

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON VANADIO (IV) SOBRE LA UTILIZACIÓN
DIGESTIVA Y METABÓLICA DEL HIERRO, SOBRE LA GLUCEMIA Y OTROS
PARÁMETROS EN RATAS DEFICIENTES EN MAGNESIO Y DIABÉTICAS

Miguel Torres Fernández

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Miguel Torres Fernández
D.L.: GR 1912-2013
ISBN: 978-84-9028-617-3

***MEMORIA QUE PRESENTA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN
FARMACIA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA EL LDO. D. MIGUEL
TORRES FERNÁNDEZ***

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:



Prof. Dr. D. Juan Llopis González

Prof. Dra. D^a Pilar Aranda Ramírez



Dra. D^a. Cristina Sánchez González



**Ldo. D. Miguel Torres Fernández
Aspirante al grado de Doctor**

Granada, Febrero 2013

D. Juan Llopis González. Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

D^a Pilar Aranda Ramírez. Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

D^a Cristina Sánchez González. Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Directores de la Memoria de Tesis Doctoral de título “Efecto del tratamiento con Vanadio (IV) sobre la utilización digestiva y metabólica del hierro, sobre la glucemia y otros parámetros en ratas deficientes en Magnesio y diabéticas”, realizada por el Ldo. Miguel Torres Fernández, autorizan su presentación ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente a 18 de Febrero de 2013.



Fdo. Juan Llopis González

Fdo. Pilar Aranda Ramírez



Fdo. Cristina Sánchez González

El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, titulada “Efecto del tratamiento con Vanadio (IV) sobre la utilización digestiva y metabólica del hierro, sobre la glucemia y otros parámetros en ratas deficientes en Magnesio y diabéticas”, se ha cofinanciado gracias a las ayudas recibidas por el proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía P06-CTS-01435, realizado en el Dpto. de Fisiología y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Granada,

ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65
4.- RESULTADOS.....	78
5.- DISCUSIÓN.....	110
6.- CONCLUSIONES.....	143
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	147

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La diabetes es una patología que afecta a muchos procesos metabólicos. Además, se encuentra asociada con alteraciones de la defensa oxidativa y el metabolismo de los elementos traza. Todas estas circunstancias contribuyen al desarrollo de la enfermedad.

La investigación sobre la diabetes ha progresado mucho en las últimas dos décadas y ha permitido incrementar en gran medida nuestro conocimiento sobre las complejas interrelaciones entre la acción de la insulina, resistencia a la insulina y metabolismo de diferentes macro y micronutrientes entre los que se encuentran el vanadio y hierro.

El vanadio es un elemento ampliamente distribuido en la tierra, pero su papel como micronutriente en el humano aún no se encuentra completamente establecido. En los últimos tiempos se ha demostrado que el vanadio es un elemento traza asociado a la regulación del metabolismo de la glucosa y mejora la sensibilidad del receptor a la insulina. En los sistemas biológicos el vanadio se encuentra preferentemente como vanadato (+5) y vanadilo (+4). En el plasma se encuentra en ambos estados de oxidación en un 90% unido a proteínas, fundamentalmente transferrina. Posteriormente este elemento se distribuye fundamentalmente en hueso, riñón e hígado, encontrándose en el hueso los principales depósitos.

El vanadio interviene en el metabolismo de los carbohidratos incluyendo el transporte de glucosa, la translocación del transportador de glucosa (GLUT 4), oxidación de la glucosa, captación de glucosa, síntesis de glucógeno, etc. En los últimos años el vanadio ha adquirido gran importancia farmacológica debido a la actividad que ciertos complejos de dicho elemento ofrecen en el tratamiento de la diabetes. Ciertos experimentos en animales e incluso investigaciones clínicas en humanos han puesto de manifiesto las propiedades de estos complejos como medicamentos “miméticos de la insulina”, al disminuir la resistencia e incrementar la sensibilidad a la insulina y mejorar el transporte y metabolismo de la glucosa. Se han establecido “in vitro” algunos de los mecanismos por los que el vanadio produce los efectos antidiabéticos, entre los cuales destacan: estimula la autofosforilación de los receptores a la insulina, incrementa la actividad de la tirosin-kinasa en el receptor de insulina, la fosforilación del sustrato del receptor de la insulina (IRS-1) e incrementando la expresión del transportador GLUT 4. En resumen, aunque no se conoce exactamente los mecanismos de acción del vanadio, parece ser que participaría activando la cascada de transmisión de la señal de la insulina tras su unión al receptor, facilitando la entrada y metabolismo celular de la glucosa.

Aunque algunos compuestos de vanadio se están investigando en humanos, y se están utilizando como suplemento por atletas, muchos aspectos no están bien establecidos, como su interacción con otros elementos traza implicados en la defensa oxidativa. Algunos autores sugieren que el vanadio

mejora el estrés oxidativo proceso ligado a la aparición y desarrollo de la diabetes. Uno de los posibles mecanismos anotados sería el derivado de la mejora del metabolismo de la glucosa al disminuir la producción de radicales libres procedentes de la glucosa y su efecto tóxico. Sin embargo, otros han descrito efectos prooxidantes del vanadio, debido a que no normaliza las alteraciones en el metabolismo de diversos elementos traza asociadas a la diabetes.

La diabetes se ha asociado con alteraciones en la homeostasis del hierro tanto en humanos como en animales de experimentación. La generación de especies reactivas de oxígeno por metales oxidantes como el hierro puede representar un mecanismo que agrave la nefropatía diabética que caracteriza las últimas fases de esta patología. En anteriores publicaciones se ha descrito que la diabetes produce una acumulación del hierro renal junto con una elevada excreción de este metal y que este hecho se encuentra relacionado con cambios en la expresión del transportador de metales divalentes DMT1 y el receptor de la transferrina. Con respecto al efecto de la diabetes sobre el contenido de Fe en el hígado no existe unanimidad, unos autores encuentran incrementos, mientras otros no encuentran cambios.

Se conoce muy poco sobre si la exposición al vanadio puede alterar el metabolismo del hierro en la diabetes. Por esta razón consideramos importante abordar el estudio de las posibles interacciones entre el vanadio y el hierro en ratas diabéticas.

De acuerdo con los anteriores comentarios el objetivo del presente trabajo es estudiar si el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas altera el metabolismo del hierro y la actividad de parámetros relacionados con los procesos inflamatorios y defensa antioxidante. Los resultados obtenidos permitirán comprender mejor el papel del vanadio como micronutriente, su actividad biológica como agente antidiabético y sus efectos tóxicos.

2.INTRODUCCIÓN

La Diabetes

Cuadro clínico

La diabetes mellitus término describe un trastorno metabólico de etiología múltiple caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones del metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas resultante de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina, o ambos.

La diabetes mellitus causa daños a largo plazo, disfunción e insuficiencia de varios órganos. Puede presentarse con síntomas característicos, como sed, poliuria, polifagia, visión borrosa y pérdida de peso (debido al hipercatabolismo derivado de la hipoinsulinemia). En sus formas más graves se puede desarrollar, cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetónico y conducir a estupor, coma y, en ausencia de un tratamiento efectivo, la muerte. Los efectos a largo plazo de la diabetes mellitus incluyen el desarrollo progresivo de las complicaciones específicas de la retinopatía con ceguera potencial nefropatía, que puede conducir a insuficiencia renal y/o neuropatía con riesgo de úlceras en los pies, amputaciones, articulaciones de Charcot, y las características de la disfunción autonómica, incluyendo la disfunción sexual. Las personas con diabetes tienen un mayor riesgo de enfermedad vascular cardiovascular, periférica y enfermedad cerebrovascular. (1)

Causas y tipos de diabetes

Varios procesos patogénicos están implicados en el desarrollo de la diabetes. Estos incluyen procesos que destruyen las células beta del páncreas con la deficiencia de insulina consecuente (tipo I), y otros que resultan en la resistencia a la acción de la insulina (Tipo II). Las anormalidades del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas son deficientes debido a la acción de la insulina sobre los tejidos diana resultantes de insensibilidad o falta de insulina.(1, 2)

Un gran número de procesos patológicos están involucrados en el desarrollo de DM y abarcan desde la destrucción de las células β del páncreas, proceso de etiología autoinmune que repercute en la deficiente secreción de la insulina, hasta alteraciones que resultan en la resistencia de los tejidos a la acción de la insulina. La base de la anormalidad en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en diabetes es debida a la acción deficiente de la insulina en tejidos diana. La acción deficiente de insulina es resultado de una secreción inadecuada de dicha hormona, o de una disminución de la respuesta en los tejidos a la insulina o a una falla en uno o más puntos de las complejas vías de la acción de dicha hormona.

El deterioro de la secreción de la insulina y los defectos de la acción de esta frecuentemente coexisten en el mismo paciente.

Criterio diagnostico

Los actuales criterios de la OMS para el diagnóstico de la diabetes está en ayunas $\geq 7,0$ mmol de glucosa en plasma/l (126mg/dl) (1)

Diabetes, daño renal y anemia

La diabetes causa microangiopatía renal, lesiones vasculares producidas por daños en la membrana basal glomerular derivadas de la glucotoxicidad (glicación no enzimática de proteínas y formación de AGE). La nefropatía diabética, deriva en el desarrollo de insuficiencia renal crónica. Una importante consecuencia de la insuficiencia renal es la anemia renal derivada de una deficiente síntesis de eritropoyetina en las células peritubulares renales y por tanto de alteraciones de la eritropoyesis (3). Ésta comienza a desarrollarse desde las primeras fases de la alteración de la función renal. La tercera Encuesta Examen Nacional sobre Nutrición y Sanidad (*National Health and Nutrition Examination Survey*, NHANES III), realizada en los EEUU, confirmó que los efectos perjudiciales de la anemia se desarrollan en etapas tempranas de la insuficiencia renal crónica (4). En dicho estudio se asoció fuertemente la disfunción renal moderada y grave con unos niveles de hemoglobina más bajos y una mayor prevalencia de anemia. De hecho, el grado de anemia en el diabético

puede servir como indicador del deterioro de la función renal secundaria a la nefropatía diabética que se está produciendo. (4)

Diabetes y daño oxidativo

Aunque existe una fuerte evidencia experimental que indica que el estrés oxidativo puede determinar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías de la diabetes mellitus, aún hay controversia acerca de si el incremento de este fenómeno es meramente asociativo más que causal en el caso de esta enfermedad metabólica; no obstante, se ha demostrado que existe un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y una disminución de las defensas antioxidantes en los sujetos diabéticos.

Existen varios mecanismos implicados en el incremento del estrés oxidativo (EO) en la diabetes mellitus, entre los cuales se encuentran: la autooxidación de la glucosa, la glucación de proteínas, la activación de la vía de los polioles y la disminución de las defensas antioxidantes. La glucosa, al igual que otros alfa-hidroxialdehídos, es capaz de autooxidarse a enediones (enolizarse) en solución acuosa y en presencia de metales de transición, como el Fe^{+3} , reacción en la cual se producen citoaldehídos intermediarios oxidados y radicales libres con un alto poder oxidante como el $O_2^{\cdot-}$.

La interacción de los productos finales de la glucación avanzada (PFGA) con sus receptores celulares promueve la producción intracelular de radicales libres y contribuye a disminuir los niveles intracelulares de antioxidantes. Asimismo, el glioxal, especie

derivada de la oxidación de la glucosa, puede generar citotoxicidad mediada por un incremento de la generación de EROs y una disminución del GSH intracelular. Por otro lado, la glucación de las proteínas antioxidantes puede disminuir la actividad de éstas y la hemoglobina glucada puede constituir una fuente donadora de radical $O_2^{\circ-}$ a la pared vascular en los diabéticos.

Se ha demostrado que la hiperglucemia favorece la producción de $O_2^{\circ-}$ mitocondrial, lo que ocasiona, entre otros efectos adversos, la activación de la vía de los polioles (vías de los hexosaminas) y, consecuentemente, una disminución de NADPH, que constituye el cofactor de las enzimas generadoras de GSH. Es decir, es evidente que estamos frente a un mecanismo de retroalimentación positiva en el cual el estrés oxidativo activa a la vía de los polioles y, a su vez, contribuye a la generación de más radicales libres y, por tanto, a acentuar aún más el desbalance redox.

En los individuos diabéticos existe también disminución de las defensas antioxidantes, entre las que se incluyen el GSH, y todas las enzimas y vitaminas antioxidantes, y un aumento del estrés nitrosante, lo que implica un incremento del RL peroxinitrito, potente oxidante lipídico y proteico, y de la actividad de la proteína quinasa C.

Se ha precisado además, que el desbalance entre las EROs y los antioxidantes es un elemento patogénico importante de la resistencia a la insulina, debido a que durante el estado de estrés oxidativo no se estimulan adecuadamente las vías de señalización mediadas por esta hormona. Así, también se ha comprobado que existe una correlación entre el nivel de control metabólico y el grado de severidad del estrés oxidativo en los

individuos diabéticos. Se ha encontrado un incremento de la peroxidación lipídica, y oxidación proteica en la diabetes, que guardan relación con los procesos de nefropatía, neuropatía y retinopatía diabética (5, 6).

Diabetes, Fe, estrés oxidativo y daño renal

Además, la diabetes mellitus se asocia con una alteración de la homeostasis del hierro en modelos diabéticos humanos y animales. El hierro es un metal oxidante de generar especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que se ha postulado que contribuye a la nefropatía diabética. De hecho, varios estudios han demostrado una asociación clara entre el metabolismo del hierro y la diabetes y sus complicaciones crónicas.

En ratas diabéticas STZ se ha encontrado un elevado estrés oxidativo, que se manifiesta por unas marcadas alteraciones en la actividad enzimática antioxidante, así como un aumento de la acumulación de hierro en los lisosomas tubulares proximales, (efecto que también se ha encontrado en pacientes diabéticos). Algunos autores han encontrado correlaciones positivas entre la producción hepática de MDA y la acumulación de Fe. De este modo, la acumulación de Fe en hígado puede elevar muy intensamente la producción de MDA. (7). Según algunos autores, la inducción de la diabetes en ratas diabéticas STZ, resultó en un aumento de 4,9 veces en la excreción urinaria de hierro después de 14 días de la inducción de la diabetes.

Algunos autores han encontrado que los niveles plasmáticos de hierro no se alteran en ratas diabéticas STZ, sin embargo, el contenido de hierro de su tejido renal se incrementa significativamente después de 2 semanas, así como la generación de ROS y la posibilidad de lesiones tubulointersticiales. Así, los cambios de los niveles de hierro que se producen durante la diabetes podrían explicar algunas de las complicaciones renales asociadas con el estado diabético.

Por otra parte, en la diabetes experimental, la expresión renal de dos proteínas de transporte de hierro se altera significativamente. Tales cambios podrían ayudar a explicar las alteraciones en la distribución de hierro encontradas en que pueden contribuir a la generación de ROS y el inicio de la nefropatía diabética. (8)

Los niveles séricos de ferritina se han encontrado positivamente correlacionados con la resistencia a la insulina. Es más, algunos autores han sugerido el uso de este parámetro como indicador de la presencia del síndrome de resistencia a la insulina e incluso como parámetro del seguimiento de un adecuado control metabólico del paciente diabético. (9)

En relación a la distribución tisular del Fe en la diabetes, algunos autores han encontrado niveles de Fe elevados en riñón y reducidos en hígado (10).

El Vanadio

El vanadio es un elemento traza bioactivo (11) entre cuyas funciones, en animales y plantas, se encuentra la de almacén y transporte de oxígeno, transporte de electrones y participa en la fotosíntesis (12).

Antecedentes históricos

El primer informe que versaba sobre el uso de las sales de vanadio como agente metaloterapéutico apareció en 1899 (13 y 14). De acuerdo con los ensayos médicos de la época, Lyonnet y sus colegas probaron los compuestos de vanadio en sí mismos y a continuación, en 60 de sus pacientes (tres de los cuales eran diabéticos) durante un periodo de algunos meses. Ellos describieron lo que podría considerarse hoy una "Fase 0" ensayo clínico: aproximadamente 4-5 mg de metavanadato de sodio (antes de comer) cada 24 horas, tres veces por semana. Como resultado, dos de los tres pacientes diabéticos obtuvo una leve y transitoria disminución de la glucemia sin observarse ningún efecto negativo en ninguno de sus pacientes.

Cien años más tarde, se completó la primera fase I del ensayo clínico de un complejo de vanadio diseñado (15). Se evaluaron en un total de 40 sujetos no diabéticos la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y biodisponibilidad de

dosis crecientes de un complejo de vanadio, el bis(ethylmaltolato) oxovanadio (IV) (BEOV), compuesto destinado para uso terapéutico en la diabetes mellitus.

Durante los años 60 se produjo también una creciente apreciación de la complejidad y versatilidad de oxovanadio (IV) y (V), apareciendo una tenencia a desarrollar complejos de coordinación del vanadio con el objetivo de incrementar su biodisponibilidad y eficacia (16)

En un artículo de opinión titulado "Elementos Traza anormales en el hombre - Vanadio", el objetivo fue considerar si el vanadio podría ser un elemento esencial en los seres humanos (17). Schroeder y sus colaboradores llegaron a la conclusión de que pequeñas cantidades de vanadio eran ubicuas, aparentemente bajo control homeostático, y tenía una "baja toxicidad", todo lo cual tendió a apoyar (pero no a probar) su esencialidad. En esta línea, se llevaron a cabo más estudios para clarificar el metabolismo del vanadio (18 y 19), los efectos sobre el crecimiento (20), y los posibles síntomas de deficiencia (19).

El descubrimiento de que el vanadio (V), como vanadato, era un inhibidor enzimático extremadamente potente era completamente inesperado. Laboratorios de todo el mundo notaron que una preparación comercial en particular de ATP que contenía v (de Sigma Chemical Co.) dio tasas catalíticas anormalmente bajas en un ensayo de ATPasa estándar (21-23).

Estudios posteriores determinaron que esta inhibición de transporte de cationes se originó en el lado citoplásmico de la membrana de la célula (24 y 25), y que la inhibición implicaba al vanadato, impidiendo un cambio conformacional de la enzima desfosforilada (26). La similitud en tamaño y carga de vanadato y fosfato, (el vanadato podía inhibir irreversiblemente las enzimas dependientes del fosfato), resultó en el uso generalizado de vanadatos como inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa para todo tipo de ensayos de células (revisado en (27)). Se ha postulado que “el vanadio es un metal ultratraza con una función biológica elusiva y muchas posibles funciones reguladoras en el cuerpo, a menudo relacionados con la glucosa y lípidos en las vías metabólicas” (28 y 29).

La experiencia pionera fue la de McNeill y colaboradores (30), quienes agregaron ortovanadato sodio al agua de bebida de ratas diabéticas STZ durante varias semanas, era impresionante en su sencillez, y más aún en la claridad de los resultados: una solución diluida de un vanadio (V) sal administrada por vía oral aliviaba muchos de los signos y síntomas de la diabetes STZ con pocos efectos secundarios negativos. Posteriormente, a finales de 1970 y principios de 1980, se observaron efectos insulino-miméticos *in vitro* a concentraciones de iones vanadio en el rango de 0.2-3 mM.

Los compuestos orgánicos de vanadio

La pregunta “¿hay alguna manera de mejorar químicamente potencia de agentes antidiabéticos, pero reduciendo aun mas su toxicidad?” Obtuvo la respuesta “sí” con el informe de bis (maltolato) oxovanadio (IV), BMOV, en 1992 (31).

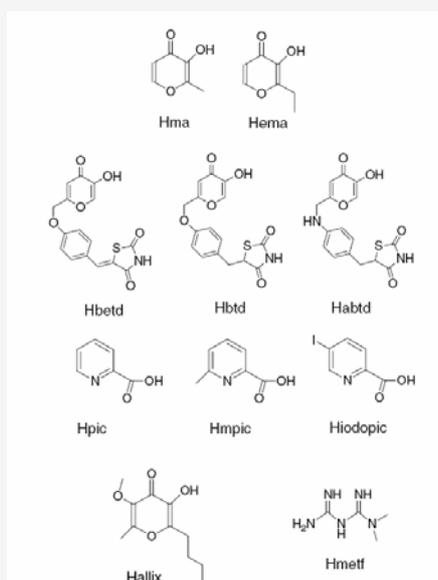


Fig1. Algunos de los ligandos en estudio para la síntesis de compuestos orgánicos de vanadio

El bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) era de dos a tres veces más efectivo que el sulfato de vanadilo como agente reductor de la glucosa, pero se toleraba mejor que las sales de vanadio inorgánicas, y dio como resultado la disminución de la glucemia en todos los modelos animales de diabetes en el que se sometió a prueba (32 y 33), revisado en (34 y 35). El BMOV se podría administrar en el agua de bebida con eficacia equivalente a la de sulfato de vanadio (36). Un estudio farmacocinético realizado con ^{48}V -BMOV y $^{48}\text{VOSO}_4$

(37) demostró de forma concluyente que el vanadio procedente del complejo con la hidroxipirona maltol, (un aditivo alimentario aprobado), mejoraba la captación tisular del ión en comparación con su congénere inorgánico (38).

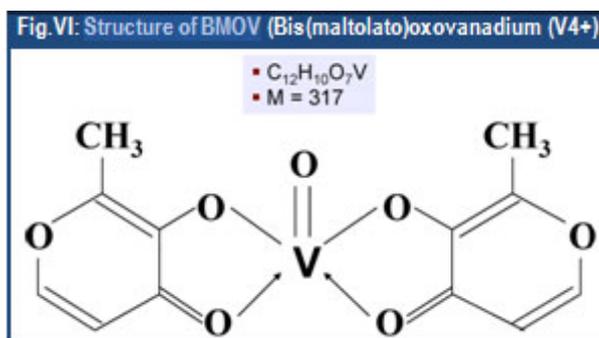


Fig 2. Estructura del bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV)

Absorción

La mayoría del vanadio no es absorbido, por tanto es excretado a través de las heces (39 y 40). Generalmente se encuentra menos de 0.8 µg/L en la orina de individuos no expuestos a compuestos de vanadio. Se ha reportado que alrededor de un 35% de vanadio como BMOV, compuesto altamente soluble, se absorbe por el tracto gastrointestinal humano, mostrándose mediante un modelo cinético que el metabolismo de éste sucede en su mayor parte en el tracto gastrointestinal superior. La mayoría del V es transformado en el estomago en catión vanadil y en esta forma pasa al duodeno. Sin embargo otros estudios sugieren que el vanadato puede entrar a las células a través de fosfato o por otro sistema de transporte de aniones. Debido a los diferentes rangos de absorción, el efecto de otros componentes en la dieta, en las formas de V en el estomago y la velocidad a

la cual se transforma en la forma tetravalente influye en el porcentaje de V ingerido que es absorbido (41)

Un estudio en ratas de Shuang-Qing Zhang y colaboradores demostraron que el BMOV puede ser absorbido rápidamente y con rangos de tiempo que alcanzaban una concentración máxima de vanadio en sangre entre 0.6-0.4 horas posterior a la administración subcutánea y a 2.4-0.9 horas para administración intragástrica como única dosis. El BMOV se distribuye en varios tejidos acumulándose en mayor cantidad en el fémur. (42).

Distribución

La interacción de los pro-fármacos con las proteínas del suero y las pequeñas entidades moleculares, por ejemplo, iones de citrato, ascorbato, y es un aspecto importante del metabolismo del fármaco, capaz de afectar fuertemente la distribución, la biotransformación y en última instancia, el mecanismo de acción de los agentes farmacéuticos (44), y los compuestos de vanadio no son una excepción (45 y 46). Estudios de especiación del BMOV, picolinato de vanadilo, y vanadilo 6-metilpicolinato (46) concluyeron que el 90% de los iones de vanadilo en circulación estaría ligados a aniones citrato y también formando fuerte complejo con las proteínas de alto peso molecular en suero, transferrina y albúmina (47).

Excreción

La orina es la ruta por la cual es excretado la mayor parte del vanadio ingerido en la dieta. Una porción del V absorbido pudiera excretarse por la bilis (43).

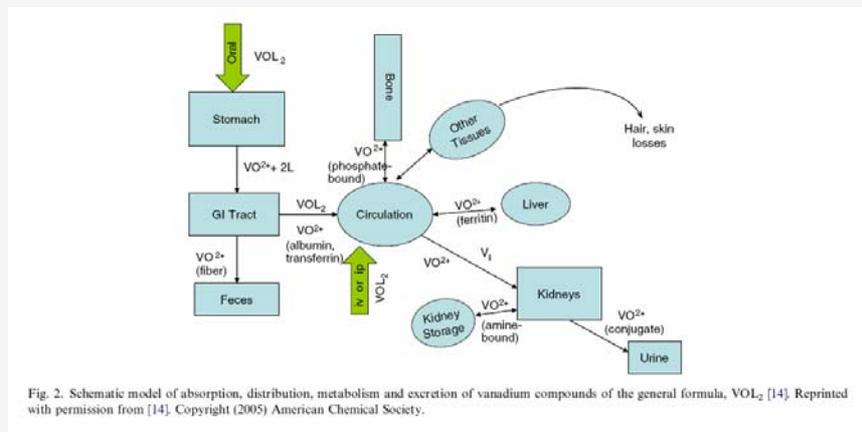


Fig 3. Absorción, distribución y excreción del vanadio

Mecanismo de acción

Son diversos los mecanismos de acción propuestos para el vanadio (48, 59, 60, 61). Una sugerencia es que la formación in situ de peroxovanadatos conduce a la inhibición de PTPasas en la cascada de señalización de la insulina. Otra es que vanadilo estimula proteína quinasas citosólicas, puenteando así al receptor de insulina por completo (49-51). Otros efectos son la translocación de GLUT4 desde el compartimento intracelular a la membrana plasmática (52 y 53). Lo más probable es que el efecto derive de la combinación de los mencionados mecanismos (54 y 55).

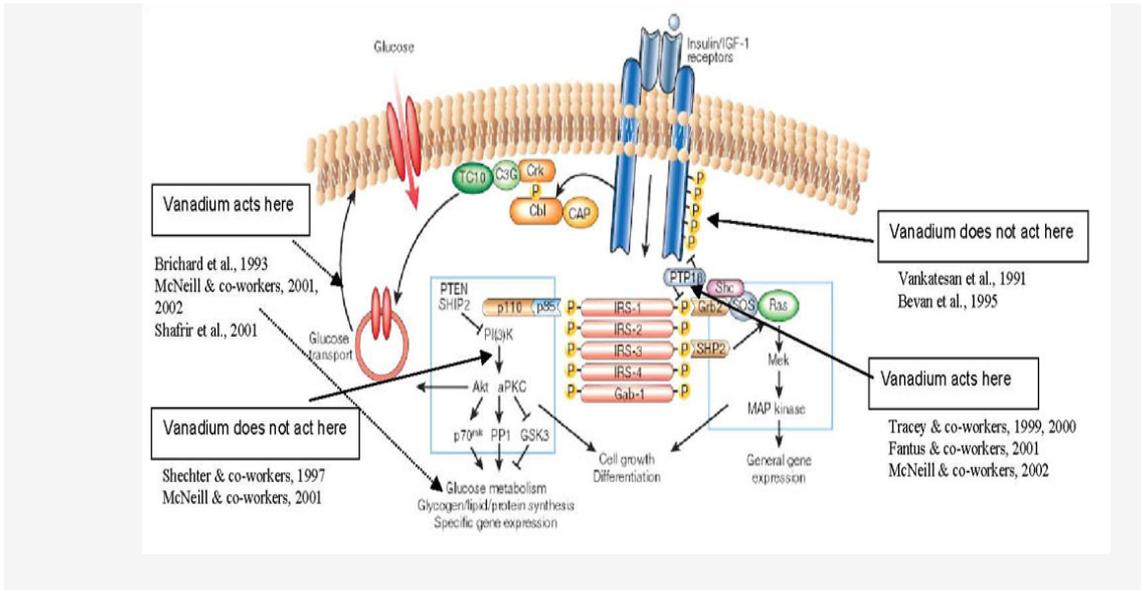


Fig 4. Mecanismo de acción propuesto para el vanadio. Modificada de Saltiel & Kahn. *Nature* 414, 799-806

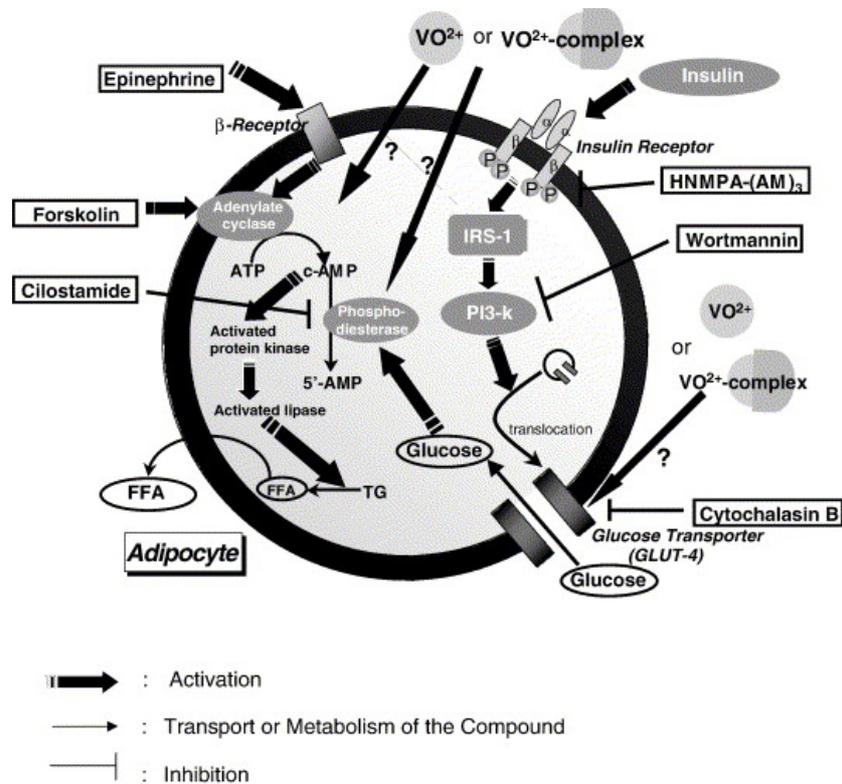


Fig 5. Mecanismo de acción propuesto para el vanadio. Kawabe y col. *Life Sciences* 78: 2860-2866, 2006

Toxicidad

Los compuestos orgánicos de vanadio presentan diversas ventajas frente a las sales orgánicas de V. En este sentido, el bismaltoato de oxovanadio IV (BMVO) es dos o tres veces más potente que el vanadil sulfato y ha mostrado una menor toxicidad (48).

En estudios con animales los resultados son variables debido al tipo de vía de administración del vanadio y la dosis administrada. Además la toxicidad varía entre las diferentes especies ensayadas (48). El vanadio es un elemento relativamente tóxico, en ratas se ha demostrado una intoxicación aguda de V que engloba procesos de enteritis descamativa, congestión hepática leve con cambios en la composición grasa, alteraciones gastrointestinales (diarrea), lengua verde, retraso en el crecimiento y anorexia.

De acuerdo con la bibliografía, en ratas tratadas con vanadio, éste se acumula principalmente en riñón, bazo, testículos, hígado y huesos (56-58).

Vanadio y Diabetes Mellitus

Se han propuesto muchos modelos de acción insulinomimética del V, parece que una sola variable no puede por si sola explicar las acciones similares a la insulina de los compuestos del vanadio. El vanadio y sus compuestos

estimulan el transporte y oxidación de la glucosa, la síntesis de glucógeno y la lipogénesis e inhibe la lipólisis y la gluconeogénesis, propiedades todas ellas insulino-miméticas. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el vanadio tiene un papel clave en el efecto de las vías de señalización de la insulina, inhibe la proteína fosfotirosina fosfatasa e inhibe la glucosa 6- fosfatasa (48, 59, 60).

El potencial insulino-mimético del vanadio ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales y en seres humanos con diabetes. Numerosos estudios han demostrado que los signos de diabetes melitus como polidipsia, poliuria, pérdida de peso y polifagia se resolvieron en animales de experimentación tratados con vanadio.

La hiperglicemia crónica reduce los niveles intracelulares de glucosa 6- fosfato, el uso de vanadato como tratamiento hipoglucemiante en ratas STZ restaura dicha deficiencia. (62-69).

Iglesias-Gonzalez y colaboradores demostraron que la administración de sulfato de vanadil disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada HbA1c en ratas diabéticas-STZ (57)

Un gran número de genes relacionados con la vía de señalización de la insulina están involucrados en el efecto del tratamiento del vanadio en la hiperglicemia (70).

Vanadio y sistema antioxidante

Se ha sugerido que V puede reducir la producción de radicales libres resultantes de trastornos en el metabolismo de la glucosa, y de este modo evitar el daño oxidante causado por diabetes (48, 71). Por otra parte, los efectos pro-oxidantes de este metal en los tejidos, especialmente los eritrocitos, hígado y riñón, se han descrito, asociada con las interacciones con varios elementos traza incluyendo el hierro, el cobre y zinc (72-74).

El vanadio, como elemento metal de transición, que presenta diversos estados de oxidación, puede participar en reacciones que implican la formación de radicales libres. El vanadio (V) en plasma se reduce rápidamente a vanadio (IV) por agentes antioxidantes enzimáticos (NADPH) y no enzimáticos (ácido ascórbico) para ser posteriormente transportado unido a proteínas plasmáticas.

Las siguientes reacciones pueden tener lugar dentro de la célula (75).



Estas reacciones conducen a la formación de peroxovanady1 [V (IV)-OO•] y vanadilo hidroperóxido [V (IV)-OH •]. El superóxido generado se convierte

adicionalmente, por reacción de dismutación con SOD, en H₂O₂. Estudios in vitro han confirmado que la reducción no enzimática de un electrón de vanadio (V) mediada por ascorbato junto con fosfato puede representar una importante vía de reducción de vanadio (V) in vivo. Se ha propuesto que las especies reactivas resultantes generadas por vanadio (IV) por H₂O₂ y hidroperóxido de lípidos a través de la reacción de Fenton puede jugar un papel importante en el mecanismo de vanadio (V) inducción de lesión celular por el vanadio (75).

En condiciones fisiológicas (pH ~ 7), en la presencia de V (IV) / V (V) y H₂O₂ puede tener lugar la siguiente reacción de producción de radicales libres (reacción de Fenton) (75).



La formación de $\bullet\text{OH}$ reactivo puede a su vez producir el radical superóxido, que transforma a través de la superóxido (SOD) a O₂ y H₂O₂ que entra en el ciclo aún más en la reacción. La incubación in vitro de vanadio (IV) con 2'-deoxyguanosina (dG) o con ADN en presencia de H₂O₂ resultó en un incremento de la 8-hidroxilo-2'-deoxyguanosina (8-OH-dG) y sustanciales roturas de hebra de ADN. La reacción de vanadio (IV) con t-butil hidroperóxido genera radicales libres derivados de hidroperóxido, lo que causa la formación de 8-OH-dG y la rotura de la cadena de ADN.

Conclusiones similares fueron extraídos del estudio de la generación de radicales libres mediada por vanadio (IV), la hidroxilación de la 2'-desoxiguanosina y daño en el DNA. El Vanadio (IV) causa hidroxilación dependiente de oxígeno molecular de dG para formar 8-OH-dG. Catalasa y formiato inhibien la formación de 8-OH-dG, mientras que la superóxido dismutasa la incrementan. El vanadio (IV) también causa roturas de la cadena de ADN dependientes de oxígeno molecular en un patrón similar al observado para la hidroxilación de dG (75).

Se diseñó un estudio en ratones para investigar la inducción de apoptosis por el vanadio (V), la inflamación pulmonar y el papel de las ROS. El vanadio (V) produjo una rápida afluencia de leucocitos polimorfonucleares en el espacio aéreo pulmonar con un incremento de la respuesta inflamatoria. El número de células de pulmón apoptóticas (predominantemente neutrófilos) se incrementó considerablemente. Experimentos EPR mostraron la formación de ROS, como el radical superóxido, H₂O₂ y radicales reactivos • OH. Estos resultados indican que múltiples especies oxidativas están involucrados en la inflamación pulmonar y apoptosis inflamación pulmonar y apoptosis inducida por vanadio (V), y que el H₂O₂ juega un papel importante en este proceso (75).

Zhao y col, demostraron en 2010 que los compuestos de V ejerce diversos efectos sobre la mitocondria induciendo el estrés oxidativo, incrementando su

permeabilidad y la liberación de Citocromo C, favoreciendo el proceso de apoptosis (76).

Los resultados obtenidos por Scibior y col, indican que el V reduce la capacidad antioxidante total e incrementa la generación de peróxidos lipídicos hepático, confirmando el potencial prooxidante el V no solo *in vivo* sino *in vitro* (77). Como se detalla más adelante, y según Scibior y col, estos hallazgos pueden ser los causantes de la generación de procesos de anemia en animales tratados con V (78 y 79).

Los resultados publicados por nuestro propio grupo de investigación también avalan el carácter antioxidante del vanadio, produciendo un desequilibrio de la homeostasis del Se y como consecuencia la alteración de enzimas dependientes de Se relacionados con la defensa antioxidante (66 y 74).

Sin embargo, también se ha observado un papel antioxidante del vanadio en la diabetes. Se ha propuesto que el estrés oxidativo participa tanto el origen como en el aumento de las complicaciones secundarias de la diabetes. El estrés oxidativo causado por la toxicidad de la glucosa y la producción resultante de radicales libres, especialmente en el páncreas, se ha propuesto como causa importante del desarrollo de la resistencia a la insulina en la diabetes tanto el tipo 1 como tipo 2. Los resultados experimentales sugieren que la administración oral de vanadato, debido a sus propiedades insulinomiméticas y con ello ocasiona

cambios en el metabolismo celular del GSH, apoyando la hipótesis de la capacidad antioxidante de este metal de transición (80).

Vanadio y anemia

Como ya se ha apuntado anteriormente, Scibior y col demostraron que el tratamiento de ratas con vanadio causa, como consecuencia de alteraciones de la defensa antioxidante, una disminución significativa del recuento de eritrocitos, la concentración de Hb, el volumen celular medio y la hemoglobina celular media. Estos hallazgos estaban correlacionados con una disminución significativa en la concentración de ácido L-ascórbico en el plasma y provocó un aumento significativo en la concentración de MDA en eritrocitos (78 y 79)

Experimentos in Vitro apuntan a que el vanadio ejerce también un efecto negativo directo sobre la maduración de los eritrocitos (a nivel de reticulocitos), interfiriendo así en la eritropoyesis (81), causando al mismo tiempo un descenso de la síntesis de hemoglobina. Parece que el vanadio también puede afectar de un modo directo la síntesis del grupo hemo de la hemoglobina (82).

El hierro

El hierro es un metal esencial para la vida, pero en cantidades elevadas resulta tóxico. La regulación del metabolismo del hierro es actualmente un tema

de intensa investigación al haberse descrito el papel clave de la hepcidina, hormona cuyo gen *HAMP* está muy conservado. Las alteraciones del metabolismo del hierro dan lugar a sobrecarga, destacando la hemocromatosis hereditaria clasificada como enfermedad rara, o en el otro extremo deficiencia de hierro y anemia ferropénica que constituyen un problema de Salud Pública de proporciones mundiales. El hierro tiene la capacidad de ceder o donar electrones con facilidad y puede catalizar reacciones vía radicales libres e incrementar el estrés oxidativo. Así, la peroxidación lipídica y riesgo cardiovascular son consecuencias de la sobrecarga de hierro. Recientemente, se ha descrito también una relación entre el metabolismo del hierro y la resistencia a la insulina y la obesidad. Por el contrario, aún existe gran controversia en cuanto a la relación anemia ferropénica-enfermedad cardiovascular (83).

Función, necesidades, almacenamiento e ingestas recomendadas de hierro

El hierro es un mineral vital para el ser humano. Participa en múltiples procesos metabólicos, ya que se encuentra como componente de enzimas y otros complejos moleculares. Dentro de sus funciones principales se pueden mencionar: transporte de oxígeno a través de la hemoglobina; síntesis de ADN, al formar parte de la enzima ribonucleotido reductasa; y transporte de electrones, por tener la capacidad de aceptar los y donarlos (84, 85).

El papel del hierro en la función del sistema nervioso es muy importante. El hierro parece intervenir en la síntesis, degradación y almacenamiento de neurotransmisores, serotonina, dopamina y ácido gammaaminobutírico (GABA). La distribución del GABA y la dopamina coincide aproximadamente con la de este metal, y se ha sugerido que debe existir alguna participación del hierro en las funciones dopaminérgicas y gabaminérgicas (86).

Además, el hierro es imprescindible para la mielinización. También se ha relacionado la influencia de este mineral en el hipocampo y áreas de memoria. De hecho muchas enfermedades degenerativas cerebrales como Parkinson o demencia, parecen tener su origen en alteraciones del metabolismo del hierro (87-89). Todos estos datos, demuestran la importancia del hierro en numerosas funciones orgánicas, siendo imprescindible para la función cognitiva y el rendimiento físico.

Un adulto promedio sano contiene un total de 3-4 mg de hierro corporal (40-50 mg por kg de peso corporal), del cual aproximadamente un 50% se encuentra en forma de hemoglobina, 25% como reserva hepática (ferritina), y el resto está constituido por las mioglobinas y proteínas que contienen hierro en su estructura.

El hierro absorbido se almacena en forma de ferritina o se utiliza para formar hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, citocromos, etc). El exceso de hierro se deposita intracelularmente como ferritina y hemosiderina en el sistema

retículo endotelial del hígado, bazo y medula ósea. Cada día, se movilizan de 20 a 30 mg de hierro que proviene de la destrucción de los eritrocitos por el sistema retículo endotelial. El hierro se reutiliza, predominando cuantitativamente su incorporación a los precursores de eritrocitos de la medula ósea. Una pequeña cantidad se pierde por la orina y el sudor. Un promedio de 0,5 a 2 mg diarios se eliminan a través de pérdidas sanguíneas, secreciones intestinales y de la continua exfoliación de células epiteliales (90) por lo que la ingesta dietética debe ser la adecuada para mantener la homeostasis del micronutriente.

En humanos, no existe un mecanismo eficiente para la eliminación de este micronutriente, una vez absorbido se reutiliza de forma bastante eficaz, de forma que la absorción está regulada por las demandas metabólicas. Así, cuando las reservas de hierro están disminuidas o cuando hay un incremento en la demanda de eritropoyesis, hay una mayor absorción (90 y 91).

Biodisponibilidad

La biodisponibilidad de un nutriente o componente de un alimento se entiende como la proporción del mismo que es digerida, absorbida y finalmente se utiliza para funciones metabólicas normales. Es importante tener en cuenta que dicho nutriente debe ser también disponible para ser transportado a los lugares de acción o a sus reservorios corporales según el metabolismo normal del mismo. Los factores individuales y exógenos que intervienen en la

biodisponibilidad mineral se han revisado anteriormente (92-94). Dado que el proceso digestivo constituye el principal regulador fisiológico del hierro corporal y que una vez absorbido los mecanismos para excretarlo son ineficaces, los componentes de los alimentos que afectan su solubilidad y transporte intestinal, modificarán su biodisponibilidad.

Mecanismos de absorción del hierro

En las células del epitelio intestinal o enterocitos duodenales, tiene lugar la mayor parte de la absorción del hierro (95).

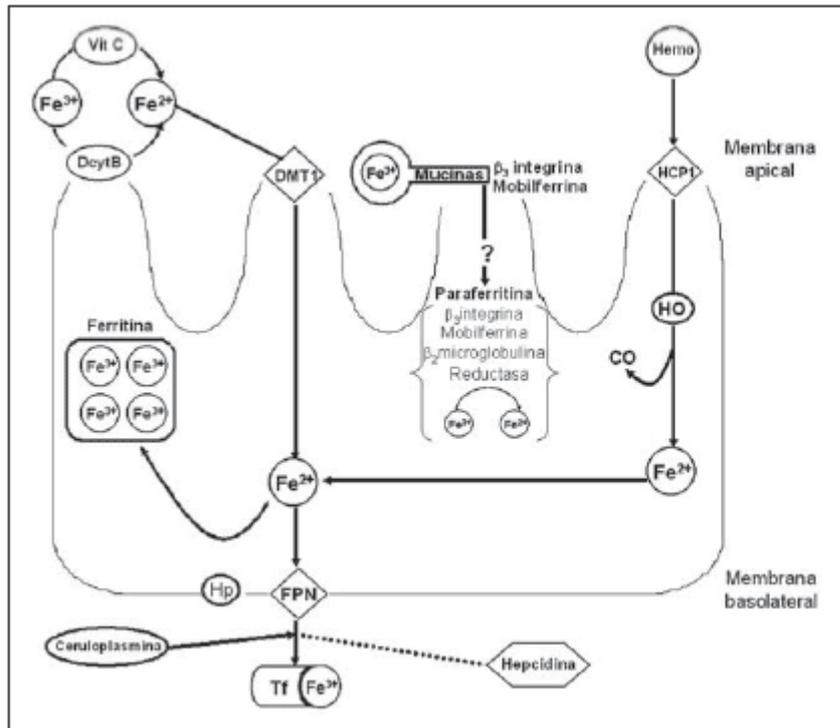


Fig. 1.—Esquema que muestra la absorción de hierro en el enterocito. DcytB: citocromo B duodenal; DMT1: transportador de metales divalente; HCP1: Proteína Transportadora de Hemo; HO: hemo oxigenasa; CO: monóxido de carbono; Hp: hepcidina; FPN: ferroportina; Tf: transferrina.

