

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



Efecto del tratamiento con Vanadio (IV) sobre la biodisponibilidad y distribución tisular del Selenio y Magnesio en ratas diabéticas-STZ: Influencia sobre el estado antioxidante

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

María del Carmen Bermúdez Peña

Granada, 2014

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María del Carmen Bermúdez Peña
ISBN: 978-84-9125-011-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/39531>

**MEMORIA QUE PRESENTA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN NUTIRCIÓN
HUMANA POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA EL LDA. D. MARÍA DEL CARMEN
BERMÚDEZ PEÑA.**

ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DE:



Prof. Dr. D. Juan Llopis González



Prof. Dª. Dra. Cristina Sánchez González



Dr. Jesús Fernando Guerrero Romero



Lda. María del Carmen Bermúdez Peña

Aspirante al Grado de Doctor

Granada, Diciembre 2014



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

JUAN LLOPIS GONZÁLEZ, CATEDRÁTICO DE FISIOLÓGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada : *“Efecto del tratamiento con Vanadio (IV) sobre la biodisponibilidad y distribución tisular del Se y Mg en ratas diabéticas-STZ: Influencia sobre el estado antioxidante”*, que presenta Dña. **MARÍA DEL CARMEN BERMÚDEZ PEÑA** al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2011- 2014, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Juan Llopis González

En Granada, 3 de octubre del 2014



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

CRISTINA SÁNCHEZ GONZÁLEZ, PROFESORA CONTRATADA DOCTOR DEL
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada : *“Efecto del tratamiento con Vanadio (IV) sobre la biodisponibilidad y distribución tisular del Se y Mg en ratas diabéticas-STZ: Influencia sobre el estado antioxidante”*, que presenta Dña. **MARÍA DEL CARMEN BERMÚDEZ PEÑA** al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2011- 2014, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Cristina Sánchez González

En Granada, 3 de octubre del 2014



UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA, DURANGO, MÉXICO.

JESÚS FERNANDO GUERRERO ROMERO, DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL IMSS, DURANGO, MÉXICO.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada : *“Efecto del tratamiento con Vanadio (IV) sobre la biodisponibilidad y distribución tisular del Se y Mg en ratas diabéticas-STZ: Influencia sobre el estado antioxidante”*, que presenta Dña. **MARÍA DEL CARMEN BERMÚDEZ PEÑA** al superior juicio del Tribunal que designe la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo mi dirección durante los años 2011- 2014, siendo expresión de la capacidad técnica e interpretativa de su autora en condiciones tan aventajadas que le hacen merecedora al Título de Doctora, siempre y cuando así lo considere el citado Tribunal.

Fdo. Jesús Fernando Guerrero Romero

En Victoria de Durango, Dgo., México, 20 de octubre del 2014

El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, titulada “Efecto del tratamiento con Vanadio (IV) sobre la biodisponibilidad y distribución tisular del Se y Mg en ratas diabéticas-STZ: Influencia sobre el estado antioxidante”, 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

La vida se comprende de ciclos, los cuales siempre tienen un sin fin de sabores desde los más dulces hasta los menos, y que gracias a ellos me han permitido crecer en el aspecto tanto profesional como personal. Pero en este ciclo que está por culminar, no me ha faltado ayuda, lo cual gracias a ello hizo que fuese más llevadero. Por tanto, es mi deber agradecer a todos los que me han tendido una mano desde que me embarqué en esta aventura al perseguir mi sueño en el campo de la ciencia y a los que sin duda les debo gran parte de la presente tesis.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis:

Al Dr. Juan Llopis. Dr. Llopis no existen las palabras para darle las gracias por su apoyo incondicional, por creer en mí y guiarme en mi formación. De Ud. me llevo con cariño el esfuerzo y la dedicación en cada detalle. Ha sido un gran honor trabajar con usted y nunca sabré agradecerle todo lo que ha hecho por mí. Gracias de corazón.

A la Dra. Cristina Sánchez. Muy querida Cristina tampoco existen palabras para darte las gracias por todo tu apoyo incondicional en cada etapa y locura que llevo este trabajo, por creer en mí, confiar en mí, por estar siempre dispuesta a ayudarme y guiarme en este largo camino hoy recorrido. Ha sido un honor compartir contigo tanto en lo profesional como en lo personal. Todo esto me lo llevo en el corazón, Muchas gracias de corazón.

Al Dr. Fernando Guerrero. Muy querido Dr. Guerrero, a mi padre putativo, muchas gracias porque siempre estuvo allí a pesar de la distancia, contando con todo su apoyo incondicional en todo momento, sus consejos, siempre al pendiente e impulsándome a ser mejor desde el inicio de esta aventura, desde aquel 20 de noviembre que deje todo atrás para forjar mi camino. No hay palabras que expresen cuán agradecida le estoy, muchísimas gracias de todo corazón.

A la Dra. María López-Jurado Romero de la Cruz por acogerme en su departamento de Fisiología.

Al Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach director del Instituto de Veterinaria y Fisiología Animal de la Freie Universität Berlin y a todo su grupo de investigación, muchas gracias

por tenderme una mano y por su amabilidad. Prof. Aschenbach so many thanks for your support and your help when I was there!

Asimismo, me gustaría agradecer al Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos "José Mataix Verdú" y a la Universidad de Granada que me ha abierto siempre las puertas como en casa.

A CONACYT por concederme la beca que me ha permitido realizar este sueño, esta tesis doctoral.

A los profesores y compañeros del Departamento de Fisiología, al Dr. Jesús siempre tan amable y dispuesto a ayudar. A Carlos, Lorenzo, Chari y Gary siempre tan entusiastas, positivos y siempre teniendo una palabra de aliento en los momentos difíciles y por los ratitos de ocio que hicieron que el trabajo fuese más ameno.

A mis amigos en especial a :

A mi Lucia, por siempre apoyarme, por la paciencia de enseñarme, ayudarme, por las largas horas en el laboratorio, por animarme en los momentos en que creía que no se podía más, así como también por todos los buenos momentos que pasamos, por ser siempre como una hermana, mi hermana italiana, muchísimas gracias. My Lucia, for always supporting me, for the patience to teach me, help me, for the long hours at the laboratory, for encouraging me in times when I thought it could not do, as well for the good moments we spent, always like a sister, my Italian sister, thank you very much.

A mi Mariajo, mi mucha querida, mi hermana guatemalteca muchas gracias por los ánimos, a verle el lado positivo cuando todo parecía lo contrario, por las largas pláticas tan sabrosas como siempre y tu incondicional amistad.

A mi Grace, mi muy querida hermana putativa, muchas gracias por que siempre a pesar de estar tan lejos y con tanta ocupación, siempre tuviste tiempo para mi, para ayudarme a iniciar esta aventura, sin ti, no hubiese sido posible estar aquí hoy y te agradezco de todo corazón.

A mi Miriam, mi niña, muchísimas gracias por tener siempre una palabra de aliento, por animarme y ayudarme en los momentos difíciles, por tu incondicional amistad, eres una de las grandes querida amiga.

A Gerhard, muchas gracias por tanta enseñanza en el laboratorio, por hacerme sentir en casa cuando estaba tan lejos y tener siempre una palabra de aliento en momentos difíciles y tu incondicional amistad. Gerhard, thank you very much for teaching me at lab, for made me feel at home when I was so far away and always to have a word of encouragement in a difficult times and for your unconditional friendship.

A Luis, gracias porque a pesar de la distancia, siempre me has tendido la mano, porque a pesar de ser una persona de pocas palabras, son siempre tan asertivas, las cuales sacan un sonrisa y animan en los momentos difíciles, por ser mi hermano putativo, gracias por todo mi querido hermano.

A Óscar, gracias por las largas platicas, horas de reflexión, por los ánimos en los momentos difíciles. Tu harás y seguirás cosechando grandes éxitos amigo mío, gracias por tu amistad.

Por último, pero no menos importante, mi agradecimiento más sincero va para las personas a las que dedico esta tesis, a los que más quiero.

A mis padres, Carmen y Carlos, gracias a ustedes soy lo que soy, por apoyarme en esta aventura, que en su momento pensaron que era una gran locura, tan lejos de casa, pero al final conte con todo su apoyo incondicional. Por enseñarme que el trabajo siempre tiene su recompensa, por no dejarme caer, por estar ahí siempre, no importando la hora, si era de madrugada allá, siempre allí para mi, en los momentos buenos, pero sobre todo, en los malos. No me falten nunca. Gracias por ser la luz que alumbra mi camino, no hay palabras para expresar todo lo que me han ayudado y me ayudan cada día. Muchas Gracias Mamá y Papá ¡Los quiero por encima de todo!

A mis hermanas, Carla y Mariana, gracias por escucharme, por animarme cuando estaba triste, por ser tan especiales para mi, porque estoy muy orgullosa de ustedes y las admiro mis tesoros, porque aunque estemos lejos, yo sé que siempre están y estarán a mi lado (y yo al suyo)... Las quiero muchísimo.

A mis padres putativos, Fernando y Martha, gracias por apoyarme en esta aventura, por animarme a “tomar al toro por los cuernos” y darme el valor que necesitaba para hacerlo (gracias por aquella platica, aquella noche, la recuerdo como si fuese ayer), por las platicas largas domingueras en que el escucharles me hacia sentir que ya no estaba tan lejos. Por ser parte de mi vida, los quiero mucho y espero tenerles por muchísimo tiempo, nunca me falten.

A mi Sebastiaan, Gracias por aguantarme cada día, sé que no ha sido fácil y en estos últimos tiempos menos todavía. Gracias por tener siempre una palabra de cariño, por hacerme cada día mejor que el anterior... pero sobre todo porque a pesar de la distancia y de los altibajos, sabes sacarme una sonrisa y que vaya a donde vaya tú siempre estarás a mi lado. ¡Gracias por quererme! ¡Te quiero más que a nada!. Aan Sebastiaan, bedankt voor je ondersteuning, iedere dag weer. Ik weet dat het niet gemakkelijk is geweest en vooral de laatste tijd niet. Bedankt voor je aardige woorden, en bedankt dat je elke dag beter maakte dan de vorige... Maar vooral dat je, ondanks de afstand en het heen-en-weer reizen, me altijd liet glimlachen. En ik weet dat waar ik ook ben, jij altijd bij me zal zijn. Bedankt voor je liefde! Ik hou ontzettend veel van je!

En definitiva, ustedes son los que mueven mi mundo y sin ustedes nada de esto sería posible. Gracias por creer en mí, por ser mi energía, mi motivación, los primeros que celebran mis alegrías y los que no dejan que me hunda cuando llegan las penas. ¡Gracias! Esta tesis les pertenece a Ustedes.

Gracias a todos los que he mencionado y a aquellos a los que haya podido olvidar sin mala intención. Gracias por hacer posible esta tesis y por formar parte de mi vida.

A mis padres y hermanas

A mis padres putativos

A Sebastiaan

“Caminante no hay camino, se hace camino al andar ”

Antonio Machado

ABREVIATURAS

V	vanadio
Se	selenio
DM	diabetes
Mg	magnesio
Ca	calcio
BMVO	bis(maltolato)oxovanadio
Cl₄V	cloruro de vanadio
C	grupo control (ratas sanas)
DMV	ratas diabéticas inducidas con estreptocitocina tratadas con 1 mg de vanadio por kilogramo de peso al día
DMVH	ratas diabéticas inducidas con estreptocitocina tratadas con 3 mg de vanadio por kilogramo de peso al día
STZ	estreptozotocina
GPx	enzima glutatión peroxidasa
GST	glutation transferasa
GR	glutationreductasa
CAT	catalasa
NQO1	NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I
MDA	malondialdehído
SOD	superóxidodismutasa
PCG	grupos carbonilo
FA	fosfatasa alcalina
PCR	proteína C reactiva

CTA	capacidad total antioxidante
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
GLUT 4	proteína transportadora de glucosa
LDL	lipoproteína de baja densidad
Na⁺, K⁺-ATPasa	bomba sodio-potasio
HEK293	células embrionarias renales humanas HEK293
hSLC41A1	proteína que en los humanos está codificada por el gen SLC41A1

ÍNDICE

<u>1. RESUMEN (SUMMARY)</u>	25
<u>2. JUSTIFICACIÓN Y OJBJETIVOS</u>	37
<u>3. INTRODUCCIÓN</u>	43
3.1.LA DIABETES MELLITUS	45
3.2. VANADIO	50
3.3. SELENIO	63
3.4. MAGNESIO	74
3.5 ESTRÉS OXIDATIVO SU RELACIÓN CON LOS ELEMENTOS TRAZA Y DIABETES MELLITUS	81
<u>4. ARTICULOS DE INVESTIGACIÓN</u>	83
<u>5. DISCUSIÓN</u>	123
5. 1. Estudios sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del selenio	128
5.1.1.Estudios en ratas sanas. (Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. Metallomics 2012; 4: 814 – 819; Exposure to vanadium (IV) increases levels of hepcidin mRNA and impairs the homeostasis of iron, Acta Physiologica 2014; 212 S 698: 66).	128
5.1.1.1. Efecto de la exposición al vanadio (IV) sobre el peso corporal, ingesta de alimentos y agua y niveles circulantes de glucosa y leptina	129
5.1.1.2. Efecto de la exposición del vanadio (IV) sobre la absorción del Selenio	130
5.1.1.3. Efecto de la exposición al vanadio (IV) sobre parámetros hematológicos y distribución del Selenio en los tejidos	131
5.1.1.4. Efecto de la exposición el vanadio (IV) sobre parámetros relacionados con la defensa antioxidante y con la respuesta inflamatoria.	133
5.1.2. Estudios en ratas diabéticas (Effect of bis (maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. British Journal of Nutrition, 2012; 108: 893-899	136

5.1.2.1. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ sobre los niveles de glucosa e insulina séricos.	137
5.1.2.2. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre el peso corporal, ingesta de alimentos y agua y niveles circulantes de leptina.	139
5.1.2.3. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre la absorción, retención y contenido de selenio en tejidos.	142
5.1.2.4. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre el estado antioxidante.	147
5. 2. Estudios sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del magnesio.	150
5.2.1. Efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del magnesio. (Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient ratas. Magnesium-Research, 2011; 24 (4): 196-208).	150
5.2.1.1. Efecto de la exposición a vanadio(IV) sobre la absorción, retención y contenido de magnesio en los tejidos	151
5.2.1.2. Efecto de la exposición a vanadio(IV) sobre diversos parámetros bioquímicos.	152
5. 2. 2. Estudios sobre el efecto del tratamiento con vanadio a ratas diabéticas sobre la homeostasis del magnesio. (Aggravation by vanadium of magnesium deficiency in STZ-induced diabetic rats. Magnesium-Research, 2013; 26: 74-82).	154
5. 2. 2.1. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre la absorción, retención y contenido de magnesio en los tejidos	154
5. 2. 2.2. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre los parámetros bioquímicos.	158
5. 2. 3. Estudios 132“in vitro” del efecto de la exposición a vanadio sobre el transporte de Mg ²⁺ en células embrionarias renales humanas HEK293. (Estudios en realización).	163
5.3. Estudio de la influencia de los cambios del contenido de selenio y magnesio en el suero e hígado sobre los parámetros séricos y hepáticos estudiados.	166
<u>6. CONCLUSIONES (CONCLUSION)</u>	171
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	177
<u>8. CURRICULUM VITAE</u>	197

1.- RESUMEN (SUMMARY)

Aunque el vanadio es un elemento traza ampliamente distribuido en la naturaleza y es esencial para algunas formas de vida, su papel como micronutriente, su esencialidad así como su actividad biológica y farmacológica no se encuentran completamente establecidas. Dicho elemento se encuentra asociado con la regulación, incremento del transporte y metabolismo de la glucosa, así como con el aumento de la sensibilidad al receptor de la insulina. Debido a los altos niveles de vanadio presentes en el medio ambiente, su amplio uso industrial, su frecuente empleo como suplemento por diferentes tipos de atletas (fundamentalmente culturistas) (Barceloux et al, 1999) y al creciente interés por sus efectos farmacológicos, el estudio del metabolismo del vanadio constituye actualmente una importante área de investigación (Domingo et al, 1991; Oster et al, 1993; Domingo et al, 1995; Zaparowska et al, 1998; Thompson et al, 2006; Michibata, 2012). Aunque se han realizado ensayos clínicos para algunos compuestos de vanadio (Thompson et al, 2006a), se recomienda que el uso de los compuestos de vanadio debe estar controlado hasta que se disponga de más información sobre sus posibles efectos tóxicos derivados de los tratamientos crónicos.

Como se ha comentado, actualmente muchos aspectos del metabolismo del vanadio no se encuentran bien esclarecidos, como lo son las interacciones digestivas y metabólicas con otros elementos involucrados en la defensa antioxidante.

Según algunos autores (Thompson et al, 2006b, Kawabe et al, 2006; Yanardag et al, 2006), al favorecer la metabolización de la glucosa, el vanadio reduciría la producción de especies reactivas de oxígeno y en consecuencia prevendría el daño oxidativo ocasionado por la hiperglicemia. Dado que el vanadio altera el metabolismo de diversos elementos traza tales como el Mg, Fe, Cu, Zn and Se, varios autores han asociado la acción del vanadio con efectos pro-oxidantes (Oster et al, 1993; Scibior et al, 2006; 2009, 2010a, 2014; Sánchez et al, 2011, 2012, 2014 a,b). La presencia de estrés oxidativo se encuentra asociada con cambios en la producción de citocinas (Dye et al, 1999), cambios inflamatorios (Pierce et al, 1996) y la presencia de tumores pulmonares (Assem et al, 2012). En este contexto, se ha sugerido que el vanadio puede actuar como inhibidor en diferentes formas de cáncer (Das et al, 2012).

Aunque existe cierto grado de información sobre interacciones entre el vanadio y el selenio (Haider et al, 1998; Kumar et al, 1993; Zwolak et al, 2012) y entre el vanadio y el magnesio en ratas no diabéticas (Scibior et al, 2006,2009,2010, 2012, 2014), no existe información sobre posibles alteraciones en la homeostasis del selenio y del magnesio, dos elementos muy relacionados con el estado antioxidante, en ratas

diabéticas que reciben tratamiento con vanadio,. Además, también se ha puesto de manifiesto que ambos elementos se encuentran relacionados con el metabolismo de la glucosa, y de modo similar al vanadio, participan en el control de éste favoreciendo la activación de kinasas del receptor de la insulina y la traslocación del transportador GLUT 4 en ratas diabéticas.

De acuerdo con los comentarios anteriores, en el presente estudio nos planteamos profundizar en el efecto de la exposición a vanadio en ratas sanas, y aportar nuevos datos sobre si el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas altera la homeostasis del selenio y del magnesio; además, dada la ausencia de publicaciones sobre este tema, también consideramos de interés estudiar si el tratamiento con vanadio podría afectar a los cambios en el metabolismo del magnesio ocasionados por la diabetes.

Para la realización del estudio se seleccionó el bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV), porque se ha sugerido que dicho compuesto es más efectivo como hipoglucemiante, mejor tolerado y menos tóxico en los modelos animales que los compuestos inorgánicos de vanadio (Caravan et al, 1995; Thompson et al, 2006b). Además, es un compuesto estable en soluciones acuosas (Caravan et al, 1995).

El desarrollo del trabajo se ha realizado en dos fases:

A) En la primera fase se estudió la influencia de la exposición de ratas sanas al BMOV sobre la homeostasis del selenio y magnesio. Para la realización de este estudio se utilizaron dos grupos de 10 ratas. Un grupo control y otro expuesto a 6.22 mg de BMOV / día (1 mg V / día) durante 35 días.

B) En una segunda fase se estudiaron los cambios en la homeostasis del selenio y magnesio ocasionados por el tratamiento con BMOV a ratas a las que se les ha inducido diabetes tipo 1 mediante tratamiento con STZ. Para este estudio se utilizaron 4 grupos de 10 ratas. Un grupo control, un grupo de ratas diabéticas, un grupo de ratas diabéticas tratadas con 6.22 mg de BMOV / día (1 mg V / día) y un grupo de ratas diabéticas tratadas con 18.66 mg de BMOV / día (3mg V/día) durante 35 días.

Queremos destacar que para la realización de la primera fase (estudios realizados en ratas sanas) se empleó una única dosis de vanadio (1 mg V/d), mientras que para la realización de la segunda fase (estudios realizados en ratas diabéticas) se emplearon dos dosis de vanadio (1 y 3 mgV /d), este hecho se justifica porque al tratar a las ratas

diabéticas con la dosis de 1 mg vanadio/ día, no obtuvimos efecto hipoglucemiante lo que nos condujo a la utilización de una dosis mayor con la finalidad de poder asociar el efecto hipoglucemiante del vanadio con los cambios en la homeostasis de ambos elementos. La dosis empleadas en el presente estudio (1mg V / día \approx 5 mg V/ kg de peso/d y 3 mg V/ d \approx 15 mg V / kg de peso / d) son superiores a la dosis menor descrita que causa efectos adversos en la rata (0.8 mg V / kg de peso / d) no obstante, estas dosis son bajas en comparación con las dosis utilizadas habitualmente en otros estudios y mucho menores que la LD50 (dosis letal %0 (40-90 mgV/kg peso/d) (EFSA 2004). Las dosis empleadas se eligieron cuidadosamente tras una larga revisión de los estudios realizados anteriormente y representan dosis intermedias de BMOV, respecto a las dosis utilizadas en reportes previos (Yuen et al, 1993; Dai et al, 1995).

En nuestro estudio se observó la presencia de desordenes gastrointestinales en algunos animales de los grupos tratados con vanadio. Dichos animales fueron retirados del estudio. Estos desordenes gastrointestinales también han sido observados en otros estudios en ratas sanas (Scibior et al, 2006) y diabéticas (Oster et al, 1993).

El estudio ha dado lugar a diversas publicaciones entre las que destacamos por mayor relación con la Tesis que se presenta:

Sánchez-González C, Bermudez-Peña C, Trenzado CE, Goenaga-Infante H, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics* 2012; 4: 814 – 819

Sánchez-González C, Bermúdez-Peña C, Guerrero- Romero F, Trenzado CE, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Effect of bis(maltolato) oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *Br J Nutr* 2012; 108: 893-899.

Sánchez C, Torres M, Bermúdez-Peña C, Aranda P, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient rats. *MagnesRes* 2011; 24: 196-208.

Bermúdez-Peña C, López-Chaves C, Llopis J, Guerrero- Romero F, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Sánchez-González C. Aggravation by vanadium of magnesium deficiency in STZ-induced diabetic rats. *MagnesRes* 2013; 26: 74-82.

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con vanadio a ratas sanas a dosis de 6.22 mg BMOV / día ocasionó una reducción en la ingesta de alimentos y agua (\approx 15% y 50% respectivamente), la cual se asoció con una reducción en la ganancia de peso (\approx 20%). Estos cambios estuvieron acompañados de una fuerte caída de la absorción del selenio y un incremento de las pérdidas renales de magnesio. La menor absorción de selenio ocasiono una caída de sus niveles séricos y una depleción tisular del catión que afectó fundamentalmente al riñón e hígado. El incremento de las pérdidas renales de magnesio dio lugar a hipomagnesemia y a un descenso en el contenido de magnesio en el fémur. Además en estas ratas, también se aprecio una menor actividad de la fosfatasa alcalina sérica y un incremento de los niveles de urea circulante y citokinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF α).

Las pérdidas hepáticas de selenio estuvieron acompañadas por la caída de la actividad de la glutathion peroxidasa, glutathion transferasa y NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I y por el incremento de la peroxidación lipídica y oxidación proteica (niveles de MDA y grupos carbonilo) en el hígado, lo que indica un deterioro de las defensas antioxidantes y la presencia de un daño oxidativo hepático. El deterioro de la defensa antioxidante y la presencia de un proceso inflamatorio, podrían haber sido la causa del estado anémico moderado que se observó en estas ratas.

El tratamiento con 6.22 mg BMOV / día (1mg V/día) a ratas diabéticas-STZ no tuvo ningún efecto antidiabético y solo se observaron efectos menores sobre la homeostasis del selenio y magnesio. Sin embargo, el tratamiento con 18.66 mg BMOV / día (3mg V/día) indujo un claro efecto antidiabético, normalizando la ingesta de alimentos y la glucemia en ayunas. Además, el tratamiento con 3mg V/día también causo un descenso en la absorción y niveles séricos del selenio depleción tisular del catión (en suero, riñón, hígado y bazo). Esta dosis también ocasionó un incremento de las pérdidas renales de magnesio, que indujeron hipomagnesemia y depleción tisular de este elemento (en riñón, hígado, bazo y femur). Esta situación estuvo acompañada por incrementos de los niveles de ácido úrico, urea, colesterol total, colesterol-LDL y triglicéridos y un descenso de la actividad sérica de la aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina. A esta dosis, también se han encontrado incrementos de la proteína-C-reactiva y citokinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF α) en el suero.

Como en el caso de las ratas sanas el tratamiento con 18.66 mg BMOV / día (3mg V/día), las pérdidas hepáticas de selenio estuvieron acompañadas por la caída de la actividad de la glutathion peroxidada (GPx), glutathion transferasa (GST) y

NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I y por el incremento de la peroxidación lipídica y oxidación proteica (niveles de MDA y grupos carbonilo) en el hígado. Esta situación indica la presencia de un daño oxidativo a nivel hepático por el deterioro de las defensas antioxidantes.

En términos generales podemos concluir que el BMOV altera la homeostasis del selenio y del magnesio, lo que conduce a un incremento del estrés oxidativo y la aparición de un proceso inflamatorio. Además, podemos afirmar que en las ratas diabéticas se han observado efectos semejantes a los encontrados en las ratas sanas empleando una dosis tres veces superior, lo que sugiere que las ratas diabéticas son menos sensibles al efecto tóxico del vanadio que las ratas no diabéticas.

SUMMARY

Vanadium (V) is a trace element that is widely found in nature. It is essential for some forms of life, but its role as a micronutrient, its essentiality and its biological and pharmacological activity are not yet fully established. It has been associated with the regulation, increased transport and metabolism of glucose, and with increased sensitivity to insulin receptors. Due to high levels of V in the environment, its widespread industrial application, its common use as a supplement for athletes (especially bodybuilders) (Barceloux et al., 1999) and the growing interest in its pharmacological effects, the metabolism of V is now an important area of research interest (Domingo et al., 1991; Oster et al., 1993; Domingo et al., 1995; Zaparowska et al., 1998; Thompson et al., 2006; Michibata, 2012). Although clinical trials have been completed for some V compounds (Thompson et al., 2006), it has been recommended that the use of V compounds should be controlled until more information is available about the possible toxic effects of chronic treatment.

