosforila a IRS y éste a su vez es reconocido por la fosfatidilinositol-trifosfato (PI3K) la cual es una cinasa que modifica los fosfolípidos de la membrana citoplasmática como el fosfatidilinositolbifosfato (PIP₂) produciendo fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP₃) exponiendo así sus sitios de fosforilación (Figura 2.3) (26).

Siguiendo con la activación de esta vía, la cinasa dependiente de fosfoinositoles (PDK) reconoce los sitios expuestos de PIP₃ y fosforila a la cinasa B o Akt, que en consecuencia es activada por su fosforilación en el residuo Thr308 (27). Akt activada, es capaz de fosforilar varios puntos en la cascada de señalización que regulan el crecimiento y sobrevivencia



celular así como del metabolismo energético.

La vía de la proteína cinasa B o Akt (PKB/Akt) es importante ya que regula la señalización de múltiples procesos biológicos esenciales, como lo son la proliferación celular, síntesis de proteínas, prevención de degradación lípidica, translocación de GLUT 4 a membrana citoplásmica para mejorar el transporte de glucosa (con excepción del hígado), entre muchos otros que se ven alterados en el SM principalmente por la resistencia a la insulina.

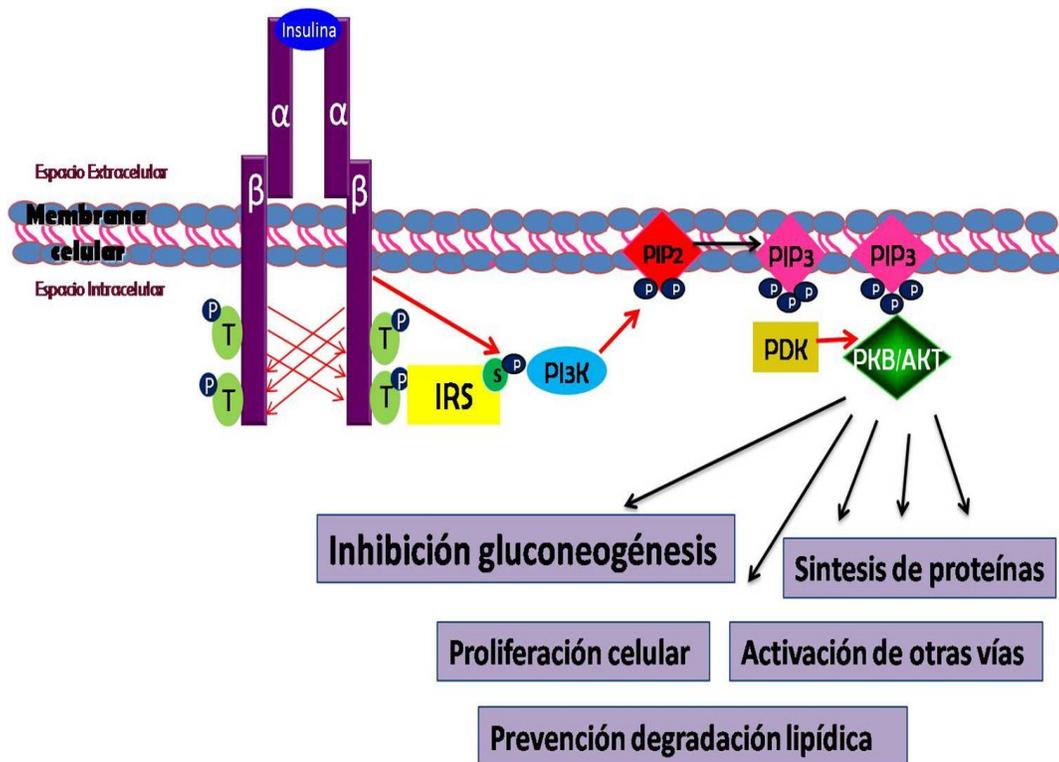


Figura 2.3: **Vía de señalización de la insulina.** La insulina se une al receptor de insulina el cual sufre un cambio conformacional por lo que se autofosforila y a su vez fosforila al IRS, el cual es reconocido por PI3K, éste modifica los lípidos en membrana de PIP2 a PIP3, exponiendo sus sitios de fosforilación reconocidos por PDK que a su vez fosforila a Akt, T=Tirosina, S=Serina, P=Fosforilación (26).



2.8. Metabolismo energético

2.8.1. Proteína Cinasa Dependiente de AMP (AMPK)

La AMPK es una proteína cinasa dependiente de AMPK que actúa como un sensor celular energético que está presente en los eucariotes. Regula los niveles de AMP/ATP, ya que se activa para inhibir el proceso de consumo de energía en reacciones anabólicas como síntesis de proteínas, síntesis de lípidos, síntesis de glicógeno y para activar el proceso de producción de energía de reacciones catabólicas como la oxidación de ácidos grasos y la glicólisis; y así restablecer la homeostasis energética dentro de la célula (Figura 2.4) (23).

La AMPK es un heterotrímero que está formado por una subunidad catalítica α y dos subunidades no catalíticas la β y la γ . Existen dos isoformas de las subunidades α y β (α 1, α 2, β 1 y β 2) y tres genes que codifican para las isoformas de la subunidad γ (γ 1 - γ 3). La isoforma α 2 es la subunidad de la AMPK que predomina en el músculo esquelético y el cardíaco, mientras que, las isoformas α 1 y α 2 están igualmente distribuidas en el hígado (28).

La AMPK es activada cuando se fosforila por acción de una o más AMPK cinasas (AMPKKs). La fosforilación de la AMPK se da en la subunidad α en el residuo Treonina 172 (Tre 172) que se encuentra en el asa de activación.

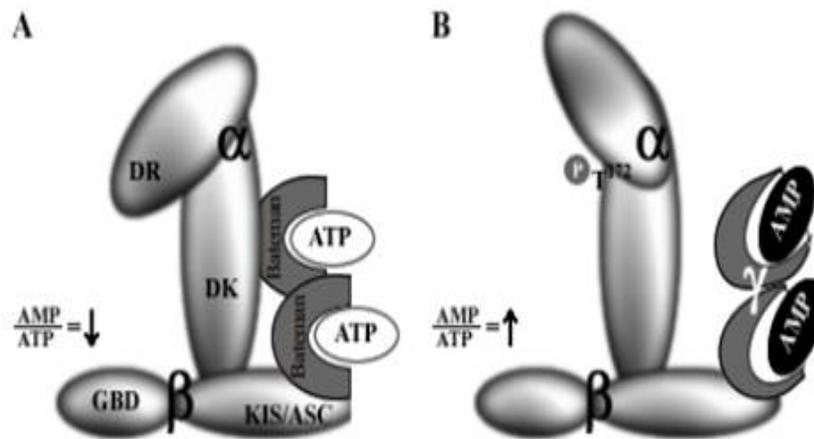


Figura 2.4: **Fosforilación de AMPK (25).** **A)** El dominio catalítico de la subunidad γ , permanece bloqueado mientras los niveles de ATP son normales. **B)** Cuando los niveles de ATP disminuyen la subunidad γ sufre una modificación conformacional debida a la unión de AMP, esto permite que el dominio catalítico se exponga y que se fosforile la Thr 172 completando la fosforilación de AMPK (29).



En el Síndrome Metabólico existe un desbalance energético debido a la obesidad y a la resistencia a la insulina, que posteriormente está asociada con la Diabetes Mellitus tipo II. Activar AMPK a nivel de músculo esquelético ayuda al tratamiento del SM ya que es ahí donde se utilizan los ácidos grasos (29). La AMPK se ha propuesto como regulador energético maestro por la cantidad de vías que regula e inhibe a partir de su activación, como se puede observar en la figura 2.5, la vía de señalización de AMPK.

La AMPK es muy sensible y se puede activar con diferentes estímulos, ya sean químicos (medicamentos) o físicos (ejercicio, hipoxia), por lo que se ha propuesto como un regulador energético durante condiciones energéticas anormales. Para el tratamiento del SM se han utilizado las biguanidas como la metformina y las tiazolidinedionas que activan a la AMPK, aunque no queda claro cómo es que esta droga promueve su fosforilación, sin embargo se ha sugerido que pudiera deberse a su efecto sobre el complejo I de la cadena respiratoria (32). Se considera a la metformina como un fármaco sensibilizador de la insulina, actuando como activador de la vía de AMPK.