Fig 6. Regulación de la absorción de hierro. Toxqui1 y col. Nutr Hosp. 2010;25(3):350-365

Para la absorción del hierro no-hemo, es preciso que éste se encuentre en una forma soluble, siendo el Fe^{2+} más soluble que el Fe^{3+} . El hierro ferroso se absorbe utilizando el transportador de metales divalente (*Dimetal Transporter 1*, DMT1), que se encuentra en el borde de cepillo de la membrana apical del enterocito y es el encargado de transportarlo a su interior (96). El hierro férrico, puede transformarse a ferroso, por acción de una serie de componentes reductores de los alimentos (ácido ascórbico, aminoácidos, etc) o bien a través la acción de una proteína que se expresa en la membrana apical, llamada citocromo B duodenal (DcytB), cuya función es reducir el metal (96 y 97). Algunos autores proponen que el hierro férrico se absorbe en el enterocito por un mecanismo distinto a la reducción previa y transporte vía DMT1. En este modelo, el hierro férrico, sería liberado del alimento en el ambiente ácido del estómago y quelado por mucinas en la superficie del borde de cepillo, manteniendo el hierro en su forma férrica. El Fe^{3+} atravesaría la membrana apical del enterocito al interactuar con la β 3-integrina y la mobilferrina.

Una vez en el citosol, este complejo se combinaría con una reductasa, la flavina monooxigenasa, y la β 2-microglobulina para formar un gran conglomerado conocido como paraferitina, resultando la reducción del hierro absorbido de la forma férrica a la forma ferrosa. Hay evidencia que sugiere que el complejo de paraferitina contiene DMT1, que permite la entrada del hierro Fe^{2+} a los orgánulos intracelulares. El hierro en forma ferrosa podría almacenarse en forma de ferritina (90)

Por su parte, el hierro hemo se absorbe por un sistema diferente. Se ha identificado una proteína de la membrana apical de la célula del epitelio intestinal, denominada proteína transportadora de hemo (*Heme Carrier Protein 1*, HCP1) como posible transportador del hierro hemo (90 y 91). Una vez dentro del enterocito, la hemo-oxigenasa 1 (HO-1) y sus homólogos HO-2 y HO-3 son las encargadas de romper la molécula de hierro para liberar Fe^{2+} (14-16). La reacción también genera monóxido de carbono (CO), que está involucrado en vías de señalización, y biliverdina, que se convertirá enzimáticamente en el antioxidante bilirrubina (98).

Una vez dentro del enterocito, el hierro puede almacenarse en forma de gránulos de ferritina (como Fe^{3+}) que se eliminan por descamación, o bien ser exportado a la circulación por la acción combinada de una reductasa denominada hepaestina (Hp) y una proteína transportadora de la membrana basolateral denominada ferroportina (FPN) (91). El hierro ferroso debe ser oxidado a férrico, mediante la ceruloplasmina, y así se une a la transferrina (Tf), la cual distribuye el metal por todo el cuerpo para su utilización y almacenamiento (90, 91, 96).

Hepcidina

La hepcidina es una proteína plasmática de 20-25 aminoácidos, considerada actualmente una hormona del hierro, proveniente de un precursor de

mayor tamaño, que reduce la absorción intestinal de hierro al tiempo que impide su liberación excesiva de los macrófagos (99-101). El gen que codifica la hepcidina (*HAMP*), se expresa y secreta en el hepatocito (96), aunque hay evidencia de que también se expresa en corazón, riñón, tejido adiposo, páncreas, células hematopoyéticas, monocitos y macrófagos. Sin embargo, la relevancia biológica de la hepcidina extrahepática aún es objeto de intensa investigación (99).

Mutaciones en el gen *HAMP* en humanos generan enfermedad por sobrecarga severa de hierro (99). Una completa deficiencia de hepcidina causa hemocromatosis juvenil, teniendo lugar una excesiva absorción de hierro dietético a pesar de las reservas excesivas del metal (96). Por el contrario, una expresión incrementada induce una anemia por deficiencia en la absorción de hierro a pesar de una dieta normal o rica en hierro (96, 99).

El mecanismo de acción de la hepcidina en la absorción se ejerce mediante la unión al transportador ferroportina, causando su internalización y degradación lisosomal (96, 99, 102), lo que impide el transporte basolateral del hierro (96).

La síntesis de hepcidina es estimulada por las reservas y los niveles plasmáticos de hierro, así como por la inflamación a través de citoquinas (TNF α , IL-6). Por el contrario, la expresión de la hepcidina es inhibida por la actividad

eritropoyética, para asegurar que las concentraciones de hierro plasmático extracelular y las reservas se mantienen estables, a la vez que la demanda eritropoyética de hierro está cubierta (96, 102).

Alteraciones en el metabolismo del hierro

Deficiencia de hierro

A diferencia de la sobrecarga, la deficiencia de hierro y anemia ferropénica son muy frecuentes y constituyen un problema de salud pública de orden mundial, siendo la deficiencia nutricional con más prevalencia en el mundo y la principal causa de anemia incluso en los países desarrollados^{59,60}. La anemia es un proceso patológico en el cual la concentración de hemoglobina en los eritrocitos está anormalmente baja.

Se habla de anemia cuando existe una disminución en el organismo de la masa eritrocitaria y de la concentración de hemoglobina circulantes por debajo de los límites considerados normales para un sujeto, teniendo en cuenta factores como la edad, sexo, condiciones medioambientales, y estado fisiológico.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (103), se denomina anemia, cuando la hemoglobina (Hb) se encuentra en los siguientes valores:

- Hombre adulto: Hb < 13 g/dL.
- Mujer adulta no embarazada: Hb < 12 g/dL.
- Mujer adulta embarazada: Hb < 11 g/dL.
- Niños:
 - - 6 meses-5 años: Hb < 12 g/dL.
 - - 5-11 años: Hb < 11,5 g/dL.
 - - 12-13 años: Hb < 12 g/dL.

Un descenso brusco o gradual de 2 g/dL o más de la cifra de Hb habitual de un paciente, aun cuando se mantenga dentro de los límites normales para su edad y sexo.

También puede clasificarse a la anemia según su severidad como:

- Anemia leve a moderada: Hb 8-11g/dL.
- Anemia marcada: Hb 6-7 g/dL.
- Anemia severa: Hb 4-5 g/dL.
- Anemia crítica: Hb menor a 4 g/dL.

La anemia ferropénica está caracterizada por la reducción o ausencia de depósitos de hierro, bajas concentraciones séricas de hierro y Hb, disminución

del hematocrito e incremento en la cantidad de plaquetas, ferritina sérica baja y un aumento marcado en la capacidad de transporte del hierro en plasma.

Así mismo, se ha visto que en pacientes críticos con deficiencia de hierro causada por inflamación, existe una respuesta inapropiada del sistema inmunitario, lo que ocasiona un peor pronóstico para los mismos (104).

Sobrecarga de hierro

Como se mencionó anteriormente, aunque el hierro es un nutriente esencial para el ser humano un exceso en el organismo implica una amenaza para células y tejidos (98, 105).

En condiciones fisiológicas, la cantidad total de hierro en el organismo es dependiente de la absorción de dicho elemento y en ella intervienen mecanismos genéticamente regulados. En numerosas enfermedades, genéticas o adquiridas, se puede producir acumulación del micronutriente.

Hemocromatosis

La hemocromatosis se puede definir como una enfermedad donde hay un incremento de almacenes de hierro, causando cambios patológicos. Hay dos tipos de hemocromatosis: idiopática primaria (o hereditaria) y secundaria (106).

Sobrecarga de hierro no asociadas a hemocromatosis

Existe sobrecarga de hierro por otras causas diferentes a hemocromatosis.

Entre las principales causas se pueden mencionar (107):

- Anemia sideroblástica y ciertas anemias hemolíticas.
- Talasemia mayor.
- Transfusiones sanguíneas frecuentes.
- Causas “médicas” (iatrogénicas) como administración de dextrano ferroso para el tratamiento de algunas anemias.
- Hepatopatías crónicas: alcohólica, asociada a virus C.
- Esteatohepatitis no alcohólica.
- Porfiria cutánea tarda.
- Aceruloplasminemia.
- Atransferremia congénita: rara anemia hipocrómica microcítica.
- Tirosinemia hereditaria.
- Síndrome cerebrohepatorrenal (síndrome de Zellweber).
- Hemodiálisis crónica.
- Sobrecarga dietética.
- Sobrecarga parenteral.
- Cortocircuito portocava.
- Siderosis en algunos subsaharianos y afroamericanos.

Consecuencias de la sobrecarga de hierro

La sobrecarga de hierro es muy tóxica para el organismo, ya que genera radicales que pueden atravesar las membranas y producir daño en las mitocondrias. Estos productos no están sujetos a ningún mecanismo regulador y pueden lesionar directamente a órganos vitales como corazón, hígado u órganos endocrinos. Aunque el hierro es un requisito fundamental para la fisiología celular normal, el acúmulo de hierro conduce a su deposición en las células del parénquima de varios órganos tales como el hígado, el corazón y el páncreas, lo que resulta en toxicidad celular, lesión y fibrosis de tejidos y órganos. El Fe induce daños celulares mediante la generación de oxyradicales y peroxidación de lípidos de membranas (83).

En el hígado, la peroxidación lipídica resulta en un daño a las organelas hepatocelulares, como las mitocondrias y los lisosomas, lo que se cree que contribuye a la necrosis y apoptosis de los hepatocitos. Esto, en última instancia, conduciría al desarrollo de fibrogénesis hepática y cirrosis y, en casos avanzados, cáncer de hígado. Un creciente cuerpo de evidencia sugiere que los niveles altos de hierro pueden explicar varias anomalías enfermedades del corazón. La formación de radicales hidroxilo inducidos por Fe no unido a transferrina causa una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial que conduciría al paro cardíaco. Los efectos cardíacos más destacados son hipertrofia, degeneración de fibras, arritmias y el paro cardíaco congestivo. (108)

Hierro y riesgo cardiovascular

Sobrecarga de hierro y riesgo cardiovascular

La eficiencia del hierro Fe^{2+} para ceder electrones y la del hierro Fe^{3+} para aceptarlos, es una característica fundamental para muchas reacciones bioquímicas del organismo. Sin embargo, ésta característica lo convierte también en un peligro potencial, ya que bajo condiciones aerobias, fácilmente puede catalizar la formación de radicales libres nocivos, especies reactivas de oxígeno o más coloquialmente radicales libres (98). La toxicidad del hierro se basa en la química de Fenton y de Haber-Weiss (98, 109) donde pequeñas cantidades del mineral son suficientes para formar radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) a partir de superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), conocidos como intermediarios reactivos de oxígeno (ROS) (98, 110).

Cabe mencionar que los ROS se producen inevitablemente por la respiración aerobia y se forman a través de la reducción incompleta de oxígeno molecular en la mitocondria. Así mismo, se pueden generar durante reacciones enzimáticas en otros subcompartimentos de la célula, tales como peroxisomas, retículo endoplásmico o en el citoplasma. También se producen en el borde de la membrana celular a través del complejo NADPH oxidasa, una enzima que se expresa principalmente en neutrofilos y macrófagos, pero también es expresada

en otros tipos celulares. La NADPH oxidasa es una herramienta importante para la defensa del organismo¹⁶. El potencial redox del hierro no sólo cataliza la formación de radicales hidroxilo; también cataliza la formación de especies reactivas orgánicas, tales como ROOs, ROs, RS o RSOOs. Del mismo modo, el hierro hemo (contenga o no hemoproteínas) cataliza la formación de radicales libres, vía formación de intermediarios de oxoferrilo (98). Finalmente, el hierro ferroso también puede contribuir como reactivo más que como catalizador, para la generación de radicales libres a través de una interacción directa con el oxígeno. Los radicales libres son especies muy reactivas y promueven la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana y modificación de ácidos nucleicos. Un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, que va más allá de la capacidad antioxidante del organismo, ocasionando estrés oxidativo, se puede encontrar en ciertas situaciones patológicas como inflamación crónica, reperfusión isquémica causada por una lesión o neurodegeneración (98, 111) y en general las enfermedades cardiovasculares (112).

Un exceso de hierro con actividad redox agrava el estrés oxidativo y acelera la degeneración tisular. Esto se hace evidente en desórdenes hereditarios o sobrecargas secundarias de hierro. En condiciones fisiológicas, el hierro extracelular se encuentra ligado a la transferrina, que además de transportar el hierro a través del plasma, lo mantiene soluble y “prácticamente” no-tóxico, por no ser capaz de llevar a cabo las reacciones de Fenton y Haber-Weiss. En

situaciones de sobrecarga de hierro, se satura la capacidad de unión con la transferrina. Así, el hierro no ligado a transferrina, se internaliza en tejidos, a través de mecanismos poco definidos que originan daño celular (98).

Diversos estudios han investigado el efecto del hierro en la peroxidación lipídica. El hierro podría estar involucrado en la patología aterosclerótica mediante la promoción de la modificación oxidativa de LDL, aumentando así su potencial aterogénico. La peroxidación lipídica, puede incluso dañar las membranas de otras células; con lo cual se incrementa LDL-colesterol (LDL-C), disminuye HDL-colesterol (HDL-C) y se altera la presión sistólica sanguínea; por lo que se define como factor de riesgo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (83).

Hipótesis de hierro

Diversos factores de riesgo se asocian claramente con aterosclerosis: edad, género, dislipemias, tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus, obesidad y estilo de vida sedentario. Sin embargo, se sugiere que la causa de casi la mitad de los casos de aterosclerosis no se define por dichos factores. De ahí que la investigación de los posibles factores de riesgo o protección de enfermedades cardiovasculares sigue siendo motivo de estudio (113).

En 1981, Jerome Sullivan propuso que la deficiencia de hierro era un posible factor protector contra enfermedades cardiovasculares. Inicialmente, la “hipótesis de hierro” fue formulada para explicar las diferencias entre sexo y

riesgo cardiovascular, de modo que la menstruación en las mujeres constituiría un factor que condicionaría un escaso reservorio corporal de hierro y por tanto menor riesgo cardiovascular. Sin embargo, este razonamiento es aún motivo de discusión (114). En 1992, Salonen y cols. (115), publicaron un estudio prospectivo acerca de la hipótesis del hierro y las enfermedades cardiovasculares.

Se encontró que una asociación positiva entre las concentraciones de ferritina sérica, indicador de almacenes de hierro, y determinados factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. La asociación fue fuerte en hombres con altos niveles de LDL-colesterol sérico, sugiriendo un papel sinérgico de altos depósitos de hierro y altos niveles de LDL-colesterol (116). Estos hallazgos fueron confirmados por otros investigadores, que muestran que el exceso de hierro estimula la formación de lesiones ateroscleróticas en conejos hipercolesterolémicos. Kiechl y cols. (117), comprobaron en un estudio asintomático de aterosclerosis carotídea evaluado por ecografía dúplex, la existencia de una fuerte correlación entre la aterosclerosis y los depósitos de hierro en hombres y mujeres, los cuales fueron más prominentes cuando se asociaron con hipercolesterolemia.

Por lo tanto, aunque hay pruebas de que la cantidad total de hierro en el cuerpo está relacionada con la enfermedad aterosclerótica, no está claro si es una relación gradual ni la existencia de una relación causa-efecto. Además, los procesos inflamatorios que cursan con ferritina elevada constituirían un factor

confundente. No obstante, sí se conoce una clara relación entre sobrecarga de hierro, peroxidación lipídica elevada y cirrosis hepática en enfermos de hemocromatosis hereditaria (98).

Por otro lado, en un estudio epidemiológico de envejecimiento, se ha observado una interesante asociación positiva entre resistencia a la insulina e hiperlipemia y número de eritrocitos. La hiperinsulinemia es en sí misma un factor de riesgo independiente de enfermedades cardiovasculares, debido a la capacidad de la insulina de promover el crecimiento de células vasculares y aterosclerosis. Además, se ha visto *in vitro* que el efecto de la insulina sobre el crecimiento celular ocurre también en las células eritropoyéticas. Un incremento de la masa eritrocitaria se asocia con enfermedad cardiovascular. Barberi y cols. (118), demostraron *in vivo* que en la resistencia a la insulina hay un incremento en el número de glóbulos rojos, lo cual contribuye a que las personas con síndrome de resistencia a la insulina, tengan un alto riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares.

Interacciones entre Fe y V

Uno de los mecanismos por los que la homeostasis del hierro puede alterarse es por la exposición a otros metales. En 2007 Scibior y col encontraron en ratas sanas un incremento de los niveles hepáticos de Fe después del tratamiento con compuestos de V. El mecanismo que

propusieron para justificar este hecho fue que el V induce un aumento de la captación de Fe de la transferrina, y su posterior almacenamiento en el hígado en el complejo de ferritina. Asimismo observaron en el hígado, un aumento significativo en el contenido de V. Este hecho lo justificaron como la consecuencia de lo anteriormente expuesto, es decir, una mayor capacidad de la transferrina (que ha sido parcialmente liberada de hierro, depositado en la ferritina hepática) para ligar y transportar V hacia hígado.

Estos hallazgos apoyaron la existencia de una relación entre el metabolismo del Fe y el V. Scibior y col, concluyeron que era necesario el estudio del contenido de Fe en órganos y excretas de ratas tratadas con V para la elucidación de un mecanismo preciso por el que V produce un aumento en la concentración de Fe en el hígado (119) .

Estos resultados son consistentes, considerando estudios previos realizados en ratas (120), que demostraron que el vanadio no se transporta unido a hemoproteínas de unión a hierro (como la hemoglobina, mioglobina miocárdica, o citocromos a y b hepáticos) pero sí a proteínas no hemo ligadoras de hierro por mecanismos no enzimáticos como la transferrina plasmática o la ferritina hepática, siendo posible el intercambio bidireccional de V entre ambas proteínas. Ello sugiere que el metabolismo de ambos elementos se encuentran asociados (47, 57).

En 2002, Thompson y col encontraron en ratas sanas tratadas con BMOV un incremento del contenido de hierro óseo y un descenso del contenido renal. Los autores sugirieron que el uso de BMOV en la diabetes podría ayudar a compensar las pérdidas urinarias de hierro que sufrían las ratas diabéticas aprovechando el mencionado efecto de retención de hierro en el hueso ejercido por el BMOV (121)

Esta interacción en el metabolismo de ambos elementos justifica los recientes hallazgos de Todorich y col, que en 2011 demostraron que la exposición a vanadio interfiere con la asimilación de hierro normal en oligodendrocitos causando hipomielinización de fibras nerviosas, por un mecanismo que implica a la ferritina y el hierro (122).

Poco se sabe acerca de si la exposición a V puede alterar el metabolismo del Fe en la diabetes (72) y por lo tanto consideramos que es importante para hacer frente a este estudio de las interacciones entre V y Fe en ratas diabéticas.

El Magnesio

El magnesio es el segundo catión intracelular más abundante y el cuarto catión más abundante en el cuerpo. Alrededor del 60% del magnesio está presente en los huesos, del cual el 30% es intercambiable y funciona como depósito para estabilizar la concentración de suero. Alrededor del 20% está en los

músculos esqueléticos, el 19% en otros tejidos blandos, y menos del 1% en los fluidos extracelulares. El músculo esquelético y el hígado contienen entre 7 y 9 mmol / kg de tejido húmedo; entre 20% y 30% de esto es relativamente intercambiable.

En adultos normales, el magnesio sérico oscila entre 0,70 y 1,10 mmol / L. Aproximadamente el 20% de este está unido a proteínas, 65% es ionizado, y es el resto formando complejos con diversos aniones tales como fosfato y citrato (123). De la fracción unida a proteínas, el 60-70% se asocia con la albúmina, y el resto está unido a las globulinas (124). El magnesio está implicado en varios cientos de reacciones enzimáticas, muchas de las cuales contribuyen a la producción de energía.

La deficiencia de magnesio

La deficiencia de magnesio es de hecho bastante común, sin embargo, generalmente no se diagnostica en clínica y por lo tanto no se corrige. Los primeros síntomas de la deficiencia de magnesio pueden incluir fatiga, anorexia, irritabilidad, insomnio y temblores musculares o contracciones nerviosas (125, 126). También pueden ocurrir cambios psicológicos tales como apatía, aprehensión, disminución de la capacidad de aprendizaje, confusión y mala memoria. En la deficiencia de Mg moderada puede aparecer taquicardia (latidos rápidos del corazón) y otras alteraciones cardiovasculares, mientras que la

deficiencia de magnesio severa puede llevar a entumecimiento, hormigueo, y tetania de los músculos, así como el delirio y la alucinación (127, 128).

El déficit de magnesio se pueden clasificar en dos tipos: La deficiencia de magnesio y agotamiento de magnesio. Desequilibrios en la ingesta de magnesio puede aumentar la prevalencia de la deficiencia de magnesio (129). El agotamiento de magnesio puede ser debido a la dis-regulación de los factores que controlan el estatus de magnesio: la hipoabsorption intestinal de magnesio, la movilización de magnesio hueso, las pérdidas urinarias urinaria, o el hiperadrenoglucocorticismo por disminución de la capacidad de adaptación al estrés, la resistencia a la insulina, y la hiporeceptividad adrenérgica (130). Se ha sugerido que el envejecimiento, el estrés, y diversos estados de enfermedad pueden aumentar los requerimientos de magnesio (131). La deficiencia de magnesio se ha demostrado en 7-11% de los pacientes hospitalizados (132-134). En los pacientes con otras alteraciones electrolíticas, la hipomagnesemia es más frecuente: presentan hipomagnesemia el 40% de los pacientes hipocalcemia, el 30% de los pacientes hipofosfatémico, el 23% de los pacientes hiponatémicos, y 22-32% en pacientes con hipocalcemia (132, 1358, 136). La prevalencia de la hipomagnesemia en pacientes críticos es aún mayor, (20% a 65%) (137-139). La hipomagnesemia en pacientes de cuidados intensivos se asocia con un aumento de la mortalidad (140).

La deficiencia de magnesio en el cuerpo se refleja en una disminución de los niveles séricos de magnesio. Los niveles séricos de magnesio se considera que el primer indicador de la deficiencia de magnesio (141). Del mismo modo, el contenido de magnesio de eritrocitos es otro indicador fiable de las reservas corporales totales de magnesio (142).

La deficiencia de magnesio y la diabetes tipo 2

El magnesio juega un papel importante en el metabolismo de carbohidratos. Puede influir en la liberación y la actividad de las implicadas en el metabolismo de la glucosa (143). Con frecuencia se observa hipomagnesemia en individuos con diabetes tipo 2 (144). Hipomagnesemia puede empeorar la resistencia a la insulina, una condición que a menudo precede a la diabetes, o puede ser una consecuencia de la resistencia a la insulina. Los riñones parecen perder su capacidad de retención magnesio durante períodos de hiperglucemia severa. El incremento de las pérdidas urinarias de Mg puede empeorar la hipoglucemia. Corregir la depleción de magnesio puede mejorar la respuesta a la insulina (144).

Claramente, la mayoría de los estudios confirman que una dieta alta en magnesio tiene un efecto beneficioso en la reducción del riesgo de desarrollar diabetes. La existencia de una estrecha relación entre el control metabólico y el desequilibrio de la homeostasis del Mg fue confirmada por Fujii y col (145)

quienes observaron un marcado descenso de los niveles de Mg en plasma e intraeritrocitario, particularmente evidente en los pacientes diabéticos con retinopatía diabética avanzada y con un inadecuado control de la enfermedad. Se han propuesto varios mecanismos posibles, por lo que los niveles bajos de magnesio sérico puede conducir al desarrollo de diabetes tipo 2. Primero, el Mg es un cofactor esencial en las reacciones que implican la fosforilación, por lo que la deficiencia de magnesio podría perjudicar la cascada de señalización intracelular de la insulina (146, 147). En segundo lugar, los bajos niveles séricos o eritrocitarios de Mg pueden afectar la interacción entre la insulina y el receptor de la insulina por la disminución de la afinidad de receptores de hormonas o por aumento de la microviscosidad membrana (148). Por último, el magnesio también puede ser un factor limitante en el metabolismo de hidratos de carbono ya que muchas de las enzimas en este proceso requieren magnesio como cofactor en las reacciones de fosforilación (149-151). La diabetes mellitus se ha sugerido que es el trastorno metabólico más común asociado con la deficiencia de magnesio, mostrando un 25% a 39% de prevalencia (152, 153).

Deficiencia de Magnesio y metabolismo del Hierro

Durante años, nuestro grupo de investigación ha demostrado ampliamente la existencia de numerosas interacciones metabólicas entre el Mg y diversos metales esenciales. El uso de un modelo experimental de rata hipomagnesémica ha permitido demostrar que la deficiencia de Mg altera la homeostasis de

numerosos minerales (154-165), lo que sin duda repercute en alteraciones de los sistemas biológicos

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación demostraron que la ingesta de una dieta deficiente en Mg tras un breve periodo de tiempo, incrementaba la absorción hierro y que esta situación se mantenía durante el periodo de estudio. Esta mayor absorción de minerales, se va a reflejar en una mayor retención que queda puesta de manifiesto con un incremento de los niveles plasmáticos y el contenido de hierro en los diferentes (157).

Para el estudio de los cambios en la concentración de minerales en tejidos se seleccionaron el músculo esquelético (*longissimus dorsi*), corazón, riñón, fémur e hígado.

Tras diez semanas de suministrar la dieta deficiente en Mg, una tendencia a incrementar (de forma no significativa) el contenido de Fe en el músculo esquelético. A nivel del corazón encontramos un aumento del peso de dicho órgano y un incremento del contenido de Fe (157). Ello podría favorecer la formación de especies reactivas de oxígeno. Este efecto (conjuntamente con la alteración de los niveles de otros minerales como el Ca), podría explicar los síntomas originados por el déficit de Mg sobre el corazón y ampliamente descritos en la bibliografía (166 y 167).

El riñón es uno de los órganos más afectados por el déficit de Mg. En este órgano se observa un fuerte incremento de la concentración de minerales desde los primeros días de ingerir la dieta deficiente. Estos minerales parecen ser fundamentalmente fosfato y oxalato cálcico, ya que al disminuir la concentración de Mg en el filtrado el Ca tiende a unirse con el oxalato precipitando (163). Además también hemos podido comprobar que la deficiencia de Mg provoca un fuerte incremento de la concentración de fosfatos en la orina al disminuir su reabsorción 30, lo cual facilita la formación de sales cálcicas que precipitan en los túmulos renales. La formación de estos precipitados podrían favorecer, en este órgano, la retención de Fe (157), Zn (156) y Cu (159) observados.

En el hígado la deficiencia de Mg provoca un fuerte incremento del contenido de Fe (157) y Cu (159), mientras que en el bazo solo hemos encontrado aumentado el Fe (157). Estos fuertes depósitos hepáticos de Fe y Cu podrían ser los responsables de la activación del estrés oxidativo hepático y de las alteraciones en el metabolismo lipídico (168).

3.MATERIAL Y MÉTODOS

Para el desarrollo del estudio y alcanzar los objetivos propuestos, se ha llevado a cabo la siguiente metodología y se han utilizado los materiales que se exponen a continuación:

Diseño experimental

El diseño experimental se basó en 2 experimentos constituidos por los siguientes grupos de animales:

a) Experimento 1: Estudios realizados en ratas deficientes en Mg:

1.- Grupo control, constituido por 8 ratas no sometidas a ningún tipo de tratamiento, que ingieren la dieta AIN-93 (que proporciona 456.4 mg Mg, 44.5 mg Fe y 60 μ g V por cada Kg de alimento)

2.- Grupo control tratado con V constituido por 8 ratas tratadas con 6.22 mg de BMOV/día suministrado en el agua de bebida, lo que aportaba una dosis de 1 mg V/día. A este grupo se le suministró la dieta AIN-93 (que proporciona 456.4 mg Mg, 44.5 mg Fe y 60 μ g V por cada Kg de alimento)

3.- Grupo deficiente en Mg constituido por 8 ratas no tratadas que ingieren la dieta AIN-93 carente de óxido de magnesio (que proporciona 164.4 mg Mg, 44.5 mg Fe y 60 μ g V por cada Kg de alimento)

4.- Grupo deficiente en Mg tratado con 6.22 mg de BMOV / día suministrado en el agua de bebida, lo que aportaba una dosis de 1 mg V/día. A este grupo se le suministró la dieta AIN-93 carente de óxido de magnesio (que proporciona 164.4 mg Mg, 44.5 mg Fe y 60 µg V por cada Kg de alimento)

b) Experimento 2: Estudios realizados en ratas diabéticas-STZ:

1.- Grupo control constituido por 8 ratas no sometidas a ningún tipo de tratamiento, que ingieren la dieta AIN-93 (que proporciona 44.5 mg Fe y 60 µg V por cada Kg de alimento)

2.- Grupo control constituido por 8 ratas sometidas a un tratamiento de 6.22 mg de BMOV / día suministrado en el agua de bebida, lo que aportaba una dosis de 1 mg V/día que ingieren la dieta AIN-93 (que proporciona 44.5 mg Fe y 60 µg V por cada Kg de alimento)

3.- Grupo de 8 ratas a las que se les indujo diabetes por métodos farmacológicos mediante inyección de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 60 mg/kg de peso disuelta en un tampón citrato a pH 4.5 que ingieren la dieta AIN-93 (que proporciona 44.5 mg Fe y 60 µg V por cada Kg de alimento)

4.-Grupo de 8 ratas a las que se les indujo diabetes por métodos farmacológicos mediante inyección de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 60 mg/kg de peso

disuelta en un tampón citrato a pH 4.5, sometidas a un tratamiento de 6.22 mg BMOV/día suministrado en el agua de bebida, lo que aportaba una dosis de 1 mg V/día, que ingieren la dieta AIN-93 (que proporciona 44.5 mg Fe y 60 µg V por cada Kg de alimento).

5.- Grupo de 8 ratas a las que se les indujo diabetes por métodos farmacológicos mediante inyección de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 60 mg/kg de peso disuelta en un tampón citrato a pH 4.5, sometidas a un tratamiento de 18.66 mg BMOV/día suministrado en el agua de bebida, lo que aportaba una dosis de 3 mg V/día, que ingieren la dieta AIN-93 (que proporciona 44.5 mg Fe y 60 µg V por cada Kg de alimento).

En todos los casos, la solución de BMOV fue preparada diariamente.

Durante el experimento se controlaron semanalmente los siguientes parámetros, evolución del peso, ingesta de alimentos, incremento de peso. Cada 7 días se analizó el nivel de glucosa en sangre periférica. En la última semana experimental se recogieron heces y orina para realizar el estudio de absorción y retención. Transcurrido el periodo, en el día 35, las ratas se anestesiaron con una solución de pentobarbital (0,5g/100ml), y se desangraron por canulación de la aorta posterior. Los animales fueron así sacrificados y separados la sangre, el suero (mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos) y los diferentes tejidos seleccionados (bazo, hígado, riñón, fémur, corazón y músculo

gastrocnemio), que posteriormente fueron almacenados a -80°C hasta el momento de realizarse las correspondientes determinaciones.

Animales y dietas.

Para el estudio se utilizaron ratas Wistar adultas (180-200 g de peso al inicio de los experimentos) que consumieron una dieta semisintética recomendada por el Instituto Americano de Nutrición (AIN-93M) (169) por un periodo de cinco semanas. Esta dieta aportaba un contenido total de 44.5 mg Fe/kg y 60 μg V/kg. Durante los periodos experimentales los animales se mantuvieron en jaulas individuales de metabolismo, que permitieron la recogida separada de las excretas, ubicada en una habitación termorregulada $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa controlada y un fotoperíodo de 12 horas luz/oscuridad. A los animales se les suministró la dieta semisintética (AIN 93M) y agua bidestilada “ad libitum”.



Se consideraron ratas diabéticas aquellas que tras una semana de la inyección del agente diabetógeno presentaron una glucemia en ayunas superior a 140 mg/dL, o superior a 250 mg/dL cuando la glucemia se tomó al azar.

Se calcularon los siguientes índices Biológicos:

Fe Absorbido como la diferencia $[I-F]$

% Absorción (CDA) como $[(I-F)/I] \times 100$

Fe Retenido como $[I-(F+U)]$

(%) R/A (porcentaje retenido del ingerido) como $[(I-(F+U)) / I] \times 100$

Donde I = ingesta, F = excreción fecal y U = excreción urinaria.

Todos los experimentos se diseñaron y desarrollaron de acuerdo con Directional Guides Related to Animal Housing and Care (European Council Community, 1986) y fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Técnicas analíticas.

Determinación de V y Fe en la dieta y órganos

La determinación de Fe y V en la dieta, suero y tejidos se realizó mediante ICP-MS (Agilent 7500, Alemania), provisto de celdas de colisión. Todos los

materiales usados en el análisis fueron previamente limpiados con ácido nítrico y enjuagados con agua ultra-pura obtenidos mediante un sistema Milli Q.

El pretratamiento de las muestras se realizó por ataque con ácido nítrico y peróxido de hidrogeno (calidad supra pure, Merck), en un sistema de digestión por microondas (Milestone, Sorisole, Italia). Cuando la muestra se ha digerido, el extracto se recoge y es llevado a un volumen final de 10 ml para su posterior análisis.

Las curvas de calibración fueron preparadas siguiendo las técnicas de adición de Ga como patrón interno, utilizando las soluciones estándar de 1000mg/L de cada elemento (Merck).

El contenido total de metal (Fe y V) en los tejidos, fue analizado usando técnicas de ICP-MS, y la exactitud del método se evaluó mediante análisis de materiales de referencia adecuados Seronom, (Billingstad, Norway) y NIST 8414, (Gaithersburg, MD 20899) y por estudios de recuperación en muestras de órganos enriquecidos estándares multielementales. El % CV obtenido para la Fe era 2,2% y la de V 5,6%. Para cada elemento se utilizó la media de cinco determinaciones separadas de este material de referencia.

Determinación de glucosa en sangre.

Para la determinación de la glucemia se ha empleado el sensor ACCU-SHEK AVIVA (Roche-Mannheim, Alemania), que permite medir los valores en sangre en el intervalo comprendido entre 10 y 600mg/dL, mediante el uso de tiras reactivas ACCU-SHEK Sensor Comfort Glucosa que actúan como sensores bioquímicos. El sensor ACCU-CHEK AVIVA determina el valor de la glucemia por un método amperimétrico, es decir, indica el flujo electrónico entre el electrodo de medición y el de comparación.

Determinación de la insulinemia

Los niveles plasmáticos de insulina se determinaron utilizando la técnica de enzimoimmunoensayo BIO SPI (Montigny le Bretonneux, Francia).

Determinación de parámetros bioquímicos

Las proteínas transferrina (Spinreact Ref. 11002134, Girona España), ferritina (Spinreact Ref 1107040DS, Girona, España), y proteína C-reactiva (CRP) (Ref Spinreact 1107001L, Girona, España) se determinaron utilizando un Analizador de Química BS-200 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Hamburgo, Alemania).

Análisis del hemograma

Los glóbulos rojos (eritrocitos), glóbulos blancos (WBC), recuento de linfocitos y plaquetas, hemoglobina (Hb) y los niveles de hematocrito (Hct) se determinaron utilizando un analizador hematológico Sysmex KX-21 automático (Sysmex, Japón). El volumen celular medio (MCV) y la hemoglobina celular media se calcularon a partir de la RCB, Hb y HCT.

Determinación de parámetros relacionados con la defensa antioxidante

Las muestras de hígado se homogeneizaron en tampón enfriado con hielo (100 mM Tris-HCl, EDTA 0,1 mM y 0,1% de Triton X-100 (v / v), pH 7,8) en una proporción de 1:9 (w / v). Los homogeneizados se centrifugaron a 30000 rpm durante 30 min en una centrífuga Centrikon H-401 (Alemania). Después de la centrifugación, el sobrenadante fue recogido y congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. Todos los ensayos enzimáticos se llevaron a cabo a $25 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando un espectrofotómetro microplaca de barrido Poder Wavex (Bio-Tek Instruments, EE.UU.) por duplicado en microplacas de 96 pocillos (UVStar®, Greiner Bio-One, Alemania). Las reacciones enzimáticas se iniciaron mediante la adición del extracto de tejido. Las condiciones de ensayo específicas fueron las siguientes.

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) se midió espectrofotóquimicamente por el método ferrocitocromo c usando xantina/xantina oxidasa como fuente de radicales superóxido siguiendo el método diseñado por Mc Cord y Fridovich en 1969 (170). El método fue adaptado de acuerdo con Trenzado et al. 2006 (171). La mezcla de reacción consistía en 50 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 0,1 mM de xantina, 0,013 mM citocromo c y 0,024 UI ml⁻¹ de la xantina oxidasa. Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para producir una inhibición del 50% de la tasa de reducción de ferrocitocromo c medido a 550nm.

La actividad de la catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) se determinó midiendo la disminución de la concentración de H₂O₂ a 240 nm de acuerdo con el método propuesto por Aebi en 1984 (172), adaptado por Trenzado et al. (2006). La mezcla de reacción contenía 10,6 mM de H₂O₂ en 50 mM de tampón de fosfato potásico pH 7,0 recién preparada.

La actividad de la NAD (P) H: quinina-oxidoreductasa1 (NQO1, EC 1.6.99.2) se determinó midiendo la reducción de DCPIP a 600 nm de acuerdo con el método propuesto por Sturve y col en 2005 (173), adaptado por Sanz y col en 2010 (174). La mezcla de reacción contenía 50 mM de Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM de 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) y NADH 0,5 mM. Se realizó una reacción control con agua destilada (promedio de tres medidas) y se restó de cada reacción de muestra.

Para estas enzimas, una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de sustrato/min en las condiciones de ensayo anteriores.

Los niveles de grupos carbonilo de proteínas se evaluó usando el Kit Cayman Chemical Company, MI, USA. 100 μl del homogeneizado de tejido entero se transfirieron a dos tubos. Un tubo fue el tubo de muestra y el otro era el tubo de control. Después de la adición de 400 μl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para el tubo de muestra y 400 μl de 2,5 M HCl al tubo de control, ambos se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 h. Después se añadió 0,5 ml de ácido tricloroacético al 20% a cada tubo y se incubó en hielo durante 5 min. Esta mezcla se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min a +4 ° C, obteniéndose un sedimento que se resuspendió en 0,5 ml de ácido tricloroacético al 10%, se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó de nuevo a 10.000 \times g durante 10 min a 4 ° C. El pellet obtenido se resuspendió en 0,5 ml de una mezcla de etanol / acetato de etilo (1:1) y se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min a 4 ° C dos veces. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió en 250 l de clorhidrato de guanidina y se centrifugó a 10,000 x g durante 10 min a +4 ° C, obteniendo un sobrenadante del que cuales se transfirieron 220 l a una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia (Infinite ® 200 PRO NanoQuant . Tecan Group Ltd., Suiza) a 370 nm.

El contenido de proteína de las soluciones sobrenadantes se determinó por el método de diseñado por Bradford en 1976 (175), utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Los niveles de peroxidación lipídica se determinaron mediante la medida de los niveles de malondialdehído (MDA) generados por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados. En presencia de ácido tiobarbitúrico, el MDA reacciona produciendo sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) coloreadas que se midieron a 535 nm, siguiendo el método de propuesto por Buege y Aust en 1978 (176).

Todos los productos bioquímicos, incluyendo sustratos, coenzimas y enzimas purificadas, se obtuvieron de Roche (Mannheim, Alemania) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). Todos los otros productos químicos procedían de Merck (Darmstadt, Alemania) y fueron de grado reactivo.

Determinación de marcadores inflamatorios

Para la determinación de IL-1 β , Il-6 y el TNF α se utilizó un kit de Millipex Map Rat Citokine/Chemoquine Magnetic Beat Panel, RECYCTMAG-65K utilizando como método de detección un sistema Luminex xMAP (EMD, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Tratamiento estadístico

Los estadísticos descriptivos (medias y desviaciones estándar) se obtuvieron a partir de las diferentes variables estudiadas. Los datos experimentales se analizaron mediante el empleo de pruebas para muestras no paramétricas, utilizándose las pruebas de Kruskal-Wallis seguida de la U de Mann Whitney para las comparaciones de muestras independientes. Los coeficientes de correlación de Spearman se calcularon para el 95% del IC. Todos los análisis se realizaron con la versión 15.0 del Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS, Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas a al nivel de probabilidad $< 5\%$.

4. RESULTADOS

4.1.- Estudios realizados en ratas deficientes en Mg (como modelo de ratas resistentes a la insulina).

Tabla 1.- Cambios de peso a lo largo del periodo experimental (g).

Día	C	CV1	DMg	DMgV1
0	200±14	198±8	208±9	199±4
7	219±15	204±9 ^a	222±13	202±11 ^a
14	241±17	194±21 ^a	243±11 ^b	222±19 ^{b,c}
21	255±21	208±19 ^a	277±14 ^{a,b}	222±19 ^{a,c}
28	288±26	239±21 ^a	291±14 ^b	227±19 ^{a,c}
35	296±30	257±25 ^a	289±15 ^b	251±12 ^{a,c}

Valores medios ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. *P*<0.05.

En la Tabla 1 podemos observar la evolución ponderal que han llevado a cabo las ratas macho Wistar a lo largo de los 35 días del período experimental, quedando registrado un notable incremento de peso en los días 7, 14, 21, 28 y 35 de todos los grupos respectivamente.

En el grupo control se manifiesta un aumento progresivo del peso de los animales a lo largo del período experimental. Este grupo junto al grupo de ratas deficientes en magnesio son los que alcanzan mayor peso al final del

experimento, incrementándose de forma normal semana tras semana sin registrarse ninguna disminución a lo largo de los 35 días del período experimental.

Por otro lado, en el grupo de ratas control tratadas con vanadio se produce una ganancia de peso tras los primeros 7 días del experimento, registrándose una ligera pérdida de peso el día 14 y recuperándose la misma a lo largo del período experimental.

Finalmente, el grupo deficiente en magnesio tratado con vanadio sigue una evolución ponderal similar al grupo de ratas control tratadas con vanadio, siendo los resultados obtenidos al final del experimento, análogos.

Tabla 2.- Alimento ingerido a lo largo del periodo experimental (g/día)

Semana	C	CV1	DMg	DMgV1
1	14,2±4,0	13,1±2,9	14,9±1,4	23,9±3,03 ^{a,b,c}
2	15,7 ± 2,0	13,3±4,7	16,7±2,5 ^b	6,1±2,2 ^{a,b,c}
3	16,6 ± 2,0	19,0±4,6 ^a	18,7±1,7 ^a	16,7±2,0
4	16,6 ± 1,5	20,5±2,5 ^a	21,2±2,3 ^a	21,9±3,2 ^{a,b}
5	15,0 ± 2,0	14,0±2,2	15,0±2,0	14,8±1,9

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. *P*<0.05.

La tabla 2, tal y como nos indica su enunciado, refleja la ingesta de alimento (g/día) en ratas control y deficientes en Mg a lo largo de las cinco semanas del período experimental.

El grupo de ratas control, control + V y deficiente en Mg presentan un incremento gradual en la ingesta de alimento a lo largo de las cuatro primeras semanas experimentales produciéndose una disminución de la misma en la última semana. El grupo de ratas deficientes en Mg + V comienzan con una ingesta de alimento notablemente superior a los demás grupos, ocurriendo lo contrario en la segunda semana, puesto que se registran los valores más bajos de ingestas referentes a todos los grupos. Posteriormente su consumo comienza a elevarse en la tercera y cuarta semana, produciéndose un descenso de la ingesta en la última semana.

Tabla 3.- Agua ingerida a lo largo del periodo experimental (g/día)

Semana	C	CV1	DMg	DMgV1
1	14,17± 3,98	4,75±1,89 ^a	20,5±6, ^{6a,b}	11,5±2,3 ^{a,b,c}
2	19,61±6,77	10,62± 1,53 ^a	14,8±6,4 ^b	9,5±1,7 ^{a,c}
3	16,30±3,79	12,30±4,00 ^a	17,6±7,0 ^b	9,4±2,5 ^{a,c}
4	17,64±4,33	9,88±2,30 ^a	25,0±7,8 ^{a,b}	11,8±3,8 ^{a,c}
5	16,61±4,32	8,20±1,91 ^a	19,0±3,3 ^b	8,9±1,3 ^{a,c}

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. *P*<0.05.

El tratamiento con vanadio, tanto a ratas control como a ratas deficientes en Mg origina un descenso de la ingesta de agua (Tabla 3), manteniendo ingestas semejantes entre los grupos CV1 y DMgV1 a lo largo del periodo experimental.

La tabla 4 nos muestra la diuresis y el peso de las heces en la última semana del periodo experimental. Igual que ocurría con la ingesta de agua, las ratas tratadas con vanadio muestran diuresis netamente inferiores a las no tratadas, tanto control como deficientes en Mg, las cuales a la vez muestran diuresis superiores y muy semejantes. No se observan cambios en el peso de las heces durante la última semana de estudio.

Tabla 4.- Peso heces (g/ día) y diuresis (ml/ día), en la última semana de tratamiento (días 28-35).

