

García Arteaga
María del Rosario

Efecto de dieta obesogénica y diabetes tipo 2 inducida en isoformas de
proteína cinasa C (ϵ y ζ) y lipoperoxidación en hígado de ratas

2020



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**Efecto de dieta obesogénica y diabetes tipo 2 inducida en isoformas de
proteína cinasa C (ϵ y ζ) y lipoperoxidación en hígado de ratas.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

María del Rosario García Arteaga

Dirigido por:

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

Querétaro, Querétaro a Enero 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Efecto de dieta obesogénica y diabetes tipo 2 inducida en isoformas de proteína cinasa C (ϵ y ζ) y lipoperoxidación en hígado de ratas.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias de la Nutrición Humana

Presenta:

María del Rosario García Arteaga

Dirigido por:

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

SINODALES

Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano

Presidente

Dra. Alma Dalia Luna Moreno

Secretario

Dr. Jorge Luis Chávez Servín

Vocal

Dra. Clara Alba Betancourt

Suplente

MSPAS Paola Jazmín Aranda Vargas

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Querétaro.

Enero 2020

México

DEDICATORIAS

A mi papi, que siempre me ha apoyado ciegamente en todas mis ideas y proyectos, por creer más en mí de lo que yo misma creo y por darle un significado extraordinario a la palabra papi.

A mi mami, que, gracias a su mente soñadora y a su dulce necesidad, me ha enseñado a no dejarme vencer por la adversidad a base de esfuerzo, perseverancia y honestidad.

A mis hermanas, por ser mis compañeras de vida, por su sinceridad absoluta, apoyo, sacrificios y por ayudar a formar la grandiosa familia que somos.

A Vic (mi Lovi), mi ahora esposo por su amor incondicional, su dulce y enternecedora paciencia, por ser mi fan número uno, por hacer mi vida aún más feliz y por darme la oportunidad de formar una familia.

A mi directora de tesis, por su valiosísimo tiempo, infinita paciencia, enseñanzas, apoyo incondicional, por no dejar de creer en mí a pesar de las frustraciones, mostrarme este gran mundo de la investigación y por ser un gran ser humano que me hizo sentir en un gran ambiente de confianza y amistad.

A mi comité sinodal, Dra. Dalia, Dra. Clara, Dr. Jorge y Dra. Paola por su apoyo, enseñanzas, retroalimentaciones, confianza y sobre todo tiempo.

A todos los del Laboratorio de Biología Celular y Molecular, por ser más que maestros, por brindarme su amistad, Paco, Pao, Kuri, Ale, Richy, Naye.

A Joss, porque sin su ayuda y compañía en las jornadas interminables del laboratorio, siempre tenía las palabras exactas para sacarte una sonrisa y levantarte el ánimo y seguir con los ánimos e intentar cuantas veces fuera necesario.

A mis compañeros de la maestría, Héctor, Naye, Dena, Maru, Nacho, Pao, Adri, Glo, Xime y Yoli por hacer de estos dos años una gran aventura.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la asistencia técnica, análisis de datos, infraestructura y préstamo de equipo a MSPAS Paola Aranda de la Parra y QFB Raquel Cervantes Martínez del Laboratorio de Histopatología-Veterinaria para el procesamiento de los tejidos; Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola y QFB Sonia Micaela Hernández Narváez de la Clínica de Nutrición Humana, para los análisis bioquímicos (todos de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro); al MVZ José Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla León, por el apoyo en bioterio y manejo de los animales; Dr. Mauricio Díaz Muñoz y Dra. Olivia Vázquez del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, por el apoyo para usar su polytron para la realización de los homogenados. Y un especial agradecimiento al MCNH Francisco Josué López Martínez, técnico del laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias Naturales y a mi grupo de investigación, liderado por el Dra. Santiago Marisela Ahumada Solórzano, conformado por MCNH Adriana Araceli Becerril Campos, LN Perla Viridiana Ocampo Anguiano, PLN Xianny Pichardo Piña.

Este estudio ha sido apoyado por el fondo de investigación de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SAGARPA DF1600004770), fondo de proyectos especiales de rectoría (FOPER 2018-00221-UAQ). Se tuvo la beca de CONACYT con número 857389 durante el período de agosto de 2017 a agosto de 2019.

ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	viii
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Prevalencia de obesidad y diabetes mellitus tipo II (DM2).....	1
1.2 Obesidad y su relación con comorbilidades.....	2
1.3 Resistencia a la insulina (RI).....	3
1.4 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).....	5
1.5 Metabolismo energético de carbohidratos y lípidos.....	6
1.6 El papel del hígado y páncreas en el metabolismo energético.....	11
1.6.1 Páncreas.....	11
1.6.2 Hígado.....	13
1.7 Transportador de glucosa.....	18
1.8 Insulina y su papel en la homeostasis de glucosa.....	20
1.8.1 Insulina.....	20
1.8.2 Receptor de insulina (IR).....	21
1.8.3 Cascada de señalización de insulina.....	22
1.8.4 Regulación de transporte de glucosa.....	23
1.8.4.1 Vía PI3 K/AKT.....	23
1.8.4.2 Vía PI3K/PDK.....	23
1.8.4.3 Vía APS/CAP/Cbl.....	24

1.9	Proteína Cinasa C (PKC).....	25
1.9.1	Características de PKC	25
1.9.2	Estructura de PKC.....	25
1.9.3	Subfamilias de PKC.....	26
1.9.4	Activación de PKC.....	26
1.10	PKC en obesidad, resistencia a insulina y diabetes tipo 2.	28
1.11	Lipoperoxidación y su relación con DM2.	30
1.12	Modelos in vivo de DM2 inducida con estreptozotocina.....	32
II.	JUSTIFICACIÓN.....	33
III.	HIPÓTESIS.....	34
IV.	OBJETIVOS.....	34
4.1	Objetivo general.....	34
4.2	Objetivos específicos	34
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1	Diseño Animal.....	35
5.2	Grupos experimentales y tamaño de la muestra.....	36
5.3	Control de peso.....	36
5.4	Eutanasia y obtención de muestras	37
5.5	Guías y reglamentación	37
5.6	Análisis de peso corporal y parámetros bioquímicos en suero	38
5.7	Análisis histológicos en hígado y páncreas.....	40
5.8	Homogenados.....	42
5.9	Evaluación semicuantitativa de niveles de daño oxidativo en hígado.....	43
5.10	Cuantificación de Proteína Total.....	44
5.11	Electroforesis SDS-PAGE	44
5.12	Evaluación semicuantitativa por Western-Blot de isoformas de PKC....	45
5.13	Análisis Estadístico.....	46
VI.	RESULTADOS.....	47
6.1	Peso Corporal.....	47
6.2	Parámetros bioquímicos.	47

6.2.1	Perfil Glucémico.	47
6.2.2	Perfil Lipídico.	48
6.2.3	Perfil Hepático.	49
6.3	Análisis Morfológicos e Histológicos.	50
6.3.1	Hígado.	50
6.3.2	Páncreas.	52
6.4	Reacciones de daño oxidativo en hígado.	56
6.5	Cuantificación de proteína total.	57
6.6	Estandarización de las técnicas de electroforesis y western blot.	59
6.7	Inmunnodetección de las isoformas ζ y ϵ de PKC en homogenados de hígado.	60
VII.	DISCUSIÓN.	63
VIII.	CONCLUSIONES.	69
IX.	REFERENCIAS.	71
X.	ANEXOS.	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones metabólicas en obesidad y su relación con otras comorbilidades.....	3
Figura 2. Principales mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina.	5
Figura 3. Eventos progresivos de la diabetes mellitus 2.....	6
Figura 4. Representación de estado postprandial.....	9
Figura 5. Representación del ayuno temprano.	10
Figura 6. Clasificación de células pancreáticas.	12
Figura 7. Diagrama de la liberación de insulina por las células β pancreáticas.	13
Figura 8. Anatomía morfológica del hígado de rata.	14
Figura 9. Estructura microscópica de hígado.....	16
Figura 10. Metabolismo bioquímico de los carbohidratos en hígado.	18
Figura 11. Estructura de la insulina.....	20
Figura 12. Esquema del receptor de insulina.....	21
Figura 13. Vías clásicas de señalización de la insulina.	22
Figura 14. Regulación de transporte de glucosa.....	24
Figura 15. Representación esquemática de la estructura de las isoformas de Proteína Kinasa C (PKC).....	27
Figura 16. Características de diseño animal y grupos de intervención.....	35
Figura 17. Planeación de diseño animal.	37
Figura 18. Protocolos de tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) y Tricrómica de Masson (TM).....	42
Figura 19. Microfotografías de tejido hepático.	52
Figura 20. Microfotografías de tejido pancreático.	55
Figura 21. Fotografía de gel, SDS PAGE con BSA.....	59
Figura 22. Corrimiento electroforético representativo en geles de los homogenados de hígados en animales control (C), con dieta obesogénica(O) y con diabetes (D).	59
Figura 23. Proceso de Inmunotransferencia	60
Figura 24. Expresiones de proteínas de isoformas de PKC ζ en hígado.....	61
Figura 25. Expresiones de proteínas de isoformas de PKC ϵ en hígado.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Combustibles energéticos del metabolismo celular.	7
Tabla 2. Vías metabólicas activas e inactivas correspondiente al estado metabólico.	11
Tabla 3. Presencia de las isoformas PKC en condiciones normoglúcemicas, obesidad (O) y DM2.....	29
Tabla 4. Análisis de parámetros bioquímicos cuantificados Mindray® bs-120.	39
Tabla 5. Criterios de selección de tinciones empleadas.	41
Tabla 6. Anticuerpos para detectar isoformas de PKC.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Niveles de glucosa, insulina y HOMA-IR en animales control (C), con dieta obesogénica(O) y con Diabetes inducida (D).	48
Cuadro 2. Cambios en el perfil lipídico en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).	49
Cuadro 3. Niveles de transaminasas hepáticas en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D).	49
Cuadro 4. Estudio histopatológico del tejido hepático. Principales lesiones observadas en los animales con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D).....	52
Cuadro 5. Concentración de proteínas en los animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D).	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 1. Peso en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).....	47
Gráfica 2. Peso de hígados en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida(D) posterior a sacrificio.....	50
Gráfica 3. Peso de hígados normalizados con peso final de animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).....	51
Gráfica 4. Peso de páncreas en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida(D) posterior a sacrificio.....	53
Gráfica 5. Peso de páncreas normalizados con peso final en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D) posterior a eutanasia.	53
Gráfica 6. Cuantificación de los islotes de Langerhans en los animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida(D).....	54
Gráfica 7. Funcionalidad de las células β pancreáticas a través de HOMA- β en los animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).....	55
Gráfica 8. Efecto del estrés en el daño oxidativo del hígado en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D) a través de la formación de DC.....	56
Gráfica 9. Efecto del estrés en el daño oxidativo del hígado en animales control(C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida(D) por TBARS.....	57
Gráfica 10. Cuadro de calibración de albumina sérica bovina (BSA).....	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Soluciones para la realización de la electroforesis SDS-PAGE.....	86
Anexo 2. Preparación para dos geles de poliacrilamida	88
Anexo 3. Soluciones para Western Blot.....	89

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AGL/ NEFA	Ácidos grasos no esterificados
ADA	Asociación Americana de Diabetes
AKT	Proteína AKT o PKB
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aminotransferasa
ATP	Adenosin Trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DC	Dienos Conjugados
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DO	Dieta obesogenica
GLUT	Glucotransportadores
HDL	Lipoproteína de Alta Densidad.
H&E	Hematoxilina-eosina
IR	Receptor de insulina
IRS	Proteínas sustrato del receptor de insulina
LP	Liperoxidación
LDL	Lipoproteína de Baja Densidad.
MDA	Malondialdehido.
NAFLD	Enfermedad del hígado graso no alcohólico
NAFL	Esteatosis
NASH	Esteatohepatitis
OMS	Organización Mundial de la Salud
PKC	Proteína Cinasa C
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PP2A	Fosfolipasa 2A
RI	Resistencia a la insulina
RL	Radicales Libres.
RNS	Especies reactivas de nitrógeno.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
Ser	Serina
SGLT	Cotransportadores sodio-glucosa
STZ	Estreptozotocina.
TA	Tejido adiposo
TAG	Triacilglicéridos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Liperoxidación, mediante el complejo TBA
Thr	Treonina
TM	Tricrómica de Masson
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

La obesidad se caracteriza por el exceso de grasa corporal que producen hiperglucemia y alteraciones en el mecanismo de la insulina que conducen a resistencia a insulina (RI) y diabetes mellitus 2 (DM2). El daño oxidativo sobre las membranas celulares y algunos segundos mensajeros del mecanismo de la insulina como las isoformas de Proteína Cinasa C (PKC) se plantean como posibles causas. El objetivo fue evaluar el efecto de dieta obesogénica (DO) y DM2 inducida con estreptozotocina (STZ) sobre isoformas de PKC (ϵ y ζ) y lipoperoxidación en hígado de ratas. Los animales se dividieron en grupos: Control (C), con dieta DO (O) y con DM2 inducida con STZ (D). Fueron evaluados parámetros bioquímicos, lipoperoxidos, por método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y presencia proteica. Los resultados indican hiperglucemia e hiperinsulinemia, donde los niveles de glucosa aumentaron significativamente en los animales O y D al comparar contra C (178.75 ± 8.79 , 467.5 ± 41.01 , 112.37 ± 11.7 mg/dl, respectivamente), de igual forma que los niveles de insulina de O y D incrementaron significativamente respecto a C (10.47 ± 1.41 , 10.70 ± 0.80 , 6.73 ± 1.68 μ UI/mL, respectivamente). Además, se encontró una desregulación en los niveles de lípidos con incremento en triacilglicéridos en O y D respecto a C (240.55 ± 43.96 , 425.42 ± 72.89 , 145.23 ± 4.41 mg/dl, respectivamente). La histopatología sugiere esteatohepatitis y fibrosis en animales O y D. Los niveles de TBARS en O y D aumentaron respecto a C (0.152 ± 0.073 , 0.134 ± 0.075 vs 0.087 ± 0.018 nmol/mg proteína, respectivamente), aunque este no es significativo. La expresión proteica de PKC ζ en hígado de los grupos O y D disminuyó respecto a C (357.63 ± 52.26 , 389.60 ± 54.14 , 416.11 ± 41.61 pixeles, respectivamente). En tanto, la expresión proteica de PKC ϵ aumento en O y D respecto a C (348.21 ± 56.07 , 358.67 ± 52.48 , 192.73 ± 28.67 pixeles, respectivamente). Estos resultados muestran que los animales O y D desarrollaron RI, DM2, esteatohepatitis y fibrosis. El aumento de lipoperoxidos apoyan las evidencias de una asociación etiológica y fisiopatológica del daño oxidativo con DM2. Los niveles de expresión de PKC ϵ/ζ fortalece la hipótesis de que estas isoformas actúan como inductor de RI y, por ende, isoformas de PKC, pueden ser un blanco terapéutico para modular el desarrollo de DM2.

(Palabras clave: Obesidad, diabetes, proteína cinasa C, hígado, lipoperoxidación).

ABSTRACT

Obesity is characterized by an excess of body fat that produces hyperglycemia and alterations in the mechanism of insulin that promote the development of insulin resistance (IR) and diabetes mellitus 2 (DM2). Oxidative damage in cell membranes and some second messengers of the insulin mechanism, such as isoforms of protein kinase C (PKC) are suggested as possible causes. The aim of this study was to evaluate the effect of the obesogenic diet (OD) and streptozotocin-induced DM2 (STZ) on PKC isoforms (ϵ and ζ) and lipoperoxidation in rat liver. The animals were divided into groups: Control (C), with DO diet (O) and with DM2 induced with STZ (D). Biochemical parameters were evaluated, also oxidative damage markers lipid peroxidation by the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein presence. The results showed hyperglycemia and hyperinsulinemia, where glucose levels increased significantly in animals O and D when compared against C (178.75 ± 8.79 , 467.5 ± 41.01 , 112.37 ± 11.7 mg/dl, respectively), also insulin levels of O and D increased significantly against C (10.47 ± 1.41 , 10.70 ± 0.80 , 6.73 ± 1.68 μ UI/mL, respectively). On the other hand, decreased levels of lipid with an increase in triacylglycerides in O and D with respect to C (240.55 ± 43.96 , 425.42 ± 72.89 , 145.23 ± 4.41 mg/dl, respectively). Histopathology suggests steatohepatitis and fibrosis in animals O and D. The levels of TBARS in O and D increased with respect to C (0.152 ± 0.073 , 0.134 ± 0.075 vs 0.087 ± 0.018 nmol/mg protein, respectively), although this is not significant. Instead, protein expression of PKC ζ in liver of groups O and D decreased with respect to C (357.63 ± 52.26 , 389.60 ± 54.14 , 416.11 ± 41.61 pixels, respectively). Protein expression of PKC ϵ increased in O and D with respect to C (348.21 ± 56.07 , 358.67 ± 52.48 , 192.73 ± 28.67 pixels, respectively). These results showed that animals O and D developed RI, DM2, steatohepatitis and fibrosis. The increase in lipoperoxides supports the evidence of an etiological and pathophysiological association of oxidative damage with DM2. The PKC ϵ/ζ expression levels strengthens the hypothesis that these isoforms act as an inducer of RI and, therefore, PKC isoforms, may be a therapeutic target to modulate the development of DM2.

(Key words: obesity, diabetes, protein kinase C, liver, lipid peroxidation).

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Prevalencia de obesidad y diabetes mellitus tipo II (DM2).

La obesidad y la diabetes por el aumento en su tasa de prevalencia a nivel mundial, son un problema de gran impacto social, demográfico y económico (Barba Evia J.R., 2018). En 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 650 millones de adultos entre 20 y 80 años tenían obesidad y más de 1900 millones sufrían de sobrepeso, lo cual representa el 13% y 39% de la población total mundial (OMS, 2018). En México, la prevalencia de sobrepeso y obesidad es de 72.5% (48.6 millones de personas, >20 años), esto significa que 7 de cada 10 mexicanos tienen sobrepeso u obesidad (Hernández-Ávila M. *et al.*, 2016). Además, el 20% del presupuesto total de un país emergente es destinado al tratamiento de la obesidad y sus complicaciones (Güemes-Hidalgo M. y Muñoz-Calvo M.T., 2015).

La Federación Internacional de la Diabetes (IDF) en 2017 indicó que 425 millones de adultos de entre 20 y 79 años tenían diabetes, además se calculó que ésta genera 1.5 millones de muertes de manera directa y 2.2 millones de manera indirecta, por comorbilidades asociadas (Cristi-Montero C., *et al.*, 2017). En México se reportó una prevalencia del 9.4 % de diabetes en adultos >20 años, lo que representa alrededor de 12 millones y ocupando el quinto lugar a nivel mundial (Hernández-Ávila M. *et al.*, 2016). Estas cifras han generado que la diabetes se encuentre entre las 7 principales causas de muerte a nivel mundial, solo por debajo de enfermedades cardiovasculares o pulmonares (Mendoza Romo M.A. *et al.*, 2017). Más del 90% de los pacientes con diabetes presentan DM2, aunque existen otros como la diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 3 (DM3) y diabetes mellitus gestacional (DMG) (Alam U. *et al.*, 2014).

1.2 Obesidad y su relación con comorbilidades.

La obesidad se considera una patología de origen multifactorial en donde interaccionan diversos factores genéticos, ambientales y estilo de vida. Actualmente, el último factor es el más común, el cual genera un desequilibrio energético positivo por incremento en la ingesta energética y una disminución del gasto energético. Este desequilibrio provoca una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, especialmente en el depósito visceral y en una expansión general del tejido adiposo (TA) que puede ser perjudicial para la salud (Quirantes Moreno A. *et al.*, 2009; Serrano Ríos M. *et al.*, 2016; Luig T. *et al.*, 2018).

El incremento de masa en el TA provoca un aumento en el número y el tamaño de adipocitos (hiperplasia e hipertrofia), lo que conlleva a diversas alteraciones metabólicas (Figura 1) como:

- a. Incremento de la secreción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL-6, IL-10, entre otras) secretadas por el mismo TA, lo cual genera un estado de inflamación sistémica crónica de baja grado.
- b. Incremento de la producción y permanencia de las especies reactivas de oxígeno (ROS) acumulándose e induciendo daño a nivel de los lípidos de la membrana plasmática.
- c. El aumento de la liberación excesiva de ácidos grasos no esterificados (NEFA o AGL) que predispone a la acumulación ectópica de lípidos en órganos periféricos no adiposos (hígado, músculo esquelético, corazón, páncreas, o incluso cerebro) conocido como lipotoxicidad.

Dichas alteraciones son parte del ciclo dañino, que en conjunto con la hiperglucemia e hiperinsulinemia, se traducen en RI y posteriormente al desarrollo de DM2; hipertensión arterial, niveles altos de triacilglicéridos (TAG), colesterol, lipoproteínas de baja (VLDL) y muy baja densidad (VLDL) que se convierten en factores para la dislipidemia; esteatosis (NAFL) y hepatitis (NASH), etapas de

desarrollo del hígado graso no alcohólico (NAFLD), además del desarrollo de síndrome metabólico, cardiopatía isquémica, enfermedad cardiovascular y cáncer (Esser N. *et al.*, 2014; Carvajal Carvajal C., 2015; Engin A., 2017).

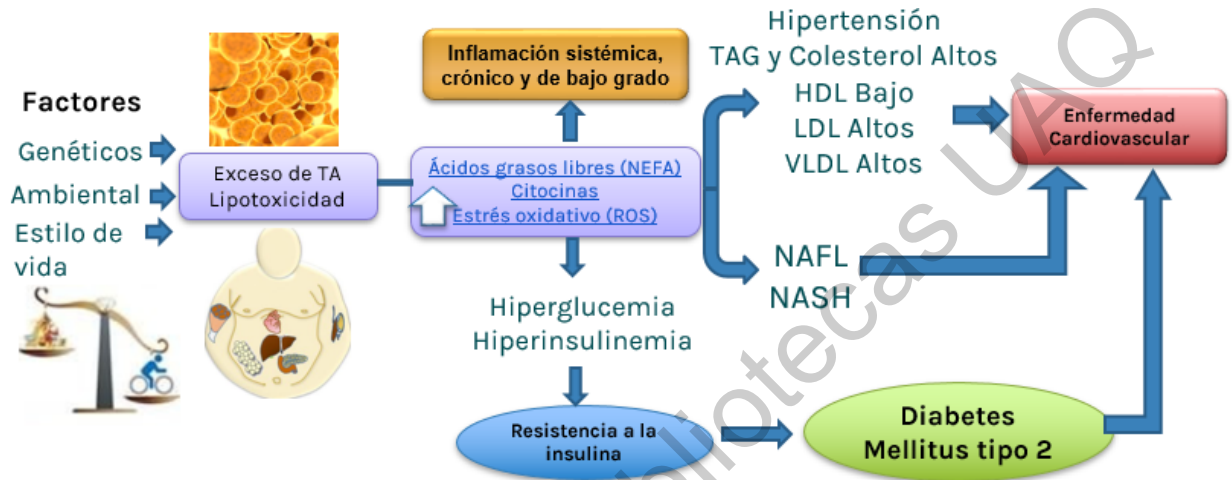


Figura 1. Alteraciones metabólicas en obesidad y su relación con otras comorbilidades.

La ingesta excesiva de nutrientes característica en la obesidad da como resultado el depósito de grasa excesivo en el TA y alteración metabólica inducida por el aumento de los niveles circulantes de lípidos, como desregulación hormonal, estrés oxidativo, RI caracterizada por hiperglucemia e hiperinsulinemia como antesala de DM2 (Martínez Sámano J., *et al.*, 2013; Güemes-Hidalgo M. y Muñoz-Calvo M.T., 2015; Costa Gil J.E. y Spinedi E., 2017).

1.3 Resistencia a la insulina (RI).

La RI un estado patológico caracterizado por una disminución de la capacidad de respuesta de las células a la insulina debido a alteraciones en las vías de señalización de insulina causadas por modificaciones postraduccionales del receptor de insulina o de proteínas intracelulares de la cascada de señalización (Olivares Reyes J. A. y Arellano Plancarte A., 2008; Güemes-Hidalgo M. y Muñoz-Calvo M.T., 2015; Gutiérrez-Rodelo C. *et al.*, 2017). Aún no están claramente definidos los fallos en el proceso de la resistencia a la insulina, sin embargo, diversos estudios tanto en roedores como en células han establecidos como posibles (Figura 2) los siguientes:

- a) En el primero están involucradas las citocinas proinflamatorias secretadas por el TA como el factor de necrosis tumoral, TNF α , e interleucinas (IL-1 β y IL-6), las cuales al verse aumentadas inducen a la activación de fosforilación de Ser/Thr en el IR, provocando que este no se active, bloqueando al receptor y saturándolo de insulina.
- b) Por otro lado, el aumento en las demandas de oxígeno, provoca una disfunción mitocondrial que promueve una disminución en la oxidación de lípidos y a su vez la disminución de la fosforilación oxidativa; esto contribuye a una acumulación de AGL y lípidos que se ve acompañada de un incremento en la producción de diacilglicerol (DAG), un segundo mensajero que promueve la activación de una familia de serina (Ser)-treonina (Thr) cinasas (PKC), que fosforila en residuos de Thr/ Ser inhibiendo así a las proteínas receptor de insulina (IRS).
- c) Además del incremento de DAG, también se ven aumentadas las ceramidas, las cuales inducen la desfosforilación e inactivación de la proteína AKT por la fosfolipasa 2 A (PP2A) lo que induce el bloqueo de la vía de señalización de insulina dependiente del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K).
- d) Así también, la disfuncionalidad mitocondrial aumenta la oxidación de los fosfolípidos de membrana, proceso conocido como lipoperoxidación (LP), el que es acompañado de la producción de ROS, las que activan cinasas de Ser/Thr incrementando la fosforilación en Ser de las proteínas IRS e inhibiéndolas (Bhattacharya S. *et al.*, 2007; Gutiérrez-Rodelo C. *et al.*, 2017; Yazici D. y Sezer H., 2017).

Se ha considerado a la RI como el núcleo de la obesidad, síndrome metabólico y como predecesor de la DM2 debido a las alteraciones que provoca en la homeostasis de la glucosa (Yazici D. y Sezer H., 2017).