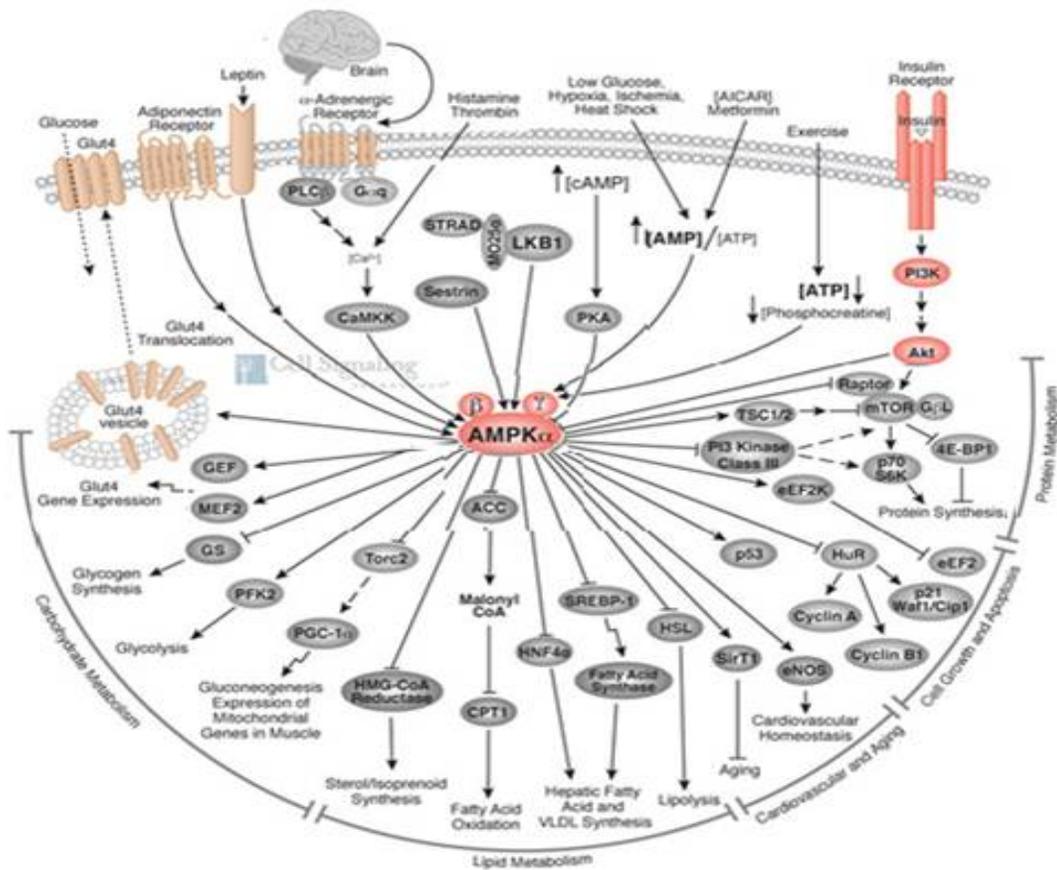


Figura 2.5: **Vía de señalización de AMPK.** Tomado y modificado de Cell SignalingTechnology <http://www.cellsignal.com/reference/pathwayAMPK.html>.



La metformina es una biguanidina oral antihiper glucémica, comunmente utilizada para tratar la diabetes tipo 2, debido a su efecto reductor de glucosa en sangre, a la metformina se le suman diferentes efectos benéficos en la diabetes tipo 2 como la disminución de peso, disminución del perfil lipídico y mejoría en la función endotelial.

La metformina actúa en los estados de la resistencia a la insulina incluso antes de que se desarrolle la hiperglucemia. Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* donde se ha demostrado que el efecto hipoglucemiante de la metformina es principalmente una consecuencia de la reducción de la producción hepática de glucosa y también el aumento de la captación de glucosa periférica y su mejoría al ser utilizada (31).

En el hígado la activación de la vía de AMPK inhibe la gluconeogénesis y la salida de glucosa del hígado, y así favorece la disminución de los niveles de glucemia e insulinemia. Así es como la metformina puede estar actuando a nivel molecular mediante la vía de AMPK como regulador energético, pero aun no se conoce el mecanismo exacto por el cual actúa (23).

Capítulo 3

JUSTIFICACIÓN

El síndrome metabólico es considerado actualmente como una pandemia por sus factores de riesgo como son la obesidad, resistencia a la insulina (RI), diabetes tipo II, presión arterial alta, arterioesclerosis y dislipidemias.

El aumento de obesidad en adultos y el incremento alarmante en obesidad infantil, es un riesgo de salud pública, aunado a la resistencia a la insulina que probablemente conlleve a desarrollar diabetes; son enfermedades consideradas de gran importancia en el país y en el mundo ya que cobran la vida de miles de personas.

El impacto económico, es decir, mayor gasto monetario, que implica el tratamiento de las consecuencias del SM a las instituciones de salud de los diferentes gobiernos, conlleva a la relevancia de la investigación para la prevención del síndrome.

En este trabajo se buscaron biomarcadores de función celular que pueden ser utilizados en un futuro para la prevención y la identificación temprana del síndrome metabólico.

Capítulo 4

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



4.1. Hipótesis

El Síndrome Metabólico altera a nivel molecular las cascadas de señalización de la vía de la insulina y del metabolismo energético (AMPK).

4.2. Objetivo General

Evaluar la resistencia a la insulina y activación de AMPK en hepatocitos de rata con síndrome metabólico inducido por una dieta alta en hidratos de carbono.

4.2.1. Objetivos Particulares

- Inducir el estado de síndrome metabólico (SM) en ratas.
- Evaluar la resistencia a la insulina en hepatocitos de rata con SM por medio de la activación de proteínas en la vía de la insulina (AKT)
- Evaluar la activación de AMPK en hepatocitos de rata con SM estimulados con Metformina.
- Evaluar la activación de AMPK y la resistencia a la insulina en ratas con SM tratadas crónicamente con metformina vía oral.

Capítulo 5

METODOLOGÍA



5.1. Obtención del modelo de síndrome metabólico en ratas

Se utilizaron ratas macho Wistar de la misma edad con un peso aproximado entre 250 g. - 300 g., las cuales se dividieron homogéneamente en cuatro grupos de 5 ratas cada uno por el método de la culebra japonesa, de los cuales al grupo control se les dio agua simple *ad libitum*, y los otros tres grupos para desarrollar el SM fueron alimentados con sacarosa al 30% en el agua de bebida, todos los grupos fueron alimentados con la misma dieta sólida, *ad libitum* durante 16 semanas.

Se llevó un control de peso semanal para hacer el registro de incremento de peso.

Después de las 16 semanas de dieta con sacarosa, se tomó una gota de sangre de la arteria caudal mediante una pequeña incisión para medir triglicéridos utilizando un equipo portátil para determinación de triglicéridos con tiras reactivas (Accutrend GCT de Roche). A uno de los grupos de SM se les continuó la dieta de sacarosa mas el tratamiento con metformina (Glucophage 850 mg de Roche) vía oral (100 mg/kg peso corporal). Un grupo mas de SM se trató con placebo vía oral (2.71 mg/mL de Povidona, 1.08 mg/mL de Estearato de Mg) durante 5 semanas. (Figura 5.1)

Al cabo del tratamiento se obtuvieron muestras de sangre en las que se determinó leptina, adiponectina e insulina por medio de pruebas de ELISA con kit comercial de ALPCO. Se realizó medición de glucosa en sangre con kit de SIGMA GAGO-20, este kit es para la determinación cuantitativa de la glucosa oxidasa por un ensayo enzimático y se midió por espectrofotometría a 540 nm. (Apéndice)

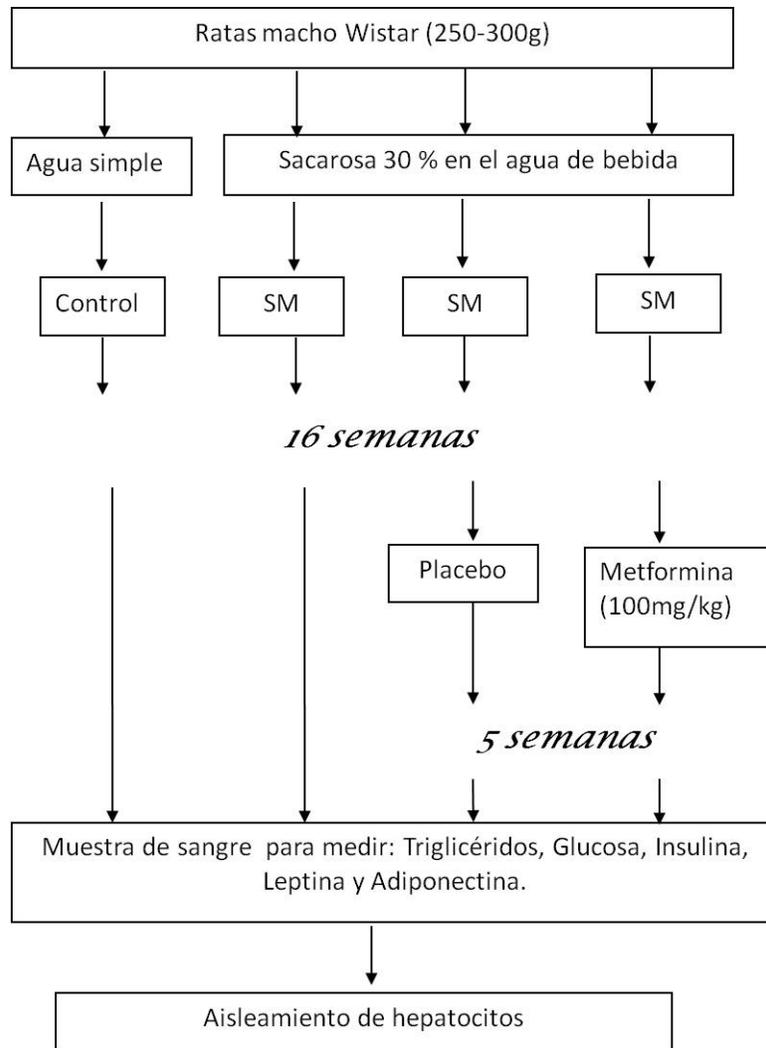


Figura 5.1: Esquema de la metodología para la obtención del modelo de SM.



5.2. Aislamiento de hepatocitos

Se utilizó el método de “Berry and Friends” modificado para aislar los hepatocitos. Se preparó una solución Ringer Krebs (RK) se oxigenó y se llevó a un pH 7.4 con NaHCO₃, se dejó en el sistema de perfusión para estabilizar la temperatura a 37 °C.

Terminado los diferentes tratamientos, la rata se ayunó durante la noche y en la mañana siguiente se anestesió con pentobarbital (0.5 mL / kg de peso corporal), se abrió la cavidad abdominal para exponer el hígado y se canuló por la vena porta para pasar la solución RK.