Grupo	Diuresis	Heces
C	8,08±3,67	1,08±0,13
CV	2,24±0,50 ^a	0,97±1,50
DMg	10,5±3,4 ^b	1,17±0,14
DMgV	2,40±0,72 ^{a,c}	1,23±0,21

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. *P*<0.05.

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos de las ingestas de magnesio (mg/día) en ratas control y deficientes en Mg a lo largo de las cinco semanas del

período experimental. Tal y como se puede observar, los datos difieren de unos grupos a otros a lo largo de todo el período experimental.

Tabla 5.- Ingesta de Mg (mg/día) en ratas control y deficientes en Mg a lo largo del periodo experimental (5 semanas).

Semana	C	CV1	DMg	DMgV1
1	6,5±1,8	6,0±1,3	2,3±0,6 ^{a,b}	3,9±0,5 ^{a,b,c}
2	7,1±0,9	6,1±2,1	2,8±0,4 ^{a,b}	1,0±0,4 ^{a,b,c}
3	7,4±0,9	8,7±2,1 ^a	3,1±0,3 ^{a,b}	2,7±0,8 ^{b,c}
4	7,6±0,7	9,4±1,1 ^a	3,5±0,4 ^{a,b}	3,6±5,2 ^{a,b}
5	6,8±0,9	6,4±1,0	2,3±0,4 ^{a,b}	2,3±0,5 ^{a,b}

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día).^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

En el grupo de ratas control y control V se dan ingestas superiores respecto a los demás grupos, produciéndose un incremento progresivo a lo largo de las cuatro primeras semanas y disminuyendo ésta en la última semana.

En cuanto a los grupos deficientes en Mg presentan ingestas inferiores durante todo el período experimental. Las deficientes en Mg siguen una distribución similar a los grupos anteriores pero en menor medida, puesto que las ingestas difieren notablemente en cuanto a la cantidad de Mg ingerido. Por otro lado, el grupo de ratas deficientes en Mg + V presentan irregularidades en la ingesta de Mg durante las tres primeras semanas del período experimental.

La tabla 6 nos muestra los resultados obtenidos de las ingestas de vanadio (mg/día) en ratas control y deficientes en Mg a lo largo de las cinco semanas del periodo experimental.

El grupo de ratas control y deficientes en magnesio presentan una evolución similar en cuanto a las cantidades de vanadio ingerido a lo largo del período experimental, destacando que durante el experimento se producen incrementos semanales en sus ingestas exceptuando la última semana. Por otro lado, el grupo de ratas control V y deficientes en Mg + V muestran ingestas superiores respecto a los demás grupos.

Tabla 6.- Ingesta de V (mg/día) en ratas control y deficientes en Mg a lo largo del periodo experimental (5 semanas).

Semana	C	CV1	DMg	DMgV1
1	0,00085±0,00023	1,03±0,04 ^a	0,00083±0,00020 ^b	1,15±0,23 ^{a,c}
2	0,00093±0,00011	1,07±0,11 ^a	0,0010±0,00015 ^b	0,96±0,17 ^{a,c}
3	0,00097±0,00012	1,09±0,12 ^a	0,0011±0,00010 ^{a,b}	0,94±0,25 ^{a,c}
4	0,00099±0,000087	1,19±0,11 ^a	0,0012±0,00013 ^{a,b}	1,18±0,38 ^{a,c}
5	0,00090±0,00011	1,04±0,02 ^a	0,00084±0,00016 ^b	1,01±0,06 ^{a,c}

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día).^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

El grupo control tratado con vanadio presenta un incremento en las ingestas durante el período experimental, apreciándose una ligera disminución en la última semana (Tabla 6).

Finalmente, los animales deficientes en Mg + V muestran en la primera semana una ingesta elevada, disminuyendo durante la segunda y tercera semana, incrementándose las ingestas en semanas posteriores excepto en la última que se da un ligero descenso.

Las ingestas de Fe (Tabla 7) en el grupo de ratas control incrementan a lo largo de las cuatro primeras semanas disminuyendo levemente en la última, donde se obtienen valores similares a los alcanzados entre la primera y segunda semana. El grupo control V presenta una distribución similar al grupo control en cuanto a la ingesta de hierro a lo largo del período experimental aunque difieren las cantidades, alcanzando ingestas superiores en la tercera y cuarta semana.

El grupo deficiente en Mg es el que presenta las ingestas más elevadas respecto a los demás grupos, dándose un incremento progresivo a lo largo de las cuatro primeras semanas del período experimental, alcanzando los resultados valores semejantes en la última semana de estudio.

Tabla 7.- Ingesta de Fe ($\mu\text{g}/\text{día}$) en ratas control y deficientes en Mg a lo largo del periodo experimental (5 semanas).

Semana	C	CV1	DMg	DMgV1
1	630 \pm 177	584 \pm 128	618 \pm 62	1372 \pm 135 ^{a,b,c}
2	697 \pm 89	593 \pm 208	745 \pm 111 ^b	272 \pm 98 ^{a,b,c}
3	739 \pm 90	843 \pm 207 ^a	832 \pm 76 ^a	748 \pm 90 ^c
4	739 \pm 64	913 \pm 109 ^a	943 \pm 102 ^a	974 \pm 142 ^{a,b}
5	667 \pm 88	623 \pm 99	668 \pm 88	657 \pm 85

Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

Por último, el grupo deficiente en Mg + V muestra irregularidades en cuanto a las cantidades ingeridas a lo largo de las cinco semanas del período experimental obteniendo las ingestas más elevadas en la primera y cuarta semana.

Tabla 8.- Niveles séricos de Fe, Mg y V en ratas control y deficientes en Mg en el día 35 de tratamiento.

GRUPO	Fe suero (mg/l)	Mg suero (mg/l)	V suero ($\mu\text{g}/\text{l}$)
C	1,81 \pm 0,72	21,0 \pm 1,0	2,35 \pm 0,57
CV1	1,79 \pm 0,69	17,1 \pm 2,0	456,73 \pm 52,87 ^a
DMg	1,73 \pm 0,42	8,4 \pm 1,3 ^{a,b}	3,03 \pm 0,68 ^{a,b}
DMgV1	2,10 \pm 0,71	9,2 \pm 2,6 ^{a,b}	439,62 \pm 141,96 ^{a,c}

Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

La tabla 8 presenta los resultados obtenidos de los niveles séricos de hierro, magnesio y vanadio (ml/L suero) en ratas control y deficientes en Mg en el último día del tratamiento.

Los niveles séricos de Fe hallados en los animales deficientes en Mg + V han sido superiores respecto a los demás grupos. El grupo control y control + V han obtenido resultados similares. Finalmente los animales deficientes en Mg ha sido el grupo en el que se ha registrado una menor concentración de este elemento tras los 35 días de tratamiento.

Por otro lado, en el grupo control y control+V se han alcanzado los valores más elevados de Mg en suero difiriendo notablemente de los obtenidos en los grupos de animales deficientes en magnesio.

Por último, los niveles séricos de V obtenidos en el grupo control + V y deficientes en Mg + V son significativamente superiores a los demás grupos. En cuanto a la concentración de dicho elemento en el grupo deficientes en Mg es superior al encontrado en el grupo control tras los 35 días de tratamiento.

Tabla 9.- Glucemia en ayunas (mg/100ml) en ratas control y deficientes en Mg a lo largo del período experimental (35 días).

GRUPO	Día 0	Día 7	Día 14	Day 21	Day 28	Day 35
C	70,5±12,2	89,9±7,3	92±7,7	91,1±6,6	94,2±8,0	90,7±6,9
CV1	74,7±5,5	68,3±8,2 ^a	90,1±4,3	90,5±10,5	96,1±5,7	79,3±7,4
DMg	72,1±12,5	98±7,5	101,7±10,1 ^{a,b}	107,7±10,6 ^{a,b}	108,7±8,2 ^{a,b}	111,5±7,5 ^{a,b}
DMgV1	71,3±12,1	79±15,0	77,8±10,1 ^{a,b,c}	98,2±14,7	92,1±7,2 ^c	78,7±8,9 ^c

Valores medios ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

En la tabla 9 podemos observar los resultados referentes a los niveles de glucemia en ayunas en ratas control y deficientes en Mg durante el período experimental.

En general nos encontramos con unos niveles de glucemia normales en cada uno de los grupos a lo largo de los 35 días del período experimental, siendo en el grupo de ratas deficientes en Mg donde se encuentran valores significativamente más altos a partir del día 14, aún así debemos decir que se encuentran dentro de los valores normales.

Tabla 10.- Insulina sérica e índice HOMA-IR en el día 35 de tratamiento

	C	CV1	DMg	DMgV1
Insulina sérica (ng/ml)	2.05 ± 0.78	1.73±0.81	6.65 ± 3.72 ^{a,b}	1.82 ± 1.49 ^c
Índice HOMA-IR*	9.53 ± 4.36	7.88 ± 3.57	39.63 ± 22.04 ^{a,b}	7.69 ± 5.64 ^c

* Modelo homeostático para la valoración de la resistencia a la insulina.

Valores medios ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

La deficiencia de Mg incrementa significativamente los niveles de ininsulina sérica y el índice HOMA-IR, mientras que el tratamiento con V devuelve dichos valores

Tabla 11.- Estudio de la absorción de Fe (µg/día) en ratas control y deficientes en Mg tras cinco semanas de tratamiento (días 28-35).

GRUPO	Ingesta Fe	µg Fe heces/día	µg Fe absorbido/día	Fe % CDA
C	667±88	481±53	187±46	27±4
CV1	623±99	480±120	129±48 ^a	22±8
DMg	668±88 ^a	423±21 ^a	258±62 ^{a,b}	37±7 ^{a,b}
DMg+V	657±85	433±27 ^a	223±94 ^b	32±10 ^b

Valores medios ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día).

CDA: Coeficiente de Digestibilidad Aparente (absorbido/Ingerido x100)

^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

La tabla 11 muestra la absorción de Fe (µg/día) en ratas control y deficientes en Mg tras cinco semanas de tratamiento.

En cuanto a los grupos controles, se observa que el tratado con vanadio ha obtenido valores inferiores referentes a la absorción de Fe que el grupo control tras las cinco semanas de tratamiento. Los animales deficientes en Mg y deficientes en Mg + V han absorbido cantidades superiores de Fe respecto a los grupos controles. Particularmente el grupo deficiente en Mg presenta la cantidad de Fe absorbida más elevada.

Tabla 12.- Retención de Fe ($\mu\text{g}/\text{día}$) en ratas control y deficientes en Mg tras cinco semanas de tratamiento (días 28-35).

GRUPO	Ingesta Fe	μg Fe heces/día	μg Fe orina/día	μg Fe retenido/día	Fe % retenido
C	667 \pm 88	481 \pm 53	50 \pm 41	137 \pm 41	20 \pm 6
CV1	623 \pm 99	480 \pm 120	35 \pm 11	108 \pm 48	17 \pm 7
DMg	668 \pm 88	423 \pm 21 ^a	17 \pm 6 ^{a,b}	240 \pm 58 ^{a,b}	35 \pm 6 ^{a,b}
DMgV1	657 \pm 85	433 \pm 27 ^a	26 \pm 9	197 \pm 95 ^{a,b}	29 \pm 11 ^{a,b}

Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día).

% Retenido: Retenido/Ingerido x100.

^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^c Diferente del grupo DMg. P<0.05.

La tabla 12 muestra la retención de Fe ($\mu\text{g}/\text{día}$) en ratas control y deficientes en Mg tras cinco semanas de tratamiento.

El grupo control tratado con vanadio ha obtenido valores ligeramente inferiores referentes a la retención de Fe que el grupo control tras las cinco semanas de tratamiento. Los animales deficientes en Mg y deficientes en Mg + V han retenido cantidades superiores de Fe respecto a los grupos controles.

Particularmente el grupo deficiente en Mg presenta la cantidad de Fe retenida más elevada.

Tabla 13.- Peso de los órganos (g) al final del periodo experimental (día 35)

	C	CV1	DMg	DMgV
Bazo	0,56±0,10	0,54±0,12	0,57±0,09	0,57±0,17
Hígado	8,3±1,6	6,6±1,0 ^a	6,5±0,4 ^a	6,5±0,7 ^a
Riñón	0,9±0,1	0,9±0,1	0,8±0,04	0,9±0,1
Fémur	1,1±0,2	1,1±0,2	0,9±0,2	1,2±0,1
Corazón	0,9±0,2	0,8±0,1	0,8±0,06	0,8±0,1

Valores medios ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día).

^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^c Diferente del grupo DMg. P<0.05.

En la tabla 13 se exponen los pesos de los órganos al final del periodo experimental. Los resultados obtenidos muestran que tanto el tratamiento como la deficiencia de Mg disminuye el peso del hígado, no viéndose afectado el peso de los demás órganos estudiados.

Los niveles de transferrina y ferritina séricas (Tabla 15), tienden a incrementar con el tratamiento con vanadio, mientras que la deficiencia de Mg tiende a disminuirlos.

La ingesta de la dieta deficiente en Mg produce una caída del estado total antioxidante. El tratamiento con vanadio a ratas deficientes en Mg retorna estos valores a niveles semejantes a los encontrados en las ratas control.

El estudio de los parámetros relacionados con la inflamación (IL-1 β , IL-6 y TNF α) indica que la deficiencia de Mg tiende a disminuir dichos valores, mientras que el tratamiento con V tiende a recuperarlos aproximándolos a los valores control. No obstante el TNF α encontrado en los dos grupos que ingieren la dieta deficiente en magnesio permanece en niveles significativamente inferiores a los observados en las ratas control y control tratadas con V

Tabla 14.- Parámetros bioquímicos y hematológicos en el día 35.

Groups	C	CV	DMg	DMgV1
Suero				
Transferrina (mg/ml)	6,1 \pm 3.3	12,7 \pm 8,6	10,9 \pm 8,3	8,6 \pm 4,2
Ferritina (ng/ml)	210 \pm 30	242 \pm 25	188 \pm 52 ^b	186 \pm 80 ^b
Estado Total Antioxidante (mmol/l)	1,29 \pm 0,30	1,37 \pm 0,15	0,77 \pm 0,33 ^{a,b}	1,29 \pm 0,13 ^c
Interleucina-1 β (pg/ml)	79 \pm 44	56 \pm 37	46 \pm 18	68 \pm 47
Interleucina-6 (pg/ml)	127 \pm 69	212 \pm 71	81 \pm 17	109 \pm 33
Factor de necrosis tumoral α (TNF α) (pg/ml)	8,4 \pm 2,7	9,5 \pm 6,9	3,6 \pm 1,2 ^{a,b}	4,8 \pm 1,0 ^a
Sangre				
Eritrocitos (x10 ⁶ /mm ³)	9,0 \pm 1,4	7.0 \pm 1.1 ^a	8,1 \pm 0,5	8,1 \pm 0,5
Hemoglobina (Hb) (g/dl)	16,7 \pm 2,9	12.5 \pm 0.7 ^a	14,2 \pm 0,6	13,4 \pm 0,7 ^{a,b,c}
Hematocrito (%)	47,4 \pm 8,7	44,6 \pm 5,0	43,6 \pm 2,42	41,8 \pm 2,4
Volumen Corpuscular Medio (VCM) (fl)	54,5 \pm 0,6	52,4 \pm 1,3	53,5 \pm 1,4	51,8 \pm 1,4 ^{a,c}
Hemoglobina Celular Media (HCM)(pg)	18,5 \pm 0,5	17,8 \pm 0,8	17,5 \pm 0,7 ^a	16,6 \pm 0,8 ^{a,b,c}
Leucocitos (x10 ³ /mm ³)	4,5 \pm 2,4	2.7 \pm 0.8 ^a	3,9 \pm 1,4	3,0 \pm 1,0 ^a
Linfocitos (x10 ³ /mm ³)	3,2 \pm 1,8	1,8 \pm 0,6 ^a	2,6 \pm 0,9 ^a	2,2 \pm 0,7 ^a
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	618 \pm 269	507 \pm 324	736 \pm 219	672 \pm 296

Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día).

^aDiferente del grupo C; ^bDiferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. P<0.05.

El estudio del hemograma (Tabla 14) nos muestra que el tratamiento con vanadio disminuye la el n° de eritrocitos, Hb, leucocitos y linfocitos. La deficiencia de Mg disminuye la HCM y el n° de linfocitos, mientras que el tratamiento a ratas deficientes en Mg disminuye todos los parámetros estudiados excepto Hematocrito y plaquetas.

Como es de esperar los tejidos de animales tratados con vanadio presentan mayores concentraciones de este elemento (Tabla 15), siendo el hígado, fémur, corazón y riñón los tejidos que mas vanadio acumulan por kg de tejido seco.

Tabla 15.- Contenido de V y Fe en tejidos (mg/kg tejido seco) en el día 35.

		C	CV1	DMg	DMgV
Músculo	V	0,014±0,008	1,07±0,16 ^a	0,015±0,0024 ^b	0,92±0,28 ^{a,c}
	Fe	50 ± 14	49±6	46±6	50±11
Riñón	V	0,12 ± 0,02	28 ± 6 ^a	0,17±0,05 ^{a,b}	25±5 ^{a,c}
	Fe	255 ± 43	255±23	252±48	271±56 ^{a,b}
Hígado	V	0,043 ± 0,010	9 ± 3 ^a	0,061±0,014 ^{a,b}	9±2 ^{a,c}
	Fe	404 ± 54	527±118 ^a	469±127	658±141 ^{a,b}
Corazón	V	0,007±0,002	1,25±0,18 ^a	0,01±0,009	1,20±0,32
	Fe	340 ± 26	391±61	335±20 ^b	403±48 ^{a,c}
Femur	V	0,034±0,013	16±5 ^a	0,079 ± 0,016 ^{a,b}	20±7 ^{a,c}
	Fe	395± 4	500±8 ^a	850±263 ^{a,b}	844±316 ^{a,b}
Bazo	V	0,048 ± 0,007	0,19± 0,18	0,08±0,03	10±4
	Fe	3043±646	3440±924	3946±348 ^{a,b}	3885±420 ^{a,b}

Valores medios ± DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día).

^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^c Diferente del grupo DMg. P<0.05.

El tratamiento con vanadio a ratas control causa un incremento de los depósitos de Fe en el hígado y fémur, mientras que la deficiencia de Mg tiende a incrementar los depósitos de hierro en el bazo y en el fémur. La exposición a vanadio de las ratas deficientes en Mg agrava la situación generada por la deficiencia al incrementa los depósitos de hierro en el riñón e hígado, además de mantener los depósitos altos en el fémur y bazo (Tabla 15)

4.2.- Estudios realizados en ratas diabéticas STZ (como modelo de ratas con diabetes tipo I).

Tabla 16.- Cambios de peso a lo largo del periodo experimental (g).

Día	C	DM	DMV1	DMV3
0	200 ± 14	184 ± 7 ^a	187 ± 3 ^a	203 ± 1 ^{a,b,c}
7	219 ± 15	179 ± 30 ^a	193 ± 13 ^a	181 ± 11 ^a
14	241 ± 16	190 ± 40 ^a	193 ± 11 ^a	177 ± 12 ^{a,c}
21	255 ± 21	192 ± 40 ^a	193 ± 9 ^a	180 ± 12 ^{a,c}
28	288 ± 26	204 ± 24 ^a	184 ± 9 ^a	194 ± 17 ^a
35	296 ± 15	201 ± 11 ^a	181 ± 3 ^a	204 ± 8 ^{a,c}

Valores medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DM1. *P*<0.05.

La tabla 16 nos muestra la evolución de los cambios ponderales a lo largo del periodo experimental. La diabetes disminuye drásticamente la ganancia de

peso observada en los animales control. El tratamiento con 1 mgV/día ratas diabéticas da lugar a una pérdida de peso durante el periodo experimental, mientras que el tratamiento con 3mgV/día se comporta de manera semejante a las ratas diabéticas no tratadas apreciándose un ligero incremento de peso al final del estudio, cuando se compara con el grupo DMV1.

La tabla 17 muestra en las ratas del grupo control presentó una ingesta de alimentos sostenida sin cambios durante el periodo experimental. El grupo DM presento un aumento en la ingesta de alimentos a lo largo del periodo experimental. El grupo DMV1 en la primera semana del estudio presentaba una ingesta similar al grupo DM, pero a partir de la tercera semana mostró un descenso de la ingesta que se mantuvo hasta el final de periodo experimental, en comparación con las ratas diabéticas no tratadas. El grupo DMV3 mantuvo una ingesta continua y regular, de igual magnitud e incluso en algunas semanas, ligeramente menor que el grupo control.

El grupo control mantuvo a lo largo del periodo experimental una ingesta de agua sostenida (Tabla 18). Las ratas DM presentaron una mayor ingesta de agua, la cual se vio incrementada de manera significativa partir de la 3ª semana hasta finalizar nuestro estudio. El grupo de las ratas diabéticas tratadas con 1mg de V presento diferencias significativas con el grupo de ratas control durante todo el periodo experimental, comportándose de manera parecida al grupo de diabéticas aunque con ingestas medias ligeramente inferiores, que alcanzan

significación estadística en la 5ª semana. Las ratas diabéticas tratadas a altas dosis de V presentaron una ingesta de agua continua y sostenida a lo largo del periodo experimental, alcanzando valores semejantes al control y mostrando diferencias significativas con el resto de los grupos de ratas diabéticas.

Tabla 17.- Alimento ingerido a lo largo del periodo experimental (g/día)

Semana	C	DM	DMV1	DMV3
1	14,2 ± 4,0	25,8 ± 6,0 ^a	26,5 ± 3,9 ^a	10,2 ± 4,7 ^{b,c}
2	15,7 ± 2,0	30,7 ± 1,4 ^a	23,1 ± 9,4	10,7 ± 1,4 ^{ab,c}
3	16,6 ± 2,0	38,0 ± 3,4 ^a	16,8 ± 9,7 ^b	10,7 ± 1,4 ^{a,b}
4	16,6 ± 1,5	33,5 ± 2,0 ^a	19,6 ± 7,3 ^b	12,3 ± 1,0 ^{a,b}
5	15,0 ± 2,0	33,1 ± 2,4 ^a	26,9 ± 2,0 ^{a,b}	13,8 ± 1,1 ^{b,c}

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DM1. *P*<0.05.

Tabla 18 .- Agua ingerida a lo largo del periodo experimental (ml/día)

Semana	C	DM	DMV1	DMV3
1	17,1 ± 4,7	156 ± 53 ^a	167 ± 33 ^a	22,4 ± 15,2 ^{b,c}
2	19,6 ± 6,8	184 ± 46 ^a	214 ± 37 ^a	12,2 ± 5,2 ^{a,b,c}
3	16,3 ± 3,8	233 ± 57 ^a	186 ± 60 ^a	12,1 ± 5,9 ^{b,c}
4	17,6 ± 4,3	200 ± 43 ^a	181 ± 88 ^a	15,2 ± 8,1 ^{b,c}
5	16,6 ± 4,3	324 ± 36 ^a	191 ± 41 ^{a,b}	13,6 ± 7,2 ^{b,c}

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. *P*<0.05.

Tabla 19.- Diuresis (ml/día) y peso de las heces (g/día) durante la 5ª semana (días 28-35)

	C	DM	DMV1	DMV3
diuresis	8,1±3,7	203±31 ^a	199±54 ^a	13,7±2,3 ^{a,b,c}
heces	1,1±0,1	2,5±0,5 ^a	1,9±0,3 ^{a,b}	0,9±0,1 ^{b,c}

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^bDiferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P<0.05$.

Las ratas diabéticas presentan polidipsia, el tratamiento con 1mgV/día no logra normalizar el consumo de agua en ratas diabéticas, pero sí la dosis de 3mgV/día (Tabla 19). La diuresis y el peso de las heces siguen pautas semejantes a las observadas para las ingestas de alimento y agua (Tabla 19).

La tabla 20, muestra la ingesta de V de los grupos experimentales. Las ingestas de los grupos tratados son significativamente superiores a las observadas en el grupo control y diabéticas y reflejan la dosis recibida.

La tabla 21, muestra la ingesta de Fe de los grupos experimentales. Como era de esperar la ingesta del elemento sigue una evolución semejante a la ingesta de alimento, antes comentada.

La tabla 22 muestra la evolución de la glucemia en ayunas a lo largo del periodo experimental. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con 1 mg V/día a ratas diabéticas no modifica significativamente la glucemia durante los primeros 28 días. Sin embargo, en el día 35 los niveles de glucemia fueron significativamente superiores a los encontrados en las ratas diabéticas no tratadas. El tratamiento con 3 mg V/día, mantiene los valores de glucosa en niveles semejantes a los observados en las ratas control a partir de la primera semana de tratamiento.

Tabla 20.- Vanadio ingerido (mg/día) a lo largo del periodo experimental.

Semana	C	DM	DMV1	DMV3
1	0,00085±0,00023	0.0015±0.0003 ^a	1.11±0.08 ^{a,b}	2.39±1.56 ^{a,b}
2	0,00093±0,00011	0.0018±0.00008 ^a	1.07±0.11 ^{a,b}	3.12±1.22 ^{a,b,c}
3	0,00097±0,00012	0.002±0.001 ^a	1.08±0.13 ^a	3.01±1.13 ^{a,b,c}
4	0,00099±0,000087	0.002±0.0001 ^a	0.99±0.09 ^{a,b}	3.34±1.19 ^{a,b,c}
5	0,0009±0,00011	0.0019±0.0001 ^a	0.96±0.10 ^{a,b}	3.22±1.34 ^{a,b,c}

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. *P*<0.05.

Tabla 21.- Ingesta de Fe ($\mu\text{g}/\text{día}$) a lo largo del periodo experimental (5 semanas).

Semana	C	DM	DMV1	DMV3
1	632 \pm 177	1148 \pm 268 ^a	1178 \pm 173 ^a	455 \pm 207
2	699 \pm 86	1366 \pm 63 ^a	1028 \pm 420 ^a	477 \pm 61 ^{a,b,c}
3	739 \pm 90	1691 \pm 151 ^a	745 \pm 430 ^{a,b}	477 \pm 62 ^{a,b,c}
4	739 \pm 64	1491 \pm 89 ^a	872 \pm 325 ^b	547 \pm 45 ^{a,b,c}
5	667 \pm 88	1472 \pm 105 ^a	1196 \pm 89 ^{a,b}	614 \pm 50 ^{b,c}

Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

Tabla 22.- Glucemia en ayunas (mmol/l) durante el periodo experimental

Grupo	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
C	3,6 \pm 0,4	5,0 \pm 0,3	5,7 \pm 0,1	5,1 \pm 0,2	5,2 \pm 0,1	4,7 \pm 0,3
DM	7,9 \pm 1,3 ^a	13,9 \pm 2,1 ^a	13,6 \pm 1,1 ^a	14,3 \pm 1,9 ^a	14,2 \pm 2,0 ^a	14,6 \pm 1,2 ^a
DMV1	11,6 \pm 1,9 ^a	17,0 \pm 2,0 ^a	16,0 \pm 1,8 ^a	16,0 \pm 2,2 ^a	12,5 \pm 1,5 ^a	19,6 \pm 1,7 ^{a,b}
DMV3	9,4 \pm 1,2 ^a	5,0 \pm 0,3 ^{b,c}	4,7 \pm 0,1 ^{a,b,c}	5,4 \pm 0,3 ^{b,c}	5,1 \pm 0,3 ^{b,c}	5,3 \pm 0,3 ^{b,c}

Valores medios semanales (n = 9) \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

La tabla 23 muestra las glucemias al azar durante el mismo periodo. Se observa un comportamiento semejante al descrito para las glucemias en ayunas. La administración de 1mgV no modifica las glucemias en relación a las ratas

diabéticas, mientras que la dosis de 3mgV (grupo DMV3) produce un descenso significativo de los niveles de glucosa circulante cuando se compara con las ratas de los grupos DM y DMV1. No obstante, los valores encontrados son significativamente superiores a los observados en las ratas control.

La tabla 25 muestran los aspectos digestivos y metabólicos del Fe durante la última semana del periodo experimental. Se han encontrado niveles superiores de Fe ingerido en el grupo de ratas diabéticas no tratadas y diabéticas tratadas con 1mgV que en el resto de grupos estudiados.

Tabla 23.- Glucemia al azar (mmol/l) durante el periodo experimental.

Grupo	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
C	5,7±1,2	6,8±1,1	7,9±1,8	6,7±0,4	6,6±0,6	6,4±0,7
DM	24,6±8,7 ^a	30,18±4,7 ^a	33,3±0,0 ^a	24,8±10,6 ^a	33,3±0,0 ^a	33,3±0,0 ^a
DMV1	24,0±7,1 ^a	28,3±5,5 ^a	32,6±1,7 ^a	31,0±3,5 ^a	33,0±0,7 ^a	33,3±0,0 ^a
DMV3	14,7±3,6 ^{a,b,c}	14,9±9,8 ^{a,b,c}	10,5±4,7 ^{b,c}	11,4±4,7 ^{a,b,c}	15,0±6,0 ^{a,b,c}	10,1±2,5 ^{a,b,c}

Valores medios semanales (n = 9) ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. *P*<0.05.

Tabla 24.- Insulina sérica en el día 35 de tratamiento

	C	DM	DMV1	DMV3
Insulina sérica (ng/ml)	2,05±0,26	0,25±0,06 ^a	0,27±0,08 ^a	0,22±0,02 ^a

Valores medios semanales ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. *P*<0.05.

La excreción fecal de hierro se vio incrementada tanto por la diabetes como por el tratamiento con 1mgV/día. El grupo de ratas diabéticas tratadas con dosis de 3mgV mostró una excreción fecal de Fe semejante al grupo control e inferior a los otros dos grupos de ratas (DM y DMV1). La excreción urinaria de hierro se ve incrementada por la diabetes y por el tratamiento con 1mgV a ratas diabéticas. Sin embargo, el tratamiento con 3mgV produce un fuerte descenso de las pérdidas urinarias, pero sigue siendo superior al encontrado en las ratas control.

Tabla 25.- Utilización digestiva y metabólica del hierro en los días 28-35 del estudio.

	C	DM	DMV	DMVH
Fe Ingerido ($\mu\text{g}/\text{day}$)	668 \pm 88	1472 \pm 105 ^a	1196 \pm 89 ^{a,b}	614 \pm 50 ^{b,c}
Faecal ($\mu\text{g}/\text{day}$)	497 \pm 75	1219 \pm 106 ^a	888 \pm 50 ^{a,b}	430 \pm 78 ^{b,c}
Urinario ($\mu\text{g}/\text{day}$)	29 \pm 8	118 \pm 95 ^a	103 \pm 22 ^a	47,2 \pm 17,1 ^{a,b,c}
Absorbido ($\mu\text{g}/\text{day}$)	171 \pm 78	253 \pm 56 ^a	308 \pm 68 ^a	184 \pm 59 ^{b,c}
Absorción (%)	25,1 \pm 10,9	17 \pm 4	25,6 \pm 8,2	29,9 \pm 14,8 ^O
Retenido ($\mu\text{g}/\text{day}$)	142 \pm 79	134 \pm 52	205 \pm 66 ^b	137 \pm 64 ^c
% RI	21 \pm 11	9 \pm 4 ^a	17 \pm 5 ^b	22 \pm 14 ^b

Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

La diabetes incrementa el Fe absorbido, mientras que el tratamiento con 3mgV impide el incremento de la absorción producido por la diabetes dando lugar a un nivel de Fe absorbido semejante al grupo control. El tratamiento con

1mgV/día no modifica significativamente la absorción de Fe, en comparación con las ratas diabéticas no tratadas.

El tratamiento con 1mgV/d incrementa el Fe retenido cuando se comparan con las ratas diabéticas no tratadas. El tratamiento con 3mgV/d disminuye significativamente el Fe retenido cuando se compara con las ratas tratadas con 1mgV/d.

La diabetes disminuye el % de Fe retenido, mientras que el tratamiento con vanadio a las dos dosis estudiadas lo incrementa alcanzando valores semejantes a los encontrados en las ratas control.

Los niveles séricos de V muestran un aumento significativo en ratas diabéticas no tratadas (Tabla 26). Por otra parte, los resultados muestran que la diabetes ejerce una tendencia a aumentar los niveles séricos de Fe, incrementándose este efecto de manera significativa debido al tratamiento con BMOV a dosis de 1mgV/día. Sin embargo, el tratamiento de ratas diabéticas con dosis de 3mgV/día, restablece los niveles de Fe a los valores del grupo control.

Las ratas diabéticas no tratadas presentan un incremento de los niveles de transferrina. Las dos dosis de V ensayadas disminuyen los niveles de transferrina y ferritina e incrementan los de ALT y proteína C-reactiva (PCR), IL-6: Sin embargo, el factor de necrosis tumoral ($\text{TNF}\alpha$) solo aparece significativamente aumentado en el grupo DMV1.

En las ratas diabéticas se aprecia una tendencia a disminuir el nº de eritrocitos y hemoglobina (Hb) y un descenso significativo de la hemoglobina celular media (HCM) y el número de linfocitos. La ingesta de 3mgV/d disminuye significativamente la hemoglobina y los índices (HCM, VCM y CMHC), así como el nº total de leucocitos y de linfocitos. La diabetes tiende a disminuir el nº de plaquetas aunque las diferencias no son significativas (Tabla 26).

En la tabla 27 se exponen los pesos de los órganos al final del periodo experimental. Los resultados obtenidos muestran que la diabetes disminuye el peso del bazo y corazón e incrementa el del riñón. El tratamiento con vanadio a ambas dosis disminuye los pesos del bazo, fémur y corazón en relación a las ratas control, pero no se encuentran diferencias significativas cuando se comparan con las ratas diabéticas no tratadas. El tratamiento mantiene el peso del riñón en valores semejantes al de las ratas control (C) e inferiores al observado en las diabéticas (DM).

Tabla 26.- Parámetros bioquímicos y hematológicos en el día 35.

Groups	C	DM	DMV1	DMV3
Suero				
V ($\mu\text{g/L}$)	2,4 \pm 0,5	6,2 \pm 1,3 ^a	384 \pm 96 ^{a,b}	766 \pm 26 ^{a,b,c}
Fe (mg/L)	1,8 \pm 0,7	2.1 \pm 0,7	2.7 \pm 0,5 ^a	1.7 \pm 0,6 ^c
Transferrina (mg/mL)	6,1 \pm 3,3	9,5 \pm 2,0 ^a	3,5 \pm 0,5 ^{a,b}	3,6 \pm 0,5 ^{a,b}
Ferritina (ng/mL)	210 \pm 30	240 \pm 20	160 \pm 30 ^b	180 \pm 50 ^b
Alanina aminotransferasa (ALT) (U/L)	26,3 \pm 4,7	26,7 \pm 4,5	34,7 \pm 3,5 ^{a,b}	37,5 \pm 5,4 ^{a,b}
Proteína-C-reativa (PCR) (mg/L)	2,0 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3	5,9 \pm 0,8 ^{a,b}	5,3 \pm 1,2 ^{a,b}
Interleucina-1 β (pg/ml)	79 \pm 44	44 \pm 15	65 \pm 54	80 \pm 36
Interleucina-6(pg/ml)	127 \pm 69	59 \pm 22	139 \pm 51 ^b	240 \pm 78 ^{a, b,c}
Factor de necrosis tumoral α (TNF α) (pg/ml)	8,4 \pm 2,7	5,6 \pm 4,0	12,2 \pm 3,2 ^{a,b}	8,8 \pm 5,1
Sangre Total				
Eritrocitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	9,0 \pm 1,4	8,3 \pm 0,5	8,3 \pm 0,5	8,2 \pm 0,6
Hb (g/dL)	16,7 \pm 2,9	14,8 \pm 0,9	14,6 \pm 0,9	12,7 \pm 0,6 ^{a,b}
Hct (%)	47,4 \pm 8,7	44,5 \pm 2,2	44,7 \pm 2,8	42,8 \pm 3,0
VCM(fL)	54,5 \pm 0,6	53,6 \pm 1,3	53,0 \pm 1,7	52,1 \pm 1,7 ^a
HCM (pg)	18,5 \pm 0,5	17,8 \pm 0,8 ^a	17,4 \pm 0,3 ^a	15,5 \pm 0,6 ^{a,b,c}
CHCM (g/dl)	35,4 \pm 2,4	33,1 \pm 1,4	32,7 \pm 1,2 ^a	29,8 \pm 1,6 ^{a,b,c}
Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4,5 \pm 2,4	4,2 \pm 2,4	2,9 \pm 0,5 ^a	3,0 \pm 1,1 ^a
Linfocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4,3 \pm 1,8	2,6 \pm 1,5 ^a	1,9 \pm 0,4 ^a	1,6 \pm 0,7 ^a
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	718 \pm 269	513 \pm 121	646 \pm 122	594 \pm 316

Valores medios semanales (n = 9) \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. *P*<0.05. NS = No significativo

Tabla 27.- Peso de los órganos (g) al final del periodo experimental (día 35)

	C	DM	DMV1	DMV3
Bazo	0,56±0,10	0,43±0,10 ^a	0,34±0,14 ^a	0,42±0,10 ^a
Hígado	8,3±1,6	7,3±0,9	6,6±1,3 ^a	7,3±1,4
Riñón	0,9±0,1	1,0±0,1 ^a	0,9±0,2	0,8±0,1 ^b
Fémur	1,1±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2 ^a	0,9±0,1 ^a
Corazón	0,9±0,2	0,7±0,1 ^a	0,6±0,1 ^a	0,6±0,1 ^a

Valores medios semanales (n = 9) ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. *P*<0.05. NS = No significativo

Tabla 28.- Contenido en vanadio (µg ó mg/kg tejido seco) en los diferentes órganos estudiados al final del periodo experimental (día 35)

	C (µg/kg)	DM (µg/kg)	DMV1 (mg/kg)	DMV3 (mg/kg)
Riñón	121±23	205±103 ^a	13,0±2,3 ^{a,b}	33,5±5,3 ^{a,b,c}
Hígado	42,6±9,1	70,3±44,6	5,4±1,0 ^{a,b}	10,6±3,5 ^{a,b,c}
Bazo	47,9±7,5	99,5±45,3 ^a	4,7±2,1 ^{a,b}	14,2±4,0 ^{a,b,c}
Músculo	13,8±8,1	30,3±15,5 ^a	0,52±0,02 ^{a,b}	1,15±0,20 ^{a,b,c}
Corazón	7,2±1,9	23,0±14,5 ^a	0,72±0,08 ^{a,b}	1,70±0,54 ^{a,b,c}
Fémur	34,0±12,5	102±73 ^a	7,1±1,3 ^{a,b}	27,1±5,6 ^{a,b,c}
Tejido adiposo	7,1±5,5	35,0±21,4 ^a	0,66±0,18 ^{a,b}	0,25±0,14 ^{a,b,c}

Valores medios semanales (n = 9) ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. *P*<0.05. NS = No significativo

En general, los resultados obtenidos para el contenido de vanadio en los órganos y tejidos estudiados (riñón, hígado, bazo, musculo, corazón, fémur y tejido adiposo) (Tabla 28) muestran un aumento significativo del contenido de V tisular en ratas diabéticas en relación a las ratas sanas. El tratamiento con BMOV deriva en un incremento significativo de los niveles de V en todos los órganos estudiados. Este incremento es proporcional a la dosis suministrada. Sin embargo, el comportamiento encontrado en el tejido adiposo difiere del encontrado en el resto de tejidos, ya que en este caso, los mayores niveles de V se registran en el grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mgV/día.

Como se puede observar en la tabla 29, la diabetes produce un incremento de los niveles de Fe en riñón, musculo esquelético y tejido adiposo que el tratamiento con 3mg de BMOV/día logra restaurar hasta alcanzar niveles equiparables a los grupos control.

El estudio del hígado muestra una fuerte relación entre los niveles de Fe y los de V, encontrándose incrementos significativos del contenido hepático de Fe en los grupos de ratas tratados con V, con tendencia a incrementar con la dosis. En el bazo la diabetes produce una fuerte reducción del contenido de hierro que se recupera con el tratamiento. De modo que la dosis de 3mgV/día da lugar a un depósito de Fe esplénico superior al encontrado en las ratas control. En el corazón, el tratamiento con BMOV muestra una tendencia a aumentar el contenido de Fe especialmente en el caso del tratamiento con la alta dosis de V.

El fémur se muestra como el órgano mas afectado por la diabetes, encontrándose que el tratamiento no corrige el efecto de la diabetes, sino que ejerce un efecto potenciador de la formación de depósitos de Fe en el tejido óseo (Tabla 12).

Tabla 29.- Contenido en hierro (mg/kg tejido seco) en los diferentes órganos estudiados al final del periodo experimental (día 35)

	C	DM	DMV1	DMV3
Riñón	255 ± 43	359 ± 74 ^a	299 ± 51	290 ± 53
Hígado	404 ± 54	428 ± 65	505 ± 82 ^{a,b}	530 ± 73 ^{a,b}
Bazo	3043 ± 646	1849 ± 718 ^a	2410 ± 670	3918 ± 671 ^{a,b,c}
Músculo	50 ± 14	68 ± 19 ^a	70 ± 14 ^a	46 ± 5 ^{b,c}
Corazón	340 ± 26	353 ± 56	356 ± 44	420 ± 46 ^{a,b,c}
Fémur	40 ± 4	61 ± 4 ^a	69 ± 6 ^{a,b}	64 ± 19 ^a

Valores medios semanales (n = 9) ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. P<0.05. NS = No significativo

En la tabla 30 se muestran los resultados obtenidos para la capacidad total antioxidante (TAS), diversas enzimas que participan en la defensa oxidativa (GPx, GR, GST, SOD, CAT y NQO1) y los niveles de MDA (malondialdehyde) y oxidación proteica (grupos carbonilo) en el hígado. La diabetes disminuye la capacidad total antioxidante sérica y la actividad de la GST y CAT, incrementa la actividad de la GPx y NQO1 y no modifica significativamente el resto de parámetros estudiados.

El tratamiento mantiene los niveles de TAS en valores inferiores a las ratas control y semejantes a los encontrados en las ratas diabéticas no tratadas. Disminuye la actividad de la GPx, GST y NQO1 e incrementa la actividad de la CAT y los niveles hepáticos de peroxidación lipídica (MDA) y oxidación proteica (grupos carbonilo). Además el tratamiento tiende a incrementar ligeramente la actividad de la SOD. Ni la diabetes ni el tratamiento modifican la actividad de la GR.

Tabla 30.- Estado total antioxidante del suero (TAS mmol/L), actividad de la Glutacion peroxidasa (GPx), Glutacion reductasa (GR), Glutacion transferasa (GST), Superoxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I (NQO1) (mU/mg proteína), niveles de MDA (malondialdehido, nmol/g hígado) y grupos carbonilo (pm/mg proteína) en el hígado de las ratas en el día 35.

	C	DM	DMV1	DMV3
TAS	1,29±0,08	0,91±0,23 ^a	0,95±0,19 ^a	0,86 ± 0,26 ^a
GPx	631± 132	1150±100 ^a	868±146 ^{a,b}	435±158 ^{a,b,c}
GR	33,7±8,4	33,3±1,5	33,3±2,0	32,2±2,6
GST	281±24	246±18 ^a	220±17 ^a	209±18,2 ^{a,b}
SOD	685 ± 81	672 ± 83	743 ± 74	718 ± 70
CAT	389 ± 97	295 ± 29 ^a	402 ± 76 ^b	733 ± 73 ^{a,b,c}
NQO1	173 ± 72	269 ± 87 ^a	242 ± 59	155 ± 57 ^{b,c}
MDA	48 ± 11	42 ± 8	49 ± 5	64 ± 9 ^{a,b,c}
Grupos Carbonilo	134 ± 33	130 ± 38	196 ± 40 ^{a,b}	186 ± 21 ^{a,b}

Valores medios semanales (n = 9) ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). a Diferente del grupo C; b Diferente del grupo DM; c Diferente del grupo DMV1. P<0.05.

5.DISCUSIÓN

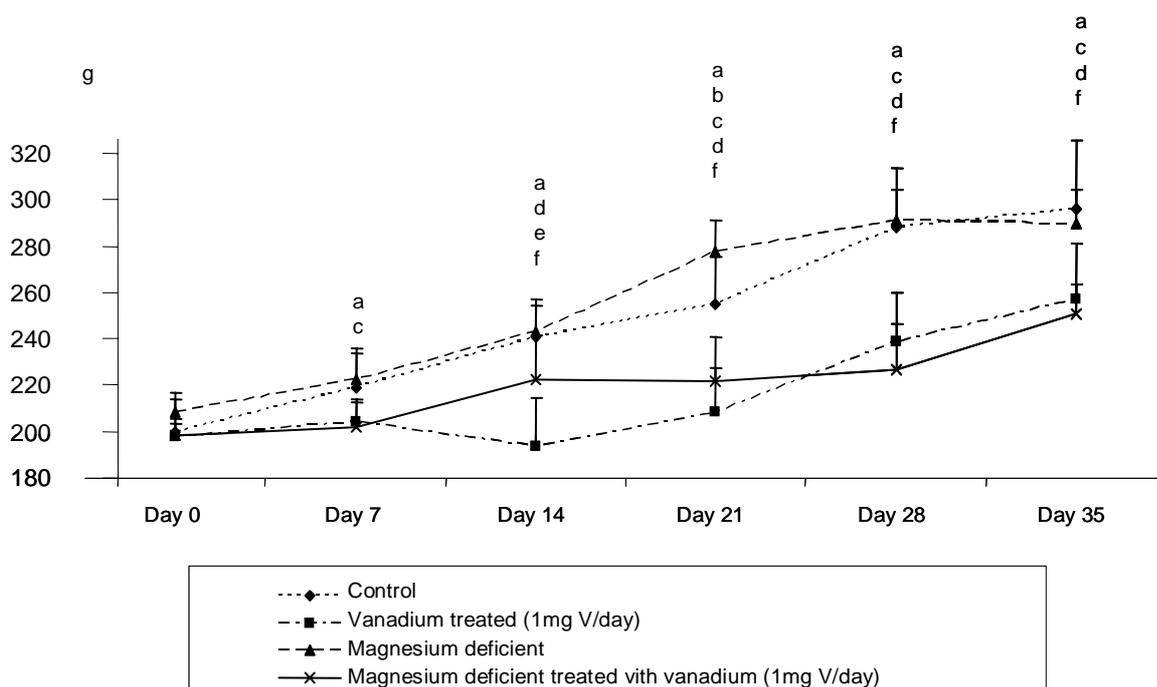
5.1.- Estudios realizados en ratas deficientes en Mg (ratas resistentes a la insulina).