As mentioned above, many aspects of the metabolism of V remain to be fully established, such as its digestive and metabolic interactions with other elements involved in antioxidant defence.

According to some authors (Thompson et al., 2006b; Kawabe et al., 2006; Yanardag et al., 2006), V promotes glucose metabolism; this reduces the production of reactive oxygen species and thus prevents the oxidative damage caused by hyperglycaemia. However, many authors have associated V with pro-oxidant effects, because it alters the metabolism of trace elements such as Mg, Fe, Cu, Zn and Se (Oster et al., 1993; Scibior et al., 2006; 2009, 2010a, 2014; Sánchez et al., 2011, 2012, 2014 a, b). The presence of oxidative stress is associated with changes in cytokine production (Dye et al., 1999), inflammatory changes (Pierce et al., 1996) and the presence of lung tumours (Assem et al., 2012). However, other authors have suggested that V may act as an inhibitor in different forms of cancer (Das et al., 2012).

Although some studies have been made of interactions between V and selenium (Haider et al., 1998; Kumar et al., 1993; Zwolak et al., 2012) and between V and magnesium in nondiabetic rats (Scibior et al., 2006, 2009, 2010, 2012, 2014), there is no information on possible alterations in the homeostasis of selenium and of magnesium, two elements closely related to the presence of oxidative stress, in diabetic rats following treatment with vanadium. Furthermore, from their relation with oxidative stress, it has also been

shown that both elements are related to the metabolism of glucose, and similarly to vanadium, participate in the control of glucose metabolism, while the translocation of the GLUT4 transporter in diabetic rats promotes kinase activation in the insulin receptors.

Taking into account the above findings, this study further considers the effect of exposure to vanadium in healthy rats, and provides new data about whether treatment with vanadium in diabetic rats alters the homeostasis of selenium and of magnesium. Furthermore, in view of the absence of previous research on this question, we also consider it of interest to examine whether the treatment could affect diabetes-induced changes in the metabolism of magnesium.

Bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) was selected for this study because reports have suggested that this compound is more effective as a hypoglycaemic agent, better tolerated and less toxic in animal models than inorganic V compounds (Caravan et al., 1995, Thompson et al., 2006b). Moreover, it is stable in aqueous solutions (Caravan et al., 1995).

The study was implemented in two phases:

- A. In the first phase, we investigated the influence of exposure to BMOV in healthy rats on the homeostasis of selenium and magnesium. In this study, two groups of 10 rats were used, a control group and an experimental group, exposed to 6.22 mg BMOV/day (1 mg V/day) for 35 days.
- B. In the second phase, we studied the changes in the homeostasis of selenium and magnesium caused by treatment with BMOV in rats induced with type I diabetes by treatment with STZ. For this study, four groups of 10 rats were used: a control group, a group of diabetic rats, a group of diabetic rats treated with 6.22 mg BMOV/day (1 mg V/day) and a group of diabetic rats treated with 18.66 mg BMOV/day (3 mg V/day) for 35 days.

In the first phase (studies in healthy rats) a single dose of vanadium (1 mg V/day) was used, while in the second phase (studies in diabetic rats), two doses were used (1 and 3 mg V/day). This different approach was adopted because the treatment of diabetic rats with a dose of 1 mg V/day did not produce a hypoglycaemic effect. Therefore, a higher dose was used, to be able to associate the hypoglycaemic effect with changes in the homeostasis of Se and Mg. The doses used in the present study (1 mg V/day \approx 5 mg V/kg/day and 3 mg V/day \approx 15 mg V/kg/day) are higher than the lowest dose described to cause adverse effects in rats (0.8 mg V/kg/day), but these doses are low compared to

those commonly used in other studies and much lower than LD50 (lethal dose 50%) (40-90 mg V/kg/day) (EFSA 2004). Moreover, the doses used were carefully chosen after a lengthy review of previous studies in this respect and represent intermediate doses of BMOV among those used in the literature (Yuen et al 1993; Dai et al., 1995).

Gastrointestinal distress was observed in some animals in the groups treated with V. These animals were removed from the study. Such gastrointestinal disorders have also been observed in other studies, both in healthy rats (Scibior et al., 2006) and in diabetic ones (Oster et al., 1993).

This study has given rise to several publications, of which the following are the most closely related to this thesis:

Sánchez-González C, Bermúdez-Peña C, Trenzado CE, Goenaga-Infante H, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Changes in the antioxidant defence and in Se concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics* 2012; 4: 814 – 819

Sánchez-González C, Bermúdez-Peña C, Guerrero-Romero F, Trenzado CE, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Effect of bis(maltolato) oxovanadium (IV) (BMOV) on Se nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *Br J Nutr* 2012; 108: 893-899.

Sánchez C, Torres M, Bermúdez-Peña C, Aranda P, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in Mg-deficient rats. *MagnesRes* 2011; 24: 196-208.

Bermúdez-Peña C, López-Chaves C, Llopis J, Guerrero-Romero F, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Sánchez-González C. Aggravation by vanadium of Mg deficiency in STZ-induced diabetic rats. *MagnesRes* 2013; 26: 74-82.

The results obtained show that treatment with V in healthy rats at doses of 6.22 mg BMOV/day reduced food and water intake (\approx 15% and 50% respectively), which was associated with a reduction in weight gain (\approx 20%). These changes were accompanied by a sharp drop in selenium absorption and increased renal losses of magnesium. This situation led to a depletion of tissue selenium (in serum, kidneys and liver), hypomagnesaemia and reduced magnesium content in the femur. In addition, reduced

activity of serum alkaline phosphatase and increased levels of circulating urea and pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF α) were observed.

Liver selenium losses were accompanied by a reduction in the activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase and NAD(P)H:quinone-oxidoreductase I and by increased lipid peroxidation and protein oxidation (levels of MDA and carbonyl groups) in the liver. These changes indicate deterioration in antioxidant defences and the presence of hepatic oxidative damage. The deterioration of antioxidant defence and the presence of an inflammation process could have been the cause of the mild anaemic state observed in these rats.

Treatment of the STZ-diabetic rats with 6.22 mg BMOV/day (1 mg V/day) had no antidiabetic effect and reduced effects on the homeostasis of selenium and magnesium. However, treatment with 18.66 mg BMOV/day (3 mg V/day) induced a clear antidiabetic effect, normalising food intake and fasting blood glucose. Furthermore, treatment with 3 mg V/day also caused a decrease in the absorption and serum levels of Se and tissue depletion of this cation (in serum, kidneys, liver and spleen). This dosage also caused an increase in the renal losses of magnesium, thus inducing hypomagnesaemia and tissue depletion of this element (in kidney, liver, spleen and femur). This situation was accompanied by increased levels of uric acid, urea, total cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides and decreased serum activity of aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase. At this dose, we also observed increases in C-reactive protein and pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF α) in serum.

As in the case of the healthy rats, in the treatment with 18.66 mg BMOV/day (3 mg V/day), the hepatic losses of selenium were accompanied by a reduced activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase and NAD(P)H:quinone-oxidoreductase I and by increased lipid peroxidation and protein oxidation (levels of MDA and carbonyl groups) in the liver. This situation indicates the presence of hepatic oxidative damage by the impairment of antioxidant defences.

Overall, we conclude that BMOV alters the homeostasis of selenium and magnesium, leading to increased oxidative stress and the onset of an inflammatory process. In addition, in diabetic rats, the effects observed were similar to those found in healthy rats, but when a three times larger dose was used. Therefore, diabetic rats are less sensitive than nondiabetic rats to the toxic effect of V.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, de las proteínas y de los lípidos. Además de afectar varios procesos metabólicos, está asociada con alteraciones de la defensa oxidativa y el metabolismo de los elementos traza.

El origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, pero conllevan inexorablemente la existencia de alteraciones en la secreción de insulina, de la sensibilidad a la acción de la hormona, o de ambas en algún momento de su historia natural.

El vanadio es un metal ultra traza ampliamente distribuido en la naturaleza, presente en los tejidos de mamíferos a concentraciones por debajo de $1\mu\text{M}$, pero su papel como micronutriente en el humano aún no se encuentra completamente establecido; sin embargo, se ha demostrado que el vanadio es un elemento relacionado con las vías metabólicas de la glucosa y de los lípidos. Tiene varios estados de oxidación desde el -1 hasta el +5, de los cuales la forma +4 (vanadilo) y +5 (vanadato) son las más comunes. En el plasma se le encuentra en ambos estados de oxidación unido en un 90% a proteínas, fundamentalmente transferrina. Este elemento se distribuye fundamentalmente en hueso, riñón e hígado, encontrándose en el hueso los principales depósitos.

En los últimos años el vanadio ha adquirido gran importancia farmacológica debido a la actividad que ciertos complejos de dicho elemento ejerce como hipoglucemiantes. Compuestos de vanadio orgánicos, tales como el bis (maltolato) oxovanadio (IV), bis (etil maltolato) oxovanadium (IV), y acetilacetato de vanadilo, se han sintetizado para su uso en el tratamiento de la diabetes y el cáncer. Estudios experimentales, así como ensayos clínicos han demostrado la acción insulino mimética del vanadio disminuyendo la resistencia e incrementando la sensibilidad a la insulina y mejorando 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: a) estimulación de la autofosforilación de los receptores a la insulina, b) incremento en la actividad de la tirosina-cinasa en el receptor de insulina, c) fosforilación del sustrato del receptor de la insulina (IRS-1), d) incremento de la expresión del transportador GLUT 4. En resumen, aunque no se conocen exactamente los mecanismos de acción del vanadio, parece ser que el vanadio activa la cascada de transmisión de señalización de la insulina tras su unión al receptor, facilitando la entrada

y el metabolismo celular de la glucosa. Además, algunos autores sugieren que el vanadio mejora el estrés oxidativo al disminuir la producción y el efecto tóxico de radicales libre, procedente de la glucosa. Sin embargo, otros autores han descrito efectos prooxidantes del vanadio, debido a que no normaliza las alteraciones en el metabolismo de diversos elementos traza asociadas a la diabetes.

El selenio es un micronutriente esencial que, entre otras funciones, interviene en la defensa contra el estrés oxidativo, la regulación de acción de la hormona tiroidea, y la regulación del estado redox de la vitamina C y otras moléculas. En modelos animales se ha relacionado al selenio con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, ya que deficiencia de dicho elemento incrementa los niveles de glucosa plasmática en ratas sanas y eleva los niveles de glucosa plasmática en ratas diabéticas. “In vivo” e “in vitro”, se ha demostrado que el selenio tiene una acción insulinomimética semejante a la del vanadio y que su administración produce hipoglucemia, al favorecer la translocación del transportador GLUT 4, en ratas diabéticas.

Actualmente, la información sobre interacciones entre el vanadio y el selenio en ratas sanas es muy escasa y no existe información sobre posibles alteraciones en la homeostasis del selenio en ratas diabéticas como consecuencia del tratamiento con vanadio, dos elementos muy relacionados con el metabolismo de los carbohidratos y la presencia de estrés oxidativo. Por estas razones consideramos importante realizar el presente estudio sobre la interacción entre el vanadio y el selenio en ratas sanas y diabéticas.

Respecto al magnesio se sabe que juega un papel estructural y regulador muy importante en nuestro organismo. Entre sus funciones destaca el ser un ión que activa un amplio número de sistemas enzimáticos siendo esencial en el metabolismo de diversos nutrientes. Bajo el punto de vista fisiológico, las funciones del magnesio son bien conocidas y se encuentran descritas en un amplio número de publicaciones. También es bien conocida la relación entre el déficit nutricional de magnesio y la resistencia a la insulina, las alteraciones en el metabolismo y transporte de glucosa y el riesgo de desarrollar diabetes tipo 2. La reducción del magnesio intracelular inhibe la actividad de la tirosina kinasa en el receptor de la insulina, reduce la captación de glucosa, al interferir con la translocación del transportador de la glucosa (GLUT 4) y la utilización intracelular de la glucosa. El resultado de esta situación es un incremento de la resistencia periférica a la insulina.

El hecho de que tanto el magnesio como el vanadio participen en el metabolismo de la glucosa, interviniendo en los mismos procesos, nos conduce a pensar que ambos elementos puedan estar relacionados y actúen conjuntamente en el metabolismo de los hidratos de carbono. Por tanto, el estudio de posibles interacciones entre ambos elementos, podría ayudar a clarificar el papel del vanadio como micronutriente y agente antidiabético.

Aunque existe cierto grado de información sobre interacciones entre el vanadio y el selenio y entre el vanadio y el magnesio en ratas no diabéticas, no existe información sobre posibles alteraciones en la homeostasis del selenio y del magnesio en ratas diabéticas como consecuencia del tratamiento con vanadio, dos elementos que participan de un modo directo en el control del estrés oxidativo. Además, de su relación con el estrés oxidativo, ambos elementos se encuentran relacionados con el metabolismo de la glucosa de modo similar al vanadio. De acuerdo con los comentarios anteriores, en el presente estudio nos planteamos profundizar en el efecto de la exposición a vanadio en ratas sanas y aportar datos sobre si el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas alteraba la homeostasis del selenio y del magnesio, además consideramos de interés estudiar si, el tratamiento podría afectar los cambios en el metabolismo del magnesio ocasionados por la diabetes, dada la ausencia de publicaciones sobre este tema.

Por tanto consideramos importante abordar el estudio de las posibles interacciones entre el vanadio, selenio y magnesio en ratas diabéticas, ya que podría aportar información valiosa sobre sus efectos farmacológicos en la evolución de la diabetes.

De acuerdo con los anteriores comentarios el objetivo del presente trabajo es estudiar si el efecto del tratamiento con vanadio en ratas diabéticas altera la biodisponibilidad y distribución tisular del selenio y magnesio, así como su influencia sobre el estado antioxidante e inflamatorio. Los resultados obtenidos permitirán comprender mejor el papel del vanadio como micronutriente, su actividad biológica como agente antidiabético y sus efectos tóxicos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 LA DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas principalmente por hiperglucemia.

La hiperglucemia crónica de la diabetes es asociada con daño, disfunción y fallo de diferentes órganos, principalmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (American Association of Diabetes, 2011).

La DM cursa con gran número de procesos patológicos. La acción deficiente de la insulina en sus tejidos diana ocasiona alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas (Conget, 2002).

Clasificación

Actualmente la American Diabetes Association (2011) establece cuatro bloques principales de DM:

a) La DM tipo 1 que representa el 5-10% de los casos de DM, y es debida principalmente a una destrucción por autoinmunidad celular de las células β del páncreas, ocasionando una deficiencia absoluta de la secreción de insulina. Existe un tipo de Diabetes Idiopática, en algunas formas de DM 1, una minoría, no se conoce su etiología, algunos pacientes permanecen en una insulinopenia permanente y son propensos a cetoacidosis, pero no hay evidencia de autoinmunidad.

b) La DM tipo 2, representa aproximadamente el 90-95 % de los casos de DM, y es causada por una resistencia a la acción de la insulina con frecuencia acompañada de un defecto de la secreción de la insulina. El riesgo de desarrollar este tipo de DM incrementa con la edad, obesidad y sedentarismo. (Fig.1).

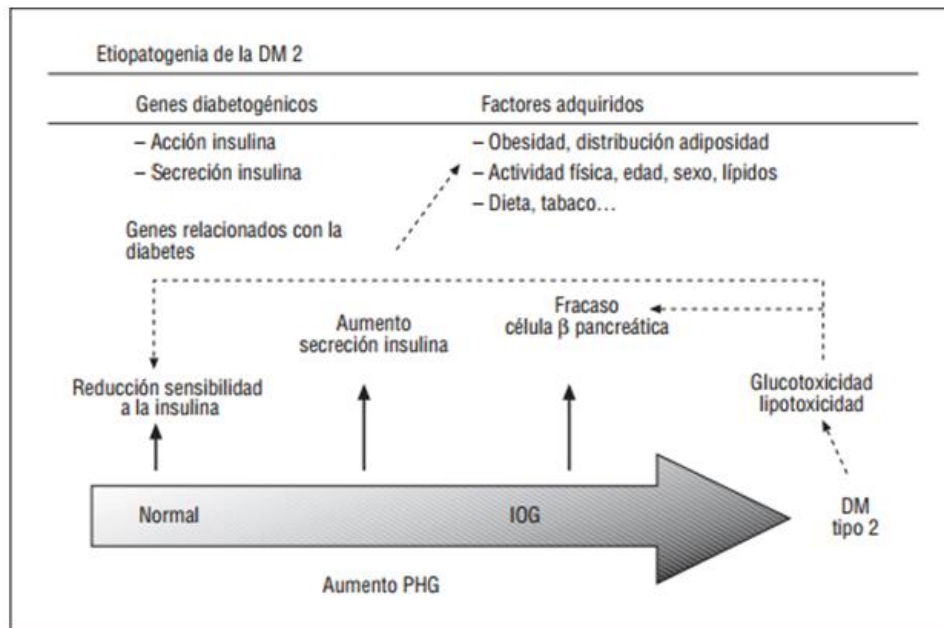


Figura 1.- Etiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 2. PHG: producción hepática de glucosa; IOG: tolerancia disminuida a la glucosa (Conget, 2002).

c) Otros tipos específicos de diabetes entre los que se describen los siguientes:

- *Defectos genéticos de las células β.* Varias formas de diabetes se asocian con defectos monogénicos en la función de las células β. Este tipo de DM es característico que se presente inicialmente como una hiperglicemia a edades tempranas aproximadamente antes de los 25 años de edad. Las anomalías genéticas que resultan en la inhabilidad a convertir la proinsulina a insulina.

- *Defectos genéticos en la acción de la insulina,* asociados principalmente con mutaciones en el receptor de la insulina mostrándose desde una hiperinsulinemia y una modesta hiperglicemia a una diabetes severa. Algunos individuos con estas mutaciones presentan acantosis nigricans, en las mujeres pudieran presentar síndrome de ovario poliquístico.

- *Enfermedades del páncreas exocrino.* Cualquier proceso que dañe difusamente el páncreas puede causar diabetes. Los procesos adquiridos incluyen pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía y carcinoma pancreático.

- *Endocrinopatías.* Muchas hormonas antagonizan la acción de la insulina, por tanto el exceso de estas pueden causar DM. Este tipo de diabetes se resuelve al tratar el exceso de la hormona involucrada.

- *Ciertos medicamentos* pueden inducir DM en individuos con resistencia a la insulina.

- *Infecciones de ciertos virus* han sido asociadas con la destrucción de células β .

d) DM gestacional, es cualquier grado inicial de intolerancia a la glucosa durante el embarazo. La mayoría de los casos se resuelve cuando tras el alumbramiento.

Sintomatología

Los síntomas característicos de la DM incluyen polidipsia, poliuria, polifagia, vision borrosa y pérdida de peso (debido al hipercatabolismo derivado de la hipoinsulinemia).

Entre las complicaciones de la diabetes se encuentran las complicaciones agudas como la cetoacidosis diabética o el síndrome hiperosmolar y las complicaciones crónicas, que consiste en un cuadro de neuropatía diabética periférica (úlceras de pie de diabético, amputaciones y pie de Charcot) también con manifestaciones autónomas que afectan a la motilidad gastrointestinal; macroangiopatía diabética que afecta a vasos coronarios y de las extremidades; microangiopatía diabética que incluye la retinopatía (por afectación de la retina), nefropatía (por afectación del glomérulo), neuropatía (por afectación de vasa nervorum), dermatopatía (por afectación de los vasos subcutáneos) y cataratas (figura 2). La hipertensión y las anormalidades del metabolismo de las lipoproteínas son a menudo encontradas en personas con DM (American Association of Diabetes, 2011).

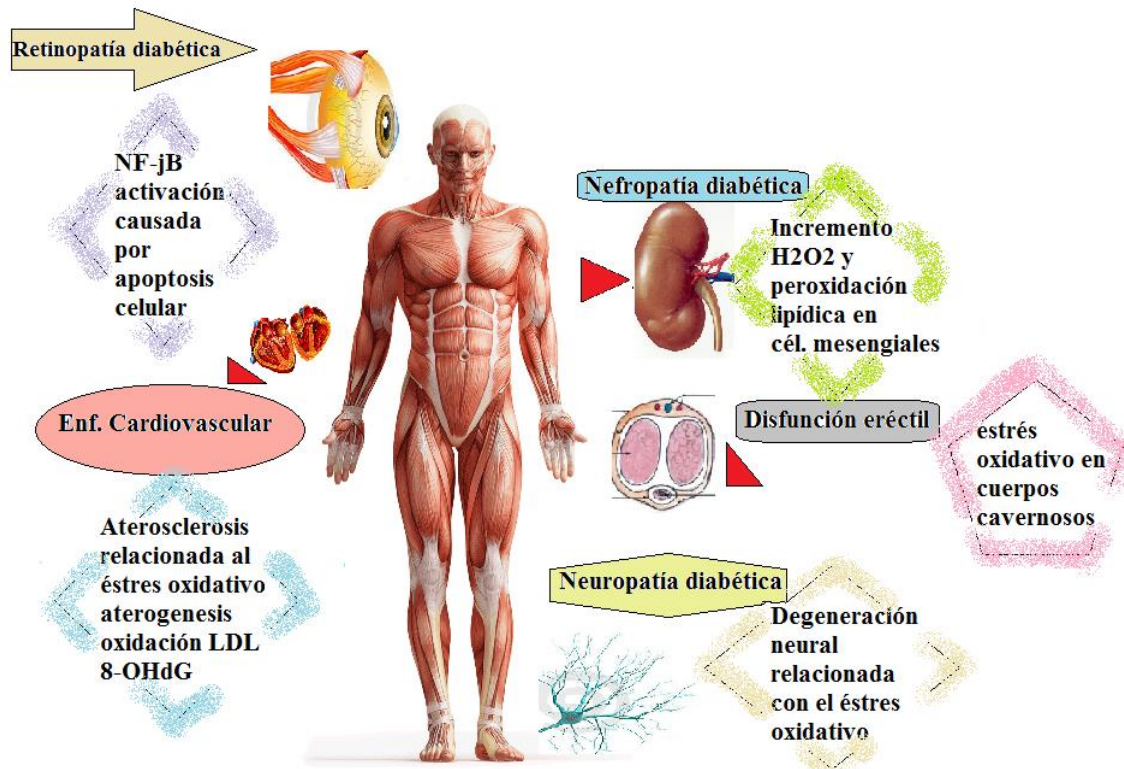


Figura 2.- Complicaciones de la diabetes mellitus

Criterios diagnósticos de DM:

Según la American Diabetes Association (2011), se asumen los siguientes criterios diagnósticos:

- 1.- Niveles de hemoglobina glucosilada $\geq 6.5\%$
- 2.- Glucosa plasmática en ayunas con valores ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l), en al menos dos ocasiones. Ayuno se define como la ausencia de ingesta calórica durante por lo menos 8h.
- 3.- Durante una curva de tolerancia oral a la glucosa, niveles de glucosa plasmática ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) a las 2 horas después de la carga oral de glucosa. La prueba debe ser realizada según lo descrito por la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa que contiene 75 g de glucosa anhidra en 150 ml de solución.
- 4.- En un paciente con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, la presencia de niveles de glucosa plasmática al azar ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l).

Stages Types	Normoglycemia	Hyperglycemia			
	Normal glucose regulation	Impaired Glucose Tolerance or Impaired Fasting Glucose (Pre-Diabetes)	Diabetes Mellitus		
			Not insulin requiring	Insulin requiring for control	Insulin requiring for survival
Type 1*	←	→			
Type 2	←	→			
Other Specific Types**	←	→			
Gestational Diabetes **	←	→			

Figura 3.- Trastornos de la glucemia: tipos etiológicos y etapa (American Association of Diabetes, 2011)

DM y daño oxidativo

Aunque existe evidencia experimental que indica que el estrés oxidativo puede determinar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías de la DM, aún hay controversia acerca de si el estrés oxidativo es un epifenómeno asociado a la DM más que un factor causal de esta enfermedad metabólica; no obstante, se ha demostrado que, en los sujetos diabéticos, existe un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y una disminución de las defensas antioxidantes (West, 2000; Wachnik et al,1992).

Hay varios mecanismos implicados en el incremento del estrés oxidativo (EO) en la DM, 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-hidroxi aldehídos, es capaz de autooxidarse a enediones (enolizarse) en solución acuosa y en presencia de metales de transición.

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. Así mismo, 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 glucosilada puede constituir una fuente donadora de radical $O_2^{\circ-}$ a la pared vascular en los pacientes 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 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 los 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 (West, 2000; Wachnik et al,1992).

3.2 VANADIO

El vanadio es un elemento bioactivo, el cual se encuentra presente en concentraciones bajas en plantas y animales, es el vigésimo primer elemento más abundante en la corteza terrestre (Thompson et al,1999).

En el pasado, sus compuestos eran prescritos como agentes terapéuticos para el tratamiento de anemia, clorosis, tuberculosis y diabetes mellitus; además, fue utilizado como antiséptico (Venkataraman y Sudha, 2005).

Hoy en día se sabe que el vanadio interviene en el metabolismo de los hidratos de carbono al mimetizar la acción de la insulina, principalmente estimulando la fosforilación de la tirosina al inhibir de modo selectivo la actividad de la fosfatasa de la

fosfotirosina (Nriagu, 1998). Además, interfiere con una multitud de procesos bioquímicos, penetra tanto la barrera hematoencefálica como la barrera placentaria y está presente en la leche materna (Nielsen, 1997).

Fuentes de Vanadio

Los alimentos con mayor contenido en vanadio incluyen los hongos, mariscos, pimienta negra, perejil, semillas de eneldo, así como ciertos alimentos preparados. Cabe mencionar que la cerveza y el vino pueden contribuir en una cantidad importante de vanadio en la dieta. El vanadio se encuentra principalmente en semillas contribuyendo con un 13 a 30 % a la ingesta total de vanadio; así mismo, suele estar presente en los edulcorantes y cereales para bebés (Mataix y Llopis, 2009; Institute of Medicine, 2001).