Se disectó el hígado para separarlo del abdomen de la rata y se colgó y fijó en un sistema de perfusión por el cual se pasaron 10 mg la colagenasa tipo IV (SIGMA), diluída en 10 mL de buffer RK con 4.7 mg de CaCl₂, durante 5 minutos. Pasado este tiempo se retiró el hígado y se disgregaron las células suavemente en una malla, los hepatocitos se recibieron en tubos falcon y se ajustaron a 50 mL con Buffer RK. Las células diluídas se homogenizaron cuidadosamente y se centrifugaron para lavarlas por 2 min / 500 rpm / 22 °C, se decantó el sobrenadante y se repitió 2 veces el lavado.

Al finalizar los lavados se decantó el buffer y el pellet de células se llevó a un volumen final de 30 mL con buffer RK al cual se agregó 10 mL de Percoll (GE) previamente atemperado a 37 °C , se centrifugó 5 min / 1000 rpm/ 22 °C. Por densidad se separaron las células vivas de las muertas, las vivas se quedan en el fondo del tubo y no flotan. (Figura 5.2)

Se observó su viabilidad tomando 10 μL de células y se mezclaron con 10 μL de azul de tripano y se observó en el microscopio.



5.3. Estimulación farmacológica de células aisladas

Las células viables se colocaron en cajas petri con colágena en el fondo resuspendidas en 3 ml de medio α -MEM (GIBCO) con suero fetal bovino (FBS) al 10% en condiciones estériles, se dejaron reposar durante dos horas, que es el tiempo óptimo en el cual la mayoría de las células se pegan a la colágena, en la incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C. Después de este tiempo y en condiciones estériles, se lavó cada caja petri con hepatocitos 3 veces utilizando PBS 1X, esto con la finalidad de eliminar las células muertas, ya que las células viables se pegan en el fondo de la caja por efecto de la colágena.

A las células adheridas se les agregó medio α -MEM sin FBS y se incubaron durante 1 hora en la incubadora con CO₂ al 5% a 37 °C. Los estímulos fueron con las siguientes concentraciones de insulina utilizando 0, 10 y 100 nM, y las concentraciones utilizadas de metformina fueron: 0, 1 y 10 mM (Figura 5.2).

Al terminar el tiempo de estímulo, se lavaron las cajas petri con PBS 1x y se separaron las células de la caja para su recolección utilizando un cell scraper (removedor de células).

5.4. Lisis celular y extracción de la proteína

A las cajas petri con los hepatocitos recolectados se les agregaron 50 μ L de buffer de lisis de la siguiente composición: HEPES 50 mM, KCl 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, B-Glicerolfosfato 5mM, Tritón 0.1 %, NaF 50 mM, NaPPi 5 mM, Ortovanadato 1 nM, DTT 1 nM, PMSF 0.2 nM (Apéndice).

El sobrenadante se recolectó en tubos nuevos, se agitó en un vortex y se guardó a -70 °C.

Para extraer las proteínas de las muestras se hicieron 3 ciclos de congelación y descon-



gelación, utilizando para descongelar agua a 37 °C. Después de esto los sobrenadantes se centrifugaron por 5 min a 14,000 rpm a 4 °C (Figura 5.2).

Terminando la centrifugación el sobrenadante se recuperó y se realizó la cuantificación de proteína.

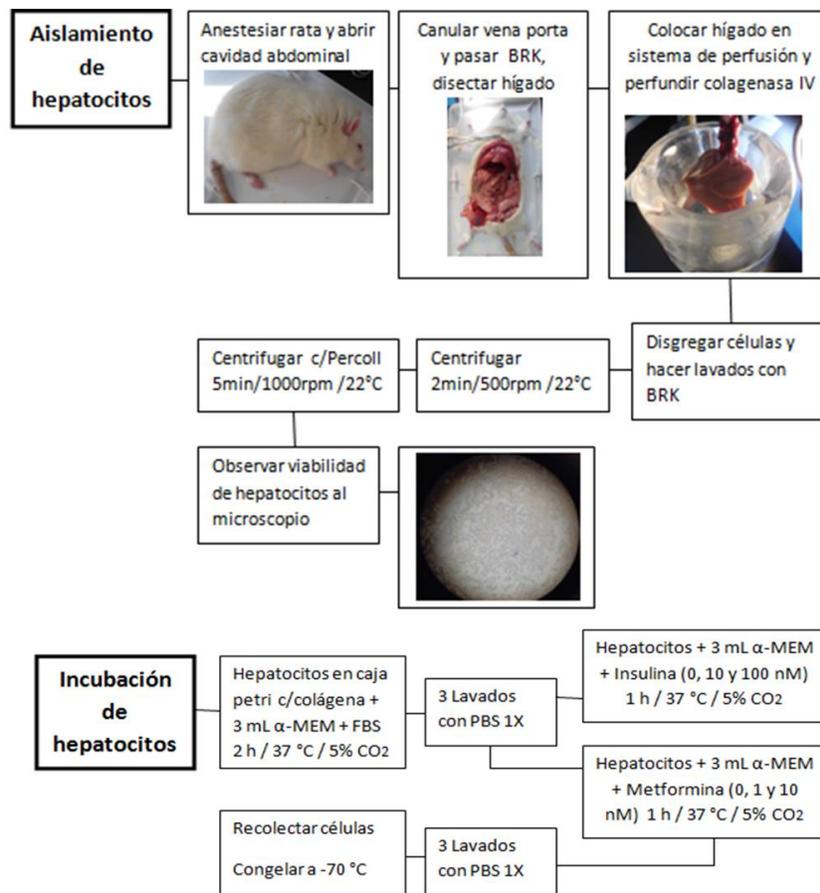


Figura 5.2: Esquema general de aislamiento e incubación de hepatocitos.



5.5. Cuantificación de la proteína por el método de Bradford

La determinación de proteína se realizó utilizando el método cuantitativo de Bradford y los datos se extrapolaron en una curva patrón de albumina sérica bovina (BSA) con concentraciones que iban de 0 a 25 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$.

Como blanco se utilizó agua y se determinó proteína con 3 μL de muestra + 797 μL de agua grado II + 200 μL de reactivo Bradford. Cada una de las condiciones se realizó por triplicado. Las celdas preparadas con las muestras se dejaron reposar 15 minutos con el reactivo de Bradford (SIGMA) y se leyeron a 595 nm en el espectrofotómetro (Cary 100 de Varian).

5.6. Ensayos de Western-blot (Wb) y revelado por quimioluminiscencia

Para el análisis de proteínas por Wb se utilizaron geles de acrilamida-bis-acrilamida de 1 mm de ancho al 8 y al 10% dependiendo del peso molecular de la proteína de interés.

Las muestras por analizar se ajustaron a la misma concentración de proteína y se agregó buffer laemmli 2x para posteriormente hervirse por 5 minutos a 95 °C. Las muestras se cargaron en el gel para la separación de las proteínas por peso molecular en la cámara de electroforesis.

Para la transferencia de los geles se utilizaron membranas de PVDF (Polivinilideno difluoruro), activadas previamente con metanol durante 5 minutos y posteriormente 5 minutos en



buffer de transferencia, los geles se incubaron por 10 minutos en buffer de transferencia. Posteriormente se realizó la transferencia por el método semi-húmedo durante 70 minutos utilizando un amperaje constante de 300 mA. Al finalizar la transferencia la membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas.

La membrana transferida y desteñida con PBS-Tween se bloqueó con leche en polvo libre de grasa al 5 % disuelta en PBS-Tween durante 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween durante 5 minutos cada lavado. La membrana se incubó a 4 °C durante toda la noche en agitación constante con el anticuerpo primario de interés (AMPK-P, AMPK, Akt-P, Akt, actina) utilizando una dilución 1:1000 en leche al 3 % PBS-Tween. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario y se realizaron 3 lavados con PBS-Tween durante 5 minutos. Al finalizar los lavados la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (HRP–conejo o HRP–ratón) a una dilución 1:2000 en leche al 3 % PBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación constante, finalizado el tiempo se retiró la membrana del anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados por 5 minutos con PBS-Tween.

Para el revelado de la membrana se agregó una solución de sustrato luminol y peróxido de hidrógeno 1:1 por 3 minutos, se retiró el sustrato y se reveló por quimioluminiscencia en un fotodocumentador (BioRad) y se guardaron las imágenes obtenidas.

Las bandas de las proteínas reconocidas por el anticuerpo fueron analizadas por densitometría en el programa de Quantity One normalizando los datos con actina.

El esquema general del Western Blot se observa en la Figura 5.3.