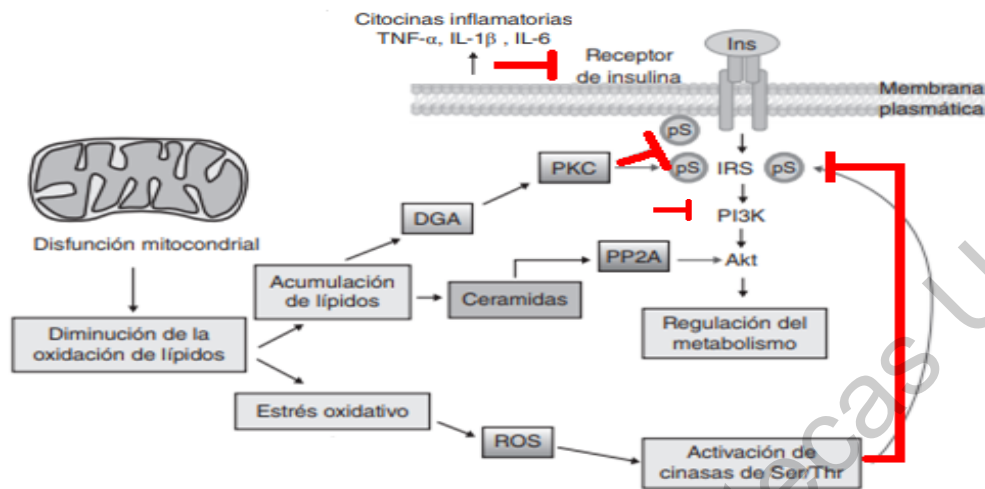


Figura 2. Principales mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina.

Estos involucran: 1) Citocinas proinflamatorias secretadas por el TA que inducen a la fosforilación de Ser/Thr en el IR, provocando el bloqueo del receptor, 2) La acumulación de ácidos grasos y lípidos genera un incremento en DGA que promueve la activación de PKC que inhibe a IRS, 3) El aumento de ceramidas activan la PP2A que provoca inactivación a AKT, 4) La disminución de oxidación lipídica genera aumento de ROS que produce estrés oxidativo, daño mitocondrial y la activación de PKC que inhibe la vía de insulina (Gutiérrez-Rodelo C. *et al.*, 2017).

1.4 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

La DM2 es un trastorno metabólico general, caracterizado por una elevación sostenida de los niveles de glucosa en sangre conocida como hiperglucemia, que produce como consecuencia la RI y más adelante disfunción en la secreción de insulina (OMS 2016; ADA 2016). Las principales causas que conllevan al desarrollo de la DM2 (Figura 3) son: 1) RI e inflamación, 2) gluco-lipotoxicidad y disfunción de la célula β pancreática, 3) disfunción mitocondrial y 4) susceptibilidad genética. La DM2 se puede sintetizar en tres fases: 1) niveles de glucosa basal alterada, 2) La aparición de la RI con una sobreproducción de insulina y una hiperglucemia postprandial (intolerancia a la glucosa) y 3) La disfuncionalidad de células β provoca disminución de la secreción de insulina y en conjunto con la RI se genera acumulación de insulina en plasma (hiperinsulinemia) y el sostenimiento de hiperglucemia en ayuno. Es en este proceso de tres fases donde radica la diferencia

entre DM1 y DM2, ya en la DM1 la destrucción autoinmune genera un déficit de insulina, en cambio en la DM2 el proceso de RI induce un déficit progresivo de secreción de insulina (Pérez F., 2009; Pérez-Díaz I., 2016 y Barquilla García A., 2017).

La mortalidad atribuida a la DM2 es debido a las complicaciones sistemáticas generadas por la hiperglucemia crónica, las cuales son clasificadas en macro y microvasculares. Las complicaciones macrovasculares más comunes en DM2 son la aterosclerosis, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, la enfermedad vascular cerebral y la insuficiencia arterial periférica. En tanto, las microvasculares relacionadas son la retinopatía, la nefropatía, la neuropatía y NAFLD (Isea J *et al.*, 2012; Pérez-Pevida B. *et al.*, 2016).

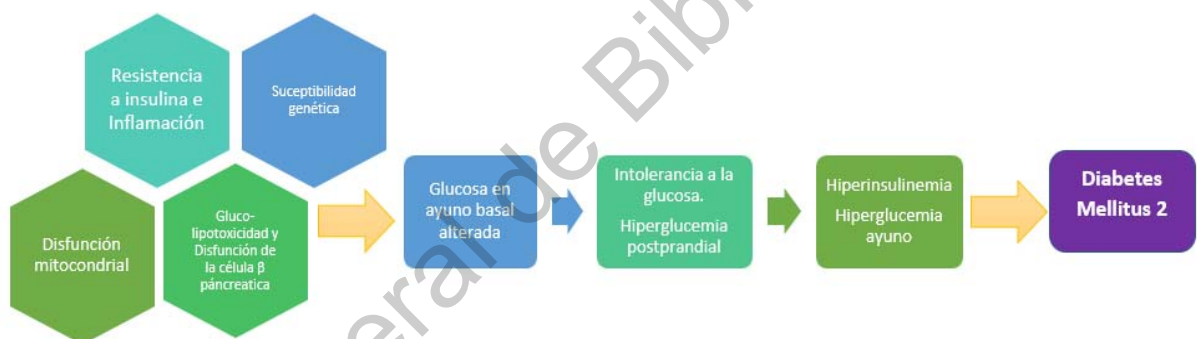


Figura 3. Eventos progresivos de la diabetes mellitus 2.

Los eventos para desarrollar DM2 dependen de factores previos como hiperglucemia, RI, disfunción mitocondrial, glucotoxicidad, lipotoxicidad y de los rasgos genéticos (Pérez-Díaz I., 2016).

1.5 Metabolismo energético de carbohidratos y lípidos.

Para el correcto metabolismo celular se requiere de un equilibrio ordenado y dinámico de la homeostasis de nutrimentos, dependiente del proceso cíclico de alimentación-ayuno (postprandial, ayuno, inanición), en la que participan diversos órganos y tejidos, principalmente hígado, músculo, TA y cerebro (Tabla 1). Esta homeostasis depende de una adecuada distribución, abastecimiento y eliminación de los principales combustibles energéticos (Brandan N. *et al.*, 2014; FAO., 2015).

Tabla 1. Combustibles energéticos del metabolismo celular.

Órgano/Tejido	Combustible		
	Almacena	Absorbe	Exporta
Cerebro	Ninguno	Glucosa, CC	Ninguno
Músculo	Glucógeno (10%)	AGL	Ninguno
TA	TAG	AGL	AGL, glicerol
Hígado	Glucógeno (90%) TAG	Aminoácidos, Glucosa y AGL	AGL, Glucosa, CC

Adaptado de Brandan N. *et al.*, 2014. TAG: Triacilglicéridos, AGL: Ácidos Grasos Libres, CC: Cuerpos cetónicos

En un organismo en un estado control, el aporte energético normal se basa en tres principales nutrientes que son transformados a sus unidades más simples: los glúcidos (azúcares e hidratos de carbono), lípidos (grasas y ácidos grasos) y proteínas (aminoácidos). Los alimentos son ingeridos, digeridos y absorbidos por el aparato digestivo, filtrados por el sistema porta de la mucosa intestinal y vertidos directamente al hígado antes de dirigirse a los otros tejidos (Ponziani F.R. *et al.*, 2015). Todos los nutrientes a excepción de los ácidos grasos pasan al hígado a través de la vena porta antes de ingresar en la circulación sanguínea, mientras que las grasas se convierten en TAG en la mucosa intestinal y en conjunto con otros elementos (fosfolípidos y apoproteínas) forman los quilomicrones, los cuales ingresan en los vasos linfáticos y circulación sanguínea. La mayoría de los carbohidratos de la dieta son transformados en glucosa, la cual es captada por los tejidos como cerebro, hígado, TA y músculo esquelético y cardíaco, cuya internalización a las células depende de proteínas acopladoras a membrana: Cotransportadores sodio-glucosa (SGLT) o glucotransportadores (GLUT) (Mataix J., 2009; Brandan N. *et al.*, 2014).

En el estado postprandial (Figura 4) aumentan los niveles de metabolitos en plasma produciendo hiperglucemia, aumento de AGL, hipertrigliceridemia y aumento de estrés oxidativo. Ante el aumento de la glucemia, el organismo estimula la secreción de la insulina en 30 segundos y paralelamente inhibe la secreción de

glucagón por parte de las células β y α , de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino, con el fin de reestablecer los niveles basales de glucosa sanguínea en aproximadamente 2 h (Reyna N. *et al.*, 2013; Brandan N. *et al.*, 2014). De forma normal, la glucosa es utilizada para la obtención de energía a través de la glucólisis hasta cubrir las demandas energéticas, después se activa la glucogénesis, responsable de la transformación del exceso de glucosa en glucógeno que es almacenado en hígado. Otro proceso que se ve favorecido por la insulina, es el incremento de la metabolización de la glucosa al tejido muscular mediante la gluconeogénesis muscular y hacia el TA (Brandan N. *et al.*, 2014). Por otra parte, en el hígado, la glucosa excedente se transforma en AGL y esto favorece la síntesis de TAG por medio de la lipogénesis, para posteriormente transportarlos y almacenarlos en el TA (Saz Peiro P. y Ortiz Lucas M., 2007). Simultáneamente, una porción de la glucosa sanguínea es transportada directamente hacia TA, donde es oxidada a AGL por lipogénesis. Al estimular la lipogénesis, en consecuencia, la hidrólisis de los TAG almacenados en el TA (lipólisis) se inhibe, favoreciendo el almacenamiento de lípidos y disminuyendo los niveles de NEFA circulantes. (McKee T. y McKee J.R. 2003; Brandan N. *et al.*, 2014).

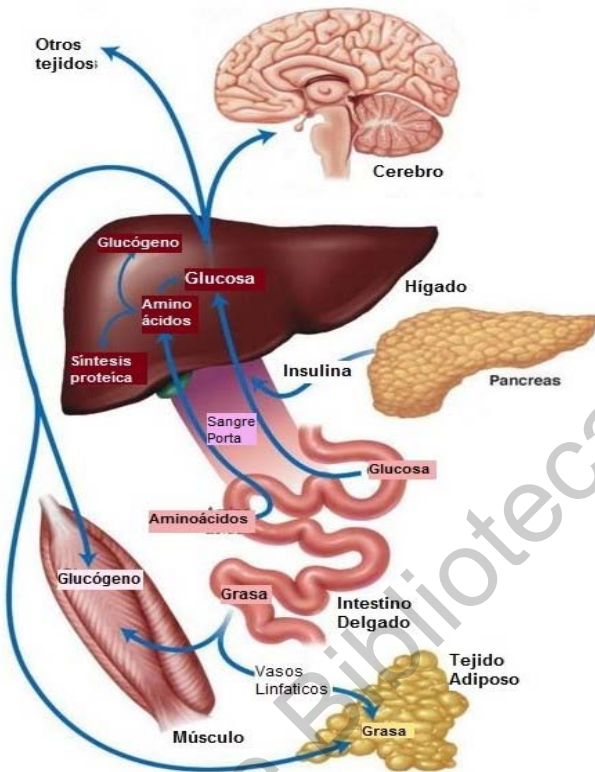


Figura 4. Representación de estado postprandial.

Posterior a la ingesta, los carbohidratos y aminoácidos son absorbidos y transportados vía porta al hígado antes de ingresar a los vasos sanguíneos. Las grasas se transportan en quilomicrones mediante los vasos linfáticos a los tejidos, el glicerol es captado por hígado. Posterior al aumento de glucemia, se secreta la insulina por parte de las células β pancreáticas, que estimula la glucogénesis, síntesis de AGL, glucólisis y lipogénesis (McKee T. y McKee J.R. 2003).

Una vez que han disminuido los metabolitos en plasma, hasta alcanzar niveles basales, el organismo cambia a una fase metabólica de movilización de la glucosa (Figura 5) para tratar de regular los niveles sanguíneos de glucosa, priorizando las necesidades de tejidos periféricos como cerebro y eritrocitos (Brandan N. *et al.*, 2014). Lo anterior ocurre en el ayuno temprano (4 a 6 horas posterior a la ingesta), donde la liberación de glucagón por parte del páncreas juega un papel importante, para invertir los procesos post ingesta, con el fin de aprovechar las reservas energéticas y mantener niveles basales. Inicialmente, el metabolismo recurre a la glucogenólisis para degradar el glucógeno hepático y muscular en glucosa; posteriormente se activa la lipasa sensible a hormonas (HSL) que degrada

los TAG del TA mediante la lipólisis para ser utilizados por los músculos como combustibles; a la par, el músculo esquelético produce lactato, piruvato o cuerpos cetónicos, los cuales son movilizados al hígado y son utilizados para sintetizar glucosa a través de la gluconeogénesis y en última instancia el metabolismo recurre al uso de proteínas y aminoácidos para la obtención de glucosa (Appleton A. y Vanberguen O., 2013). La tabla 2 muestra las vías metabólicas en cada estado metabólico (Varady K.A. *et al.*, 2007; Brandan N. *et al.*, 2014).

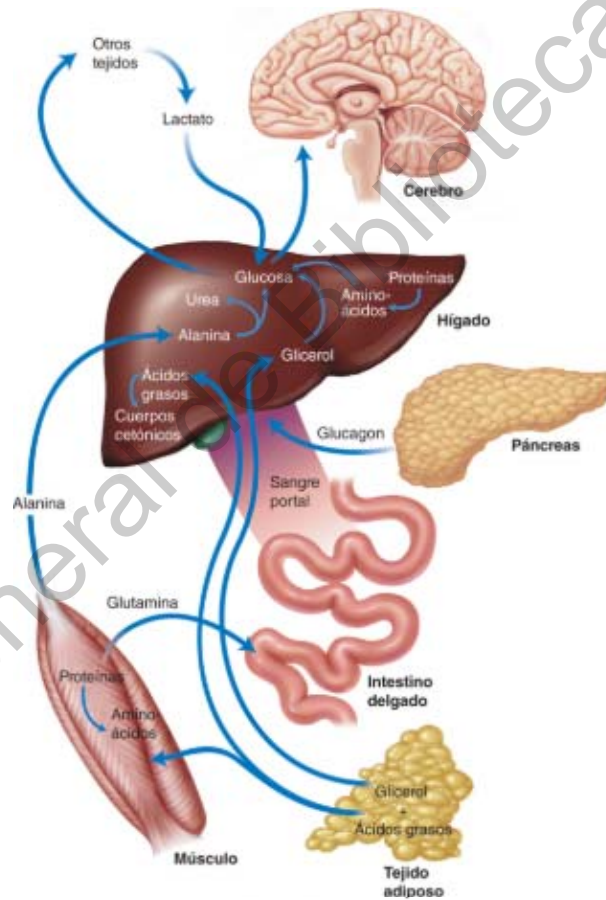


Figura 5. Representación del ayuno temprano.

Una vez que los niveles de metabolitos se han normalizado, las células α del páncreas liberan glucagón estimulando glucogenólisis, gluconeogénesis y lipólisis con el objetivo de generar energía metabólica para abastecer a los diversos tejidos, principalmente cerebro y eritrocitos (McKee T. y McKee J.R. 2003).

Tabla 2. Vías metabólicas activas e inactivas correspondiente al estado metabólico.

Estado Metabólico	Hormonas pancreáticas	Vías metabólicas
Posprandial /Alimentado	Insulina aumentada Glucagón disminuido	Estimulación de Transporte de Glucosa a TA y muscular Glucogénesis Glucólisis Lipogénesis (hígado y TA) Inhibición de: Glucogenólisis Lipólisis en TA Menor oxidación de AGL
Postabsortivo /Ayuno	Insulina disminuida Glucagón aumentado	Estimulación de Glucogenólisis Lipólisis en TA Gluconeogénesis Inhibición de: Transporte de Glucosa a TA y muscular Glucogénesis Glucólisis Lipogénesis (hígado y TA) Mayor oxidación de AGL

Adaptado de Brandan N. *et al.*, 2014.

1.6 El papel del hígado y páncreas en el metabolismo energético.

1.6.1 Páncreas

El páncreas es un órgano glandular mixto compuesto por la porción endocrina y la exocrina, situado en la cavidad abdominal posterior, desde el duodeno hasta el bazo, por detrás del estómago. Cerca del 80-85% del volumen pancreático cumple la función exocrina a través de los acinos serosos produciendo jugo pancreático que contiene enzimas digestivas (lipasas, proteasas, amilasas), las cuales son evacuadas al intestino (duodeno) para ayudar al proceso de digestión de las grasas, proteínas y carbohidratos de los alimentos (Sánchez-Bernal C. *et al.*, 2002; Sastrea J. *et al.*, 2005).

El resto del páncreas cumple la función endocrina consistente en los islotes pancreáticos o Langerhans, los cuales están constituidos por cuatro tipos de células: células α , productoras de glucagón; las células β , productoras de insulina; células δ , productoras de somatostatina y células F o PP, productoras de polipéptido pancreático (Figura 6). La función endocrina es fundamental para la regulación de la homeostasis de la glucosa en la sangre. De tal manera que la insulina se secreta con el fin de disminuir los niveles de glucosa en sangre y suprimir la secreción de glucagón (estado postprandial) (Olvera Granados C.P. *et al*, 2008). Mientras que el glucagón actúa aumentando el nivel glucémico en plasma e inhibiendo la secreción de insulina (estado de ayuno) para mantener los niveles de glucosa para el funcionamiento del organismo. De ahí que una disfunción de la porción endocrina genere diabetes mellitus (Brandan, N. *et al.*, 2006; Jennings, R.E. *et al.*, 2015).

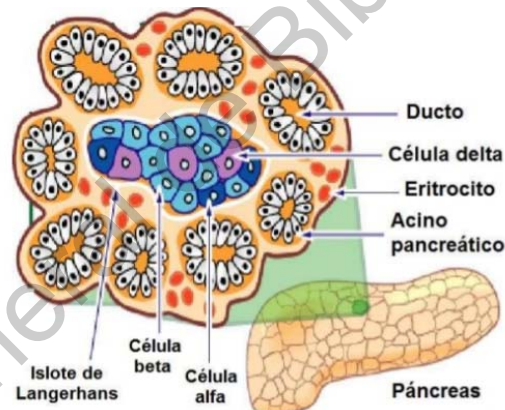


Figura 6. Clasificación de células pancreáticas.

El páncreas está conformado por una porción endocrina y otra exocrina. La porción exocrina está formada por los acinos pancreáticos, mientras que la parte endocrina tiene cuatro tipos de células: α , productoras de glucagón; β , productoras de insulina; células δ , productoras de somatostatina y células F, productoras de polipéptido pancreático (Sánchez-Bernal C. *et al.*, 2002).

El aumento de glucemia estimula la liberación de la insulina (Figura 7), al internalizarse a la célula pancreática mediante el GLUT 2 (Rorsman P. y Braun M., 2013). La glucosa es fosforilada por la enzima glucocinasa formando glucosa 6 fosfato, la cual participa en la glucólisis donde es transformada hasta piruvato. Este

piruvato ingresa a la mitocondria y libera ATP y este ATP bloquea los canales de potasio (K^+) sensibles a ATP, lo que provoca una acumulación de potasio e induce a la despolarización de la membrana, esto estimula la apertura de los canales de Ca_2^+ debido a cambios conformacionales que aumentan el ingreso de este, aumentando su gradiente intracelular (Rorsman P. y Braun M., 2013). Este aumento en la concentración de este ion promueve la migración de los gránulos de insulina a la membrana con la consiguiente secreción de la hormona, la cual se distribuye a tejidos insulino-dependientes (Unger R.H. *et al.*, 1978; Leibiger I.B. *et al.*, 2008)

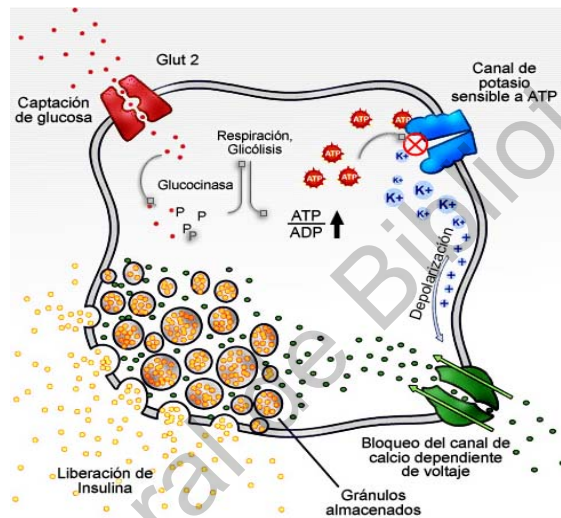


Figura 7. Diagrama de la liberación de insulina por las células β pancreáticas. En respuesta a la hiperglucemia posterior a la ingesta, las células β del páncreas endocrino estimulan la liberación de insulina mediante un proceso de cierre y apertura de canales de potasio y calcio activado por el ATP resultante de la metabolización de la glucosa, que permite la movilización de los gránulos de insulina a la membrana y su posterior secreción (Brandan, N *et al.*, 2006).

1.6.2 Hígado

El hígado es el órgano glandular de mayor volumen en el organismo y desempeña múltiples funciones metabólicas, digestivas, de síntesis, desintoxicación y almacenamiento. Es una glándula accesoria del tubo digestivo, de gran importancia metabólica y al ser el mayor órgano representa en peso aproximadamente el 2.5 % del peso corporal total. Está ubicado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y colinda de izquierda a

derecha con el estómago, una parte del colon y del duodeno y con el riñón derecho en su parte posterior (Guyton A.C. y Hall J.E., 2001; Delgado-Coello, B. A y Mas-Oliva, J., 2017).

A nivel macroscópico, tiene una forma ovoide de color marrón rojizo oscuro, con una consistencia firme pero friable y lisa. Morfológicamente presenta dos caras: diafragmática (de forma convexa relacionada al músculo) y visceral (de forma cóncava relacionada al estómago y duodeno); se divide en cuatro lóbulos: derecho, izquierdo, cuadrado y caudado unidos por el ligamento falciforme. Las diferencias principales entre la morfología del hígado humano y el de rata (Figura 8), son que el hígado de rata se divide en seis lóbulos: lóbulo lateral derecho (1), lóbulo medial derecho (2), lóbulo lateral izquierdo (4), lóbulo medial izquierdo (5) y proceso caudado del lóbulo caudado (5) de la figura 8A; además de que no presenta vesícula biliar (Moller R. y Vázquez N., 2011; Sibulesky L., 2013).

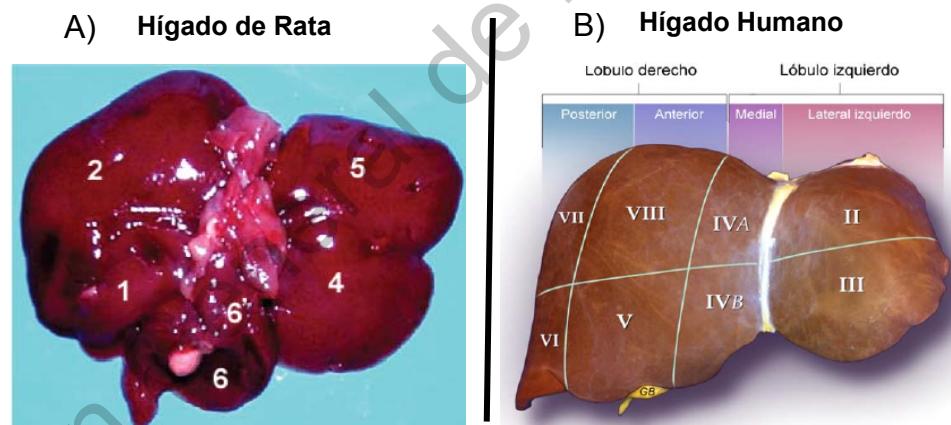


Figura 8. Anatomía morfológica del hígado de rata.

Es un órgano en forma ovoide de color marrón rojizo oscuro, con una consistencia firme pero friable y lisa que se sitúa por debajo del diafragma, por delante de estómago y por encima del duodeno. El hígado de rata presenta 6 lóbulos: 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6. Proceso caudado del lóbulo caudado a diferencia del hígado humano que tiene solo 4 (posterior, anterior, medial y lateral izquierdo). Además, la rata no tiene vesícula biliar (Moller R. y Vázquez N., 2011; Sibulesky L., 2013).

El hígado cuenta con una estructura tridimensional que se organiza en unidades microscópicas repetitivas formada por dos principales elementos tisulares:

1) Estroma compuesto por tejido conectivo que tiene la función de sostén y almacén y 2) Parénquima compuesto por tejido epitelial que representa la unidad estructural y funcional de la fisiología hepática. El estroma está conformado por la cápsula de Glisson, vasos linfáticos, sanguíneos, células de Kupffer, las células sinusoidales endoteliales y las células estrelladas (o de Ito) y trabéculas, mientras que el parénquima está conformado por las células denominadas hepatocitos organizados en láminas o trabéculas separadas por células sinusoidales. Los hepatocitos representan el 85% del hígado, en tanto el otro 15% lo conforman células no parenquimatosas (Valatas *et al.*, 2003; Murli K, 2013). Histológicamente, el hígado está constituido por dos unidades funcionales, acino y lobulillo hepático. El lobulillo hepático (Figura 9A) se considera como la unidad funcional y estructural del hígado, tiene una forma poligonal cuyo centro está ocupado por la vena central y hacia los bordes por las tríadas portales o espacio porta. Cada tríada portal está formada por el ducto biliar, una rama de la arteria hepática o arteriola y otra de la vena porta o vénula, además de vasos linfáticos y fibras nerviosas. Por otro lado, el acino hepático (Figura 9B) tiene forma romboidal y es la unidad funcional más pequeña del parénquima, tiene un pequeño espacio porta en el centro y vénulas hepáticas terminales alrededor de la periferia, de tal manera que se divide en tres zonas: zona 1) la más cercana al eje menor y rodea al lobulillo (con contenido relativamente alto de sustancias nutritivas y oxígeno), zona 2) sin límites claros y la zona 3 que es la más alejada del eje menor y rodea a la vénula hepática (con contenido de oxígeno menor, ya que corresponde al de la sangre venosa; además contiene pocas sustancias nutritivas) (Guyton A.C. y Hall J.E. 2001; Murli K., 2013; Delgado-Coello, B. A y Mas-Oliva, J., 2017).