El objetivo de este apartado fue examinar los efectos del tratamiento con BMOV sobre la glucemia y el metabolismo del Fe en ratas deficientes en Mg. Considerando las ratas deficientes en Mg como un modelo de prediabetes.

La dosis de vanadio usada en este estudio (6.22 mg bis(maltolato)oxovanadio (IV)/día o ~ 0.6 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV)/ml, que suministran 1mg vanadio/día o ~ 5mg vanadio/kg peso corporal/día) es superior a la menor dosis descrita que causa efectos adversos en ratas (0.8mgV/kg peso/día). Sin embargo, es una dosis baja comparada con la utilizada por otros autores (72, 78 177, 178) y mucho menor que la LD50 (40-90 mgV/kg peso/día) (179). No obstante dicha dosis fue elegida basándonos en antecedentes bibliográficos. Es una dosis intermedia de las ensayadas por (180) (0.5 to 0.75 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /mL) con las que no observa efectos tóxicos en ratas diabéticas STZ. En todos los casos los compuestos de V se suministraban en el agua de bebida. En nuestro estudio si se ha observado la presencia de problemas gastrointestinales en 2 animales de cada grupo tratado con vanadio que fueron retirados. Estos desordenes gastrointestinales también han sido observados en anteriores publicaciones (178) usando ~9.5 mg vanadio/Kg peso/día en ratas Wistar sanas.

5.1.1.- Sobre los cambios ponderales e ingesta de dieta y agua.

En nuestro trabajo hemos observado que las curvas de crecimiento de las ratas control y deficientes en Mg no difieren significativamente. Este hecho también ha sido descrito por otros autores empleando la misma dieta AIN-93M (169), con un contenido similar de Mg (181).



Evolución del peso medio. (a) control vs tratadas con V; (b) control vs deficientes en Mg; (c) control vs deficientes en Mg tratadas con V; (d) Tratadas con V vs deficientes en Mg; (e) tratadas con V vs deficientes en Mg tratadas con V; (f) deficientes en Mg vs deficientes en mMg tratadas con V. $P < 0.05$

El tratamiento con 1mg vanadio/día (como bis(maltolato)oxovanadium (IV)) a ratas sanas produce una menor ganancia de peso (Tabla 1; Figura 1).

En nuestro estudio también hemos observado que la corrección del HOMA-IR (Modelo homeostático para la valoración de la resistencia a la insulina) (Tabla 10) en las ratas tratadas con vanadio que ingieren la dieta Mg-deficiente, no va acompañado de una corrección de la curva de ganancia de peso, aunque en la última semana de estudio la ingesta de alimento en todos los grupos estudiados fue semejante (Tabla 2).

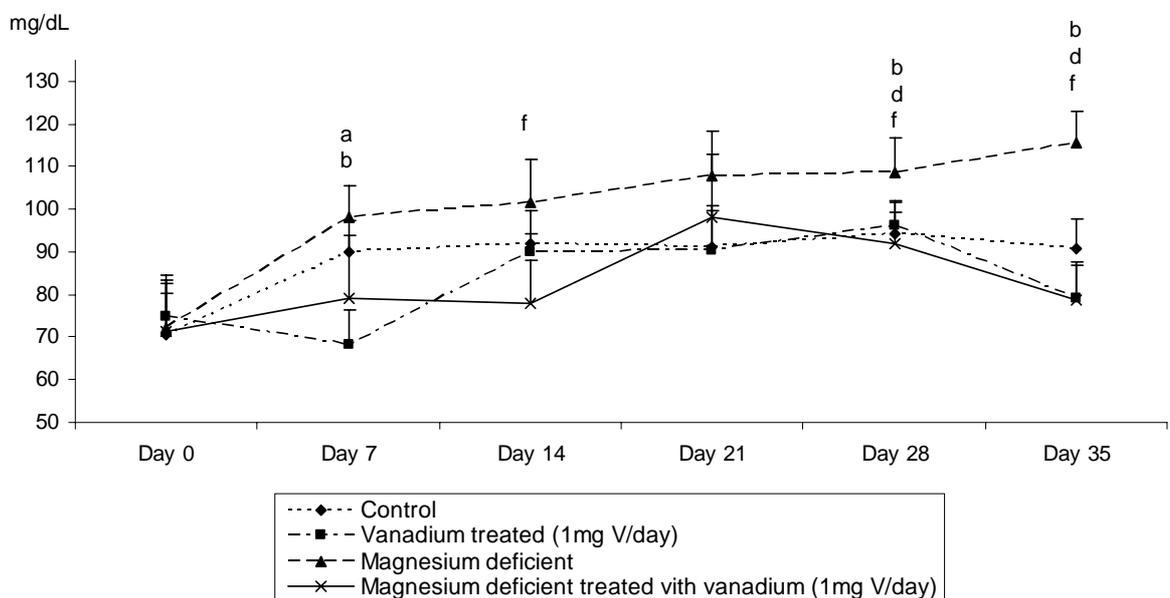
Además, tampoco hemos encontrado correlaciones significativas entre los cambios de peso y HOMA-IR ($r=0.34$; $p>0.05$), aunque si se ha observado una correlación inversa ($r=-0.44$; $p<0.01$) entre los cambios de peso y la ingesta de vanadio (Tabla. 6). Los hechos descritos nos conducen a pensar que el tratamiento con vanadio es el único factor responsable para explicar la menor ganancia de peso encontrada entre estos grupos (182) y que, en el presente estudio, dichas pérdidas de peso no se encuentren relacionadas con la normalización del HOMA-IR (Tabla 10) encontrada en las ratas deficientes tratadas.

La evolución de la ingesta de alimento en los diferentes grupos experimentales a lo largo del periodo de estudio, se muestra en la tabla 2. En ella podemos observar que el tratamiento con vanadio, en términos generales, no afecta de modo importante la ingesta de alimento. Sin embargo, la ingesta de vanadio produce un claro descenso de la ingesta de agua (Tabla 3). El efecto del vanadio deprimiendo la ingesta de agua ha sido descrito en anteriores

publicaciones (79). El volumen de heces y orina excretados (Tabla 4), sigue los mismos patrones que la ingesta de alimentos y agua. No se aprecian diferencias significativas en la excreción fecal entre los distintos grupos experimentales, mientras que los animales tratados con vanadio presentan una diuresis netamente inferior a los grupos no tratados.

5.1.2.- Sobre los niveles circulantes de glucosa en ayunas, insulina sérica e índice HOMA-IR.

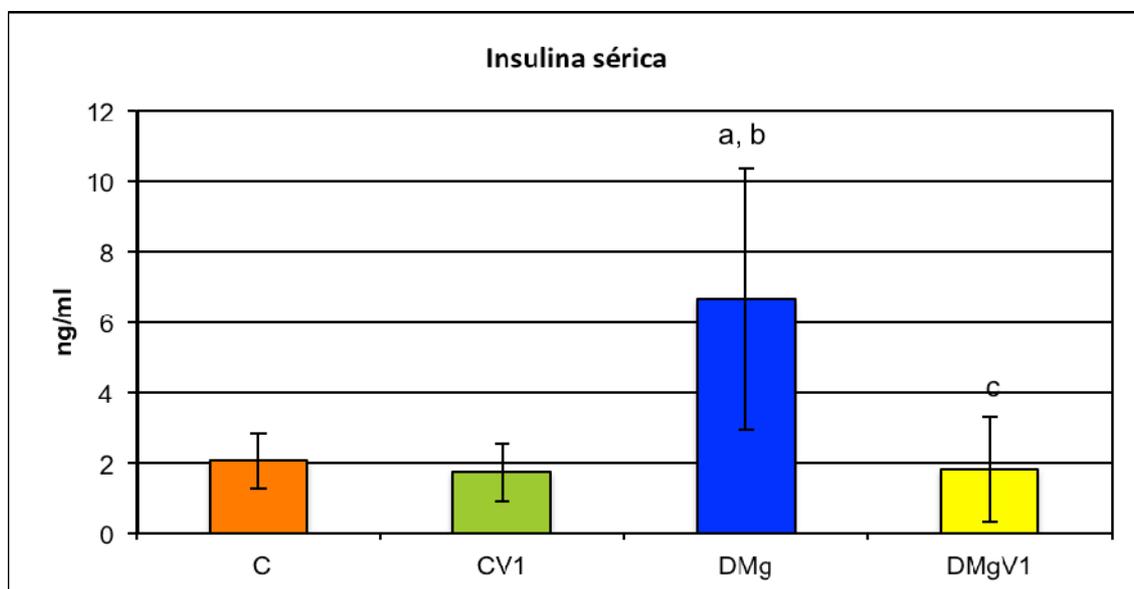
Estudios epidemiológicos e investigaciones clínicas sugieren que los bajos niveles séricos de magnesio se encuentran asociados con resistencia a la insulina y un incremento del riesgo de padecer diabetes tipo II (183-190), y la suplementación con magnesio mejora la sensibilidad a la insulina en pacientes diabéticos tipo II con bajos niveles séricos de magnesio (191).



Glucemia en ayunas a lo largo del periodo experimental. (a) control vs tratadas con V; (b) control vs deficientes en Mg; (c) control vs deficientes en Mg tratadas con V; (d) Tratadas con V vs deficientes en Mg; (e) tratadas con V vs deficientes en Mg tratadas con V; (f) deficientes en Mg vs deficientes en mMg tratadas con V. P< 0.05

Se ha sugerido, como posible mecanismo, que la reducción de la concentración intracelular de Mg incrementa la concentración intracelular de Ca (163, 192, 193), el cual disminuye la actividad de la tirosin-kinasa del receptor de la insulina (194). Además, también se ha puesto de manifiesto que la deficiencia de Mg incrementa la síntesis de de citocinas ocasionando un efecto proinflamatorio (195) y que las citocinas proinflamatorias pueden inducir resistencia a la insulina al inhibir la fosforilación de la IRS1 (196).

En nuestro estudio, la ingesta de una dieta deficiente en Mg (Tabla 5) produce hipomagnesemia (Tabla 8) que va acompañada de un incremento significativo de la glucemia (Figura 2) y de los niveles séricos de insulina.

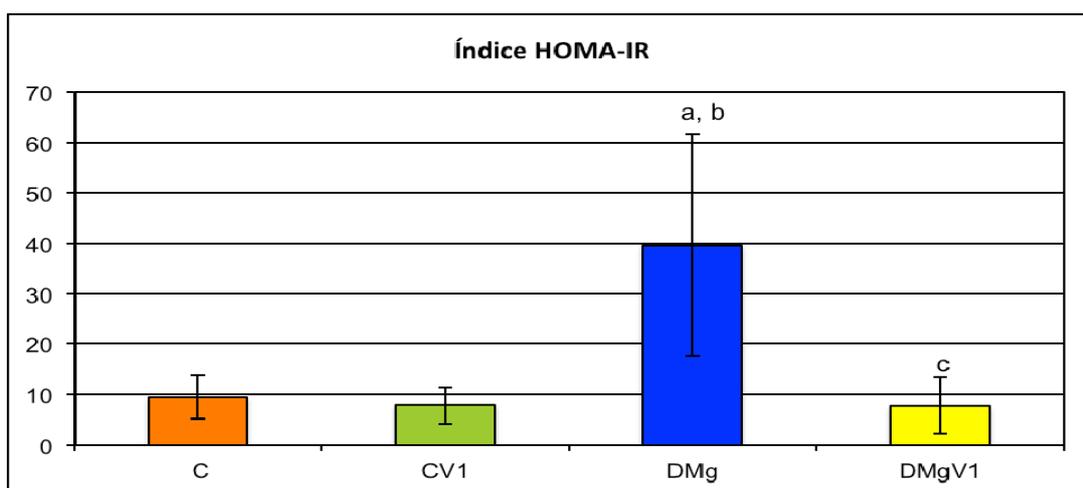


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Estudios realizados “*in vitro e in vivo*” han puesto de manifiesto que la deficiencia de magnesio deteriora la secreción de insulina y que la suplementación con magnesio previene el desarrollo de diabetes (197, 198).

El déficit intracelular de Mg reduce la captación de glucosa al interferir con la translocación del transportador de glucosa [GLUT 4]. La depleción intracelular de magnesio también reduce la utilización de la glucosa, ya que es un elemento activador de diversas enzimas que participan en la glucólisis (199). Además, la reducción del Mg intracelular promueve desordenes en la actividad de la tirosina kinasa en el receptor de la insulina (194). Todos estos eventos se encuentran relacionados con el desarrollo de la resistencia a la insulina.

El incremento del índice HOMA-IR en las ratas deficientes en Mg confirma la existencia de un incremento de la resistencia a la insulina entre estos animales (Tabla 10).



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Además la correlación inversa encontrada entre ingesta de magnesio y glucosa sérica ($r=-0.46$; $p<0.01$), insulina sérica ($r=-0.50$; $p<0.01$) y el índice HOMA-IR ($r=-0.50$; $p<0.01$) soportan los comentarios anteriores.

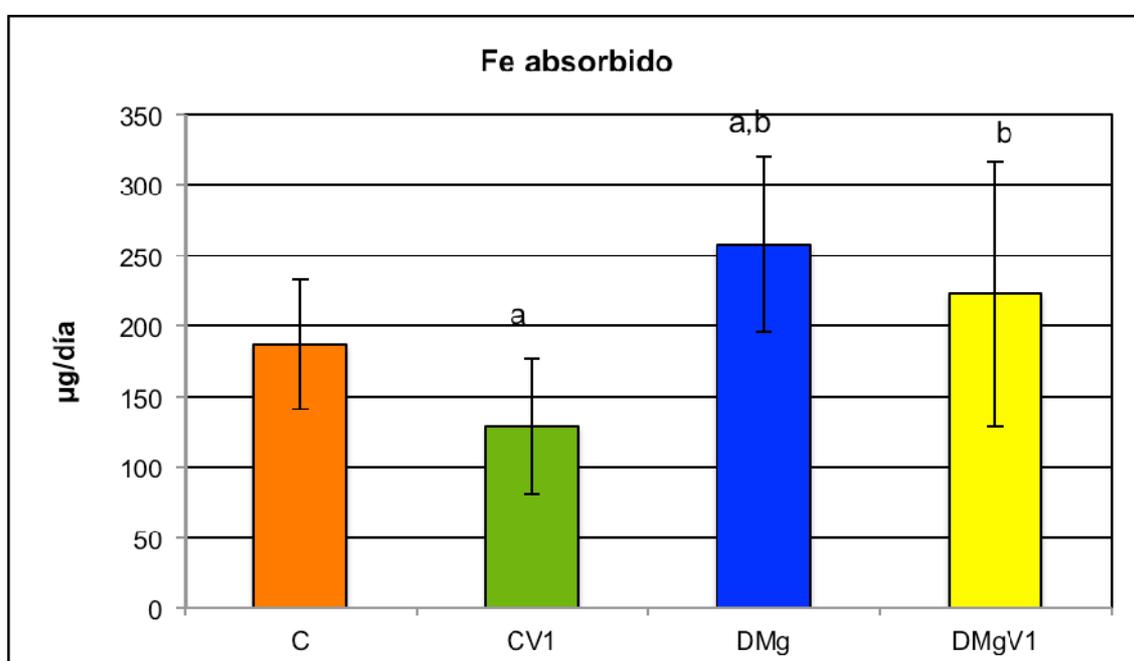
Es conocido que el vanadio es un elemento traza asociado a la regulación del metabolismo de la glucosa, mejorando su transporte y metabolismo e incrementando la sensibilidad del receptor de la insulina (200).

Nuestros resultados confirman dichos hallazgos, ya que muestran que el tratamiento con vanadio a ratas que ingieren la dieta deficiente en Mg mantienen los niveles de glucosa, insulina y el índice HOMA-IR (Figura 2; Tabla 9 y Tabla 10), en valores semejantes a los encontrados en las ratas control.

En este caso, también las correlaciones lineales negativas observadas entre ingesta de vanadio y niveles de glucosa, insulina sérica y HOMA-IR ($r=-0.463$; $r=-0.501$; and $r=-0.514$; respectivamente $p<0.01$ en todos los casos) soportan los resultados comentados.

5.1.3.- Sobre la utilización digestiva y metabólica del hierro.

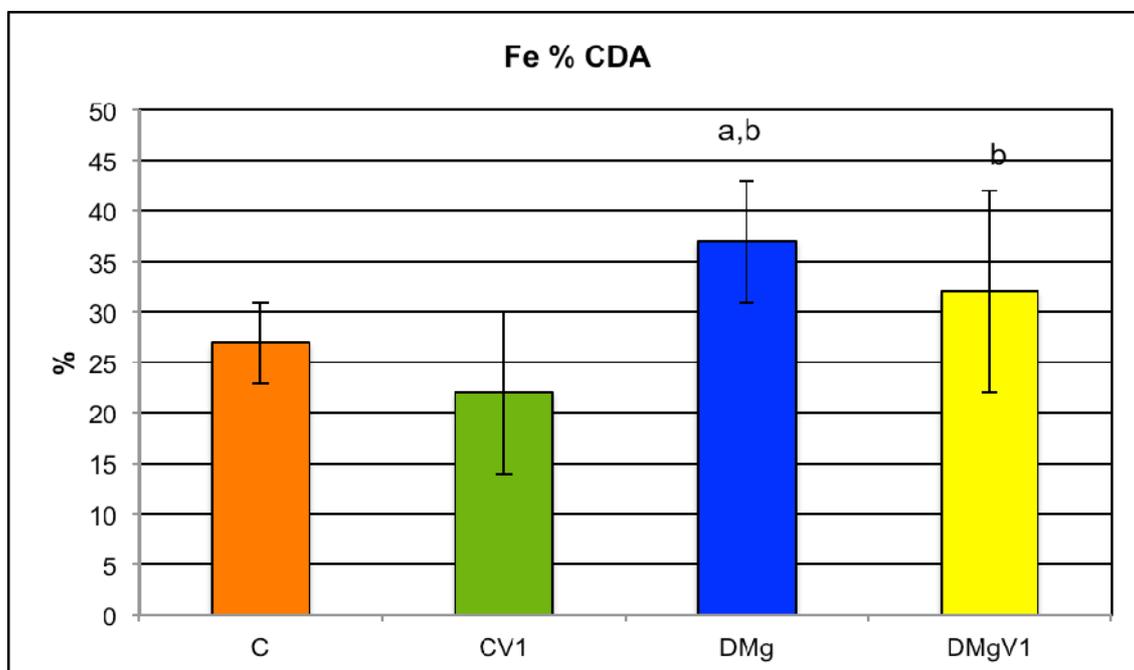
La absorción y retención de hierro en los animales controles (Tablas 11 y 12) son inferiores a los observados en trabajos anteriores de nuestro grupo (157). El tratamiento con vanadio a ratas control produce un descenso significativo del Fe absorbido.



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

En nuestra opinión dicho descenso es consecuencia del ligero descenso (no significativo) de la ingesta observada en este grupo y no a la presencia de interacciones entre ambos elementos, como lo pone de manifiesto que cuando expresamos la absorción como % (CDA) no se encuentran diferencias

significativas entre ambos grupos. Por tanto, podemos decir que a nivel digestivo el tratamiento no modifica la absorción de Fe.



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

En nuestras condiciones experimentales observamos un incremento de la absorción de Fe en las ratas deficientes en Mg (Tabla 11). Este hecho, que también ha sido descrito en anteriores publicaciones nuestras (157), podría deberse a interacciones entre ambos elementos a nivel intestinal ya que se ha encontrado que el Fe también puede ser transportado por el antiporte $\text{Na}^+ / \text{Mg}^{2+}$ (161). Además de por los factores intramucosales, la absorción de Fe también puede verse afectada por factores somáticos. Es conocido que la deficiencia de Mg produce eritrocitos más frágiles y la hemólisis al incrementar el daño oxidativo. Nuestros resultados muestran pequeños descensos del nº de eritrocitos

y hemoglobina que se traducen en un descenso significativo de la hemoglobina celular media (Tabla 15). Este pequeño incremento de la destrucción de eritrocitos podría estimularía la absorción de hierro.

El tratamiento con vanadio a ratas que ingieren una dieta deficiente en Mg, no modifica significativamente los cambios observados en las ratas deficientes en Mg, aunque se observa una ligera reducción de la absorción de Fe. No obstante, en este grupo de animales la absorción de Fe se mantiene en valores superiores a las ratas control y control tratadas (Tabla 11). Podemos decir que el efecto que el tratamiento ejerce un efecto mucho menor en las ratas deficientes en Mg que en las ratas control.

La retención del catión viene determinada por la diferencia entre la ingesta y la suma de las pérdidas fecales y urinarias. El tratamiento con vanadio a ratas sanas produce un ligero descenso del Fe retenido como consecuencia de la pequeña caída de la ingesta que produce el vanadio en estas ratas. Ninguno de los cambios expuestos alcanza significación estadística (Tabla 12).

Las ratas que ingieren la dieta deficiente en Mg presentan una retención de Fe significativamente superior a la de las ratas control. Este incremento se justifica por la mayor absorción y por un descenso de las pérdidas urinarias. En estudios previos, nuestro grupo, ha puesto de manifiesto que el déficit nutricional de Mg reduce la excreción renal de Fe (157) y otros iones (156, 158). El

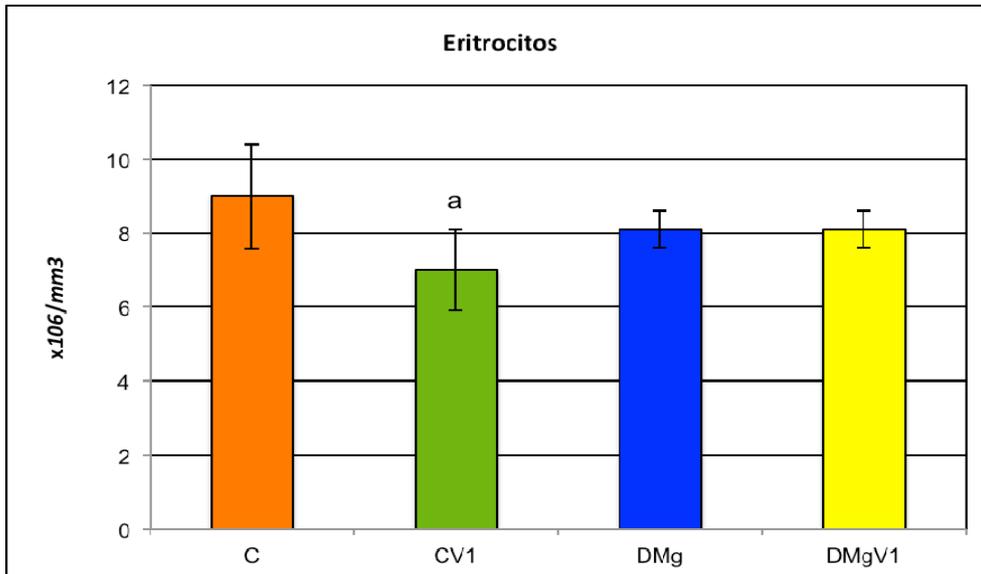
tratamiento con vanadio a las ratas deficientes en Mg, aunque tiende a incrementar las pérdidas urinarias del catión, no modifica significativamente la retención de Fe que permanece en valores significativamente mayores a los de las ratas control y tratadas con controles tratadas (Tablas 11 y 12). Los porcentajes de Fe retenido en relación al ingerido en los cuatro grupos experimentales, muestran un patrón semejante a los expuestos para el CDA.

5.1.4.- Sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos.

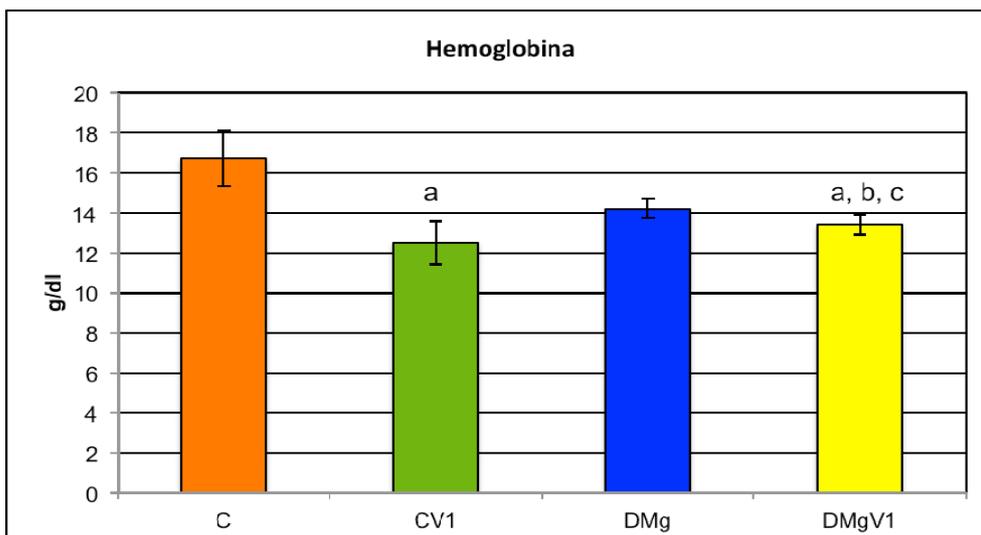
No existe un acuerdo definitivo sobre los cambios hematológicos producidos por el vanadio en ratas sanas. Algunos autores han observado descensos en esos valores (79, 201), mientras que otros usando altas dosis de BMOV (9.2 mg V per kg per 24 h) durante un largo periodo de tiempo (12 semanas), no han encontrado cambios (202). Todas estas diferencias podrían deberse a los diferentes compuestos de vanadio ensayados, las distintas dosis empleadas o a los distintos tiempos de duración de los ensayos. Algunos autores (79, 201) han sugerido que el V produce cambios peroxidativos en la membrana del eritrocito ocasionando una reducción de la capacidad para deformarse y facilitando la hemolisis. Estos mismos autores también se ha sugerido que este elemento causa desordenes en la eritropoyesis y maduración del eritrocito.

En nuestro estudio, la exposición de animales sanos al BMVO, condujo a una reducción significativa del número de eritrocitos y hemoglobina sin que se

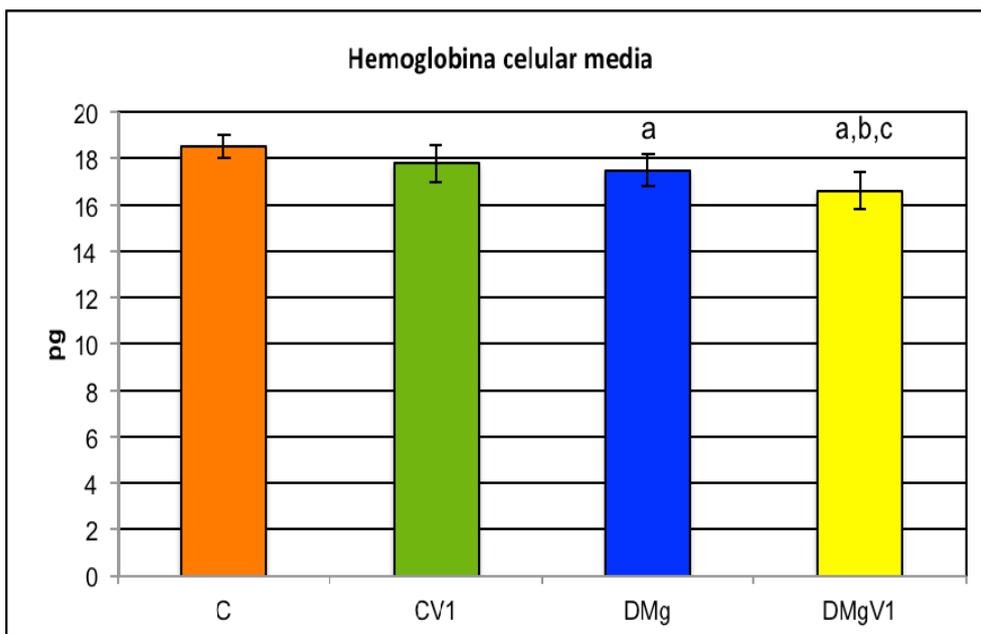
modifique la HCM (Tabla 14). La reducción en estos parámetros, en nuestra opinión posiblemente debida a un incremento de la hemólisis, ya que a nivel metabólico no se aprecia un incremento de la retención del catión (Tabla 12)



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

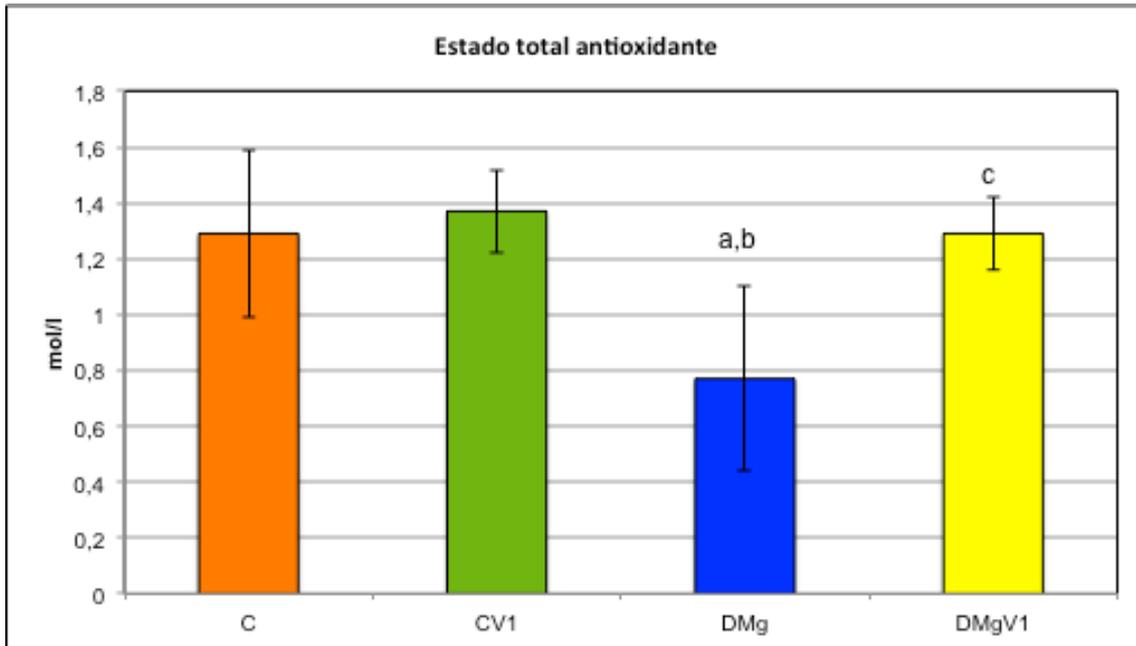


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.



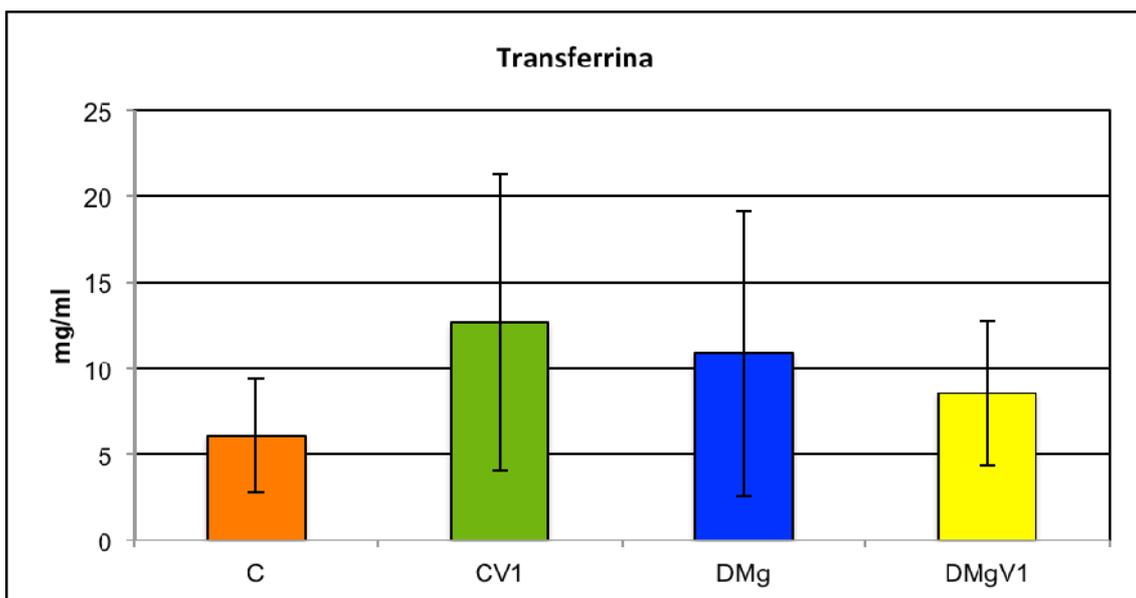
Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

La ingesta de la dieta deficiente en Mg, solo redujo ligeramente ambos parámetros (eritrocitos y Hb) sin llegar a alcanzar significación estadística. No obstante, la deficiencia de Mg aparece acompañada de una caída en la HCM (Tabla 14). Estos resultados presentan la misma tendencia, aunque no coinciden exactamente, con los obtenidos en un trabajo anterior con ratas deficientes en Mg (157). Se ha descrito que la deficiencia de Mg incrementa la fragilidad y destrucción de los eritrocitos (203). Nuestro grupo ha observado que la deficiencia de Mg altera la composición lipídica de la membrana (162) y produce una sobrecarga de hierro intraeritrocitario (157) que estimularía la peroxidación lipídica de las membranas y favorecería la hemólisis (58). El descenso del estado total antioxidante del suero (Tabla 14) avala la hipótesis de la existencia de un proceso hemolítico (Tabla 14).

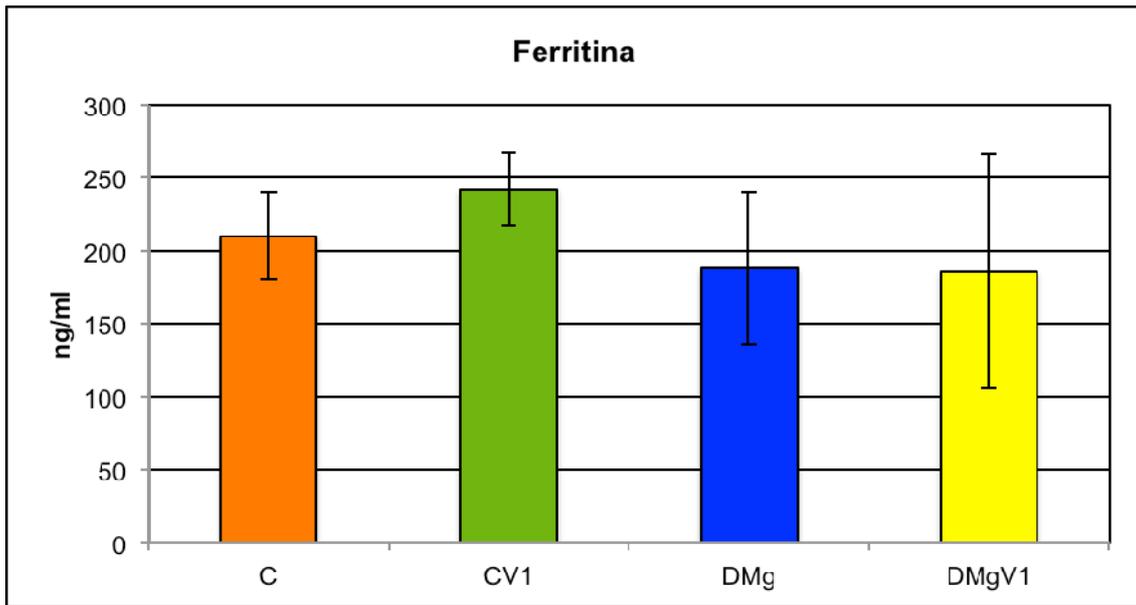


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

A pesar de los comentarios anteriores, los cambios hematológicos, la tendencia a incrementar de la transferrina y el descenso de la ferritina (Tabla 14), apuntan también a un proceso anémico por deficiencia de hierro.

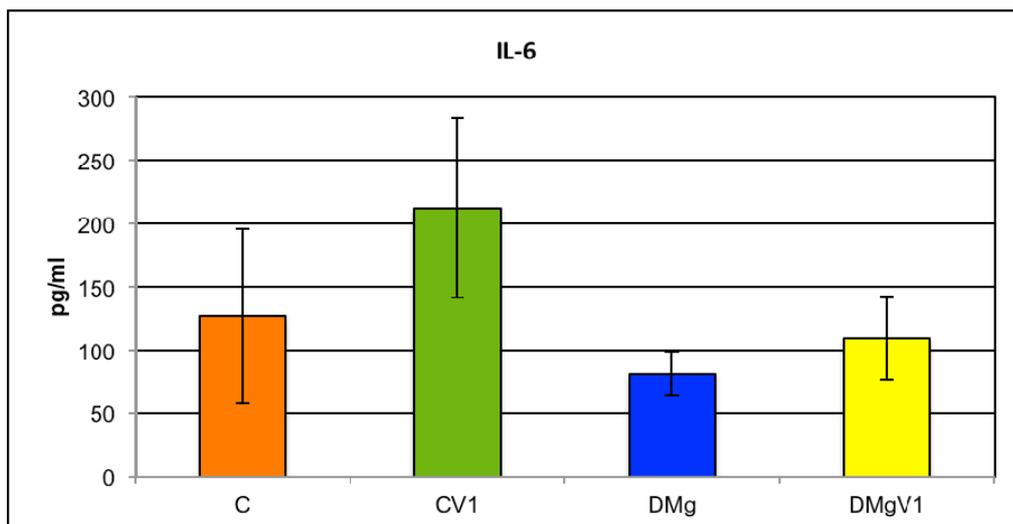


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.



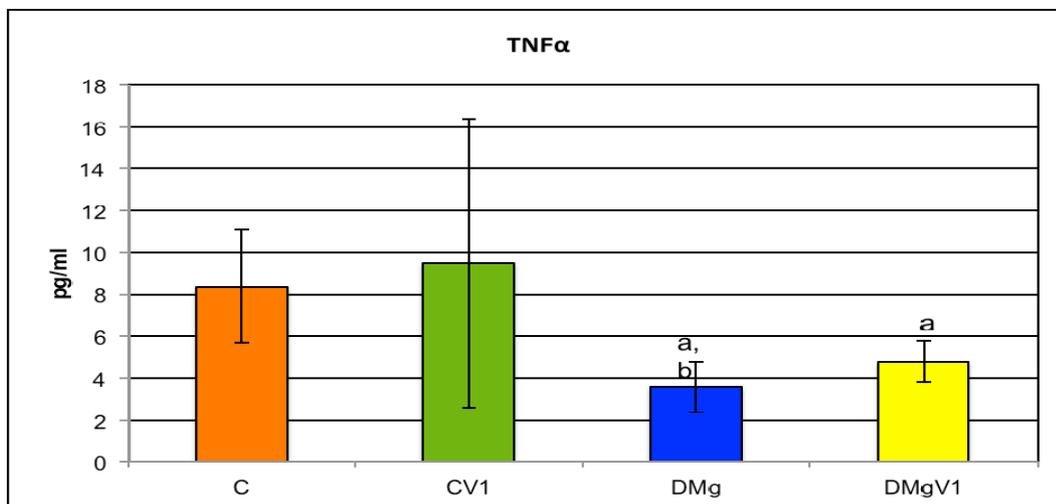
Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Además, se ha sugerido que la elevación de la citokina proinflamatoria IL-6 se encuentra asociada con la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 (204), y que la deficiencia de Mg incrementa la síntesis de de citokinas ocasionando un efecto proinflamatorio (195) que actuaría inhibiendo eritropoyesis.



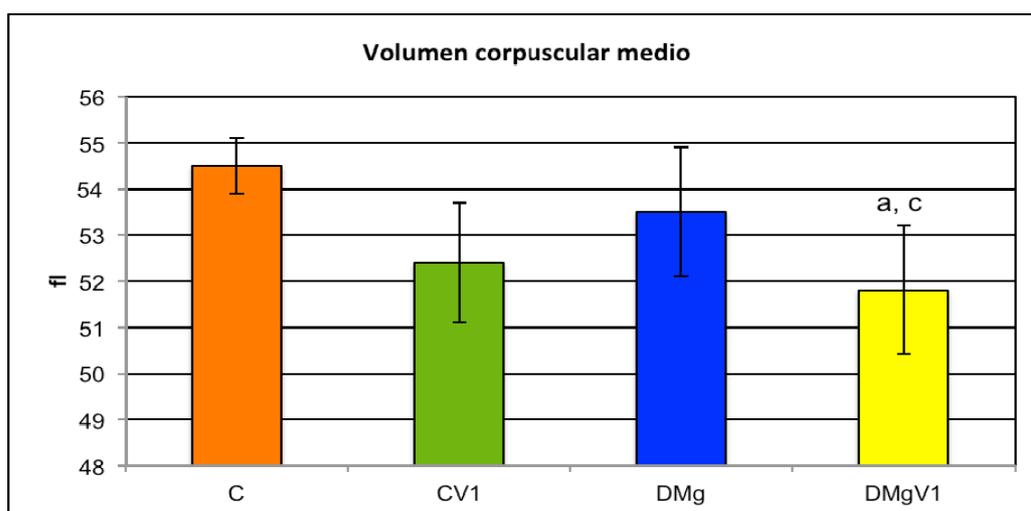
Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Nuestros resultados no avalan dicha hipótesis ya que los marcadores de inflamación determinados no muestran cambios significativos o presentan descensos significativos como en el caso del TNF α .



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

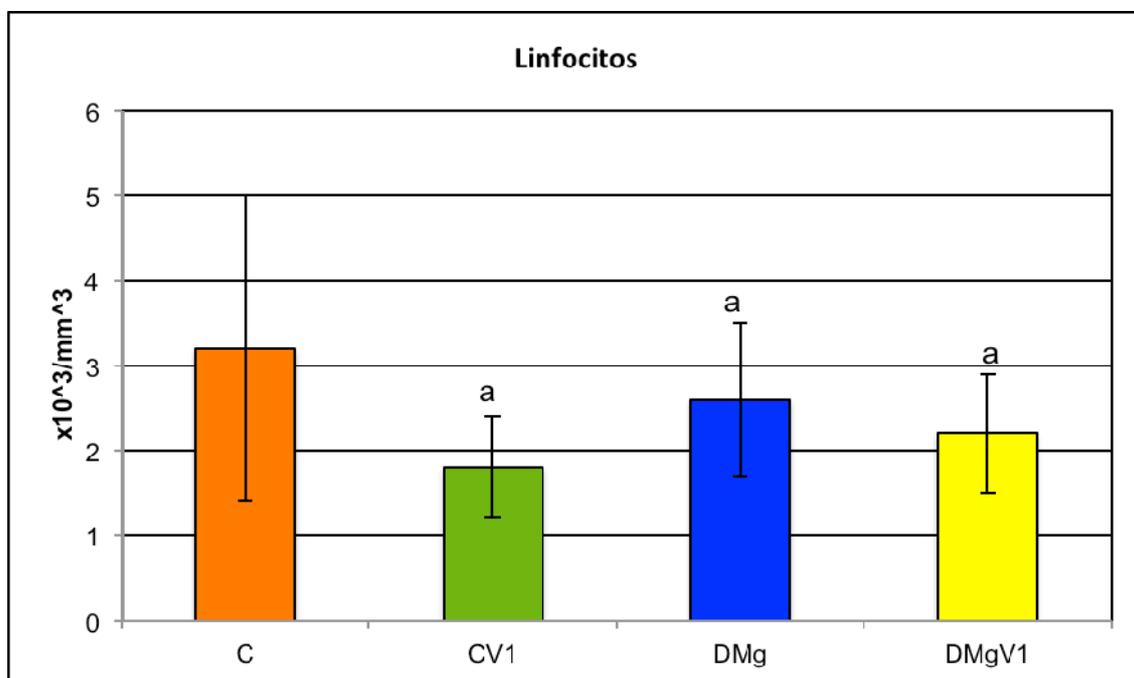
El tratamiento con V a ratas que ingieren la dieta deficiente en Mg, aunque no modifica significativamente el n $^{\circ}$ de eritrocitos, muestra un descenso significativo del contenido de hemoglobina, VCM y HCM.