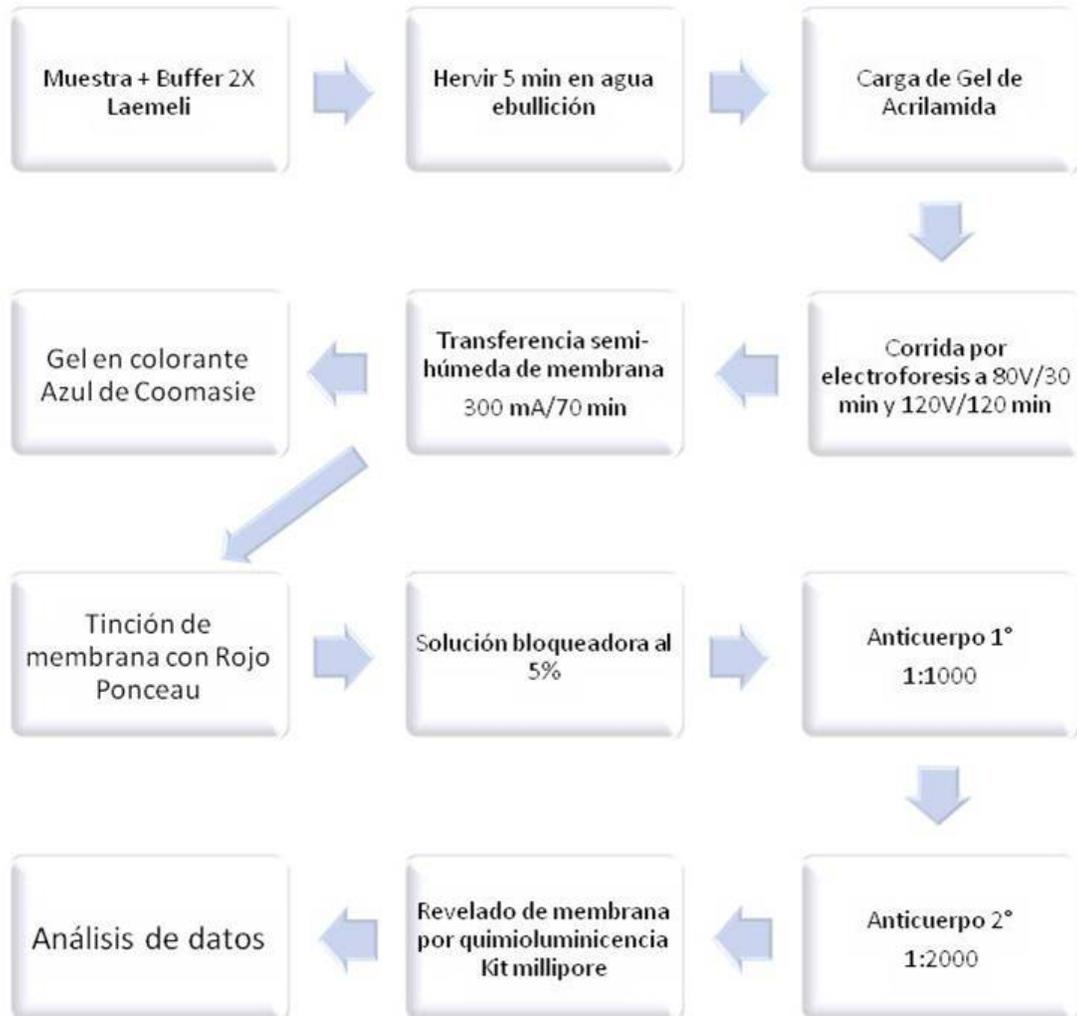


Figura 5.3: Diagrama de Western Blot.



5.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico para el WB y la prueba de ELISA se realizó utilizando la prueba de T de Student y ANOVA de 1 cola con $p \leq 0.05$ para la cual se consideró significativo.

Capítulo 6

RESULTADOS



6.1. Evaluación del modelo del Síndrome Metabólico

El tratamiento con sacarosa al 30% provocó el desarrollo del SM con un aumento notorio en la grasa abdominal de los animales. También se ve reflejado en el aumento significativo en los triglicéridos, adiponectina, leptina, e insulina en sangre. Cuadro 6.1

La metformina disminuye los niveles de los parámetros alterados en el SM.



Variable	Control	SM	SM+Met
Incremento de peso (g)	188.38± 24.8 n=25	175.48± 25.15 n=50	162.05 ± 13 n=10
Grasa abdominal (g)	7.27 ± 2.6 n=25	*16.19 ± 4 n=50	11.25 ± 0.7 n=10
% Grasa abdominal	1.7 ± 0.4 n=25	*3.52± 1.6 n=50	2.54± 0.64 n=10
Adiponectina (ng/mL)	0.98 ± 0.32 n=9	1.61 ± 0.44 n=10	1.51 ± 0.46 n=9
Triglicéridos (mg/dL)	115.2 ± 13.3 n=9	*238.2 ± 53 n=10	152.5 ± 3.54 n=9
Leptina (pg/mL)	238.8 ±33.30 n=9	*572.1 ±30.2 n=10	278.6 ± 33.9 n=9
Glucosa (mg/dL)	132.1 ±5.5 n=9	131.3 ± 9.1 n=10	*115.7 ± 9.4 n=9
Insulina (ng/mL)	5.64 ± 0.38 n=9	*9.20 ± 0.25 n=10	6.24 ± 0.47 n=9
HOMA	1.78 ± 0.33 n=9	*2.84 ± 0.40 n=10	1.93 ± 0.31 n=9

Cuadro 6.1: **Variables en el Síndrome Metabólico.*** $p \leq 0.05$: SM da diferencia significativa comparado con Control y con SM + Metformina. ANOVA de 1 cola Comparación múltiple Bonferroni. HOMA (Homeostasis Model Assessment, por sus siglas en inglés): Es el modelo homeostático, utilizado para evaluar los niveles de insulina en ayunas en personas con tolerancia normal a la glucosa. $HOMA = (\text{insulina } \mu\text{U} / \text{ml} \times \text{glucosa mmol} / \text{L}) / 22,5$. De acuerdo a este método, un elevado índice de HOMA significa una baja sensibilidad a la insulina (4).



6.2. Viabilidad de los hepatocitos por exclusión de tinción de azul de tripano

Después de realizar el aislamiento de los hepatocitos se observaron al microscopio (Figura 6.1) para comprobar su viabilidad por la técnica de exclusión de azul de tripano, los hepatocitos vivos lucen translúcidos, mientras que los no viables se ven teñidos por el azul de tripano (Figura 6.2).

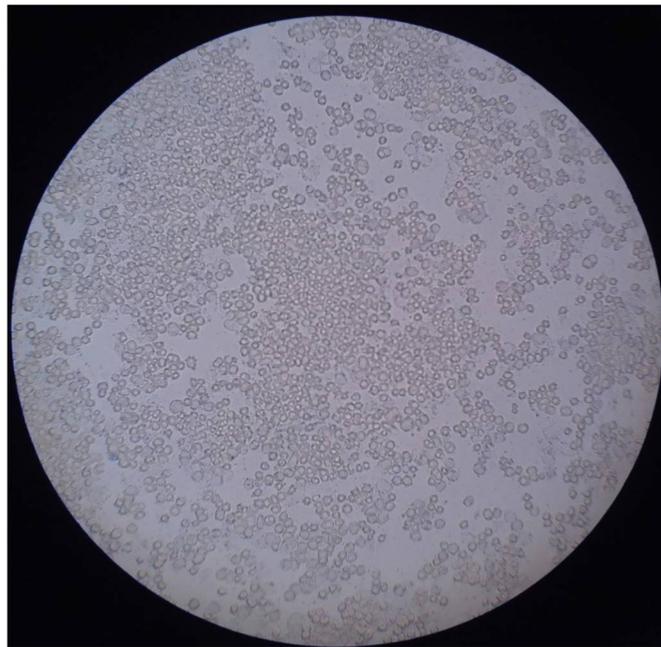


Figura 6.1: Hepatocitos teñidos vista a 10x Se observan los hepatocitos viables translúcidos y los muertos teñidos con azul de tripano.

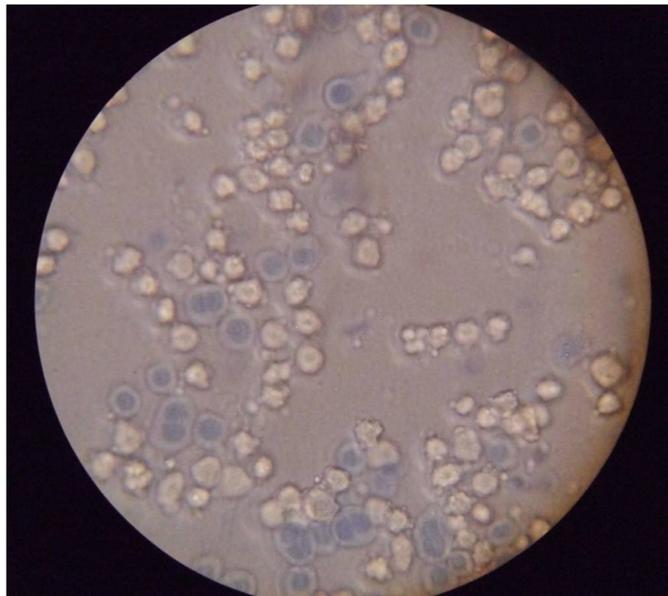


Figura 6.2: Hepatocitos teñidos vista a 40x.



6.3. Análisis de la activación de AMPK en hepatocitos de rata con SM

En hepatocitos de ratas controles y con Síndrome Metabólico, estimuladas con 10 mM de metformina y sin estímulo, se analizó la activación de la proteína de AMPK por ensayos de Western blot, incubadas con un anticuerpo policlonal para reconocer a la proteína fosforilada, AMPK-P, la proteína total AMPK-T y Actina como control de carga.

El anticuerpo de anti AMPK-P reconoció una única banda de peso aproximado de 62 kDa correspondiente a la proteína de AMPK (Figura. 6.3).

El análisis densitométrico de la proteína reconocida por el anticuerpo AMPK-P se muestra en la figura 11, en donde se observa un incremento en la expresión de AMPK-P en las muestras que fueron estimulados con metformina. En las muestras con SM se observa que la expresión de AMPK-P es mucho menor que las muestras controles.