El hígado cuenta con dos fuentes de suministro sanguíneo: 85% de la vena porta, que contiene sangre poco oxigenada y es rica en nutrientes pues viene desde los intestinos y el otro 15% es sangre muy oxigenada y con pocos nutrientes pues proviene desde la aorta a través de la arteria hepática. Lo anterior ocasiona que en el hígado se concentre cerca del 13% de la sangre total del cuerpo, por lo que tiene

ese color marrón rojizo oscuro. Gracias a la vascularización y a la estructura parénquimal, el hígado se convierte en un excelente hilo conductor entre el tracto digestivo y el organismo, para la distribución de los nutrientes constituyendo el mayor secretor de combustibles energéticos como glucosa, cuerpos cetónicos, AGL, entre otros (Sibulesky L., 2013; Delgado-Coello, B. A y Mas-Oliva, J., 2017).

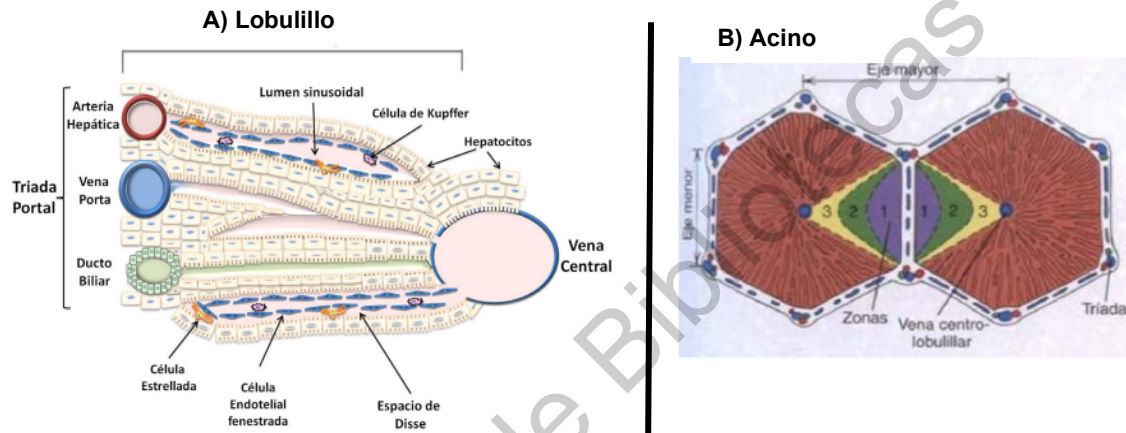


Figura 9. Estructura microscópica de hígado.

A) En el lobulillo portal está la unidad funcional y estructural del órgano, tiene una forma poligonal, con el espacio portal en el centro e incluye la arteria hepática, vena porta y conducto biliar, además contiene vasos linfáticos y fibras nerviosas. B) El acino hepático de forma romboide es la unidad más pequeña y se divide en las zonas 1 (periportal), 2 (media) y 3 (pericentral) (Murli K, 2013).

El hígado tiene la particularidad de ser el principal regulador de glucosa del organismo, debido a que metaboliza aproximadamente el 60% de los carbohidratos de la dieta degradados mayoritariamente a glucosa, galactosa y fructuosa (Figura 10). Los carbohidratos absorbidos por el intestino delgado son vertidos directamente al hígado a través de la vena portal. La gran ventaja del hígado como regulador glucémico radica en que contiene enzimas clave (galactocinasa GALK, galactosa-1-fosfato-uridil transferasa GAL1PUT y uridin difosfato galactosa 4' epimerasa UDPGAL) las cuales transforman la galactosa en glucosa; fructocinasa, aldolasa B y la triocinasa, la fructosa en dihidroxiacetona (DHA) y gliceraldehído (G3P), metabolitos intermediarios de las vías glucolíticas y gluconeogénicas. Al

incrementar la glucemia, aumenta el ingreso de glucosa al hígado mediante los transportadores GLUT2 por un proceso de difusión facilitada independiente de la insulina. La glucosa es convertida rápidamente a glucosa 6-fosfato (G6P) por la glucocinasa, cuyo proceso es activado por la insulina, con el fin de impedir su difusión al exterior de los hepatocitos y así mantener un continuo gradiente intra y extracelular (Brandan N. *et al.*, 2014). Los niveles de glucosa en plasma actuando como sensor, indicando al hígado del estado metabólico del organismo (posprandial o postabsorbativo). En el estado posprandial, el hígado metaboliza cerca del 60% de la insulina liberada por el páncreas, mientras el resto se libera en plasma con una vida media de 3 a 5 minutos (Ulrich A.B., *et al.*, 2002, McKee T. y McKee J.R. 2003; Brandan N. *et al.*, 2014).

La importancia de la insulina en el hígado radica en que promueve varias vías metabólicas como: 1) La síntesis de glucógeno (glucogénesis) mediante la glucógeno sintasa (GYS1); 2) Aumenta la glucólisis activando a la fosfofructocinasa (PFK1); 3) Incrementa la síntesis de acetil-CoA derivada del piruvato, estimulado por la piruvato deshidrogenasa (PDH); 4) Intensifica la lipogénesis de novo estimulada por la acetil-CoA carboxilasa, cuando existe un exceso de glucosa, y por último; 5) Inhibe la actividad de la glucógeno fosforilasa disminuyendo la degradación del glucógeno (glucogenólisis).

(Na⁺) como cotransportador de la glucosa mientras que los GLUTs actúan por difusión facilitada (Pérez C.E. y Guerrero C.A. 2005). Hasta la fecha, se han descritos 14 miembros de la familia de los GLUTs con características similares como dominios intracitoplasmáticos, un dominio extracelular glucosilado, una especificidad de acuerdo al tipo de monosacárido que transporta y una diversa distribución en tejidos ((Díaz Hernández D.P y Burgos Herrera L.C., 2002; Bermúdez V. *et al.*, 2007). El principal transportador de glucosa expresado en la membrana plasmática de los hepatocitos es el GLUT2, este también se localiza en células β pancreáticas y en menor proporción en intestino delgado y riñón. En tanto, el principal transportador expresado en músculo y TA es el GLUT4 (Leturque A. *et al.*, 2009; Sandoval-Muñiz R.J. *et al.*, 2016).

El GLUT2 es un transportador de glucosa con una cinética enzimática de Michaelis-Menten (K_m) de 15-20 mM, lo cual indica una baja afinidad por la glucosa, sin embargo, cuenta con la cualidad de una gran afinidad a otros monosacáridos como la galactosa, fructuosa y manosa. El GLUT2 es altamente específico para glucosa y debido a su alta K_m se le atribuye la propiedad de glucosensor debido a que transporta glucosa por gradiente de concentración intra y extracelular, es decir, solo permite el ingreso de la glucosa cuando su concentración en plasma este tan elevada como para necesitar la liberación de insulina. (Díaz Hernández D.P y Burgos Herrera L.C., 2002; Bermúdez V. *et al.*, 2007; Sandoval-Muñiz R.J. *et al.*, 2016).

1.8 Insulina y su papel en la homeostasis de glucosa.

1.8.1 Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica de 5.8 KDa (Figura 11) de 51 aminoácidos (aa) compuesta por dos cadenas (A con 21 aa y B con 30 aa) unidas por puentes disulfuro (Chang L. *et al.*, 2004; Brandan N. *et al.*, 2006).

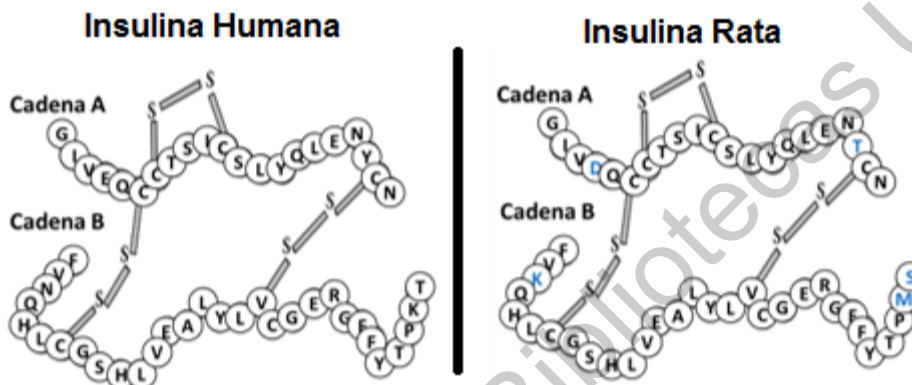


Figura 11. Estructura de la insulina.

Hormona polipeptídica con dos cadenas (A con 21 y B con 30 aminoácidos) unidas por puentes disulfuro. Se sintetiza a partir de preproinsulina, pasa a retículo endoplásmico como proinsulina, y el aparato de Golgi es transformada en insulina y péptido C. La insulina de rata se diferencia de la humana en los aminoácidos marcados en azul (Barrett E. *et al.*, 2010; Jia, y Weiss 2011).

La insulina es secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino en respuesta al aumento niveles de glucosa y otros metabolitos en plasma después de la ingesta de alimentos (Benítez A. *et al.*, 2015). La producción de la insulina inicia en el ribosoma, que traducen las subunidades del núcleo y así formar la preproinsulina (11. 5Kda), posteriormente es desdoblado en el retículo endoplásmico rugoso en proinsulina, la cual está constituida por 3 cadenas: A (cadena carboxiterminal), B (cadena amino terminal) y C (conexión con péptido C). Posteriormente las endopeptidasas retiran al péptido C, luego se moviliza al aparato de Golgi donde es transformada en insulina madura y péptido C (de 32 aa), ambos son empaquetados en vesículas secretoras que se acumulan en el citoplasma hasta su proceso de liberación (Valsecia M., 2006; Mandal A., 2019).

1.8.2 Receptor de insulina (IR).

El IR (Figura 12) es una glucoproteína transmembranal heterotetramérica conformada por 4 subunidades (2 α y 2 β) unidas por puentes disulfuro que pertenece a la familia de receptores con actividad cinasa intrínseca que modula la autofosforilación en residuos de tirosina (Tyr). Las subunidades α son extracelulares y contiene el sitio de unión con la insulina; mientras que las subunidades β poseen un dominio extracelular, transmembrana y otro intracelular donde se localiza la región catalítica de cinasa con sitios de unión a ATP (adenosín trifosfato). La insulina se une a la porción N-terminal de las subunidades α que contienen una zona abundante en cisteína (Cys 524 y Cys 647), lo cual genera cambios conformacionales de la subunidad β que inducen a la autofosforilación de los residuos de tirosina (Try1158, Try1162 y Try 1163) y en consecuencia el IR queda activado y reconoce a proteínas adaptadoras como sustrato del receptor de insulina (IRS) que coordinan la formación de complejos moleculares que desencadenan el encendido de cascadas de señalización intracelular que rio abajo van a ser mediadas a través de enzimas cinasas (Youngren J., 2007; Olivares Reyes J. A. y Arellano Plancarte A., 2008; Gutiérrez-Rodelo C. *et al.*, 2017).

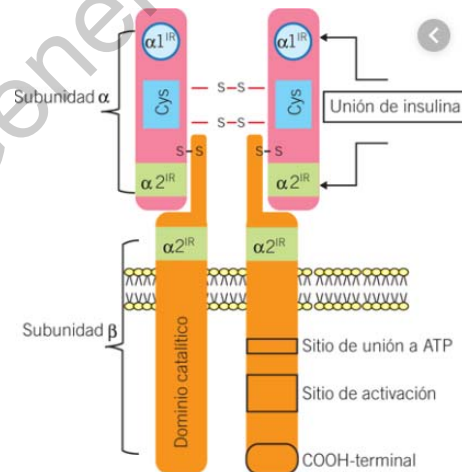


Figura 12. Esquema del receptor de insulina.

El receptor de insulina es una glucoproteína de membrana, constituido por dos subunidades extracelular con el sitio de unión con la insulina y dos subunidades trans e intramembranales con la región catalítica de cinasa con residuos de tirosina que inducen a la autofosforilación e inician el encendido de cascada rio abajo. Modificado de (Sesti, 2006; Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008).

1.8.3 Cascada de señalización de insulina.

La insulina inicia múltiples funciones biológicas mediante la activación de dos principales vías de señalización celular (Figura 13): 1) Vía de las MAP cinasas, la cual regula la expresión genética y el crecimiento celular y 2) Vía del fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K/AKT) la cual presenta el principal mecanismo de la regulación del metabolismo de la glucosa y lípidos a través de la activación de enzimas permitiendo la captura de glucosa, sobrevivencia celular, síntesis de proteínas y glucógeno (Sesti, 2006; Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008).

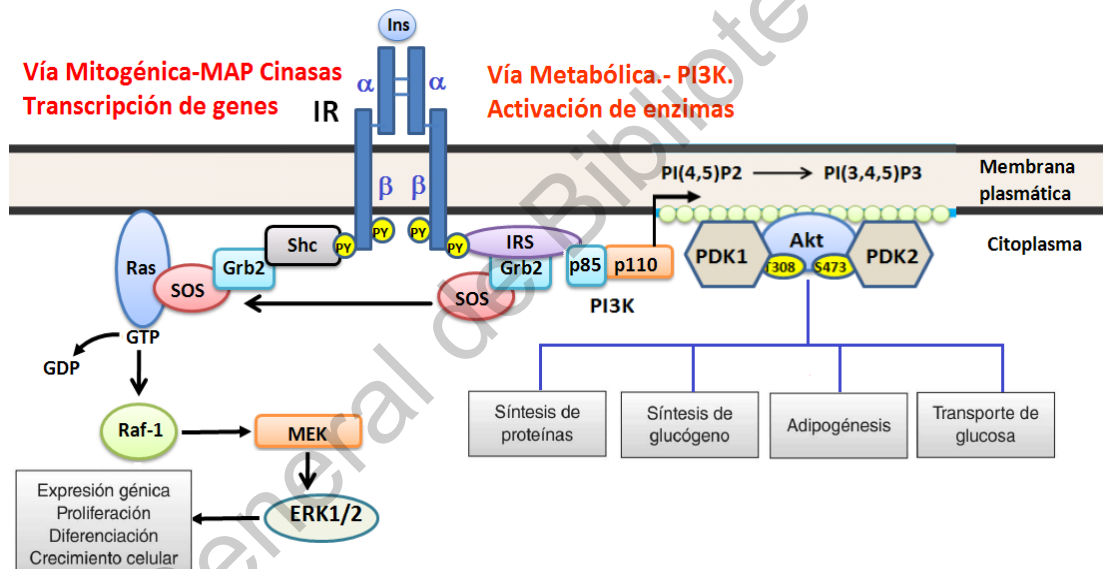


Figura 13. Vías clásicas de señalización de la insulina.

El mecanismo de acción de la insulina inicia cuando se une a sus receptores de membrana, éste presenta cambios conformacionales en sus subunidades α , que permiten la autofosforilación de las subunidades beta en residuos de tirosina que produce el encendido de cascadas de señalización río abajo, mediadas a través de enzimas cinasas, es decir, activadas por fosforilación. Modificado de (Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008; Gutiérrez-Rodelo C. *et al.*, 2017)

La transducción de señales de la vía metabólica PI3K/AKT inicia con la activación de IR, el cual es autofosforilado, activando a las proteínas sustrato del receptor de insulina (IRS) que fosforilan a la subunidad reguladora p85 de la PI3K,

produciendo un cambio conformacional, estimulando la activación de la subunidad catalítica p110 de PI3K y consecuentemente p110 fosforila al fosfatidilinositol 3,4 difosfato (PIP2), el cual se convierte en el segundo mensajero fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), que fosforila en Thr308 a la cinasa dependiente de fosfoinositidos-1 (PDK1) y a la Ser473 de PDK2, las cuales activan a AKT (también llamada PKB). Una vez activada AKT, esta regula varios efectos metabólicos a través de sus isoformas 1,2 y 3 como: la síntesis de proteínas, síntesis de glucógeno, adipogénesis y transporte de glucosa (Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008; Gutiérrez-Rodelo C. *et al.*, 2017).

1.8.4 Regulación de transporte de glucosa.

El transporte de glucosa en músculo y TA depende de la translocación de los GLUTs (específicamente GLUT4) del citoplasma a la membrana (Figura 14) para internalización de glucosa a la célula, con el fin de que sea utilizada para obtener la energía requerida a través de glucólisis, seguida del ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa. La glucosa sobrante estimula lipogénesis. Esta regulación de transporte se lleva a cabo a través de 3 vías: 1) PI3K/AKT, 2) Cbl/APS/CAP y 3) PDK1/PCK atípicas (Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008; Gutiérrez-Rodelo C. *et al.*, 2017).

1.8.4.1 Vía PI3 K/AKT

Una vez activa AKT, esta fosforila a la proteína AS160, que a su vez activan a las proteínas G pequeñas Rab, lo cual promueve la translocación de los GLUTs (Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008).

1.8.4.2 Vía PI3K/PDK

Se ha sugerido que esta señalización inicia con la activación de PI3K, la cual activa a PDK-1, que posteriormente fosforila a las isoformas atípicas de PKC, específicamente a zeta ζ y lambda λ), las cuales promueven la translocación de los GLUTs (Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008).

1.8.4.3 Vía APS/CAP/Cbl

Esta vía involucra a las proteínas adaptadoras APS, CAP y Cbl que forman un complejo proteico que es fosforilado por el IR lo cual activa a la proteína Cbl, que fosforila y activa a las proteínas CR y C3G, C3G para finalmente activar a la proteína G pequeña TC10, la cual interacciona con el complejo PKC atípicas/PAr6/PAr3 para fosforilarlas y activarlas y así promover la translocación de los GLUTs (Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2018).

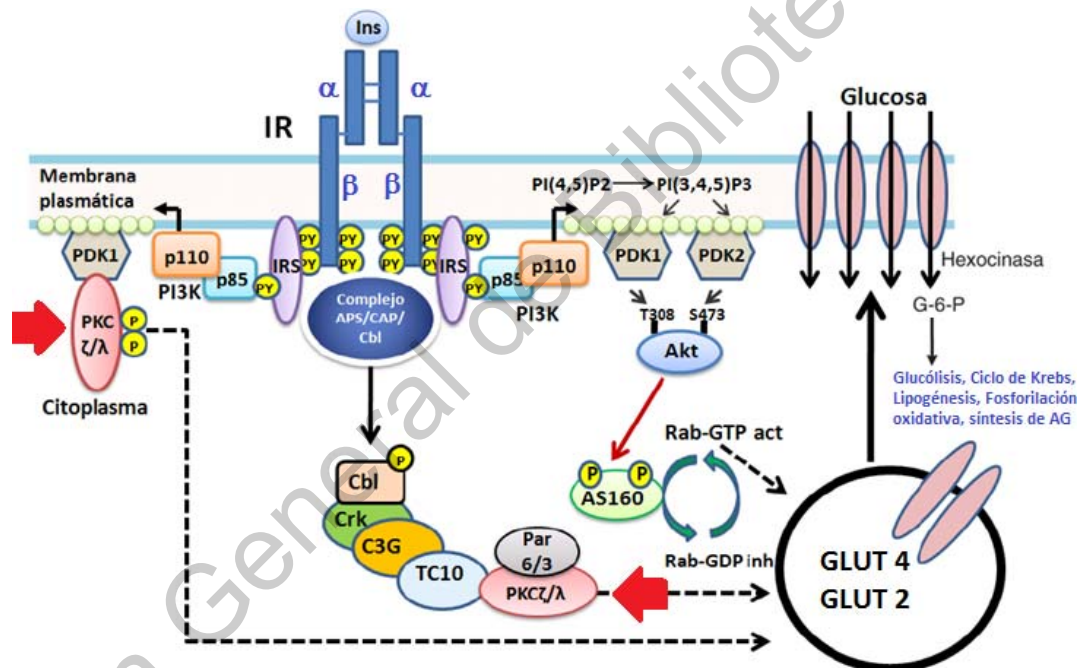


Figura 14. Regulación de transporte de glucosa.

La translocación de las proteínas GLUTs del citoplasma a la membrana para permitir el ingreso de la glucosa a la célula depende de varios mecanismos: 1) La vía clásica inicia después de activación de IRS seguida de PDK1 y 2 y AKT, que fosforila al sustrato de la proteína AS160, la cual inhibe e incrementa el tráfico dependiente de Rab-GTP activo del GLUT 2) Vía PI3K, activada inicialmente por PDK1 que induce la fosforilación de Thr de PKC que contribuyen a la translocación de los GLUTs. 3) Vía de los complejos proteicos APS/CAP/Cbl y Crk/C3G/TC10, este último fosforila a las PKC, las cuales promueven la movilización de los GLUTs. Modificado de (Olivares Reyes J.A. y Arellano Plancarte A., 2008).

1.9 Proteína Cinasa C (PKC).

1.9.1 Características de PKC

La proteína cinasa C, PKC, es una familia de proteínas de distintas isoformas que realizan la acción de fosfotransferasa, es decir, catalizan la fosforilación de distintas proteínas diana, principalmente en residuos de Thr y Ser, modificando su estructura y participando en múltiples vías de señalización celular con el fin de activar factores de transcripción a nivel intracelular (Farese, R. y Sajan, M.P., 2010).

Las isoformas de PKC al ser enzimas anfitrópicas, se encuentran tanto en el citosol como unidas a la membrana, participan en múltiples funciones fisiológicas como mecanismos de señalización que incluyen diferenciación, proliferación, expresión génica, apoptosis, función cerebral, transporte de membrana, modulación negativa y positiva de la insulina y la organización de proteínas de la matriz extracelular y citoesquelética. Gracias a su multifuncionalidad y ubicuidad son un grupo de proteínas muy interesantes a investigar y estudiar (Kaibuchi K. *et al.*, 1983; Nishizuka, 1995).

1.9.2 Estructura de PKC.

Las isoformas de la familia de las proteínas PKC consisten de una cadena polipeptídica que está conformada por dos regiones: un dominio regulador con un extremo amino terminal (N-terminal) y un dominio catalítico con extremo carboxilo terminal (C-terminal) y separadas entre sí por una región variable (V) (Newton, 1995). La región catalítica tiene 2 dominios C3 y C4; C4 lleva a cabo la actividad de cinasa y C3 realiza la unión a ATP, este es el que aporta el grupo fosfato para fosforilar al sustrato (Corbalán-García S. y Gómez-Fernández J.C, 2006). La región reguladora se compone de los dominios pseudosustrato, C1 y C2, los cuales establecen la forma de activación de la PKC (Corbalán-García S. y Gómez-Fernández J.C, 2006). El dominio C1 representa la unión de DAG y esteres de forbol y el dominio C2 que regula la unión de fosfolípidos con iones de calcio ((Corbalán-García S. y Gómez-Fernández J.C, 2006). Las diferencias en estructura entre las

PKC se encuentran en la región reguladora responsable de la activación de cada grupo de estas proteínas (Newton A., 1995; Corbalán-García S. y Gómez-Fernández J.C, 2006).

1.9.3 Subfamilias de PKC.

Se han identificado al menos 11 isoformas (Figura 16) en diferentes mamíferos, las cuales basados en la estructura primaria y características bioquímicas se dividen en tres subfamilias: clásicas, nuevas y atípicas (Corbalán-García S. y Gómez-Fernández J.C, 2006).

- a) Familia de PKC clásicas o convencionales (cPKC): Está formada por las isoenzimas α , β I, β II y γ ; para su activación se requiere de la unión DAG y esteres de forbol en su dominio C1 y de la unión de iones de calcio (Ca^{+2}) y fosfolípidos aniónicos (Nishizuka, 1995).
- b) Familias de PKC nuevas (nPKC): Está formada por las isoenzimas ϵ , δ , η y θ ; para su activación requiere de la unión DAG y esteres de forbol en su dominio C1 y del dominio C2 tipo II, por lo cual su posición estructural se sitúa delante de los dominios C1. Asimismo, este dominio C2 no responde al Ca^{+2} , por lo cual solo requiere de los fosfolípidos aniónicos (Nalefski y Falke, 1996; Newton A. C., 2010).
- c) Familias de PKC atípicas (aPKC): Está formada por las isoenzimas ζ , ι cuyo homólogo en ratón se denomina λ , y μ , para su activación solo requiere de PB (fosfatidilserina), al igual que las PKC nuevas y clásicas contienen el dominio C1, pero este es denominado atípico pues es insensible a la unión DAG-esteres de forbol (Suzuki *et al.*, 1987; Selbie L.A *et al.*, 1993) .

1.9.4 Activación de PKC.

Las isoformas atípicas de la proteína cinasa C (aPKC) regulan los efectos de la insulina sobre el transporte de glucosa en los tejidos musculares y adiposos y la

síntesis de lípidos en el hígado y apoyan otros procesos metabólicos, la expresión de enzimas necesarias para la secreción de insulina de los islotes pancreáticos y la producción de glucosa hepática (Farese R. *et al.*, 2005; Sajjan M.P. *et al.*, 2012).

PKC es activada mediante la liberación de la PP2A, que a su vez hidroliza fosfolípidos localizados en membrana, como el PI3K y produce los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP3) y DAG. La PKC atípica, que consiste en PKC ζ , ι , λ , y μ , que no están activados por DAG o éster de forbol, es uno de tales efectores de PI3K (Farese R. y Sajjan M.P, 2010; Habegger K.M *et al.*, 2012).