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Estos resultados indican la existencia de un efecto conjunto de la deficiencia de magnesio y vanadio potenciando la hemólisis. Sin embargo, como en el caso de las ratas deficientes en magnesio no tratadas, los cambios hematológicos, apoyan también la presencia de un proceso ferropénico (Tabla 14). Además, diversos autores han puesto de manifiesto que el vanadio produce desordenes en la eritropoyesis y maduración del eritrocito (79, 201, 205, 206).

El descenso del número de linfocitos parece ser la principal causa de la leucopenia provocada por el tratamiento a ratas sanas (Tabla 14). Sin embargo, no existe consenso en relación al efecto del vanadio sobre el número de leucocitos (79, 177; 201).

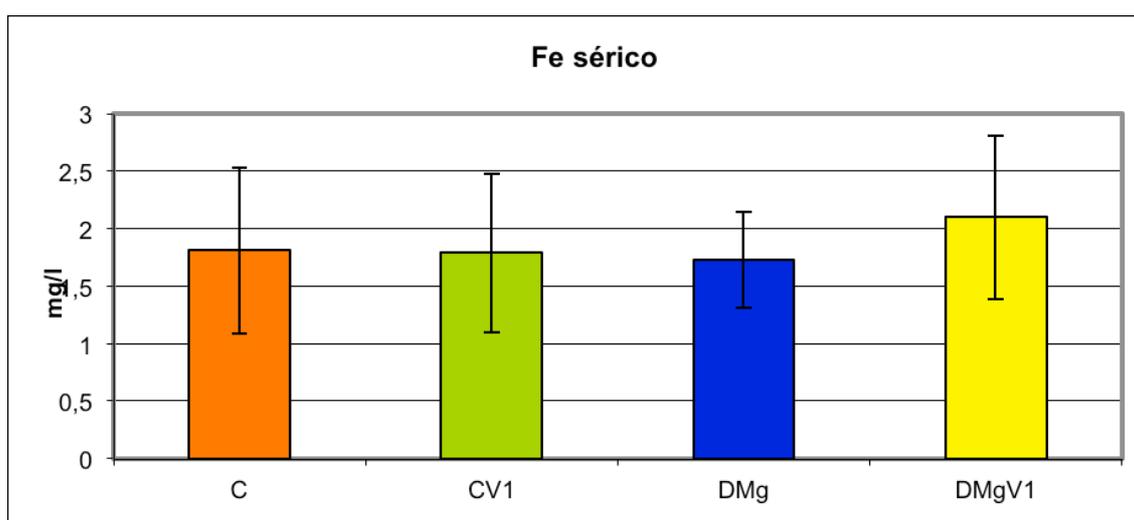


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

La ingesta de la dieta deficiente no afecta significativamente el número de leucocitos, pero si disminuye el de linfocitos. Estos resultados contradicen los obtenidos en una publicación anterior en la que observamos que la deficiencia de Mg inducía un incremento del nº de leucocitos (157).

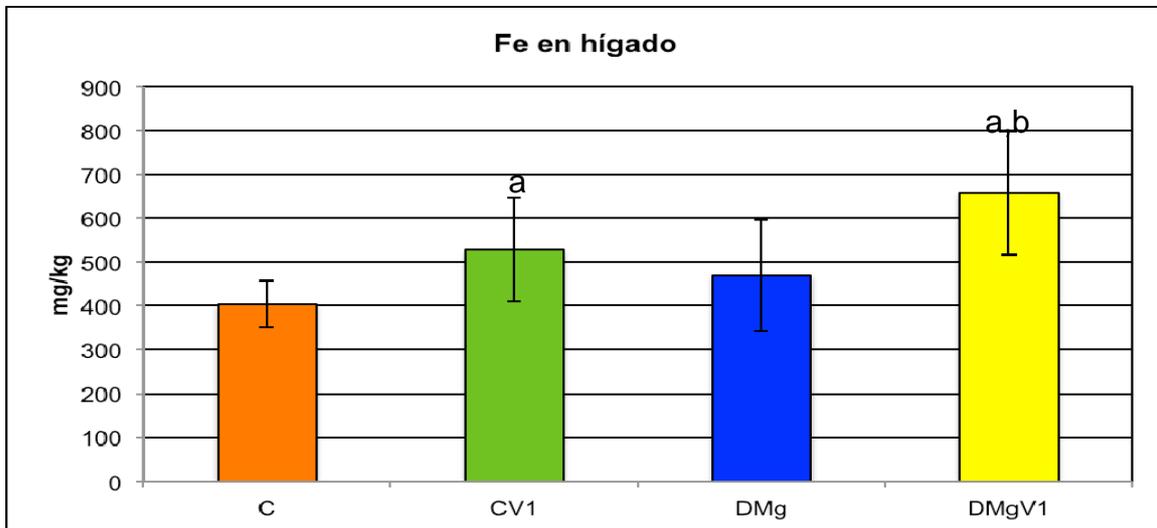
5.1.5.- Sobre el contenido de Fe en suero y tejidos.

Ni el tratamiento ni la deficiencia modifica significativamente el contenido sérico de Fe (Tabla 8), esta situación indicaría que la mayor absorción y retención causada por la ingesta de la dieta deficiente en Mg (Tablas 11 y 12) no queda reflejada a nivel sérico. No obstante, se aprecia una tendencia a aumentar en las ratas deficientes tratadas. Sin embargo, en un trabajo anterior si se observaron incrementos significativos de Fe sérico en ratas que ingerían una dieta deficiente en Mg durante 35 días (157)

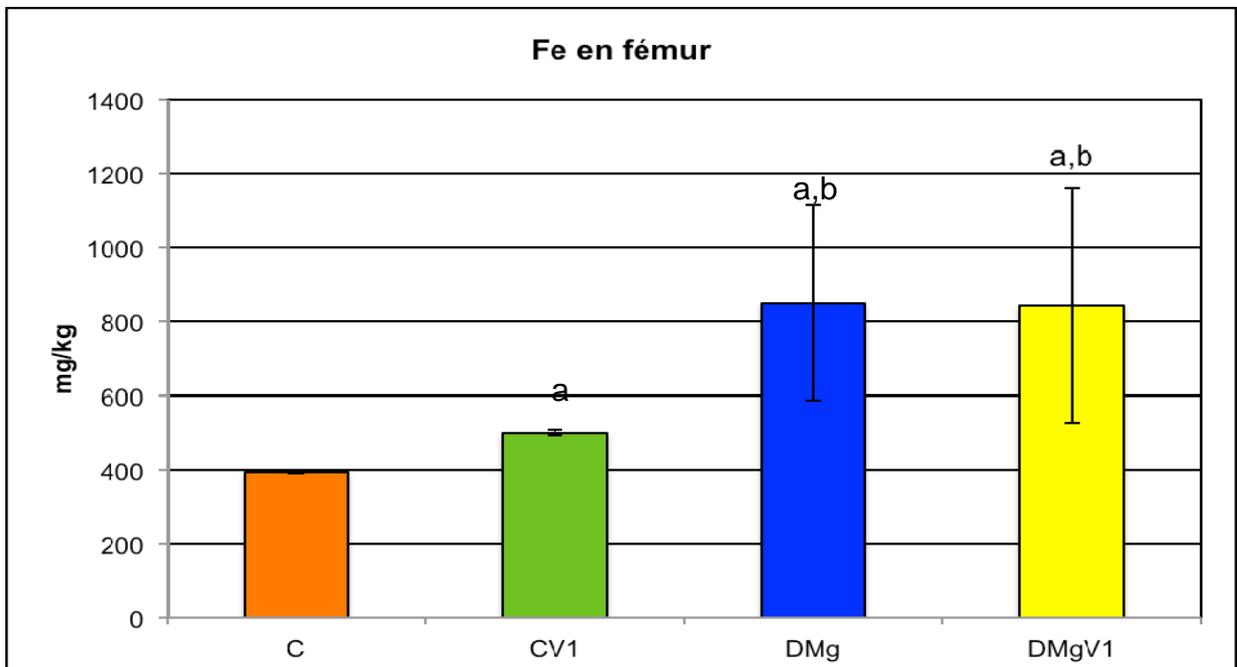


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

El tratamiento con vanadio a ratas sanas ocasiona incrementos significativos del contenido de Fe en hígado y fémur.



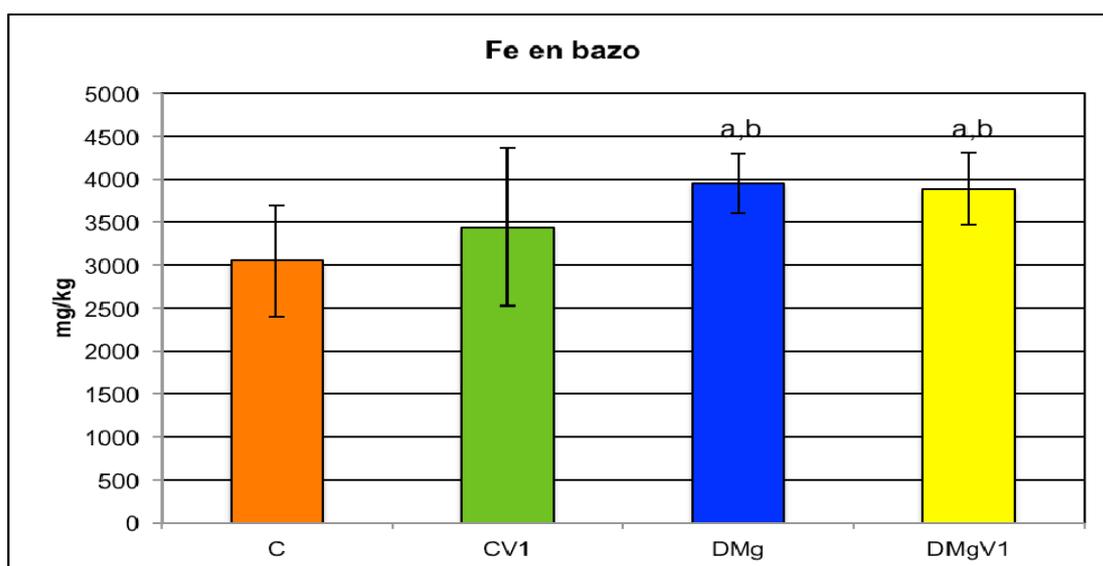
Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

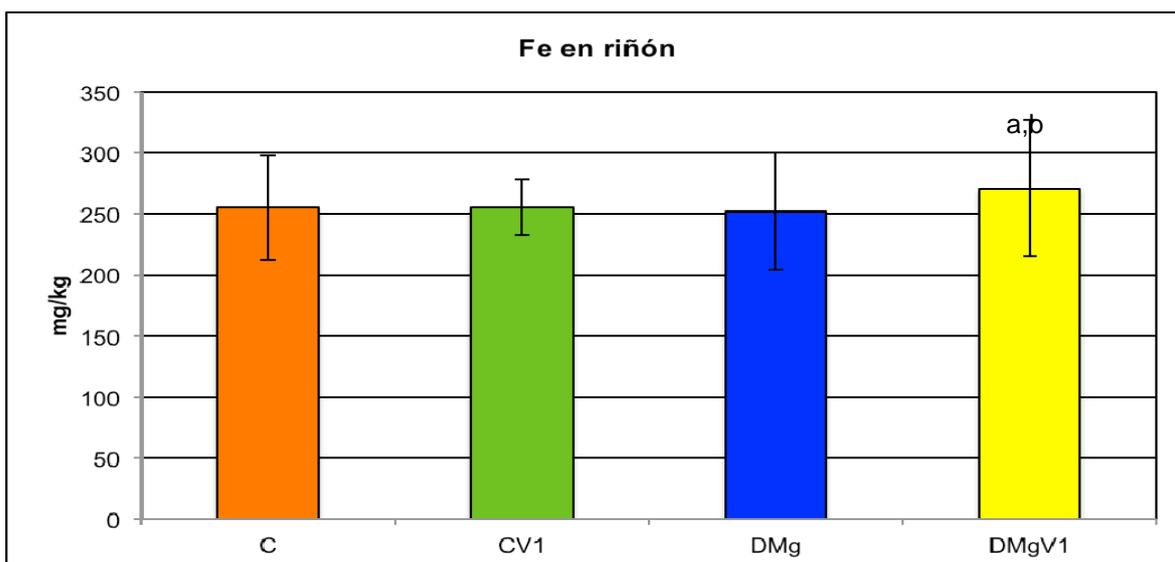
En publicaciones anteriores también se han observado incrementos en los depósitos de Fe en estos órganos (72). Dado que en este grupo de animales no se aprecia un aumento en la absorción y retención, podríamos pensar que dichos incrementos pueden estar asociados a la hemólisis (Tabla 14), anteriormente comentada. El Fe procedente de la hemólisis sería transportado a los órganos de depósito (hígado) e implicados en la eritropoyesis (hueso), aunque en el fémur la hematopoyesis solo se encuentra limitada a las epífisis.

La ingesta de una dieta deficiente en Mg, aumenta ligeramente el contenido de Fe en el hígado y significativamente en el fémur y en el bazo (Tabla 15). Estos cambios podrían ser consecuencia principalmente de la mayor retención del catión (Tabla 12) y también a ligeros aumentos de la hemólisis posiblemente debidos un incremento de la fragilidad de los eritrocitos (157) como consecuencia de cambios estructurales en su membrana (162).

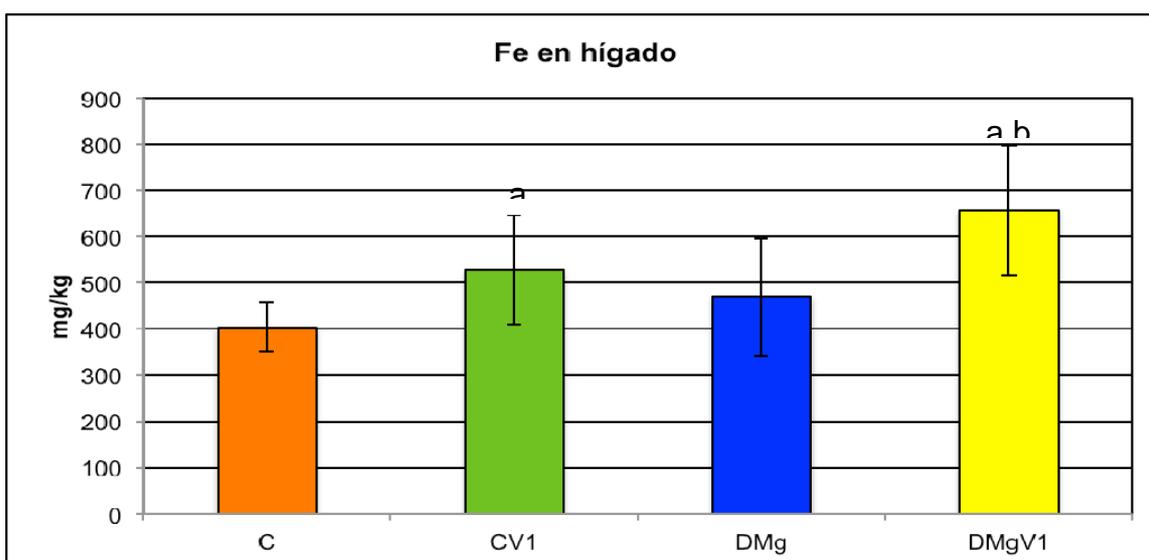


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

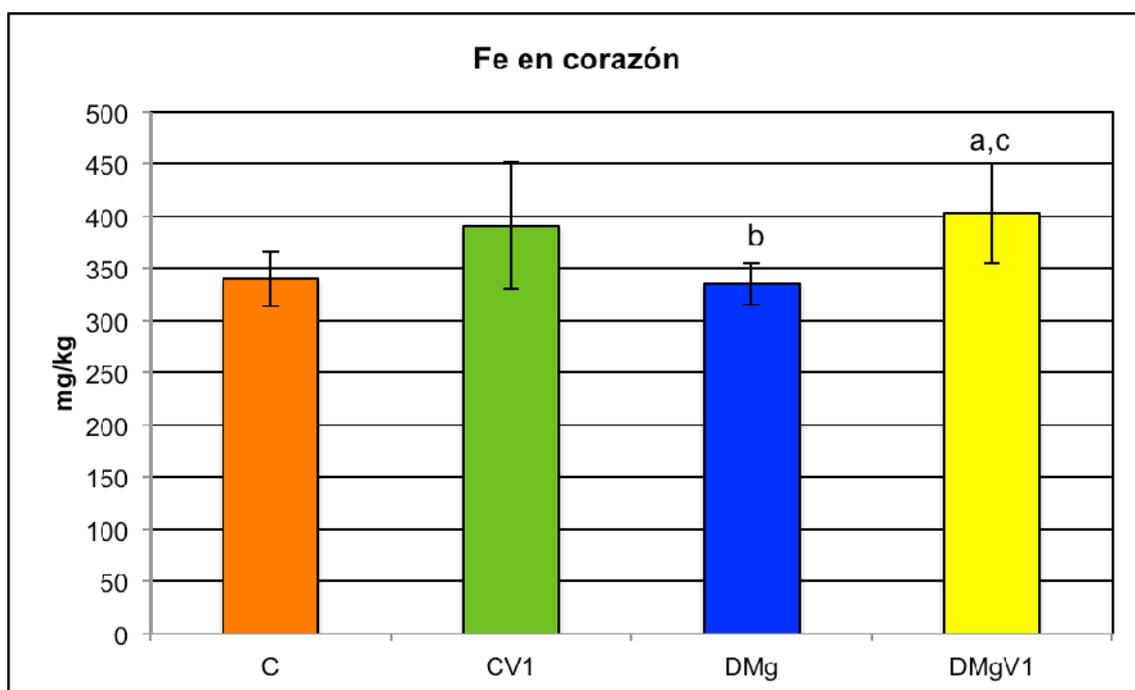
El tratamiento con vanadio a ratas que ingieren una dieta deficiente de Mg conduce a una potenciación de los efectos de la deficiencia de Mg y de la exposición al V. Así se observan incrementos en los depósitos de Fe en el riñón, hígado y corazón y mantiene los originados por la deficiencia en fémur y bazo (Tabla 15).



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

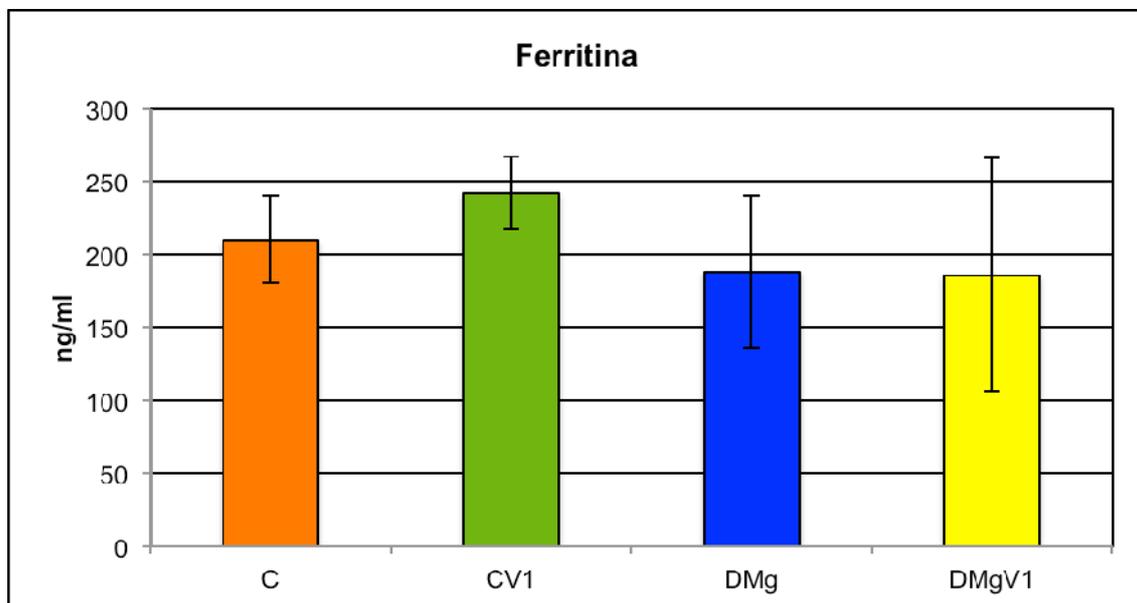


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Estos cambios no pueden ser atribuidos exclusivamente a la mayor retención del catión provocada la deficiencia ya que los animales deficientes tratados presentan retenciones semejantes a las encontradas en las ratas deficientes no tratadas, pero los depósitos tisulares son mayores. Como ya se ha comentado el tratamiento con vanadio a ratas deficientes potencia el grado de hemólisis ocasionada por la deficiencia con el consiguiente aumento de la capacidad de depósito de hierro en tejidos. En 1986, Cohen y col. observan un significativo incremento de los precursores de eritrocitos en el bazo de ratones expuestos a vanadio (205). Los aumentos del contenido del catión en riñón y corazón son inferiores al de los órganos comentados lo que podría deberse a que dichos órganos contiene menos ferritina (207). Es conocido que el incremento de

hierro en el corazón indica una sobrecarga de Fe ya que este catión se deposita en el corazón se ha saturado la capacidad de almacenamiento de otros órganos. Esta sobrecarga indica un empeoramiento de la situación que podría ocasionar alteraciones funcionales de los órganos afectados

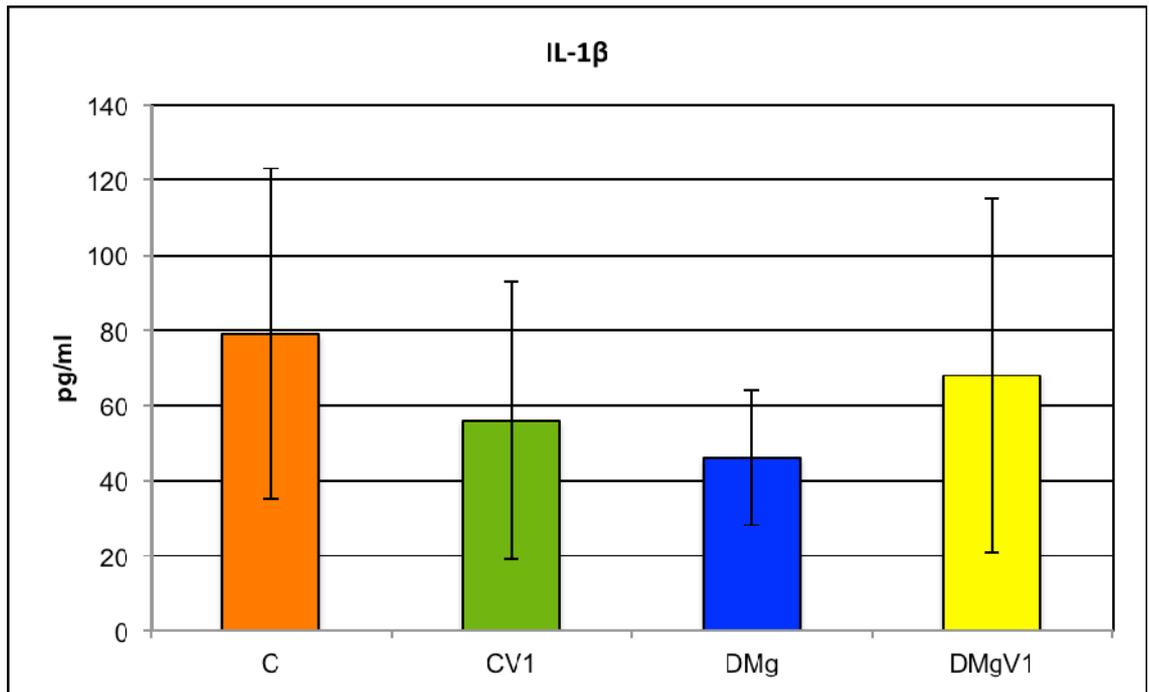
En teoría la sobrecarga de hierro en los tejidos debería ir acompañada por un incremento de la ferritina circulante, pero en nuestro estudio encontramos que esta no se modifica por el tratamiento con vanadio y desciende en las ratas deficientes en Mg y deficientes tratadas (Tabla 14). Esta situación podría deberse a que en las ratas no se ha observado una buena correlación entre la ferritina sérica y hepática (208).



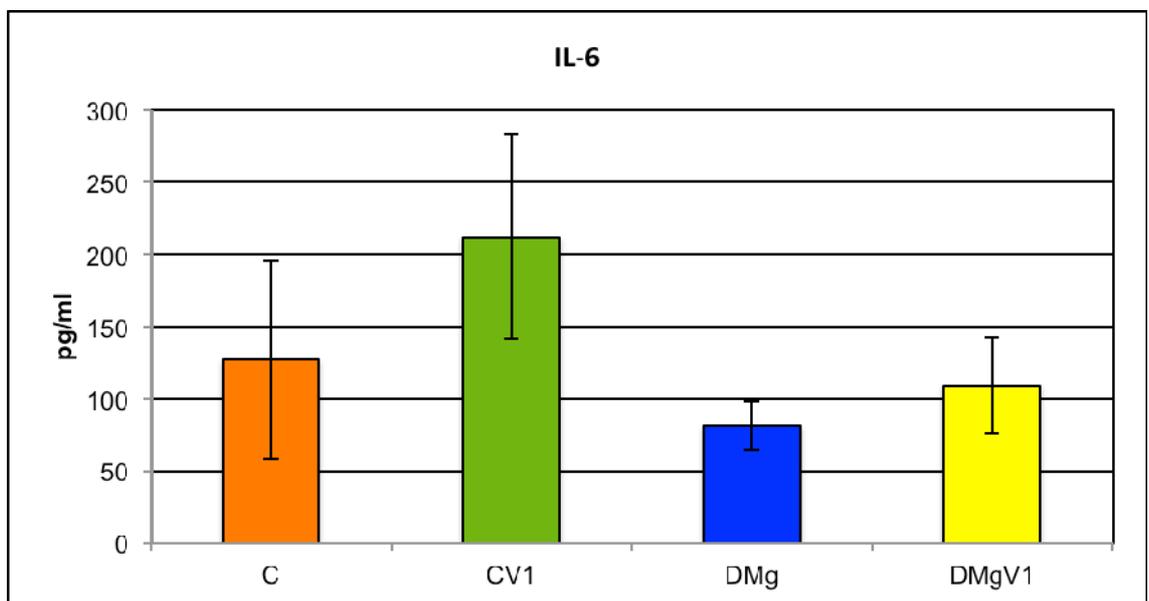
Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Se ha sugerido que el vanadio puede inducir la síntesis y expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF α posiblemente mediante la activación del Factor Nuclear de Células T Activadas (NFAT) (209). También se ha observado que el vanadio incrementa los niveles séricos de IL-6 en ratones tras la inyección subcutánea de matavanadato amónico (210). Por tanto, podríamos pensar que la sobrecarga de hierro encontrada en el grupo que ingiere la dieta deficiente, y sobre todo, la observada en el grupo deficiente tratado, nos puede conducir a un proceso anémico ligado a un proceso inflamatorio.

En el presente trabajo, el estudio de las interleukinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α , indican que el tratamiento con vanadio a ratas sanas modifica poco los valores de IL-1 β y TNF α , e incrementa los valores de IL-6, pero no de modo significativo, mientras que la deficiencia de Mg, en contra de lo descrito en la bibliografía (195), disminuye los valores de las tres interleukinas, y el tratamiento con vanadio a las ratas deficientes tiende a recuperar dichos valores aproximándolos a los valores control en el caso de la IL-1 β y IL-6.

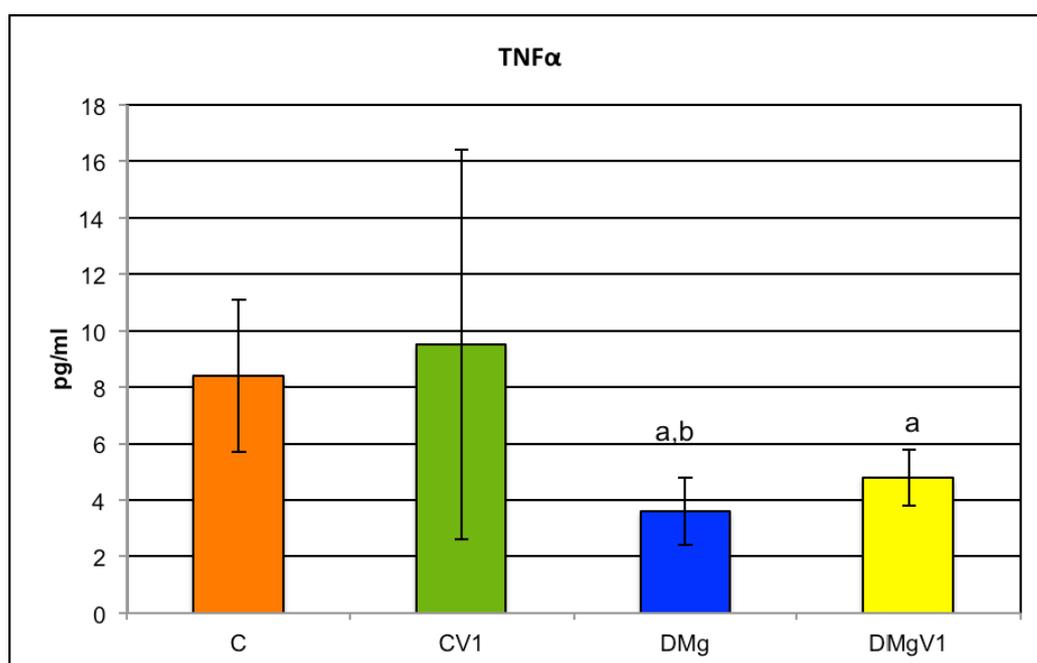


Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

Sin embargo, los valores del $\text{TNF}\alpha$ son significativamente inferiores a los controles tanto en las ratas deficientes en Mg como las deficientes tratadas con vanadio. Recientemente en 2011, Deng y col han observado un descenso de la IL-2, IL-6, IL-10 y $\text{TNF}\alpha$ en la mucosa intestinal de broilers tratados con diferentes dosis de vanadio (211).



Valores medios \pm DS; C (ratas control); CV1 (ratas tratadas con 1mgV/día); DMg (ratas deficientes en Mg); DMgV1 (ratas deficientes en Mg tratadas con 1mgV/día). ^aDiferente del grupo C; ^b Diferente del grupo CV1; ^cDiferente del grupo DMg. $P < 0.05$.

5.2.- Estudios realizados en ratas diabéticas STZ (como modelo de ratas con diabetes tipo I).

Actualmente se conoce que las alteraciones en el metabolismo de diversos elementos traza causada por la diabetes contribuyen al desarrollo de la enfermedad. Diversos estudios han mostrado que el tratamiento con vanadio

reduce la hiperglucemia asociada con la diabetes al mejorar el metabolismo y transporte de la glucosa y al incrementar la sensibilidad del receptor de la insulina (Thompson y Orvig, 2006). Además, también se conoce que el compuesto bis(maltolato)oxovanadio(IV)(BMOV) es más efectivo que el vanadio inorgánico como agente hipoglucemiante (48). Aunque algunos compuestos de vanadio se encuentran actualmente en ensayos clínicos (48), existen muchos aspectos que actualmente no se encuentran bien establecidos, como son las interacciones digestivas y metabólicas con otros elementos. En este apartado de nuestro trabajo, se abordan el estudio de los cambios en el metabolismo del hierro y las alteraciones en la defensa antioxidante tras la exposición al BMOV de ratas diabéticas.

Las dosis empleadas en la realización de la presente parte del estudio 6.22 y 18,66 mg bis(maltolato)oxovanadio (IV)/día, que suministran aproximadamente 1 y 3mg V/día, aproximadamente 5 y 15 mg V/kgpeso/día, como se ha indicado anteriormente, es superior a la menor dosis descrita que causa efectos adversos en ratas (0.8mg V/kg peso/día). Sin embargo, es una dosis baja comparada con la utilizada por otros autores (72, 177); y mucho menor que la LD50 (40-90mg V/kg peso/día) (179). En cada grupo tratado con vanadio dos ratas fueron retiradas del estudio por presentar problemas gastrointestinales.

5.2.1.- Sobre los cambios ponderales e ingesta de dieta y agua.

En las ratas diabéticas no tratadas (DM), no se apreciaron cambio de peso a lo largo del periodo experimental (Tabla 16), debido al hipercatabolismo que acompaña a la enfermedad, aunque estas ratas presentan polifagia (Tabla 17). Las ratas diabéticas tratadas con vanadio tampoco presentaron cambios significativos de peso durante el estudio (72) (Tabla 16), aunque la ingesta de alimento disminuye a medida que incrementa la dosis, alcanzando valores semejantes a los controles en el caso del grupo tratado con 3mg V/día (DMV3) (Tabla 17). Se ha sugerido que el descenso de la ingesta de alimento podría haber sido causado porque el vanadio inhibe el incremento del neuropéptido hipotalámico Y (NPY) producido por la diabetes. Dicho neuropéptido juega un importante papel en la regulación del apetito en los mamíferos (212). Otros autores indican que el vanadio incrementa los efectos catabólicos de la leptina, favoreciendo las pérdidas de peso corporal y reduciendo la ingesta (213).

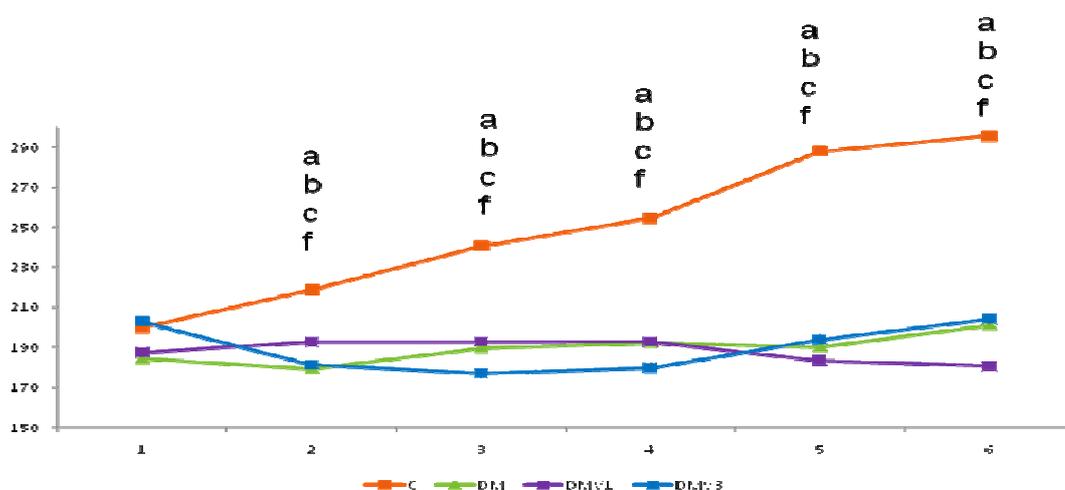


Fig 9 . Evolución del peso medio. (a) C vs DM; (b) C vs DMV1; (c) C vs DMV3; (d) DM vs DMV1; (e) DM vs DMV3; (f) DMV1 vs DMV3. P<0.05

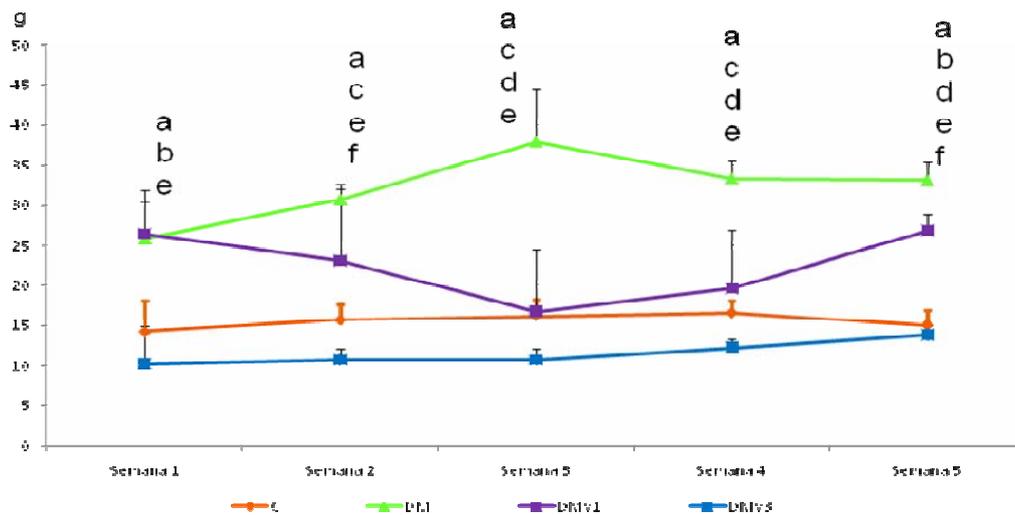
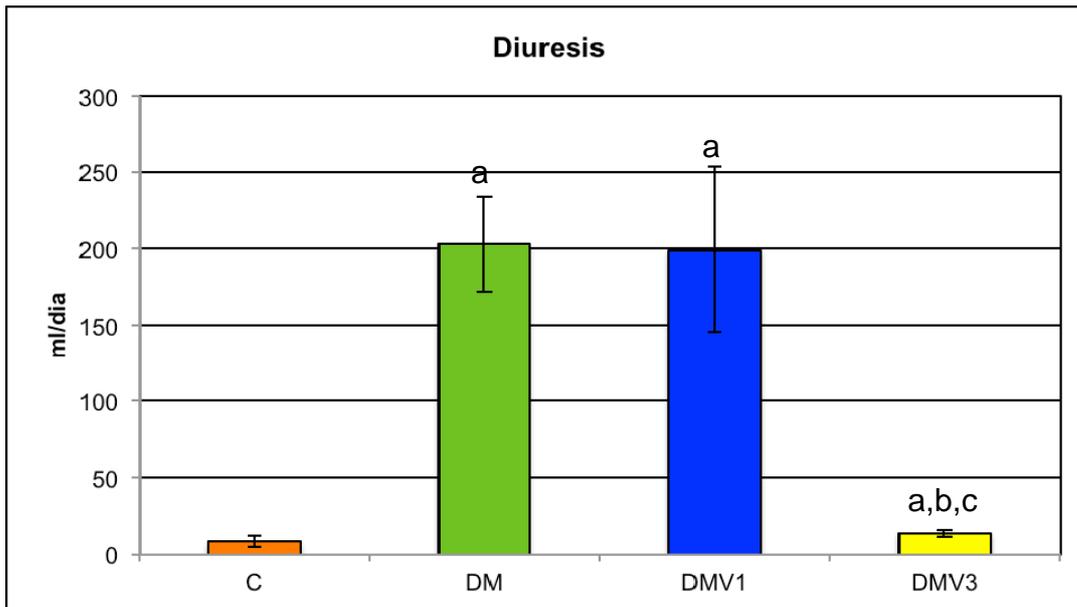


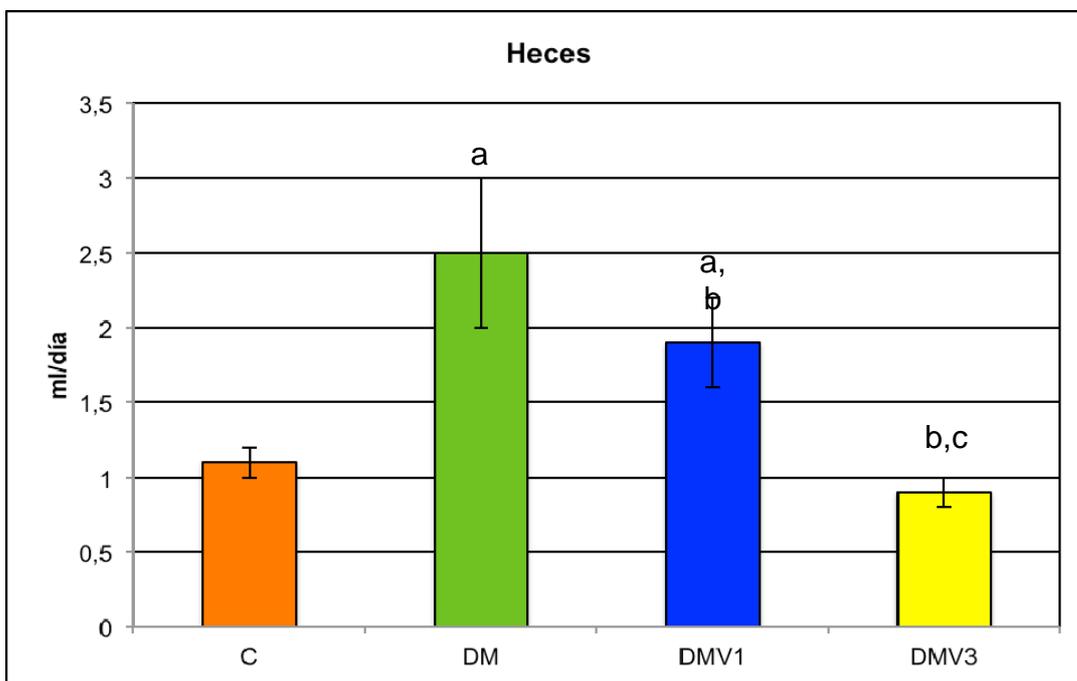
Fig 10. Evolución de la ingesta de alimento. (a) C vs DM; (b) C vs DMV1; (c) C vs DMV3; (d) DM vs DMV1; (e) DM vs DMV3; (f) DMV1 vs DMV3. $P < 0.05$

Como es conocido la diabetes cursa con polidipsia (Tabla 18). El tratamiento con vanadio tiende a reducir la ingesta de agua del mismo modo que ocurría con la ingesta de alimento. La ingesta de agua del grupo DMV3 presenta valores semejantes a los controles. Liu et al. (212) también asocian el descenso de la ingesta del agua con el descenso del NPY provocado por el vanadio.

La diuresis y el peso de heces excretado, como es de esperar, siguen una evolución semejante a la de las ingestas de alimento y agua (Tabla 19).



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

5.2.2.- Sobre los niveles circulantes de glucosa en ayunas e insulina sérica.

El tratamiento con 1mg V/día no modifica significativamente los niveles de glucosa sanguínea durante primeros 28 días de tratamiento. El incremento de la glucemia en el día 35, en este grupo, con respecto a las ratas diabéticas no tratadas (Tabla 22), podría deberse a que el STZ ha producido mayores daños pancreáticos en unas ratas que en otras y este diferente tipo de lesión se ha mostrado al final del periodo experimental.

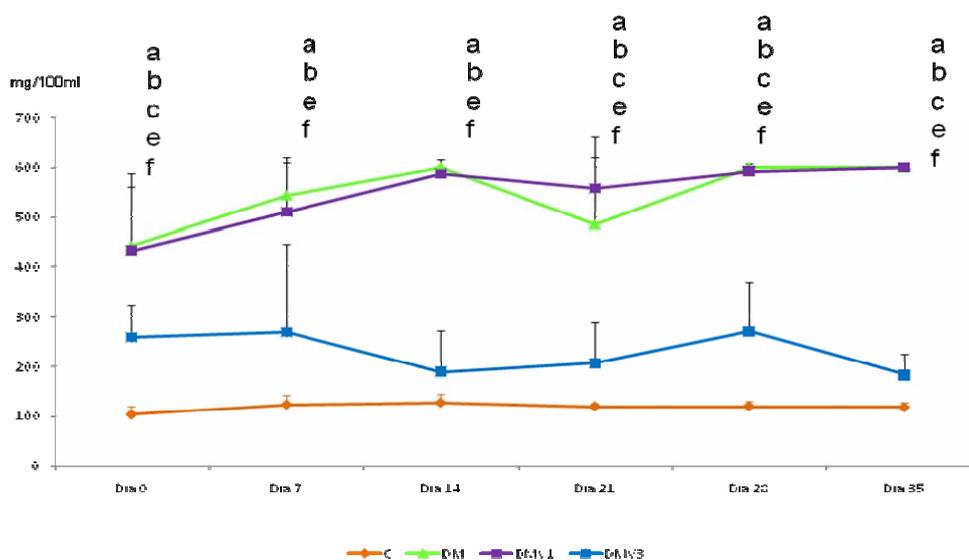
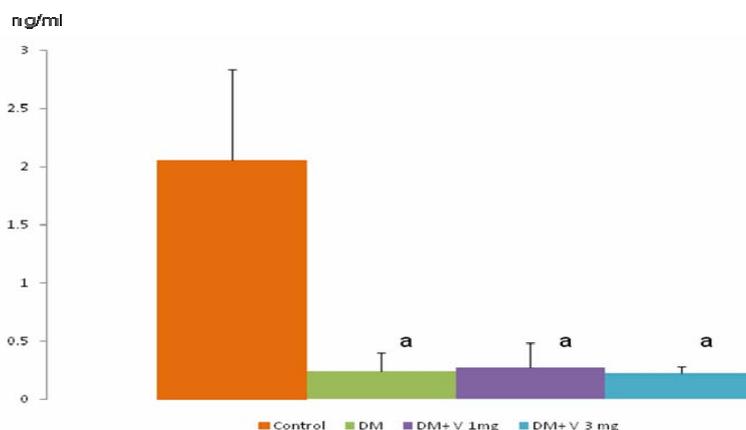


Fig 11. Evolución de la glucemia en ayunas. (a) C vs DM; (b) C vs DMV1; (c) C vs DMV3; (d) DM vs DMV1; (e) DM vs DMV3; (f) DMV1 vs DMV3. $P < 0.05$

La dosis de 3mg V/día, normaliza la glucemia en las ratas diabéticas desde la primera semana de tratamiento, estos resultados coinciden con los aportados por otros autores en trabajos anteriores (182, 214; 215). No obstante otros autores han observado que aunque el V ejerce un efecto hipoglucémico no

se logra recuperar los valores normales (65, 72, 80, 216). Esta circunstancia podría deberse a diferentes causas como el uso de diferentes compuestos de vanadio, la duración de los ensayos, los métodos para determinar los niveles de glucosa, la dosis de STZ utilizada y/o la variabilidad de la respuesta animal.