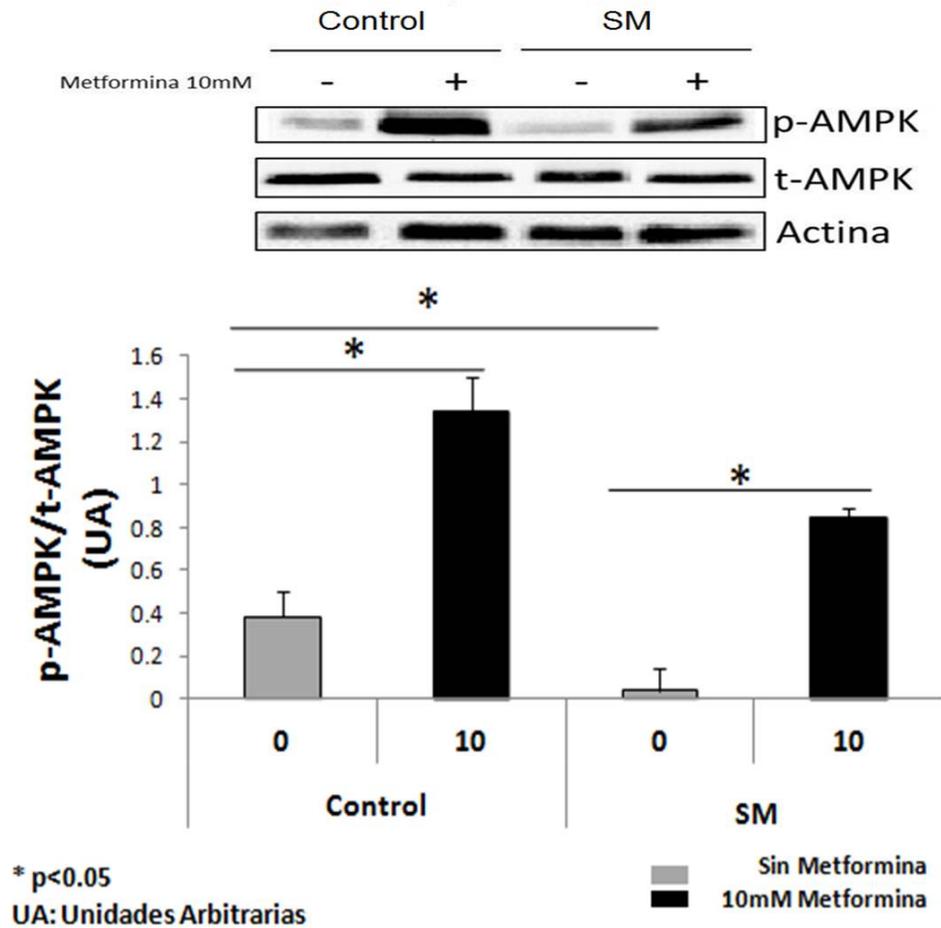


Figura 6.3: Evaluación de la activación de AMPK en hepatocitos de ratas control y con SM estimulados con metformina 10mM. (A) Reconocimiento de los anticuerpos anti AMPK-P, anti AMPK-T y Actina. (B) Análisis densitométrico de la proteína reconocida AMPK.



6.4. Análisis del tratamiento crónico con metformina sobre la activación de AMPK en hepatocitos de rata con SM

Con el fin de establecer si el SM afecta la vía de señalización mediada por AMPK, se evaluó el estado de activación de esta cinasa en hepatocitos provenientes de ratas con SM, mediante Western Blot. Los resultados muestran que los animales con SM tienen un decremento significativo en el nivel de activación basal de la p-AMPK (control 0, SM 0) figura 6.4. También se evaluó si la metformina, un activador de la AMPK, restablece el nivel de activación a los controles cuando los hepatocitos se tratan de manera aguda con dicho fármaco. Como se esperaba, el tratamiento agudo de los hepatocitos control muestra una activación elevada de la p-AMPK, mientras que aquellos provenientes de ratas con SM se activa solo parcialmente. (Figura 6.4).

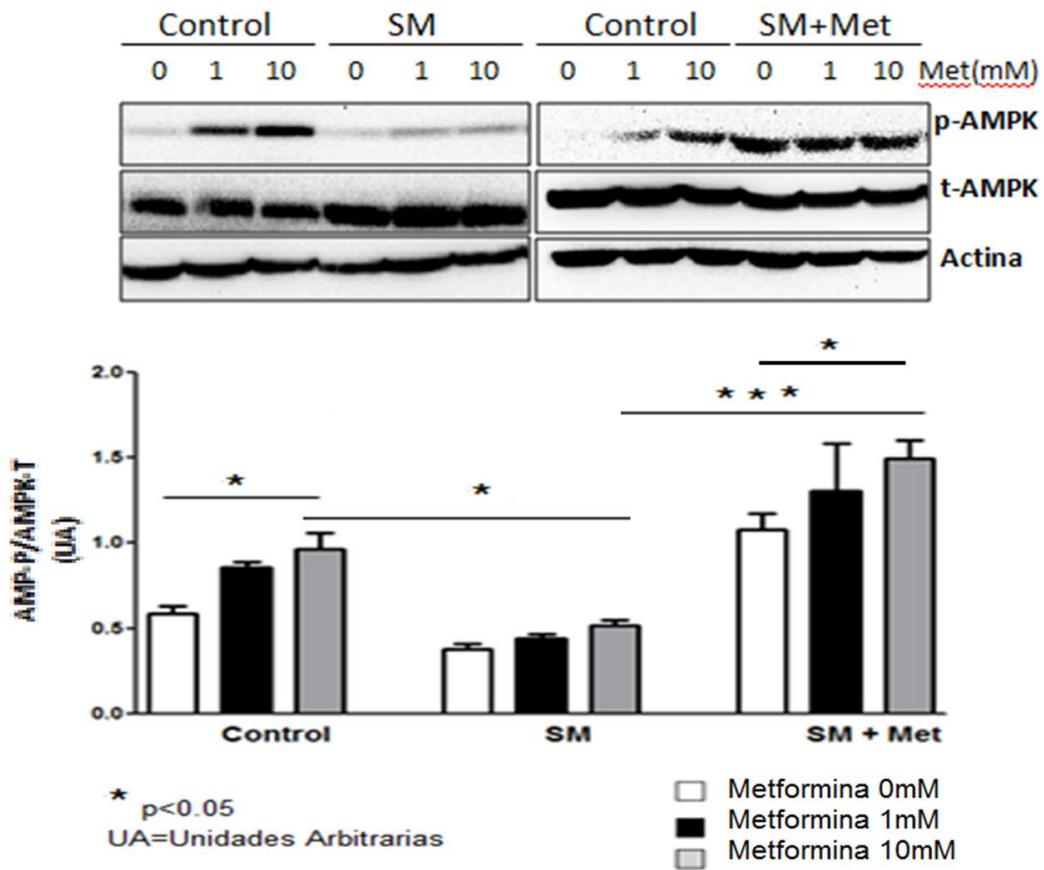


Figura 6.4: Evaluación de la activación de la proteína AMPK en hepatocitos de rata control, SM y SM tratados con metformina vía oral. (A) Reconocimiento de los anticuerpos anti AMPK-P, anti AMPK-T y Actina. (B) Análisis densitométrico de la proteína reconocida AMPK.



6.5. Análisis de la vía de la insulina en hepatocitos de ratas con SM por medio de la activación de Akt

En hepatocitos de ratas controles y con Síndrome Metabólico, estimuladas con 10 nM de insulina y sin estímulo se analizó la activación de la proteína de Akt por ensayos de Western blot, incubadas con un anticuerpo policlonal para reconocer a la proteína fosforilada de Akt-P, la proteína total Akt-T y Actina como control de carga.

El anticuerpo de anti Akt-P reconoció una única banda de peso aproximado de 60 kDa correspondiente a la proteína de Akt (Figura. 6.5).

El análisis densitométrico de la proteína reconocida por el anticuerpo Akt-P se muestra en la figura 6.5. En donde se observa un incremento en la expresión de Akt-P en las muestras que fueron estimulados con metformina. En las muestras con SM se observa que la expresión de Akt-P es mucho menor que las muestras controles.

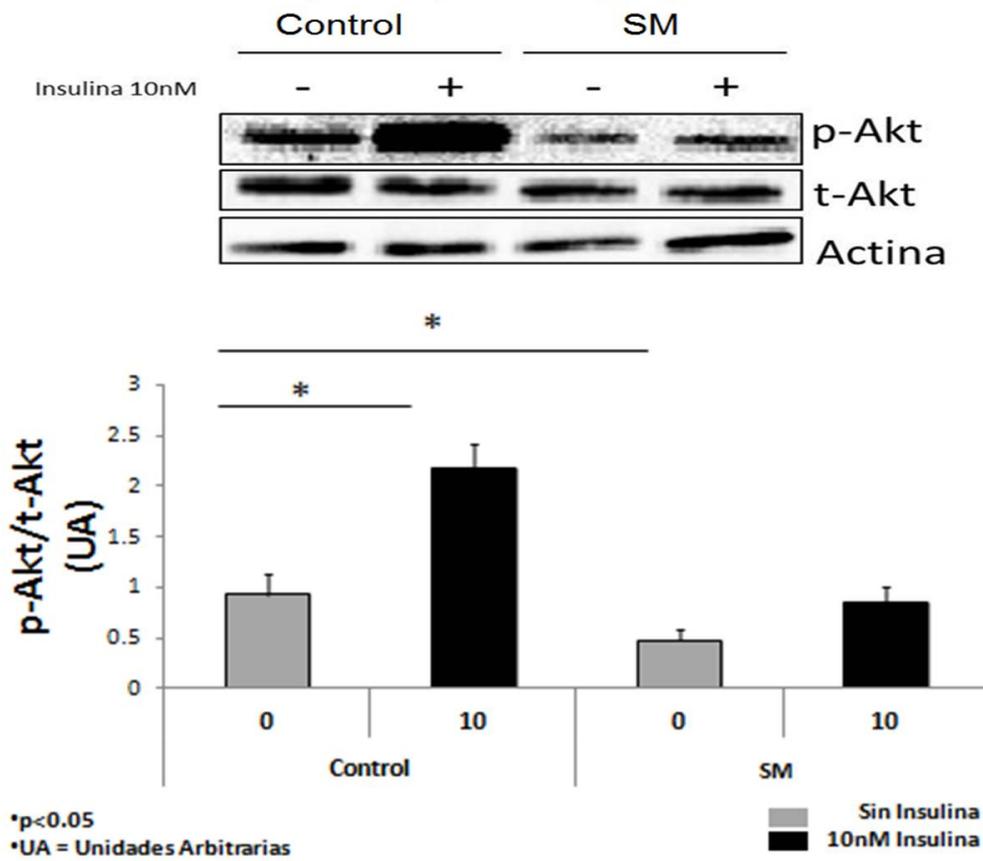


Figura 6.5: Evaluación de la activación de Akt en hepatocitos de ratas control y con SM estimulados con insulina 10nM. (A) Reconocimiento de los anticuerpos anti Akt-P, anti Akt-T y Actina. (B) Análisis densitométrico de la proteína reconocida Akt.