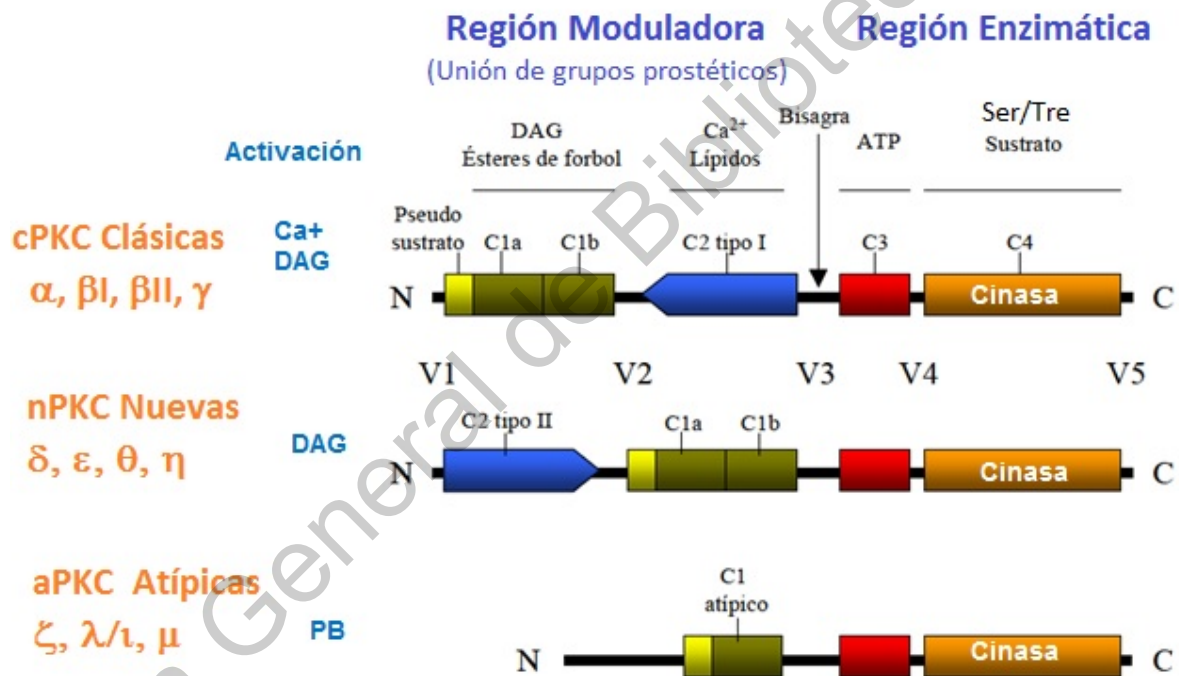


Figura 15. Representación esquemática de la estructura de las isoformas de Proteína Cinasa C (PKC).

Se distinguen dos regiones: 1) En el extremo amino terminal se encuentra la región moduladora con el dominio pseudosustrato que sirve de unión a grupos prostéticos como lípidos y Ca^{+2} según el tipo de isoenzima y 2) El extremo carboxilo terminal contiene la región enzimática con el dominio cinasa de unión al sustrato y el área que transfiere el grupo fosfato mediante el ATP. Modificado de (Newton A. C., 2011).

1.10 PKC en obesidad, resistencia a insulina y diabetes tipo 2.

Debido a que las isoformas de PKC son activadas principalmente por lípidos y a sus características como segundos mensajeros en la transducción de señales, incluida la modulación positiva y negativa de la acción de la insulina, diversos estudios han relacionado su presencia en estados normales, hiperglucémicos e hiperlipídicos y las han considerado como blancos para mediar los efectos del exceso de grasa en tejidos metabólicos afectados por los cambios producidos en la obesidad y diabetes (Schmitz-Peiffer C. y Biden Trevor J., 2008). Los estudios de PKC tanto *in vitro* como *in vivo* han sido correlacionales, pero comienza a abordarse el papel causal de isoformas de PKC en tejidos sensibles a la insulina como músculo, TA, hígado y páncreas expuestos a altas concentraciones de glucosa y lípidos y esto es en gran parte debido a que los niveles totales de DAG, principales activadores de PKC están elevados en obesidad, RI y diabetes. Dependiendo del tipo de tejido, la distribución celular y los cofactores de activación, Ca^{2+} / lípidos, existe la presencia diferencial de las isoformas individuales de PKC principalmente en tejidos metabólicos que participan de los cambios causados de la obesidad y diabetes, en tejidos cardiovasculares y renales derivados de las complicaciones de estas enfermedades (Gerald, P. y King, GL, 2010, Zhang L.L *et al.*, 2015). Estudios realizados en hígado, TA y músculo (Tabla 3) se ha visto la implicación de isoenzimas de PKC como mediadores e inhibidores de la acción de la insulina. Se ha sugerido que isoformas atípicas de PKC como λ/ι modulan positivamente la acción de insulina en TA y músculo induciendo la translocación del GLUT 4 a la membrana para la captación de la glucosa (Inoue M. *et al.*, 1977; Zhang L.L *et al.*, 2015). En tanto que isoformas nuevas como δ o θ , participan en la RI hepática inhibiendo la vía de señalización celular a través de la acumulación lipídica de DAG y el aumento de ROS, las cuales activan a dicha subfamilia de PKC (nPKC) provocando una inadecuada fosforilación en alguna molécula blanco río abajo en las cascadas de señalización, este podría ser el mecanismo que vincula la RI en

músculo con el metabolismo lipídico desregularizado (Idris I. *et al.*, 2001; Rhee *et al.*, 2015; Gutiérrez-Rodelo C.*et al.*, 2017).

En un estudio de ratas alimentadas con una dieta alta en grasas se observó que las isoformas de nPKC, especialmente PKC θ y PKC ϵ , estaban implicadas en un aumento en la movilidad de PKC ϵ junto con un contenido elevado de lípidos y una disminución de la eliminación de glucosa en el músculo esquelético (Schmitz-Peiffer C.y Biden Trevor J., 2008). En otro estudio con ratones AAKO (knockout de PKC λ en adipocitos), se determinó mediante inmunoensayo la presencia de PKC λ , Glut 1 y 4 e IRS 1 y 2 en adipocitos, músculo e hígado; tras la administración de 1mU/g peso de insulina durante 10 min, los resultados sugirieron que PKC λ es necesaria para el control de glucosa (Sajan *et al.*, 2014). La translocación PKC δ también se ha observado en el músculo de ratas alimentadas con alto contenido de grasa, así como después de la infusión de lípidos en ambos hígados (Lam TKT *et al.*, 2002) y músculo, donde PKC β también se activó (Itani S.I. *et al.*, 2002). Se observó que en ratones Lepob / ob que carecen de PKC δ , alimentados con dieta alta en grasas, la acumulación de triacilglicéridos hepática se reduce y la sensibilidad a la insulina mejora en comparación con los ratones Lepob / ob que contienen PKC δ .

Tabla 3. Presencia de las isoformas PKC en condiciones normoglucémicas, obesidad (O) y DM2

Tejido	Condición/ Isoforma	PKC Clásicas				PKC Nuevas				PKC Atípicas		
		α	β I	β II	γ	δ	ϵ	η	θ	ζ	λ /I	μ
Hígado	Normal	+	+	+	-	+	+	¿?	+	+	+	¿?
	O&DM2	+	+	+	+	+	+	¿?	+	+	+	+
TA	Normal	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	O&DM2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Músculo	Normal	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	O&DM2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Páncreas	Normal	+	+	+	-	¿?	+	¿?	¿?	¿?	+	¿?
	O&DM2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Isoformas de PKC detectadas en tejidos relacionados con el metabolismo de carbohidratos y lípidos en condiciones normales o exposición a hiperglucemia/hiperlipidemia. +presencia, -ausencia, ¿? presencia desconocida. Modificado de Geraldés y King, 2011.

Los estudios de PKC han determinado su presencia y expresión a nivel de mRNA y/o proteína tanto en condiciones normales como en estados metabólicamente alterados, tanto en modelos *in vivo* basados en modificación dietéticas como farmacológicas y con animales alterados genéticamente para alcanzar dichos estados metabólicos alterados (Farese, R. y Sajan, M.P., 2010). A pesar de que se ha sugerido el papel potencial de las isoformas de PKC en la DM2 en diversos sistemas *in vivo*, existen pocos estudios que representan las particularidades de la enfermedad combinando el uso de un fármaco para acelerar el proceso de hiperglucemia con una dieta igualitaria y adicionada con grasa y azúcar de tipo fructuosa en animales que no hayan sido modificados genéticamente, lo cual podría dar resultados más representativamente significativos.

1.11 Lipoperoxidación y su relación con DM2.

En un estado metabólicamente normal existe un equilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) y la actividad de sistemas de defensa antioxidante, que incluye enzimas como: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT), entre otras (González M. *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando este equilibrio se pierde por la producción excesiva de ROS o RNS y la disminución de los sistemas de defensa se produce una condición fisiológica conocida como estrés oxidativo (Venero G. J., 2002). El daño causado por estrés oxidativo es debido a que los radicales libres tienen una gran capacidad oxidante sobre las membranas celulares ocasionando alteraciones funcionales y estructurales y con ello el deterioro de la homeostasis de la célula, desarrollo de enfermedades crónicas e incluso muerte celular (Valdivieso-Izquierdo, L.R, 2015). Este daño oxidativo se ha implicado en la patogénesis de la DM2, derivado de la disminución en la β -oxidación lipídica y producción excesiva de RL, por la activación de cinasas de Ser/Thr, como PKC, que inhiben la fosforilación de las proteínas IRS en la vía de señalización de insulina a nivel periférico (Valdivieso-Izquierdo, L.R, 2015). Lo anterior contribuye a

la disfunción de las células β pancreáticas desarrollando la RI hepática y su posterior desarrollo a DM2. (Forbes, J.M. *et al.*, 2008; Orasanu G. Plutzky J., 2009).

Una manera de cuantificar el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes es a través de la oxidación de fosfolípidos de membrana, mediante el proceso conocido como lipoperoxidación (LP). Para la determinación de LP es común cuantificar la presencia de dienos conjugados (DC) y determinación de TBARs (Luna-Moreno, D *et al.*, 2007). Los DC se forman mediante el reordenamiento de los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) por ello se considera el evento primario del proceso peroxidativo, mientras que el ensayo TBARS se basa en los aductos formados entre el ácido tiobarbitúrico y los productos finales carbonílicos del lípido, es decir, la progresión de la peroxidación, principalmente malondialdehído (Abuja, P.M. y Albertini, R., 2001).

Un estudio realizado en varones inducidos a una glucemia aguda (Oré R, *et al.*, 2009) tuvo como objetivo determinar la respuesta del sistema antioxidante en varones control. Se incluyó a 13 sujetos adultos clínicamente controles, entre 20 y 41 años a los que se les midieron los niveles de glicemia, lipoperoxidación en suero, glutatión y actividad superóxido dismutasa en glóbulos rojos lisados e índices de estrés oxidativo. Obtuvieron como resultado que la lipoperoxidación aumentó de 2.54 ± 0.51 a 2.90 ± 0.58 $\mu\text{mol/L}$, de 0 a 60 minutos, y a 2.66 ± 0.55 $\mu\text{mol/L}$ a los 120 minutos. El glutatión se redujo en 8.10% a la hora, aumentando 7.08% a los 120 minutos. La actividad superóxido dismutasa se elevó sobre el basal 0.54% a los 60 minutos y 5.66% a los 120 minutos. Los índices de valoración del estrés oxidativo tuvieron correlación *r* Pearson positiva, en nivel alto a muy alto.

Otro estudio transversal realizado en 72 adultos control y 74 con DM2 en determinó la relación entre los niveles de lipoperoxidación y sistemas antioxidantes en la DM2. En ese trabajo se midieron los lipoperoxidos por TBARs y la actividad de las enzimas SOD y GPx. Los resultados fueron que los TBARs incrementaron en los sujetos con DM2 contra los animales control (0.329 ± 0.13 vs 0.293 ± 0.09 mmol/L , respectivamente) sin ser estadísticamente significativa, mientras que la actividad de SOD y GPx, en los sujetos DM2 presentaron actividades más bajas

que los controles (168 ± 16 vs 172 ± 17 U/L; 6262 ± 2912 vs 6782 ± 2500 U/L, respectivamente) aunque dicha diferencia no fue significativa. Estos resultados apoyan las evidencias que determinan una asociación etiológica y fisiopatológica del estrés oxidativo con la diabetes mellitus (Blanco R. *et al.*, 2004).

1.12 Modelos in vivo de DM2 inducida con estreptozotocina.

Las ratas alimentadas con dieta alta en grasa y tratadas con una dosis baja de estreptozotocina (STZ), se considera un modelo fenotípico que se asemeja a la DM2 en humanos (Mediani A. *et al.*, 2016). Debido a que la STZ es un análogo de la glucosa, cuya única diferencia estructural es un 3-metil-3-nitrosourea y en este sentido, el páncreas la internaliza por los mismos transportadores de la glucosa (Szkudelski T., 2001; Furman B.L., 2015). Ya dentro de la célula, el fragmento de nitrosourea se libera y ejerce su acción citotóxica que promueve la apoptosis de las células β (Szkudelski T., 2001; Furman B. L., 2015). Este fragmento de nitrosourea es un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucocinasa e induce a la metilación del DNA (generalmente adición de grupos metilo-CH₃) causando ruptura en la doble hélice del DNA que induce a la activación de poliribosilación del ADP y lleva a la depleción de NAD⁺ y ATP (Goyal S.N. *et al.*, 2016). Por otro lado, la nitrosourea es productor de RL que aumentan la xantina oxidasa (XOD) mitocondrial, inhibiendo el ciclo de Krebs y provocando la disminución de ATP (Szkudelski, 2001). Estas alteraciones en la glucólisis de las células β pancreáticas, inhiben el proceso de liberación de la insulina de las vesículas contenidas en el páncreas, causando la disfuncionalidad de las células β (Szkudelski T., 2001). En estudios previos usando STZ como el fármaco para inducir en animales diferentes tipos de diabetes, se han probado diferentes dosis, siendo las mínimas reportadas de (35-40mg/kg), animales en diferentes periodos de vida, y tipo de administración (intraperitoneal, intravenosa) y sean demostrado que mezclando factores, el modelo es efectivo para inducir DM2, comprobable a través de análisis de glucosa, insulina, hemoglobina glucosilada e histología del páncreas (Ayala I. *et al.*, 2008, Hugués Hernandez B. *et al.*, 2002)

II. JUSTIFICACIÓN

Dado las altas tasas de prevalencia de la obesidad y la diabetes, diversas investigaciones se han enfocado en el estudio de proteínas que participan en el metabolismo glucémico y lipídico, como es el caso de PKC.

Estas investigaciones se han centrado en modelos con el fin de emular condiciones metabólicas de la obesidad y diabetes, ya sea en animales con alguna modificación genética y/o a través de la modificación dietética o farmacológica. Para este proyecto se planteó un modelo con la misma proporción de incremento de carbohidrato simple y grasa saturada de origen animal, en conjunto con la administración de una dosis única de STZ, para la inducir DM2.

Las isoformas de PKC al ser enzimas que modifican a otras moléculas mediante fosforilación, participan como segundos mensajeros en múltiples procesos fisiológicos activados principalmente por la insulina, es por ello que en las últimas décadas el interés por aclarar la función específica de cada isoforma se ha incrementado, a la par de la evaluación de uso como objetivos de acción farmacológica. La información es limitada con respecto a la detección de isoformas de PKC ϵ y ζ (épsilon y zeta) y la evaluación del daño oxidativo de fosfolípidos de membrana como factores de predisposición a la resistencia a la insulina hepática en condiciones de obesidad y DM2. De modo que el interés de este proyecto es aportar información que apoye a comprender el papel de isoformas de PKC y el proceso de lipoperoxidación en un órgano clave en homeostasis de glucosa y metabolismo lipídico como es el hígado.

III. HIPÓTESIS

La presencia de isoformas de proteína cinasa C (ϵ y ζ) y lipoperoxidación en hígado incrementarán por una dieta obesogénica y la inducción de diabetes tipo 2.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de dieta obesogénica y diabetes tipo 2 inducida sobre isoformas de proteína cinasa C (ϵ y ζ) y lipoperoxidación en hígado de ratas.

4.2 Objetivos específicos

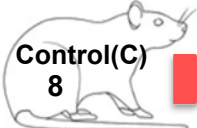
- 4.2.1** Evaluar los efectos de la dieta obesogénica y la inducción de diabetes tipo 2 con variables bioquímicas, metabólicas e histológicas.
- 4.2.2** Cuantificar el grado oxidativo del hígado de ratas, con dieta obesogénica e inducción de diabetes tipo 2, a través de lipoperoxidación.
- 4.2.3** Comparar la presencia proteica de las isoformas PKC (ϵ y ζ) en hígado de ratas con dieta obesogénica e inducción de diabetes tipo 2.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño Animal.


Se llevó a cabo un estudio correlacional, experimental y comparativo en ratas Wistar, con aprobación del comité de bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (registro 51FCN2016). El estudio (Figura 16) se ejecutó por 6 semanas en 24 ratas macho Wistar de 5 semanas de edad, obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (INB-UNAM Campus Juriquilla). Se eligió esta cepa por no ser modificadas genéticamente y desarrollar obesidad en función del aumento de peso y acumulación de grasa en la zona visceral. Los animales se alojaron en jaulas (27X37X15 cm) con cama sanitaria de viruta estéril, cambio de cama y limpieza de jaulas cada 3 días y bajo condiciones controladas de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$), humedad relativa ($60\pm 5\%$), un ciclo regulado de 12 horas de luz/oscuridad y suministro de alimento y agua a libre demanda (*ad libitum*).

Condiciones Experimentales. 6 semanas	
Especie a usar	Ratas macho cepa Wistar 5 semanas de nacidas
Tamaño de muestra	24 ratas 2 animales por jaula
Condiciones Ambientales	Temperatura: $20\pm 3^\circ\text{C}$ Humedad: $60\pm 5\%$ Ventilación: Aire controlado.
Ciclos Regulado	12 horas luz/12 horas oscuridad
Normatividad	NOM-062-ZOO-1999, NOM-033-ZOO-1995, NOM-087-ECOL-SSA1-2002, NOM-052-SEMARNAT-2005, Aprobación Bioética de FCN (51FCN2016)
Alimentación	Alimento y agua <i>ad libitum</i> DE, DE+DO, DO+STZ.
Eutanasia	Decapitación



Control(C)
8


DE: Dieta Estándar.
Alimento molido Rodent Lab Chow 5001®



Co DO(O)
8

DO: Dieta Obesogénica

- 50% Dieta estándar
- 20% fructuosa
- 20% manteca de cerdo
- 10% caseína.
- 0.15% colato de sodio



Con Diabetes(D)
8

DO+STZ (Estreptozotocina)
Vía intraperitoneal.
Dosis única (40mg/kg)

Figura 16. Características de diseño animal y grupos de intervención.

5.2 Grupos experimentales y tamaño de la muestra.

Durante la primera semana (7 días) no se llevó a cabo ningún procedimiento con el fin de permitir la adaptación de los animales al alimento estándar en polvo. Posteriormente, los 24 animales se separaron de manera aleatoria en 3 grupos con 8 ratas cada uno (Figura 17):

a. Grupo C (Control) se alimentó durante todo el experimento con dieta estándar (DE) Rodent Lab Chow 5001®.

b. Grupo O (Con dieta obesogénica) se alimentó durante las 6 semanas del experimento con una dieta obesogénica (DO) compuesta de la siguiente manera: 50% DE, 20% de fructuosa (carbohidratos simples) y 20% de manteca de cerdo (grasa saturada), 10 % de caseína y 0.15% de colato de sodio ($C_{24}H_{39}NaO_5$). La caseína se utilizó para complementar los requerimientos de proteína, mientras que el colato de sodio es usado para favorecer el metabolismo de lípidos debido a que las ratas no presentan vesícula biliar.

c. Grupo D (con diabetes inducida) se alimentó con la misma dieta DO y en la 3er semana se administró vía intraperitoneal una dosis única de STZ (40 mg / kg) para inducir diabetes.

Los grupos tuvieron una administración intraperitoneal en la tercera semana de buffer de citratos (50 mM, pH 4.5) como vehículo (Furman, B. L., 2015).

5.3 Control de peso

Los animales se pesaron al inicio, durante y al final del experimento. La frecuencia del pesaje durante el experimento fue semanal por duplicado usando en balanza analítica, con sensibilidad de 0.01 gr. La ingesta de alimentos y agua se evaluó diariamente.












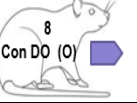


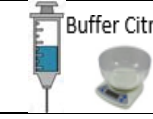









SEMANAS							
	0	1	2	3	4	5	6
Adaptación 				 Buffer Citratos			Sacrificio   
				 Buffer Citratos			
				 Buffer Citratos + Estreptozotocina			

Figura 17. Planeación de diseño animal.

5.4 Eutanasia y obtención de muestras

Al final del período de tratamiento y después del ayuno durante la noche, los animales fueron sometidos a eutanasia por decapitación y se recolectaron muestras de sangre y tejido para análisis bioquímicos, histológicos y de expresión proteica. Las muestras de sangre de 4 ml fueron recolectadas en tubos BD vacutainer® SST™ (368159 amarillos) para suero con gel separador y centrifugadas a 1500 rpm por 10 min en la centrifuga EBA 20 Hettich Lab Technology® para alicuotar el suero y almacenarlo a -80°C hasta su procesamiento. Las muestras de hígado y páncreas para análisis histológico se colocaron en histocassettes y se fijaron en formol al 10%. Las muestras de tejido para análisis de expresión proteína fueron colocadas en papel aluminio y almacenadas a -80°C para su posterior manejo.

5.5 Guías y reglamentación

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las Estándares de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, NOM-033-ZOO-1995: sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres, eutanasia de animales de laboratorio, así como normativas de bienestar animal en la investigación para la protección de los animales con fines de experimentación y

otros fines científicos y de docencia. Para el manejo de los residuos derivados de la eutanasia se llevó a cabo de acuerdo a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo, la cual considera el desecho de residuos biológico infecciosos (RPBI). Durante todo el experimento se siguieron las especificaciones de la NOM-052-SEMARNAT-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos, y la norma NMX-R-019-SCFI-2011 referente al Sistema armonizado de clasificación y comunicación de peligros de los productos químicos.

5.6 Análisis de peso corporal y parámetros bioquímicos en suero

El peso se obtuvo semanalmente utilizando la báscula Medi Data® serie DS-5. Para los parámetros de glucosa colesterol, triacilglicéridos (TAG), lipoproteínas: lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), enzimas hepáticas: aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) a excepción de insulina, se utilizaron kits de diagnóstico clínico basados en métodos enzimáticos-colorímetros con reactivos Spinreact® utilizando el analizador clínico Mindray® bs-120(Tabla 4). La VLDL se calculó mediante la fórmula: VLDL: Triglicéridos/5 (Spinreact, 2019). La insulina se cuantificó con el kit Rat Ins1/Insulin Elisa Kit RAB0904 de Sigma-Aldrich® en el lector de placas Spectramax-250® basado en método del inmunoensayo de ELISA. El índice HOMA-IR y HOMA-β se calcularon con las fórmulas: $HOMA-IR = \text{glucosa en ayunas (mmol/L)} \times \text{insulina en ayunas (mUI/L)} / 22.5$ y $HOMA-\beta = 20 \times \text{insulina en ayunas (mUI/L)} / 22.5 / (\text{glucosa en ayunas (mmol/L)} - 3.5)$, (García-Fuentes, E., Garrido-Sánchez, L., y Tinahones, F., 2008).

Tabla 4. Análisis de parámetros bioquímicos cuantificados Mindray® bs-120.

Parámetro y reactivo	Método
Glucosa Spinreact 41012	Método enzimático GOD-POD-Trinder Límite de detección: 0.379 a 500 mg/dL Glucosa + O ₂ + H ₂ O $\xrightarrow{\text{GOD}}$ Gluconato + H ₂ O ₂ 2H ₂ O ₂ + Fenol + 4-AF $\xrightarrow{\text{POD}}$ Quinona + 4H ₂ O
Triglicéridos Spinreact 41032	Método enzimático GPO-PAD Límite de detección: 0 a 1600 mg/dL Triglicéridos + H ₂ O $\xrightarrow{\text{LPL}}$ Glicerol + Ácidos grasos libres Glicerol + ATP $\xrightarrow{\text{GK}}$ Glicerol-3-P + ADP Glicerol-3-P + O ₂ $\xrightarrow{\text{GPO}}$ DAP + H ₂ O ₂ H ₂ O ₂ + 4 AF + p-Clorofenol $\xrightarrow{\text{PAD}}$ Quinona + H ₂ O
Colesterol total Spinreact 41022	Método enzimático CHOD-PAD. Límite de detección: 0.113 a 750 mg/dL Ésteres colesterol + H ₂ O $\xrightarrow{\text{CHE}}$ Colesterol + Ácidos grasos Colesterol + O ₂ $\xrightarrow{\text{CHOD}}$ 4-Colestenona + H ₂ O ₂ 2H ₂ O ₂ + Fenol + 4 Aminofenazona $\xrightarrow{\text{PAD}}$ Quinonimina + 4H ₂ O
Colesterol HDL-D Spinreact 41022	Método enzimático CHOD-PAD Reactivo precipitante Límite de detección: 1.57 a 257 mg/dL En el suero las LDL y VLDL son precipitadas por el ácido fosfotungstato con iones de magnesio
Colesterol LDL-D Spinreact 41023	CHOD-PAD Límite de detección: 17 a 976 mg/dL 1. Eliminación de lipoproteínas no-LDL Ésteres colesterol + H ₂ O $\xrightarrow{\text{CHE}}$ Colesterol + Ácidos grasos Colesterol + O ₂ $\xrightarrow{\text{CHOD}}$ 4-Colestenona + H ₂ O ₂ 2. Medición LDL Ésteres colesterol + H ₂ O $\xrightarrow{\text{CHE}}$ Colesterol + Ácidos grasos Colesterol + O ₂ $\xrightarrow{\text{CHOD}}$ 4-Colestenona + H ₂ O ₂ 2H ₂ O ₂ $\xrightarrow{\text{Catalasa}}$ 2H ₂ O + O ₂ LDL = colesterol total - HDL - (triglicéridos/5)
Aspartato aminotransferasa GOT/AST Spinreact 41272	IFCC. Método cinético enzimático U.V. Catalizar la conversión de aspartato a oxaloacetato L-Aspartato- α -cetoglutarato $\xleftarrow{\text{AST}}$ Oxaloacetato + L-glutamato Oxaloacetato + NADH + H ⁺ $\xleftarrow{\text{MDH}}$ Malato + NAD ⁺
Alanina aminotransferasa GOT/ALT Spinreact 41282	IFCC Método cinético enzimático U.V. Catalizar la conversión de alanina a piruvato. L-Alanina- α -cetoglutarato $\xleftarrow{\text{ALT}}$ Piruvato + L-glutamato Piruvato + NADH + H ⁺ $\xleftarrow{\text{LDH}}$ Lactato + NAD ⁺

Glucosa oxidasa (GOD), Peroxidasa (POD), 4-aminofenazona (4-AF), Lipoproteinlipasa (LPL), Glicerol Cinasa (GK), Glicerol-P-oxidasa (GPO), Dihidroxiacetona (DAP), Peroxidasa (PAD), Colesterol Esterasa (CHE), Colesterol oxidasa (CHOD), Malato deshidrogenasa (MDH), Lactato deshidrogenasa (LDH), Nicotinamida adenina reducida (NADH), Dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) (Spinreact, 2019; Departamento de Bioquímica Clínica, 2009).