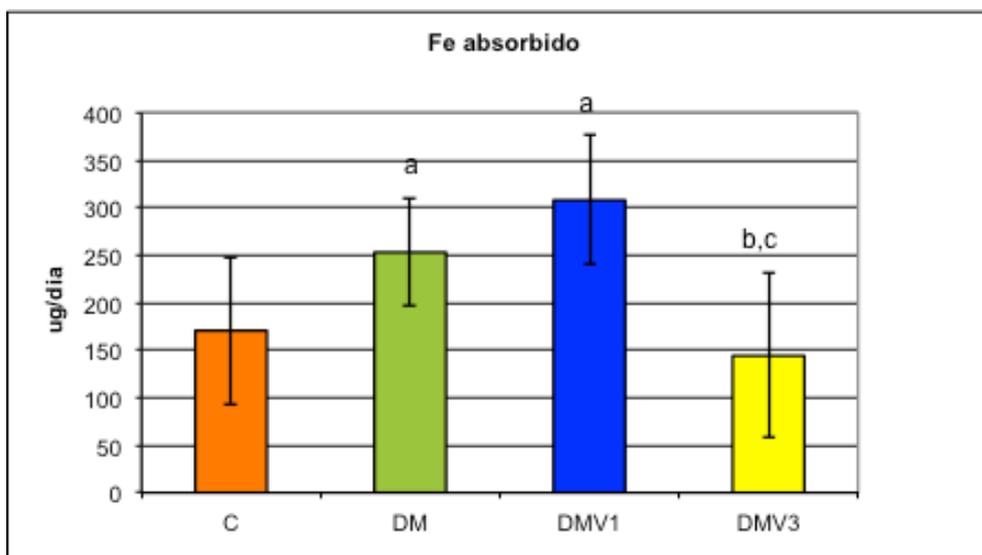
Para las glucemias determinadas al azar (Tabla 23) se observa un comportamiento semejante al descrito para las glucemias en ayunas. La administración de 1mg V/día no modifica las glucemias en relación a las ratas diabéticas, mientras que la dosis de 3mg V/día produce un descenso significativo de los niveles de glucosa circulante cuando se compara con las ratas diabéticas no tratadas y diabéticas tratadas con 1mg V/día. No obstante, los valores encontrados son significativamente superiores a los observados en las ratas control (57). Las ratas diabéticas presentan unos niveles de insulinemia inferiores a los observados en las ratas control, debido a la destrucción de las células β causada por el STZ. El tratamiento con V, independientemente de la dosis empleada, no tiene ningún efecto sobre los niveles de insulina sérica (Tabla 24).



Insulinemia en ayunas. (a) C vs DM; (b) C vs DMV1; (c) C vs DMV3; (d) DM vs DMV1; (e) DM vs DMV3; (f) DMV1 vs DMV3. $P < 0.05$

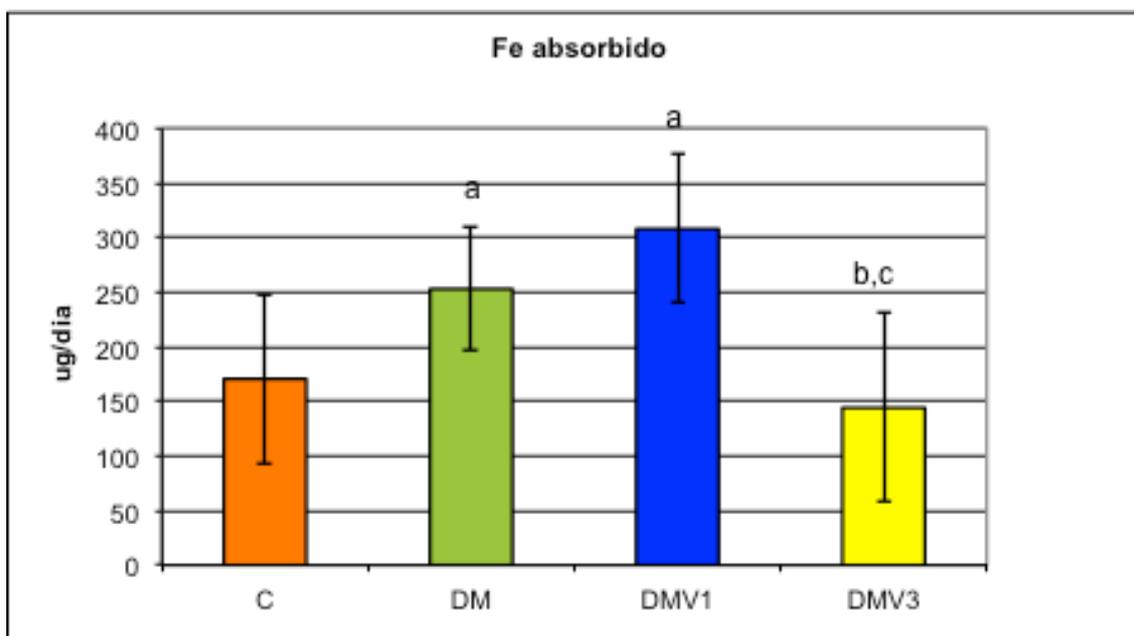
4.2.3.- Sobre la utilización digestiva y metabólica del hierro.

La hiperfagia asociada a la diabetes, como se ha comentado, conduce a un incremento de la ingesta de alimento y por tanto de Fe. Este incremento de la ingesta de Fe (Tablas 21, 25), es el responsable del aumento de la absorción neta de Fe observada en este grupo (DM) (Tabla 25).



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

El incremento de las pérdidas urinarias (Tabla 25), como resultado del alterado estado endocrino de los animales, es el responsable de que el Fe retenido en las ratas diabéticas no tratadas sea similar al de las ratas controles y que el incremento de los valores plasmáticos de Fe (Tabla 26) no sean significativos en relación con las ratas control (217).

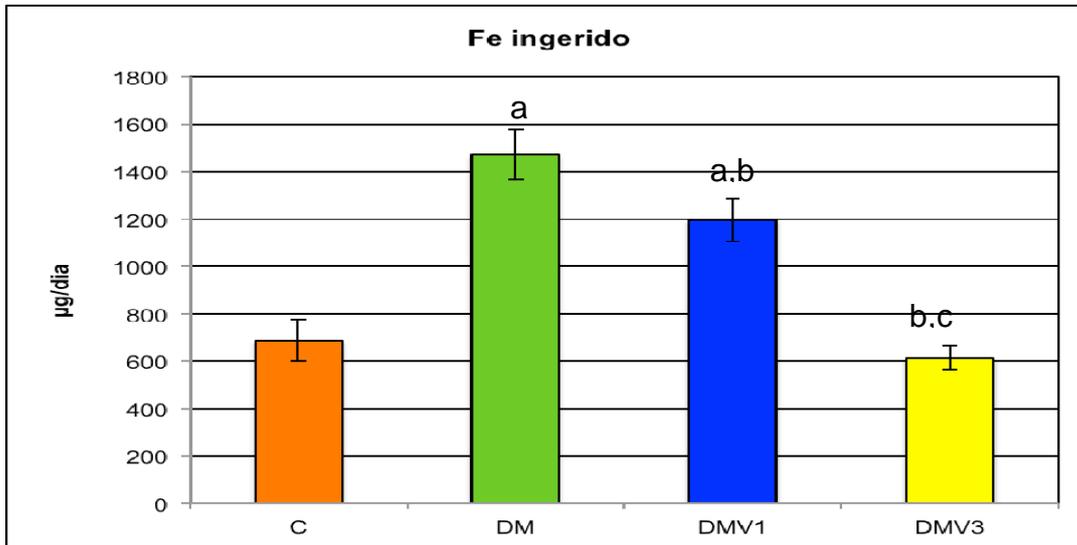


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

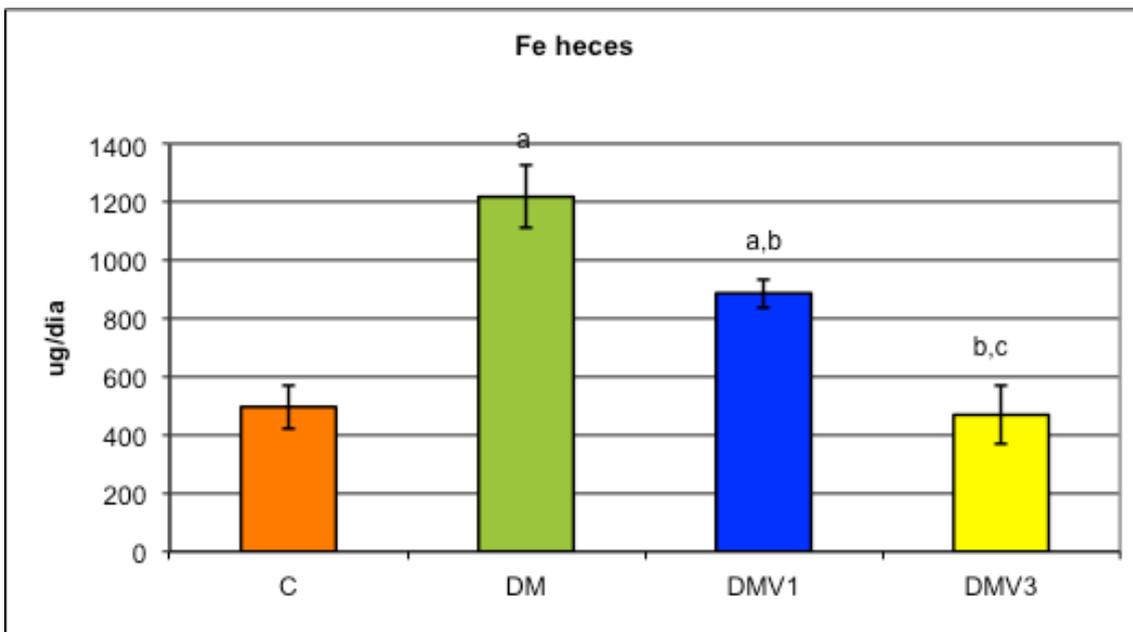
El tratamiento a ratas diabéticas con una dosis de 1mg V/día, como se ha comentado anteriormente, no ejerce ningún efecto sobre la glucemia en ayunas ni al azar, pero produce un descenso significativo en la ingesta de alimento, y por tanto de Fe, así como del Fe fecal. Los descensos en la excreción fecal y urinaria explican que la cantidad neta de Fe retenido incrementa en relación con las ratas diabéticas no tratadas.

La dosis de 3mg V/día presenta un claro efecto antidiabético normalizando la glucemia (74) (Tabla 22) y reduciendo la ingesta de alimento y Fe a niveles semejantes a los controles. Esta dosis produce una reducción del vanadio absorbido. En nuestra opinión, la reducción en la absorción de Fe encontrada en este grupo, es una consecuencia de la reducción de la ingesta, como lo pone de manifiesto que no se aprecian cambios significativos cuando expresamos la absorción del elemento en % (Tabla 25). Aunque esta dosis

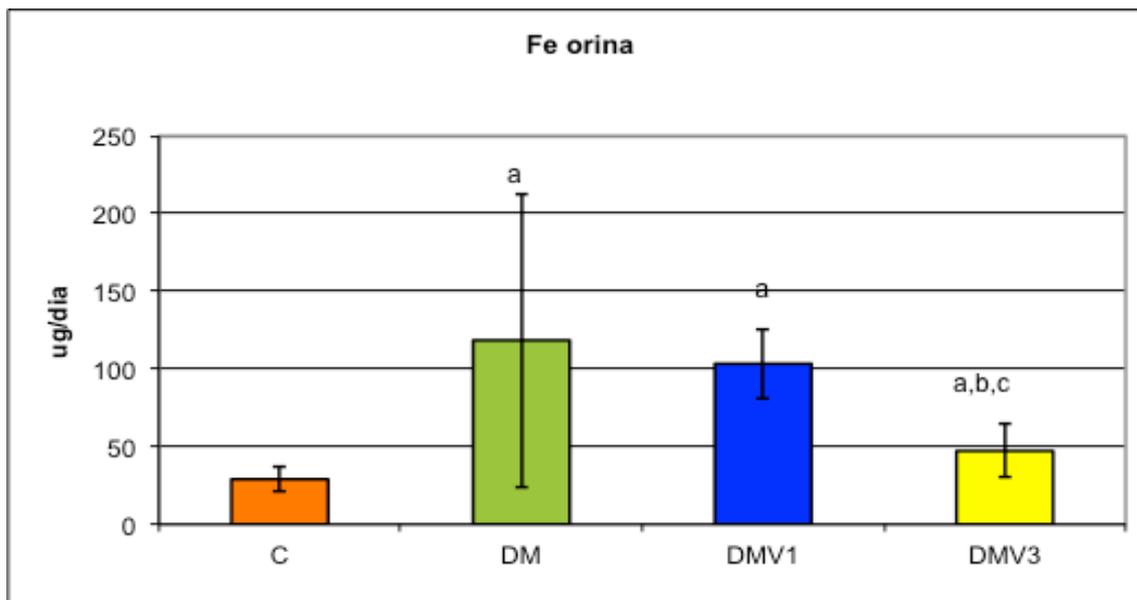
también ocasiona una reducción de las pérdidas urinarias, la excreción urinaria de Fe fue significativamente mayor a la encontrada en las ratas control, lo que explica la ligera menor retención del elemento en este grupo (Tabla 25).



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



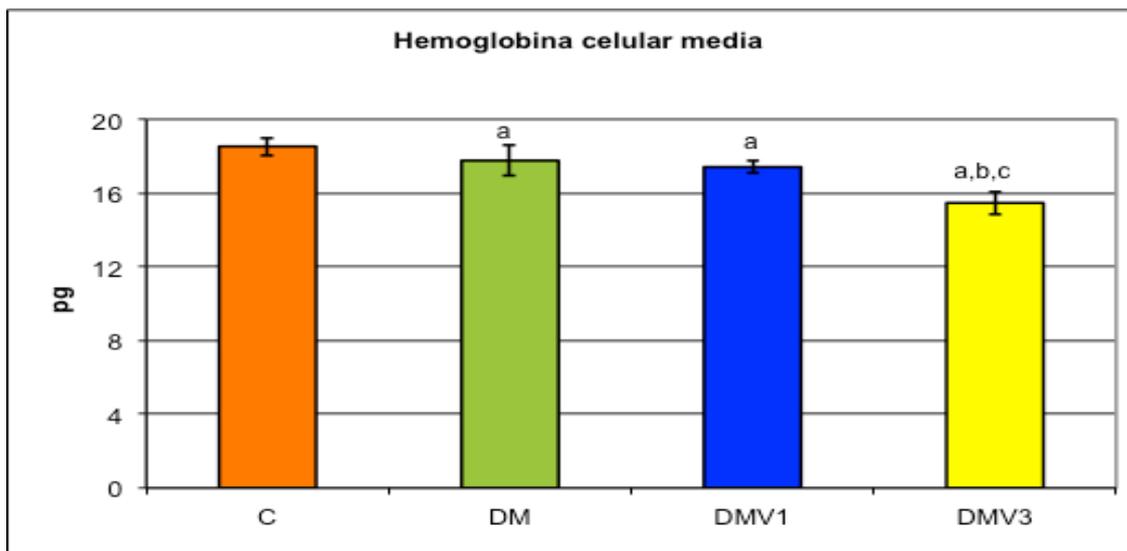
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

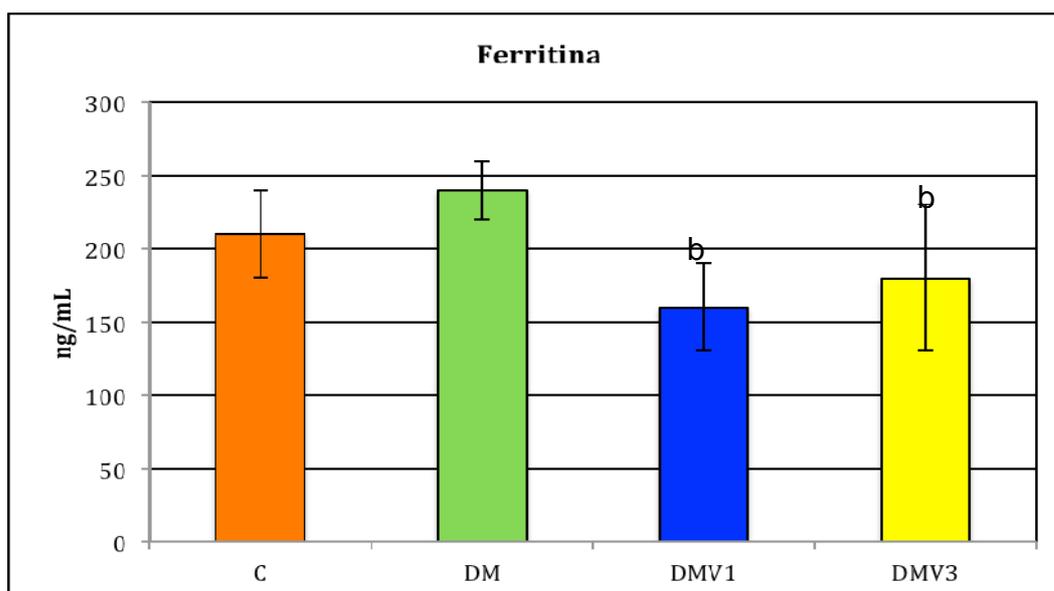
5.2.4.- Sobre los parámetros bioquímicos y hematológicos y el contenido de Fe en suero y tejidos.

La diabetes tiende a disminuir los parámetros hematológicos estudiados, aunque solo la hemoglobina celular media presenta una reducción significativa (Tabla 26).



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

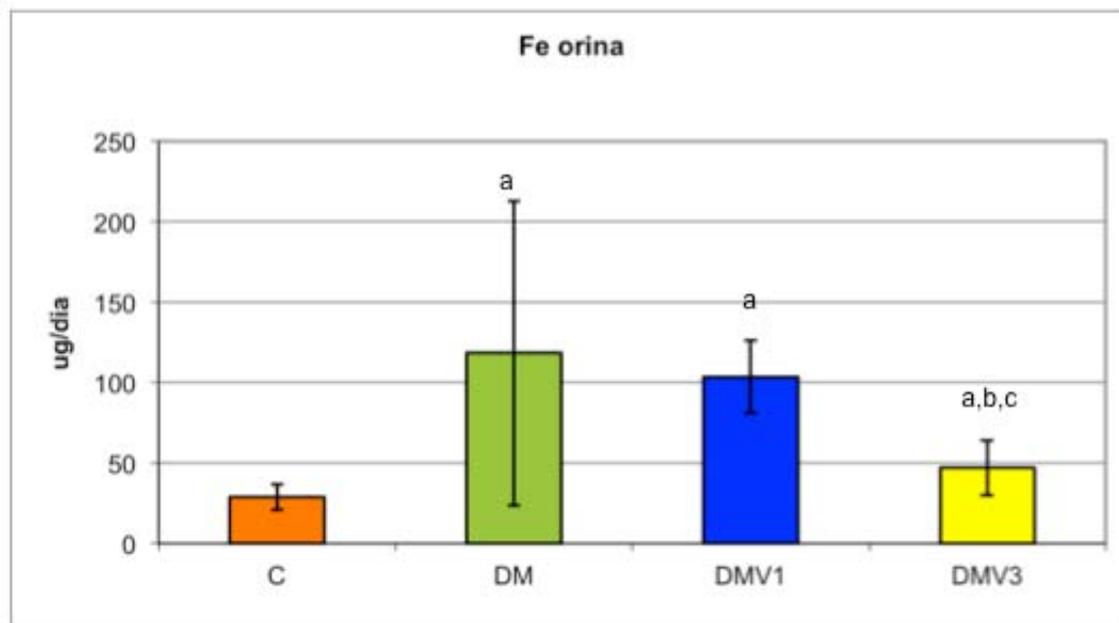
En nuestra opinión, esta situación junto con la ausencia de cambios significativos en los niveles de ferritina, refleja la fase inicial de la anemia que frecuentemente acompaña a la diabetes, como consecuencia del desarrollo de un proceso renal que afecta a la producción de Eritropoyetina (218).



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

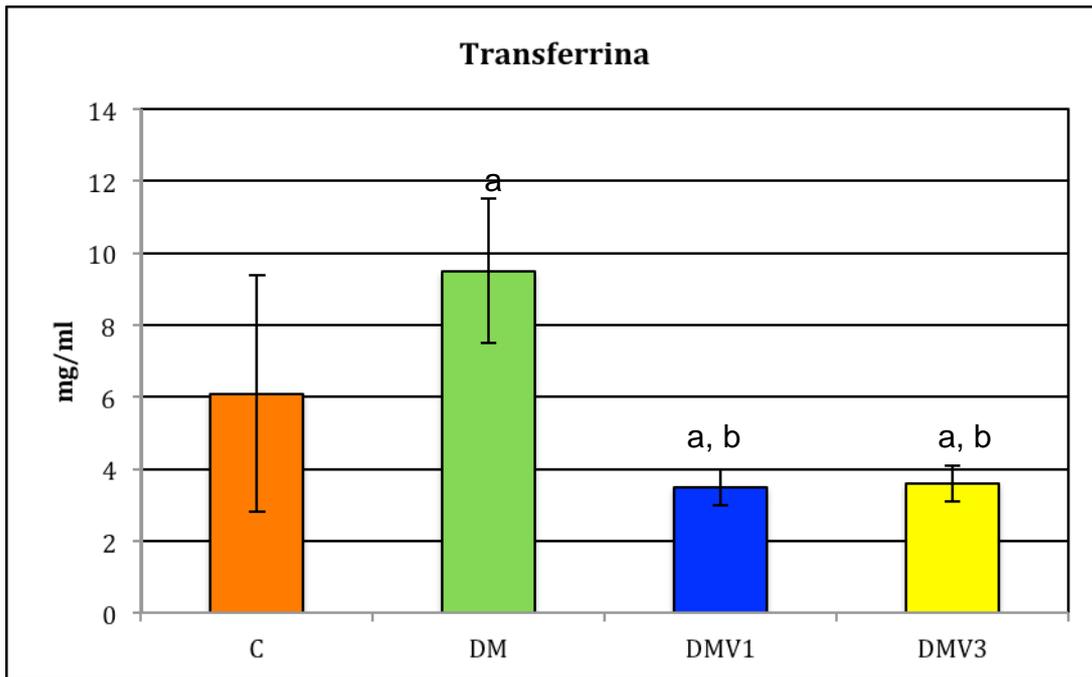
La deficiencia de eritropoyetina reduce la eritropoyesis y acorta la vida

media de los eritrocitos. Esta situación justificaría el incremento de las pérdidas urinarias de Fe (Tabla 25), comentadas en el apartado anterior.



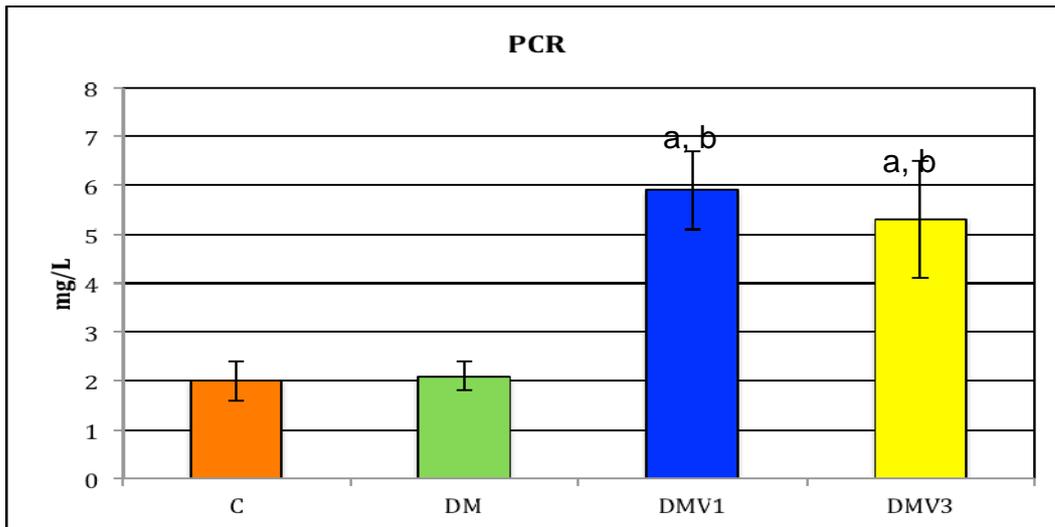
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

Esta circunstancia sería también la responsable del incremento de los niveles de transferrina circulante, lo cual facilitaría el transporte de Fe a la médula y demás tejidos. Trabajos anteriores han observado un incremento del contenido de Fe en diversos órganos, existiendo un alto nivel de coincidencia en el caso del riñón (10, 219). Se ha sugerido que los receptores renales a la transferrina incrementan su expresión en ratas diabéticas STZ, lo que podría explicar el acumulo de Fe observado en el riñón de estos animales (8).

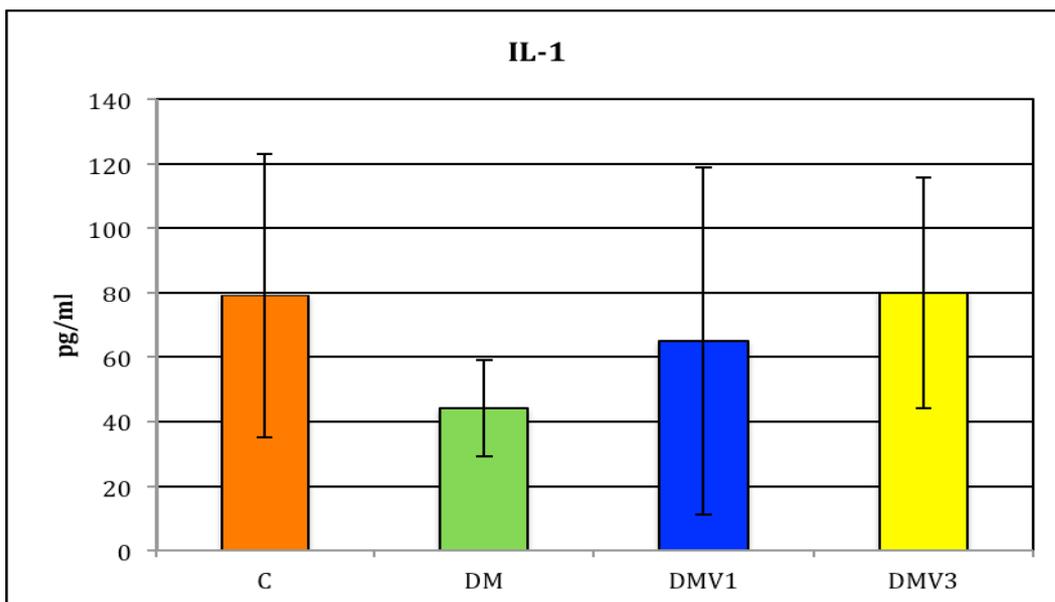


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

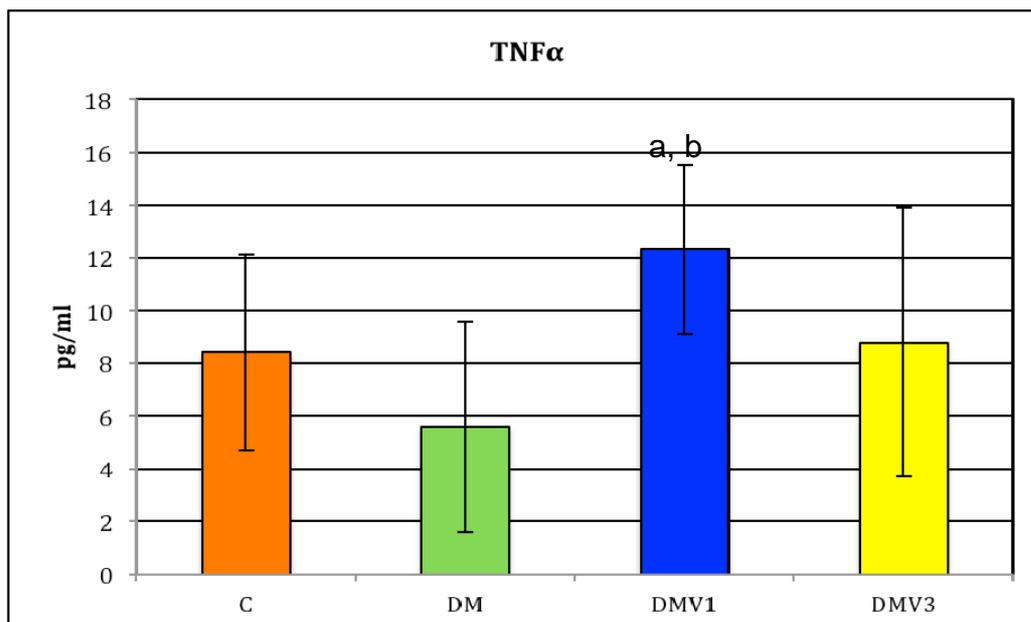
Aunque se ha descrito que la proteína C reactiva y la IL-6 se encuentran asociadas a la hiperglicemia y desarrollo de la diabetes tipo 2 (220) y que los altos niveles de glucosa y Fe favorecen la respuesta inflamatoria (221), los resultados obtenidos en los estudios genéticos dirigidos a asociar la IL-6 con la diabetes tipo 1 son contradictorios (222). En nuestro caso no observamos cambios en los parámetros séricos estudiados relacionados con este proceso (PCR, IL-1 β , IL-6 y TNF α)



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

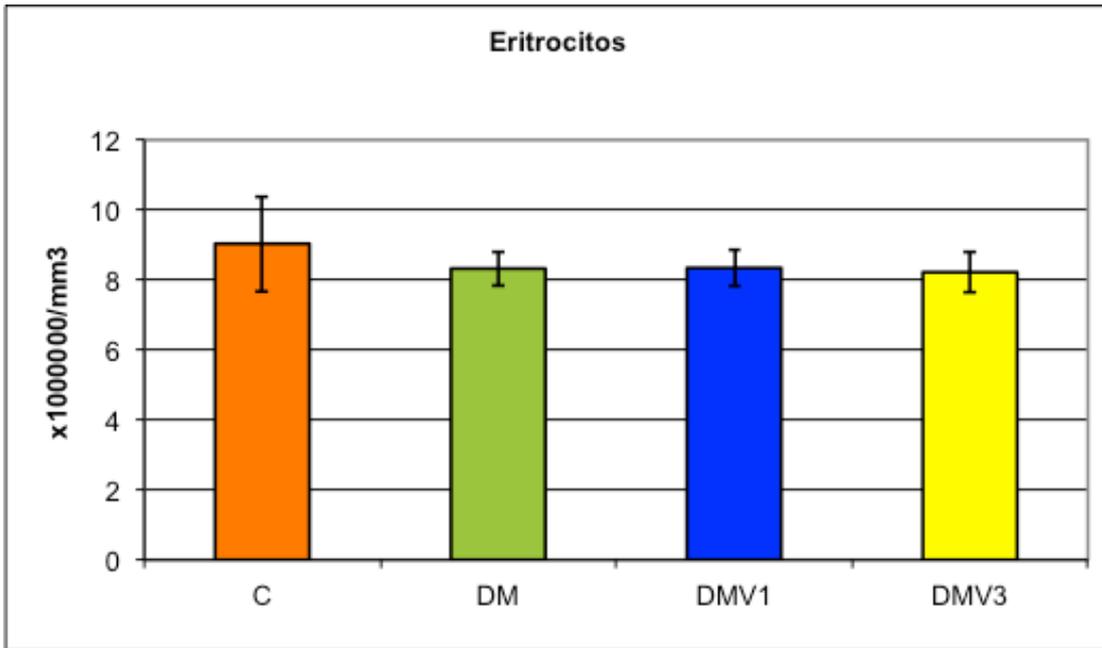


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

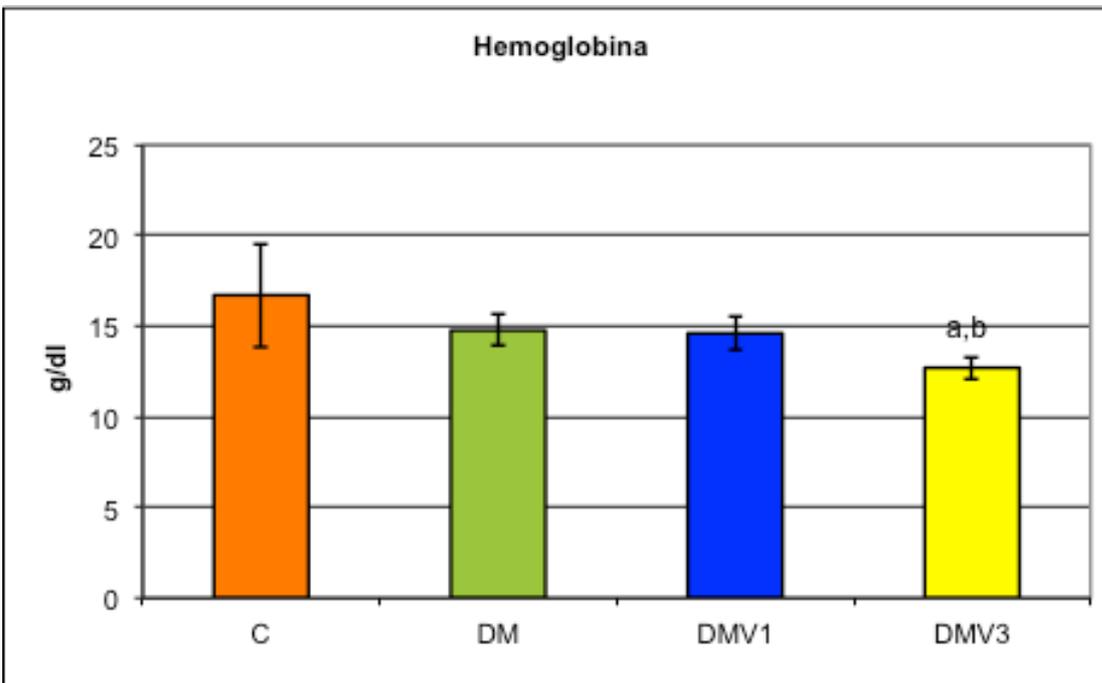


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

En relación al efecto del vanadio sobre los parámetros hematológicos en ratas diabéticas, no existe un acuerdo unánime. Como se ha explicado en el apartado 4.1.4. Algunos autores han encontrado que los valores hematológicos disminuyen ya que el vanadio produce cambios oxidativos en la membrana del eritrocito que facilitan la hemólisis (79, 201), sin embargo otros no encuentran cambios (202). En el presente estudio, el tratamiento con 1mg V/día no presenta ningún efecto sobre el número de células sanguíneas, ni sobre los índices hemáticos (Tabla 26), los cuales permanecen en valores semejantes o ligeramente inferiores a los observados en las ratas diabéticas no tratadas.

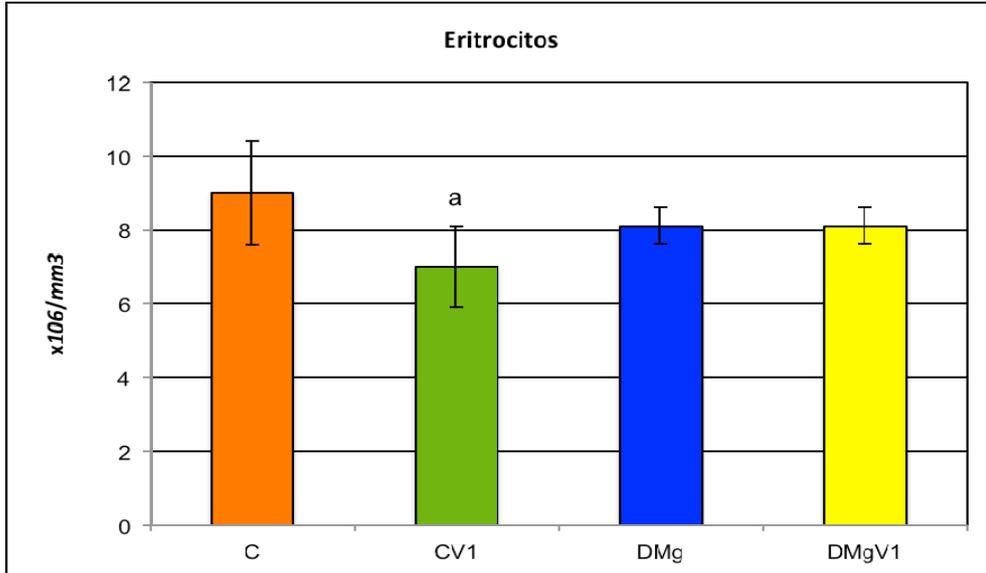


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

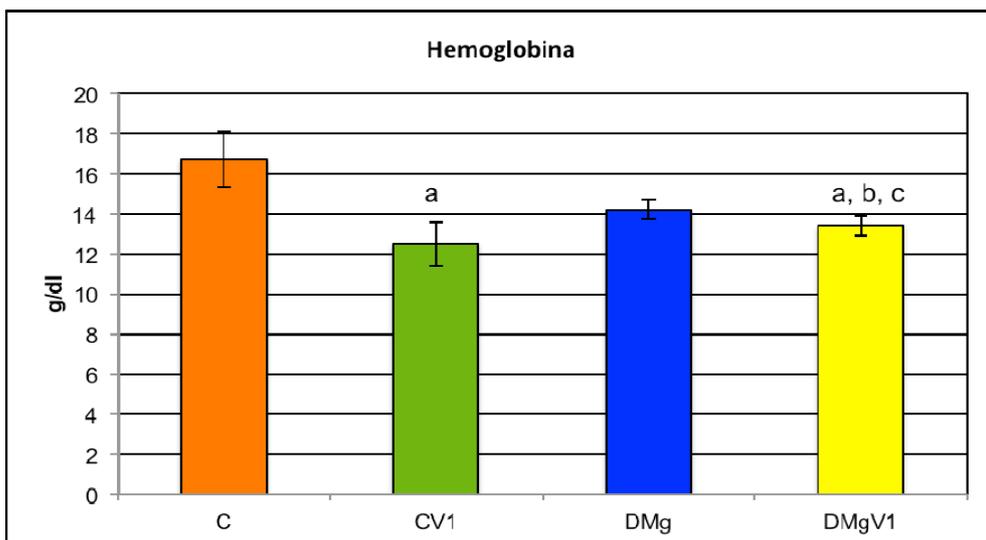


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en ratas no diabéticas tratadas con la misma dosis (ver tabla 14; apartado 4.1.4), donde si se observa que el tratamiento produce un descenso en el nº de eritrocitos y Hb.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

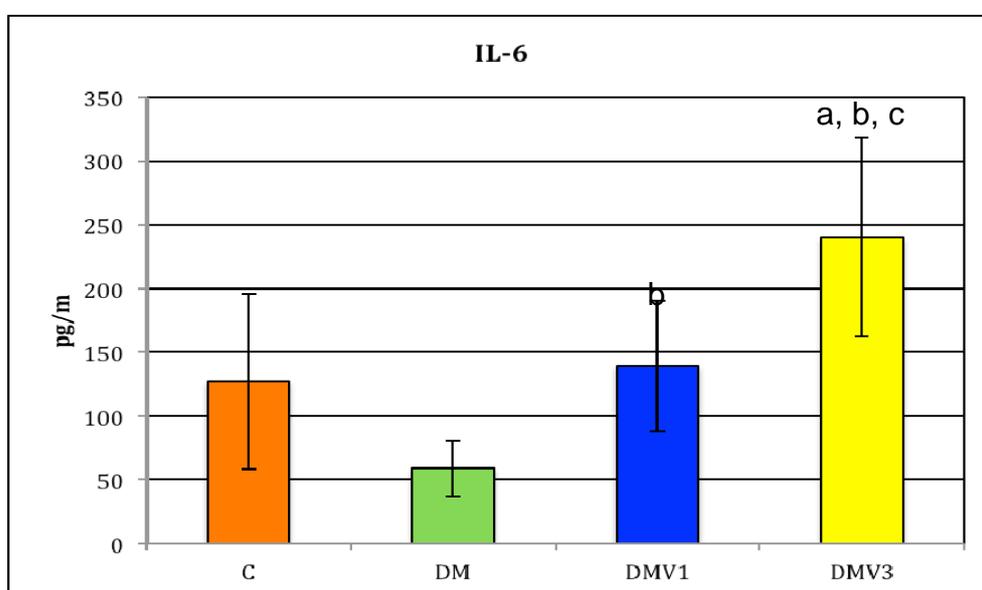


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

Estos hechos nos hacen pensar que el vanadio ha ejercido un mayor

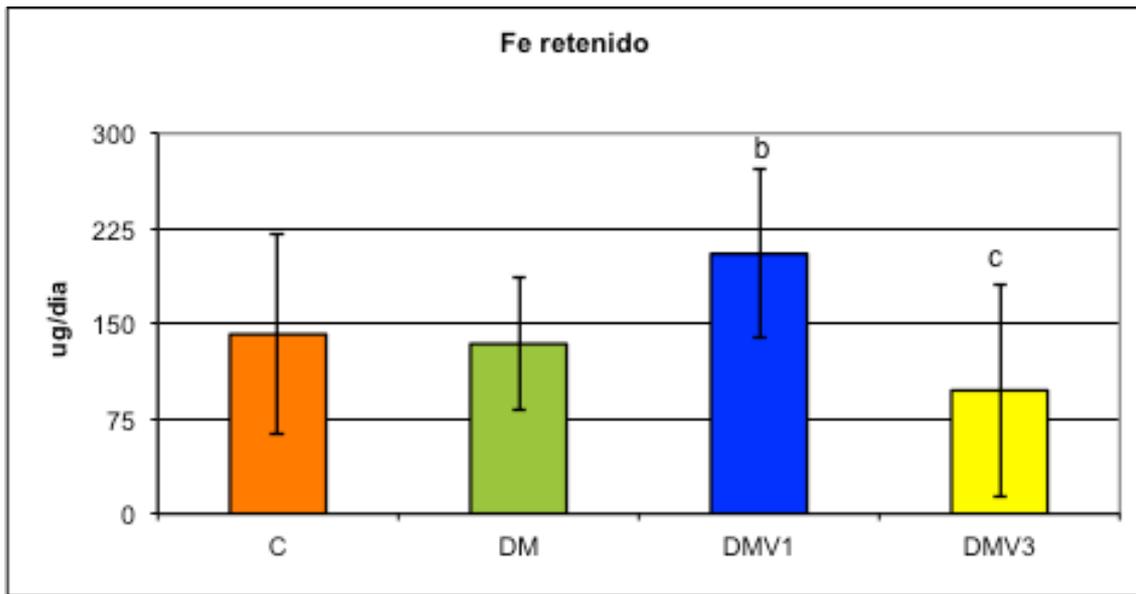
efecto, sobre los parámetros hematológicos, en los animales no diabéticos (74).

Como ya se ha comentado, el vanadio puede inducir la síntesis y expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF α posiblemente mediante la activación del Factor Nuclear de Células T Activadas (NFAT) (209). Además el vanadio incrementa los niveles séricos de IL-6 en ratones tras la inyección subcutánea de matavanadato amónico (210)



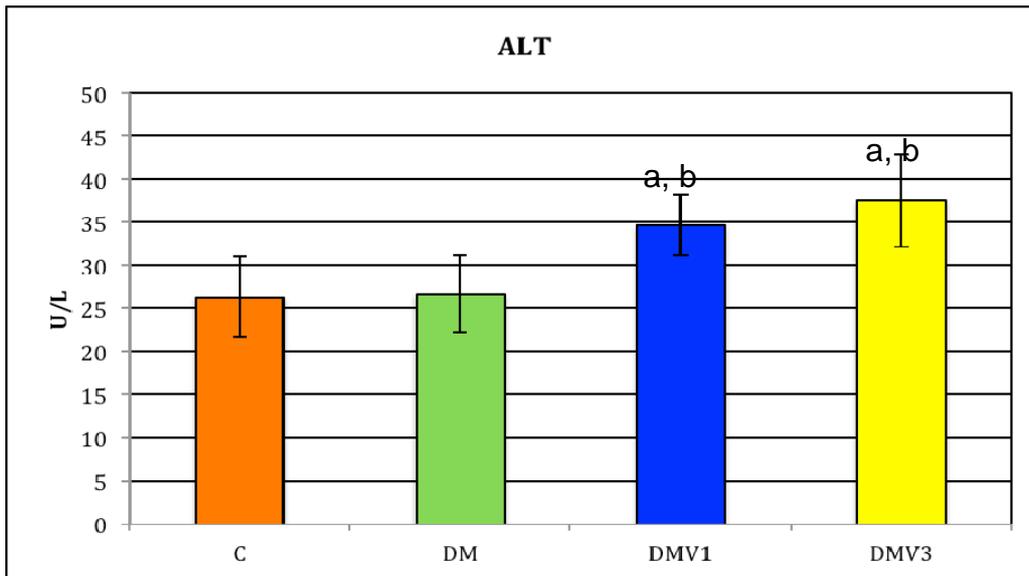
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

En este grupo (DMV1) se aprecia un incremento de la retención del hierro (Tabla 25) junto con un descenso en niveles de transferrina sérica e incrementos de de los niveles de la ALT, proteína C reactiva (PCR), IL-6 y TNF α .