Rol del Vanadio

La esencialidad del vanadio es hoy en día un tema de debate. Entre las funciones de dicho elemento en algunos seres vivos se encuentra la de almacén y transporte de oxígeno, como agente transportador de electrones, como catalizador, y se sabe que participa en la fotosíntesis (Nielsen, 1997).

El vanadio en modelos animales normaliza la glucosa sanguínea, los niveles de lípidos, mejora la deficiencia de la hormona tiroidea, mejora la sensibilidad a la insulina y previene así las complicaciones de la diabetes como la cardiomiopatía y el desarrollo de cataratas. Del mismo modo, según diversos autores, el vanadio mejora el estado antioxidante y reduce la ingesta excesiva de alimentos y líquidos en la diabetes (Badmaev et al, 1999).

Formas biodisponibles del Vanadio

Existen al menos seis estados oxidativos del vanadio, que pueden formar polímeros (Nielsen, 1997). En animales grandes las formas tetra y pentavalente son las formas más importantes de vanadio. El estado tetravalente aparece simplemente como catión vanadil, el cual compite por sitios de ligandos de unión con el Ca^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , etc. Además forma complejos con proteínas, especialmente las asociadas al Fe^{2+} , como la transferrina y la ferritina, los cuales estabilizan al vanadil contra la oxidación.

El estado pentavalente es conocido como vanadato el cual forma complejos con otras sustancias biológicas, compite con el fosfato en muchos procesos bioquímicos. El vanadato es fácilmente reducido por el ascorbato, glutatión o NADH (Nielsen, 1997).

Actualmente no se han descrito las funciones bioquímicas del vanadio en animales y seres humanos.

El vanadato incrementa la actividad de la adenilato ciclasa y los niveles extracelulares de la adenosino monofosfato ciclasa (Nielsen, 1997).

Teóricamente, el efecto regulador del vanadio en los niveles de AMPc y la actividad podría afectar un amplio rango de funciones en el organismo, las cuales resultan de las uniones del segundo mensajero del AMPc en interacciones hormonales.

El principio fisiológico del AMPc como segundo mensajero podría causar inhibición de la agregación plaquetaria, incrementando la lipólisis en los adipocitos, aumentando el cronotropismo, el potencial de la secreción de la insulina, incrementando la producción de la hormona tiroidea, así como la síntesis de esteroides, la secreción de la hormona pituitaria y disminuyendo la presión intraocular.

Además el vanadio incrementa el transporte y la oxidación de la glucosa, disminuye la lipólisis, así como incrementa la síntesis de lípidos. También activa a síntesis de glucógeno en el tejido adiposo, músculo e hígado.

En el hígado de ratas diabéticas STZ el vanadio restaura los niveles de ARNm para enzimas glucolíticas, glucocinasa, L-tipo piruvato cinasa. Incrementa los niveles de síntesis de glucógeno, fosforilasa glucógeno y restaura el glucógeno en el hígado (Nielsen, 1997). “In vitro” e “in vivo” la biosíntesis de colesterol en el hígado, ácidos grasos y fosfolípidos es inhibida en ratas tratadas con sulfato de vanidil (Nielsen, 1997).

El vanadio al igual que la insulina incrementa los niveles de glucosa cerebral, disminuyendo así la ingesta de alimentos (Nielsen, 1997).

Bis(maltolato)oxovanadio (BMVO)

Es un compuesto de vanadio, que cuenta con ligandos no tóxicos, siendo dos a tres veces más potente que el vanadio inorgánico, ver figura 4. El BMOV puede ser absorbido rápidamente, eliminado lentamente del plasma y extensamente distribuido a lo largo de varios tejidos, acumulándose en gran medida en el fémur (Domingo, 1996).

El bis (maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) ha demostrado ser de dos a tres veces más efectivo que el sulfato de vanadilo como agente reductor de la glucosa, mejor tolerado que las sales de vanadio inorgánico, y dando como resultado la disminución de la glucemia en todos los modelos animales de diabetes en el que se sometió a prueba (Caravan et al,1995; Yuen et al, 1995). El BMOV en estudios animales mostró que puede administrarse en el agua de bebida con una eficacia equivalente a la de sulfato de vanadio (20). Un estudio farmacocinético realizado con BMOV y VOSO_4 (Setyawati et al, 1998) demostró de forma concluyente que el vanadio procedente del complejo, (un aditivo alimentario aprobado), mejoraba la captación tisular del ión en comparación con su congénere inorgánico (Thompson et al, 2006).

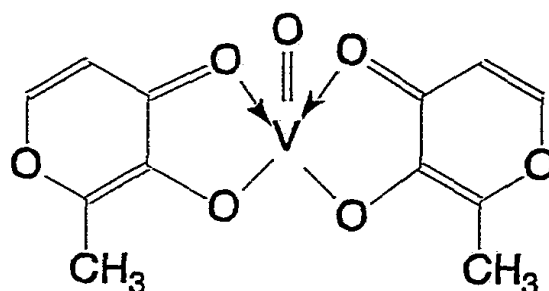


Figura 4.- Bismaltolato oxovanadium (BMOV)

Absorción y distribución

En seres humanos la mayoría del vanadio no es absorbido (tan solo se absorbe menos de 5 % del vanadio ingerido) (Institute of Medicine,2001; Mataix, 2009), por lo cual la mayor parte de vanadio excretado es a través de las heces (Nielsen,1997; Zhang et al, 2008). Generalmente se encuentra menos de $0.8\mu\text{g/L}$ en la orina (figura 4).

Estudios realizados en ratas mediante técnicas de perfusión intestinal, revelaron que el BMOV se absorbe en aproximadamente un 35% de la dosis administrada (Iglesias-González, 2012)

El modelo cinético del metabolismo del vanadio en el cuerpo indica que la absorción de vanadio tiene lugar en el tracto gastrointestinal superior. La mayoría del vanadio es transformado en el estomago en catión vanidil 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, lo cual podría explicar porque el vanadio pentavalente se absorbe de 3 a 5 veces más que la forma

tetravalente. Debido a los diferentes rangos de absorción, el efecto que otros componentes en la dieta ejercen en las formas de vanadio en el estomago y la velocidad a la cual se transforma en la forma tetravalente, influye en el porcentaje de vanadio ingerido que es absorbido.

Cabe mencionar que los compuestos solubles de vanadio inhalados y depositados en los pulmones, son rápidamente absorbidos, ésto implica que en trabajadores expuestos a vanadio a nivel industrial alrededor del 25% de dicho compuesto es absorbido, (Venkataraman y Sudha, 2005).

De acuerdo con los estudios de Crans y colaboradores, los compuestos de vanadio administrado a animales de experimentación en grandes cantidades y por períodos de tiempo prolongados (por ejemplo en el agua de bebida) son absorbidos más lentamente y cambian de estado de oxidación en el organismo (Crans et al, 2004). Por su parte, Zhang y colaboradores demostraron que el BMOV puede ser absorbido rápidamente; de manera que en ratas diabéticas, posterior a la administración subcutánea y la administración intragástrica de vanadio como dosis única, la concentración máxima de vanadio en sangre se observa de 0.6-0.4 horas y 2.4-0.9 horas, respectivamente (Zhang et al, 2008).

En general en animales de experimentación, el vanadio se acumula principalmente en riñón, bazo, testículos, hígado y huesos (Badmaev et al, 1999, Domingo,2000; Iglesias Gonzalez, 2012). Estudios en ratas mostraron que el BMOV se acumula principalmente en huesos (fémur), riñones e hígado (Institute of Medicine, 2001; Sanchez et al, 2011; Schroeder et al, 1963; Thompson y Orving, 2006).

Mecanismo de acción

Los mecanismos de acción que se han propuesto son los siguientes:

Inhibición de la actividad de la proteína tirosin fosfatasa, que está implicada en la activación del receptor de la insulina así como en la de la tirosin kinasa citosólica. (Goldwasser et al, 2000)

Fosforilación directa del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS-1) y la activación del fosfatidilinositol 3 kinasa.

Estos eventos repercutirían en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 (Kawabe et al, 2006; Thompson y Orvig, 2006).

Para entender el mecanismo de acción del vanadio y sus interacciones a nivel genético se ha propuesto la siguiente hipótesis: el vanadio inhibe la expresión génica de las vías de señalización de la insulina a nivel del RNAm (Wei et al, 2007). La mayoría de los genes de transcripción en las ratas diabéticas del estudio de Dan Wei y colaboradores mostraron normalización de los niveles de dichos genes tras el tratamiento con vanadio o con insulina. Un gran número de genes candidatos en la vía de señalización de la insulina están involucrados en el efecto que el vanadio tiene sobre la hiperglucemia (Wei et al, 2007); sin embargo se requieren futuras líneas de investigación que esclarezcan las vías de señalización, así como las posibles interacciones entre ellas.

Transporte

En lo que respecta al transporte de metal en el torrente sanguíneo, se han descrito dos proteínas de suero humano (transferrina y albúmina) que podían interactuar con el vanadio (De Cremer et al, 2002). La transferrina (Tf) tiene un peso molecular de aproximadamente 80 KDa y presenta dos sitios de unión para varios metales. La concentración de transferrina en el plasma humano es de aproximadamente 37 mM y sus sitios de unión a metal están ocupados sólo en un 30% aproximadamente por Fe (III), dejando un número significativo de sitios de unión a metal (~ 50 m) disponibles para la reacción con otros metales tales como fármacos a base de compuestos metálicos (Nagaoka et al, 2004). La albúmina también se ha considerado un potencial bioligando de iones vanadio (IV) aunque en menor medida que la transferrina. Ciertos estudios (Kiss et al; 2000) in vitro han revelado que la asociación de vanadio a Tf parece ocurrir de la misma manera, independientemente de la forma de vanadio que se añade a las muestras de suero. Este hallazgo indica que las especies de vanadio (IV) se disocian primero, al menos parcialmente, antes de que el vanadio se una a la Tf, y que la formación de complejos ternarios (VL-Tf, siendo L la molécula quelante de vanadio) no parecen ocurrir en el suero.

En estudios recientes, el uso integrado de HPLC-ICP-MS y MALDI-TOF ha permitido estudiar los transportadores de vanadio en el torrente sanguíneo después de la administración oral de BMOV. La transferrina sérica es el principal bioligando transportador de vanadio en plasma de rata, confirmando los experimentos anteriores in vitro. También se ha encontrado una pequeña fracción de vanadio intraeritrocitario en

forma de complejos de bajo peso molecular (~ 3kDa) no unido a hemoglobina (Iglesias-Gonzalez, 2012).

Excreción

Debido a la baja absorción a nivel gastrointestinal, el vanadio no absorbido es eliminado por las heces (Venkataraman y Sudha, 2005).

La orina es la ruta por la cual es excretado la mayor parte del vanadio absorbido de la dieta, así como una porción pudiera excretarse por la bilis, ver figura 5.

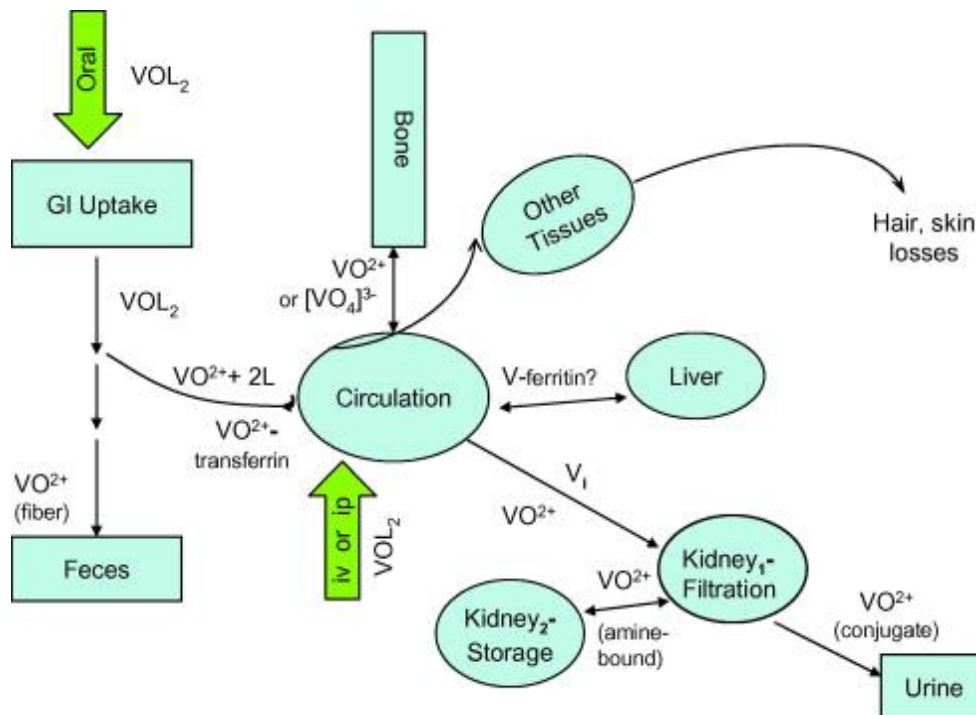


Figura 5.- Absorción, distribución y excreción del vanadio (Thompson y Orvig, 2006)

Ingesta recomendada y niveles tóxicos

La esencialidad del vanadio es hoy en día un tema de debate. No se ha establecido la ingesta recomendada para dicho elemento, pero existe evidencia de que el vanadio tiene un papel benéfico en algunos procesos fisiológicos para algunas especies (Institute of Medicine, 2001).

Pennington y Jones en 1987 reportaron que la ingesta de vanadio en niños y adolescentes oscila en un rango de 6.5 a 11 $\mu\text{g}/\text{día}$, mientras que en adultos y ancianos oscila entre 6 y 18 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Pennington y Jones, 1987). Los suplementos de vanadio que actualmente se venden en el mercado contienen aproximadamente 9 $\mu\text{g}/\text{día}$. (Institute of Medicine, 2001).

El nivel de consumo máximo tolerable (UL) es el nivel más alto de ingesta diaria de nutrientes que no presenta riesgos de efectos adversos para la salud en la mayoría de los individuos. El nivel de consumo máximo tolerable (UL) es de 1.8 mg/día en adultos (Institute of Medicine, 2001).

Se ha establecido que la dosis letal 50% (DL50) es de 31-90 mg V/kg peso/día. (EFSA, 2004). Se considera la DL 50 es la dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de experimentación

Deficiencia

Las ratas, sometidas a dietas pobres en vanadio, reportaron deformidades esqueléticas, en las patas delanteras, así como articulaciones tarsales engrosadas, depleción de las células rojas, de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y cecal total de anhidrasa carbonica, incluso se presentó incremento del peso de la glándula tiroides. En seres humanos no existen estudios sobre la deficiencia de vanadio (Nielsen, 1997; Nielsen, 1999).

Efectos tóxicos

La variedad de la toxicidad es diferente entre las especies así como entre las distintas dosis y compuestos ensayados (Institute of Medicine, 2001).

Dentro de los compuestos de vanadio el bismaltoato de oxivanadio IV (BMVO) es el que hoy día ha mostrado una menor toxicidad (Domingo, 2000). El compuesto de vanadio con mayor toxicidad es el pentóxido de vanadio (Institute of Medicine, 2001).

En ratas de experimentación, se ha reportado una intoxicación aguda de vanadio, presentando una enteritis descamativa, congestión hepática leve y una ligera degeneración del parénquima de los túbulos renales. En ratones, una dosis subcutánea de 20 mg/kg de metavanadato de amonio produjo necrosis tubular aguda 6 a 7 horas postinyección. A nivel renal, no existe evidencia de dicha toxicidad en seres humanos,

si bien se utilizan en animales de experimentación dosis superiores a las usadas en humanos. Otros estudios en animales han mostrado desde alteraciones gastrointestinales (diarrea), lengua verde, retraso en el crecimiento, anorexia y muerte (Institute of Medicine, 2001).

Carmignani y colaboradores en 1991 demostraron que la exposición a vanadato inducía o incrementaba la presión arterial en ratas (Carmignani et al, 1991).

En base a varios estudios realizados con animales, se concluye que animales que tienen una ingesta diaria de $196\mu\text{mol}$ (10mg) por periodos prolongados presentan alguno de los efectos tóxicos mencionados anteriormente (Nielsen,1999).

En seres humanos, actualmente no existe evidencia de los efectos adversos ocasionados por el vanadio asociados al contenido de éste en los alimentos, ya que es la mayor fuente de exposición a dicho elemento, por la población en general (Barceloux, 1999); además, en virtud de la pobre absorción gastrointestinal de dicho elemento, la intoxicación alimentaria por vanadio no representa un problema para los seres humanos (Venkataraman y Sudha, 2005).

En seres humanos sobreexposados a vanadio medioambiental, los efectos adversos ocasionados por los compuestos de vanadio fueron molestias gastrointestinales, lengua verde, fatiga, letargo y lesiones neurofocales y en algunos casos calambres abdominales (Barceloux, 1999; Institute of Medicine, 2001; Nielsen,1999). La mayoría de toxicidad reportada en seres humanos involucra una alta exposición industrial en los niveles de pentóxido de vanadio en aire, la cual es la forma más tóxica de dicho elemento (Institute of Medicine, 2001).

Efectos farmacológicos atribuidos al Vanadio

En varios estudios se ha demostrado un claro efecto del vanadio como insulino mimético, mejorando la resistencia a la insulina, incrementando la sensibilidad de esta, así como interviniendo en la normalización de la glucosa basal, mejorando el estrés oxidativo, y corrigiendo el funcionamiento anormal de enzimas glucolíticas como la fosfofructocinasa y glucocinasa (Thompson y Orving , 2006; Barceloux, 1999; Marzban et al, 2002). Los efectos de la acción insulino mimética del vanadio se observaron por primera vez en los adipocitos aislados de ratas (Goldwasser et al, 2000).

El vanadio puede comportarse tanto como un antioxidante o como un prooxidante (Badmaev et al, 1999).

Estudios en ratas STZ mostraron que la biosíntesis tanto de colesterol, ácidos grasos como de fosfolípidos fue incrementada por el vanadio (Badmaev et al, 1999).

Un gran número de aplicaciones farmacológicas se ha investigado para el vanadio, incluyendo el tratamiento de diabetes, terapia contra algunos tipos de cáncer, actividad antiinflamatoria, hipertensión y obesidad (Thompson y Orving, 2006).

Vanadio y Diabetes Mellitus

Se ha demostrado que el vanadio tiene un potencial insulinomimético e hipoglucemiante, el cual se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales y, recientemente, en sujetos humanos con diabetes. (Karmaker et al, 2008; Sakurai et al, 2008, Sun et al, 2000, Sanchez et al, 2011). La administración de sulfato de vanidil reduce la pérdida de peso corporal de las ratas diabéticas STZ (Goldwasser et al, 2000; Kawabe et al, 2006, Meyerovitch et al, 2000, Sanchez et al, 2011)(figura 7). Diversos compuestos de vanadio han demostrado reducir la poliuria, polidipsia y polifagia presentes en la diabetes (Sanchez-Gonzalez et al, 2012a).

El vanadio y sus compuestos estimulan el transporte y oxidación de la glucosa (ver figura 6), la síntesis de glucógeno, la lipogénesis, inhibe la lipólisis y la gluconeogénesis. No obstante el tratamiento con vanadio no reduce la incidencia de diabetes en ratones prediabéticos no obesos (Meyerovitch et al, 2000).

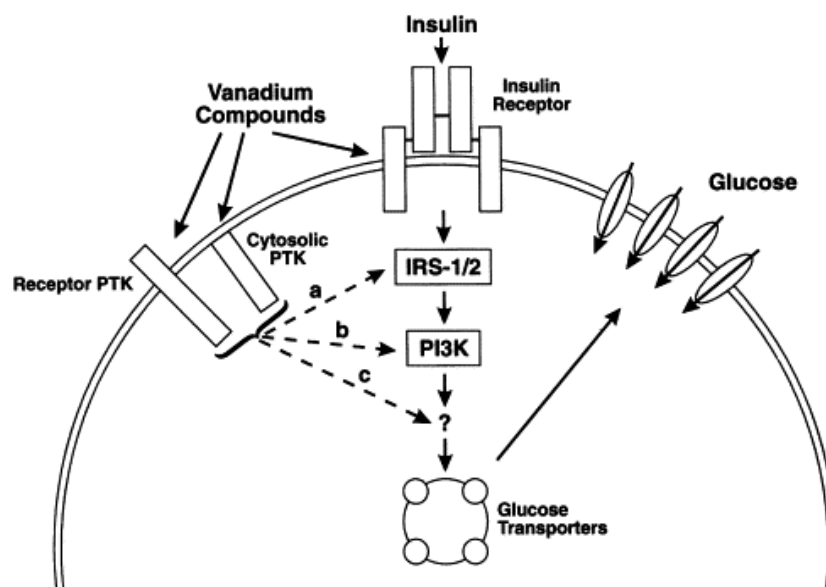


Figura 6.-Mecanismo de acción del vanadio.

(Sakurai et al, 2008)

La hiperglicemia crónica es producida por la presencia de bajos niveles intracelulares de glucosa-6-fosfato. El uso de vanadio como tratamiento hipoglucemiante en ratas STZ restaura dichos niveles (Sun et al, 2000).

Iglesias-Gonzalez y colaboradores demostraron que la administración de sulfato de vanadil disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada HbA1c en ratas diabéticas-STZ (Iglesias-González et al, 2012). Ensayos clínicos muestran que los suplementos con sulfato de vanidil normalizan los niveles de glucosa sanguínea y disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada HbA1c en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (Kurt et al, 2011).

El efecto del vanadio sobre la leptina y su implicación en el desarrollo de la diabetes mellitus es hoy día objeto de investigación. Los resultados obtenidos por diversos autores demuestran que el vanadio incrementa la secreción de leptina (Chen et al, 2001) y la señal de transducción de la leptina (Wilsey et al, 2006). Sin embargo, nuestro grupo de investigación ha encontrado que en ratas sanas hay un descenso significativo de la leptinemia tras el tratamiento con BMOV (Sanchez-Gonzalez, 2014b)

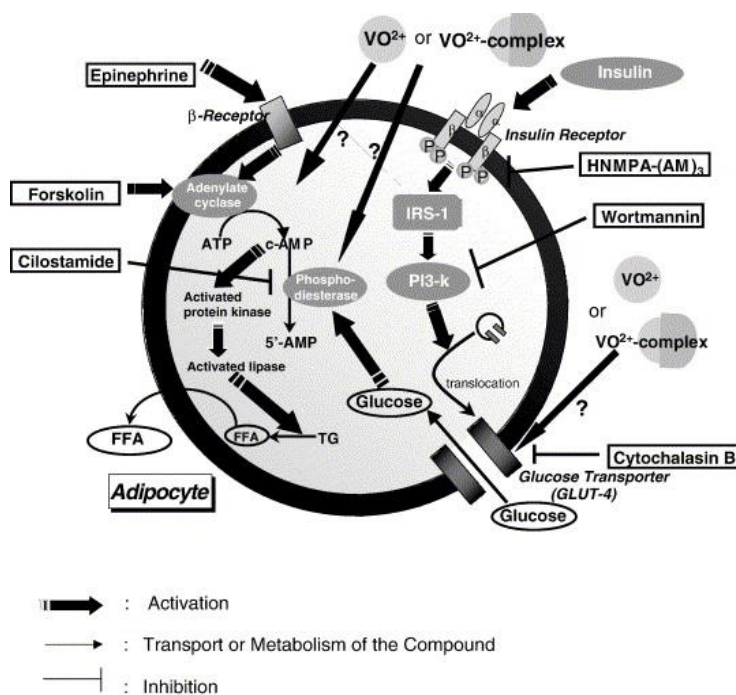


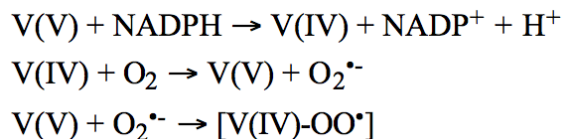
Figura 7.- Mecanismo de acción propuesto para el vanadio en los adipocitos de las ratas diabéticas. (Goldwaser et al. 2005)

Vanadio y sistema antioxidante

Se ha sugerido que el vanadio 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 la diabetes (Thompson y Orving, 2006; Yanardag y Tunail, 2006). Por otra parte, los efectos pro-oxidantes de este metal en los tejidos, especialmente los eritrocitos, hígado y riñón se asocian con las interacciones con varios elementos traza incluyendo el hierro, el cobre y zinc (Oster et al, 1993; Scibior et al, 2009; Yanardag y Tunail, 2006).

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 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 (Valko et al, 2005).



Estas reacciones conducen a la formación de peroxovanadyl [$\text{V(IV)-OO}^{\bullet}$] y vanadilo hidróperóxido [$\text{V(IV)-OH}^{\bullet}$]. El superóxido generado se convierte adicionalmente, por reacción de dismutación con SOD, en H_2O_2 . Estudios in vitro han confirmado que la reducción no enzimática de un electrón de vanadio mediada por ascorbato junto con fosfato puede representar una importante vía de reducción de vanadio in vivo. Se ha propuesto que las especies reactivas resultantes generadas por vanadio (IV), por H_2O_2 y hidróperóxido de lípidos, a través de la reacción de Fenton, puede jugar un papel importante en el mecanismo de vanadio y en la inducción de lesión celular por el vanadio (Valko et al, 2005).

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) (Valko et al, 2005).



La formación de $\cdot\text{OH}$ 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 extraídas 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 (Valko et al, 2005).

Se diseñó un estudio en ratones para investigar la inducción de apoptosis por el vanadio, la inflamación pulmonar y el papel de las ROS. El vanadio 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 $\cdot\text{OH}$. Estos resultados indican que múltiples especies oxidativas están involucradas en la inflamación pulmonar y apoptosis inducida por vanadio y que el H₂O₂ juega un papel importante en este proceso (Valko et al, 2005).

Zhao y colaboradores demostraron en 2010 que los compuestos de vanadio ejercen diversos efectos sobre la mitocondria induciendo el estrés oxidativo,

incrementando su permeabilidad y la liberación de Citocromo C, favoreciendo el proceso de apoptosis (Zhao et al, 2010).