5.7 Análisis histológicos en hígado y páncreas

Durante la eutanasia y disección, los órganos y tejidos se extrajeron, pesaron y se colocaron en histocassettes, después se fijaron con formaldehído al 10% y amortiguador salino de fosfatos, PBS 1X (NaCl 138mM, KCl 3mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM y KH₂PO₄ 1.5mM). Los tejidos hepáticos y pancreáticos fijados se deshidrataron y aclararon en un tren de alcoholes creciente (50, 70, 80, 90, 96, 100 %) y xilol, se infiltraron e incluyeron en parafina para obtener bloques. Con los bloques se hicieron cortes transversales de 5 µm usando el micrómetro, luego se extendieron y se unieron a laminillas de vidrio en baño de agua con parafina a 60°C, dejándolos secar para su posterior tinción (Montalvo-Arenas, C.E, 2010). Para el tejido pancreático y hepático se utilizaron tinciones de hematoxilina-eosina (H&E, Figura 18) y para tejido hepático además de H&E se utilizó tricrómica de Masson (TM, Figura 18) de acuerdo a lo especificado en la tabla 5. Las soluciones para la H&E fue preparada de acuerdo a lo descrito en Prophet, B.E., Mills, B., Arrington, J. B. y Sobin, H. L, 1995 y para la tinción TM se utilizó el kit 64297 de Hycel®. Posteriormente, se hidrataron en un tren de alcoholes decreciente y xilol, se montaron con resina epóxica para preservación y observación a microscopio óptico. El estudio morfológico y las microfotografías se realizaron con un microscopio óptico marca Velab, modelo VE-BC3 Plus Plan®, con objetivos acromáticos 4X, 10X, 40X y 100X retráctil usando el programa ISCapture®.

Tabla 5. Criterios de selección de tinciones empleadas.

Colorante	Tipo de colorante	Estructura tisular a teñir
Hematoxilina	<ul style="list-style-type: none"> • Colorante vegetal obtenido del árbol (<i>Haematoxylum campechanum</i>). • Colorante básico que tiñe estructuras ácidas • Coloración directa 	Afinidad por los ácidos nucleicos (ADN y ARN) o núcleos. Color de azul, azul morado o púrpura.
Eosina	<ul style="list-style-type: none"> • Colorante sintético ácido obtenido a partir del eosinato de sodio. • Carga eléctrica negativa le permite unirse a componentes celulares positivos. • Coloración directa 	Citoplasma y material extracelular Diversos grados de color rosado.
Solución Bouin	<ul style="list-style-type: none"> • Solución formol, ácido pícrico y ácido acético). • Indicado para fijación de tejidos blandos. 	Actúa como mordiente que ayuda a la tinción.
Hematoxilina Férrica de Weigert	<ul style="list-style-type: none"> • Colorante natural obtenido de una leguminosa (<i>Haematoxylum campechianum</i>). • Colorante básico que tiñe estructuras ácidas. • Se combinada con un metal que actuará como mordiente y su oxidación produce un color café oscuro. 	Teñirá los núcleos de azul y se apoya de una sustancia ácida.
Fucsina ácida Escarlata de Biebrich	<ul style="list-style-type: none"> • Colorante artificial básicos. • Basada en la fucsina, colorante de color magenta 	Tiñe los eritrocitos de fucsia, y se mezclará con los azules en los citoplasmas dando un color azul-violáceo Tiñe fibras de colágena.
Ácido fosfomolibdico	Compuesto químico de color amarillo verdoso, soluble en agua y solventes orgánicos polares como el etanol	Acentúa la acción de los demás colorantes
Azul de alanina	Colorante de origen sintético de color azul brillante y es estable al aire en soluciones de agua o alcohol.	Da color azul (más claro que la hematoxilina). Tiñe fibras de colágeno y fibras de reticulina
(Hycel, 2019; Montalvo-Arenas, C.E, 2010, Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud 2019)		

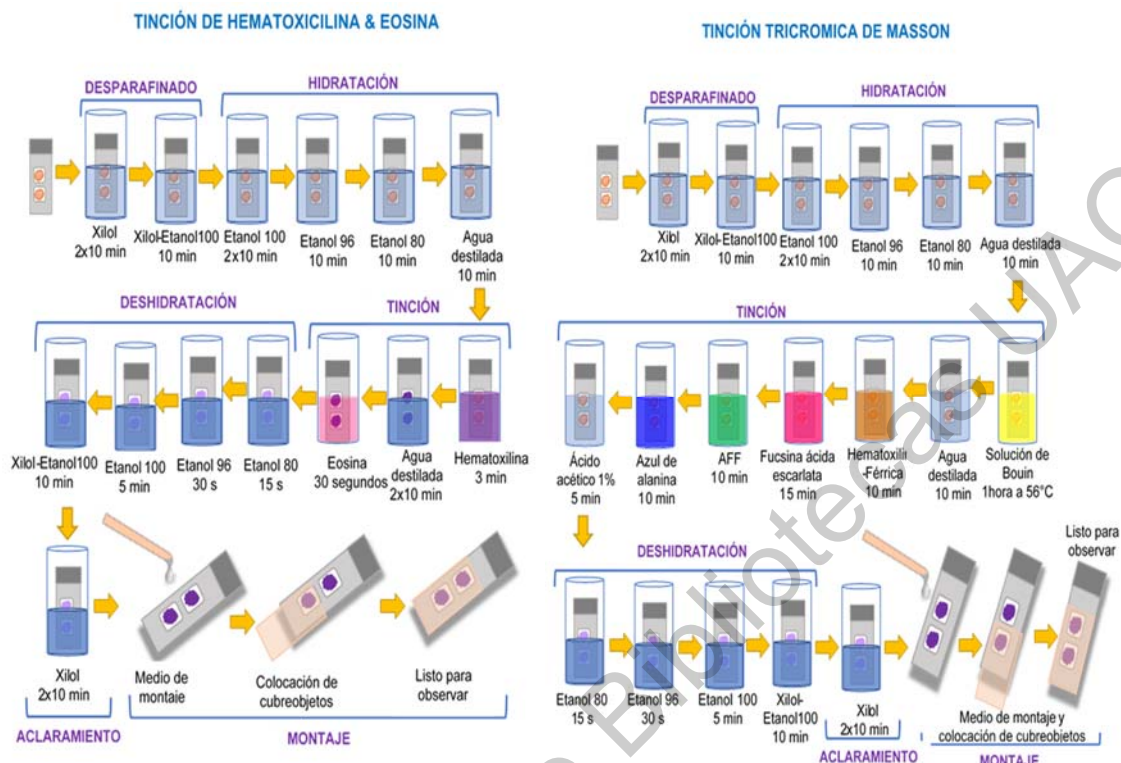


Figura 18. Protocolos de tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) y Tricrómica de Masson (TM).

5.8 Homogenados

Se pesó un 1 g hígado y se homogeneizó en una proporción de 10: 1 en Tris-HCl 10 mM (Tris 1.21 g/L, sacarosa 77.02 g/L, EGTA 0.114 g/L, albúmina sérica bovina 2 g/L, pH 7.5 ajustado con HCl) con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete™, EDTA-free, Roche®) y se trituró con un homogenizador (Polytron, Glas-Col®) en hielo frappe para evitar la degradación de la muestra. Los homogenados se centrifugaron a 1500 g (3500 rpm, rotor SS34) durante 15 minutos en una centrifuga Eppendorf 5207® en tubos facón de 15 ml. El sobrenadante se recuperó y se colocó en tubos eppendorf de 0.6 ml y se centrifugo a 10,000 g (12,700 rpm, rotor SS56) durante 15 minutos en una centrifuga eppendorf 5415®. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se

almacenó a -80°C para su posterior análisis (Aguilar-Delfín I *et al.*, 1996, Vázquez-Martínez O. *et al.*, 2019).

5.9 Evaluación semicuantitativa de niveles de daño oxidativo en hígado.

El daño oxidativo se estimó mediante el proceso de lipoperoxidación, en el cual se cuantificó la presencia de DC y se determinó los TBARS, según lo descrito por se homogeneizó en una proporción de 10: 1 en Tris-HCl 10 mM en homogenado de hígado (Luna-Moreno, D. *et al.*, 2007). Se introdujeron algunas modificaciones al método original (Hernández-Muñoz R. *et al.*, 1984). Las muestras del homogenado de hígado (200 μl) se analizaron de manera basal con 1 ml de Tris 0.15 M, pH 7,4 y de manera catalizada por Fe^{2+} (900 μL de Tris 0.15 M, pH 7,4 y 100 μL de FeSO_4 500 μM) se incubaron por 30 min a 37°C . La incubación se completó añadiendo 1,5 ml de ácido acético al 20% (ajustado a pH 2.5 con KOH), 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y 0.5 ml de agua. Las muestras se mantuvieron en baño de agua hirviendo por 45 min, se enfriaron y se les añadió 1 ml de KCl al 2%. El complejo se extrajo con 5 ml de solución butanol-piridina (15: 1, v/v); se tomaron 3.5 ml de la fracción superior y se centrifugaron a 1500 g (3500 rpm, rotor SS 34) durante 10 minutos en una centrifuga Eppendorf 5207® en tubos facón de 15 ml. El extracto se cuantificó a 532 nm. Se uso el malondialdehído (MAD) como estándar (coeficiente de extinción: $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Los resultados se expresan como TBARs (nmol/mg de proteína) calculando la concentración de la expresión TBARs: (Absorbancia 532 nm/0.0156) * mg proteína. Se determinó D.O en homogenados de hígado y la fracción lipídica se separó con reactivo Folch (cloroformo-metanol 2: 1, v/v). Las muestras se secaron y reconstituyeron con hexano y se midió la absorción de luz a 233 nm. Los resultados se expresan como D.O calculando la concentración de la expresión D. O= Absorbancia 233 nm * mg proteína (Klaassen C.D., Plaa G.L. 1969; Vázquez-Martínez O *et al.*, 2019). Análisis realizado en el departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla.

5.10 Cuantificación de Proteína Total

La cuantificación de proteínas de las muestras usadas para lipoperoxidación se realizó a través del método de Lowry (Lowry O.H *et al.*, 1951; Waterborg J. y Matthews H., 1984, Olson B. y Markwell J, 2007), usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Por otro lado, la cuantificación de proteínas de las muestras usadas para la expresión proteica se cuantificó usando el método de Bradford (Bradford, M., 1976), ensayo colorimétrico fundamentado en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie con los residuos de residuos de arginina, triptófano, tirosina, histidina y fenilalanina de las proteínas en solución ácida (reactivo de Bradford preparado con azul brillante de Coomassie BioRad G-250® y ácido fosfórico al 85%) y en el cambio del espectro de la longitud de onda de 465 nm a 595 nm al formarse el complejo (Friedenauer S. y Berlet, H., 1988; Kruger N., 1994). Se introdujeron algunas modificaciones al método original (Bradford M., 1976) utilizando una escala menor (Pande S. y Murthy M., 1994). En una placa de 96 pozos se colocó 10 µl de muestra o estándar (albúmina sérica bovina, BSA: 50, 100, 200, 300, 400 y 500 µg/ml), se añadieron 200 µl del reactivo de Bradford, se incubó por 5 minutos y se cuantificó a una longitud de onda de 590 nm en el lector de placas Spectramax-250®.

5.11 Electroforesis SDS-PAGE

Las técnicas de cuantificación de proteínas y electroforesis fueron estandarizadas con el fin de generar resultados confiables y precisos. Las muestras se separaron en función de su peso molecular por electroforesis de geles de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS) en condiciones semidesnaturalizantes no reductoras (Anexo 1). Los geles de PAGE forman parte de un sistema discontinuo (Anexo 2), conformado por un gel resolvente y concentrador que presentan diferente concentración, composición y pH. Se usaron geles de 10% de concentración de 1 mm de grosor, se cargaron 200 µg de proteína total de hígado, tomando 20 microlitros de muestra de homogenados de cada grupo experimental con 20 microlitros de amortiguador de la muestra en cada pozo del gel

concentrador y se usó como control un marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained 10-250kDa Protein # 26619, Thermo Scientific™.®). La electroforesis se inició con una intensidad de 100 V hasta que el frente rebaso el gel concentrador y se aumentó a 120V, la corriente se aplicó durante 1h 30 min a 4°C aproximadamente con solución amortiguadora de corrida 1x (Anexo 1), tomando como referencia la línea de amortiguador de la muestra (Anexo 1). Posteriormente, los geles se tiñieron con azul brillante de Coomassie (BioRad R-250®) o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

5.12 Evaluación semicuantitativa por Western-Blot de isoformas de PKC

Luego de la electroforesis, los geles se transfirieron en condiciones húmedas en un sistema denominado “sándwich” (cassette negro, esponjas, papel filtro, gel, membrana, papel filtro, esponjas y cassette blanco) usando un buffer Tris-Glicina-Metanol a pH 8.3 (Anexo 3) a membranas de nitrocelulosa (BioRad®) usando una corriente de 200 miliamperes (mA) durante una 1 hora en agitación constante y a aproximadamente 4°C. Al término de la transferencia, el gel se tiñó con solución teñidora a base de azul de Coomassie R250 BioRad ® (Anexo 3) con el objetivo de visualizar las proteínas transferidas del gel a la membrana, mientras que las membranas fueron marcadas las bandas de pesos moleculares con una aguja. Las membranas se enjuagaron con TBS 1x (Anexo 4) en agitación constante y se bloquearon con leche libre de grasa al 5% (BioRad ®) durante 1 hora en agitación constante y temperatura ambiente para bloquear señales inespecíficas. Las membranas se lavaron con TTBS 1X, pH 7.5 (Anexo 4). Las membranas se utilizaron para inmunodetectar PKC ζ y PKC ϵ incubando con anticuerpos específicos (Tabla 6). Los anticuerpos primarios fueron PKC ζ (sc: 17781, Santa Cruz Biotechnology) y PKC ϵ (NBP2-38531, Novus) los cuales fueron incubados en TTBS1X con 1% leche (Anexo 4) toda la noche. Las membranas fueron lavadas 3 veces con TTBS1X por 10 minutos. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, sc-516102, Santa Cruz Biotechnology y ab205718, abcam). Se procedió con lavados con TTBS1X y

TBS1X. Las proteínas se visualizaron utilizando un procedimiento colorimétrico por diaminobencidina (DAB, D8001 Sigma-Aldrich®, peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y TBS 1X y por quimioluminiscencia con luminol (GE Healthcare Amersham™ ECL™). El luminol se colocó por 10 min, la obtención de la señal en el luminograma fue con 15 minutos de exposición a la placa de revelado, 60 segundos en la solución reveladora y 60 segundos en la solución fijadora. Se llevó a cabo la cuantificación por densitometría con el analizador de imagen (Image Lab®, Bio Rad).

Tabla 6. Anticuerpos para detectar isoformas de PKC.

Anticuerpo	Marca	Dilución	Descripción
<i>PKC ε antibody NBP2-38531</i>	NOVUS	0.4 µg/ml	Anticuerpo primario policlonal de conejo para la detección de la familia de PKC en ratón, rata y humano.
<i>PKC ζ antibody(H-1) sc-17781</i>	Santa Cruz Biotechnology	1:5000	Anticuerpo primario monoclonal de ratón (IgGκ) para la detección de la secuencia entre los aminoácidos 573-592 del extremo C de PKC ζ de origen de rata.
<i>m-IgGκ BP-HRP sc-516102</i>	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	Anticuerpo secundario anti-ratón, acoplado a peroxidasa de rábano picante.
<i>Goat Anti-Rabbit IgG H&L HRP ab205718</i>	ABCAM	1:6000	Anticuerpo secundario policlonal anti-conejo, acoplado a peroxidasa de rábano picante.

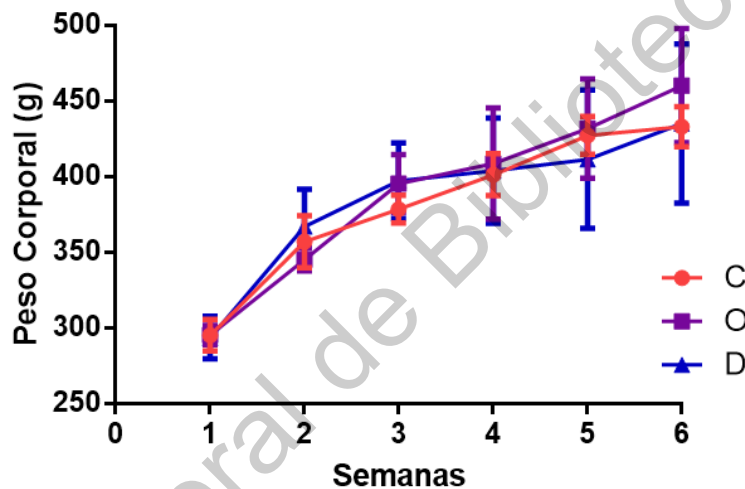
5.13 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron utilizando los softwares estadísticos: GraphPad Prism v6.0® y SPSS v23®. Las señales colorimétricas se cuantificaron directamente utilizando el software Image Lab Software 6.0.1®. Las diferencias en las variables continuas entre los grupos experimentales se evaluaron con ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc de Tukey. Los datos se proporcionaron como medias ± desviación estándar (DE) o error estándar (SEM) con un intervalo de confianza del 95%, considerando una significancia estadística del valor de $p \leq 0.05$. Se considera como variable independiente el grupo experimental (C, O, D).

VI. RESULTADOS

6.1 Peso Corporal.

En el inicio experimental el peso promedio de los animales fue de 294.833 ± 0.997 g. El peso corporal de las ratas se registró semanalmente (Gráfica 1) y no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D). La ganancia de peso entre el inicio y el final del experimento fue de 137.81 ± 12.77 g en C, 164.75 ± 36.98 g en O y de 141.53 ± 43.26 g en D.



Gráfica 1. Peso en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=8). Anova post hoc Tukey.

6.2 Parámetros bioquímicos.

6.2.1 Perfil Glucémico.

Los datos obtenidos de glucosa, insulina e índice HOMA-IR de las muestras de suero obtenidas del sacrificio se muestran en el cuadro 1. El nivel de glucosa aumentó significativamente 1.66 veces en O y 4.26 veces en D al comparar contra el grupo C. Esto sugiere desregulación en la homeostasis de la glucosa, provocando hiperglucemia por la intervención con la dieta obesogénica. Además, la insulina aumentó significativamente tanto en O (1.69 veces) como en D (1.75 veces) con respecto al grupo C. No se encontró diferencia significativa en la insulina entre O y

D, lo que sugiere que, en los animales con diabetes inducida, cambió la secreción de insulina por parte de las células β del páncreas. Ambos grupos con intervención presentaron hiperinsulinemia al comparar contra el C. Los niveles HOMA-IR mostraron una diferencia significativa entre los tres grupos (C, O y D), donde el aumento en los animales con O fue de 2.84 veces, mientras que en los animales D fue de 7.06 veces más, comparado con el grupo C (Cuadro 1). Tanto O como D presentaron RI, donde D tuvo 3 veces más que O, sugiriendo DM2 inducida.

Cuadro 1. Niveles de glucosa, insulina y HOMA-IR en animales control (C), con dieta obesogénica(O) y con Diabetes inducida (D).

	C	O	D
Glucosa (mg/dL)	112.37 \pm 11.7 a	178.75 \pm 8.79 b	467.5 \pm 41.01 c
Insulina (μ UI/mL)	6.73 \pm 1.68 a	10.47 \pm 1.41 b	10.70 \pm 0.80 b
HOMA-IR	1.90 \pm 0.53 a	4.63 \pm 0.74 b	12.27 \pm 2.09 c

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=6). Anova post Hoc Tukey, a, b, c $p \leq 0.05$.

6.2.2 Perfil Lipídico.

Los niveles de colesterol, triacilglicéridos (TAG), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) aumentaron significativamente en los grupos O y D, respectivamente, al comparar contra C (Cuadro 2), de tal manera que los niveles de colesterol en O y D aumentaron 1.64 y 2.34 veces; los TAG aumentaron en O y D 1.41 y 2.27 veces; las LDL en O y D aumentaron 2.24 y 2.47 veces, las VLDL en O y D aumentaron 1.57 y 2.85 veces. Sin embargo, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) no presentaron cambios significativos a pesar de que los O aumentaron 0.91 veces y los D disminuyeron 0.61 veces al comparar contra C. Estos resultados muestran un desequilibrio del metabolismo lipídico en O y D debido al incremento en concentración lipídica en plasma. Estos datos indican el desarrollo de dislipidemia caracterizado por el aumento de colesterol y TAG. El aumento en los niveles de LDL y VLDL indican una alteración en el equilibrio de la producción de lipoproteínas a nivel hepático. La

disminución en D sugiere un riesgo cardiovascular, frecuentemente asociado con DM2.

Cuadro 2. Cambios en el perfil lipídico en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).

	C	O	D
CT (mg/dL)	69.35 ± 1.26 a	118.03 ± 7.36 b	183.07 ± 22.73 c
TAG (mg/dL)	145.23 ± 4.41 a	240.55 ± 43.96 b	425.42 ± 72.89 c
HDL (mg/dL)	25.67 ± 1.28 a	27.15 ± 3.73 b	17.37 ± 2.98 b
LDL (mg/dL)	15.53 ± 0.58 a	42.38 ± 9.66 b	50.72 ± 13.39 b
VLDL (mg/dL)	28.05 ± 1.91 a	48.1 ± 8.76 b	83.67 ± 11.11 c

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=6). Anova post Hoc Tukey, ^{a, b, c} p≤0.05. CT: Colesterol Total, TAG: Triacilglicéridos, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

6.2.3 Perfil Hepático.

La funcionalidad hepática en plasma determinada por la actividad de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) es mostrada en el cuadro 3 y nos indican que los niveles de AST de O aumentaron 0.96 veces respecto a C, sin diferencia significativa. Sin embargo, la AST de D aumentó 1.27 veces de manera significativa con respecto a C. Mientras que los niveles de ALT en O y D aumentaron 1.39 y 1.48 veces, respectivamente, mostrando diferencia significativa al comparar contra C, sin embargo, entre los O y D no existió una diferencia significativa.

Cuadro 3. Niveles de transaminasas hepáticas en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D).

	C	O	D
AST (mg/dL)	108.33 ± 14.31 a	117.83 ± 15 a	145.33 ± 7.86 b
ALT (mg/dL)	56.83 ± 8.7 a	78.00 ± 9.33 b	87.50 ± 13.11 b

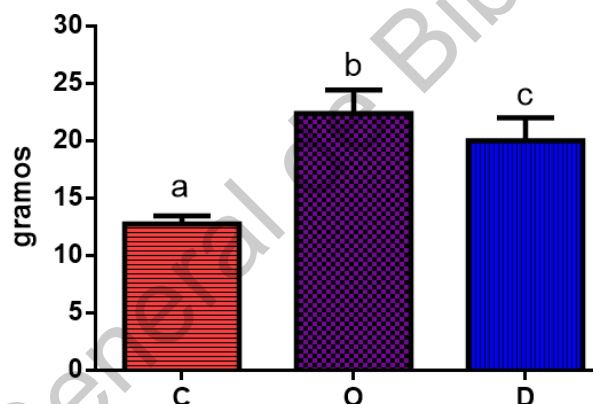
Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=6). Anova post Hoc Tukey, ^{a, b, c} p≤0.05. AST: Amino transaminasa. ALT: Alanina Transaminasa.

6.3 Análisis Morfológicos e Histológicos.

6.3.1 Hígado.

El estudio morfométrico mostró que el hígado del grupo C presentó características propias de ratas control como es: una coloración marrón uniforme, superficie lisa y consistencia firme. Los animales O y D presentaron una coloración marrón uniforme, una superficie lisa, presencia de TA subyacente y una consistencia menos firme y friable además de ligeramente grasosa respecto a los animales control.

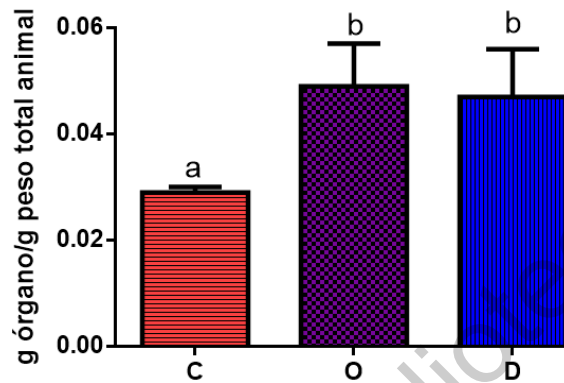
El peso promedio de los hígados (Gráfica 2) de los animales C, O y D fue de 12.75 ± 0.71 g, 22.38 ± 2.07 g y 20 ± 2 g respectivamente, lo cual muestra un incremento estadísticamente significativo en el peso del hígado de los animales O y D respecto a C, posiblemente derivado de las intervenciones.



Gráfica 2. Peso de hígados en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida(D) posterior a sacrificio.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=8). Anova de una vía, post hoc Tukey, a, b, c $p \leq 0.05$.

La relación entre el peso del órgano y el peso corporal final (Gráfica 3) aumentó de manera significativa en O y D en comparación con los animales C ($0.049 \text{ g} \pm 0.008 \text{ g}$, $0.047 \text{ g} \pm 0.009 \text{ g}$, $0.029 \text{ g} \pm 0.001 \text{ g}$ respectivamente) indicando un aumento en el tamaño del órgano.



Gráfica 3. Peso de hígados normalizados con peso final de animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=8). Anova de una vía, post hoc Tukey, a, b, c $p \leq 0.05$.