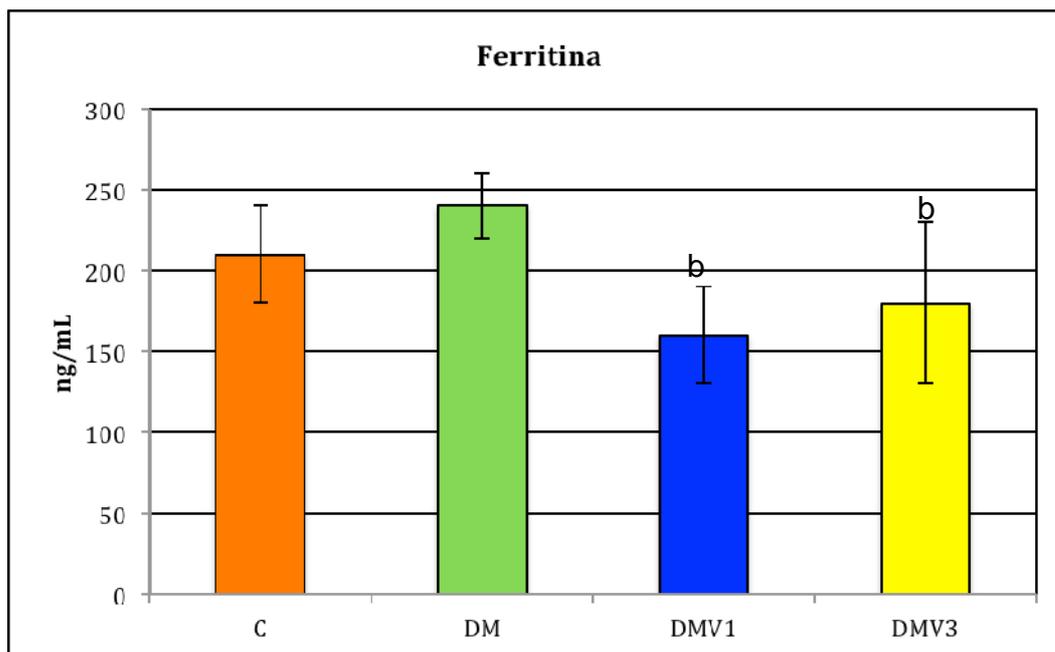
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

En nuestra opinión, junto a los efectos causados por la diabetes, el tratamiento con 1mg V/día podría haber iniciado un proceso inflamatorio ligado a una ligera sobrecarga de hierro. Esta situación justificaría los mayores los niveles séricos del elemento, los menores niveles de transferrina circulante (221) y los incrementos en la actividad de la ALT. Estos dos parámetros se han utilizado habitualmente en el diagnóstico de la sobrecarga de hierro.



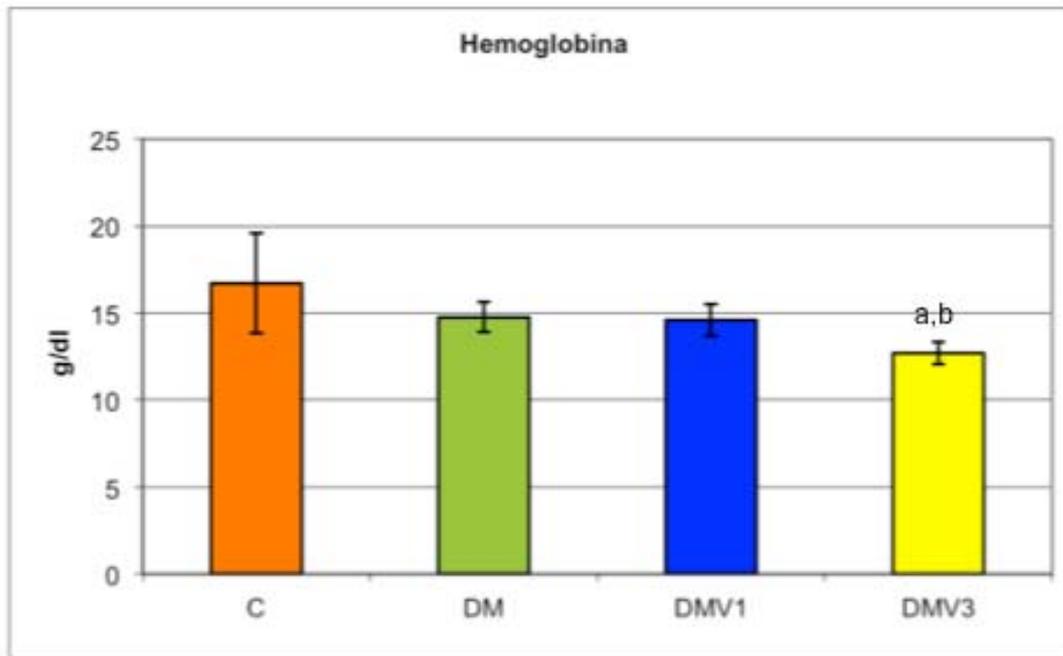
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

En teoría la sobrecarga de hierro en los tejidos debería encontrarse acompañada por un incremento de la ferritina circulante, pero en nuestro estudio la ferritina en este grupo de ratas (DMV1) disminuye. Esta situación podría deberse a diferentes causas: se ha puesto de manifiesto que en la rata no se encuentra bien correlaciona la ferritina sérica con la hepática. Además, la ferritina hepática se ha encontrado pobremente relacionada con la ferritina sérica en ratas a las que se suministraba un suplemento de hierro por vía oral (208).

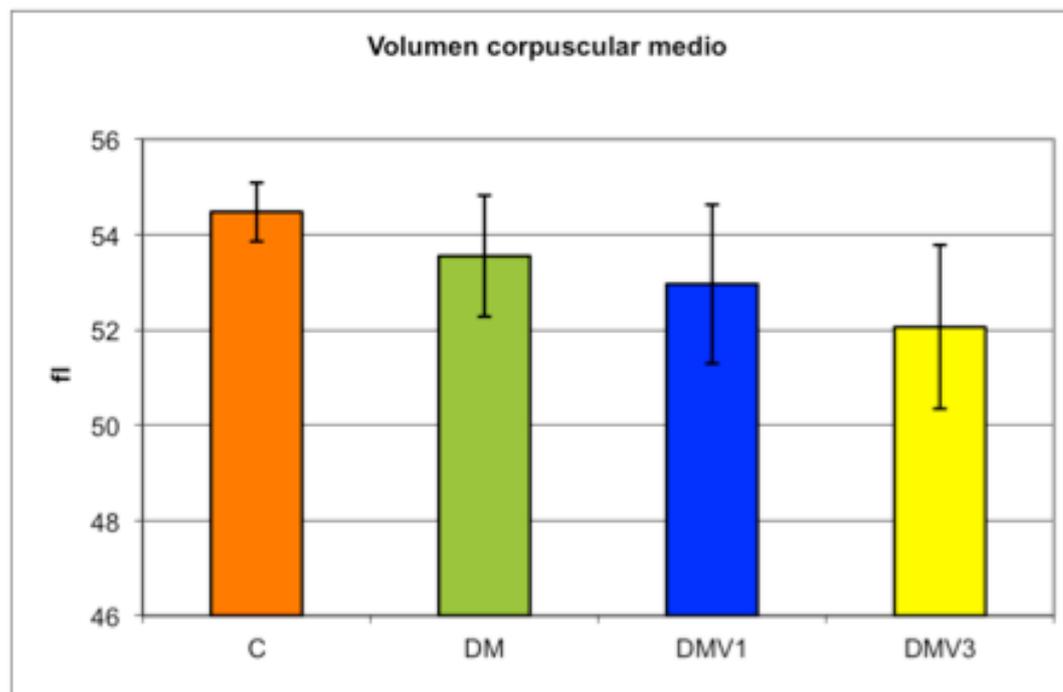


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

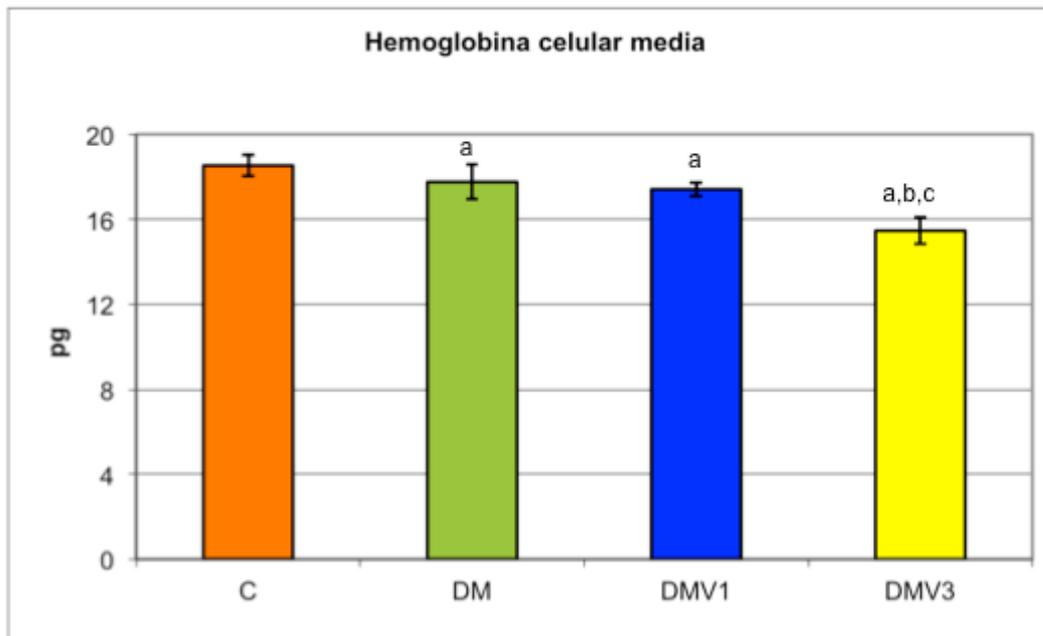
Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento a ratas diabéticas con 3mg, V/día disminuye la absorción y la retención de Fe y los niveles de Fe sérico en comparación con las ratas diabéticas no tratadas, aproximándose a los valores a los de las ratas control. Estos hechos, como se ha indicado anteriormente, pensamos son consecuencia del descenso de la ingesta (Tabla 25). Sin embargo, los niveles de transferrina, ferritina, ALT y PCR permanecen en valores semejantes a los encontrados en ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día, pero se aprecia un fuerte incremento de los niveles circulantes de IL-6, observándose una relación dosis efecto (Tabla 26). Junto a estos cambios se observa un empeoramiento de los parámetros hematológicos, como lo pone de manifiesto el descenso de la Hb, MCV, HCM y CHCM (Tabla 26).



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



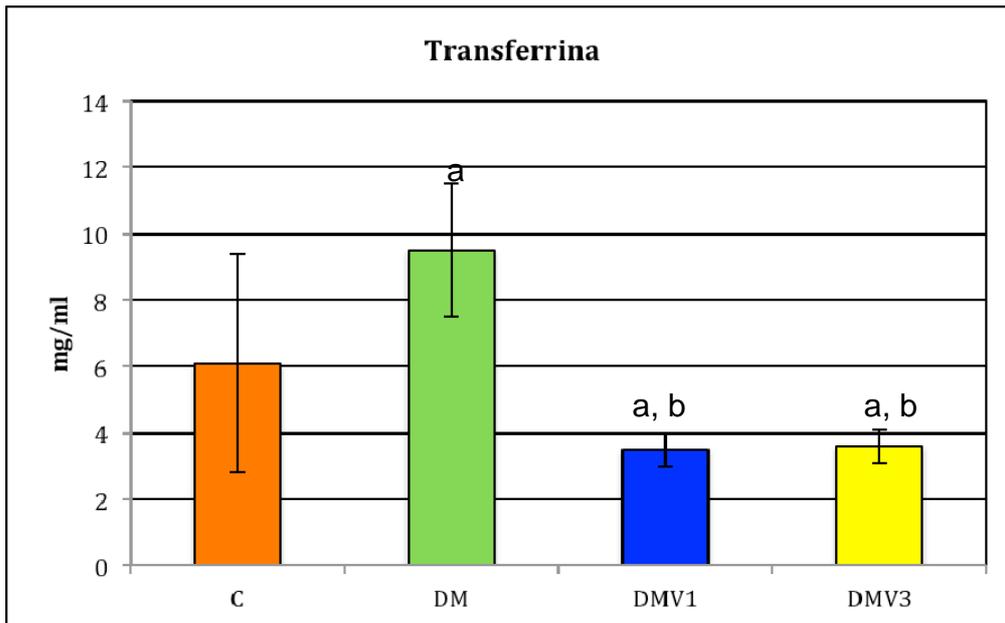
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

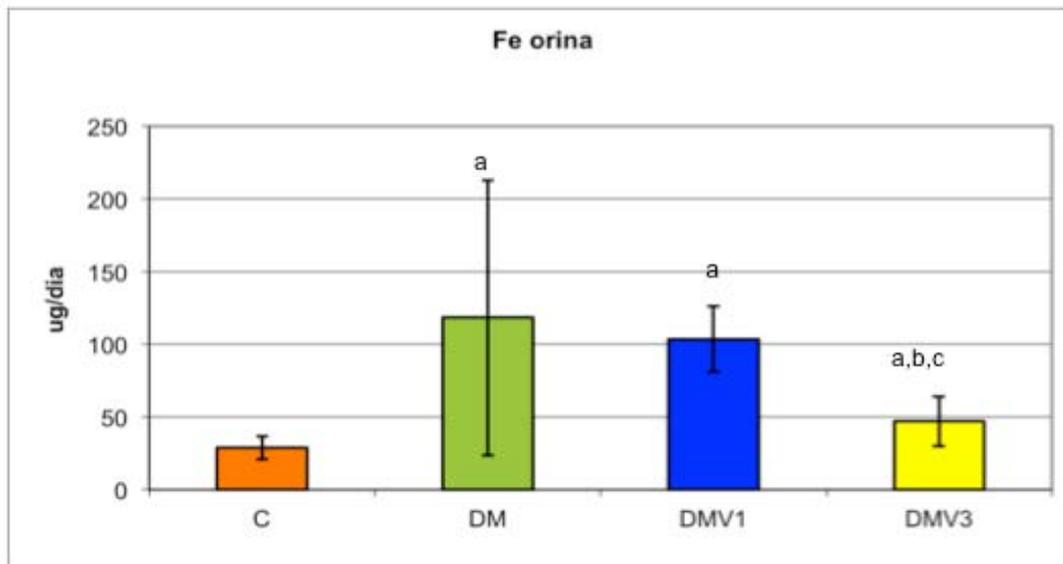
En un trabajo anterior también ha encontrado un descenso de los parámetros hematológicos de ratas sanas tratadas con vanadio (74). Estos hechos podrían deberse a que el aumento de la dosis de vanadio, ha potenciado el proceso inflamatorio que puede favorecer la reducción de la vida media de los eritrocitos por la activación de los macrófagos (96) y la hemólisis, como consecuencia de un aumento de la peroxidación lipídica de los eritrocitos (79).

A esta dosis (3mgV/día) el descenso de la transferrina circulante podría dar lugar a que se excediera su % de saturación y facilitar que el hierro formara complejos con otras proteínas plasmáticas (lactoferrina) y aniones orgánicos (citrato).



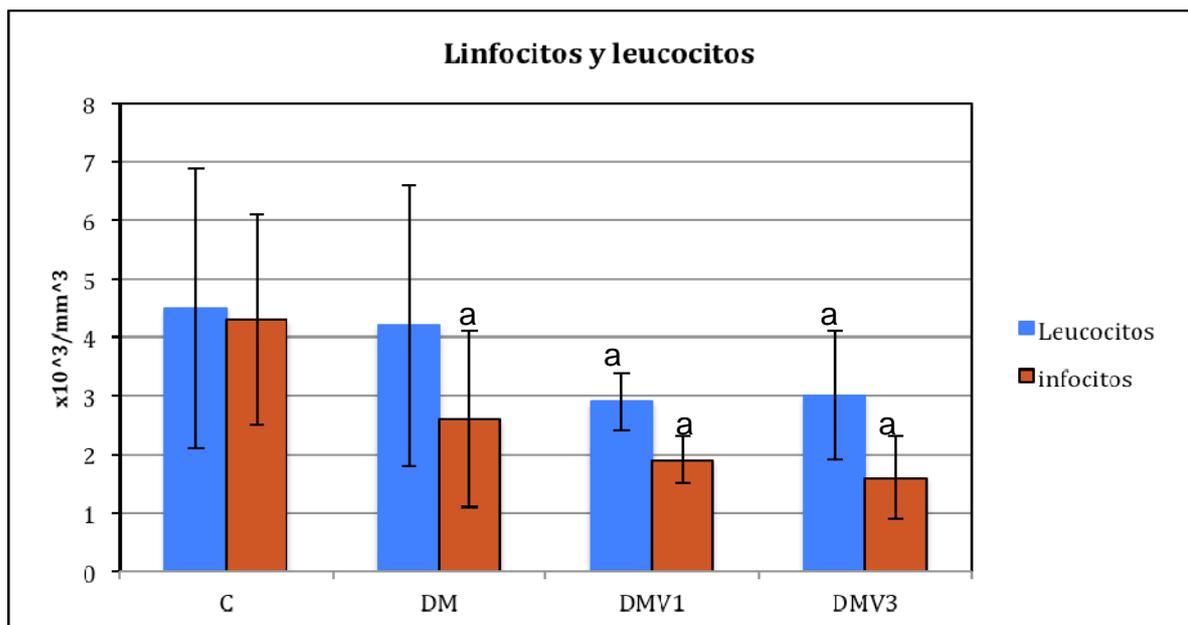
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

Estos ligandos de hierro no transferrina (NTBI) son ávidamente captados por macrófagos, hepatocitos y otras células parenquimatosas (miocitos cardiacos) (223). Además, se conoce que la transferrina juega un importante papel en el transporte de vanadio (47, 57). Los altos niveles circulantes de este elemento puede haber desplazado al Fe de la transferrina incrementan el hierro transportado por NTBI, lo que justificaría el incremento de la excreción urinaria de Fe (cuando se compara con las ratas control) (Tabla 25) y facilitaría la sobrecarga de hierro en los tejidos (Tabla 29).



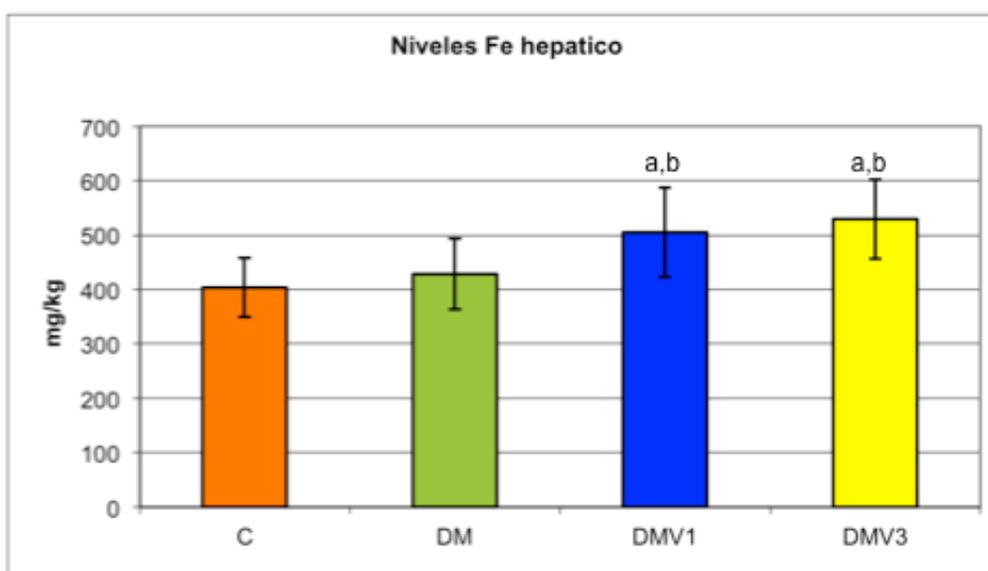
Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

El descenso en el número de linfocitos (Tabla 26) parece ser la principal causa de la leucopenia provocada por el tratamiento. Sin embargo, no existe consenso en relación al efecto del vanadio sobre el número de leucocitos (79, 201).

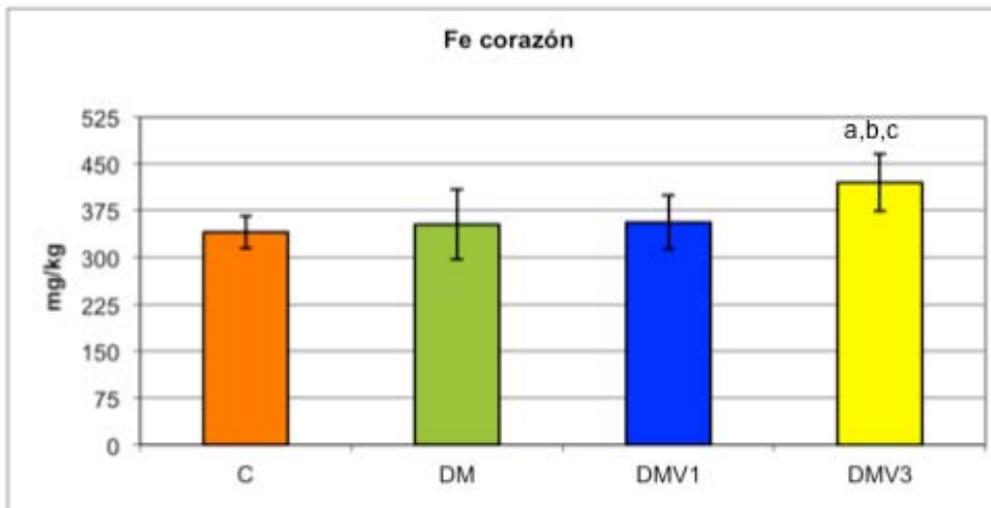


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

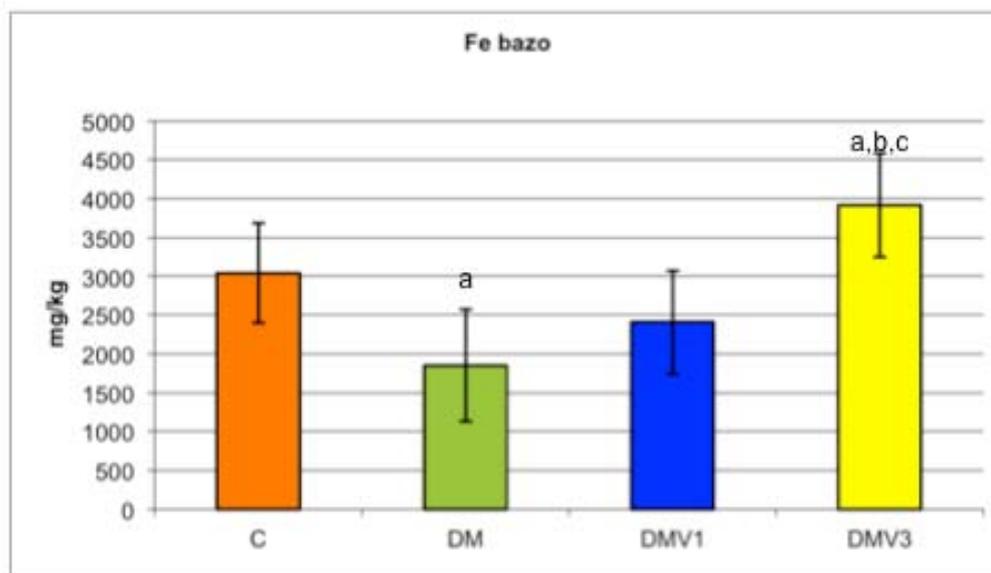
El tratamiento con 3mg V/día produce un incremento significativo del contenido de hierro en el hígado, bazo y corazón (Tabla 29), posiblemente debido a la mayor captación por hepatocitos, macrófagos y miocitos cardiacos de Fe libre y ligandos de hierro no transferrina (NTBI). El incremento del contenido de hierro en el corazón pone de manifiesto la existencia de una evidente sobrecarga de Fe. El corazón es un órgano donde el hierro se deposita cuando se encuentran saturados los almacenes corporales para este elemento.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

La sobrecarga de hierro encontrada podría encontrarse mediada por incremento en la hepcidina. La hepcidina es una hormona peptídica que regula negativamente los principales flujos de entrada de Fe al plasma: absorción intestinal, liberación desde los macrófagos y del hierro almacenado en los

hepatocitos. La síntesis de la hepcidina se encuentra regulada por el hierro hepático, plasmático y por las necesidades de hierro para la eritropoyesis (223). Sin embargo, la inflamación, principalmente a través de la IL-6 puede activar la transcripción de la hepcidina. Por tanto, actualmente se considera a la hepcidina una proteína de fase aguda, ligada a procesos inflamatorios y que conduce a una sobrecarga de hierro al incrementar la captación de hierro en los diferentes tejidos (75, 196).

De acuerdo con los comentarios anteriores, el fuerte incremento de los niveles plasmáticos de IL-6 encontrado en el grupo tratado con 3mgV/día, justifica la aparición de los depósitos tisulares encontrados (Tabla 28).

Las correlaciones encontradas entre ingesta de vanadio y niveles plasmáticos de transferrina ($r = - 0.41$; $P < 0.05$), ferritina ($r = - 0.57$; $P < 0.01$), el número de glóbulos blancos ($r = - 0.56$; $P < 0.001$), hemoglobina ($r = - 0.68$; $P < 0.001$), MCV ($r = - 0.47$; $P < 0.01$), PCR ($r = 0.76$; $P < 0.001$), IL-6 ($r = 0.64$; $P < 0.01$) contenido de Fe en el hígado ($r = 0.46$; $P < 0.01$) y en el corazón ($r = 0.43$; $P < 0.05$), apoyan los comentarios anteriores.

4.2.5.- Sobre el estado total antioxidante del suero y actividad de enzimas que participan en la defensa oxidativa en el hígado (Tabla 30).

Es conocido que la sobrecarga de hierro podría dar lugar a alteraciones

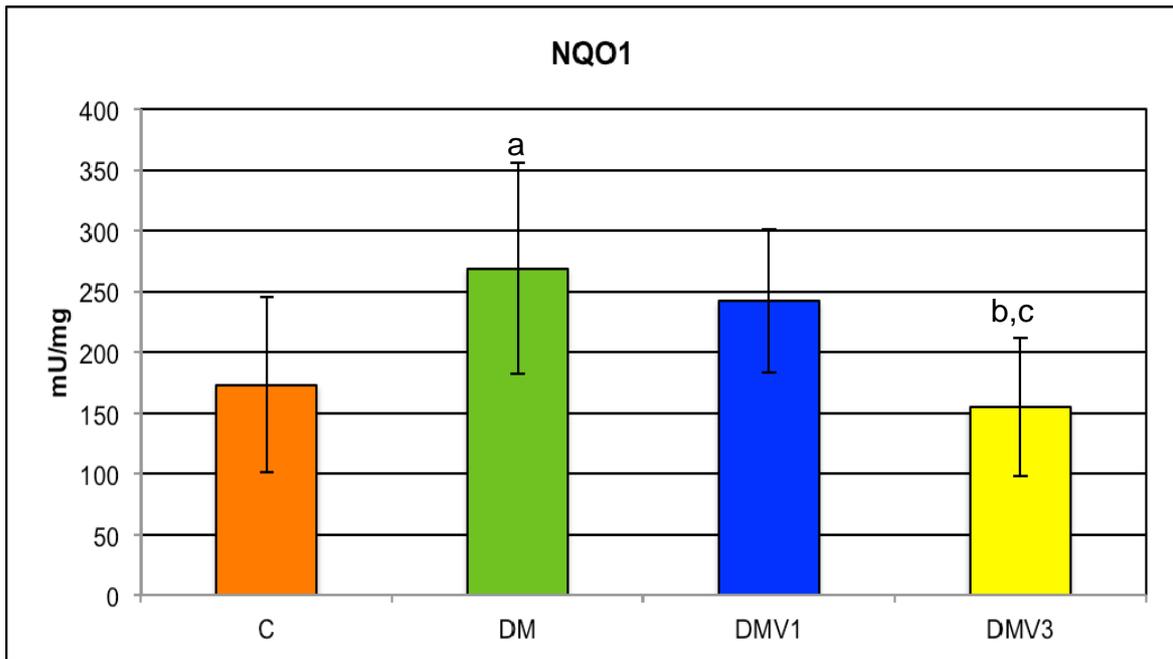
funcionales de los órganos afectados. El vanadio junto a la acumulación de hierro ocasionada por el tratamiento podría causar daños tisulares, presumiblemente por generación de especies reactivas de oxígeno a través de diversas reacciones como la reacción de Fenton (75).

Con el fin de conocer si el tratamiento y/o sobrecarga de hierro en los tejidos afectaba el estado oxidativo se determinó el estado total antioxidante del suero (TAS), y la actividad de un conjunto de enzimas que participan en la defensa antioxidante (Tabla 30). Para la realización de este estudio se ha elegido el hígado por ser un órgano de gran relevancia en la regulación del metabolismo del Fe. Con el fin de disponer de una visión más completa de los fenómenos relacionados con la defensa antioxidante en las ratas diabéticas no tratadas y tratadas con vanadio, en el presente apartado se han incorporado a los resultados originales otros publicados anteriormente por nuestro grupo de trabajo (66, 74)

Se ha sugerido que la patogénesis y la progresión de la diabetes se encuentran asociadas a un incremento del estrés oxidativo. Los resultados obtenidos mostraron que en las ratas diabéticas no tratadas disminuye el TAS sérico, mientras que en el hígado incrementa la actividad de la GPx y la quinona-oxireductasa 1 (NQO1), disminuye la actividad de la GST y CAT y no muestran cambios significativos la SOD, GR, los niveles de MDA y la producción de grupos carbonilos proteicos. El incremento de la actividad de la GPx podría estar dirigido a impedir la formación de radicales prooxidantes

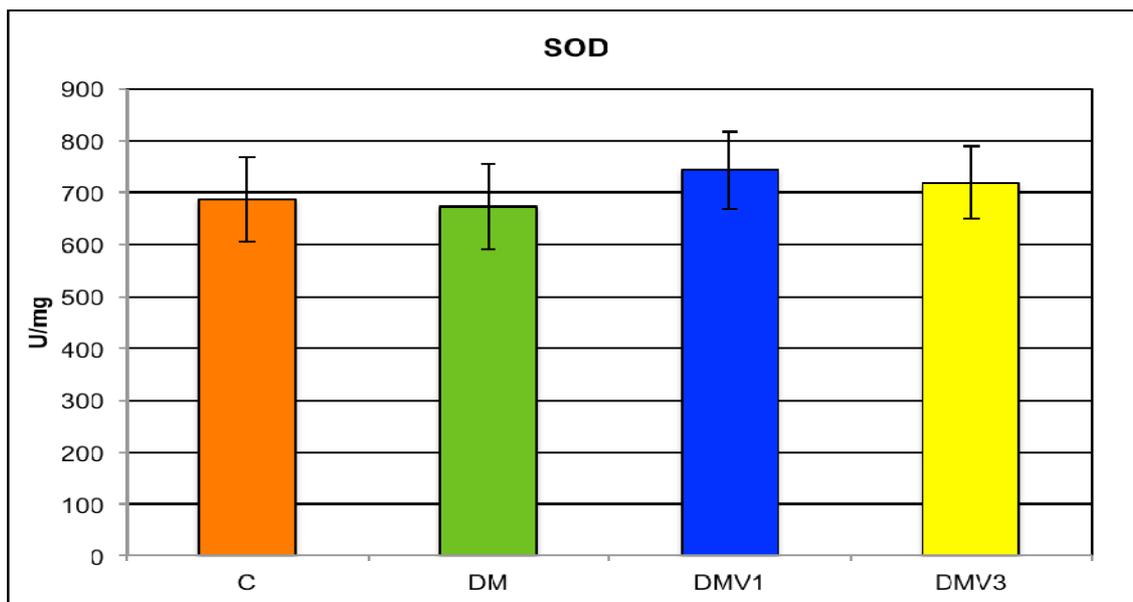
derivados de la hiperglucemia. Además, el incremento de la GPx también podría encontrarse asociado a un incremento del Se hepático encontrado en este grupo (74). Es conocido que la actividad de la GPx hepática se encuentra directamente asociada al estado nutricional en selenio. El descenso de la actividad de la GST podría encontrarse relacionado con los menores niveles de GSH. Se ha descrito un descenso de los niveles de GSH en los eritrocitos de pacientes diabéticos (224).

Estudios anteriores apoyan los resultados obtenidos con respecto a la actividad de SOD y CAT en ratas diabéticas no tratadas. Jang et al. en 2000 y Sadi y Güray en 2009 no encuentran cambios significativos en la actividad de la SOD (225, 226), mientras que Abou-Seif y Youssef (227) observan un descenso en la actividad de la CAT. La quinona-oxireductasa 1 (NQO1) es una enzima que cataliza la reducción de quinona, por tanto, protege a la célula del daño oxidativo. Se ha comprobado que en animales experimentales la actividad de la NQO1 incrementa en respuesta a xenobiótico oxidantes, metales pesados y carcinogénesis, lo que sugiere que este enzima puede constituir un sistema de protección contra los efectos tóxicos de estos agentes (228).

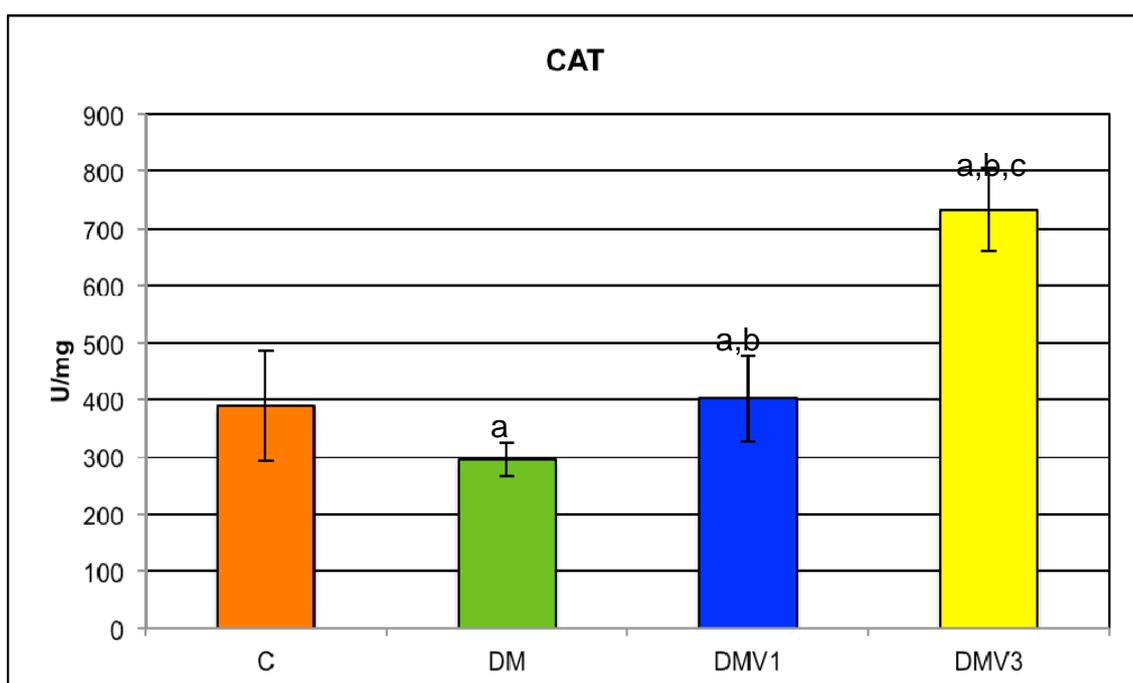


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

En nuestra opinión, el incremento de la actividad de la NQO1 en las ratas diabéticas podría favorecer una menor formación de especies reactivas de oxígeno, lo cual podría explicar la ausencia de cambios de la SOD junto con el descenso en la actividad de la CAT, en este grupo.

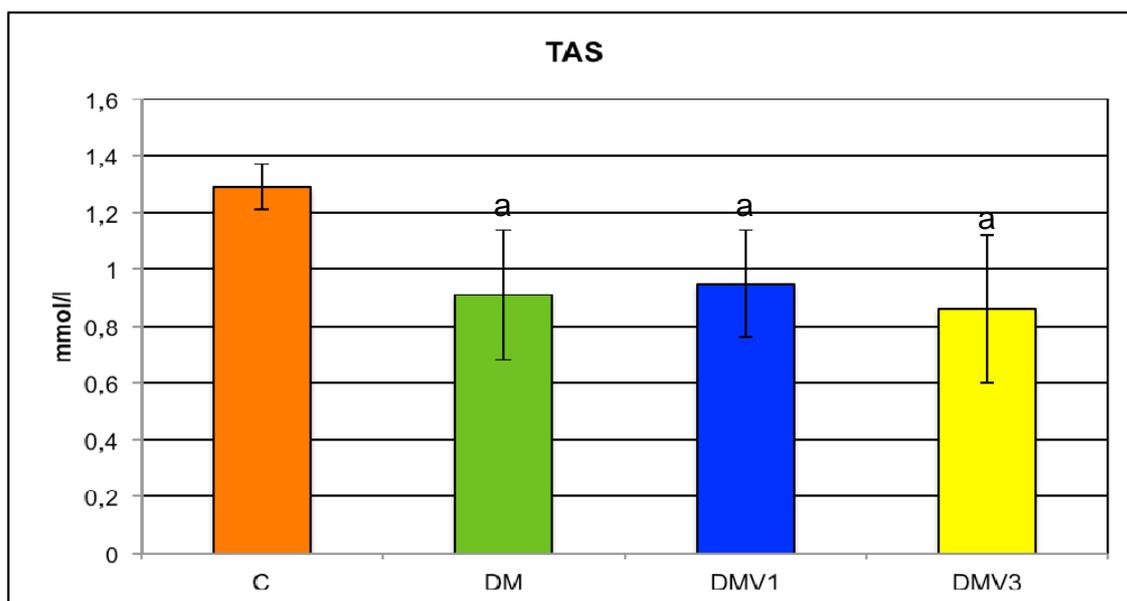


Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

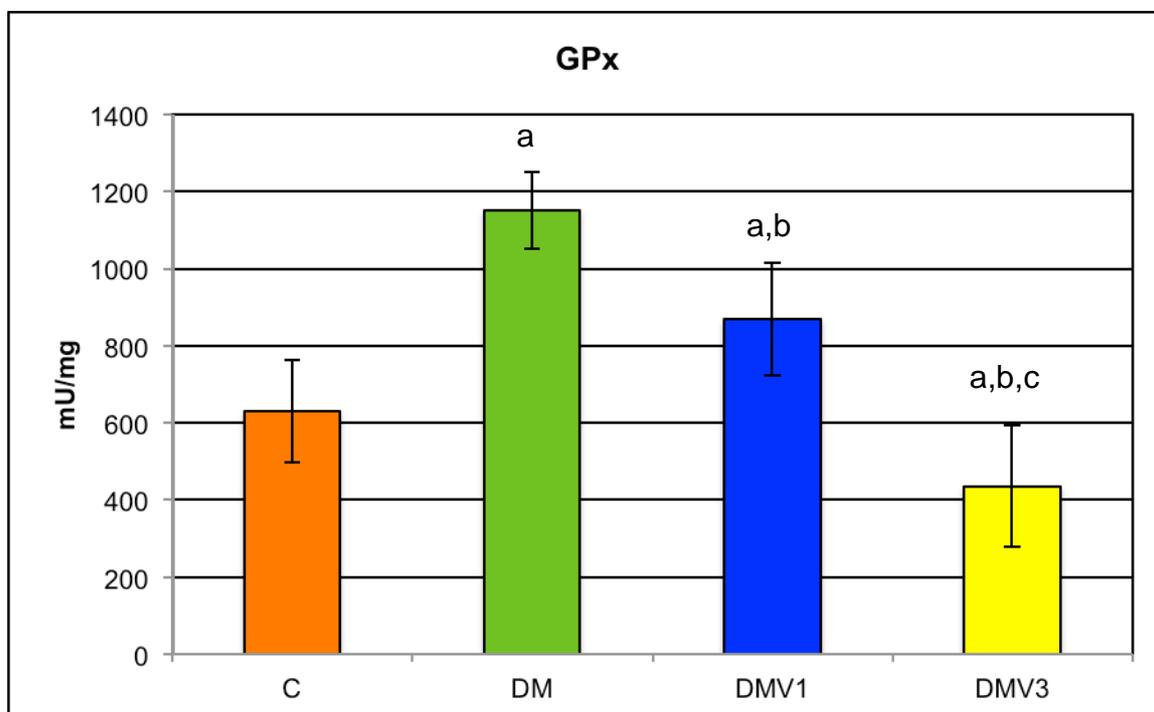
El tratamiento con vanadio a las ratas diabéticas no modifica el estado total antioxidante (TAS), independientemente de la dosis empleada (Tabla 30). En estudios anteriores (77), tampoco han observado cambios significativos en el TAS tras el tratamiento con vanadio.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

Se ha sugerido que la exposición al vanadio da lugar a una depleción del pool celular de GSH, lo que incrementaría la vulnerabilidad a la peroxidación lipídica (66, 75, 229, 230). Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que el tratamiento con 1mg V/día a ratas diabéticas disminuye la actividad de la GPx e incrementa la de CAT hepáticas cuando se comparan con las ratas diabéticas no tratadas. El descenso de la actividad de la GPx parece encontrarse mas relacionado con la depleción de Se en el hígado (66), mientras

que los incrementos de la actividad de la CAT parecen responder a el incremento de la concentración de Fe en este órgano.



Valores medios semanales \pm DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV1 (ratas diabéticas STZ tratadas con 1mgV/día); DMV3 (ratas diabéticas STZ tratadas con 3mgV/día). ^a Diferente del grupo C; ^b Diferente del grupo DM; ^c Diferente del grupo DMV1. $P < 0.05$.

No se aprecian cambios significativos en la SOD y MDA aunque ambos parámetros tienden a incrementar.

El tratamiento con 3mg V/día presenta un claro efecto antidiabético, normaliza la glucemia y la ingesta de alimento. Sin embargo, ocasiona un fuerte descenso en la actividad de de la GPx, que como en la dosis más baja podría asociarse a la fuerte depleción hepática de Se que produce (74).

En anteriores estudios (72, 229) se ha sugerido que la depleción de GSH puede ser la responsable del descenso de la actividad de la GST y este hecho también contribuiría a la menor actividad de la GPx. Además, en este grupo de ratas, también se ha observado un incremento de la actividad de la CAT y un descenso de la NQO1. Estudios recientes “in Vitro” desarrollados en células HepG2 (231), han mostrado que la exposición al vanadio (metavanadato amónico) a bajas concentraciones no modifica la actividad de la NQO1, pero dicha actividad disminuye cuando aumenta la dosis de vanadio. Estos autores sugieren que el vanadio inhibe la expresión génica de esta enzima. Aunque en nuestro estudio hemos empleado un compuesto diferente de vanadio, los resultados obtenidos “in vivo” coinciden con los mencionados anteriormente. Con una dosis de 1mg V/día, no se observan cambios significativos, mientras que cuando se suministran 3 mg V/día a ratas diabéticas la actividad de la enzima disminuye.

El descenso de la actividad de la GPx y NQO1 junto con el incremento de los depósitos hepáticos de Fe podría haber incrementado la producción de radicales hidroxilo. El aumento de la actividad de la CAT es insuficiente para impedir el incremento del daño producido a los lípidos (niveles de peroxidación lipídica (MDA)) y a las proteínas (grupos carbonilo). Actualmente la cuantificación del daño producido a lípidos (peroxidación) y proteínas (formación de grupos carbonilo) constituyen un método indirecto de determinar la producción de radicales libres. Los resultados obtenidos para dichos

parámetros nos indican que el vanadio a la dosis de 3 mg V/día produce en el hígado un incremento de la peroxidación lipídica en relación a las ratas control y diabéticas y de la formación de grupos carbonilo cuando se comparan con las ratas control. Por tanto, podemos decir que a nivel hepático la mayor dosis empleada ha ocasionado daños tanto a nivel lipídico como a nivel proteico.