6.6. Análisis del tratamiento crónico con metformina sobre la vía de la insulina en hepatocitos de rata con SM por medio de la activación de Akt

En hepatocitos de ratas controles, con Síndrome Metabólico y Síndrome metabólico tratadas con metformina vía oral, estimuladas con 10 nM y 100 nM de insulina y sin estímulo se analizó la activación de la proteína de Akt por ensayos de Western blot, incubadas con un anticuerpo policlonal para reconocer a la proteína fosforilada de Akt-P, la proteína total Akt-T y Actina como control de carga.

El anticuerpo de anti Akt-P reconoció una única banda de peso aproximado de 60 kDa correspondiente a la proteína de Akt (Figura 6.6).

El análisis densitométrico de la proteína reconocida por el anticuerpo Akt-P se muestra en la figura 6.6. Aquí se observa un incremento en la expresión de Akt-P en las muestras que fueron estimuladas con metformina. En las muestras con SM se observa que la expresión de Akt-P es mucho menor que las muestras controles. Sin embargo en las muestras con SM + Metformina, se ve un leve incremento en la activación de Akt, pero es menor que en las muestras con SM.

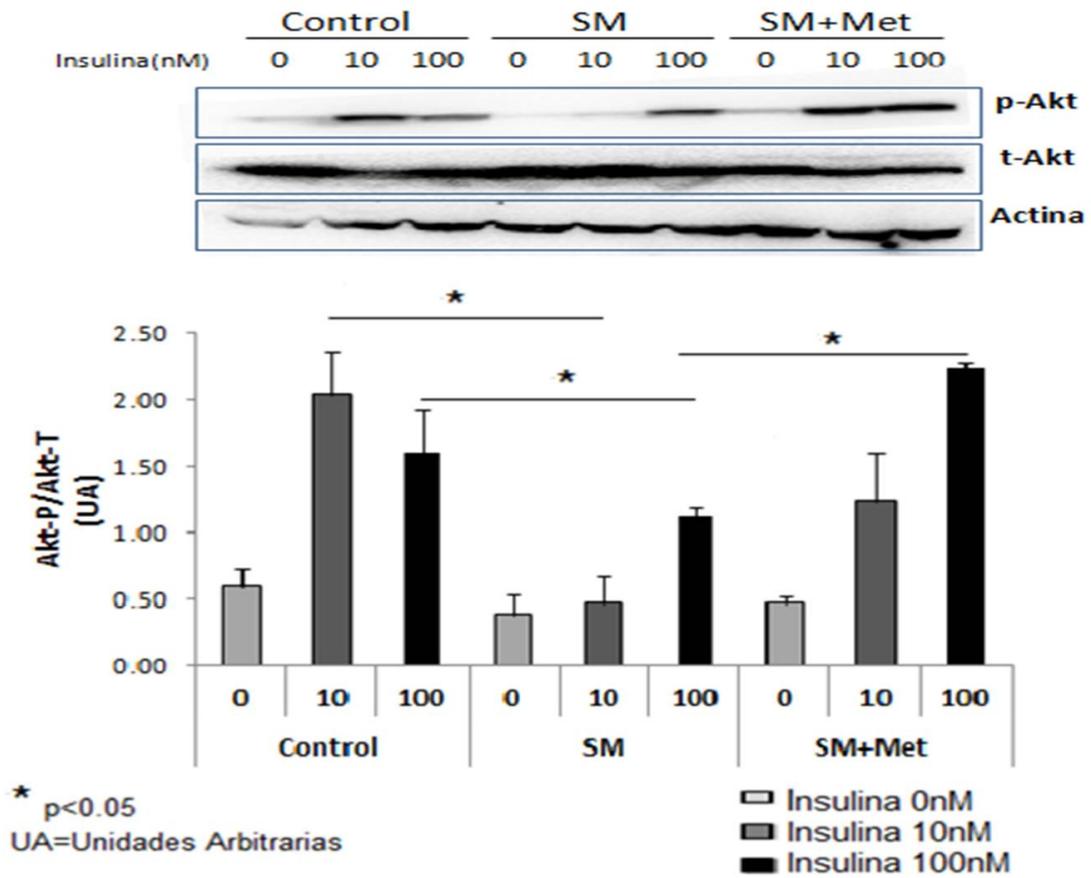


Figura 6.6: Evaluación de la activación de Akt en hepatocitos de ratas control, con SM y con SM + Metformina estimulados con insulina 10 nM. (A) Reconocimiento de los anticuerpos anti Akt-P, anti Akt-T y Actina. (B) Análisis densitométrico de la proteína reconocida Akt.

Capítulo 7

DISCUSIÓN



7.1. Evaluación del modelo de SM

La alimentación basada en una dieta alta en hidratos de carbono provocó el desarrollo de Síndrome metabólico. En comparación con las ratas control no se observa un cambio significativo en el aumento de peso, al extraer la grasa abdominal de las ratas con SM se observa que llegan a aumentar hasta el doble debido a la gran cantidad de hidratos de carbono que consumen y no utilizan, por lo tanto lo guardan en forma de grasa como reserva, al ser tratadas con metformina vía oral por 5 semanas las ratas con SM logran reducir la grasa abdominal, pero no llegan a los mismos niveles como en los controles.

Al término del tratamiento con sacarosa al 30% en el agua de bebida, los animales desarrollaron características típicas del síndrome metabólico. Por ejemplo, muestran un incremento significativo de la grasa abdominal, así como en los niveles de triglicéridos y de insulina en suero, que son consistentes con un estado de resistencia a insulina. En este modelo animal de SM no se observan cambios significativos en los niveles de glucosa cuando se comparan con los controles (Cuadro 6.1).

En este trabajo se evaluó también los niveles de dos adipocinas como la leptina y la adiponectina que participan en el control del balance energético. Los resultados muestran un incremento significativo de ambas proteínas en sangre al término del estudio (Cuadro 6.1).

En la medición de triglicéridos en sangre, los cuales se elevan significativamente en las ratas con SM, en las ratas controles los triglicéridos se encuentran por debajo de 190 mg / dL, en ratas con SM se eleva por arriba de 300 mg / dL, lo cual se relaciona al aumento que tienen las mismas de tejido adiposo. En ratas con SM que fueron tratadas con metformina vía oral disminuyen los triglicéridos en sangre, pero no llegan a los niveles de las ratas controles, es la misma relación que se observa con el tejido adiposo por lo que se puede



suponer que si se continuara el tratamiento de metformina vía oral, se podría normalizar los valores de triglicéridos en sangre.

En la medición de insulina en sangre por medio de la ELISA se observa un aumento en la concentración de insulina en sangre en las ratas con SM con lo cual se puede decir que presentan resistencia a la insulina y son hiperinsulinémicas, las ratas con SM que fueron tratadas con metformina se observa una disminución en los valores de las concentraciones de insulina en sangre pero no logra normalizar los valores a nivel de las ratas control, con el tratamiento continuo de metformina se podría mantener niveles bajos, pero no llegar a los niveles de los controles, posiblemente por un daño irreversible.

La medición de la HOMA nos permite estimar el nivel de resistencia a la insulina, en el cual se observa que en las ratas con SM aumenta, lo que nos permite decir que son insulino-resistentes, al darles la metformina vía oral de manera crónica se revierten los efectos, sin llegar a los niveles de las ratas controles.

La Metformina es un fármaco ampliamente usado en pacientes diabéticos, que si bien el mecanismo de acción aún no es del todo entendido, se sabe que por su tratamiento disminuyen los niveles de glucosa y mejora la resistencia a insulina en pacientes, como se observa también en nuestro modelo de SM tratadas con metformina en el Cuadro 6.1. Por lo tanto, para determinar si la metformina tiene efectos sobre los parámetros que dan origen al SM, se les administró metformina por vía oral a ratas con SM durante cinco semanas. Con excepción del peso corporal y la glucosa; la grasa abdominal, insulina, adiponectina, y leptina, que son indicadores del SM se modifican, disminuyeron sus niveles hasta el punto de llegar a ser similares a los controles (Cuadro 6.1).

Estos resultados demuestran que la metformina tiene efectos benéficos en el SM al parecer disminuyendo la concomitante resistencia a insulina.



7.2. Evaluación de la activación de AMPK en hepatocitos de rata con SM

En hepatocitos de rata control y con SM se analizó la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) debido a que es el regulador homeostático de energía.

Se analizaron los hepatocitos con un estímulo de metformina a concentraciones diferentes (0, 1 y 10 mM). En las muestras de las ratas control se observa una respuesta dosis-dependiente al estímulo de metformina, es decir, con el estímulo de 1 mM se ve fosforilada AMPK pero con el estímulo de 10mM aumenta la fosforilación de esta proteína.

En los resultados obtenidos del análisis densitométrico, las imágenes del Western blot, se observa en las muestras controles una respuesta al estímulo de metformina 10 mM, es decir, la proteína AMPK con un peso de 62 KDa se fosforila, en las muestras con SM la respuesta al estímulo de metformina 10 mM no es tan intenso como en las controles, es decir la proteína AMPK se fosforila menos, se podría suponer que en hepatocitos de ratas con SM existe una mayor desfosforilación o hay una disminución de AMP (Figura 6.3).