Las principales lesiones observadas en los tejidos hepáticos se presentan en el cuadro 4 y en la figura 19. Los animales control presentaron una apariencia histológica normal: vena centrolobulillar (cabeza de flecha), trabéculas de hepatocitos (flechas), espacios sinusoidales (flechas). No se encontraron diferencias significativas entre los animales con dieta obesogénica y con diabetes en cuanto a la presencia de inflamación y fibrosis caracterizada por inflamación intralobular, globo hepatocelular y formación de tejido fibroso. En los animales con dieta obesogénica se presentó esteatosis macrovesicular moderada (Figura 10B), caracterizada por gotas lipídicas dentro del hepatocito que desplazaron al núcleo a la periferia (flechas) en un 75%, mientras que el grupo D mostró esteatosis macrovesicular leve y formación de fibras de colágeno alrededor de la vena centrolobulillar (flechas negras; figura 19C) en un 87.5%. En ningún caso se constató la presencia de necrosis.

Cuadro 4. Estudio histopatológico del tejido hepático. Principales lesiones observadas en los animales con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D).

	ESTEATOSIS		HEPATITIS		FIBROSIS	
	Ausente- Leve	Moderado- Severo	Ausente- Leve	Moderado- Severo	Ausente- Leve	Moderado- Severo
Con dieta obesogénica	2/25%	6/75%	7/87.5%	1/12.5%	7/87.5%	1/12.5%
Con diabetes	7/87.5%	1/12.5%	4/50%	4/50%	5/62.5%	3/37.5%
	p= 0.012		p=0.106		p=0.248	

Los datos se representan en valores absolutos y porcentajes. Prueba de ji al cuadrado (n=8). $p \leq 0.05$

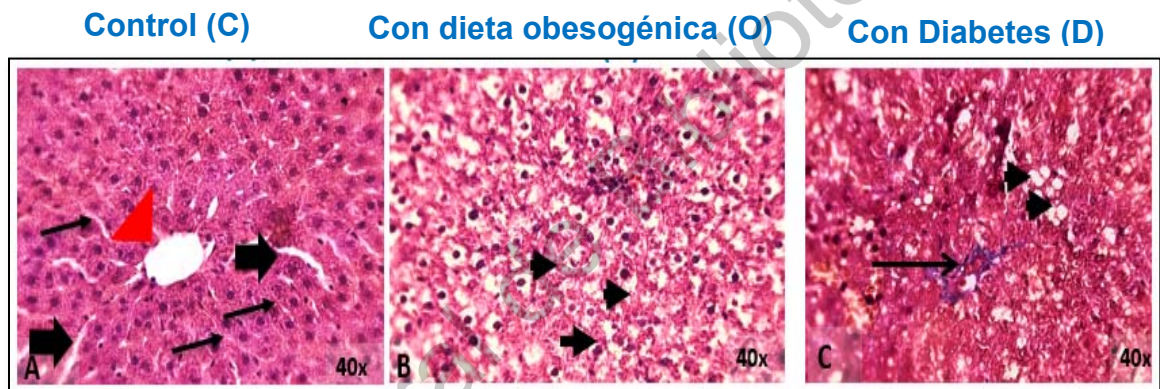
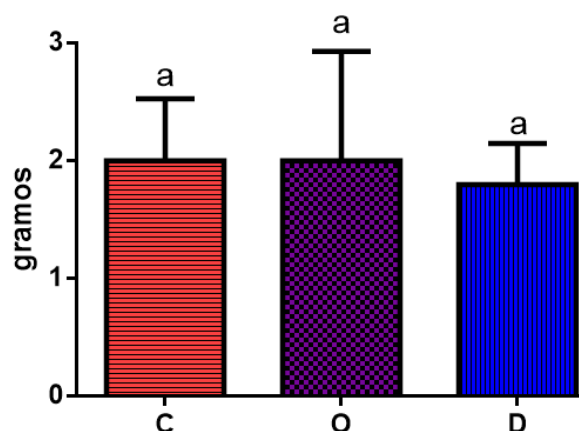


Figura 19. Microfotografías de tejido hepático.

A y B con H&E y C con TM. 40x. A) Grupo C con apariencia normal histológica. B) Grupo con dieta obesogénica con esteatosis moderada. C) Grupo con diabetes con esteatosis macrovesicular leve y fibrosis leve.

6.3.2 Páncreas.

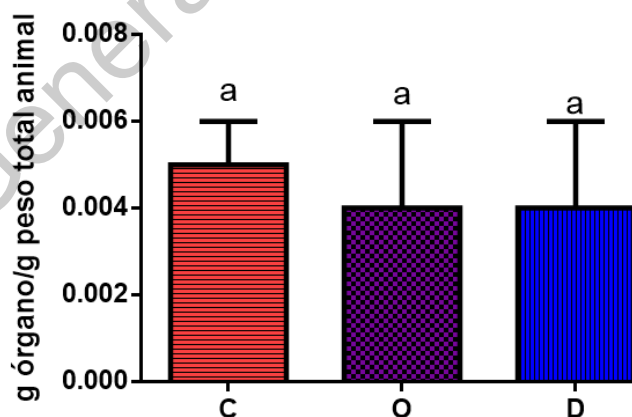
El estudio morfométrico de los páncreas en los animales control, con dieta obesogénica y con diabetes presentaron una forma irregular no definida, una superficie corrugada, consistencia firme, pero friable y un color de blanco a ligeramente rosado, sin mostrar diferencias físicas significativas. El peso promedio de los páncreas de C, O y D (Gráfica 4) fue de 2 ± 0.53 g, 2 ± 0.93 g y 1.8 ± 0.71 g respectivamente, sugiriendo que las intervenciones no generaron cambios macroscópicos significativos.



Gráfica 4. Peso de páncreas en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida(D) posterior a sacrificio.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=8). Anova de una vía, post hoc Tukey, a, b, c $p \leq 0.05$.

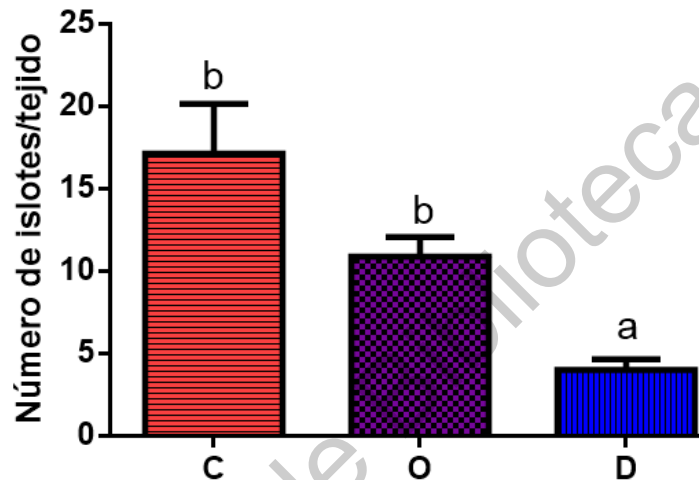
La relación entre el peso del órgano y el peso corporal final (Gráfica 5) no se modificó significativamente con dieta obesogénica y con diabetes con respecto a los animales control (0.004 g \pm 0.002 g, 0.004 g \pm 0.002 g y 0.005 g \pm 0.001 g respectivamente), sugiriendo que en términos generales el páncreas mantuvo su peso durante la intervención con dieta obesogénica y con la inducción de diabetes.



Gráfica 5. Peso de páncreas normalizados con peso final en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D) posterior a eutanasia.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar (n=8). Anova de una vía, post hoc Tukey, a, b, c $p \leq 0.05$.

Se cuantificó el número de islotes β pancreáticos presentes en los tejidos examinados (Gráfica 6), lo cual mostró una disminución significativa en el número de islotes de los animales O y D comparados con el grupo de C (10.88 ± 1.20 , 4.00 ± 0.65 y 17.13 ± 3.02 , respectivamente); mientras que entre los animales O y C (10.88 ± 1.20 , 17.13 ± 3.02 , respectivamente) la disminución no fue significativa.

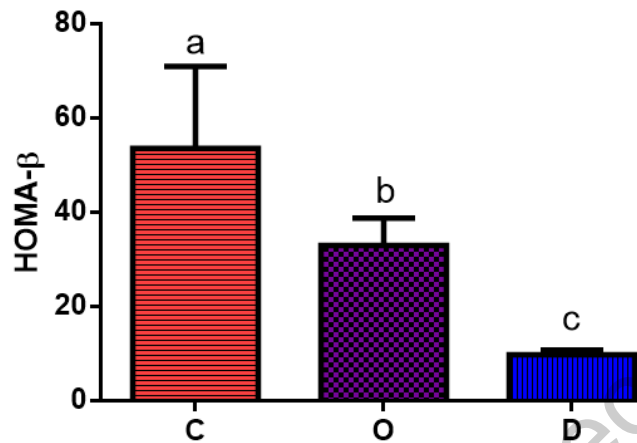


Gráfica 6. Cuantificación de los islotes de Langerhans en los animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida(D).

Los datos se expresan como media \pm error estándar (n=8). Anova de una vía, post hoc Tukey, a, b, c $p \leq 0.05$.

Se determinó la funcionalidad de las células β pancreáticas a través del modelo de determinación de homeostasis (HOMA- β) utilizando las concentraciones basales de glucosa e insulina y refleja la secreción de insulina de las células β pancreáticas en condiciones no estimuladas.

El índice HOMA- β (Gráfica 7) disminuyó significativamente en los animales O y D respecto a C (32.99 ± 5.80 , 9.76 ± 1.02 y 53.38 ± 17.39 , respectivamente), lo que indica que la única administración de STZ disminuyó la funcionalidad de las células β pancreáticas, sin suprimir completamente la secreción de insulina y sin cambios significativos en la relación del peso del órgano/peso del animal.



Gráfica 7. Funcionalidad de las células β pancreáticas a través de HOMA-β en los animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D).

Los datos se expresan como media ± desviación estándar (n=8). Anova de una vía, post hoc Tukey, a, b, c $p \leq 0.05$

Los páncreas (Figura 20) de los animales control mostraron una apariencia normal histológica (Flecha: islotes de Langerhans, flechas: acinos serosos, los animales con diabetes tuvieron presencia de gotas lipídicas dentro del parénquima exocrino y los animales con diabetes mostraron una infiltración de lípidos en la región exocrina y leve atrofia de islotes de Langerhans (Flechas blancas).

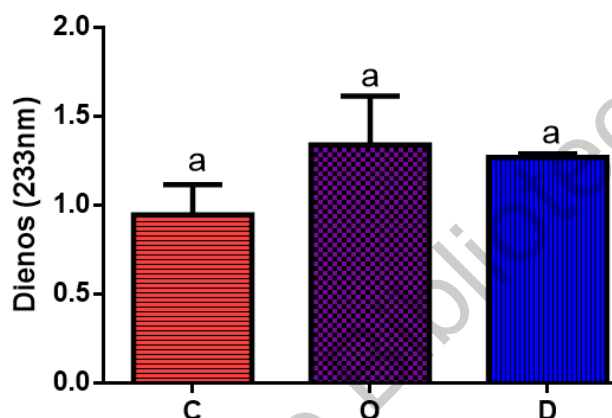


Figura 20. Microfotografías de tejido pancreático.

A) Grupo control con apariencia normal histológica, B) Grupo con dieta obesogénica, presencia por gotas lipídicas, C) Grupo con diabetes mostró cambios en la histología de los islotes de Langerhans. H&E. 40x

6.4 Reacciones de daño oxidativo en hígado.

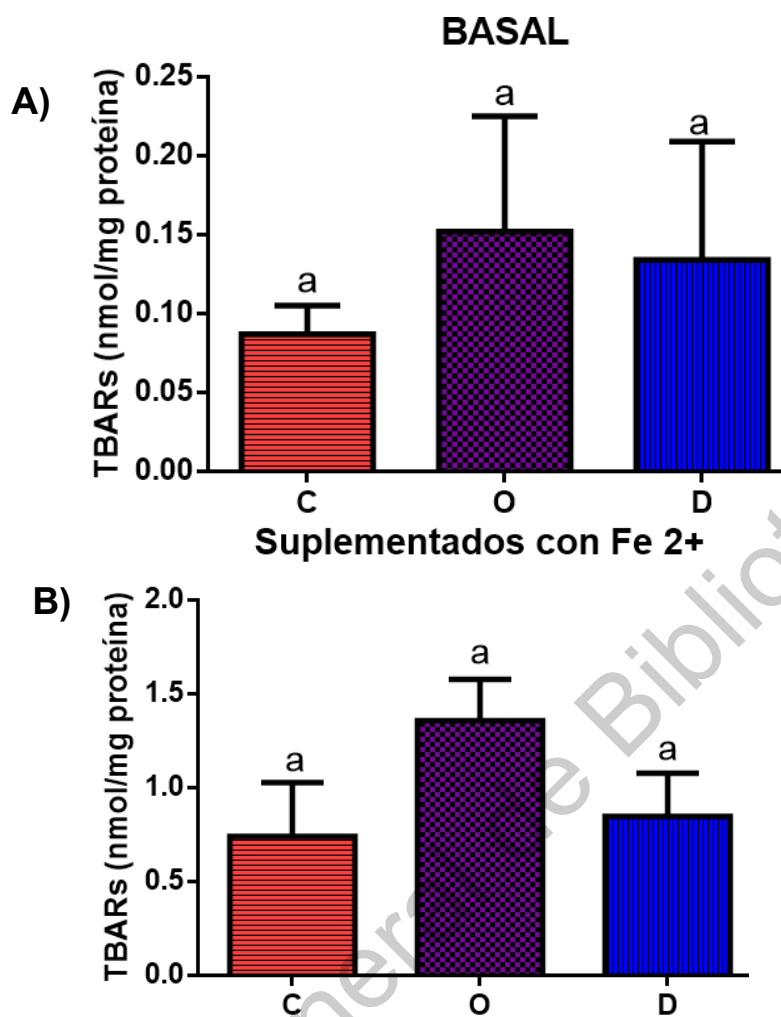
En la formación de DC, evento primario en el proceso de lipoperoxidación no se presentó un aumento significativo (Gráfica 8). Los animales con dieta obesogénica y con diabetes aumentaron con respecto a los animales control (1.339 ± 0.027 , 1.270 ± 0.020 vs 0.946 ± 0.17 , respectivamente).



Gráfica 8. Efecto del estrés en el daño oxidativo del hígado en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D) a través de la formación de DC.

Los datos se expresan como media \pm error estándar (n=8). Anova post Hoc Tukey, a, b, c se consideran diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los niveles TBARs basales y complementados con Fe^{2+} en los homogenados de hígado se muestran en la gráfica 9A y 9B. Podemos observar que hubo un incremento en los niveles de TBARs en O y D al comparar con C (0.152 ± 0.073 , 0.134 ± 0.075 vs 0.087 ± 0.018 nmol/mg proteína, respectivamente). Este incremento también se presentó cuando el ensayo se suplementó con FeSO_4 $50 \mu\text{M}$ (1.358 ± 0.22 , 0.848 ± 0.230 , 0.741 ± 0.287 nmol/mg proteína respectivamente), en ambos casos este aumento no es significativo, solo hay una tendencia a aumentar en O y D en el estado basal y aumentar en O en la suplementación con Fe.

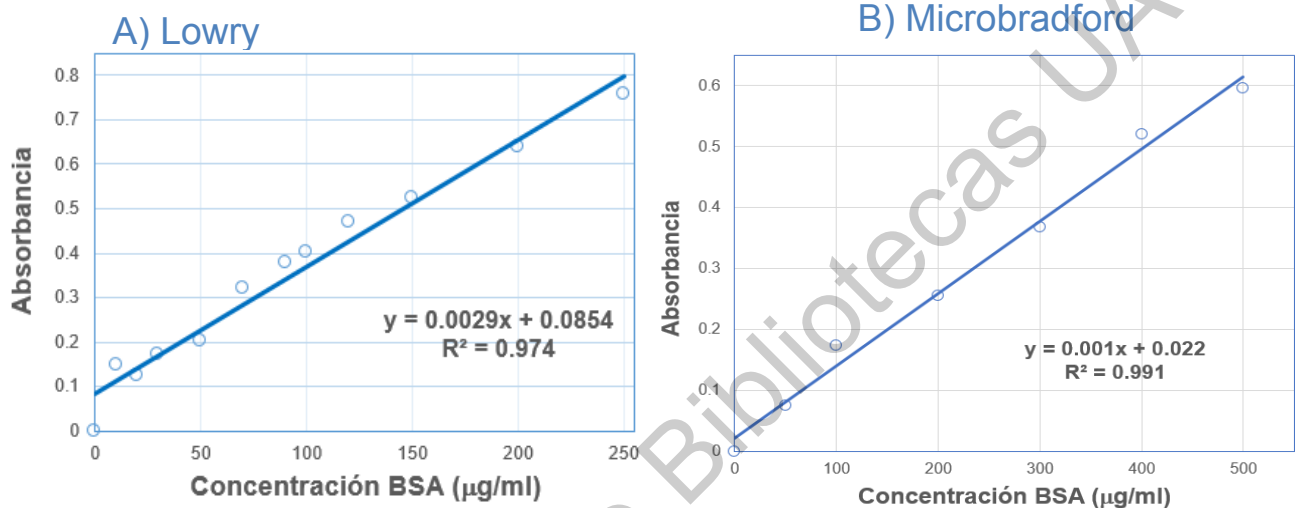


Gráfica 9. Efecto del estrés en el daño oxidativo del hígado en animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes inducida (D) por TBARS. A) TBARs basales B) TBARs suplementados con FeSO₄ 50 µM. Los resultados se expresan como media ± error estándar (n=8). Anova post Hoc Tukey, a, b, c se consideran diferencias significativas (p<0.05). TBARs: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

6.5 Cuantificación de proteína total.

Para la cuantificación de la proteína expresada en concentración (µg/ml) se usó una curva de calibración basada en graficar medias ± desviación estándar de las diferentes concentraciones de BSA, utilizando como variables de validación un coeficiente de determinación en la regresión lineal ($r^2 > 0.95$) y un coeficiente de

variación intraensayo (CV<10%) lo cual asegura la precisión, exactitud y repetibilidad. En la figura 10A podemos la curva de calibración usada para la cuantificación de proteína por el método Lowry en donde se puede observar una r^2 de 0.974, mientras que en la figura 10B representa la curva de calibración por el



Gráfica 10. Cuadro de calibración de albumina sérica bovina (BSA).

A) Método Lowry (n=11, duplicado). B) Método Microbradford (n=6, duplicado) método Microbradford.

La concentración de proteínas (Cuadro 5) tanto por método Lowry como por Microbradford no mostró diferencias significativas entre los animales control, con dieta obesogénica y con diabetes.

Cuadro 5. Concentración de proteínas en los animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D).

	C	O	D
Lowry Proteína (µg/ul)	24.985 ± 4.449 a	23.250 ± 1.989 a	32.132 ± 3.458 a
Microbradford Proteína (µg/ul)	25.607 ± 3.773 a	23.986 ± 3.055 a	30.460 ± 5.46 a

Los datos se expresan como media ± error estándar (n=8). Anova post Hoc Tukey, a, b, c se consideran diferencias significativas (p<0.05).

6.6 Estandarización de las técnicas de electroforesis y western blot.

Para la estandarización de la técnica de electroforesis, se realizó un corrimiento por quintuplicado de una curva de cuatro puntos de BSA (20, 10, 5, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), con un peso aproximado de 66.6 kDa. Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ fue el marcador de pesos moleculares empleado (Figura 21).

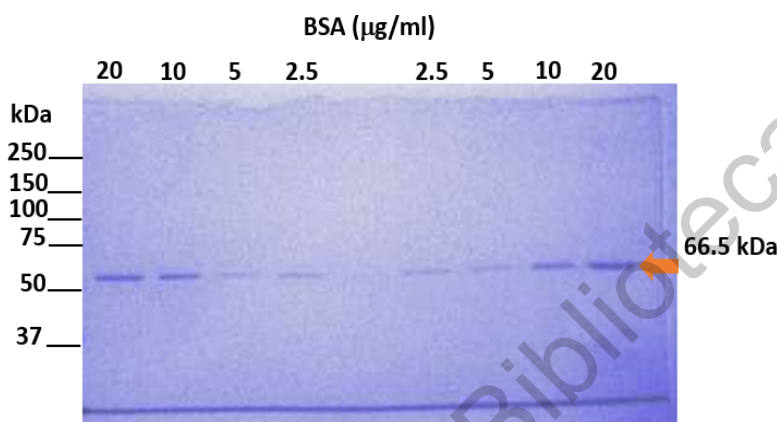


Figura 21. Fotografía de gel, SDS PAGE con BSA.

Condiciones no reductoras (n=4 triplicado). En los carriles se observa la banda correspondiente al peso aproximada de BSA (20, 10, 5, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Para comprobar el correcto corrimiento de proteínas en la electroforesis, las muestras cargadas en un gel se replicaron en otro. Un gel se tiñó con azul de Coomasie y el otro fue utilizado para la transferencia de proteínas, ambos se destiñeron para visualizar el corrimiento proteico (Figura 22).

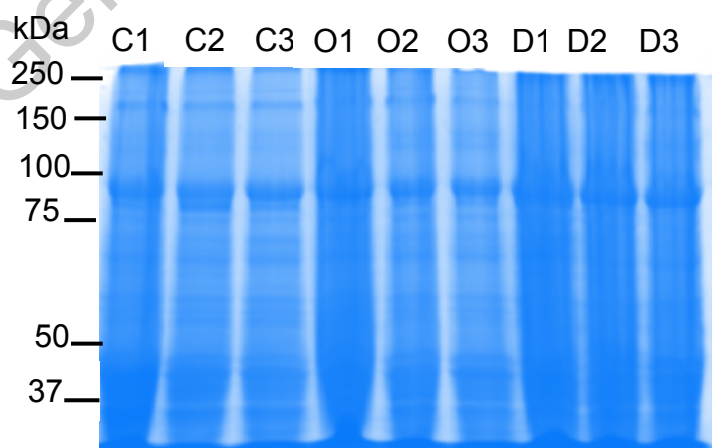


Figura 22. Corrimiento electroforético representativo en geles de los homogenados de hígados en animales control (C), con dieta obesogénica(O) y con diabetes (D). SDS-PAGE al 10%, 200 μg proteína total por carril, n=3. Marcador de pesos moleculares (Page Ruler Prestained Protein Ladder™)

De la misma manera, con el fin de verificar el proceso de transferencia del gel a la membrana de nitrocelulosa, se identificaron los marcadores del peso en la membrana y el gel extraído del sistema “sándwich” de transferencia húmeda se tiñó con azul de Coomasie. De tal manera que cuando la transferencia hubiera procedió con éxito se observan bandas disminuidas en el gel (Figura 23a) y la impregnación de los colores del marcador de peso molecular en la membrana (Figura 23b).

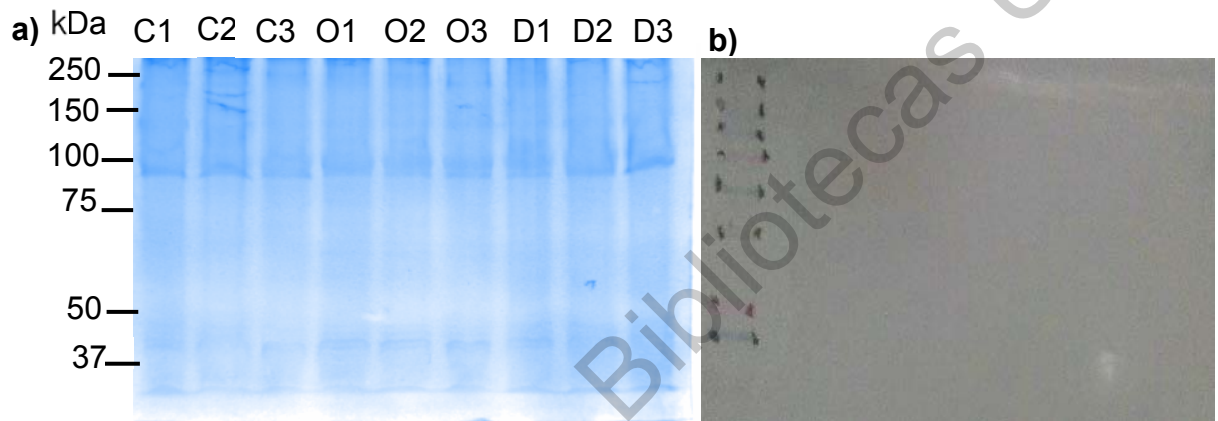


Figura 23. Proceso de Inmunotransferencia

A) Geles SDS-PAGE al 10% posterior a la transferencia. b) Membrana de nitrocelulosa con los marcadores de peso molecular marcados. 200 μ g de proteína total por carril, n=3. + Marcador de pesos moleculares (Page Ruler Prestained Protein Ladder™). ++. Homogenado de cada grupo de animales.

6.7 Inmunnodetección de las isoformas ζ y ϵ de PKC en homogenados de hígado.

En el hígado, la presencia de la isoforma PKC ζ , en un peso molecular promedio de 53.04 KDa (Figura 24A) se redujo tanto en O (357.63 ± 52.26 pixeles) como en D (389.60 ± 54.14 pixeles) en comparación con C (416.11 ± 41.61 pixeles), aunque esta disminución no fue estadísticamente significativa. De la misma manera, la proteína de PKC ζ en un peso molecular promedio de 45.32 KDa (Figura 24B) disminuyó, sin cambio significativo en O y D con respecto a C (549.00 ± 58.89 , 457.167 ± 41.46 , 474.73 ± 59.96 , respectivamente).