Los resultados obtenidos por Scibior y colaboradores, indican que el vanadio reduce la capacidad antioxidante total e incrementa la generación de peróxidos lipídicos hepático, confirmando el potencial prooxidante del vanadio no solo *in vivo* sino *in vitro* (Scibior et al, 2009). Como se detalla más adelante, según Scibior y colaboradores, estos hallazgos pueden ser los causantes de la generación de procesos de anemia en animales tratados con vanadio (Scibior et al, 2010b; Scibior et al, 2006).

Los resultados publicados por nuestro grupo de investigación también avalan el carácter antioxidante del vanadio, produciendo un desequilibrio de la homeostasis del selenio y como consecuencia en la alteración de enzimas dependientes del selenio relacionadas con la defensa antioxidante (Yanardag y Tunail, 2006; Sánchez-González et al, 2012a).

Sin embargo, también se ha observado un papel antioxidante del vanadio en la diabetes. Se ha propuesto que el estrés oxidativo participa tanto en el origen como en el aumento de las complicaciones secundarias de la diabetes.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo causado por la toxicidad de la glucosa y la producción resultante de radicales libres, especialmente en el páncreas, es causa importante del desarrollo de resistencia a la insulina en la diabetes.

Los resultados experimentales sugieren que la administración oral de vanadato, debido a sus propiedades insulinomiméticas, ocasiona cambios en el metabolismo celular del GSH, apoyando la hipótesis de la capacidad antioxidante de este metal de transición (Yanardag y Tunail, 2006).

3.3 SELENIO

El selenio (Se) es un elemento traza presente en la naturaleza; es un micronutriente esencial para los humanos, se encuentra en el suelo y entra en la cadena alimenticia a través de las plantas.

Los humanos obtienen la mayoría del selenio de la dieta, proveniente del pan, cereal, carnes y aves. Los niveles tisulares de selenio son influenciados fácilmente por la ingesta dietética, los cuales dependen del selenio disponible del suelo en las diferentes zonas geográficas. El agua de bebida, no provee la fuente nutricional

adecuada de selenio, en la mayoría de los países donde se han realizado estudios sobre dicho micronutriente.

El selenio no puede ser sintetizado por los seres humanos, se sintetiza inicialmente en las plantas, incorporándose dentro de la metionina contenida en una variedad de proteínas denominadas selenoproteínas, disponibles de las plantas como selenometionina y en animales como selenocisteína, esta última da cuenta de la actividad biológica del selenio (Foster et al, 1997; Navarro-Alarcon et al, 2008; Brown et al, 2001). Dichas selenoproteínas contienen el elemento en cantidades estequiométricas.

El selenio se absorbe en el yeyuno e íleon de los mamíferos (Institute of Medicine, 2001), en un 50-100 % y es eliminado a través de la orina principalmente, heces y aire espirado (Navarro Alarcón, 2010).

Hasta hoy día se sabe que hay más de 100 selenoproteínas, las cuales pueden encontrarse en mamíferos. A la fecha hay 15 selenoproteínas, que han sido purificadas o clonadas permitiendo a futuro la caracterización de su función biológica.

Formas disponibles de selenio

El selenio y sus diferentes entidades químicas son absorbidas por mecanismos intestinales y se almacena en varios órganos, donde es incorporado dentro de las selenoproteínas dependientes de la forma química de selenio (Mehdi et al, 2013)

Los cuatro estados naturales de oxidación del selenio son: selenio elemental, selenato, seleniato y selenito. Los compuestos orgánicos de selenio son la selenometionina y selenocisteína.

La seleniometionina, derivado principalmente de plantas (cereales, legumbres, soya), entra dentro del grupo de metionina en el organismo y comparte el destino de la metionina hasta ser catabolizada por la vía de transulfuración (Mehdi et al, 2013; Reilly et al, 2006; Navarro-Alarcon et al, 2008). La selenocisteína libre resultante se desglosa con la liberación de una forma reducida del elemento, que es designado seleniuro (Esaky et al, 1982).

Las formas inorgánicas de selenio son el selenato y el selenito. El selenato es absorbido casi en su totalidad, solo una fracción significativa de este se pierde en la orina antes de ser incorporado en los tejidos. El selenito, tiene un grado de absorción más variable probablemente debido a interacciones con sustancias en el lumen

intestinal. Esta forma de selenio se retiene mejor, una vez absorbido (Thomson et al, 1986). Tanto el selenato como el selenito son utilizados frecuentemente para enriquecer alimentos o en suplementos dietéticos. El selenio tiene una biodisponibilidad que excede el 50% (Navarro-Alarcon et al, 2008).

El metabolismo de la seleniomietionina, derivado principalmente de plantas, entra en el grupo de metionina en el organismo y comparte el destino de la metionina hasta ser catabolizada por la vía de transulfuración. La selenocisteína libre resultante se desglosa con la liberación de una forma reducida del elemento, que es designado seleniuro (Esaky et al, 1982). El selenito ingerido, selenato y selenocisteína son aparentemente metabolizados directamente a seleniuro.

Reservas de selenio en el organismo

Hay dos formas de reservas del selenio en los seres humanos y animales. Uno de ellos presente como selenometionina, depende de la ingesta de selenio como selenometionina (Waschulewski et al, 1988).

La cantidad disponible de selenio en este grupo se debe a la función del volumen de reserva de la metionina. La segunda reserva de selenio se encuentra en el hígado como glutatión peroxidasa 1 (GSHPx-1). En ratas, el 25% del selenio total del cuerpo está presente en este grupo (Behne et al, 1983).

En los seres humanos la mayor concentración de selenio se localiza en el músculo esquelético aproximadamente un 50%, sin embargo se encuentran altos niveles de este elemento en los riñones, testículos e hígado (Navarro-Alarcon et al, 2008; Navarro Alarcón, 2010). Las células que consumen gran cantidad de selenio son las del sistema inmune, eritrocitos y plaquetas (Navarro-Alarcon et al, 2008).

Bioligandos dependientes de Se

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima selenio dependiente, la cual fue aislada de un eritrocito bovino por primera vez en 1957 por Millis, posteriormente en humanos y animales. El selenio es un cofactor de la familia GPx las cuales protegen contra el estrés oxidativo (Navarro-Alarcon et al, 2008). La GPx se encuentra en el citosol donde su función es antioxidante por la reducción directa del peróxido de hidrógeno y la fosfolipasa A2 adherida a los hidroperóxidos lipídicos (Ottensmeyer, 2006).

La GPx cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o lipoperóxido, utilizando como agente reductor el glutatión reducido (Cisneros et al, 1997). Los lipoperóxidos son tóxicos en los tejidos animales ya que dan lugar a especies reactivas del oxígeno (ROS) como los radicales peróxidos (Cisneros et al, 1997). La GPx, como parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los lipoperóxidos, reduciéndolos en presencia del glutatión reducido (Navarro-Alarcon et al, 2008). Ya que la oxidación de los lipoperóxidos produce hidróxidos que son potencialmente dañinos, porque al oxidarse se convierten en radicales alcoholóxidos, para los que no se conoce enzima que los metabolice (Cisneros et al, 1997). Por tanto la GPx y la selenoproteína P están involucradas en la respuesta inflamatoria (Navarro-Alarcon et al, 2008)

La familia de las GPx incluyen 4 enzimas: 1-glutatión peroxidasa clásica, 2-glutatión peroxidasa gastrointestinal, 3-glutatión peroxidasa plasmática, 4-glutation peroxidasa fosfolipido hidroxiperoxidasa (Cisneros et al, 1997;Brown et al, 2001) actúan como antioxidantes ante el estrés oxidativo (Flohé, 1988). La GPx clásica fue la primera selenoproteína identificada y demostró una fuerte relación lineal entre la concentración del selenio eritrocitario y la actividad de GPx, siendo el primer marcador bioquímico funcional del selenio.

Las selenio peroxidases son genéticamente, estructuralmente y cinéticamente diferentes, y presentan funciones comunes e individuales.

Otras selenoproteínas

Se ha propuesto que las selenoproteínas P y W tienen una acción antioxidante (Arteel et al, 1998; Burk et al, 1995; Saito et al, 1999). La selenoproteína P es una proteína plasmática de síntesis hepática y renal. Esta proteína constituye la principal forma de selenio plasmático representando más de un 60% del selenio plasmático total. La selenoproteína P actúa como un antioxidante extracelular asociado con el endotelio vascular el cual disminuye la peroxinitrilo (ONOO⁻) que es una especie reactiva de nitrógeno (Navarro-Alarcon et al, 2008). La selenoproteína W es una proteína muscular.

La 3-yodotironina diyodinasas dependiente de selenio regula el metabolismo de la hormona tiroidea (Berry et al, 1992). Las funciones de la 3-tiorredoxina reductasa incluyen la reducción de puentes disulfuro intramoleculares y la regeneración de ácido ascórbico de sus metabolitos oxidados. La isoforma selenio-dependiente selenofosfato

sintetasa participa en el metabolismo del selenio. Otras selenoproteínas aún no se conocen con la misma medida sus funciones (Behne et al, 1983).

Funciones

Dentro de las funciones biológicas conocidas de selenio está la defensa contra el estrés oxidativo, la regulación de acción de la hormona tiroidea, y la regulación del estado redox de la vitamina C y otras moléculas. (Navarro-Alarcón et al, 2000)

Absorción

La absorción de selenio es eficiente y no está regulada. Más del 90 por ciento de seleniometionina, forma la mayor parte del selenio de la dieta (Otten, 2006), es la forma principal de selenio (Boosalis, 2008), la cual es absorbida por el mismo mecanismo que la metionina (Swanson et al, 1991). La seleniometionina junto con selenocisteína, se absorben bien y son altamente biodisponibles. (Boosalis, 2008).

Aunque poco se sabe acerca de la absorción de selenocisteína, parece que se absorbe eficientemente. Las reservas de selenocisteína responden a las necesidades de selenio; cuando es requerido para la síntesis de otras selenoproteínas (Boosalis, 2008), es casi completamente ionizado y es extremadamente eficiente como catalizador biológico. La selenocisteína, es un componente antioxidante de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), cuya función consiste en proteger a las proteínas, las membranas celulares, el Se es incorporado como selenocisteína en el sitio activador de las proteínas (Cisneros et al, 1997). La GPx4 reacciona con los fosfolípidos hidroperoxidados, y es capaz de metabolizar el colesterol e hidroperóxidos de éster del colesterol en lipoproteína oxidada de la baja densidad.

Por lo tanto, es esencial para la destrucción de ácidos grasos hidroperoxidados. Si no redujera los ácidos grasos, conduciría a reacciones en cadena incontroladas de radical libre, que son deletéreas para la integridad de las membranas (Cisneros et al, 1997).

Biodisponibilidad y excreción

El selenio de la dieta puede convertirse en un factor limitante para la síntesis de selenoproteínas, por lo cual sus depósitos, se encuentran bajo regulación por una reducción de la concentración de mRNA de GPx (Sunde et al, 2011). Esto hace que el selenio este disponible para la síntesis de otras selenoproteínas (Otten, 2006).

El mecanismo que regula la producción de metabolitos de excreción no ha sido definido aún, pero la excreción ha demostrado ser responsable de mantener la homeostasis de selenio en los animales (Burk et al,1972). Los metabolitos de excreción aparecen en la orina principalmente, pero cuando se excretan grandes cantidades de selenio, pueden incluso eliminarse a través de la respiración por medio de metabolitos volátiles (Otten, 2006;McConnellet al, 1952).

Valores recomendados de selenio

El selenio es un micronutriente cuyas concentraciones puede causar deficiencia o toxicidad, por lo tanto es importante conocer su abundancia o deficiencia en los alimentos (Navarro-Alarcón et al, 2000).

La ingesta recomendada (RDA) de selenio en hombres y mujeres es de 55 μg (0.7 μmol)/día. El plasma humano contiene 0,8 a 1,1 $\mu\text{mol} / \text{L}$ (7-9 $\mu\text{g} / \text{dL}$) de selenio (Navarro-Alarcon et al, 2008; Hill et al, 1996). Por encima de este rango, las concentraciones de selenoproteínas se asocian a factores genéticos y ambientales (Brown et al, 2001).

Deficiencia

En general la concentración de selenio en el suelo es baja en Europa, así como en el noreste de China (Navarro Alarcón, 2010), donde se han presentado enfermedades ocasionadas por la deficiencia de selenio tales como la enfermedad de Keshan, una cardiomiopatía que ocurre sólo en niños, la cual parece ser desencadenada por estrés adicional, posiblemente, una infección o una exposición a sustancias químicas (Navarro-Alarcon et al, 2008; Geet al, 1983). La enfermedad de Kashin-Beck, una enfermedad endémica de cartílago, que se produce en la preadolescencia o adolescencia, es más frecuente en zonas con bajos niveles de selenio (Navarro-Alarcon et al, 2008;

Yang et al, 1988). Es posible que esta enfermedad, como la enfermedad de Keshan, sólo se produzca en las personas deficientes en selenio. Sin embargo, no se ha demostrado que la mejora del estado nutricional del selenio pueda prevenir la enfermedad de Kashin-Beck, de modo que la participación de la deficiencia de selenio en su patogénesis es aún incierta.

Estas consideraciones indican que la deficiencia de selenio rara vez causa enfermedad cuando se produce de forma aislada. Sin embargo, conduce a cambios bioquímicos que predisponen a enfermedades asociadas a otros problemas (Brown et al, 2001).

Los niveles bajos de selenio crónico, pueden favorecer el desarrollo de enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares así como incrementar la susceptibilidad a la infección viral (Brown et al, 2001). Por lo cual, el selenio es de fundamental importancia en la salud humana, siendo un componente esencial para varias vías metabólicas, incluyendo el metabolismo de la hormona tiroidea, interviniendo en el control de la homeostasis de las hormonas tiroideas (Brown et al, 2001), así como mecanismo defensor ante el estrés oxidativo, ayudando al estado redox de la vitamina C y otras moléculas.

Los efectos clínicos de una ingesta moderadamente deficiente de selenio en animales de experimentación, son relativamente leves. Sin embargo, ciertas circunstancias como el estado nutricional e inmunológico pueden llevar a enfermedades graves en los animales deficientes en selenio. Por ejemplo, la inducción de la deficiencia de vitamina E en animales deficientes en selenio provoca la peroxidación lipídica y necrosis hepática en ratas y cerdos, así como daño cardíaco en los cerdos, ovejas y ganado vacuno (Van Vleet, 1980). Otro ejemplo de este fenómeno, es la conversión de una cepa no patógena del virus Coxsackie B3 a un patógeno que causa miocarditis, cuando infecta a ratones deficientes en selenio (Beck et al, 1998; Levander, 2000).

La deficiencia de selenio se asocia con daño hepático y necrosis, similar a la causada por un consumo de alcohol excesivo. Este efecto ocurre frecuentemente con concentraciones bajas de vitamina E (Navarro-Alarcon et al, 2008).

Intoxicación por selenio

El selenio es un enigma alimenticio porque es un micronutriente esencial y a su vez es altamente tóxico. (Institute of Medicine, 2000)

Los primeros signos de toxicidad aguda por selenio son hipotensión y taquicardia; a menudo se muestra aplanamiento e inversión de la onda T, y prolongación del intervalo QT. La muerte suele ser precedida por hipotensión refractaria, vasodilatación periférica y depresión miocárdica directa (Institute of Medicine, 2000).

La ingesta de grandes cantidades de selenio de forma crónica, ocasiona selenosis, caracterizada por fragilidad y pérdida de cabello y uñas, halitosis, erupciones de la piel, miopatía, irritabilidad y otras anomalías del sistema nervioso incluyendo neuropatía (Navarro-Alarcon et al, 2008; Thomson et al, 1986; Zwolak et al, 2012), otros síntomas de toxicidad crónica son la presencia de náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal; el edema pulmonar puede ser una complicación grave (Navarro-Alarcon et al, 2008; Thomson et al, 1986). Dentro de los síntomas neurológicos se describen temblores, espasmos musculares, inquietud, confusión, delirio y coma (Navarro-Alarcon et al, 2008). Se ha reportado elevación de la creatinina sérica, que aparece al inicio de el episodio de toxicidad y alcanza un máximo a los 4-5 días (Navarro-Alarcon et al, 2008).

El exceso de selenio aumenta el estrés oxidativo y la inflamación, así como enfermedades tales como la escoliosis idiopática en adolescentes o la esclerosis lateral amiotrófica (Dastyh et al, 2008).

En las últimas décadas ha sido un gran reto en investigación el metabolismo del selenio y su influencia en la nutrición humana. Hoy día aún no se sabe completamente su función (Mehdi et al, 2013; Brown et al, 2001).

Estudios de selenio en DM

La relación existente entre los niveles de selenio y la DM es hoy día un tema controvertido. Diversas teorías postulan sobre las bondades o perjuicios del aporte de suplementos del selenio en el tratamiento de la DM tipo 2.

El selenio tiene potencial antioxidante y antiinflamatorio y por ello un rol importante en la resistencia a la insulina y la diabetes, por lo que el aporte de suplementos de selenio pudiera ser un campo promisorio en el control de la diabetes; sin

embargo, los estudios en este campo son escasos (Battin y Brumaghim, 2009, Tapiero et al, 2003).

En la DM, la hiperglucemia o bien la hiperinsulinemia parecen inhibir a la p38MAPkinasa, ocasionando por esta vía un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión, favoreciendo el proceso inflamatorio. Según diversos autores (Zheng et al, 2008), el selenio mediante la estimulación de la p38MAPkinase, que reduce la expresión de dichas moléculas de adhesión, podría reducir así la inflamación. El selenio, por otra parte, parece reducir el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB), así como los niveles de la Proteína C reactiva y L-selectina soluble, lo que también podría reducir la inflamación, (Wiernsperger et al, 2010). Es por ello que el selenio podría mejorar el metabolismo de la glucosa.

En estudios realizados en ratas diabéticas tipo 1, el selenito de sodio demostró proteger a la mitocondria del estrés oxidativo. Otros modelos experimentales en ratas han demostrado un mejor efecto hipoglucemiante cuando se administró selenometionina en comparación a la administración de selenato de sodio. Hay estudios que demuestran que el selenato disminuye la gluconeogénesis e inhibe las fosfatasa fosfotirosinas en un 50%, dicho efecto es atribuible a la formación de selenito desde selenato (Dastyh et al, 2008; Ulusu et al, 2005; Becket et al, 1996).

Otros estudios demuestran que la inducción de la deficiencia de selenio incrementa los niveles de glucosa plasmática en ratas sanas y en ratas diabéticas. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el selenato de sodio posee una acción insulinomimética. Según algunos autores, la administración de dosis elevadas de selenato de sodio en ratas sanas produjo hipoglucemia, mientras que en ratas diabéticas tipo 1 inducidas con STZ, se restauró el control glucémico (Ulus et al, 2005; Waschulewski et al, 1988).

En estudios llevados a cabo por Ezaki, el selenato estimuló la actividad de transporte de glucosa de una manera dosis-dependiente en los adipocitos aislados de rata (Ezaki, 1990) lo cual se debió a la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT-1 y GLUT-2) a la superficie de la membrana (Stapleton, 2000).

Varios mecanismos teóricamente podrían contribuir a la acción hipoglucemiante oral del selenato en ratas diabéticas. En primer lugar, se ha observado *in vitro* una inhibición del transporte de glucosa intestinal por selenato (Andreas S. Mueller et al, 2006). En ratas diabéticas tipo 1, el selenito de Na protegió a la mitocondria del daño producido por el estrés oxidativo (Can et al, 2005). Las propiedades insulinomiméticas

del selenato también se han demostrado en ratones db/db con DM tipo 2, el efecto antidiabético del selenato podría atribuirse a una reducción de la resistencia a la insulina, mientras que la administración in vivo de selenito no resultó en una mejora significativa de la resistencia a la insulina y la DM (Mueller et al, 2003; Mueller et al, 2005; Mueller et al, 2006).

Un estudio mostró que el selenio no sólo disminuye los niveles séricos de glucosa, sino también los perfiles bioquímicos asociados a daño hepático y mejora el metabolismo lipídico en ratones sanos y en ratones no obesos diabéticos (NOD) (Chen et al, 2005; Hwang et al, 2007). Otros estudios sugieren que, a dosis bajas de insulina en combinación con selenio, podrían disminuir significativamente la glucosa sanguínea y aumentar el contenido de GLUT4 de la membrana plasmática del músculo cardíaco en ratas diabéticas (Xu et al, 2011).

En estudios realizados por Puchau y colaboradores, se encontró, en adultos jóvenes que tenían niveles más altos de selenio dietético, una reducción de los niveles de triglicéridos, debido posiblemente a una reducción en el factor 3 del complemento (C3). Este efecto puede considerarse beneficioso considerando el vínculo entre el C3 y parámetros relativos al síndrome metabólico como demuestra el hecho de que se redujo el índice de masa corporal, grosor de la piel, y los triglicéridos (Puchau et al, 2009).

A pesar de lo anteriormente expuesto, el selenio también parece presentar efectos negativos sobre la DM según otros autores. En estudios realizados por Rasekh y colaboradores, cuando la dosis administrada de selenio a ratas sanas fue relativamente alta (1,6 mg/kg o más), indujo hiperglucemia (Rasekh et al, 1991). Por otra parte se ha reportado que el selenio de la dieta puede afectar negativamente el metabolismo de la hormona del crecimiento al suprimir la producción del factor de crecimiento-1 asociado a la insulina, que tiene una influencia en el control de la homeostasis de la glucosa. Los datos reportados en modelos animales sugieren que las dietas ricas en selenio pueden estimular la liberación de glucagón, lo que conduce a la hiperglucemia (Stranges et al 2007).

Algunos datos publicados reportan que los altos niveles de selenio ingerido se relacionan con el incremento del riesgo de diabetes en humanos. En esta misma línea se sitúan los hallazgos reportados por Stranges y colaboradores, que examinaron la eficacia del aporte de suplementos de selenio en la prevención de DM2. Sus resultados indican que el aporte de suplementos de 200µg Se/día a largo plazo puede incrementar el riesgo de DM, aumentando así la preocupación por el uso prolongado de suplementos

dietéticos de selenio dada su interacción con en el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina (Stranges et al 2007). A su vez, otros estudios han demostrado que en descendientes de pacientes diabéticos el selenio se correlaciona inversamente con la proteína C reactiva y con resistencia a la insulina si los niveles de selenio son menores de 80 µg /L.; por tanto el aporte de suplementos de selenio no parece prevenir la incidencia de diabetes tipo 2, e incluso puede aumentar el riesgo de desarrollo de la enfermedad (Stranges et al 2007, 2010; Bleys et al, 2007).

Así mismo, la seguridad del aporte de suplementos con selenio en pacientes diabéticos, quienes tienen niveles adecuados de selenio, ha sido fuertemente cuestionado (Stranges et al 2007), por lo que se recomienda en pacientes diabéticos evitar el uso de suplementos de dicho elemento hasta que se demuestren los beneficios sobre la morbimortalidad (Bleys et al, 2007). Por lo tanto, las dosis elevadas de suplementos de selenio en el tratamiento de algunos cánceres debe aplicarse con precaución (Stranges et al, 2010). Otros autores afirman que los sujetos que viven en regiones con alta ingesta de selenio, el uso de suplementos con selenio pudiera incrementar el riesgo de DM e hipercolesterolemia (Navarro-Alarcón et al, 2000). Otros estudios en esta área son necesarios a fin de aclarar la implicación de selenio en la génesis y el desarrollo de la DM.

Selenio y sistema antioxidante

La relación entre el selenio y el sistema antioxidante es también objeto de debate. El selenio puede presentar efectos prooxidantes y antioxidantes dependiendo principalmente de las dosis administradas.

Un estudio experimental con ratas Sprague-Dawley demostró que el selenio tiene el efecto ahorrador de la vitamina E en su actividad antioxidante a nivel tisular. La seleniometionina, selenocisteína y metionina parece que no tienen actividad antioxidante directa. Sus intermediarios metabólicos pueden ser los antioxidantes eficaces (Awad et al, 1994).

Otros autores han demostrado que el selenio puede proteger contra el daño oxidativo atribuido a la hiperglicemia en la DM (Naziroglu et al, 2001; Guney et al, 2011). La capacidad antioxidante del selenio puede mejorar la DM mediante mecanismos que incluyen la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Gebremedhin et al, 1988), la inhibición de los cálculos de páncreas (Quilliot et al,

2001;Yadav et al, 1991), la protección contra lesiones glomerulares (Douillet et al, 1996), la normalización de la concentración de ácidos grasos (Douillet et al, 1998), la corrección de la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y del lactato (Kim et al, 2011), la prevención de la pérdida de miofibrillas y de los miocitos (Ayaz et al, 2002), la atenuación de los daños a glóbulos rojos (Sheng et al, 2004), la disminución de los niveles de malondialdehído (Skripchenko et al, 2003) y el incremento de las propiedades antioxidantes, así como de la ultraestructura del hígado (Can et al, 2005; Rocourt et al, 2013).

El efecto perjudicial del exceso de selenio sobre la DM descrito por diversos autores, podría estar mediado por alteraciones en la señalización intracelular del peróxido de hidrógeno (Rhee, 1999). Con el tiempo, estas alteraciones podrían alterar el tono oxidante y crear un entorno celular incapaz de actuar eficazmente en la vía de señalización de la insulina y en la captación de glucosa (Giorgio et al, 2007; Stone et al, 2006; Veal et al, 2007) manifestándose, finalmente, la DM tipo 2.

3.4 MAGNESIO

El contenido de magnesio en el organismo es aproximadamente 25 g (1,000 mmol) del cual un 50 a 60% se encuentra depositado en los huesos en un adulto normal, del cual el 30% es intercambiable y dicha fracción sirve como reservorio para el mantenimiento de la concentración normal del magnesio extracelular. Alrededor del 20% del magnesio está en el músculo esquelético, el 19% en otros tejidos blandos, y menos del 1% en los fluidos extracelulares (Sales et al, 2006). El músculo esquelético y el hígado contienen entre 7 y 9 mmol / kg de tejido húmedo; entre 20% y 30% es relativamente intercambiable.

En adultos sanos, el magnesio sérico oscila entre 0,70 y 1,10 mmol/L. Aproximadamente el 20% de éste, está unido a proteínas, 65% es ionizado, y es el resto formando complejos con diversos aniones tales como fosfato y citrato (Saris et al, 2000). De la fracción unida a proteínas, el 60-70% se asocia con la albúmina, y el resto está unido a las globulinas (Kroll et al, 1985).