Las correlaciones lineales encontradas entre ingesta de vanadio y actividad de la GPx ($r = -0.70$; $P < 0.001$), GST ($r = -0.68$; $P < 0.001$), CAT ($r = 0.83$; $P < 0.001$) y MDA ($r = 0.62$; $P = 0.001$) y las correlaciones entre el contenido hepático de Fe y GST ($r = -0.47$; $P < 0.05$), CAT ($r = 0.38$; $P < 0.05$), MDA ($r = 0.61$; $P < 0.01$), apoyan los comentarios anteriores.

6. CONCLUSIONES

Sobre los estudios realizados en ratas deficientes en Mg

1^a. La ingesta de la dieta deficiente en magnesio produce una hipomagnesemia que va acompañada de un incremento de la resistencia a la insulina, medida por el índice HOMA-IR, y de la glucemia. El tratamiento con 6,22 mg bismaltolato de oxovanadio (BMOV)/día a ratas deficientes en magnesio corrige las desviaciones ocasionadas por la hipomagnesemia, devolviendo los niveles de glucosa, insulina y el índice HOMA-IR a valores semejantes a los controles.

2^a. El tratamiento con BMOV a ratas deficientes en magnesio corrige los incrementos en la absorción de hierro ocasionados por la ingesta de la dieta deficiente, pero no mejora la mayor retención de hierro ocasionada por el déficit de magnesio.

3^a. Tanto el tratamiento con BMOV a ratas sanas, como la ingesta de una dieta deficiente de magnesio tienden a depositar hierro en los tejidos. El tratamiento con BMOV a ratas deficientes en magnesio produce incrementos significativos del contenido de hierro en todos los tejidos estudiados excepto en el músculo, lo que responde a una suma de los efectos de la deficiencia y el tratamiento.

4^a. Los mayores depósitos tisulares de hierro ocasionados por la exposición a BMOV de las ratas deficientes en magnesio pueden estar ocasionados por a la mayor retención del catión y/o las alteraciones hematológicas ocasionadas por el tratamiento.

Sobre los estudios realizados en ratas diabéticas STZ

5^a. El tratamiento con 6,22 mg bismaltolato de oxovanadio (BMOV)/día a ratas diabéticas STZ mantiene la ingesta de alimentos y agua y los niveles de glucosa en ayunas en valores próximos a los de las ratas diabéticas no tratadas, por lo que podemos decir que no ejerce ningún efecto antidiabético. Sin embargo, el tratamiento con 18,66 mg BMOV/día (3mgV/día) día ejerce un claro efecto antidiabético al normalizar la ingesta de alimentos y agua y la glucemia en ayunas desde la primera semana de tratamiento.

6^a. Las dos dosis de BMOV ensayadas no modifican significativamente el porcentaje de absorción del hierro, pero corrigen la menor retención de hierro ocasionada por la diabetes.

7^a. El tratamiento con la dosis más alta ensayada, 18,66 mg BMOV/día, incrementa significativamente los niveles séricos de Proteína-C-Reactiva, Interleucina-6 y Alanina Aminotransferasa, y disminuye significativamente los de Hemoglobina y los índices: Volumen Corpuscular Medio, Hemoglobina Celular Media y Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media. Estos resultados nos indican la presencia de un proceso inflamatorio que puede favorecer la aparición de un estado anémico.

8^a. El tratamiento con la dosis más alta ensayada, ocasiona un incremento significativo del contenido de hierro en el hígado, bazo y corazón. Esta sobrecarga de hierro en los tejidos apoya la hipótesis de que los cambios hematológicos encontrados se encuentran ligados a la presencia de un proceso inflamatorio. Además, el proceso inflamatorio también puede haber favorecido la sobrecarga tisular de hierro.

9^a. El tratamiento con 18,66 mg BMOV/día ocasiona un daño oxidativo hepático cuantificado por el incremento de la peroxidación lipídica (aumento de los niveles de malondialdehído), y de la oxidación proteica (incremento de la presencia de grupos carbonilo proteicos).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15:539-53.
2. American Association of Diabetes. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 2011;34:562-569
3. Nurko S. Anemia in chronic kidney disease: causes, diagnosis, treatment. *Cleve Clin J Med* 2006;73:289–97.
4. Astor BC, Muntner P, Levin A, Eustace JA, Coresh J. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med.* 2002;162:1401-8.
5. West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med.* 2000;17:171-80
6. Wachnik A, Biró G, Biró L, Gergely A, Antal M. Hepatic lipid peroxidation and trace elements--nutritional status in streptozotocin-induced diabetic rats. *Z Ernährungswiss.* 1992;31:103-9.

7. Wachnik A, Biró G, Biró L, Gergely A, Antal M Hepatic lipid peroxidation and trace elements--nutritional status in streptozotocin-induced diabetic rats. *Z Ernährungswiss.* 1992;31:103-109.
8. Ward DT, Hamilton K, Burnand R, Smith CP, Tomlinson DR, Riccardi D. Altered expression of iron transport proteins in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:79-84.
9. Fernández-Real JM, Ricart-Engel W, Arroyo E, Balançá R, Casamitjana-Abella R, Cabrero D, Fernández-Castañer M, Soler J. Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care.* 1998;21:62-8.
10. Cai L, Chen S, Evans T, Cherian MG, Chakrabarti S. Endothelin-1-mediated alteration of metallothionein and trace metals in the liver and kidneys of chronically diabetic rats. *Int J Exp Diabetes Res.* 2002;3:193-8.
11. Mataix Verdú, Llopis Gonzalez; Capítulo 9: Minerales/ editor: Mataix Verdú; *Nutrición y alimentación humana*; 2ª. Edición, Madrid; Ergon, 299-300. 2009
12. Badmaev V, Prakash S, Majeed M. Vanadium : A Review of its Potential Role in the Fight Against Diabetes. *Journal Of Alternative And Complementary Medicine.* 1991; 5(3), 273-291

13. B.M. Lyonnet, E. Martz Martin. L'emploi therapeutiques des derives du vanadium. *La Presse Med.* 1899; 7: 191–192.
14. M. Laran, *La Presse Med.* 1899; 7: 190–191.
15. K.H. Thompson, C. Orvig, Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Trans.* 2006; 761–764.
16. J. Selbin. The chemistry of oxovanadium (IV). *Chem. Rev.* 1965; 65: 153–175.
17. H.A. Schroeder, J.J. Balassa, I.H. Tipton. Abnormal trace metals in man-vanadium. *J. Chron. Dis.* 1963; 16: 1047–1071.
18. L.L. Hopkins Jr., B.E. Tilton. Metabolism of trace amounts of vanadium 48 in rat organs and liver subcellular particles. *Am. J. Physiol.* 1966; 211: 169–172.
19. L.L. Hopkins Jr., H.E. Mohr. Proceedings: Vanadium as an essential nutrient. *Fed. Proc.* 1974; 33: 1773–1775.
20. K. Schwarz, D.B. Milne. Growth effects of vanadium in the rat. *Science* 174 (1971) 426–428.

21. L.A. Beauge, I.M. Glynn. A modifier of (Na⁺ + k⁺) atpase in commercial ATP. *Nature* 1977; 268: 355–356.
22. L.C. Cantley Jr., L. Josephson, R. Warner, M. Yanagisawa, C. Lechene, G. Guidotti. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 1977; 252: 7421–7423.
23. L. Josephson, L.C. Cantley Jr. Isolation of a potent (Na-K)ATPase inhibitor from striated muscle. *Biochemistry* 1977; 16: 4572–4578.
24. L.A. Beauge, I.M. Glynn. Commercial ATP containing traces of vanadate alters the response of (Na⁺ + K⁺) ATPase to external potassium. *Nature* 1978; 272: 551–552.
25. L.C. Cantley Jr., M.D. Resh, G. Guidotti. Vanadate inhibits the red cell (Na⁺, K⁺) ATPase from the cytoplasmic side. *Nature* 1978; 272: 552– 554.
26. S.J.D. Karlsh, L.A. Beauge, I.M. Glynn. Vanadate inhibits (Na⁺ + K⁺)ATPase by blocking a conformational change of the unphosphorylated form. *Nature* 1979; 282: 333–335.

27. J.A. Gordon. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Meth. Enzymol.* 1991; 211: 477–482.
28. D.W. Boyd, K. Kustin, Vanadium: A versatile biochemical effector with an elusive biological function. *Adv. Inorg. Biochem.* 1984; 6: 311–363.
29. T. Ramasarma, F.L. Crane. Does vanadium play a role in cellular regulation? *Curr. Top. Cell. Reg.* 1981; 20: 247–301.
30. C.E. Heyliger, A.G. Tahiliani, J.H. McNeill. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 1985; 227: 1474–1477.
31. J.H. McNeill, V.G. Yuen, H.R. Hoveyda, C. Orvig. Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimic. *J. Med. Chem.* 1992; 35: 1489–1491.
32. P. Caravan, L. Gelmini, N. Glover, F.G. Herring, H. Li, J.H. McNeill, S.J. Rettig, I.A. Setyawati, E. Shuter, Y. Sun, A.S. Tracey, V.G. Yuen, C. Orvig. Reaction Chemistry of BMOV, Bis(maltolato)oxovanadium(IV) - A Potent Insulin Mimetic Agent *J. Am. Chem. Soc.* 1995 ;117:12759–12770.

33. V.G. Yuen, C. Orvig, J.H. McNeill. Comparison of the glucose lowering properties of vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium (IV) following acute and chronic administration *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1995; 73: 55–64.
34. C. Orvig, K.H. Thompson, M. Battell, J.H. McNeill. Vanadium compounds as insulin mimics. *Met. Ions Biol. Syst.* 1995; 31: 575–594.
35. K.H. Thompson, V.G. Yuen, J.H. McNeill, C. Orvig, Chemical and pharmacological studies of a new class of antidiabetic vanadium complexes, in: A.S. Tracey, D.C. Crans (Eds.), *Vanadium Compounds. Chemistry, Biochemistry, and Therapeutic Applications*, ACS Symposium Series, vol. 711, American Chemical Society, Washington, DC, 1998, pp. 329–343.
36. H. Sakurai, K. Tsuchiya, M. Nukatsuka, J. Kawada, S. Ishikawa, H. Yoshida, M. Komatsu. Insulin-mimetic action of vanadyl complexes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 1990;8: 193–200.
37. I.A. Setyawati, K.H. Thompson, Y. Sun, D.M. Lyster, C. Vo, V.G. Yuen, M. Battell, J.H. McNeill, T.J. Ruth, S. Zeisler, C. Orvig. Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of ⁴⁸V-labeled compounds in rats *J. Appl. Physiol.* 1998 (8) 569–575.

38. K.H. Thompson, C.A. Barta, C. Orvig. Metal complexes of maltol and close analogues in medicinal inorganic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 2006; 35: 545–556.
39. Nielsen/ chapter 22 Vanadium/ editors: O'Dell and Sunde; ,*Handbook of nutritionally essential mineral elements*;New York; Marcel Dekker / 619–628.1997
40. Nielsen FH/ chapter 16 ultratrace minerals/editors: Shils, Olson et al;*Modern nutrition in health and disease*; 9th edition,Pennsylvania USA; Lippincott Williams & Wilkins; 1999; 297-299.
41. Setyawati, I. A., Thompson, K. H., Yuen, V. G., Sun, Y., Batell, M., Lyster, D. M., Vo, C., Ruth, T. J., Zeisler, S., McNeill, J. H., Orvig, C. . Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of ⁴⁸V-labeled compounds in rats *J. Appl. Physiol.* *J. Appl. Physiol.*, 1998; 84: 569-575
42. Zhang SQ, Zhong XY, Chen GH, Lu WL, Zhang Q. The anti-diabetic effects and pharmacokinetic profiles of bis (maltolato) oxovanadio in non-diabetic and diabetic rats. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(1):99-105.
43. K.H. Thompson, B.D. Liboiron, G.R. Hanson, C. Orvig, In vivo coordination chemistry and biolocalization of bis(ligand)oxovanadium(IV) complexes for

diabetes treatment, in: J.L. Sessler, S.R. Doctrow, T.J. McMurry, S.J. Lippard (Eds.), *Medicinal Inorganic Chemistry*, ACS Symposium Series, vol. 903, American Chemical Society, Washington, DC, 2005, pp. 384–399

44. C. Orvig, M.J. Abrams. *Medicinal inorganic chemistry: introduction* Chem. Rev. 1999; 99: 2201–2203.

45. B. Song, N. Aebischer, C. Orvig. Reduction of [VO₂(ma)₂]⁻ and [VO₂(ema)₂]⁻ by ascorbic acid and glutathione: kinetic studies of pro-drugs for the enhancement of insulin action. *Inorg. Chem.* 2002; 41: 1357–1364.

46. T. Kiss, E. Kiss, E. Garribba, H. Sakurai. Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J. Inorg. Biochem.* 2000; 80: 65–73.

47. Tamas Jakusch, Dominik Hollender, Eva Anna Enyedy, Cristina Sanchez Gonzalez, Maria Montes-Bayon, Alfredo Sanz-Medel, Joao Costa Pessoa, Isabel Tomaz and Tamas Kiss. Biospeciation of various antidiabetic VIVO compounds in serum. *Dalton Trans.* 2009; 7 :2428-37

48. Katherine H. Thompson, Chris Orvig. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Volume 100, Issue 12, 2006; 1925–1935

49. Y. Shechter, J. Li, J. Meyerovitch, D. Gefel, R. Bruck, G. Elberg, D.S. Miller, A. Shisheva. Insulin-like actions of vanadate are mediated in an insulin-receptor-independent manner via non-receptor protein tyrosine kinases and protein phosphotyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biochem.* 1995; 153: 39–47.
50. G. Elberg, Z. He, J. Li, N. Sekar, Y. Shechter. Vanadate activates membranous nonreceptor protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *Diabetes* 1997; 46: 1684–1690.
51. J. Li, G. Elberg, N. Sekar, Z.B. He, Y. Shechter. Antilipolytic actions of vanadate and insulin in rat adipocytes mediated by distinctly different mechanisms. *Endocrinology* 1997; 138: 2274–2279.
52. E. Tsiani, I.G. Fantus, Trends Endocrinol. Vanadium compounds biological actions and potential as pharmacological agents. *Metab.* 1997; 8: 51–58.
53. E. Shafrir, S. Speilman, I. Nachliel, M. Khamaisi, H. Bar-On, E. Ziv. Treatment of diabetes with vanadium salts: general overview and amelioration of nutritionally induced diabetes in the *Psammomys obesus* gerbil. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2001; 17: 55–66.

54. N. Sekar, J. Li, Y. Shechter. Vanadium salts as insulin substitutes: mechanisms of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1996; 31: 339–359.
55. I.G. Fantus, E. Tsiani. Multifunctional actions of vanadium compounds on insulin signaling pathways: evidence for preferential enhancement of metabolic versus mitogenic effects. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 182: 109–119.
56. Domingo. Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol Cell Biochem.* 2000; 203:185-7.
57. T. Iglesias-González, C. Sánchez-González, M. Montes-Bayón, J. Llopis-González, A. Sanz-Medel. Absorption, transport and insulin-mimetic properties of bis(maltolato)oxovanadium (IV) in streptozotocin-induced hyperglycemic rats by integrated mass spectrometric techniques. *Anal Bioanal Chem* 2012; 402:277–285
58. Sánchez C, Torres M, Bermúdez-Peña MC, Aranda P, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient rats. *Magnes Res.* 2011;24:196-208.
59. Marzban L, Rahimian R, Brownsey RW, McNeill JH. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium(IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase

and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Endocrinology*. 2002;143:4636-45.

60. Marzban L, Bhanot S, McNeill JH. In vivo effects of insulin and bis(maltolato)oxovanadium (IV) on PKB activity in the skeletal muscle and liver of diabetic rats. *Mol Cell Biochem*. 2001;223:147-57.

61. Kawabe K, Yoshikawa Y, Adichi Y, Sakurai H. Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes. *Life Sci*. 2006;78:2860-6

62. Crans D; Chemistry and insulin-like properties of vanadium (IV) and vanadium (V) compounds, *J Inorg Biochem*. 2000;80:123-31.

63. Gao LH, Liu WP, Wang BL, Li L, Xie MJ, Li YR, Chen ZH, Chen XZ. Effects of bis(alpha-furancarboxylato)oxovanadium(IV) on non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Clin Chim Acta*. 2006; 368 :173-8.

64. Adachi Y, Yoshikawa Y, Yoshida J, Koderu Y, Katoh A, Takada J, Sakurai H. Improvement of diabetes, obesity and hypertension in type 2 diabetic KKAy mice by bis(allixinato)oxovanadium(IV) complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345: 945-50.

65. Facchini DM, Yuen VG, Battell ML, McNeill JH, Grynblas MD. The effects of vanadium treatment on bone in diabetic and non-diabetic rats. *Bone*. 2006; 38: 368-77.
66. Cristina Sanchez-Gonzalez, Carmen Bermudez-Peña, Fernando Guerrero-Romero, Cristina E. Trenzado, Maria Montes-Bayon, Alfredo Sanz-Medel and Juan Llopis. Effect of bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *British Journal of Nutrition* 2012; 108: 893–899
67. Karmarker. Antidiabetic Activity of the Orally Effective Vanadyl-Poly (γ -Glutamic Acid) Complex in Streptozotocin(STZ)-induced Type 1 Diabetic Mice. *J Biomater Appl*. 2008; 22: 449-64
68. Meyerovitch J, Rothenberg P, Shechter Y, Bonner-Weir S, Kahn CR. Vanadate normalizes hyperglycaemia in two mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1991; 87:1286-94.
69. Goldwasser I, Gefel D, Gershonov E, Fridkin M, Shechter Y. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *J Inorg Biochem*. 2000; 80 :21-5.

70. Dan Wei, Ming Li, Wenjun Ding. Effect of vanadate on gene expression of the insulin signaling pathway in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biol Inorg Chem.* 2007; 12: 1265-73

71. R. Yanardag and S. Tunail. Vanadyl sulfate administration protects the streptozotocin-induced oxidative damage to brain tissue in rats. *Mol. Cell. Biochem.*, 2006; 286: 153–159.

72. M. H. Oster, J. M. Llobet, L. J. Domingo, J. B. German and C. L. Keen. Vanadium treatment of diabetic Sprague-Dawley rats results in tissue vanadium accumulation and pro-oxidant effects. *Toxicology*, 1993; 83: 115–130.

73. A. Scibior, H. Zaporowska and I. Niedzwiecka. Lipid peroxidation in the liver of rats treated with V and/or Mg in drinking water. *J. Appl. Toxicol.*, 2009; 29: 619–628.

74. Cristina Sanchez-Gonzalez, Carmen Bermudez-Peña, Cristina E. Trenzado, Heidi Goenaga-Infante, Maria Montes-Bayon, Alfredo Sanz-Medel, Juan Llopis. Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics*, 2012; 4: 814 – 819

75. M. Valko, H. Morris and M.T.D. Cronin. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Med Chem*. 2005; 12:1161-208
76. Zhao Y, Ye L, Liu H, Xia Q, Zhang Y, Yang X, Wang K. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *J Inorg Biochem*. 2010; 104 :371-8.
77. Scibior A, Zaporowska H, Niedźwiecka I. Lipid peroxidation in the kidney of rats treated with V and/or Mg in drinking water. *J Appl Toxicol*. 2010; 30: 487-96.
78. Scibior A, Zaporowska H. Effects of combined vanadate and magnesium treatment on erythrocyte antioxidant defence system in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010; 30 :153-61.
79. Scibior A, Zaporowska H, Ostrowski J. Selected haematological and biochemical parameters of blood in rats after subchronic administration of vanadium and/or magnesium in drinking water. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2006; 51:287-95.
80. Yanardag R, Tunail S. Vanadyl sulfate administration protects the streptozotocin-induced oxidative damage to brain tissue in rats. *Mol Cell Biochem*, 2006; 286: 153-159.

81. Tanaka K, Waxman L, Goldberg AL. Vanadate inhibits the ATP-dependent degradation of proteins in reticulocytes without affecting ubiquitin conjugation. *J Biol Chem.* 1984; 259: 2803-9.
82. Missenard C, Hansen G, Kutter D, Kremer A. Vanadium induced impairment of haem synthesis. *Br J Ind Med.* 1989; 46: 744-7.
83. L. Toxquil, A. De Piero, V. Courtois, S. Bastida, F. J. Sánchez-Muniz and M.^a P. Vaquero. Deficiencia y sobrecarga de hierro; implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2010; 25: 350-365
84. Conrad M, Umbreit J. Iron Absorption and Transport- An Update. *Am J Hematol* 2000; 64: 287-98.
85. West AR, Oates PS. Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4101-10.
86. Suárez, Heberto; Cimino, Franco; Bonilla, Ernesto. Hierro en el sistema nervioso central: metabolismo y consideraciones fisiopatológicas. *Invest Clín* 1985; 26: 247-322.

87. Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA, Elstner M, Morris CM. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68: 1820-5.
88. Kozirowski D, Friedman A, Arosio P, Santambrogio P, Dziewulska D. ELISA reveals a difference in the structure of substantia nigra ferritin in Parkinson's disease and incidental Lewy body compared to control. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13: 214-8.
89. Friedman A, Galazka-Friedman J, Bauminger ER, Kozirowski D. Iron and ferritin in hippocampal cortex and substantia nigra in human brain—implications for the possible role of iron in dementia. *J Neurol Sci* 2006; 248: 31-4.
90. Sharp P, Srai SK. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4716-24.
91. Darshan D, Anderson GJ. Liver-gut axis in the regulation of iron homeostasis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4737-45.
92. Van Dokkum. The concept of mineral bioavailability. En: Bioavailability of minerals and minor dietary components. Metabolic and technological aspects (MP Vaquero, T García- Arias, A Carbajal, FJ Sánchez-Muniz, eds), Research Signpost,

Trivadrum, pp. 1-18, 2003.

93. Pérez-Granados AM, Navarro MP, Vaquero MP (2003). The frying process. Influence on the bioavailability of dietary minerals. En: Bioavailability of minerals and minor dietary components. Metabolic and technological aspects (MP Vaquero, T García-Arias, A Carbajal, FJ Sánchez-Muniz, eds), Research Signpost, Trivadrum, pp. 95-104.

94. Vaquero MP. Factores que intervienen en la biodisponibilidad mineral. Prevención de deficiencias. Revista de Nutrición Práctica 1998; 2: 15-23.

95. Lynch SR. Iron. In: Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B, eds. Encyclopedia of Human Nutrition, Academic Press, vol. 2, pp. 1153-9, Londres, 1998.

96. Ganz T. Molecular control of iron transport. J Am Soc Nephrol 2007; 18: 394-400.

97. Mckie AT. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. Biochem Soc Trans 2008; 36: 1239-41.

98. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 2005; 202: 199-211.

99. Piperno A, Mariani R, Trombini P, Girelli D. Heparin modulation in human diseases: from research to clinic. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 538-51.
100. Weinstein D, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implication for the anemia chronic disease. *Blood* 2002; 100: 3776-81.
101. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH, MacDonald MLE, Franchini PL, Dubé MP y cols. Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet* 2004; 36: 77-82.
102. De Domenico I, Nemeth E, Nelson JM, Phillips JD, Ajioka RS, Kay MS, Kushner JP, Ganz T, Ward DM, Kaplan J. The hepcidin-binding site on ferroportin is evolutionarily conserved. *Cell Metab* 2008; 8: 146-56.
103. Organización Mundial de la Salud (OMS). En línea [<http://www.who.int/es/>] 20 de mayo de 2009.
104. Muñoz M, Romero A, Morales M, Campos A, García-Erce JA, Ramírez G. Iron metabolism, inflammation and anemia in critically ill patients. A cross-sectional study. *Nutr Hosp* 2005; 20: 115-20

105. Vaiopoulos G, Papanikolaou G, Politou M, Jibreel I, Sakellaropoulos N, Loukopoulos D. Arthropathy in juvenile hemochromatosis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 227-30.
106. Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron deficiency and overload. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 40-61.
107. Wolff F, Carreño N, Armas M, Caravallo A. Hemocromatosis Hereditaria. Complicaciones Reumatológicas. *Reumatología* 2004; 20: 139-48
108. Fiel MI, Schiano T. A woman with chronic anemia and cholestatic liver disease. *Hepatology* 2009; 49: 1390-1.
109. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res* 2003; 531: 81-92
110. Sarriá B, Navas-Carretero S, Lopez-Parra AM, Perez-Granados AM, Arroyo-Pardo E, Roe MA, Teucher B, Fairweather-Tait SJ, Vaquero MP. The G277S transferrin mutation does not affect iron absorption in iron deficient women. *Eur J Nutr* 2007; 46: 57-60.

111. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 2003; 111: 163-169
112. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
113. Meyers DG. The iron hypothesis: does iron play a role in atherosclerosis? *Transfusion* 2000; 40: 1023-9.
114. Sullivan JL. Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1981; 1: 1293-4.
115. Salonen JT, Nyyssonen K, Korpela H, Toumilehto J, Seppanen R, Salonen R. High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in Eastern Finnish men. *Circulation* 1992; 86: 803-811.
116. Lauffer Rb. Iron stores and the international variation in mortality from coronary artery disease. *Med Hypotheses* 1991; 35: 96-102.
117. Kiechl S, Aichner F, Gerstenbrand F, Egger G, Mair A, Rungger G y cols. Body iron stores and presence of carotid atherosclerosis: results from the Bruneck Study. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1625-30.

118. Barbieri M, Ragno E, Benvenuti E, Zito GA, Corsi A, Ferrucci L, Paolisso G. New aspects of the insulin resistance syndrome: impact on haematological parameters. *Diabetologia* 2001; 44: 1232-7
119. Scibior A, Zaporowska H. Effects of vanadium(V) and/or chromium(III) on L-ascorbic acid and glutathione as well as iron, zinc, and copper levels in rat liver and kidney. *J Toxicol Environ Health A*. 2007; 70: 696-704.
120. Sabbioni E, Rade J, Bertolero F. Relationships between iron and vanadium metabolism: the exchange of vanadium between transferrin and ferritin. *J Inorg Biochem*. 1980;12: 307-15.
121. Thompson KH, Tsukada Y, Xu Z, Battell M, McNeill JH, Orvig C. Influence of chelation and oxidation state on vanadium bioavailability, and their effects on tissue concentrations of zinc, copper, and iron. *Biol Trace Elem Res*. 2002; 86: 31-44.
122. Todorich B, Olopade JO, Surguladze N, Zhang X, Neely E, Connor JR. The mechanism of vanadium-mediated developmental hypomyelination is related to destruction of oligodendrocyte progenitors through a relationship with ferritin and iron. *Neurotox Res*. 2011;19: 361-73

123. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja JA, Lewenstam A
Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. Clin
Chem Acta 2000; 294:1–26
124. 2. Kroll MH, Elin RJ Relationship between magnesium and protein
concentrations in serum. ClinChem 1985; 31:244–246
125. Durlach J, Bac P, Durlach V, Bara M, Guiet-Bara Neurotic, neuromuscular
and autonomic nervous form of magnesium imbalance. Magnes Res 1997;
10:169–195
126. Hans CP, Chaudhary DP, Bansal DD Magnesium deficiency increases
oxidative stress in rats. Indian J Exp Biol 2002; 40:1275–1279
127. Hisakawa N, Yasuoka N, Itoh H, Takao T, Jinnouchi C, Nishiya K,
Hashimoto K A case of Gitelman's syndrome with chondrocalcinosis. Endocr J
1998; 45: 261–267
128. Eby GA, Eby KL Rapid recovery from major depression using magnesium
treatment. Med Hypotheses 2006; 67: 362–370

129. Galan P, Preziosi P, Durlach V, Valeix P, Ribas L, Bouzid D, Favier A, Hercberg S Dietary magnesium intake in a French adult population. *Magnes Res* 1997; 10: 321–328
130. Durlach J, Bac P, Durlach V, Rayssiguier Y, Bara M, Guiet-Bara A Magnesium status and ageing: an update. *Magnes Res* 1998; 11: 25–42
131. Shills ME Magnesium in health and disease. *Annu Rev Nutr* 1988; 8: 429–460
132. Whang R, Oei TO, Aikawa JK, Watanabe A, Vannatta J, Fryer A, Markanich M Predictors of clinical hypomagnesemia. Hypokalemia, hypophosphatemia, hyponatremia, and hypocalcemia. *Arch Intern Med* 1984; 144:1794–1796
133. Wong ET, Rude RK, Singer FR, Shaw ST Jr A high prevalence of hypomagnesemia and hypermagnesemia in hospitalized patients. *Am J Clin Pathol* 1983; 79: 348–352
134. Hayes JP, Ryan MF, Brazil N, Riordan TO, Walsh JB, Coakley D Serum hypomagnesaemia in an elderly day-hospital population. *Ir Med J* 82:117–119
135. Kingston ME, Al-Siba'i MB, Skooge WC (1986) Clinical manifestations of hypomagnesemia. *Crit Care Med* 1989; 14: 950–954

136. Boyd JC, Bruns DE, Wills MR Frequency of hypomagnesaemia in hypokalemic states. *Clin Chem* 1983; 29: 178–179
137. Noronha JL, Matuschak GM Magnesium in critical illness: metabolism, assessment, and treatment. *Intensive Care Med* 2002; 28: 667–679
138. Chernow B, Bamberger S, Stoiko M, Vadnais M, Mills S, Hoellerich V, Warshaw AL Hypomagnesaemia in patients in postoperative intensive care. *Chest* 1989; 95: 391–397
139. Ryzen E Magnesium homeostasis in critically ill patients. *Magnesium* 1989; 8: 201–212
140. Rubeiz GJ, Thill-Baharozian M, Hardie D, Carlson RW Association of hypomagnesaemia and mortality in acutely ill medical patients. *Crit Care Med* 1993; 21: 203–209
141. Shils ME Experimental human magnesium depletion. *Medicine* 1969; 48: 61–85
142. Elin RJ, Armstrong WD, Singer L Body fluid electrolyte composition of chronically magnesiumdeficient and control rats. *Am J Physiol* 1971; 220: 543–548

143. Kobrin SM, Goldfarb S Magnesium deficiency. *Semin Nephrol* 1990; 10: 525–535

144. Paolisso G, Sgambato S, Gambardella A, Pizza G, Tesouro P, Varricchio M, D’Onofrio F Daily magnesium supplements improve glucose handling in elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1992; 55 :1161–1167

145. Fujii S, Takemura T, Wada M, Akai T, Okuda K Magnesium levels of plasma, erythrocyte and urine in patients with diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1982; 14: 161–162

146. Elin RJ Magnesium metabolism in health and disease. *Dis Mon* 1988; 34: 161–218

147. Styler L (1988) *Biochemistry*, 3rd edn. Freeman, New York

148. Tongyai S, Rayssiguier Y, Motta C, Gueux E, Maurois P, Heaton FW Mechanism of increased erythrocyte membrane fluidity during magnesium deficiency in weanling rats. *Am J Physiol* 1989; 257: C270–C276

149. Caro JF, Triester S, Patel VK, Tapscott EB, Frazier NL, Dohm GL Liver glucokinase: decreased activity in patients with type II diabetes. *Horm Metab Res* 1995; 27: 19–22
150. Matschinsky FM Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39: 647–652
151. Tosiello L Hypomagnesemia and diabetes mellitus. A review of clinical implications. *Arch Intern Med* 1996; 156: 1143–1148
152. Rude RK Magnesium deficiency and diabetes mellitus. Causes and effects. *Postgrad Med* 1992; 92: 217–219
153. Chaudhary DP, Sharma R, Bansal DD. Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: a review. *Biol Trace Elem Res.* 2010 ;134: 119-29.
154. Planells E, Sánchez-Morito N, Montellano MA, Aranda P, Llopis J. Effect of magnesium deficiency on enterocyte Ca, Fe, Cu, Zn, Mn and Se Content. *J Physiol Biochem* 2000; 56: 217-222.
155. Planells E, Aranda P, Peran F, Llopis J. Changes in calcium and phosphorus absorption and retention during long-term magnesium deficiency in rats. *Nutr. Res.* 1993; 13: 691- 699.

156. Planells, E., Aranda, P., Lerma, A., Llopis, J. Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc caused by magnesium deficiency in rats. *Br. J. Nutr.* 1994; **72**: 315-323.

157. Sanchez-Morito N, Planells E, Aranda P, Llopis J. Influence of magnesium deficiency on the bioavailability and tissue distribution of iron in the rat. *J Nutr Biochem* 2000; 11: 103-108.

158. Sanchez-Morito N, Planells E, Aranda P, Llopis J. Magnesium-manganese interactions caused by magnesium deficiency in rats. *J Am Coll Nutr* 1999; 18: 475-480.

159. Jiménez A, Planells E, Aranda P, Sánchez-Viñas M, Llopis J. Changes in bioavailability and tissue distribution of copper caused by magnesium deficiency in rats. *J. Agric. Food. Chem.* 1997; 45 : 4023-4027.

160. Jiménez A, Planells E, Aranda P, Sánchez-Viñas M, Llopis J. Changes in bioavailability and tissue distribution of selenium caused by magnesium deficiency in rats. *J. Am. Coll. Nutr.* 1997; 16: 175-180.

161. Stonell LM, Savigni DL, Morgan EH. Iron transport into erythroid cells by the Na⁺/Mg²⁺ antiport. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1282: 163-170

161. Rico MC, Lerma A, Planells E, Aranda P, Llopis J. Changes in the nutritive utilization of protein induced by Mg deficiency in rats. *Internat J Vit Nutr Res* 1995; 65: 122-126.

162. Lerma, A., Planells, E., Aranda, P., Llopis, J. Effect of magnesium deficiency on fatty acid composition of the erythrocyte membrane and plasma lipid concentration in rats. *J Nutr Biochem*. 1995; 6: 577-581.

163. Planells E, Llopis J, Perán F, Aranda, P. Changes in tissue calcium and phosphorus content and plasma concentration of parathyroid hormone and calcitonin after long-term magnesium deficiency in rats. *J Am Coll Nutr* 1995; 14: 292-298.

164. Planells E, Sánchez-Morito N, Moreno MJ, Aranda P, Llopis, J. Effect of chronic magnesium deficiency on mitochondrial Zn content in different rat brain structures. In: Centeno JA, Collery P, Vernet G, Finkelman RB, Gibb H, Etienne JC, editors. *Metal ions in biology and medicine*. Vol 6. Paris, John Libbey, 2000; 154-57.

165. Planells E, Sánchez-Morito N, Moreno MJ, Aranda P, Llopis, J. Effect of chronic magnesium deficiency on mitochondrial Cu content in different rat brain

structures. In: Rayssiguier Y, Mazur A, Durlach J, editors. *Advances in magnesium research: nutrition and health*. Paris, John Libbey, 2001; 423-6.

166. Arsenian MA. Magnesium and cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 1993; 35: 271-310.

167. Nair RR, Nair P. Alterations of myocardial mechanics in marginal magnesium deficiency. *Magnes Res* 2002; 15: 287-306

168. Günther T, Höllriegl V, Massh A, Vormann J, Bubeck J, Classen HG. Effect of Desferrioxamine on lipid peroxidation in tissues of magnesium-deficient and vitamin E-depleted rats. *Mag Bull* 1994; 16: 119-25.

169. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr.* 2010; 123: 1939-1951.

170. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzyme function for erythrocyte. *J Bio Chem* 1969; 244: 6049-6055

171. Trenzado C, Hidalgo MC, García-Gallego M, Morales AE, Furné M, Domezain A, et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon

Acipenser naccarii and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture*, 2006; 254: 758-767

172. Aebi H. Catalase “*in vitro*”. *Method Enzymol* 1984; 105: 121-126.

173. Sturve J, Stephensen E, Forlin L. Effects of redox cycling compounds on DT diaphorase activity in the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comprehensive Hepatol* 2005; 4: 4-15

174. Sanz A, Trenzado CE, López-Rodríguez MJ, Furné M, Tierno de Figueroa JM. Study of antioxidant defense in four species of perloidea (Insecta, Plecoptera). *Zoological Sci* 2010; 27: 952-958.

175. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Anal Biochem* 1976; 72: 248-256.

176. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.

177. Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: The action of chelating agents on vanadium accumulation. *Moll Cell Biochem* 1995; 153: 233-240.

178. Scibior A, Zaporowska H, Wolinska A, Ostrowski J. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in the blood of rats co-treated with vanadium (V^{+5}) and chromium (Cr^{+5}). *Cell Biol Toxicol* 2010; 26: 509-526.

179. EFSA. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of vanadium (Request No. EFSA-Q-2003-018), *The EFSA Journal* 2004; 33: 1-22 <http://www.efsa.eu.int/>

180. Yuen VG, Orvig C, McNeeill JH. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71; 263-269.

181. Venu L, Kishore YD, Raghunath M. Maternal and perinatal magnesium restriction predisposes rat pups to insulin resistance and glucose intolerance. *J Nutr* 2005; 135: 1353-8.

182. Majithiya JB, Balaraman R, Giridhar R, Yadav MR. Effect of bis[curcumino]oxovanadium on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Element Medicin Biol.* 2005; 18: 211-217.

183. Guerrero–Romero F, Rodríguez-Morán M. Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. *Acta Diabetológica* 2002; 39: 209-213.
184. Barbagallo M, Domínguez LJ, Galioto A, Ferlisi A, Cani C, Malfa L, Pineo A, Busardo A, Paolisso G. Role of magnesium in insuline action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects Med.* 2003; 24: 39-52.
185. Lopez-Ridaura R, Willet WC, Rimm EB, Simin L, Stampher MJ, Manson JE, Frank BH. Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and women. *Diabetes Care* 2004; 27: 134-140
186. Barragán-Rodríguez L, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Efficacy and safety of oral magnesium supplementation in the treatment of depression in the elderly with type 2 diabetes: A randomized, equivalent trial. *Magnes Res* 2008; 21: 218-223.
187. Curiel-García JA, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Hypomagnesemia and mortality in patients with type 2 diabetes. *Magnes Res* 2008; 21: 163-166.
188. Guerrero–Romero F, Rascón-Pacheco RA, Rodríguez-Morán M, Escobedo de la Peña J, Wachter N. Hypomagnesaemia and risk for metabolic glucose disorders: a 10-year follow-up study. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 389-396.

189. Simental-Mendía LE, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Failure of β -cell function to compensate variation in insulin sensitivity in hypomagnesemic subjects. *Magnes Res* 2009; 22: 151-156.

190. Barbagallo M, Domínguez LJ, Galioto A, Pineo A, Belvedere M. Oral magnesium supplementation improves function in elderly diabetic patients. *Magnes Res* 2010; 23: 131-137.

191. Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2003; 26: 1147-1152

192. Malpuech-Brugere C, Rock E, Astier C, Nowacki W, Mazur A, Rayssiguier Y. Exacerbated immune stress responses during experimental magnesium deficiency results from abnormal cell calcium homeostasis. *Life Sciences* 1998; 63: 1815-1822.

193. Bussièrre FI, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y. Protective effect of calcium deficiency on the inflammatory response in magnesium-deficient rats. *Eu J Nutr* 2002; 41: 197-202.

194. Suarez A, Pulido N, Casla A, Casanova B, Arrieta FJ, Rovira A. Impaired tyrosine-kinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesemic rats. *Diabetología* 1995; 38: 1262-70.
195. Rayssiguier Y, Libako P, Nowacki W, Rock E. Magnesium deficiency and metabolic syndrome: Stress and inflammation may reflect calcium activation. *Magnes Res* 2010; 23: 73-80.
196. Andrews M, Arredondo M. Hepatic and adipocyte cells respond differentially to iron overload, hypoxic and inflammatory challenge. *Biometals* 2012; 25: 749-759.
197. Balon TW, Gu JL, Tokuyama Y, Jasman AP, Nadler JL. Magnesium supplementation reduces development of diabetes in a rat model of spontaneous NIDDM. *Am J Physiol* 1995; 269: E745-52.
198. Kandeel FR, Balon E, Scott S, Nadler JL. Magnesium deficiency and glucose metabolism in rat adipocytes. *Metabolism* 1996; 45: 838-43.
199. Yeh GY, Eisemberg DM, Kaptchuk TJ, Phillips RS. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1277-94.

200. Cusi K, Cukier S, DeFronzo RA, Torres M, Puchulu FM, Pereira JC. Vanadyl sulfate improves hepatic and muscle insulin sensitivity in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1414-17.
201. Zaporowska H, Scibior A. Hematological effects of vanadium on living organism. In: Nriagu JO editor *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1998. p 135-157.
202. Dai S, Vera E, McNeill JH. Lack of haematological effect of oral vanadium treatment in rats. *Pharmacol Toxicol* 1995; 76: 263-268.
203. Piomelli S, Jansen V, Dancis F. The hemolytic anemia of magnesium deficiency in adults rats. *Blood*. 1973, 41: 451-459.
204. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes* 2002; 51: 3391-3399.
205. Cohen MD, Wei CI, Tan H, Kao KJ. Effect of ammonium metavanadate on the murine immune response. *J Toxicol Environ Health* 1986; 19: 279-298.
206. Dai CH, Kantz S. Vanadate mimics the effect of stem cell factor on highly purified human erythroid burst-forming units in vitro, but not the effect of erythropoietin. *Exp Hematol*. 1992; 20: 1055-1060.

207. Munro HN, Linder MC. Ferritin structure biosynthesis and function. *Physiol Beh.* 1978, 58: 317-396.
208. Hunter JE. Variable effects of iron status on the concentration of ferritin in rat plasma, liver, and spleen. *J Nutr* 1978; 108: 497-505.
209. Huang C, Ding M, Li J, Leonard S, Rojanasakul Y, Castranova V, Vallyathans V, Ju G, Shi X. vanadium-induced nuclear factor of activated cells activation through hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 2001; 276: 22397-22403.
210. Kobayashi K, Himeno S, Satoh M, Kuroda J, Shibata N, seko Y, Hasegawa T. pentavalente vanadium induces hepatic netallothionein through interleukin-6-dependent and-independent mechanisms. *Toxicology* 2006; 228: 162-170.
211. Deng Y, Cui H, Peng X, Fang J, Zuo Z, Wang K, Cui W, Wu B. The relevance of cytokines for mucosal immunity induced by dietary vanadium in the intestine of broilers. *Med Chem.* 2012; 2: 051-056.
212. Liu IM, Chi TC, Cheng JT. Decrease of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by vanadyl sulphate in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res.* 2001, 33: 96-100

213. Wilsey J, Manthey MK, Scarpace PJ. Oral vanadium enhances the catabolic effects of central leptin in young adult rats. *Endocrinology* 2006; 147: 493-501.
214. Cam M, Rodrigues B, McNeill JH (1999) Distinct glucose lowering and beta cell protective effects of vanadium and food restriction in streptozotocin-diabetes. *Euro J Endocrinol.* 1999; 141: 546-554.
215. Sun Qian, Sekar N, Goldwaser I *et al.* (2000) Vanadate restores glucose-6-phosphate in diabetic rats: a mechanism to enhance glucose metabolism. *AJP-Endo* 2000; 279: 403-410.
216. Tas S, Sarandol E, Ayvalik SZ *et al.* (2007). Vanadyl sulphate, taurine, and combined vanadyl sulphate and taurine treatments in diabetic rats: Effects on the oxidative and antioxidative systems. *Arch Med Res.* 2007; 38: 276-283.
217. Lau A, Failla ML. Urinary excretion of zinc, copper and iron in the streptozotocin-diabetic rat. *J Nutr* 1984; 114: 224-233.
218. O'Connell N. Anemia: una complicación diabética silenciosa. *Diabetes Voice*, 2003; 48: 25-27.

219. Dogukan A, Sabin N, Tuzcu M, Juturu V, Orhan C, Onderci M. et al. The effects of chromium histidinate on mineral status of serum and tissue in fat-fed and streptozotocin-treated type II diabetic rats. *Biol Trace Element Res* 2009; 131: 124-132.
220. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-Reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 2001; 286: 327-334.
221. Bartnikas TB. Known and potential roles of transferrin in iron biology. *Biometals*. 2012; 25: 677-686.
222. Kristansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes. The good, the bad, or the indifferent? *Diabetes* 2005; 54: S114-S124
223. Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med*. 2011; 62: 347-360.
224. Lei XG, Cheng W-H, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Ann Rev Nutr*. 2007; 27:41-61.

225. Jang YY, Song JH, Shin YK, Han ES, Lee CS. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res* 2000; 42: 361-371.
226. Sadi G, Güray T. (2009) Gene expressions of Mn-SOD and GPx-1 in streptozotocin-induced diabetes: effect of antioxidants. *Mol Cell Biochem.* 2009; DOI: 10.1007/s11010-009-0050-4
227. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 161-170.
228. Foppolia C, Marcob F, Blarzinoc C, Perluigib M, CinibC, Cocciab R. Biological response of human diploid keratinocytes to quinone producing compounds: role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Interna J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 852–863. 13.
- 229 Bycczkowski JZ, Kulkarni AP (1998) Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. In *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*, pp 235-264 [JO Nriagu, editor] New York: John Wiley & Sons, Inc.

230. Cuesta S, Francés D, García GB. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicol Teratol.*2010 , DOI:10.1016/j.ntt.2010.10.010 6.

231. Abdehamid G, Anwar-Mohamed A, Elmazar MM, El-Kadi AOS . Modulation of NAD(P)H:quinine oxidoreductase by vanadium in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicology in Vitro* 2010; 24: 1554-1561.