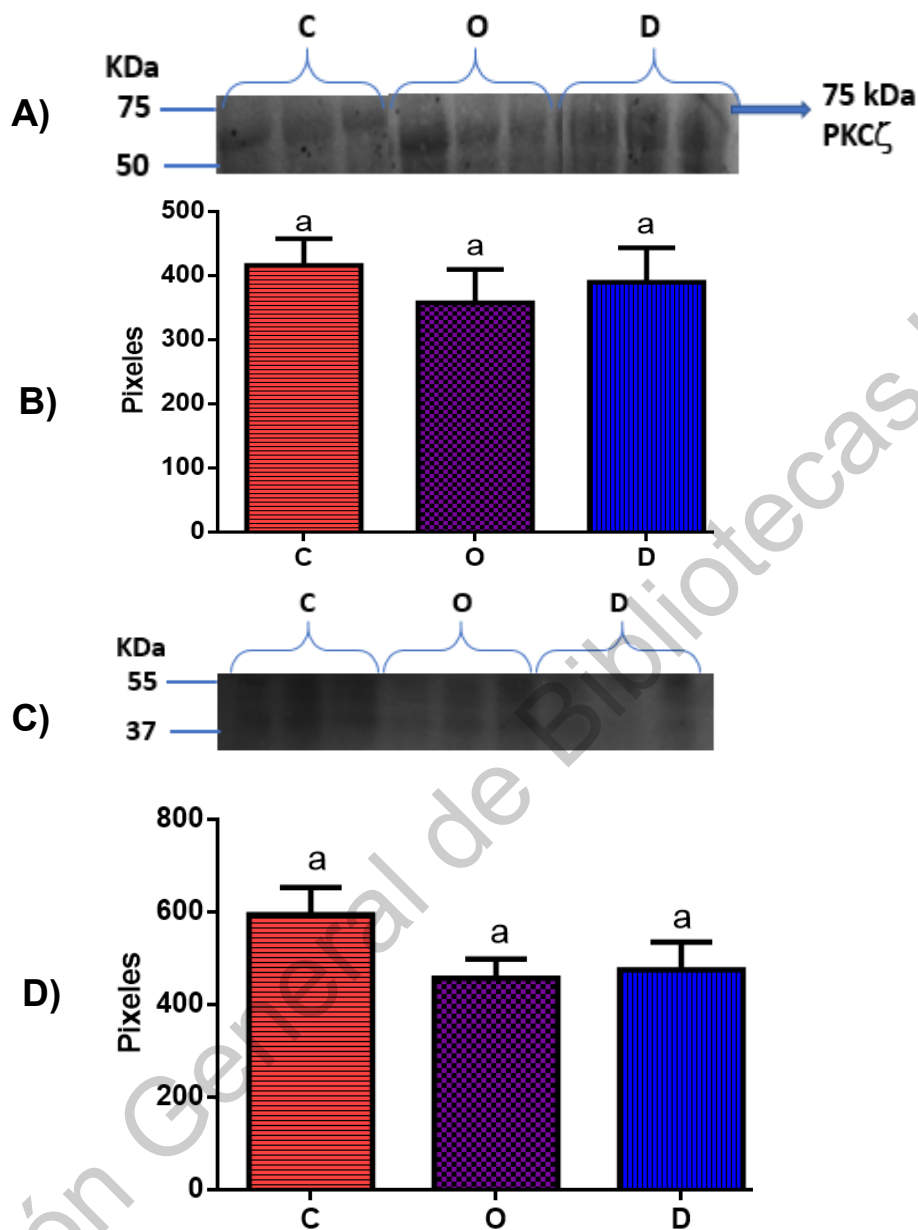


Figura 24. Expresiones de proteínas de isoformas de PKC ζ en hígado. Inmunotransferencia representativa y análisis densitométrico de PKC ζ animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D). A) Luminograma de banda 53.04 kDa, B) Expresión de proteína en peso molecular promedio de 53.04 kDa, C) Luminograma de banda de 45.32 kDa D) Expresión de proteína en peso molecular promedio de 45.32 kDa Los valores se expresan como media \pm error estándar (n=6, duplicado). Anova post Hoc Tukey, a, b, c se consideran diferencias significativas (p<0.05).

En cambio, la expresión proteica de la isoforma PKC ϵ (Figura 25) aumento 1.80 veces en O (348.21 ± 56.07 pixeles) y 1.86 veces en D (358.67 ± 52.48 pixeles) en comparación con C (192.73 ± 28.67 pixeles), siendo significativo el aumento de la expresión de los animales O y D respecto a C, pero no significativo entre O y D.

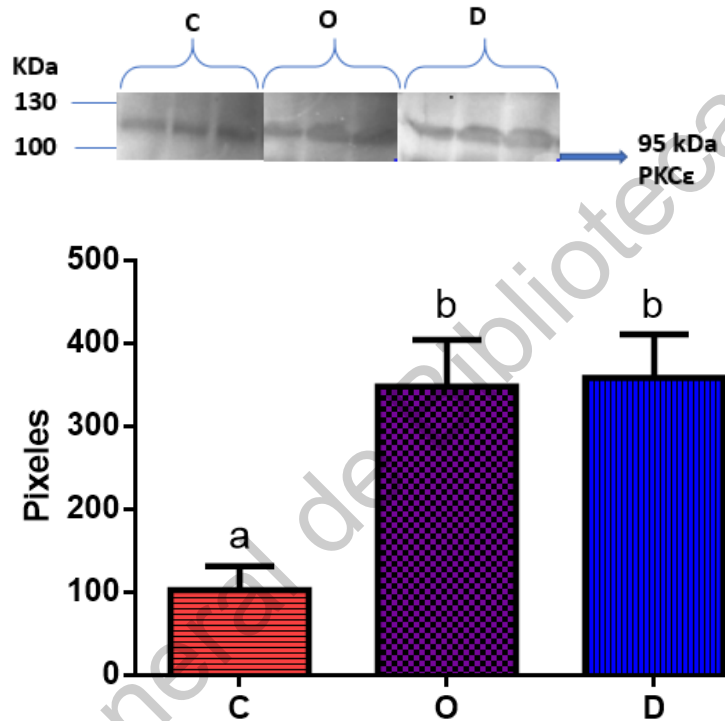


Figura 25. Expresiones de proteínas de isoformas de PKC ϵ en hígado. Inmunotransferencia representativa y análisis densitométricos de PKC ϵ animales control (C), con dieta obesogénica (O) y con diabetes (D). Los valores se expresan como media \pm error estándar (n=6, duplicado). Anova post Hoc Tukey, a, b, c se consideran diferencias significativas (p<0.05).

VII. DISCUSIÓN

Durante la experimentación no se observaron cambios en cuanto al peso corporal entre los animales control (C), con dieta obesogénica (DO) y con diabetes (D), lo cual puede explicarse debido tiempo de intervención (6 semanas) en comparación con otros estudios *in vivo*, de mayor tiempo de intervención (mayores a 8 semanas) y con incremento en el aporte de grasa en la dieta (más del 60%) (Ayala I. *et al.*, 2008; Holmes A. *et al.*, 2015; Mediani A. *et al.*, 2016). En otros estudios con mayores porcentajes de grasas (60-45%) o azúcares (25-55%) o con mayores tiempos de intervención (8-9 semanas) se obtuvo un aumento de peso significativo (Lozano I. *et al.*, 2016; Woodie L., y Blythe S., 2018), lo cual sugiere que para generar un cambio corporal significativo es necesario un mayor tiempo de intervención. En un estudio reciente (Fouret *et al.*, 2018), se informó que una dieta rica en grasa y fructosa que imita la dieta occidental, ha sido eficiente en la inducción de sobrepeso moderado, aumento del peso del hígado y TA y hiperglucemia a partir del 8 / 12^a semana de dieta. Los resultados del presente estudio con un menor tiempo de intervención de semanas presentó la acumulación hepática de metabolitos lipotóxicos, así como la inflamación y el estrés oxidativo (Hugués Hernandorena B. *et al.*, 2002; Nelson, R. A, y Bremer A. A, 2010).

Los niveles de insulina en animales con dieta fructuosa/grasa y con STZ fueron mayores en los animales con dieta obesogénica y animales con diabetes, indicando una hiperinsulinemia causada de la acumulación de insulina en plasma derivada de una RI multipresencial en tejidos periféricos (Dandona, P. *et al.*, 2005; Serrano Ríos M. *et al.*, 2016). En otros estudios donde se ha administrado dieta alta en grasas o azúcares estos cambios en aumento en niveles de glucosa e insulina han sido similares en tanto en estudios con administración de STZ con dosis similares también se han dado los cambios característicos en RI y DM2 (Goyal S.N. *et al.*, 2016; Alwahsh S.M., *et al.*, 2017). La RI es un factor predictivo para el desarrollo de DM2 incluso en individuos con tolerancia normal a la glucosa (Archundia Herrera M. C *et al.*, 2017). Por lo tanto, es importante reconocer la RI en

la etapa previa a la enfermedad cuando es probable que la intervención terapéutica tenga más éxito que en la enfermedad manifiesta (Itani S.I. *et al*, 2002).

Ambos grupos intervenidos presentaron CT, TAG y lipoproteínas de baja densidad altas (LDL y VLDL), así como HDL, los cuales son características de dislipidemia (Martínez Triguero M. L. *et al.*, 2012). Además, VLDL y LDL al estar alteradas, nos indica de un desorden en equilibrio del metabolismo lipídico hepático y las HDL al estar disminuida en el grupo D podría hacernos sospechar un daño a al sistema vascular y analizar parámetros de aterosclerosis (Errico, T. L. *et al*, 2013; Hoeke G. *et al.*, 2016; Reyes-Soffer G. *et al.*, 2017).

Las transaminasas AST, ALT y GGT se han utilizan como una vista preliminar de manera clínica para la detección de un patrón de citólisis caracterizado por un aumento de estas transaminasas en sangre (García Martín y Zurita Molina, 2010). Dado que en el hígado ocurren múltiples reacciones de transaminación y que la función principal de las transaminasas son transferir grupos aminos, su análisis es un indicador preliminar de daño hepático(García Martín y Zurita Molina, 2010). La ALT es más específica de daño hepático que la AST, debido a que la primera se localiza principalmente en el citosol del hepatocito, mientras que la AST, además del citosol y mitocondria, se encuentra en otros órganos como el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos (Busto Bea y Herrero Quirós, 2015). La elevación sérica de transaminasas se correlaciona con el vertido a la sangre de estas enzimas de los hepatocitos afectados, aunque puede no relacionarse con la gravedad de la lesión (García Martín y Zurita Molina, 2010). De tal manera, el aumento de la ALT y AST se ha considerado un punto de revisión para diagnosticar enfermedad hepática. Un aumento en ALT procederá por lo general del hígado, indicando destrucción de las células hepáticas; lo que es característico de procesos como la hepatitis vírica aguda, la hepatitis isquémica aguda o la hepatitis tóxica (García Martín y Zurita Molina, 2010; Busto Bea y Herrero Quirós, 2015). Los aumentos moderados de transaminasas pueden obedecer tanto a enfermedades hepáticas (hepatitis alcohólica aguda, en la que característicamente la AST suele elevarse más que la ALT, hepatitis vírica crónica,

esteatosis hepática, etc.) como extrahepáticas (hipertiroidismo, enfermedad celiaca, insuficiencia suprarrenal, etc.). Estas alteraciones séricas en las transaminasas se correlacionan con el vertido a la sangre de estas enzimas de los hepatocitos afectados, sospechando daños citosólicos de los hepatocito (García Martín y Zurita Molina, 2010).

En el estudio histológico del hígado de los animales sin tratamiento (C) se observó, que las estructuras lobulillares, trabeculares y portales no presentaron alteraciones aparentes. En contraste, los hígados provenientes de los animales con dieta obesogénica (O) mostraron esteatosis moderada, hepatitis y fibrosis leve caracterizada por presencia de gotas lipídicas en hepatocitos y con sinusoides hepáticos colapsados en las zonas periportal, intermedia y perivenosa, lo cual se observa como áreas muy densas uniformemente en el campo y los animales administrados con estreptozotocina (D) mostraron esteatosis leve, hepatitis moderada y una fibrosis de leve a moderada. Específicamente, la STZ induce hiperglucemia y RI, lo que eventualmente conduce a un aumento de la deposición de grasa en el tejido hepático (Browm y Kleiner, 2016. Además de la acción de la STZ, la suplementación con fructosa puede promover el estrés oxidativo a través del aumento de la translocación intestinal de la endotoxina bacteriana, lo que conduce a la secreción de endotoxina en la sangre portal y, posteriormente, causa la activación de las células de Kupffer en el hígado (Machado M. V. *et al*, 2015).

El ensayo denominado “TBARs” (en inglés, sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico) se ha considerado como marcador analítico del estrés oxidativo, que se traduce en una intensa peroxidación lipídica de membranas biológicas. Muchos estudios con modelos animales y en humanos han mostrado incrementos en la peroxidación lipídica de las membranas del hígado y el riñón en el estado diabético, frente a individuos normoglicémicos (Vázquez-Martínez, O., *et al.*, 2019). Algunos informes han indicado resultados opuestos, lo que indica que la relación entre la ingesta de alimentos y la formación de ROS es compleja y hasta ahora no está resuelta. La mayoría de los tejidos presentan metabolismo oxidativo y el hígado no es una excepción. El oxígeno es necesario para el metabolismo energético

adecuado y para corregir la función mitocondrial, pero al mismo tiempo, promueve la formación de ROS y, en consecuencia, la oxidación de las biomoléculas. La peroxidación lipídica se considera un ensayo adecuado para estimar reacciones prooxidantes; mediante esta técnica, es posible inferir la tasa de actividad peroxidativa en condiciones "in vivo" (medir DC), y también es posible deducir el equilibrio entre las reacciones pro oxidantes y las defensas antioxidantes mediante la determinación de TBARS (Hermes-Lima, 2004). Cuando el ensayo TBARS se realiza con la suplementación con Fe^{+2} , ofrece otro conjunto de información: Debido a que mejora la descomposición de los hidroperóxidos, la peroxidación lipídica inducida por Fe^{+2} es máxima y da una idea de los mecanismos antioxidantes totales en el sistema, así como la aparición de ácidos grasos insaturados presentes en la membrana estudiada (Fenton H.J.H., 1984). Cuando el ensayo TBARS se realiza en presencia de Fe^{2+} , los hidroperóxidos sufren un proceso de descomposición equivalente a la reacción de Fenton (Nagasawa T., *et al.*, 2001). Como resultado, la peroxidación lipídica se maximiza de manera que la progresión completa de las reacciones prooxidantes depende de la capacidad antioxidante total y la disponibilidad de ácidos grasos insaturados en el sistema (Hermes-Lima, 2004). Cuando el ensayo TBARS se realiza con la suplementación con Fe^{2+} , ofrece otro conjunto de información: Debido a que mejora la descomposición de los hidroperóxidos, la peroxidación lipídica inducida por Fe^{2+} es máxima y da una idea de los mecanismos antioxidantes totales en el sistema, así como la aparición de ácidos grasos insaturados presentes en la membrana estudiada (Fenton H.J.H., 1984).

Varias investigaciones hacían sospechar que los roles de PKC como mediadores o inhibidores de la acción de la insulina son contradictorios, sin embargo, ahora todo apunta a que las diferentes isoformas de PKC cumplen funciones diferentes de acuerdo a su forma estructural, su distribución subcelular y tisular, modo de activación y presencia en diversos tejidos (Considine R.V. y Caro J.F. 1993; Kawano Y. y Cohen D.E., 2013). Se ha demostrado que en metabolismos con hiperglucemia crónica existe una activación de la vía DAG-PKC en tejidos

metabólicos, renales y cardiovasculares (Xia P. *et al.*, 1994). Así es como se ha propuesto que PKC θ y PKC ϵ , activadas por DAG, regulan de manera negativa la señalización de insulina y posteriormente causan la RI en músculo e hígado. Por otro lado, isoformas de PKC atípicas como PKC ζ y PKC λ se han estudiado en músculo esquelético y tejido adiposo y se han identificado como segundos mensajeros que apoyan el transporte de la glucosa, en un mecanismo estimulado por la insulina (Idris I. *et al.*, 2001).

En un estudio llevado a cabo en sujetos con diabetes (SD) y obesos sin diabetes (OSSD) se realizaron biopsias hepáticas dando como resultado la detección de isoformas PKC α , β , ϵ y ζ , y estas a su vez, a excepción de PKC β , incrementaron de forma significativa en los sujetos SD en comparación con los sujetos OSSD (Considine R.V. *et al.*, 1995). Posteriormente, se realizó el mismo método en ratas adiposas diabéticas Zucker obteniendo el mismo resultado, por lo cual se concluyó que PKC hepática aumenta en condiciones de diabetes (Considine R.V. *et al.*, 1995). En otro estudio en ratas Goto-Kakizaki (GK) y ratas Wistar control se investigaron los niveles de expresión proteica de isoformas de PKC en islotes pancreáticos y el hígado para evaluar los diferentes niveles de regulación funcional y se encontró que la expresión de PKC ζ hepática disminuyó en ratas GK en comparación con ratas Wistar (Seed Ahmed M. *et al.*, 2015). La activación de PKC ζ podría ser importante para mejorar la sensibilidad a la insulina, esto se planteó en un estudio transversal realizado en sujetos obesos no diabéticos y en sujetos obesos con DM2. Al evaluar la actividad de PKC λ / ζ en lisados musculares, encontraron que la cantidad de proteína PKC λ / ζ disminuyó 46% en el músculo de sujetos diabéticos en comparación con sujetos obesos no diabéticos y sujetos magros, lo que indica una acción alterada de la insulina con respecto PKC λ / ζ (Kim Y.B. *et al.*, 2003). Lo anterior concuerda con los resultados de este estudio, en donde los niveles de expresión proteica de PKC ζ hepática disminuyeron, de forma estadística significativa, en las ratas Wistar con dieta obesogénica (DO) y ratas

alimentadas con DO e inducidas a diabetes usando STZ, en comparación con ratas Wistar no tratadas o control.

La RI hepática frecuentemente se asocia con un aumento en DAG, que a la par conduce a la activación de PKC ϵ (Perry R.J *et al.*, 2014). Y así lo han revelado diversos estudios, como ejemplo Varman T. y colaboradores en 2007 (Varman T S. *et al.*, 2007) buscaron conocer si PKC ϵ tenía un papel causal en la patogénesis de RI hepática, para lo cual utilizaron ratas con un oligonucleótido antisentido contra PKC ϵ y las sometieron a 3 días de alimentación rica en grasas, de este modo sugirieron que al disminuir los niveles de expresión de PKC ϵ , los hepatocitos de las ratas revertían los defectos inducidos por la grasa en la señalización de insulina, así concluyeron que al aumentar PKC ϵ se deteriora la actividad de la cinasa del receptor de insulina. Otro estudio transversal realizado en individuos obesos y no diabéticos evaluó los mecanismos celulares que correlacionaban a la NASH con la RI usando biopsias hepáticas, de tal modo que sus resultados señalaron que el aumento en DAG hepático desencadena la activación y aumento de PKC ϵ en individuos obesos en comparación con individuos obesos no diabéticos (Kumashiro N. *et al.*, 2011). Por otro lado, en ratas Zucker (ZDF/GmiTm) que acumulan grasa y desarrollan DM2 y rata Zucker solo obesa (Zucker (fa/fa) examinaron los niveles de PKC en diabetes mediante el uso de biopsias hepáticas y encontraron un aumento en membrana de los niveles de PKC α , PKC β y PKC ϵ tanto de ratas ZDF/GmiTm y Zucker (fa/fa) en comparación con los animales control (Petersen M.C. *et al.*, 2018). Los anteriores estudios se asemejan a los resultados de este estudio, en donde los niveles de PKC ϵ aumentaron tanto en los animales con DO como en animales con la diabetes inducida en contraste con los animales control. Estos datos respaldan la suposición de que PKC ϵ es causal de RI hepática. En conjunto, los resultados de este trabajo permiten apuntar a que las isoformas ζ y ϵ de PKC están implicadas en la señalización de la insulina y el desarrollo de RI durante obesidad y DM2, por lo que en futuras investigaciones sugerimos su modulación para la prevención de DM2.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los animales con dieta obesogénica y con diabetes presentaron hiperglucemia, hiperinsulinemia y dislipidemia comparados con los animales control.
2. Los valores de HOMA-IR sugieren que los animales con dieta obesogénica desarrollaron RI y los animales con STZ, diabetes DM2.
3. El perfil lipídico mostró incremento significativo de TAG, VLDL y LDL en animales con dieta obesogénica y con diabetes, lo que sugiere un desequilibrio en el metabolismo lipídico y por ende una acumulación lipídica en hepatocitos, así como una posible alteración vascular por el aumento de HDL.
4. Los cambios en AST y ALT en animales con dieta obesogénica y con DM2, sugieren que los hepatocitos afectados son responsables de la presencia de estas enzimas en suero.
5. Los análisis histológicos en hígado sugieren un daño leve como una infiltración de lípidos, presencia de inflamación y formación de fibras atribuido a la intervención dietética y farmacológica; mientras que el tejido pancreático sugiere un daño leve en la estructural del parénquima exocrino, una leve atrofia en la región endocrina y una disminución en el número de islotes de Langerhans.
6. Derivado de lo anterior podemos establecer que las ratas presentaron alteraciones metabólicas glucémicas y lipídicas asociadas a las dietas administradas con perfiles característicos en la obesidad y la DM2 en etapas iniciales.
7. El aumento en DC y TBARs en animales con DO y diabetes inducida reafirman una asociación etiológica y fisiopatológica del estrés oxidativo con la diabetes mellitus. proponen
8. Dado que los niveles de PKC ζ en animales con DO y diabetes inducida disminuyen en comparación de los animales control, esto indica que la presencia de PKC ζ es mayor en condiciones normoglucémicas y por ende apoya a la modulación positiva de la insulina.

9. El aumento de los niveles de PKC ϵ en los animales con DO y con diabetes inducida sugieren que la activación de PKC ϵ conlleva a un fallo en la señalización de la insulina.

En conclusión, el presente estudio ofrece una opción de modelo animal en el que se obtuvieron características similares a la obesidad y la DM2, principalmente en órganos del metabolismo de carbohidratos y lípidos, como lo son el hígado y el páncreas, esto con el fin de estudiar las complicaciones asociadas a estas patologías. Además, los datos de este trabajo apoyan la hipótesis de que un aumento en el daño oxidativo de las membranas celulares de los hepatocitos, así como cambios en la presencia de isoformas de PKC en este caso ζ/ϵ , son efectos causales del fallo en la cascada de señalización de insulina. De este modo, esta investigación se centra en que el estudio en la modulación de PKC y el daño oxidativo son piezas claves para comprender mejor la fisiopatología de la DM2.

IX. REFERENCIAS

- Abuja P.M., Albertini R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 306,1–17.
- American Diabetes Association (ADA). (2016). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2016; 39(Suppl. 1):S1–S2 | DOI: 10.2337/dc16-S001.
- Adabimohazab, R., Garfinkel, A., Milam, E. C., Frosch, O., Mangone, A., & Convit, A. (2016). Does Inflammation Mediate the Association Between Obesity and Insulin Resistance? *Inflammation*, 39(3), 994–1003. doi.org/10.1007/s10753-016-0329-z
- Alam U., Asghar O., Azmi S., Malik R.A. (2014). General aspects of diabetes mellitus. *Handbook of clinical neurology*. 2014;126:211-22. doi: 10.1016/B978-0-444-53480-4.00015-1
- Alwahsh S.M., Dwyer B.J., Forbe, S., Van Thiel D.H., Starkey Lewis P.J. & Ramadori G. (2017). Insulin production and resistance in different models of diet-induced obesity and metabolic syndrome. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2).
- Appleton A., Vanberguen O. (2013). Lo esencial en metabolismo y nutrición. Barcelona, España. Editorial Elsevier, 4ta Edición.
- Archundia Herrera M. C., Subhan, F. B., & Chan, C. B. (2017). Dietary Patterns and Cardiovascular Disease Risk in People with Type 2 Diabetes. *Current Obesity Reports*, 6(4), 405–413. doi.org/10.1007/s13679-017-0284-5
- Ayala I., Camara P., & Fernández-Pardo J. (2008). Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 24(January 2008), 5–16.
- Barba Evia J.R. (2018). México y el reto de las enfermedades crónicas no transmisibles. El laboratorio también juega un papel importante. *Revista Latinoamericana Patología Clínica Med Lab*. 2018; 65 (1): 4-17.
- Barrett E., Susan M. Barman, Scott Boitano, y Heddwen L. Brooks. (2010). *Ganong Fisiología Médica*. 23rd ed. México, D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Barquilla García A. (2017). Actualización breve en diabetes para médicos de

atención primaria. *Revista Española de Sanidad Penitenciaria*, [online] 19(1), 57-65. Disponible: http://scielo.isciii.es//pdf/sanipe/v19n2/es_04_

- Benítez A., Benítez G., Barriocanal L., Bueno E., Caballero A., Cañete F., Veja R. (2015). Importance of the postprandial glycemc control in the patient with Type 2 Diabetes Mellitus, 48(01), 83–100.
- Bermúdez V., Bermúdez F., Arraiz N., Leal E., Linares S., Mengual E., Valdelamar L., Rodríguez M., Seyfi H., Amell A., Carrillo M., Silva C., Acosta A., Añez J., Andara C., Angulo V. y Martins G. (2007) *Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución*. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, vol. 26, núm. 2, 2007, pp. 76-86
- Bhattacharya S., Dey D. & Roy S.S. (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *Journal of Biosciences*, 32(2), 405–413. doi.org/10.1007/s12038-007-0038-8.
- Blanco R. Ruiz, M. Sánchez, M. Mendoza, V. (2004). Lipoperoxidos, actividad antioxidante y factores prooxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2. *Bioquímica*, 29(4), 118-25.
- Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
- Brandan N., Llanos, C., Miño, A., y Ruíz, D. (2006). *Hormonas Pancreaticas*. Universidad Nacional del Nordeste. Retrieved from <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/hpancreas.pdf>
- Brandan N., Llanos, C., Barrios, B. I., Escalante Marassi, A. P., & Ruíz Díaz, D. A. N. (2006). *Lipoproteínas*. Universidad Nacional Del Nordeste Facultad de Medicina Cátedra de Bioquímica. Retrieved from <https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/bioquimica/lipoproteinas.pdf>
- Brandan N.; Aguirre M.V., Agolti G. y Vila M.V. (2014). *Interrelaciones Metabólicas: Interrelaciones metabólicas entre tejidos especializados. Ciclo Ayuno-Alimentación. Interrelaciones metabólicas en estados fisiológicos y*

patológicos. Facultad de Medicina. Cátedra de Bioquímica. Universidad Nacional del Noreste. Disponible: <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/interrelaciones.pdf>