Para los hepatocitos de las ratas con SM se puede observar como no responden de la misma manera que las controles a los diferentes estímulos de metformina, con el de 1 mM la respuesta de AMPK se ve disminuida y lo mismo sucede con el estímulo de 10 mM de metformina.



7.3. Evaluación del tratamiento crónico con metformina sobre la respuesta de la AMPK

Se trataron a los animales con síndrome metabólico con metformina vía oral durante cinco semanas.

En los hepatocitos de rata con SM que fueron tratadas con metformina vía oral y estimulados con diferentes concentraciones de metformina (0, 1 y 10 mM) se observa que la proteína AMPK está fosforilada aún sin estímulo, lo cual se debe al tratamiento vía oral que mantiene activa a AMPK y en el correcto funcionamiento de la misma en los niveles de energía. Con las concentraciones de 1 y 10 mM de metformina se observa la fosforilación de AMPK pero no se ve una diferencia significativa entre ambas.

Para evaluar si los cambios obtenidos a nivel metabólico debido al tratamiento crónico con metformina, se ven reflejados en paralelo con la activación de p-AMPK. Los resultados muestran que después del tratamiento crónico con la metformina en las ratas alimentadas con sacarosa, la AMPK se activa de manera similar al control, indicando que las células recuperan la sensibilidad a la metformina figura 6.4.

En su conjunto estos resultados sugieren que el SM se relaciona con los daños celulares a nivel energético debido en parte a la inactivación de la AMPK y que éstos pueden revertirse cuando se activa farmacológicamente, en este caso con metformina.



7.4. Evaluación de la vía de la insulina en hepatocitos de rata con SM por medio de la activación de Akt

La vía de señalización por insulina generalmente se representa como una cascada de proteínas cinasas activadas por insulina. Como se mostró previamente, el modelo de ratas con SM presentan elevados niveles de insulina en suero, sugiriendo que en estas condiciones existe resistencia a la insulina en hígado o incluso en otros tejidos periféricos. Para evaluar esta posibilidad, se examinaron los niveles de fosforilación (indicadores de activación) de las proteínas reguladoras que forman parte de esta vía, la proteína cinasa B (AKT) sólo en los hepatocitos de ratas con síndrome metabólico.

En los hepatocitos de rata controles y con SM se analizó el grado de fosforilación, que corresponde a su activación, de la proteína cinasa B o Akt por un análisis densitométrico realizado a las imágenes del Western blot.

En los hepatocitos controles al recibir un estímulo de 10 nM de insulina se observa una evidente respuesta al estímulo, es decir, se observa fosforilada la proteína de Akt, lo cual nos indica que la vía de la insulina funciona adecuadamente, las células están respondiendo al estímulo de insulina, que se une al receptor y prende la vía río abajo.

En hepatocitos con SM al recibir un estímulo de 10 nM de insulina se observa que la respuesta al estímulo no es tan favorable, es decir, que la fosforilación de Akt se ve disminuida, lo cual nos indica que la vía de la insulina no está funcionando adecuadamente, y esto confirma que las ratas con SM presentan una resistencia a la insulina (Figura 6.5).



7.5. Evaluación del tratamiento crónico con metformina en hepatocitos de rata con SM sobre la vía de la insulina por medio de la activación de Akt

Se analizaron los hepatocitos controles, con SM y los de SM tratados con metformina vía oral, con diferentes concentraciones de estímulo de insulina (0, 10 y 100 nM) para observar si existe un incremento en la fosforilación de la proteína Akt.

Como ya habíamos observado, en hepatocitos controles se observa una fosforilación en aumento de acuerdo a la concentración de insulina, es decir Akt se fosforila con el estímulo de 10 nM de insulina y aumenta su fosforilación con el estímulo de 100 nM de insulina.

En hepatocitos con SM se observa ya una respuesta importante con el estímulo de 10 nM, es decir, Akt se fosforila significativamente con respecto a las controles, y con el estímulo de 100 nM la respuesta de Akt es mucho menor, ya que al ser ratas hiperinsulinémicas ya no responden al estímulo mayor de insulina y llega a su nivel máximo de respuesta con la concentración de 10 nM. (Figura 6.6). El tratamiento crónico con metformina de las ratas con SM, restablece la respuesta dosis dependiente a la insulina de los hepatocitos aislados, lo que además correlaciona con la disminución de insulina circulante. Estos datos nos indican que la metformina, de alguna manera, mejora la respuesta celular a insulina en el SM y disminuye así la secreción de esta hormona, restableciendo sus niveles séricos.

Capítulo 8

CONCLUSIONES



De este trabajo de investigación se concluye que el Síndrome Metabólico altera significativamente el metabolismo energético, evaluado por la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK), así como también la vía de señalización de insulina por lo que se puede decir que las ratas con SM provocado por una dieta alta en hidratos de carbono presentan resistencia a la insulina, que es un predecesor a la Diabetes Mellitus tipo 2 e importantes riesgos cardiovasculares. La dieta continua alta en hidratos de carbono con el tiempo desarrolla el Síndrome metabólico, y altera los bioíndices como lo son insulina, triglicéridos, adiponectina y leptina en sangre. Al administrar la metformina vía oral ayuda a restablecer los bioíndices a los niveles casi normales, ya que no los restablece por completo.

El SM provocado por una dieta alta en hidratos de carbono se encuentra asociado con la resistencia a la insulina, ya que se ve afectada la vía de la insulina, demostrada en este trabajo por la disminución de la fosforilación de Akt. El SM altera los niveles energéticos a nivel molecular, ya que se consume más energía de la que se utiliza y se ve afectado en la vía de AMPK, ya que esta proteína es el regulador homeostático de energía, y en el SM se ve disminuida la fosforilación de AMPK.

La metformina administrada vía oral en las ratas con SM, ayudó a restablecer la respuesta a la insulina, ya se ve reflejada en la mejoría de la fosforilación de la proteína Akt, la cual es parte de la vía de la insulina. También se observa como la metformina ayuda a restablecer la fosforilación de la proteína AMPK, por lo que se puede concluir, que este fármaco ayuda a restablecer el balance energético.

Capítulo 9

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede trabajar sobre la vía de insulina, evaluar las diferentes proteínas que la conforman para lograr establecer desde donde se encuentra dañada la vía, empezando por el receptor de insulina y la vía río abajo.

Capítulo 10

BIBLIOGRAFÍA

1. Reaven GM. Syndrome X. Blood pressure Supplement. 1992;4:13-6. Epub 1992/01/01.
2. Reaven GM. The metabolic syndrome: time to get off the merry-go-round? Journal of Internal Medicine. 2011;269(2):127-36. Epub 2010/12/07.
3. www.who.int/es
4. Takamiya T, Zaky WR, Edmundowics D, Kadowaki T, Ueshima H, Kuller LH, et al. World Health Organization-defined metabolic syndrome is a better predictor of coronary calcium than the adult treatment panel III criteria in American men aged 40-49 years. Diabetes Care. 2004;27(12):2977-9. Epub 2004/11/25.
5. Bakris GL. Microalbuminuria. Rush Medical College. 1-7.
6. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28(7):412-9. Epub 1985/07/01.
7. Trejo G J. Epidemiología del síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2: ¿El diluvio que viene?. Archivos de Cardiología de México. 2004;74(2):S267-70. Epub 1985/04-06.
8. Zimmata P, George K, Albertib MM, Serrano M. Una definición mundial del síndrome



metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Revista Española de Cardiología*. 2005;58(12):1371-6.

9. Wilkin TJ, Voss LD. Metabolic syndrome: maladaptation to a modern world. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2004;97(11):511-20. Epub 2004/11/03.

10. Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2004;33(2):351-75, table of contents. Epub 2004/05/26.

11. Gallagher EJ, LeRoith D, Karnieli E. The metabolic syndrome—from insulin resistance to obesity and diabetes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2008;37(3):559-79, vii. Epub 2008/09/09.

12. www.iaso.org/resources/world-map-obesity/

13. Obesity update. OECD. 2012.

14. Velazquez MO, Rosas PM, Lara EA, Pastelín HG. Hipertensión Arterial en México: resultados de la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2000. *Archivos de Cardiología de México*. 2002;72:71-84.

15. México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas (ENEC) 1993. *Epidemiología SSA*. 1996:50p.

16. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). Instituto Nacional de Salud Pública. 2006.

17. Aguilar SC, Rojas R, Gómez F, Valles V, Ríos JM, Franco A, Olaiz G, Rull J, Sepúlveda J. High prevalence of metabolic syndrome in Mexico. *Archive of Medical Research*. 2004;35(1):76-81.

18. Bi XP, Tan HW, Xing SS, Wang ZH, Tang MX, Zhang Y, et al. Overexpression of TRB3 gene in adipose tissue of rats with high fructose-induced metabolic syndrome. *Endocrine Journal*. 2008;55(4):747-52. Epub 2008/05/24.



19. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2004;15(11):2792-800. Epub 2004/10/27.
20. Yadav A, Jyoti P, Jain SK, Bhattacharjee J. Correlation of adiponectin and leptin with insulin resistance: a pilot study in healthy north Indian population. *Indian Journal of Clinical Biochemistry : IJCB*. 2011;26(2):193-6. Epub 2012/04/03.
21. Boyko EJ, de Courten M, Zimmet PZ, Chitson P, Tuomilehto J, Alberti KG. Features of the metabolic syndrome predict higher risk of diabetes and impaired glucose tolerance: a prospective study in Mauritius. *Diabetes Care*. 2000;23(9):1242-8. Epub 2000/09/08.
22. Cordero A, Alegría E, León M. Prevalencia del Síndrome Metabólico. *Revista Española de Cardiología*. 2006;5:11-15.
23. Bosch-Barrera J, Hernandez A, Abella LE. [Insulin and insulin-like growth factor pathway, a new targeted therapy in oncology]. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2009;32(3):413-21. Epub 2010/01/23.
24. Rogero BM, Alpañil BM, Sánchez MM, Rabanal BA, Olivas DA, García LC. Prevalence of insulin resistance in a young adult population. Relationship with weight status. *Endocrinology and Nutrition*. 2012;59(2):98-104.
25. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, et al. Insulin resistance in essential hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 1987;317(6):350-7. Epub 1987/08/06.
26. Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2010;16(1):34-44. Epub 2010/03/11.
27. Chopra I, Li HF, Wang H, Webster KA. Phosphorylation of the insulin receptor by AMP-activated protein kinase (AMPK) promotes ligand-independent activation of the insulin signalling pathway in rodent muscle. *Diabetologia*. 2012;55(3):783-94. Epub 2011/12/31.



28. Hardie DG. AMPK and SNF1: Snuffing Out Stress. *Cell Metabolism*. 2007;6(5):339-40. Epub 2007/11/07.
29. Fragoso IS, Coello CP. La AMPK y la homeostasis energética. *Revista de Educación Bioquímica*. 2008;27(1):3-8. Epub 2008/06/10.
30. Wang W, Guan KL. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;196(1):55-63. Epub 2009/02/27.
31. Liu Z, Li J, Zeng Z, Liu M, Wang M. The antidiabetic effects of cysteinyl metformin, a newly synthesized agent, in alloxan- and streptozocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2008;173(1):68-75. Epub 2008/04/02.
32. Owen M R, Doran E, Halestrap A P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical Journal*. 2000;348(3):607-14. Epub 2000/06/15.

Capítulo 11

APÉNDICE



11.0.1. Soluciones

Buffer Ringer Krebs	100 mL NaCl [120 mM]: 45 g en 1 L 4 mL KCl [5.7 mM]: 7 g en 100 mL 1 mL KH ₂ PO ₄ [1.2 mM]: 10.5 g en 100 mL 1 mL MgSO ₄ [1.2 mM]: 19.1 g en 100 mL 5 mL NaHCO ₃ [12 mM]: 32.5 g en 500 mL 514 mL H ₂ O grado II	
Gel de acrilamida 10 %	Separador (10 mL): 4.1 mL H ₂ O grado II 3.3 mL Acrilamida- Bis-Acrilamida (SIGMA) 2.5 mL Resolving Buffer: pH=8.8 (1.5 M Tris-HCl) 0.1 mL SDS 50 µL APS 5 µL TEMED	Concentrador (5 mL): 3.05 mL H ₂ O grado II 650 µL Acrilamida- Bis-Acrilamida (SIGMA) 1.25 mL Stocking Buffer: pH=6.8 (1.5 M Tris-HCl) 50 µL SDS 25 µL APS 10 µL TEMED
Buffer de corrida 5x	15 g Tris 5 g Glicina Aforar a 1 L con H ₂ O grado II Ajustar pH=8.3 con HCl	



Buffer de corrida 1x	150 mL Buffer de corrida 5X Llevar a 750 mL con H2O grado II			
Buffer de transferencia 5x	15 g Glicina 15 g Tris Aforar a 1 L con H2O grado II			
Buffer de transferencia 1x	50 mL Buffer de transferencia 5X 50 mL Metanol 150 mL H2O grado II			
Buffer de Lisis TP LYSE		PM	mM	mg/500mL H2O grado II
	HEPES	238.3	50	5957.5 mg
	KCL	74.5	50	1868.75 mg
	EDTA	292.2	1	146.1 mg
	EGTA	380.35	1	190.175 mg
	B-GLICEROL FOSFATO	306.11	5	765.28 mg
	TRITON X100		0.1%	500 µL
	NaF	41.99	50	1.05 mg
	NaPPi	221.9	5	0.55 mg
	Agregar y preparar al momento de utilizar:			
	PM	nM		
ORTOVANADATO	183.9	1	10 µL/mL	
DTT	154.2	1	1 µL/mL	
PMSF	174.2	0.2	2 µL/mL	
Antiproteasas	-----	-----	1.6 µL/mL	



PBS 10x	82 g NaCl 13 g PO ₄ HNa ₂ 1.76 g PO ₄ H ₂ Na Aforar a 1 L con H ₂ O grado II Ajustar pH=7.6 con NaOH
PBS-Tween	100 mL PBS10x 1 mL Tween 20 Aforar a 1 L con H ₂ O grado II.
Minimum Essential Medium Alpha Medium (α-MEM) (GIBCO Invitrogen Corporation)	Vaciar contenido del sobre en 700 mL de H ₂ O grado II. Mezclar y agregar 2.2 g de NaHCO ₃ Ajustar pH=7.4 con NaOH 1M 10 mL Antibióticos Aforar a 1 L con H ₂ O grado II Filtrar con poro de 0.22 micras en condiciones estériles *Para medio α-MEM + Suero fetal bovino (FBS) agregar 10 % al medio preparado.
Azida de Sodio Na ₃ (1 M)	65 mg Azida de Sodio 1 mL H ₂ O grado II
Anticuerpos primarios 1:1000	3 mL de leche al 3 % con PBS-Tween 3 μL de anticuerpo de interés. 30 μL de Azida Na ₃
Anticuerpos secundarios 1:2000	3 mL de leche al 3 % con PBS-Tween 1.5 μL de anticuerpo de interés.



Solución bloqueadora 5 %	2.5 g Leche en polvo sin grasa 50 mL de PBS-Tween
Azul de coomasie	500 mg Azul de coomasie (0.1 %) 200 mL Metanol (40 %) 50 mL Ácido acético (10 %) 250 mL H2O grado II
Rojo de Punceau	0.05 g Rojo de punceau (0.1 %) 2.5 mL Ácido acético (5 %) Aforar con 50 mL de H2O grado II

11.0.2. Kits utilizados para la medición de glucosa, insulina, triglicéridos, adiponectina y leptina

Accutrend GCT RocheCat No. 04451660001

Equipo para la determinación de colesterol y triglicéridos en sangre total agente diagnóstico para uso in vitro.

Tiras AccutrendTriglycerides: Cada tira reactiva tiene una zona reactiva que contiene los reactivos indicadores. Cuando se aplica la sangre por capilaridad, se produce una reacción química y la zona reactiva cambia de color. El equipo registra este cambio de color y convierte la señal de medición en el resultado cuantitativo mostrado. Principio de la prueba: Los triglicéridos son escindidos inicialmente por una esterasa a glicerol y ácidos grasos libres. Mediante otros dos pasos enzimáticos, el glicerol se convierte en fosfato de hidroxacetona y peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el peróxido de hidrógeno provoca la oxidación de un indicador a un colorante, y su concentración se determina mediante fotometría de reflectancia.

Intervalos de medición: 70-600 mg/dL, valores normales: triglicéridos inferiores a 200



mg/dL.

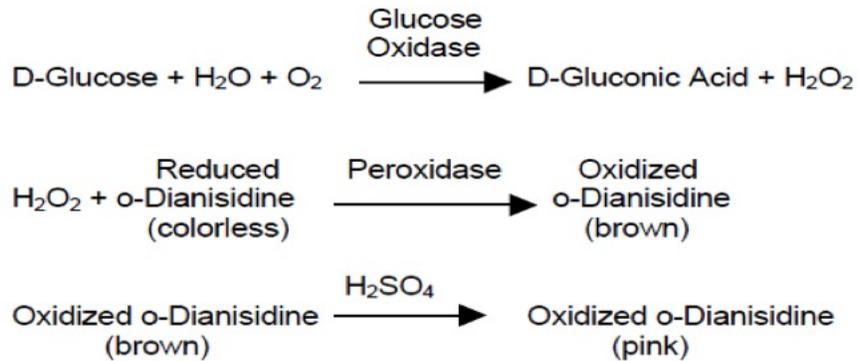
Kit de Immobilon Western, chemiluminescent HRP Substrate de Millipore corporation, Cat No WBKLS0500, Lot No 118803

Para la detección de la quimioluminiscencia se utiliza una enzima que cataliza una reacción, como resultado da una luz visible. La reacción de quimioluminiscencia de la peroxidasa de rábano (horseradishperoxidase HRP) se basa en la oxidación catalizada del luminol por el peróxido.

El luminol oxidado emite luz hasta que se descompone a su estado fundamental. Esta técnica tiene rapidez y seguridad en los métodos de detección cromogénica a niveles de sensibilidad alta.

Kit enzimático de glucosa oxidasa SIGMA GAGO-20

Principio: La Glucosa es oxidada a ácido Glucónico y peróxido de hidrógeno por medio de la glucosa oxidasa, el peróxido de hidrógeno reacciona con el o-dianisidino en presencia de la peroxidasa y producir un producto colorido (café). El o-dianisidino oxidado reacciona con el ácido Sulfúrico y formar un producto con un color más estable. El color rosa intenso se mide en el espectrofotómetro a 540nm y es proporcional a la concentración de glucosa.



ALPCO Immunoassays, Insulin (Rat) High Range ELISA, Cat 80-INSRTH-E01,E10

ALPCO Immunoassays, Leptin (Mouse and Rat) High Range ELISA

ALPCO Immunoassays, Adiponectin (Rat) High Range ELISA

11.0.3. Equipos

Espectrofotómetro CARY 100

Cámara de electroforesis: PowerPac HC BIORAD

Cámara de transferencia: Powersupplies ENDURO LABNET

Fotodocumentador y análisis de densitometría: Chemidoc BIORAD