Absorción y distribución

El magnesio se absorbe a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, pero el sitio de máxima absorción es el yeyuno distal e íleon. La vitamina D y sus metabolitos mejoran la absorción de magnesio (Institute of medicine, 1997). La absorción intestinal del magnesio oscila entre el 35 y el 50% del magnesio ingerido.

Existen dos sistemas de transporte intestinal de magnesio: uno transcelular mediado por transportadores y saturables a bajas concentraciones, y el otro no saturable que ocurre por transporte pasivo paracelular que se da a altas concentraciones.

El calcio, fosfatos, citratos, ácidos grasos, ácido fólico y sales biliares disminuyen su absorción, ya que forman con el magnesio compuestos insolubles.

Una vez absorbido, el ión es transportado a los distintos tejidos, siendo en el óseo donde se encuentra en mayor proporción en los cristales hidroxapatito, en cuya superficie es fácilmente intercambiable con los niveles séricos.

El magnesio muscular es el más fácilmente intercambiable pudiendo dar un índice real de la cantidad del catión en el organismo (Mataix, 2009).

Excreción

El riñón es el órgano principal involucrado en la homeostasis del magnesio. No existe una secreción tubular de magnesio. Aproximadamente el 65 % del magnesio filtrado es reabsorbido en el asa de Henle y 20-30 % en el túbulo contorneado proximal (Institute of medicine, 1997). Finalmente 1/3 del magnesio que ingresa en el organismo con la dieta es excretado por la orina, siendo dicha excreción mínima cuando la ingesta de magnesio es deficitaria.

Se sabe que existe también una excreción endógena a través del intestino, bilis, jugos intestinal y pancreático.

Ingestas recomendadas de magnesio

Las recomendaciones españolas de ingesta de magnesio oscilan entre 300 y 400 mg Mg/día dependiendo de la edad y sexo (Instituto de Nutrición CSIC, 1998)

La ingesta excesiva de alcohol, las dietas ricas en fibras, fosfatos o el alto consumo de estas, decrementan o interfieren en la absorción del magnesio, ocurriendo

lo contrario en las dietas bajas en fibras. También dietas excesivas en calcio afectan la absorción del magnesio. Cuando en la dieta se consume menos de 30 g de proteínas por día, se disminuye la absorción de magnesio, así como las dietas altas en proteínas incrementan la excreción renal del magnesio (Institute of medicine, 1997).

Fuentes alimentarias

Son alimentos ricos en magnesio la levadura de cerveza, el chocolate, los frutos secos, legumbres, cereales, frutas, verduras y hortalizas (Mataix y Llopis, 2009).

Transporte de Magnesio

El transporte de magnesio dentro y fuera de las células, requiere de la presencia de un sistema mediador de transporte. El eflujo de magnesio desde la célula es acoplado al transporte de sodio y requiere energía. La afluencia de magnesio también está ligada al transporte de sodio y bicarbonato pero por diferentes mecanismos (Vormann, 2003; Sales et al, 2006).

El transporte de magnesio en las células de mamíferos pudiese estar influenciado por factores tanto hormonales como farmacológicos.

Funciones del Magnesio

El magnesio es un cofactor requerido por más de 300 reacciones enzimáticas, es necesario para la generación de energía tanto anaerobia como aerobia, para la glicolisis e indirectamente como parte del complejo Mg-ATP o directamente como un activador enzimático (Sales et al, 2006)

El magnesio es necesario para la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Las enzimas mitocondriales lo utilizan como quelante del ATP y ADP como sustrato para la reacción de transferencia del fosfato.

Dentro de las funciones del magnesio se encuentra la de regular el flujo de potasio en las células miocárdicas, ya que la deficiencia de magnesio causa un efecto arritmogénico, debido a que el rol del magnesio es mantener el potasio intracelular (Erine et al, 2012).

El magnesio ha sido nombrado como “bloqueador fisiológico de los canales de calcio”, durante una depleción del magnesio, el calcio intracelular se incrementa, por tanto una depleción del magnesio causa calambres musculares, hipertensión y vasoespasmos en las arterias cerebrales y coronarias (Tramer et al , 1996).

La disminución del magnesio está relacionada con enfermedades cardiovasculares y neuromusculares, con síndromes de mala absorción, DM, pérdida de la función renal y alcoholismo (Institute of medicine, 1997).

La deficiencia de magnesio

La deficiencia de magnesio es más común que lo que se cree, sin embargo, generalmente no es diagnosticado clínicamente 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 (Durlach et al, 1997; Hans et al, 2002). También pueden presentarse cambios psicológicos tales como apatía, aprehensión, disminución de la capacidad de aprendizaje, confusión y mala memoria.

En la deficiencia de magnesio 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 a la alucinación (Hisakawa et al, 1998; Eby et al, 2006). La hipocalcemia es una de las manifestaciones de la deficiencia de magnesio en seres humanos por tanto pacientes con dichas deficiencias son resistentes al tratamiento con vitamina D y sus compuestos (Institute of medicine, 1997).

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 (Galan et al, 1997). El agotamiento de magnesio puede ser debido a la dis-regulación de los factores que controlan el estatus de magnesio: la hipoabsorción intestinal de magnesio, la movilización de magnesio hueso, las pérdidas urinarias, o el hiperadrenoglucocorticismo por disminución de la capacidad de adaptación al estrés, la resistencia a la insulina, y la hiporreceptividad adrenérgica (Durlach et al, 1998). Se ha sugerido que el envejecimiento, el estrés, y diversos estados de enfermedad pueden aumentar los requerimientos de magnesio (Shills, 1988). La deficiencia de magnesio se

ha demostrado en 7-11% de los pacientes hospitalizados (Whang et al, 1984; Wong et al, 1983; Hayes et al, 1989). En los pacientes con otras alteraciones electrolíticas, la hipomagnesemia es más frecuente (Whang et al, 1984; Kingston et al, 1989; Boyd et al, 1983). La prevalencia de la hipomagnesemia en pacientes críticos es aún mayor (Noronha et al, 2002; Chernow et al, 1989; Ryzén et al, 1989). La hipomagnesemia en pacientes de cuidados intensivos se asocia con un aumento de la mortalidad (Rubeiz et al, 1993).

La deficiencia de magnesio en el cuerpo se refleja en una disminución de los niveles séricos de magnesio, siendo dichos niveles el criterio diagnóstico (Shils, 1969). Del mismo modo, el contenido de magnesio en los eritrocitos es otro indicador fiable de las reservas corporales totales de magnesio (Elin et al, 1971).

Otros efectos causados por la hipomagnesemia

Manifestaciones Cardiovasculares

La deficiencia del magnesio incrementa la concentración urinaria de tromboxano, induce angiotensina II, induce niveles plasmáticos de aldosterona, y presión sanguínea, además que es asociado con cambios electrocardiográficos, arritmias, incremento de la sensibilidad cardíaca, síntoles atriales y ventriculares prematuras, fibrilación atrial, taquicardia ventricular, ver figura 2 (Sales et al, 2006)

Por tanto la hipomagnesemia podría jugar un papel en la isquemia cardíaca. En estudios realizados en animales alimentados con dieta deficiente en magnesio se demostró que desarrollaron una degeneración de la pared arterial y calcificación de ésta, así como hipertrigliceridemia y aterosclerosis (Institute of medicine, 1997), figura 8 (Touyz, 2003; Seelig et al, 2003)

Presión sanguínea

La evidencia epidemiológica sugiere que el magnesio juega un papel importante en la regulación de la presión sanguínea, demostrándose que una baja ingesta de magnesio aumenta la incidencia de hipertensión arterial (Touyz, 2003; Giuseppe et al, 1997) figura 8.

Osteoporosis y desarrollo

El magnesio juega un papel importante en la homeostasis de los minerales en el hueso, así como afecta directamente funciones celulares como la formación de cristales de hidroxipatita y el crecimiento. La deficiencia de magnesio puede ser un factor de riesgo para la osteoporosis postmenopáusica, figura 9 (Castiglioni et al, 2013).

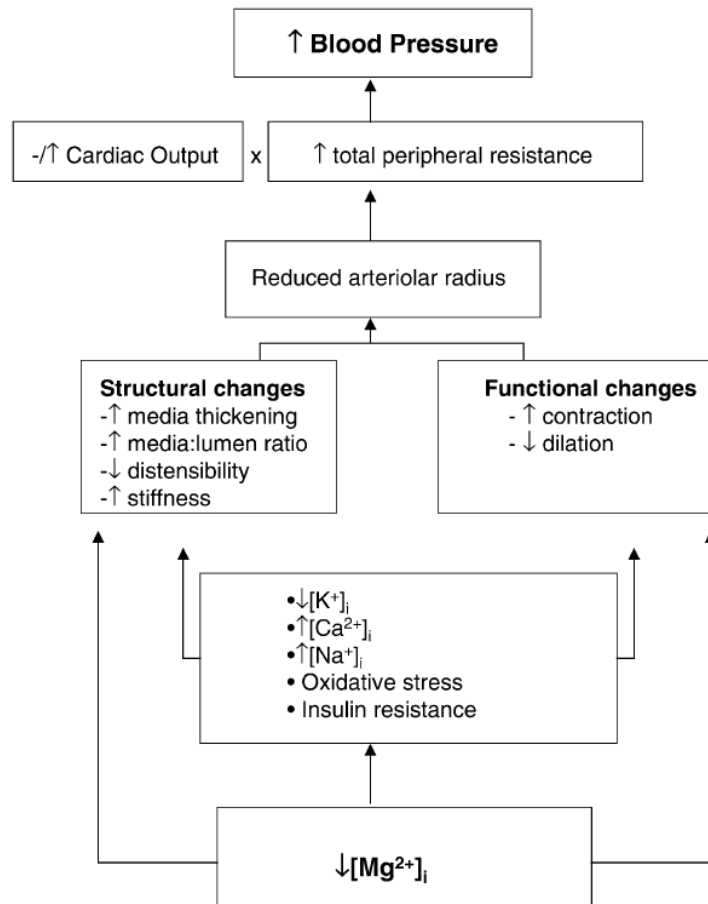


Figura 8.- Mecanismos vasculares relacionados a hipomagnesemia intracelular (Touyz et al, 2003)

Toxicidad del Magnesio

La hipermagnesemia puede desarrollarse por tratamientos con sales de magnesio o con fármacos que contienen el ión (antiácidos, catárticos), o también en pacientes con insuficiencia renal

A niveles próximos a los 8 mEq/L aparece una depresión central y anestesia profunda si se alcanzan los valores de 20 mEq/L. La infusión de calcio contrarresta la intoxicación por magnesio.

Magnesio y DM

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 (Kobrin et al, 1990, Guerrero-Romero et al, 2008). Con frecuencia se observa hipomagnesemia en individuos con DM tipo 2 (Paolisso et al, 1992, Guerrero-Romero et al, 2002).

La hipomagnesemia puede empeorar la resistencia a la insulina, una condición que a menudo precede a la DM, o puede ser una consecuencia de la resistencia a la insulina (ver Fig. 2). Los riñones parecen perder su capacidad de retención de magnesio durante períodos de hiperglucemia severa (Sales et al, 2006).

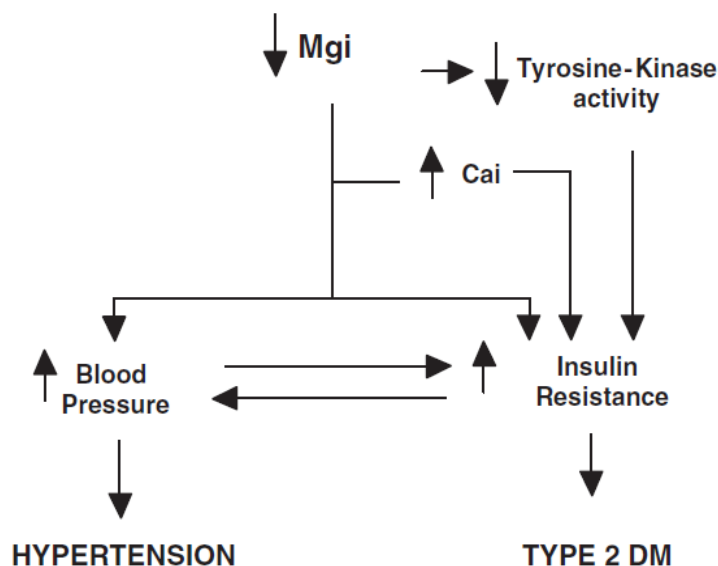


Figura 9.-La deficiencia de magnesio intracelular puede mediar la relación entre la resistencia a la insulina, la DM tipo 2 y la hipertensión. (Barbagallo, 2006).

Hoy día, 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 magnesio fue confirmada por Fujii y colaboradores (Fujii et al, 1982) quienes observaron un marcado descenso de los niveles de magnesio 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 los cuales los niveles bajos de magnesio sérico pueden

conducir al desarrollo de DM tipo 2. Primero, el magnesio 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 (Elin, 1998; Styler, 1988).

En segundo lugar, los bajos niveles séricos o eritrocitarios de magnesio 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 de la membrana (Tongyai et al, 1989). 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 (Caro et al, 1995; Matschinsky, 1990; Tosiello, 1996).

La DM se ha sugerido que es el trastorno metabólico más común asociado con la deficiencia de magnesio, mostrando un 25% a 39% de prevalencia (Rude, 1992; Chaudhary et al, 2010).

3.5 ESTRÉS OXIDATIVO SU RELACIÓN CON LOS ELEMENTOS TRAZA Y DIABETES MELLITUS

La DM juega un papel clave en la inducción del estrés oxidativo (Muchová et al, 1999), dado que esta patología se encuentra asociada con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando un daño oxidativo en varios tejidos (Muchová et al, 1999).

Un incremento en el estrés oxidativo causa una reducción de la capacidad antioxidante, la cual se ve reflejada en el incremento de radicales libres causando daño a la integridad de la membrana celular, por tanto dicho estrés oxidativo juega un papel importante en la etiología de la DM (Baynes et al, 1999). Por otra parte, el aumento de los niveles de glucosa incrementa la producción de estrés oxidativo, lo cual puede ocasionar daño a nivel tisular, por lo cual la hiperglucemia puede contribuir a la alteración tanto de la estructura como de la función de los órganos.

La hiperglucemia puede estar involucrada en los efectos adversos de varias vías metabólicas como la oxidación de la glucosa, formación de productos finales de la glicación y la activación de la vía de polioles los cuales están relacionados con la generación de ROS, también la hiperglucemia se encuentra relacionada con alteraciones en la homeostasis de algunos iones y elementos traza y elementos de transición. La

acumulación de algunos elementos de transición es extremadamente tóxica, y está relacionada con el daño oxidativo a nivel de las membranas celulares y a nivel molecular, incrementando la susceptibilidad a la peroxidación lipídica.

Los elementos traza juegan un papel fundamental en la inducción de la glicación de proteínas, las cuales tienen una afinidad substancial por dichos metales, por tanto alteraciones en la concentración tisular de dichos metales se cree que son responsables del estrés oxidativo presente en hígado, riñón en la DM (Ozcelik et al, 2011).

Estudios en ratas diabéticas han mostrado que los niveles de magnesio encontrados en hígado y en riñón fueron inferiores a los del grupo control, al igual que la enzima glutatión peroxidasa y la enzima GSH las cuales son enzimas antioxidantes indispensables que proveen protección contra los metales de transición y el daño producido por los radicales libres. La GSH se une a metales endógenos como el selenio jugando un papel importante en el transporte de metales, almacenaje y metabolismo de estos, por tanto un decremento de esta enzima se ve reflejado en una reacción directa entre GSH y la generación de radicales libres por la hiperglucemia en la diabetes (Yoshida et al, 1995). También se ha visto en ratas diabéticas tipo 1 un incremento de la enzima malonaldehído (MDA), la cual es un indicador de peroxidación lipídica, por tanto la diabetes causa un desequilibrio en el balance del estrés oxidativo (Ozcelik et al, 2011).

Dadas las condiciones mencionadas, el estrés oxidativo causa un incremento en las complicaciones crónicas de la diabetes debido al incremento de la peroxidación lipídica producto de los radicales libres, causando las complicaciones crónicas como retinopatía diabética, nefropatía diabética y neuropatía diabética (Scott et al, 2004).

4.- ARTICULOS CIENTÍFICOS

Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient rats

Cristina Sánchez¹, Miguel Torres¹, María C. Bermúdez-Peña³, Pilar Aranda¹, María Montes-Bayón², Alfredo Sanz-Medel², Juan Llopis¹

¹ Institute of Nutrition and Food Technology and Department of Physiology, Campus Cartuja, University of Granada, E-18071 Granada, Spain; ² Department of Analytical Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain; ³ Biomedical Research Unit, Instituto Mexicano del Seguro Social, Victoria de Durango, Mexico

Correspondence: Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Centro de Investigaciones Biomédicas Lab. 115, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, 18100 Armilla, Granada, Spain
<jllopis@ugr.es>

Abstract. Vanadium is an element whose role as a micronutrient and hypoglycaemic drug has yet to be fully clarified. The present study was undertaken to investigate the bioavailability and tissue distribution of vanadium and its interactions with magnesium in healthy and in magnesium-deficient rats, in order to determine its role as a micronutrient and antidiabetic agent. Four groups were used: control (456.4 mg magnesium and 0.06 mg vanadium/kg food); control treated with 1mg vanadium/day; magnesium-deficient (164.4 mg magnesium/kg food and 0.06 mg vanadium/kg food); and magnesium-deficient treated with 1 mg vanadium/day. The vanadium was supplied in the drinking water as bis(maltolato)oxovanadium (IV). The experiment had a duration of five weeks. We measured vanadium and magnesium in excreta, serum, skeletal muscle, kidney, liver, adipose tissue and femur. Fasting glucose, insulin and total antioxidant status (TAS) in serum were studied. The vanadium treatment applied to the control rats reduced the absorption, retention, serum level and femur content of magnesium. Magnesium deficiency increased the retention and serum level of vanadium, the content of vanadium in the kidney, liver and femur (organs where magnesium had been depleted), serum glycaemia and insulin, and reduced TAS. V treatment given to magnesium-deficient rats corrected magnesium content in muscle, kidney and liver and levels of serum glucose, insulin and TAS. In conclusion, our results show interactions between magnesium and vanadium in the digestive and renal systems. Treatment with vanadium to magnesium-deficient rats corrected many of the alterations that had been generated by the magnesium deficiency.

Key words: vanadium, magnesium, metabolism interactions, glycaemia, insulin, rat

Magnesium plays a structural and regulatory role in the organism. Among its functions one of the most important is to act as the ion that activates a large number of enzyme systems, making magnesium essential for the metabolism of many nutrients.

From a physiological standpoint, the functions of magnesium are well known and have been amply described in many publications. In another area of research, most epidemiological studies have reported that in western countries, magnesium intake is below the recommended

allowances in considerable percentages of the population. According to published data, the amounts of magnesium consumed are below 80% of the recommended intake in more than 20% of the population. In addition, hypomagnesaemia has been found in substantial proportions of the adult population in Europe [1, 2].

The clinical manifestations of magnesium deficiency are difficult to define because depletion of this cation is associated with considerable abnormalities in the metabolism of many elements and enzymes. However, if suboptimal intake is prolonged it can facilitate or cause the appearance of symptoms currently attributed to other causes, or whose causes are unknown. Some examples of this situation are the relationships between magnesium deficiency and cardiovascular, renal, gastrointestinal, neurological, muscular and bone disorders [1]. Furthermore, there is a well known direct relation between nutritional magnesium deficit, resistance to insulin, metabolic and glucose transport disorders and the risk of developing type II diabetes [3-10]. This mechanism is based on the fact that the reduction in the intracellular concentrations of magnesium raises the intracellular levels of Ca [11-13], which brings about a fall in the activity of tyrosine kinase in the insulin receptor [14]. In addition, the intracellular deficit of magnesium reduces the uptake of glucose by interfering with the translocation of the glucose transporter [GLUT 4]. Intracellular magnesium depletion also reduces the intracellular utilisation of glucose (magnesium is a cofactor of the enzymes involved in glucose oxidation) thus provoking peripheral resistance to insulin [15]. Furthermore, it has been observed that magnesium deficiency induces oxidative stress. These circumstances facilitate the development of type II diabetes [12, 13, 16-18].

Vanadium is a widely distributed element on earth, but its role as a micronutrient in humans is not yet fully established. In plasma, it is bound to plasma proteins, primarily transferrin. It is distributed primarily in the bone, kidney and liver. However, the mechanism of absorption, transport and disposal of vanadium is not well established.

Some complexes of vanadium (IV) have been shown to possess hypoglycaemic or insulin mimetic properties, in type II diabetes patients, stimulating the autophosphorylation of the insulin receptors, increasing the activity of tyrosine kinase and favouring the translocation of the transported GLUT 4 [19-21].

Vanadium also alleviates oxidative stress, by improving the metabolism of glucose, which reduces the production of free radicals resulting from disorders in glucose metabolism [20], and thus prevents the development of the diabetes process.

The fact that both magnesium and vanadium participate in glucose metabolism, intervening in the same processes, led us to consider that these two elements could be related and be acting jointly in the metabolism of carbohydrates. Therefore, they may present metabolic interactions.

The aim of this study was to examine the digestive and metabolic utilisation of vanadium and its interactions with magnesium in control and magnesium-deficient rats. This paper studies the hypoglycaemic effects of vanadium compounds, considering the magnesium-deficient rat as a model of prediabetes. Vanadium was supplied as bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV), a vanadium complex that is 2 to 3 times more effective than inorganic vanadium as a glucose-lowering agent [19, 20]. The results obtained clarify its role as a micronutrient and anti-diabetic agent.

Materials and methods

Animals and diets

Male Wistar rats weighing 190-220 g (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) were randomly divided into 4 groups of 8 rats in which the amount of dietary magnesium and vanadium was varied.

Control group: 8 rats fed with the semisynthetic diet AIN-93 [22]. This diet provided 456.4 mg magnesium and 0.06 mg vanadium/kg food.

Control treated with vanadium group: 10 rats fed with the AIN-93 diet. In addition, the rats in this group received in their drinking water 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV)/day, which supplied 1mg vanadium/day.

Magnesium deficient group: 8 rats fed with the diet AIN-93 deficient in magnesium. The diet contained AIN-93 mineral mix without magnesium oxide. This diet supplied 164.4 mg magnesium/kg food.

Magnesium deficient treated with vanadium group: 10 rats fed with the diet AIN-93 deficient in magnesium. The diet contained AIN-93 mineral mix without magnesium oxide. This diet supplied 164.4 mg magnesium/kg food. In addition,

the rats in this group received in their drinking water 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV)/day, which supplied 1mg vanadium/day.

In all cases, the bis(maltolato)oxovanadium (IV) solution was prepared daily. During the experimental period, the weight gain and the intake of food and water were monitored. Every seven days, the glucose level in peripheral blood was analysed. On day 35 the rats were anaesthetized with a solution of pentobarbital (0.5g/100mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and exsanguinated by cannulating the posterior aorta. Blood was collected and centrifuged (Beckman Coulter, California, USA) at 3,000 rpm for 15 minutes to separate serum. The liver, gastrocnemius muscle, kidney, perirenal adipose tissue and femur were also removed, weighed, placed in preweighed polyethylene vials, and stored at -80°C. During the last 7 days of the experimental period, the faeces and urine were collected every 24 h and stored at -80°C in polyethylene bottles for subsequent analysis.

All animals were housed from day 0 of the experiment in individual metabolic cages designed for the separate collection of faeces and urine. The cages were located in a well-ventilated, temperature-controlled room (21°C±2) with relative humidity ranging from 40 to 60%, and a light:dark period of 12 h.

The following biological indices were calculated: Absorbed as [I-F], Absorption (%), as [(I-F)/I] × 100, Retained, as [I-(F+U)], and (%)R/I as

$[I-(F+U)/I] \times 100$, where I = intake, F = faecal excretion, and U = urinary excretion.

All experiments were undertaken according to Directional Guides Related to Animal Housing and Care (European Council Community, 1986) and all procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Granada.

Analytical methods

Determination of magnesium and vanadium in the diet, serum and tissues was performed by ICP-MS (Agilent 7500, Agilent Technologies, Tokyo, Japan). All the materials used in the analysis were previously cleaned with super-pure nitric acid, and ultrapure 18 MΩcm distilled de-ionized water was obtained by means of a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Samples were prepared by attack with nitric acid and hydrogen peroxide (super-pure quality, Merck), in a microwave digester (Milestone, Sorisole, Italy). When the sample had been digested, the extract was collected and made up to a final dilution of 1/10 (w/v) for subsequent analysis.

Calibration curves were prepared following the Ga addition technique as an internal standard, using stock solutions of 1,000 mg/L of each element (Merck, Darmstadt, Germany).

The total metal content (magnesium and vanadium) in the tissues was analysed using ICP-MS techniques [23], and the accuracy of the method was evaluated by analysis of suitable certified reference materials Seronorm, (Billingstad, Norway) and NIST 8414, (Gaithersburg, MD 20899, USA) and by recovery studies in samples of organs enriched with multi-element standards.

Glycaemia levels were determined using the sensor ACCU-CHEK AVIVA (Roche-Mannheim, Germany). Plasma levels of insulin were determined using the SPI BIO (Montigny le Bretonneux, France) enzyme immune assay technique. The homeostasis model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the formula $[\text{fasting glucose } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting glucose (mg/dL)}] / 405$.

Total antioxidant status (TAS) was determined using a Randox[®] assay kit (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, Co. Antrim, UK). The reagent measures inhibition of the absorbance of the radical cation of 2,2 azinobis (3-ethylbenzothiazolinb 6-sulfonate) (ABTS), which has a long-wave length absorption spectrum showing maxima at 660 nm. The ABTS radical cation is formed by the interaction of ABTS (150 mmol) with the ferrylmyoglobin radical species generated by the activation of metmyoglobin (2.5 mmol) with H₂O₂ (75 mmol). Antioxidant compounds suppress the absorbance of the ABTS radical cation to a degree and on a time scale dependent on the antioxidant capacity. Decolourisation was used as the assay endpoint. This reaction requires the presence of myoglobin, acting as a peroxidase through the formation of the ferrylmyoglobin radical, to which ABTS donates an electron, forming ABTS+. When an aliquot of sample is added to the reaction mixture, there is a degree of decolourisation owing to the presence of plasma antioxidants that reverse the formation of the ABTS radical cation. The per cent loss of blue-green (blank-test measuring at 734

nm) was used as an index of plasma antioxidant status.