- Carvajal Carvajal C. (2015). Tejido adiposo, obesidad e insulino resistencia. *Medicina Legal de Costa Rica*, 32(2), 138-144. Recuperado el 15 de marzo de 2018 http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152015000200015&lng=en&tling=es.
- Chang L., Chiang S.H., & Saltiel R.A. (2004). Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Molecular Medicine*. 10(7-12):65-71. doi.org/10.2119/2005-00029.Saltiel
- Considine R. V. y Caro J.F. (1993). Protein kinase C: mediator or inhibitor of insulin action? *Journal of Cellular Biochemistry*. May;52(1):8-13.
- Considine R.V., Nyce M.R., Allen L.E., Morales L.M., Triester S., Serrano J., ... Caro, J.F (1995). Protein Kinase C Is Increased in the Liver of Humans and Rats with Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus: An Alteration Not due to Hyperglycemia *Journal of Clinical Research*, 95 (6), 2938–2944. doi: 10.1172 / JCI118001
- Costa Gil J.E. y Spinedi E. (2017). La tormentosa relación entre las grasas y el desarrollo de la diabetes mellitus de tipo 2: actualizado. Parte 1. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 54(3): 109-123
- Corbalán-García S., & Gómez-Fernández J.C.(2006). Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1761(7) :633-654 doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.04.015
- Cornejo E.V., & Raimann B.E.(2004). Alteraciones del metabolismo de la fructosa. *Revista Chilena de Nutrición*, 31(2), 93–99. doi.org/10.4067/S0717-75182004000200003
- Cristi-Montero C., Celis-Morales C., Ramírez-Campillo R., Aguilar-Farías N., Álvarez C., Rodríguez-Rodríguez, F., ... Organización Mundial de la Salud

(OMS). (2017). Diabetes Atlas de la FID. *Diabetes India and Jaslok Hospital President-Elect International Diabetes Federation*. doi.org/10.1016/j.diabres.2017.09.002

- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., & Garg, R. (2005). Metabolic syndrome: A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 111(11):1448-54. doi.org/10.1161/01.CIR.0000158483.13093.9D
- Delgado-Coello, B. A y Mas-Oliva, J. (2017). Avances en el estudio experimental de la bioquímica hepática. Instituto de Fisiología Celular. UNAM. Primera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Díaz Hernández D.P. y Burgos Herrera L.C., 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *Revista Médica Universidad de Antioquía*. 15 (3): 179-189.
- Engin A. (2017). Obesity and Lipotoxicity. *Obesity and Lipotoxicity - Advances in Experimental Medicine and Biology*, 960, 111–134. doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5
- Errico T.L., Chen X., Martin Campos J.M., Julve J., Escolà-Gil J. C., & Blanco-Vaca F. (2013). Mecanismos básicos: Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. *Clinica e Investigacion En Arteriosclerosis*, 25(2), 98–103. doi.org/10.1016/j.arteri.2013.05.003
- Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A. J., & Paquot N. (2014). Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2014 Aug;105(2):141-50. doi: 10.1016/j.diabres.2014.04.006.
- FAO. (2015). Macronutrientes y micronutrientes. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación y La Agricultura*. Retrieved from http://www.fao.org/elearning/Course/NFSLBC/es/story_content/external_files/Macronutrientes_y_micronutrientes.pdf
- Farese R., Sajan M.P., & Standaert M.L. (2005). Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt

2), 350–353. doi.org/10.1042/BST0330350

- Farese R. & Sajan M.P. (2010). Metabolic functions of atypical protein kinase C: “good” and “bad” as defined by nutritional status. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(3), E385-94. doi.org/10.1152/ajpendo.00608.2009
- Fenton H.J.H., 1984. The oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc. Proc.* 10, 157–158.
- Friedenauer S, Berlet H. Sensitivity and variability of the Bradford protein assay in the presence of detergents. *Anal Biochem.* 1989; 178:263-8.
- Forbes, J.M., Coughlan, M.T., Cooper, M.E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 57,1446-54
- Furman, B. L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols in Pharmacology / Editorial Board, S.J. Enna 70*, 5.47.1-5.47.20. doi.org/10.1002/0471141755.ph0547s70
- García Martín, M., & Zurita Molina, A. (2010). Transaminasas: Valoración y significación clínica. *Hospital Universitario Virgen Macarena.* 12: 267-275. doi.org/10.4028/3-908451-27-2.239
- Gerald P. & King G.L. (2010). Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circulation research*, 106(8), 1319–1331. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.
- González M., Betancourt M., Ortiz, R. (2000). Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*, 25(1), 98-106.
- Goyal S.N., Reddy N.M., Patil K.R., Nakhate K.T., Ojha S., Patil C.R., & Agrawal Y.O. (2016). Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics. *Chemico-Biological Interactions.* 244:49-63. doi: 10.1016/j.cbi.2015.11.032.
- Güemes-Hidalgo M. y Muñoz-Calvo M.T. (2015). Síndrome metabólico. *Pediatría Integral*, 19(6), 428–435.
- Gutiérrez-Rodelo C., Roura-Guiberna A. y Olivares-Reyes J.A. (2017).

Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: Una actualización. *Gaceta Médica De México*. 2017; 153:214-228

- Guyton A.C. y Hall J.E. (2001). Metabolismo y regulación de temperatura. In McGraw-Hill Interamericana (Ed.), *Tratado de fisiología médica* (Decima, pp. 931–951). México.
- Habegger K.M., Matzke D., Ottaway N., Hembree J., Holland J., Raver C., Hofmann S. M. (2012). Role of adipose and hepatic atypical protein kinase C lambda (PKCλ) in the development of obesity and glucose intolerance. *Adipocyte*, 1(4), 203–214. doi.org/10.4161/adip.20891
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 319–368.
- Hernández-Avila M., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Cuevas- Nasu L., Gómez-Acosta L. M., Gaona-Pineda E. E., ... García-López, D. E. (2016). ENSANUT MC 2016 Informe final de resultados. Instituto Nacional De Salud Publica. doi.org/10.21149/8593
- Hoeke G, Kooijman S., Boon M.R., Rensen P.C., Berbée J.F. Role of Brown Fat in Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis. *Circulation Research*.118(1):173-82. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306647
- Holmes A., Coppéy L.J., Davidson E.P., & Yorek M.A. (2015). Rat Models of Diet-Induced Obesity and High Fat/Low Dose Streptozotocin Type 2 Diabetes: Effect of Reversal of High Fat Diet Compared to Treatment with Enalapril or Menhaden Oil on Glucose Utilization and Neuropathic Endpoints. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 307285. doi.org/10.1155/2015/307285
- Hugués Hernandorena B., Rodríguez García J. C., Rodríguez González J. C., & Marrero Rodríguez M. T. (2002). Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Cubana Endocrinología*, 13(2), 160–168.
- Idris I., Gray S. y Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. (2001). *Diabetologia* (2001) 44: 659-673. doi.org/10.1007/s001250051675.

- Inoue M., Kishimoto A., Takai Y., & Nishizuka Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 252(21), 7610–7616.
- Isea J., Vilorio, J.L., Ponte N., Carlos I., Gómez M., José R. (2012). Complicaciones macrovasculares de la diabetes mellitus: cardíacas, vasculocerebrales y enfermedad arterial periférica. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*.10(1): 96-110 Sociedad Venezolana de Endocrinología y Metabolismo Mérida, Venezuela.
- Itani S.I., Ruderman N.B., Schmedier F., Boden G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51: 2005–2011, 2002
- Kaibuchi K., Takai Y., Sawamura M., Hoshijima M., Fujikura T., & Nishizuka Y. (1983). Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J. Biol. Chem.*, 258(11), 6701–6704.
- Kawano Y., & Cohen D.E. (2013). Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Gastroenterology*. 48 (4): 434-41. doi: 10.1007 / s00535-013-0758-5.
- Klaassen C.D., Plaa G.L. (1969). Comparison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1,1,2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. *Biochemical Pharmacology*. 1969;18(8):2019–2027. doi: 10.1016/0006-2952(69)90299-8.
- Kim Y.B., Kotani K., Ciaraldi T.P., Henry R.R., Kahn B.B. (2003). Insulin-Stimulated Protein Kinase C ζ Activity Is Reduced in Skeletal Muscle of Humans With Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. Agosto de 2003; 52 (8): 1935-42.
- Kruger N. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1994; 32:9-15.
- Kumashiro N., Erion D.M., Zhang D., Kahn M., Beddow S.A., Chu X., Still CD, Gerhard GS, Han X., Dziura J., Petersen K.F., Varman T S., Shulman, G.I. (2011). Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver

disease. Proceedings of national academy of sciences of the United States of America. 108 (39), 16381–16385. doi: 10.1073 / pnas.1113359108

- Lam TKT, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, Giacca (2002). Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol* 283: E682 – E691, 2002
- Leibiger I.B., Leibiger B. and Berggren P.O. (2008). Insulin Signaling in the Pancreatic β -Cell. *Annual Review of Nutrition*. 2008; 28: 233-251
- Leturque A., Brot-Laroche E., & Le Gall M. (2009). GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 296(5), E985–E992. doi.org/10.1152/ajpendo.00004.2009
- Lowry O.H., Rosebrough N.J, Farr A.I., Randall R.I. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- Lozano I., Van der Werf, R., Bietiger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pinget, M., ... Dal, S. (2016). High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutrition& metabolism*, 13, 15. doi:10.1186/s12986-016-0074-1
- Luig T., Anderson R., Sharma A. M., & Campbell-Scherer D. L. (2018). Personalizing obesity assessment and care planning in primary care: patient experience and outcomes in everyday life and health. *Clinical Obesity*, 8(6), 411–423. doi.org/10.1111/cob.12283
- Luna-Moreno, D., Vázquez-Martínez, O., Báez-Ruiz, A., Ramírez, J., y Díaz-Muñoz, M. (2007). Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic subcellular fraction. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146 (2007) 632–643
- Machado M. V., Michelott, G. A., Xie G., Almeida Pereira T., de Almeida T. P., Boursier J., ... Diehl A. M. (2015). Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis reproduce the heterogeneity of the human disease. *PloS One*, 10(5), e0127991. doi.org/10.1371/journal.pone.0127991
- Mandal, A. (2019). Síntesis de la insulina. News-Medical. Recuperado el 18 de

octubre de 2019 de <https://www.news-medical.net/health/Insulin-Synthesis.aspx>

- Martínez Sámano J., Torres Durán P.V., Juárez Oropeza M.A. (2013). Los ácidos grasos y la lipotoxicidad: implicaciones metabólicas. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 56(1), 14-18.
- Martínez Triguero, M. L., Veses Martín, S., Garzón Pastor, S., Mijares, A. H. (2012). Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas. *Medicine (Spain)*, 11(19), 1125–1129. doi.org/10.1016/S0304-5412(12)70438-9
- Mataix J. (2009). *Nutrición y alimentación humana: Capítulo 2: Situaciones fisiológicas y patológicas*. Barcelona, España: Editorial Ergon, 2da Edición.
- McKee T., McKee J.R. (2003). *Bioquímica. La Base Molecular de la Vida*. Madrid, España. 5ta Edición. Editorial Mc Graw Hill.
- Mediani, A., Abas, F., Maulidiani, M., Khatib, A., Tan, C. P., Ismail, I. S., Lajis, N. H. (2016). Metabolic and biochemical changes in streptozotocin induced obese-diabetic rats treated with *Phyllanthus niruri* extract. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 128, 302–312. doi.org/10.1016/J.JPBA.2016.06.003
- Mendoza Romo M.A., Padrón Salas A., Cossío Torres P.E., Soria Orozco M. (2017). Prevalencia mundial de la diabetes mellitus tipo 2 y su relación con el índice de desarrollo humano Investigación original. *Rev Panam Salud Publica*. 2017;41: e103. doi: 10.26633/RPSP.2017.103
- Moller R. y Vázquez N (2011). Anatomía del hígado de la rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *Int. J. Morphol.*, 29(1):76-79, 2011. Área de Anatomía. Departamento de Morfología y Desarrollo, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica
- Murli K. (2013). Anatomía microscópica del hígado. *Clinical Liver Disease*, Vol 2, No S5. PP 109-112. doi: 10.1002/cld.287.
- Nalefski E.A. & Falke J.J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Science*, 5(12), 2375–2390. doi.org/10.1002/pro.5560051201

- Nagasawa T., Yonekura, T., Nishizawa, N., Kitts, D.D., 2001. In vitro and in vivo inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine. *Mol. Cell. Biochem.* 225, 29–34.
- Nelson, R. A. & Bremer A. A. (2010). Insulin resistance and metabolic syndrome in the pediatric population. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 8(1), 1–14. doi.org/10.1089/met.2009.0068
- Newton A. C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28495–28498. doi.org/10.1074/JBC.270.48.28495.
- Newton A. C. 2001. “Protein Kinase C: Structural and Spatial Regulation by Phosphorylation, Cofactors, y Macromolecular Interactions.” *Chemical Reviews* 101 (8). American Chemical Society: 2353–64. doi.org/10.1021/cr0002801.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9(7), 484–496. doi.org/10.1096/fasebj.9.7.7737456
- Olivares Reyes J. A. y Arellano Plancarte A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9–18. ISSN (Versión impresa): 1665-1995
- Olson, B. and Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*. 48(1): 341-349. doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48
- Olvera Granados C.P., Leo Amador G.E., Hernández Montiel H.L. Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? *Boletín Medico Hospital Infantil México*. 2008; 65: 306-324
- OMS. (2016). Informe Mundial Sobre La Diabetes. Resumen de orientación. Recuperado el 24 de octubre de 2018 de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO_NMh_NVI_16.3_spa.pdf;jsessionid=6E5CC4ABC55919F9A99431CC76FCB3CD?sequence=1

- OMS. (2018). OMS | Obesidad y sobrepeso. Recuperado el 12 de noviembre de 2018 de: doi.org/http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/
- Orasanu G. Plutzky J. (2009). The pathologic continuum of diabetes vascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 53 (Suppl 5), S35-42.
- Oré R., Castillo O., Sandoval M., Valdivieso R., Oriondo R., Woolcott O., Durand, Jorge, & Tello, Lida. (2009). Respuesta del sistema antioxidante en varones sanos, frente a hiperglicemia aguda inducida. *Anales de la Facultad de Pérez Medicina*, 70(3), 186-192.
- Pérez F. (2009). Epidemiología y fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 20(5), 565-571.
- Pérez C.E & Guerrero C.A. (2005). Mecanismos moleculares por los cuales los ácidos grasos podrían influir en la captación de glucosa. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, 53(2), 91–98.
- Pérez-Díaz I. (2016). Diabetes Mellitus. *Gaceta Médica de México*, [online] 152(1):50-55.:www.anmm.org.mx/GMM/2016/s1/GMM_152_2016_S1_050-055.pdf
- Pérez-Pevida B., Llaverro M., Gargallo J., y Escalada J. (2016). Complicaciones microvasculares de la diabetes. *Medicine - Programa De Formación Médica Continuada Acreditado*. 12(17): 958-970. doi.org/10.1016/j.med.2016.09.003
- Perry R.J., Varman T S., Petersen K.F., Shulman G.I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2014;510:84–91.
- Petersen M.C., Shulman G.I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological reviews*, 98(4), 2133–2223. [doi:10.1152/physrev.00063.2017](https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017)
- Ponziani F.R., Pecere, S., Gasbarrini, A., & Ojetti, V. (2015). Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*. 9(8):1055-67. [doi: 10.1586/17474124.2015.1056156](https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1056156).
- Quirantes Moreno A., López Ramírez M., Hernández Meléndez E., y Pérez Sánchez A. (2009). Estilo de vida, desarrollo científico-técnico y obesidad. *Revista Cubana de Salud Pública*, 35(3), 1–8. versión impresa ISSN 0864-

3466versión On-line ISSN 1561-3127.

- Reyna N., Mendoza L., Urdaneta A., Añez R., Karla P., Reyna E., Bermúdez V. (2013). Comportamiento de la glicemia e insulina plasmática al administrar dos desayunos con diferentes tipos de carbohidratos digeribles y fibra dietética Revista Latinoamericana de Hipertensión. 8(4):90-94. ISSN: 1856-4550
- Reyes-Soffer G., Ginsberg, H. N., & Ramakrishnan, R. (2017). The metabolism of lipoprotein (a): an ever-evolving story. Journal of lipid research, 58(9), 1756–1764. doi:10.1194/jlr.R077693
- Rorsman P. y Braun M. (2013). Regulation of Insulin Secretion in Human Pancreatic Islets. Annual Review of Physiology. 2013; 75: 155-179. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183754.
- Sajan M. P., Nimal, S., Mastorides, S., Acevedo-Duncan, M., Kahn, C. R., Fields, A. P., Farese, R. (2012). Correction of metabolic abnormalities in a rodent model of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus by inhibitors of hepatic protein kinase C- α . Metabolism: Clinical and Experimental, 61(4), 459–469. doi.org/10.1016/j.metabol.2011.12.008
- Sánchez-Bernal C., San Román García J.I., López Rodríguez M.A., Calvo Andrés J.J. (2002). Fisiología y bioquímica del páncreas. En: Navarro S, Pérez-Mateo M, Guarner L, editores. Tratado de páncreas exocrino. Barcelona: J&C Ediciones Médicas; pp 11-34.
- Sandoval-Muñiz R.J., Vargas-Guerrero B., Flores-Alvarado L.J., y Gurrola-Díaz C.M. (2016). Glucotransportadores (GLUT): Aspectos clínicos, moleculares y genéticos. Gaceta Médica de México 2016; 152: 54-57. Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, México
- Sastrea J., Sabaterb L. y Aparisic L. (2005). Fisiología de la secreción pancreática. Gastroenterol Hepatol. 2005;28 (Supl 2):3-9.
- Saz Peiro P. y Ortiz Lucas M. (2007). Fisiología y bioquímica del ayuno. Medicina naturista. 1(1):10-19
- Schmitz-Peiffer C. y Biden Trevor J. (2008). Protein Kinase C Function in Muscle, Liver, and β -Cells and Its Therapeutic Implications for Type 2 Diabetes.

Diabetes. 57 (7) 1774-1783. doi:10.2337 / db07-1769

- Seed Ahmed M., Pelletier J., Leumann H., Gu H.F. y Östenson CG (2015). Expression of Protein Kinase C Isoforms in Pancreatic Islets and Liver of Male Goto-Kakizaki Rats, a Model of Type 2 Diabete. PloS one , 10 (9), e0135781. doi: 10.1371 / journal.pone.0135781
- Selbie L.A., Schmitz-Peiffer C., Sheng Y., & Biden T.J. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24296–24302.
- Serrano Ríos M., Cascales Angosto M., Martínez Larrad M.T. (2016). La epidemia de obesidad. Los vínculos fisiopatológicos: disfunción endócrina de la célula adiposa, inflamación y resistencia a la insulina. Real Academia Nacional de Farmacia. 82(2016).1697-4298.
- Sibulesky L. (2013). Anatomía normal del hígado. Clinical Liver Disease, Vol 2, No S4. PP 61-63. doi: 10.1002/cld.124. Recuperado el 23 de octubre de 2019 de <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cld.275>.
- Suzuki, K., Imajoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y., & Ohno, S. (1987). Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. FEBS Letters, 220(2), 271–277. doi.org/10.1016/0014-5793(87)80828-1
- Szkudelski T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*. 50(6):537-46. doi.org/10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x
- Ulrich A. B., Schmied B. M., Standop J., Schneider M. B., & Pour P. M. (2002). Pancreatic cell lines: a review. *Pancreas*, 24(2), 111–120. doi.org/10.1097/00006676-200203000-00001
- Unger R.H., Dobbs R.E., Orci L. (1978). Insulin, glucagon and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. *Annual Review of Physiology*. 1978; 40: 307-343

- Valatas V, Xidakis C, Roumpaki H, Kolios G, Kouroumalis EA. (2003). Isolation of rat Kupffer cells: a combined methodology for highly purified primary cultures. *Cell Biol Int* 27:67-73
- Valdivieso-Izquierdo, L.R. (2015). Estrés oxidativo y marcadores bioquímicos en ratas diabéticas con dieta suplementada con vitamina E. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Valsecia, M., (2006). Capítulo 25: Farmacología de la Diabetes. I. Insulinas, PP 177-178. Recuperado el 18 de octubre de 2019 de https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap25_in_suli.pdf
- Varady K.A., Roohk D.J., Loe Y.C., McEvoy-Hein B.K., Hellerstein M.K. (2007). Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice. *J Lipid Res.* 48: 2212-2219.
- Varman T S., Zhen-Xiang L., Amy W., Beddow S.S., Geisler J. G., Kahn M., Zhang X.M., Monia B. P., Bhanot S., and Shulman G.I. (2007). Inhibition of protein kinase C ϵ prevents hepatic insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation* 117 (3), 739–745. doi: 10.1172 / JCI30400
- Vázquez-Martínez, O., Valente-Godínez, H., Quintanar-Stephano, A., Gasca-Martínez, D., López-Cervantes, M. L., Palma-Tirado, L., ... Díaz-Muñoz, M. (2019). Reduced Liver Lipid Peroxidation in Subcellular Fractions Is Associated with a Hypometabolic State in Rats with Portacaval Anastomosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2019, 4565238. doi:10.1155/2019/4565238
- Venero G. J. (2002). Daño oxidativo radicales libres y antioxidantes. *Rev cubana Med Milit*, 31(2), 126-33.
- Waterborg J, Matthews H.(1984). The lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1984; 1:1-3.
- Woodie L., & Blythe S. (2018). The differential effects of high-fat and high-fructose diets on physiology and behavior in male rats. *Nutritional Neuroscience*,

21(5), 328–336. doi.org/10.1080/1028415X.2017.1287834

- Xia P., Inoguchi T., Kern T.S., Engerman R.L., Oates P.J., King G.L. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*. 1994 Sep;43(9):1122-9.
- Yazici D. y Sezer H. (2017) Insulin Resistance, Obesity and Lipotoxicity. In: Engin A., Engin A. (eds) *Obesity and Lipotoxicity. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 960. Springer, Cham
- Youngren J. (2007) Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64:873- 891.
- Zhang L.L., Cao F.F., Wang Y., Meng F.L., Zhang Y., Zhong D.S., Zhou Q.H. (2015). The protein kinase C (PKC) inhibitors combined with chemotherapy in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical and Translational Oncology*.17(5): 371–377

X. ANEXOS

Anexo 1. Soluciones para la realización de la electroforesis SDS-PAGE

Solución	Composición	Preparación
Solución A	Acrilamida-Bis (30 %, 2.67%) Acrilamida 30 g N',N'-Bis metilen- acrilamida 0.8 g	Disolver en aprox 80 ml de agua desionizada, por 1 hora. Luego aforar a 100 ml con agua y filtrar en Whatman No. 1. Almacenar a 4 C cubierto con papel aluminio.
Solución B	TRIS-HCl 1.5 M, pH 8.8 TRIS 18.15 g	Añadir aprox. 50 ml de agua y disolver. Ajustar a pH 8.8 con HCl 1N y aforar a 100 ml con agua. Almacenar a 4 C
Solución C	TRIS-HCl 0.5 M pH 6.8 TRIS 6 g	Añadir aprox. 50 ml de agua y disolver, ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N y aforar a 100 ml con agua. Almacenar a 4 C.
Solución D	SDS 10 %	Disolver en 100 ml de agua.
Solución E Amortiguador de la muestra	Agua 4 ml (1 ml). Sol. C 1 ml (0.25 ml) Glicerol 0.8 ml (0.2 ml) Sol. D 1.6 ml (0.4 ml) Azul de bromofenol 0.05	Alternativamente se puede usar el amortiguador de Muestra ya preparado de Bio-Rad. En ese caso seguir las siguientes instrucciones: Composición de 1X: - TRIS-HCl 31.5 mM, pH 6.8, glicerol 10 %, SDS 1 %, azul de bromofenol 0.005 %.

	% 0.2 ml (0.05 ml).	2 X: TRIS-HCl 31.25 mM pH 6.8, glicerol 10 %, SDS 1 %, azul de bromofenol 0.005%. Agente Reductor: 50 µl de 2-mercaptoetanol + 950
Solución Amortiguador de Corrida 5X pH 8.3	TRIS-base (0.025 M) 9g (15 g/l) Glicina (0.19 M) 43.2g (72 g/l) Dodecil Sulfato Sodico (SDS) 3g (5 g/l)	Disolver en aprox. 500 ml de agua desionizada y llevar al final a 600 ml con agua. Almacenar a 4°C. Para una corrida se diluye 5 veces el amortiguador con agua.
Solución amortiguadora de corrida 1x	100 ml solución amortiguadora de corrida 5x 400 ml de agua destilada	Disolver 100 ml de solución amortiguadora de corrida 5 x y llevar a aforar a 500 ml con agua. Almacenar a 4°C.

Anexo 2. Preparación para dos geles de poliacrilamida

	Reactivo	Concentración					
		7.5 %	9 %	10 %	12 %	12.5 %	15 %
Gel Resolvedor	H ₂ O (μl)	4085	4310	4040	3350	3180	2350
	Sol. B (μl)	2500	2500	2500	2500	2500	2500
	Sol. A (μl)	2500	3030	3300	4000	4160	5000
	Sol. D (μl)	100	100	100	100	100	100
	TEMED (μl)	5	5	5	5	5	5
	PA 10 % (μl)	50	50	50	50	50	50
	Reactivo	Concentración					
		7.5 %	9 %	10 %	12 %	12.5 %	15 %
Gel Concentrador	H ₂ O (μl)	3050	3050	3050	3050	3050	3050
	Sol. C (μl)	1250	1250	1250	1250	1250	1250
	Sol. A (μl)	650	650	650	650	650	650
	Sol. D (μl)	50	50	50	50	50	50
	TEMED (μl)	5	5	5	5	5	5
	PA 10 % (μl)	25	25	25	25	25	25
TEMED: Tetrametiletilendiamina. PA: Persulfato de amonio.							

Anexo 3. Soluciones para Western Blot

Solución	Composición			
Amortiguador de Transferencia	TRIS 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20%. pH 8.3			
	Para 3 litros	Para 2 litros		
	TRIS	9.09 g	TRIS	6.06 g
	Glicina	43.2 g	Glicina	28.8 g
	Metanol	600 ml	Metanol	400 ml
	Aforar a 3 litros con agua destilada	Aforar a 2 litros con agua destilada		
Amortiguador TBS (TRIS salino) 5 X	(TRIS 100 mM, NaCl 2.5 M, pH 7.5) TRIS 12.11 g NaCl 146.1 g Disolver en 800 ml de agua desionizada y estéril y ajustar el pH a 7.5 con HCl conc. Guardar a 4 C.			
TBS 1 X	Diluir el volumen necesario de la solución stock 5 veces con agua desionizada y estéril.			
TTBS	TBS 1 X + Tween 20 0.05%.			
Bloqueador	TBS 1X + leche descremada 5 %			
Solución para la incubación de Anticuerpos	TTBS 1X + leche 1 %			