Statistical analysis

Descriptive statistical parameters (means and standard deviations) were obtained for each of the variables studied. The experimental data were analysed using the tests for nonparametric samples, using the Mann Whitney U test for independent samples. To discern the possible interactions between vanadium and magnesium treatment, two-way analysis of variance (two-way ANOVA) was used. For the bivariate analysis, Pearson's coefficient of correlation was calculated. All the analyses were performed using Statistical Package for Social Science 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant at a probability level of 5%.

Results

Figure 1 shows the evolution of the mean weight of the rats in the experimental period and Figure 2

shows that of fasting glycaemia during the same period. The results obtained show that consumption of the magnesium-deficient diet significantly increased glycaemia. The vanadium treatment given to magnesium-deficient rats maintained glycaemia levels similar to those of the controls.

Table 1 shows serum magnesium, vanadium and insulin, the HOMA-IR index and TAS. The magnesium-deficient diet significantly increased levels of circulating insulin and HOMA-IR, while the treatment given to the deficient rats returned these levels to values similar to those of the controls. Consumption of the magnesium-deficient diet led to a fall in TAS. The vanadium treatment given to the deficient rats returned these levels to values similar to those presented by the control animals.

Table 2 shows the digestive and metabolic utilisation of magnesium and vanadium during the final weeks of the study (days 28-35), in the four experimental groups. Vanadium treatment to control rats produced a significant increase in the percentage of vanadium absorbed and retained, as well as a significant increase in the urinary excretion of magnesium, together with a decrease in magnesium retention.

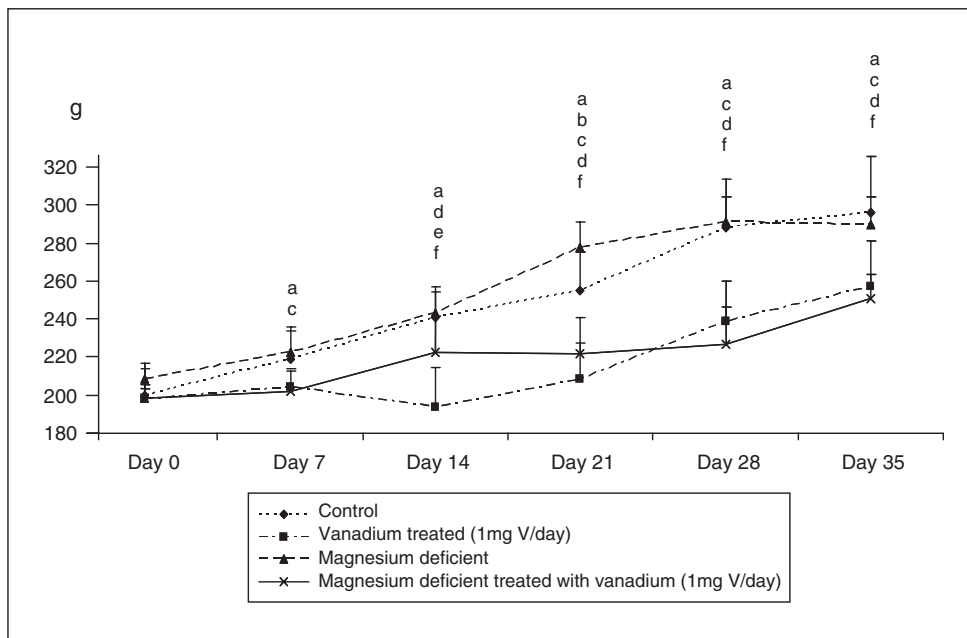


Figure 1. Evolution of mean body weight in rats during the experimental period (mean±SD, n=8).
^a Control vs vanadium treated; ^b control vs magnesium deficient; ^c control vs magnesium deficient treated with vanadium; ^d vanadium treated vs magnesium deficient; ^e vanadium treated vs magnesium deficient treated with vanadium; ^f magnesium deficient vs magnesium deficient treated with vanadium. P<0.05.

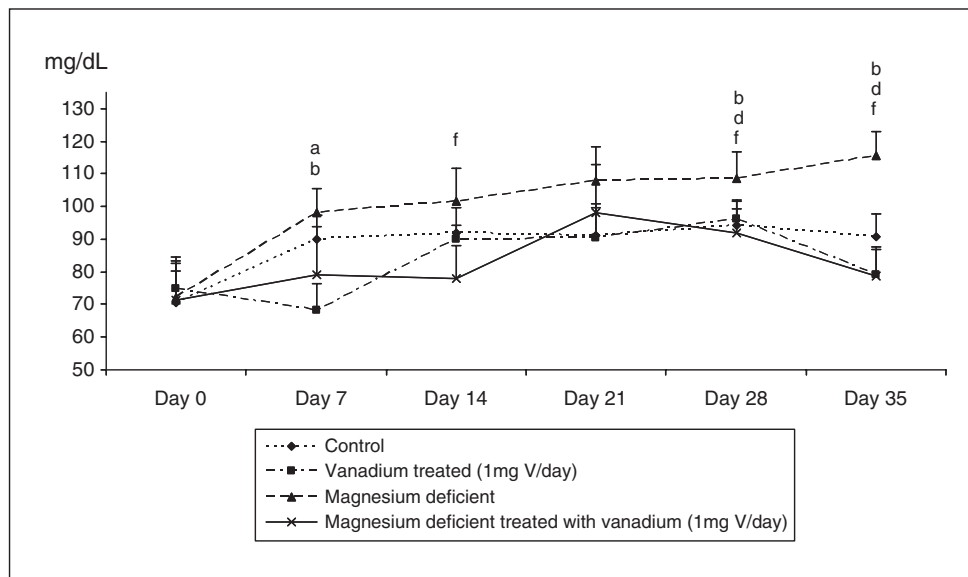


Figure 2. Fasting glycaemia during the experimental period (mean \pm SD, n=8).

^a Control vs vanadium treated; ^b control vs magnesium deficient; ^c control vs magnesium deficient treated with vanadium; ^d vanadium treated vs magnesium deficient; ^e vanadium treated vs magnesium deficient treated with vanadium; ^f magnesium deficient vs magnesium deficient treated with vanadium. $P < 0.05$.

Consumption of the magnesium-deficient diet produced a significant reduction in urinary losses of vanadium and increased vanadium retention, together with higher serum vanadium levels (table 2).

Vanadium treatment in the rats given the magnesium-deficient diet increased the absorption and retention of vanadium. These increases were smaller than those found in the treated control rats.

Although no significant changes were observed in magnesium concentration in the adipose tissue following consumption of the magnesium-deficient diet, a downward tendency in these values was observed. On the other hand, there was a significant reduction in magnesium in the skeletal muscle, kidney, liver and femur. In addition, the magnesium-deficient diet slightly raised vanadium content in the muscle, liver and kidney (table 3).

Vanadium treatment produced a significant reduction in magnesium in the femur. The vanadium treatment given to the magnesium-deficient rats increased the content of magnesium in the kidney and liver, eliminating the differences produced by magnesium deficit with respect to the

control rats. Nevertheless, there was no change in the level of magnesium content in the femur (table 3).

The bivariate study revealed the existence of a high number of significant relations, among which the following are particularly important. Ingested magnesium correlated inversely with glycaemia, serum insulin and HOMA ($r = -0.461$, $r = -0.507$ and $r = -0.468$ respectively; $p < 0.01$ in every case). Ingested vanadium also correlated inversely with glycaemia, insulin and HOMA ($r = -0.463$, $r = -0.501$ and $r = -0.514$; $p < 0.01$). TAS correlated positively with the intake of magnesium ($r = 0.500$; $p < 0.01$) and serum levels of vanadium ($r = 0.458$; $p < 0.01$) and negatively with glycaemia, serum insulin and HOMA ($r = -0.567$, $r = -0.568$ and $r = -0.677$ respectively; $p < 0.01$ in every case).

Discussion

The dose of vanadium used in this study (6.22 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV)/day or ~ 0.6 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV)/mL, which supplied 1mg vanadium/day or ~ 5 mg vanadium/kg

Table 1. Fasting magnesium (Mg), vanadium (V) and insulin content in serum, HOMA-IR and Total Antioxidant Status on day 35, of control rats, treated with vanadium (1mg vanadium/day), magnesium deficient and magnesium deficient treated with vanadium (1mg vanadium/day) for 35 days.

	Control	Vanadium treated	Magnesium deficient	Magnesium deficient treated with V	ANOVA P values		
					Main effect of Mg	Main effect of V	Interactive effect of Mg × V
Serum Mg (mg/L)	21.00 ± 1.02	17.11 ± 2.01 ^a	8.42 ± 1.34 ^{a,b}	9.25 ± 2.64 ^{a,b}	p<0.001	p<0.02	p<0.001
Serum V (µg/L)	2.35 ± 0.57	456.73 ± 52.87 ^a	3.03 ± 0.68 ^{a,b}	439.62 ± 141.96 ^{a,c}	NS	p<0.001	NS
Serum Insulin (ng/mL)	2.05 ± 0.78	1.73±0.81	6.65 ± 3.72 ^{a,b}	1.82 ± 1.49 ^c	p<0.01	p<0.001	p<0.02
HOMA-IR index*	9.53 ± 4.36	7.88 ± 3.57	39.63 ± 22.04 ^{a,b}	7.69 ± 5.64 ^c	p<0.01	p<0.001	p<0.01
Total Antioxidant Status (mmol/L)	1.29 ± 0.30	1.37 ± 0.15	0.77 ± 0.33 ^{a,b}	1.29 ± 0.13 ^c	p<0.02	p<0.02	NS

* Homeostatic model assessment for insulin resistance.

Values shown are means±SD, n=8 rats.

^a Control vs vanadium treated, magnesium-deficient and magnesium-deficient treated;

^b vanadium treated vs magnesium-deficient and magnesium-deficient treated;

^c magnesium-deficient vs magnesium-deficient treated. P<0.05. NS no significant effect

Table 2. Digestive and metabolic utilization of magnesium (Mg) and vanadium (V) on days 28-35 of study, for control rats, treated with vanadium (1mg vanadium/day), magnesium deficient and magnesium deficient treated with vanadium (1mg vanadium/day) for 35 days.

	Control	Vanadium treated	Magnesium deficient	Magnesium deficient treated with vanadium	ANOVA P values			
					Main effect of Mg	Main effect of V	Interactive effect of Mg × V	
Intake	Mg (mg/day)	6.83±0.89	5.86±0.75 ^a	2.31±0.44 ^{a,b}	2.33±0.49 ^{a,b}	p<0.001	NS	NS
	V (µg/day)	0.90±0.11	1038±208 ^a	0.84±0.16 ^b	989±127 ^{a,c}	p<0.001	p<0.001	p<0.001
	Mg (mg/day)	3.53±0.93	3.44±1.11	0.80±0.20 ^a	0.92±0.15 ^a	p<0.001	NS	NS
Faecal	V (µg/day)	0.66±0.12	500±103 ^a	0.70±0.16 ^b	539±115 ^{a,c}	p<0.05	p<0.02	p<0.05
	Mg (mg/day)	0.37±0.43	1.38±1.01 ^a	0.16±0.31 ^{a,b}	0.11±0.05 ^{a,b}	p<0.02	NS	NS
Urinary	V (µg/day)	0.17±0.04	67.9±28.7 ^a	0.05±0.02 ^{a,b}	61.8±31.7 ^{a,c}	p<0.05	p<0.001	p<0.05
	Mg (mg/day)	3.30±1.23	2.41±0.95	1.52±0.47 ^a	1.42±0.43 ^a	p<0.001	NS	NS
Absorbed	V (µg/day)	0.23±0.11	538±93 ^a	0.19±0.14 ^b	349±99.2 ^{a,c}	p<0.001	p<0.001	p<0.001
	Mg (%)	47.78±14.41	41.31±16.26	64.16±12.66 ^a	59.52±8.56 ^a	p<0.01	NS	NS
Absorption	V (%)	25.70±12.31	51.91±9.45 ^a	21.93±14.64	39.3±8.94 ^{a,c}	p<0.001	p<0.02	p<0.05
	Mg (mg/day)	2.93±1.64	1.02±1.47 ^a	1.36±0.73 ^a	1.30±0.44 ^{a,b}	p<0.01	NS	NS
Retained	V (µg/day)	0.06±0.14	470±99 ^a	0.14±0.13 ^{a,b}	287±92.5 ^{a,c}	p<0.001	p<0.001	p<0.001
	Mg (%)	42.90±13.2	17.40±14.22 ^a	58.84±11.88 ^{a,b}	55.79±7.22 ^{a,b}	p<0.05	NS	NS
% R/I ¹	V (%)	6.33±15.88	45.36±7.45 ^a	16.00±14.22 ^{a,b}	32.46±9.03 ^{a,b,c}	p<0.01	p<0.001	p<0.001

Values shown are means ± SD, n=8 rats. ¹ % R/I, percentage of retention to intake.

^a Control vs vanadium treated, magnesium-deficient and magnesium-deficient treated

^b vanadium treated vs magnesium-deficient and magnesium-deficient treated

^c magnesium-deficient vs magnesium-deficient treated. P<0.05. NS: no significant effect.

Table 3. Magnesium (Mg) and vanadium (V) content in muscle, kidney, liver, adipose tissue and femur (mg/kg dry tissue) on day 35, of control rats, treated with vanadium (1mg vanadium/day), magnesium deficient and magnesium deficient treated with vanadium (1mg vanadium/day) for 35 days.

	Control	Vanadium treated	Magnesium deficient	Magnesium deficient treated with vanadium	ANOVA P values		
					Main effect of Mg	Main effect of V	Interactive effect of Mg × V
Muscle	Mg	899.86±44.87	808.48±99.64 ^a	879.73±37.10	p<0.02	NS	NS
	V	0.014±0.008	1.068±0.156 ^a	0.015±0.0024 ^b	0.923±0.286 ^{a,c}	NS	p<0.001
Kidney	Mg	859.59±111.72	867.82±106.83	749.66±52.95 ^{a,b}	768.70±37.94	p<0.01	NS
	V	0.121±0.023	28.11±5.97 ^a	0.168±0.050 ^{a,b}	25.51±4.49 ^{a,c}	NS	p<0.001
Liver	Mg	922.07±123.47	900.34±141.96	794.11±76.42 ^a	869.80±129.59	NS	NS
	V	0.043±0.010	8.77±2.50 ^a	0.061±0.014 ^{a,b}	8.81±1.63 ^{a,c}	NS	p<0.001
Adipose tissue	Mg	19.67±5.31	17.16 ± 7.08	14.72±4.27	16.58±7.18	NS	NS
	V	0.0070±0.0039	0.239 ± 0.058	0.0042±0.0019	0.251±0.096	NS	p<0.001
Femur	Mg	2609.62±107.203	2130.16±312.68 ^a	1526.15±383.99 ^a	1478.53±366.62 ^a	p<0.001	NS
	V	0.034±0.013	15.78±4.96 ^a	0.079±0.016 ^{a,b}	19.52±6.68 ^{a,c}	NS	p<0.001

Values shown are means±SD, n=8 rats.

^a Control vs vanadium treated, magnesium-deficient and magnesium-deficient treated.

^b vanadium treated vs magnesium-deficient and magnesium-deficient treated.

^c magnesium-deficient vs magnesium-deficient treated. P<0.05. NS: no significant effect.

b.w./day). This dose is higher than the lowest dose reported by other authors to cause adverse effects in rats (0.8 mg vanadium/kg b.w./day), but is low in comparison with those used by other authors [24-27] and is much lower than the LD50 (40-90 mg vanadium/kg b.w./day) [28]. Nevertheless, this dose was chosen following a careful study of published research, and represents an intermediate level between those tested by Yuen *et al.* [29] (0.5 to 0.75 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /mL), with which no toxic effects were observed in STZ diabetic rats. In all cases, the vanadium compounds were supplied in the drinking water. In our study, the presence of gastrointestinal disorders was observed in two animals in each vanadium treatment group, and these animals were removed from the study. These gastrointestinal disorders were also observed by Scibior *et al.* [27] using ~9.5 mg vanadium/b.w./day in healthy Wistar rats.

In our research we found that the growth curves for control and magnesium-deficient rats did not differ significantly. This finding has also been reported by other authors who used the AIN-93 diet [22] with similar magnesium content [30].

Treatment with 1mg vanadium/day (as bis(maltolato)oxovanadium (IV)) to control rats produced a lower weight gain (*figure 1*). We also observed that the HOMA-IR correction in the group of rats given the magnesium-deficient diet, treated with vanadium, did not correct the weight gain curve. However, food consumption by all groups presented very similar levels (data not shown). On the other hand, we found no significant correlations between body weight changes and HOMA-IR ($r=0.34$; $p>0.05$), although there was seen to be an inverse correlation between body weight changes and vanadium intake ($r=-0.44$; $p<0.01$). These facts lead us to believe that vanadium treatment is the sole factor responsible for the low weight gain observed among these groups [31] and that, in our study, these weight losses were not related to the HOMA-IR normalisation found in the magnesium-deficient animals treated.

Epidemiological and clinical research suggests that low serum magnesium levels are associated with resistance to insulin and increase the risk of type II diabetes [3-10], and that oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type II diabetic patients with decreased serum magnesium levels [32]. In our study, consumption of the magnesium-deficient

diet produced hypomagnesaemia accompanied by a significant increase in glycaemia (*figure 2*) and in serum levels of insulin. In vitro and in vivo studies have shown that magnesium deficiency deteriorates insulin secretion and that magnesium supplementation prevents the development of diabetes in rats [33, 34]. The intracellular deficit of magnesium reduces the uptake of glucose by interfering with the translocation of the glucose transporter [GLUT 4]. Intracellular magnesium depletion also reduces the intracellular utilisation of glucose [15]. Furthermore, the reduction in the intracellular concentrations of magnesium promotes disorders in the activity of tyrosine kinase in the insulin receptor [14], these events being related to the development of insulin resistance. The increased HOMA-IR index in the magnesium-deficient rats confirmed the presence of increased resistance to insulin among the deficient animals (*table 1*). Moreover, the inverse correlations found between magnesium consumption and glucose, serum insulin and HOMA (see results) support the above findings.

It has recently been shown that vanadium is a trace element associated with the regulation of the glucose metabolism, improving its transport and metabolism and increasing the sensitivity of the insulin receptor [35]. Our results confirm these findings, showing that vanadium treatment given to rats consuming a magnesium-deficient diet maintains levels of glucose (*figure 2*), serum insulin and HOMA-IR (*table 1*) at values similar to those of the controls. In this case, too, the correlations found between V intake and levels of glucose, serum insulin and HOMA (see results) support the results given.

The results of the TAS study reveal the cumulative action of all the antioxidants present in the plasma. Thus, it is considered to be a reliable and sensitive biomarker of in vivo oxidative stress [36]. The reduction in TAS observed in the rats given the magnesium-deficient diet (*table 1*) is a consequence of the pro-oxidant capacity of magnesium deficiency [12, 13, 17, 37, 38]. It has been suggested that magnesium deficiency may provoke an increase in intracellular calcium [11-13, 37, 38]. Higher levels of cytosolic calcium would activate a whole set of factors (leukocyte and macrophage activation, the synthesis of inflammatory cytokines and acute phase proteins), giving rise to a pro-inflammatory effect [17, 38]. This inflammatory response would be the factor responsible for the increased

production of free radicals and for the oxidative damage found with magnesium deficiency [12, 16, 36, 37]. A previous study reported a reduction in TAS among magnesium-deficient patients [39]. Vanadium treatment did not significantly modify TAS in the control rats. Other studies have failed to observe changes in plasma TAS following vanadium treatment [26, 27]. However, vanadium treatment of magnesium-deficient rats returned levels to values comparable to those of the controls (*table 1*). It has been reported that vanadium alleviates the oxidative stress process related to the appearance and development of diabetes, by improving the metabolism of glucose [20, 40]. The positive correlations of TAS with vanadium intake, serum vanadium and magnesium, and the negative correlations with glycaemia and insulin, support the above findings. Nevertheless, other authors have reported vanadium to have pro-oxidant effects [25, 41].

Magnesium absorption among both the control rats and the magnesium-deficient animals (*table 2*) presented values similar to those reported previously [42]. In magnesium-deficient groups, the percentage of absorption remained high, as expected under these experimental conditions. These changes reflected the adaptation of the digestive system under conditions of magnesium depletion, to compensate the insufficient dietary supply by increasing absorption. Treatment with vanadium did not modify the faecal excretion of magnesium (*table 2*). Therefore, at the digestive level, treatment with vanadium did not modify magnesium absorption.

Cation retention is the relationship between gastrointestinal and renal absorption and the process of excretion. The rats consuming a magnesium-deficient diet presented a cation retention value that was significantly lower than that of the control animals, as a consequence of the lower intake levels of this element. Expressing retained magnesium as a percentage of magnesium ingested, the groups given the magnesium-deficient diet presented higher values than the control animals, presenting a reaction pattern parallel to that of the absorption [42] (*table 2*).

Vanadium absorption among the control animals presented values that were clearly higher than those described in previous publications [43, 44]. The higher absorption of vanadium found in our study could be related to the type of vanadium complex supplied and/or the different

methods used to determine the presence of this element in the faeces.

Vanadium treatment produced an increased percentage of absorption of this element, which could be due in part to interactions with other elements in the digestive system. It has been reported that vanadium competes with divalent cations for binding sites [43]. Nevertheless, in our study the magnesium absorption in the animals treated with vanadium only presented a slight downward trend (*table 2*).

Although magnesium deficit increases the absorption of different elements [45-47], in the present study the magnesium-deficient diet was associated with slightly reduced vanadium absorption. Although these differences are not significant, the analysis of the variance for absorbed vanadium revealed the existence of interactions between magnesium and vanadium caused by treatments (*table 2*).

The vanadium treatment given to the control rats produced greater urinary losses of magnesium, causing reduced retention and lower magnesium retention. These losses account for the falls in serum levels of magnesium in this group (*table 2*). Moreover, it is known that vanadium stimulates magnesium uptake in erythrocytes [48]. The vanadium treatment given to magnesium-deficient rats did not affect urinary losses or magnesium retention, these values remaining similar to those observed in the non-treated deficient rats (*table 2*). However, consumption of the magnesium-deficient diet reduced urinary losses of vanadium and increased its retention, which explains the increase in serum levels of vanadium in the non-treated magnesium-deficient rats (*table 1*). In previous studies, our group found that the nutritional deficit of magnesium reduced the renal excretion of various elements [11, 45, 46]

These results show the existence of interactions in the kidney between magnesium and vanadium. The analysis of the variance with respect to retained vanadium confirmed the existence of significant interactions caused by the treatments (*table 2*).

The low level of magnesium retention observed in the control rats treated with vanadium is reflected in the lower levels of serum magnesium (*table 1*) and in the lower magnesium content in the femur (*table 3*), while in the other tissues studied no significant decreases were observed. The bone tissue constitutes the highest corporal

reserve of magnesium, and as a consequence of the reduced magnesium retention, this cation was mobilised in order to maintain its homeostasis [42, 49].

The intake of a magnesium-deficient diet led to a fall in the magnesium content in the skeletal muscle, kidney, liver and femur [42, 49], and an increase in the vanadium content in the same tissues (table 3). This raised level of vanadium deposits is a consequence of the higher retention and circulating levels of vanadium caused by a magnesium-deficient diet, as remarked above. It is interesting to observe that vanadium deposits were produced in the organs where magnesium had been depleted, which indicates the existence of possible interactions between these elements in the tissues in question. Moreover, in the case of the muscle and liver, the incorporation of vanadium could help alleviate the alterations to carbohydrate metabolism generated by the magnesium deficit.

The vanadium treatment given to control and magnesium-deficient rats produced an accumulation of vanadium in all the tissues studied. In the tissues of the magnesium-deficient rats treated with vanadium, magnesium depletion was only observed in the femur, with respect to the control group, which would indicate that the treatment prevented, at least in part, the mobilisation of magnesium from the muscle, kidney and liver tissues. The mechanism involved in this process could reflect the fact of vanadium increasing cellular magnesium uptake [47].

In summary, the vanadium treatment given to control rats reduced the retention of magnesium by the organism, producing a reduction in magnesium content in serum and in the femur, while the other parameters remained unchanged. Magnesium deficiency increased vanadium retention and vanadium deposits in the kidney, liver and femur. In addition, in the magnesium deficient group there was increased resistance to insulin, and a reduction in TAS. The vanadium treatment given to magnesium-deficient rats corrected many of the alterations that had been generated by the magnesium deficiency.

Therefore, we conclude that there are interactions between magnesium and vanadium in the digestive and renal systems. The increased hepatic deposits of vanadium observed in the magnesium-deficient rats could help alleviate the resistance to insulin generated by the magnesium deficit. Nevertheless, further studies are

needed, assaying lower doses of vanadium in order to determine optimum levels for pharmacological use, reducing or avoiding toxic effects.

Disclosure

We are grateful for support received from the Consejería de Innovacion, Ciencia y Empresa, Andalusian Regional Government (Project P06-CTS-01435).

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

References

1. Durlach J. *Magnesium in clinical practice*. London: John Libbey & Company Ltd, 1988.
2. Mataix J, Aranda P, López-Jurado M, Sánchez C, Planells E, Llopis J. Calcium, phosphorus and magnesium intake in an adult population from Southern Spain: Influence of lifestyle factors. *Eur J Nutr* 2006; 45: 349-54.
3. Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. *Acta Diabetológica* 2002; 39: 209-13.
4. 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.
5. 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: 134-40.
6. Curiel-García JA, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Hypomagnesemia and mortality in patients with type 2 diabetes. *Magnes Res* 2008; 21: 163-6.
7. 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: 218-23.
8. Guerrero-Romero F, Rascón-Pacheco RA, Rodríguez-Morán M, Escobedo de la Peña J, Wacher N. Hypomagnesemia and risk for metabolic glucose disorders: a 10-year follow-up study. *Eur J Clin Invest* 2008; 38: 389-96.
9. Simental-Mendia 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: 151-6.
10. Barbagallo M, Domínguez LJ, Galioto A, Pineo A, Belvedere M. Oral magnesium supplementation improves function in elderly diabetic patients. *Magnes Res* 2010; 23: 131-7.
 11. Planells E, Llopis J, Peran F, Aranda J. 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: 292-8.
 12. 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: 1815-22.
 13. Bussière 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Weglicki WB, Dickens BF, Wagner TL, Chmielinska JJ, Phillips TM. Immunoregulation by neuropeptides in magnesium deficiency: ex vivo effect of enhanced substance P production on circulating T lymphocytes from magnesium-deficient rats. *Magnes Res* 1996; 9: 3-11.
 17. Petrault I, Zimowska W, Mathieu J, Bayle D, Rock E, Favier A, Rayssiguier Y, Mazur A. Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. *BBA-Molecular Basis of Disease* 2002; 1586: 92-8.
 18. Kramer JH, Mak IT, Phillips TM, Weglicki. Dietary magnesium intake influences circulating pro-inflammatory neuropeptide levels and loss of myocardial tolerance to post-ischemic stress. *Exp Biol Med* 2003; 228: 665-73.
 19. Verma S, Cam MC, McNeill JH. Nutritional factors that can favourably influence the glucose/insulin system: Vanadium. *Am J Coll Nutr* 1998; 17: 11-8.
 20. Thompson KH, Orvig C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J of Inorg Biochem* 2006; 100: 1925-35.
 21. Kawabe K, Yoshikawa Y, Adichi Y, Sakurai H. Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes. *Life Sciences* 2006; 78: 2860-6.
 22. 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* 1993; 123: 1939-51.
 23. Del Castillo E, Montes-Bayón M, Añón E, Sanz-Medel A. Simultaneous determination of glycosylated haemoglobin, a long term biomarker of *Diabetes mellitus*, and total haemoglobin by isotope dilution and HPLC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom* 2008; 23: 758-64.
 24. 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: 233-40.
 25. Oster MH, Llobet JM, Domingo LJ, German JB, Keen CL. Vanadium treatment of diabetic Sprague-Dawley rats results in tissue vanadium accumulation and pro-oxidant effects. *Toxicology* 1993; 83: 115-30.
 26. 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.
 27. 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⁺⁶). *Cell Biol Toxicol* 2010; 26: 509-26.
 28. 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/>.
 29. Yuen VG, Orvig C, McNeill JH. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71: 263-9.
 30. 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.
 31. Majithiya JB, Balaraman R, Giridhar R, Yadav MR. Effect of bis[curcumino]oxovanadium on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elem Med Biol* 2005; 18: 211-7.

C. SÁNCHEZ ET AL.

32. Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2003;26:1147-52.
33. Kandeel FR, Balon E, Scott S, Nadler JL. Magnesium deficiency and glucose metabolism in rat adipocytes. *Metabolism* 1996;45:838-43.
34. 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:E745-752.
35. 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;86:1414-7.
36. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad Biol Med* 2000;29:1106-14.
37. Dickens BF, Weglicki WB, Li YS, Mak IT. Magnesium deficiency in vitro enhances free radical-induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Journal* 1992;3:187-91.
38. 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.
39. Manuel y Keenoy B, Moorkens G, Vertommen J, Noe M, Neve J, De Leeuw I. Magnesium status and parameters and the oxidant-antioxidant balance in patients with chronic fatigue: effects of supplementation with magnesium. *J Am Coll Nutr* 2000;19:374-82.
40. Yanardag R, Tunali S. Vanadyl sulphate administration protects the streptozotocin-induced oxidative damage to brain tissue in rats. *Mol Cell Biochem* 2006;286:153-9.
41. Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* 2005;12:1161-208.
42. Lerma A, Planells E, Aranda P, Llopis J. Evolution of Mg-deficiency in rats. *Ann Nutr Metab* 1993;37:210-7.
43. Nielsen, J. Other trace elements. Vanadium. In: Ziegler EE, Filder LJ, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. Washington, DC: ILSI Press, 1996: 364-70.
44. Adachi A, Ogawa K, Tsushi Y, Nagao N, Okano T. Balance, excretion and tissue distribution of vanadium in rats after short-term ingestion. *J Health Sci* 2000;46:59-62.
45. Planells E, Aranda P, Lerma A, Llopis J. Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc caused by magnesium deficiency in rats. *Brit J Nutr* 1994;72:315-23.
46. Sanchez-Morito N, Planells E, Aranda P, Llopis J. Magnesium-Manganese interactions caused by magnesium deficiency in rats. *J Am Coll Nutr* 1999;18:475-80.
47. 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;11:103-8.
48. Barbagallo M, Domínguez LJ, Resnick LM. Insulin-mimetic action of vanadate: Role of intracellular magnesium. *Hypertension* 2001;38:701-4.
49. Aranda P, López-Frías M, López Jurado M, Llopis J, Mataix J, Rivero M, Urbano G. Recovery study in Mg-deficient rats given an organic source of Mg. *Ann Nutr Metab* 1990;34:244-51.

Metallomics

Cite this: *Metallomics*, 2012, **4**, 814–819

www.rsc.org/metallomics

PAPER

Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats

Cristina Sanchez-Gonzalez,^a Carmen Bermudez-Peña,^b Cristina E. Trenzado,^c Heidi Goenaga-Infante,^d María Montes-Bayon,^e Alfredo Sanz-Medel^e and Juan Llopis^{*a}

Received 3rd February 2012, Accepted 26th April 2012

DOI: 10.1039/c2mt20066j

Vanadium is an element whose role as a micronutrient for humans is not yet completely established, but which has been shown to possess hypoglycaemic properties in diabetes. In an earlier study, we showed that in STZ-diabetic rats, exposure to 1 mg V per day has no effect on glycaemia or on antioxidant status. When the exposure was raised to 3 mg V per day there was a hypoglycaemic effect, together with reduced Se in the tissues, which reduced antioxidant defences. The aim of the present study was to examine whether exposure to 1 mg V per day modifies Se nutritional status and/or antioxidant defences in healthy rats. Two groups of rats were examined: control and vanadium-treated. Vanadium, as bis(maltolato)oxovanadium(IV), was supplied in the drinking water. The experiment had a duration of five weeks. Selenium was measured in excreta, serum, skeletal muscle, kidneys, liver, heart, femur and adipose tissue. Number of red (RBC) and white (WBC) blood cells and haemoglobin (Hb) were determined in samples of whole blood. Glutathione peroxidase (GPx), glutathione transferase (GST), catalase (CAT) and NAD(P)H:quinine-oxidoreductase1 (NQO1) activity, and malondialdehyde (MDA) in the liver were evaluated. Treatment significantly reduced food intake, produced an anaemic state, and decreased Se absorption and Se content in serum, kidneys and the liver. GPx, GST and NQO1 activity were decreased in the liver, while MDA levels rose. We conclude that healthy rats are more sensitive than diabetic ones to the effects of V. This should be taken into account for populations that are particularly exposed to V for environmental reasons, and/or that consume V as a nutritional supplement.

Introduction

Vanadium is an element that is essential for some living organisms, but its essentiality, distribution and toxicology, as well as its biological and pharmacological activity, are still not fully understood.^{1–3} Some complexes of vanadium (IV) have been shown to possess hypoglycaemic properties in diabetes. The compound bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) has been reported to be more effective than inorganic V as a glucose-lowering agent.³ Moreover, long-term studies (12 and 25 weeks) have revealed no evidence of V toxicity.^{4,5} It has been

suggested that V can reduce the production of free radicals resulting from disorders in glucose metabolism, and thus prevent the oxidant damage caused by diabetes.^{3,6} On the other hand, pro-oxidant effects of this metal in the tissues, especially the erythrocyte, liver and kidney, have been described, associated with interactions with various trace elements including iron, copper and zinc.^{7,8}

In this regard, selenium (Se) is an essential trace element that has been associated with a large number of selenoproteins involved in various biological processes such as antioxidant defence, the synthesis of thyroid hormones, protection against heavy metal toxicity, immune responses, etc.^{9,10}

To the best of our knowledge, few studies have been made of the effects of Se on the action of V in mammals, but the results that have been reported show that Se can interact with V.¹⁰ Se protects against the neurotoxic effects of V in all areas of the brain,¹¹ and helps protect the liver against the toxic effects of V (lipid peroxidation and structural damage) when the latter is supplied in combination with the chelating agent Tiron.¹² Nevertheless, Se has not been found to protect against

^a Institute of Nutrition and Food Technology and Department of Physiology, Facultad de Farmacia, Campus Cartuja, > E-18071 Granada, Spain. E-mail: jllopis@ugr.es; Fax: +34-958-248959

^b Biomedical Research Unit, Instituto Mexicano del Seguro Social, Victoria de Durango, Dgo., Mexico

^c Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Campus Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

^d LGC Limited, Queens Road, Teddington, Middlesex TW11 0LY, UK

^e Department of Analytical Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain

the toxic effects of V in Balb/3 T3 cell cultures.¹⁰ It has also been found that Se and V participate in the insulin signalling pathway, by activating the MAP kinase and S6 kinase.¹³

We recently studied the hypoglycaemic effect of bis(maltolato)oxovanadium (iv) (BMOV) in two rat models, and found that at a dose of 1 mg V per day, glycaemia returned to normal values in insulin-resistant rats,¹⁴ but that this dose had no effect on STZ-diabetic rats. However, when the diabetic rats were given a dose of 3 mg V per day, fasting glycaemia normalised¹⁵ and random-testing glycaemia did so in part,¹⁶ but this was accompanied by a deterioration in antioxidant status, related to the depletion of Se in the tissues. It has been suggested that V in the diet of healthy rats may provoke toxic effects at lower doses than in diabetic rats.^{5,17}

Since V can increase sugar absorption in the muscles, more energy can be stored, and so it is often used as a supplement by athletes and body builders.¹⁸ Rising levels of V in the environment, due to its widespread use in diverse industrial processes (fossil fuels release V during combustion), together with the use of V as a nutritional supplement by part of the healthy population, led us to address the present study as a continuation of those cited above.^{14,15} The focus of this study is to examine changes in the bioavailability, metabolism and distribution of Se, and any associated alterations in antioxidant defence in healthy rats, following exposure to 1 mg V per day in the form of bis(maltolato)oxovanadium (iv), a dose that in diabetic rats had virtually no effect. The results obtained could help clarify the role of V as a micronutrient, and its biological activity and toxicity.

Experimental

Animals and diets

Male Wistar rats weighing 190–220 g (Charles River Laboratories, L'Abresde, France) were randomly divided into 2 groups of rats. *Control group (C)*: 9 healthy rats fed with the AIN93M semisynthetic diet, containing 65 µg Se and 60 µg V per kg food. *Vanadium-treated group (V)*: 10 healthy rats fed with the AIN93M diet. In addition, the rats in this group received in their drinking water 6.22 mg BMOV per day, which supplied 1 mg V per day. In all cases, the BMOV solution was prepared daily.

During the experimental period, weight gain, glucose level and the intake of food and water were monitored. On day 35, the rats were anaesthetised with a solution of pentobarbital (0.5 g per 100 mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and exsanguinated by cannulating the posterior aorta. Blood was collected and centrifuged (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 3000 rpm for 15 minutes to separate the serum. The liver, gastrocnemius muscle, kidneys, heart, femur and perirenal adipose tissue were also removed, weighed, placed in preweighed polyethylene vials, and stored at -80°C . During the last 7 days of the experimental period, the faeces and urine were collected every 24 h and stored at -80°C in polyethylene bottles for subsequent analysis.

From day 0 of the experiment, all animals were housed in individual metabolic cages designed for separate collection of faeces and urine. The cages were located in a well-ventilated,

temperature-controlled room ($21 \pm 2^{\circ}$) with relative humidity ranging from 40 to 60%, and a light : dark period of 12 h.

The following biological indices were calculated: absorbed as $[I - F]$, where I = intake and F = faecal excretion.

All experiments were undertaken according to Directional Guides Related to Animal Housing and Care (European Council Community, 1986) and all procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Granada.

Instrumentation

Samples for quantitative determination of metals were firstly lyophilised in a vacuum pump (Telstar, Madrid, Spain) and then prepared by attack with nitric acid and hydrogen peroxide (supra-pure quality, Merck), in a microwave digester (Milestone, Sorisole, Italy). Determination of V and Se in the diet, serum and tissues was performed by ICP-MS (Agilent 7500, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) fitted with a Meinhard type nebulizer (Glass Expansion, Romainmotier, Switzerland) and equipped with a collision cell.

All enzymatic assays were carried out at $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ using a PowerWavex microplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) in duplicate in 96-well microplates (UVStar[®], Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany).

Reagents and materials

A Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used to obtain deionized water (18 MΩ). All reagents used were of the highest available purity. Hydrogen peroxide was of supra-pure quality from Merck (Darmstadt, Germany).

A standard solution of 100 µg l⁻¹ of Li, Mg, Sc, Co, Y, In, Ce, Ba, Pb, Bi and U in 1% (v/v) HNO₃ was prepared from a 1000 mg l⁻¹ multi-element stock standard solution (Merck) and used for the daily optimising of the ICP parameters. Single element standard solutions for ICP-MS containing 1000 µg ml⁻¹ of Se and V were also purchased from Merck. Certified reference materials of serum (Seronorm) and bovine muscle NIST 8414 were purchased from SERO AS, (Billingstad, Norway) and NIST (Gaithersburg, MD 20899, USA) respectively.

All biochemicals used for measurement of antioxidant status, including substrates, coenzymes and purified enzymes, were obtained from Roche (Mannheim, Germany) or Sigma Chemical Co. All other chemicals came from Merck and were of reagent grade.

Procedures

Determination of the total metal concentrations. For tissue homogenization, the liver of each rat was frozen in liquid nitrogen, freeze-dried and ground using a porcelain pestle and mortar. Finally, the samples were digested with nitric acid and hydrogen peroxide in a microwave oven. The extracts were collected and made up to a final dilution of 1/10 (w/v) for subsequent analysis. Determination of V and Se in the diet, serum and tissues was performed by collision reaction cell ICP-MS (He/H₂ mode). Calibration curves were prepared by using Ga as internal standard and by dilution of stock solutions of 1000 mg l⁻¹ in 1% HNO₃.

The accuracy of the method was evaluated by analysis of suitable certified reference materials (Seronom and NIST 8414) and by recovery studies in samples of organs enriched with multi-element standards.

Measurement of blood cells. Red blood cells (RBC), white blood cells (WBC), lymphocyte and platelet counts and haemoglobin (Hb) were determined using a Sysmex KX-21 automatic haematology analyser (Sysmex, Japan).

Assay of the antioxidant status. Liver samples were homogenized in ice-cold buffer (100 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA and 0.1% triton X-100 (v/v), pH 7.8) at a ratio of 1:9 (w/v). Homogenates were centrifuged at 30 000 rpm for 30 min in a Centrikon H-401 (Kontron, Hermle, Zurich, Switzerland) centrifuge. After centrifugation, the supernatant was collected and frozen at -80°C until analysed. All enzymatic assays were carried out at $25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ using a Power Wavex microplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, USA) in duplicate in 96-well microplates (UVStar[®], Greiner Bio-One, Germany). The enzymatic reactions were started by the addition of the tissue extract. The specific assay conditions were as follows.

Glutathione peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9) activity was measured following the method of Flohé and Günzler¹⁹ with some modifications.²⁰ A freshly prepared glutathione reductase solution (2.4 U ml^{-1} in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0) was added to a 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 0.15 mM NADPH and 0.15 mM cumene hydroperoxide. After the addition of 1 mM GSH (reduced glutathione), the NADPH-consumption rate was monitored at 340 nm.

Glutathione transferase (GST; EC 2.5.1.18) activity was determined by the method of Habig *et al.*²¹ adapted to microplate.²² The reaction mixture consisted of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), 1.2 mM GSH and 1.23 mM solution of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in ethanol, prepared just before the assay. GST activity was monitored at 340 nm by the formation of glutathione-chloro-dinitro benzene conjugate.

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was determined by measuring the decrease of H_2O_2 concentration at 240 nm according to Aebi,²³ as adapted by Trenzado *et al.*²⁰ The reaction mixture contained freshly prepared 10.6 mM H_2O_2 in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0.

NAD(P)H:quinine-oxidoreductase1 (NQO1; EC 1.6.99.2) activity was determined by measuring DCPIP reduction at 600 nm according to Sturve *et al.*²⁴ adapted by Sanz *et al.*²² The reaction mixture contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 μM 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP) and 0.5 mM NADH. A control reaction with distilled water (three measures average) was assayed and subtracted from each sample reaction.

For these enzymes, one unit of activity is defined as the amount of enzyme required to transform 1 μmol of substrate per min under the above assay conditions. The protein content of the supernatant solutions was determined by the Bradford method,²⁵ using bovine serum albumin as the standard.

Lipid-peroxidation levels were determined based on malondialdehyde (MDA) levels generated by oxidation of polyunsaturated fatty acids. In the presence of thiobarbituric acid, MDA reacts

producing coloured thiobarbituric-acid-reacting substances (TBARS) that were measured at 535 nm.²⁶

Statistical analysis

Descriptive statistical parameters (means and standard deviations) were obtained for each of the variables studied. The experimental data were analysed using the tests for nonparametric samples, using the Mann Whitney *U*-test for independent samples. For the bivariate analysis, Spearman's coefficient of correlation was calculated. All the analyses were performed using Statistical Package for Social Science 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results and discussion

Studies have shown that V treatment reduces the hyperglycaemia associated with diabetes, and that the compound bis(maltolato)-oxovanadium (iv) (BMOV) is more effective than inorganic V as a glucose-lowering agent.³ Although some V compounds are currently undergoing human clinical trials,³ many metabolic aspects have yet to be established, such as the digestive and metabolic interactions with other elements. In the present study, we aimed to determine the changes in the bioavailability and tissue distribution of Se, and alterations in antioxidant defence following exposure to BMOV in healthy rats.

The reasons for the specific doses used, and observations on toxicity problems observed in the treated animals, have been described in a previous publication.¹⁴

Effect of V(iv) exposure on body weight, food intake and fasting glycaemia

Treatment with 1 mg V per day (as BMOV) for the control rats caused a reduction in food intake, associated with lower weight gain (Table 1). Reduced food intake (15%) (control $15.5 \pm 2.5 \text{ g per day}^{15}$ vs. V treated $13.2 \pm 6.4 \text{ g per day}$, $P < 0.05$) and body weight (b.w. on day 35, control 296 ± 30^{15} vs. V treated $236 \pm 24 \text{ g}$, $P < 0.05$) following the administration of V compounds has been described in several studies.^{7,8} It has been suggested that the reduced food intake could be caused by the direct action of the ion on the central nervous system, which stimulates local glucose uptake.²⁷ Other authors have reported that when V treatment is combined with leptin, V enhances the catabolic effects of the hormone (leptin), thus tending to reduce body weight and decrease food intake.²⁸ Other authors have observed that V reduces food intake but not body weight.²⁹ Some of these discrepancies in the results reported may be influenced by the different doses and V compounds used and

Table 1 Haematological parameters and selenium content in serum, muscle, kidney, liver, heart and adipose tissue on day 35

	C	CV
Red cells ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$)	8.6 ± 1.5	7.0 ± 1.1^a
Hb (g dl ⁻¹)	16.0 ± 3.2	12.5 ± 0.7^a
White cells ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	5.5 ± 1.4	2.7 ± 0.8^a
Lymphocytes (%)	70 ± 4.8	64 ± 6.9^a
Platelets ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$)	618 ± 269	507 ± 324
Serum Se (mg l ⁻¹)	81.01 ± 6.43^{15}	49.74 ± 10.23^a

Values shown are means \pm SD. C (control rats); CV (control rats treated with 1 mg V per day). ^aC vs. CV. $P < 0.05$. Ref. 15.

the variable durations of the experiments described. As stated above, treatment with 1 mg V per day has no significant effect on fasting glycaemia in healthy rats.¹⁴ This fact has also been observed in previous studies.^{7,30}

Effect of the V(IV) exposure on absorption of Se

Se absorption was calculated as the difference between Se intake and faecal excretion of Se. In our experimental conditions, the V treatment led to a severe decrease (42%) in Se absorbed (control 0.79 ± 0.05^{15} vs. vanadium treated 0.49 ± 0.15 μg Se per day, $P < 0.01$). We believe this fact is due to the participation of various factors. On the one hand, the reduced intake led to a reduction in Se absorbed; however, the slight decrease in intake (15%) is not sufficient to fully account for the fall in Se absorbed. It has been reported that V may inhibit Na^+/K^+ ATPase activity in different tissues.³¹ The inhibition of ATPase could have been one of the mechanisms responsible for the reduced absorption. Moreover, the high concentrations of V in the digestive system could have displaced the Se from its binding ligands,³² thus favouring the reduced absorption of Se. In diabetic rats, treated with 1 mg V per day, we observed a slightly greater decrease (19%), while the Se absorbed only fell by 22%, in comparison with non-treated diabetic rats.¹⁵ These results show that, in the digestive apparatus, the treatment had a stronger negative effect on Se absorption in healthy rats than in the diabetic animals.

Effect of V(IV) exposure on haematological parameters and Se distribution in tissues (Tables 1 and 2)

There are conflicting views regarding the haematological changes provoked by V treatment in non-diabetic rats. Some authors have found these values to decrease^{33,34} while others, using higher doses of BMOV (9.2 mg V per kg per 24 h) for a longer period of time (12 weeks) have observed no such changes.³⁵ It has been reported that V produces peroxidative changes in the erythrocyte membrane reduce erythrocyte deformability and haemolysis. It has also been suggested that it may provoke a disorder in erythropoiesis and erythrocyte maturation.^{33,34} In our study, the exposure of healthy rats to BMOV also led to a significant reduction in the number of erythrocytes and haemoglobin. However, when diabetic rats were given the same treatment, there were no significant haematological changes, with levels remaining similar to those observed in non-treated diabetic rats and/or healthy animals. The degree of anaemia found in the healthy rats (Table 2) was similar to that in the diabetic rats, when a dose of 3 mg V per

Table 2 Selenium content in muscle, kidneys, liver, heart and adipose tissue on day 35

	C	CV
Kidneys (mg per kg dry tissue)	4.62 ± 0.49^{15}	2.85 ± 0.78^a
Liver (mg per kg dry tissue)	2.38 ± 0.33^{15}	0.91 ± 0.28^a
Heart (mg per kg dry tissue)	0.85 ± 0.12	1.14 ± 0.15^a
Femur (mg per kg dry tissue)	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02^a
Muscle (mg per kg dry tissue)	0.44 ± 0.06	0.47 ± 0.02
Adipose tissue (mg per kg dry tissue)	0.09 ± 0.11	0.06 ± 0.02

Values shown are means \pm SD. C (control rats); CV (control rats treated with 1 mg V per day). ^aC vs. CV. $P < 0.05$. Ref. 15.

day was applied (data not published). The decrease in lymphocytes appears to be due mainly to the V-provoked leukopaenia. However, there is no consensus regarding the effect of V on the number of leukocytes.^{17,33,34}

Regarding Se concentration in the tissues, the treatment provoked a sharp fall in serum, kidneys and the liver. However, Se content rose in the femur and heart, remaining unchanged in the muscle and adipose tissue. In our opinion, the reduced absorption could be the main factor responsible for Se depletion in the tissues. However, the fact that the depletion was measured in the kidney and liver, organs with the highest relative concentrations of Se⁹ and where V content increased most¹⁴ leads us to believe that the V provoked a displacement of Se from its binding ligands toward these tissues, thus aggravating tissue depletion. The results of the bivariate analysis confirmed the existence of a strong inverse relation between V intake and serum levels of Se ($r = -0.888$; $P < 0.001$), Se content in kidneys ($r = -0.821$; $P < 0.001$) and Se content in the liver ($r = -0.929$; $P < 0.001$).

On comparing these results with those obtained for the diabetic rats, we again see that the degree of depletion in the healthy rats treated with 1 mg V per day was higher than that found in the diabetic rats given the same dose, and similar to that observed in the diabetic rats treated with 3 mg V per day.¹⁵

Effect of V(IV) exposure on the activities of parameters related to antioxidant defence (Table 3)

In order to determine whether the Se tissue depletion had affected the oxidative status, we designed a study of the activity of four enzymes and the lipid-peroxidation level (MDA). The treatment led to a decrease in the activity of GPx, GST and NQO1, had no effect on that of CAT, and provoked an increase in the lipid-peroxidation level (Table 3).

GPx is a seleno-protein that is related to oxidative defence and very effective in determining the nutritional status of Se.³⁶ NQO1 is a cytosolic enzyme which catalyses the reduction of quinone, thus protecting cells from oxidative damage. In experimental animals, NQO1 increases in response to xenobiotics, oxidants, heavy metals and carcinogens, which has led to the suggestion that the enzyme may offer protection against the toxic effect of these agents.^{35,37}

It has been suggested that, *in vivo*, V(IV) oxidises to vanadate [V(V)] in the presence of oxygen, and that vanadate could be reduced by glutathione (GSH).¹ It is also known that exposure to vanadate results in depletion of the cellular GSH pool.³⁸ In earlier studies, it was also observed that treatment with V reduces the activity of Se-dependent GPx in the liver,⁷ although in this study

Table 3 Activity of GPx (glutathione peroxidase), GST (glutathione transferase), catalase (CAT), NAD(P)H:quinine-oxidoreductase I (NQO1) and MDA in the liver on day 35

	C	CV
GPx (mU mg^{-1} protein)	631 ± 132^{15}	298 ± 154^a
GST (mU mg^{-1} protein)	281 ± 24^{15}	215 ± 24^a
CAT (U mg^{-1} protein)	389 ± 97	430 ± 18
NQO1 (mU mg^{-1} protein)	192 ± 58	109 ± 63^a
MDA (nmol g^{-1} liver)	50 ± 12	71 ± 13^a

Values shown are means \pm SD. C (control rats); CV (control rats treated with 1 mg V per day). ^aC vs. CV. $P < 0.05$. Ref. 15.

no relation with Se was studied, and in erythrocytes.³⁹ Moreover, in studies of the rat brain,⁶ liver⁷ and erythrocytes³⁹ treated with different V compounds, it was found that GSH content tended to decrease. However, other authors have reported no modifications to GPx, but reduced GST activity in the erythrocytes.⁴⁰ The discrepancies in the results obtained by these authors may be due to the different experimental conditions used in each case.

In our study, the activity of the hepatic enzymes that participate in antioxidant defence (Table 3) shows that the depletion of Se in the liver, caused by the V treatment, is accompanied by a reduction in the activity of GPx, GST and NQO1, especially the former. The reduced activity of the above enzymes is accompanied by a significant increase in lipid peroxidation (MDA) in the liver. Divariate analysis reveals a high positive correlation between the liver content of Se and the activity of GPx ($r = 0.873$; $P < 0.001$ and GST ($r = 0.813$; $P < 0.001$). MDA is also inversely correlated with the content of Se in the liver ($r = -0.708$; $P < 0.01$).

In our opinion, the depletion of Se and GSH could account for the reduced activity of GPx and GST. We observed no significant changes in hepatic catalase (CAT) activity. Previous studies, too, have reported no such changes in the CAT of erythrocytes using a dose of 9 mg V per kg b.w. per 24 h.⁴⁰ However, there were changes when the dose was raised to 12 mg V per kg b.w. per 24 h.³⁹ (as sodium metavanadate in both cases). In our case, the dose used was lower than in the above-mentioned studies (~5 mg V per kg b.w. per 24 h). Recent “*in vitro*” studies with HepG2 cells⁴¹ have shown that exposure to V (ammonium metavanadate) decreases the activity of NQO1. These authors suggest that V inhibits the gene expression of NQO1. Although our study used a different V compound and our results were obtained “*in vivo*”, they coincide with those mentioned above.

Markedly fewer enzymatic activities were obtained in healthy rats treated with 1 mg V per day than in the diabetic rats given the same dose, and were similar to those found in the diabetic rats treated with a dose three times higher.¹⁵ The situation found was comparable to that regarding the level of Se absorption and distribution in the tissues. Therefore, we conclude that V appears to exert a greater toxic effect on healthy rats than on diabetic animals.¹⁵

As reported in previous studies, there is an inverse correlation between the appearance of coronary heart disease and low serum Se levels.^{9,42} The reduced serum Se levels following V treatment (Table 3) could increase the risk of cardiovascular disease, by compromising antioxidant defence.

Conclusions

The results obtained from this study reveal that V treatment given to healthy rats at a dose of 1 mg V per day in the form of bis(maltolato)oxovanadium (iv) (BMOV) reduces food intake and produces a sharp fall in Se absorption, which could be the main factor responsible for the depletion of Se in serum, kidneys and the liver. The losses of Se in the liver are accompanied by falls in GPx, GST and NQO1 activity and by increased lipidic peroxidation, which compromises Se status and antioxidant defences. Furthermore, the increased peroxidation could be the cause of the anaemic status observed in these rats. This situation has also been observed in diabetic

rats when BMVO is administered at a dose three times higher,¹⁵ but not when the dose is as described in the present study. Therefore, we conclude that healthy rats are more sensitive to the toxic effects of V than are diabetic rats. This finding should be taken into consideration for populations that are exposed to V due to environmental circumstances and/or that use it as a nutritional supplement. However, further studies are needed to better determine the effects arising from these interactions.

Conflicts of interest statement

There are no conflicts of interest of authors or consortium members, since the project was funded by public funds. This project is dedicated to basic research and there are no commercial interests.

Acknowledgements

We are grateful for support received from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Andalusian Regional Government (Project P06-CTS-01435).

References

- M. Valko, H. Morris and M.T.D. Cronin, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 1161–1208.
- K. Kawabe, Y. Yoshikawa, Y. Adichi and H. Sakurai, *Life Sci.*, 2006, **78**, 2860–2866.
- K. H. Thompson and C. Orvig, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 1925–1935.
- V. G. Yuen, C. Orvig and J. H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1993, **71**, 263–269.
- D. M. Facchini, V. G. Yuen, M. L. Batell, J. H. McNeill and M. D. Grynpas, *Bone*, 2006, **38**, 368–377.
- R. Yanardag and S. Tunail, *Mol. Cell. Biochem.*, 2006, **286**, 153–159.
- M. H. Oster, J. M. Llobet, L. J. Domingo, J. B. German and C. L. Keen, *Toxicology*, 1993, **83**, 115–130.
- A. Scibior, H. Zaporowska and I. Niedzwiecka, *J. Appl. Toxicol.*, 2009, **29**, 619–628.
- M. Navarro-Alarcón and C. Cabrera-Vique, *Sci. Total Environ.*, 2008, **400**, 115–141.
- I. Zwolak and H. Zaporowska, *Cell Biol. Toxicol.*, 2012, **28**, 31–46.
- S. S. Haider, A. A. Abdel-Gayoum, M. El-Fakhri and K. M. Ghwarsha, *Hum. Exp. Toxicol.*, 1998, **17**, 23–28.
- A. K. Srivastava and M. Z. Mehdi, *Diabetic Med.*, 2005, **22**, 2–13.
- Y.-J. Hei, S. Farahbakhshian, X. Chen, M. L. Batell and J. H. McNeill, *Mol. Cell. Biochem.*, 1998, **178**, 367–375.
- C. Sánchez, M. Torres, M. C. Bermúdez-Peña, P. Aranda, M. Montes-Bayon, A. Sanz-Medel and J. Llopis, *Magnesium Res.*, 2011, **24**, 196–208.
- C. Sánchez-González, C. Bermúdez-Peña, F. Guerrero-Romero, C. E. Trenzado, M. Montes-Bayon, A. Sanz-Medel and J. Llopis, *Br. J. Nutr.*, 2011, DOI: 10.1017/S0007114511006131.
- T. Iglesias-González, C. Sánchez-González, M. Montes-Bayón, J. Llopis-González and A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, **402**, 277–285.
- J. L. Domingo, M. Gómez, D. J. Sánchez, J. M. Llobet and C. L. Keen, *Mol. Cell. Biochem.*, 1995, **153**, 233–240.
- D. G. Barceloux, *Clin. Toxicol.*, 1999, **37**, 265–278.
- L. Flohé and W. A. Günzler, *Methods Enzymol.*, 1984, **105**, 115–121.
- C. E. Trenzado, M. C. Hidalgo, M. García-Gallego, A. E. Morales, M. Furné, A. Domezain, J. Domezain and A. Sanz, *Aquaculture*, 2006, **254**, 758–767.
- W. H. Habig, M. J. Pabst and W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 7130–7139.
- A. Sanz, C. E. Trenzado, M. J. López-Rodríguez, M. Furné and J. M. Tierno de Figueroa, *Zool. Sci.*, 2010, **27**, 952–958.
- H. Aebi, *Methods Enzymol.*, 1984, **105**, 121–126.

- 24 J. Sturve, E. Stephensen and L. Forlin, *Comp. Hepatol.*, 2005, **4**, 4–9.
- 25 M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248.
- 26 J. A. Buege and S. D. Aust, *Methods Enzymol.*, 1978, **52**, 302–310.
- 27 J. Meyerovitch, Y. Dshechter and S. Amir, *Physiol. Behav.*, 1989, **45**, 1113–1116.
- 28 J. Wilsey, M. K. Manthey and P. J. Scarpace, *Endocrinology*, 2006, **147**, 493–501.
- 29 A. Adachi, K. Ogawa, Y. Tsushi, N. Nagao and T. Okano, *J. Health Sci.*, 2000, **46**, 59–62.
- 30 J. B. Majithiya, R. Balaraman, R. Giridhar and M. R. Yadav, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2005, **18**, 211–217.
- 31 F. Arduser, S. Wolffram and E. Scharrer, *J. Nutr.*, 1985, **115**, 1203–1208.
- 32 F. H. Nielsen, Other trace elements. Vanadium, in *Present Knowledge in Nutrition*, ed. E. E. Ziegler and L. J. Fildes, ILSI Press, Washington, DC, 1996, pp. 364–370.
- 33 H. Zaporowska and A. Scibior, in *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*, ed. J. O. Nriagu, John Wiley & Sons Inc, New York, 1998, ch. 16, pp. 135–157.
- 34 A. Scibior, H. Zaporowska and J. Ostrowski, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2006, **51**, 287–295.
- 35 S. Dai, E. Vera and J. H. McNeill, *Pharmacol. Toxicol.*, 1995, **76**, 263–268.
- 36 D. G. Hafeman, R. A. Sunde and W. G. Hoekstra, *J. Nutr.*, 1974, **104**, 580–587.
- 37 C. Foppoli, F. Marco, C. Blarmino, M. Perluigi, C. Cini and R. Cocci, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, **37**, 852–863.
- 38 S. Cuesta, D. Francés and G. B. García, *Neurotoxicol. Teratol.*, 2010, **33**, 297–302.
- 39 A. Scibior and H. Zaporowska, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 2010, **26**, 509–526.
- 40 A. Scibior, H. Zaporowska, A. Wolinska and J. Ostrowski, *Cell Biol. Toxicol.*, 2010, **26**, 509–526.
- 41 G. Abdehamid, A. Anwar-Mohamed, M. M. Elmazar and A. O. S. El-Kadi, *Toxicol. in Vitro*, 2010, **24**, 1554–1561.
- 42 J. Arnaud, N. T. Akbaraly, A. M. R. Hininger and C. Berr, *J. Nutr. Biochem.*, 2007, **18**, 482–487.



British Journal of Nutrition (2012), 108, 893–899
© The Authors 2011

doi:10.1017/S0007114511006131

Effect of bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats

Cristina Sanchez-Gonzalez¹, Carmen Bermudez-Peña², Fernando Guerrero-Romero²,
Cristina E. Trenzado³, María Montes-Bayon⁴, Alfredo Sanz-Medel⁴ and Juan Llopis^{1,5*}

¹Institute of Nutrition and Food Technology and Department of Physiology, Campus Cartuja, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

²Biomedical Research Unit, Instituto Mexicano del Seguro Social, Victoria de Durango, Durango, Mexico

³Departamento de Biología Animal, Facultad de Ciencias, Campus Fuentenueva, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

⁴Department of Analytical Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain

⁵Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Centro de Investigaciones Biomédicas, Laboratory 115, Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud, 18100 Armilla, Granada, Spain

(Submitted 1 August 2011 – Final revision received 12 October 2011 – Accepted 13 October 2011 – First published online 16 November 2011)

Abstract

The role of V as a micronutrient, and its hypoglycaemic and toxicological activity, have yet to be completely established. The present study focuses on changes in the bioavailability and tissue distribution of Se in diabetic streptozotocin rats following treatment with V. The following four study groups were examined: control; diabetic (DM); diabetic treated with 1 mg V/d (DMV); diabetic treated with 3 mg V/d (DMVH). V was supplied in the drinking water as bis(maltolato)oxovanadium (IV). The experiment had a duration of 5 weeks. Se was measured in food, faeces, urine, serum, muscle, kidney, liver and spleen. Glucose and insulin serum were studied, together with glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GR), glutathione transferase (GST) activity and malondialdehyde (MDA) levels in the liver. In the DM group, we recorded higher levels of food intake, Se absorbed, Se retained, Se content in the kidney, liver and spleen, GSH-Px and GST activity, in comparison with the control rats. In the DMV group, there was a significant decrease in food intake, Se absorbed, Se retained and Se content in the liver and spleen, and in GSH-Px and GST activity, while fasting glycaemia and MDA remained unchanged, in comparison with the DM group. In the DMVH group, there was a significant decrease in food intake, glycaemia, Se absorbed, Se retained, Se content in the kidney, liver and spleen, and in GSH-Px and GST activity, and increased MDA, in comparison with the DM and DMV groups. We conclude that under the experimental conditions described, the treatment with 3 mg V/d caused a tissue depletion of Se that compromised Se nutritional status and antioxidant defences in the tissues.

Key words: Vanadium: Selenium: Diabetes: Nutritional status: Oxidative defence

Diabetes is a pathology that affects many metabolic processes, altering the concentration of various trace elements in the tissues, and of enzymes related to antioxidant defence. This circumstance, together with the metabolic changes induced by hyperglycaemia, may contribute to the development of the disease.

V is a widely distributed element, which is essential for some living organisms, but its role as a micronutrient, its essentiality, and its biological and pharmacological activity are as yet incompletely understood. Due to growing interest in the pharmacological effects of some V compounds, the

metabolism of V is an important area of current investigation⁽¹⁾. In the plasma, V is present as 90% bound to plasma proteins, primarily transferrin. Elsewhere, it is distributed primarily in the bone, kidney and liver. However, its interactions with other trace elements, regarding absorption and tissue distribution, are not well understood. Some complexes of V have been shown to possess hypoglycaemic effects, stimulating autophosphorylation of the insulin receptors and increasing the activity of tyrosine kinase, favouring the translocation of GLUT4^(1,2). It has been known that the V complex, bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV), is more

Abbreviations: ABTS, 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid); BMOV, bis(maltolato)oxovanadium (IV); GR, glutathione reductase; GSH, reduced glutathione; GSH-Px, glutathione peroxidase; GST, glutathione transferase; MDA, malondialdehyde; STZ, streptozotocin; TAS, total antioxidant status.

* **Corresponding author:** Dr J. Llopis, fax +34 958 248959, email jllolis@ugr.es



effective than inorganic V as a glucose-lowering agent⁽¹⁾. Although some V complexes are currently undergoing human clinical trials⁽¹⁾, there are many aspects that remain to be determined, such as the digestive and metabolic interactions with other elements involved in antioxidant defence. According to some authors^(1–3), V improves glucose metabolism, and thus reduces the production of free radicals resulting from disorders in glucose metabolism; in consequence, it prevents oxidant damage caused by diabetes. However, others⁽⁴⁾ have related V to pro-oxidant effects, because it does not normalise alterations in the metabolism of various trace elements, such as Fe, Zn and Cu, that are associated with diabetes.

In vitro and *in vivo* studies have shown that sodium selenate has an insulin-mimetic action similar to that of V, and that its administration to diabetic streptozotocin (STZ) rats produces hypoglycaemia⁽⁵⁾ by favouring the translocation of GLUT4 transporters in diabetic rats⁽⁶⁾. Moreover, Se is an element that is associated with antioxidant defence and protection against heavy metal toxicity⁽⁷⁾, a fact also observed in relation to diabetic rats^(5,8).

However, to date, no data have been published as to whether exposure to V might alter the metabolism of Se. For these reasons, we consider it important to address the present study of the interactions between V and Se in diabetic rats.

The aim of the present study is to examine whether V-treated diabetic rats experience alterations in the bioavailability and tissue distribution of Se, and in the activity of enzymes related to the nutritional status of Se and to antioxidant defence. The results obtained will reveal the existence, or otherwise, of interactions between these two elements and clarify the role of V as an anti-diabetic agent.

Materials and methods

Animals and diets

Male Wistar rats weighing 190–220 g (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were randomly divided into four groups.

- (1) Control group (C): nine rats fed the semi-synthetic diet AIN-93. This diet provided 65 µg Se and 60 µg V/kg food.
- (2) Diabetic group (DM): eight rats fed the semi-synthetic diet AIN-93. Diabetes was induced in rats by the injection of STZ at a dose of 60 mg/kg.
- (3) Diabetic group treated with 1 mg V/d (DMV): ten rats fed the semi-synthetic diet AIN-93. Diabetes was induced in rats by the injection of STZ at a dose of 60 mg/kg. In addition, the rats in this group received in their drinking water 6.22 mg BMOV/d, which supplied 1 mg V/d.
- (4) Diabetic group treated with 3 mg V/d (DMVH): ten rats fed the semi-synthetic diet AIN-93. Diabetes was induced in rats by the injection of STZ at a dose of 60 mg/kg. In addition, the rats in this group received in their drinking water 18.66 mg BMOV/d, which supplied 3 mg V/d.

In all cases, the BMOV solution was prepared daily. During the experimental period, the weight gain and the intake of

food and water were monitored. Every 7 d, the glucose level in the peripheral blood was analysed.

On day 35, rats were anaesthetised with a solution of pentobarbital (0.5 g/100 ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and exsanguinated by cannulating the posterior aorta. Blood was collected and centrifuged (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) at 3000 rpm for 15 min to separate serum. The gastrocnemius muscle, kidney, liver and spleen were also removed, weighed, placed in preweighed polyethylene vials and stored at –80°C. During the last 7 d of the experimental period, the faeces and urine were collected every 24 h and stored at –80°C in polyethylene bottles for subsequent analysis.

All animals were housed from day 0 of the experiment in individual metabolism cages designed for the separate collection of faeces and urine. The cages were located in a well-ventilated, temperature-controlled room (21 ± 2°C) with relative humidity ranging from 40 to 60%, and a light–dark period of 12 h.

The following biological indices were calculated: absorbed as $(I - F)$, absorption (%) as $((I - F)/I) \times 100$, retained as $(I - (F + U))$ and retained (%) R/I as $(I - (F + U))/I \times 100$, where I is the intake; F is the faecal excretion; U is the urinary excretion.

All experiments were carried out in accordance with Directional Guides Related to Animal Housing and Care (European Council Community, 1986) and all procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Granada.

Analytical methods

Determination of V and Se in the diet, serum and tissues was performed using inductively coupled plasma spectroscopy–MS (Agilent 7500; Agilent Technologies, Tokyo, Japan). All materials used in the analysis were previously cleaned with super-pure HNO₃ and ultra-pure water (18.2 Ω) obtained using a Milli Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Samples were prepared by digestion with HNO₃ and H₂O₂ (super-pure quality; Merck, Darmstadt, Germany), in a microwave digester (Milestone, Sorisole, Italy). When the sample had been digested, the extract was collected and made up to a final volume of 10 ml for subsequent analysis.

Calibration curves were prepared following the Ga addition technique as an internal standard, using stock solutions of 1000 mg/l of each element (Merck).

The total metal content (V and Se) in the tissues was analysed using inductively coupled plasma spectroscopy–MS techniques⁽⁹⁾, and the accuracy of the method was evaluated by the analysis of suitable certified reference materials, Seronorm (Billingstad, Norway) and NIST 8414 (Gaithersburg, MD, USA), and by recovery studies in samples of organs enriched with multi-element standards. The percentage of CV obtained for Se was 2.9% and that for V 5.6%. For each element, we used the mean of five separate determinations of this reference material.

Glycaemia levels were determined using the sensor ACCU-CHEK AVIVA (Roche, Mannheim, Germany). Plasma levels of



insulin were determined using the SPI BIO (Montigny le Bretonneux, France) enzyme immune assay technique.

Total antioxidant status (TAS) was determined using a Randox[®] assay kit (Randox Laboratories Limited, Crumlin, Antrim, UK). The assay is based on the incubation of 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) with a peroxidase (methmyoglobin) and H₂O₂ to produce the radical cations ABTS⁺, which has a relatively stable blue-green colour, measured at 600 nm. The suppression of the colour is compared with that of Trolox, which is widely used as a traditional standard for TAS measurement assays, and the assay results are expressed as Trolox equivalent (nmol/l).

Liver samples were homogenised in ice-cold buffer (100 mM-Tris-HCl, 0.1 mM-EDTA and 0.1% Triton X-100 (v/v), pH 7.8) at a ratio of 1:9 (w/v). Homogenates were centrifuged at 30 000 rpm for 30 min in a Centrifuge H-401 (Kontron Hermle, Zurich, Switzerland) centrifuge. After centrifugation, the supernatant was collected and frozen at -80°C until analysed.

All enzymatic assays were carried out at 25 ± 0.5°C using a PowerWavex microplate scanning spectrophotometer (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) in duplicate in ninety-six-well microplates (UVStar[®]; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany). The enzymatic reactions were started by the addition of the tissue extract. The specific assay conditions were as follows:

Glutathione peroxidase (GSH-Px; EC 1.11.1.9) activity was measured following the method of Flohé & Günzler⁽¹⁰⁾ with some modifications⁽¹¹⁾. A freshly prepared glutathione reductase (GR) solution (40 µkat/l in 0.1 M-potassium phosphate buffer, pH 7.0) was added to a 50 mM-potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.5 mM-EDTA, 1 mM-sodium azide, 0.15 mM-NADPH and 0.15 mM-cumene hydroperoxide. After the addition of 1 mM- reduced glutathione (GSH), the NADPH consumption rate was monitored at 340 nm.

GR (EC 1.6.4.2) activity was assayed as described by Carlberg & Mannervik⁽¹²⁾ with some modifications⁽¹¹⁾, by measuring the oxidation of NADPH at 340 nm. The reaction mixture consisted of 0.1 M-sodium phosphate buffer (pH 7.5), 1 mM-EDTA, 0.63 mM-NADPH and 0.15 mM-oxidised glutathione.

Glutathione transferase (GST; EC 2.5.1.18) activity was determined by the method of Habig *et al.*⁽¹³⁾ adapted to a microplate reader⁽¹⁴⁾. The reaction mixture consisted of 0.1 M-phosphate buffer (pH 6.5), 1.2 mM-GSH and 1.23 mM-solution of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene in ethanol, all prepared just before the assay. GST activity was monitored at 340 nm by the formation of glutathione-chloro-dinitro benzene conjugate.

For these enzymes, one unit of activity is defined as the amount of enzyme required to transform 1 µmol of substrate/min under the above assay conditions. The protein content of the supernatant solutions was determined by the Bradford method⁽¹⁵⁾, using bovine serum albumin as the standard.

Lipid peroxidation levels were determined based on malondialdehyde (MDA) levels generated by the oxidation of PUFA. In the presence of thiobarbituric acid, MDA reacts to produce coloured thiobarbituric-acid-reacting substances that were measured at 535 nm, following Buege & Aust⁽¹⁶⁾.

The percentage of CV for GSH-Px, GR, GST and MDA was 7.3, 5.5, 6.4 and 8.5%, respectively. For each enzyme, we used the mean of five separate determinations of the same liver sample from a control rat.

All biochemicals, including substrates, coenzymes and purified enzymes, were obtained from Roche or Sigma Chemical Company. All other chemicals came from Merck and were of reagent grade.

Statistical analysis

Descriptive statistical parameters (means and standard deviations) were obtained for each of the variables studied. The Mann-Whitney *U* test for two independent samples and the Kruskal-Wallis test for multiple independent samples were used in the analyses. For the bivariate analysis, Spearman's coefficient of correlation was calculated. All analyses were performed using SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Differences were considered statistically significant at a probability level < 5%.

Results

Table 1 shows the evolution of the mean body weight and mean food intake of rats during the experimental period. The diabetic STZ rats (DM) did not present a significant change in body weight during the experimental period. Treatment with V, both at 1 mg V/d (DMV) and at 3 mg V/d (DMVH), induced weight changes similar to those observed in the DM rats.

Diabetes increased the food intake. However, the higher-dose V treatment reduced the food intake of rats, to levels slightly below those of the control rats (Table 1).

Table 2 shows the evolution of fasting glycaemia during the experimental period. The V treatment of 1 mg/d did not significantly alter glycaemia levels in the diabetic rats during the first 28 d. However, on day 35, glycaemia levels were higher than those in the DM group. The treatment with the 3 mg V/d dose maintained glycaemia at levels similar to those of the control rats.

Table 1. Evolution of mean body weight and mean food intakes during the experimental period

(Mean values with their standard errors)

Groups	Body weight (g)					
	Day 0		Day 35		Food intake (g)	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
C	200	5	296	10	15.5	0.4
DM	184**	7	201**	15	30.1***	0.9
DMV	187*	3	181***	3	22.6***†††	1.2
DMVH	203††††	1	204***‡	8	11.6***†††††	0.4

C, control rats; DM, diabetic streptozotocin rats; DMV, diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/d; DMVH, diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/d. Mean value was significantly different from that of the C group: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01, *** *P* < 0.001.

Mean value was significantly different from that of the DM group: † *P* < 0.05, ††† *P* < 0.001.

Mean value was significantly different from that of the DMV group: ‡ *P* < 0.05, †† *P* < 0.01, ††† *P* < 0.001.



Table 2. Fasting glycaemia during the experimental period (mmol/l) (Mean values with their standard errors)

Groups	Day 0		Day 7		Day 14		Day 21		Day 28		Day 35	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
C	3.6	0.4	5.0	0.3	5.7	0.1	5.1	0.2	5.2	0.1	4.7	0.3
DM	7.9**	1.3	13.9**	2.1	13.6**	1.1	14.3**	1.9	14.2**	2.0	14.6**	1.2
DMV	11.6**	1.9	17.0**	2.0	16.0**	1.8	16.0**	2.2	12.5**	1.5	19.6***†	1.7
DMVH	9.4**	1.2	5.0††††	0.3	4.7††††	0.1	5.4††††	0.3	5.1††††	0.3	5.3††††	0.3

C, control rats; DM, diabetic streptozotocin rats; DMV, diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/d; DMVH, diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/d. Mean value was significantly different from that of the C group: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Mean value was significantly different from that of the DM group: † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$. Mean value was significantly different from that of the DMV group: ††† $P < 0.01$, †††† $P < 0.001$

Table 3 shows serum V, Se and insulin on day 35, in the experimental groups. Diabetes induced by STZ produced a significant increase in the serum levels of V and Se and a decrease in circulating insulin. The diabetic rats treated with 1 mg V/d did not present any change in serum Se or insulin, compared with the untreated diabetic rats. However, the diabetic rats treated with 3 mg V/d presented serum Se values below those of the control rats, while insulin and TAS remained at levels similar to those of the diabetic rats.

Table 4 shows the digestive and metabolic utilisation of Se. Diabetes (DM group) increases the net values of absorbed and retained Se; although when expressed as a percentage (% absorption and %R/I), no significant changes were observed. The diabetic rats treated with 1 mg V/d (DMV) presented a reduction in Se absorption and Se retained, in comparison with the DM group.

Table 5 shows the Se content in the muscle, kidney, liver and spleen on day 35. Diabetes increased Se content in the kidney, liver, spleen and heart. In the diabetic rats, the V treatment, at a dose of 1 mg V/d, decreased Se content in the liver and spleen in comparison with the untreated diabetic rats (DM), but these values remained higher than those of the control rats, except in the case of the muscle and spleen. The treatment of the diabetic rats with 3 mg V/d produced a significant reduction in Se in the kidney, liver and spleen.

TAS and the activities of GSH-Px, GR, GST and lipid peroxidation levels (MDA) are shown in Table 6. The treatment leads to a decrease in the activity of GSH-Px and GST and an increase in the lipid peroxidation level.

The bivariate study revealed the existence of significant relationships, among which the following are particularly

important: V intake correlated negatively with Se absorbed ($r = -0.556$; $P < 0.01$), Se retained ($r = -0.644$; $P < 0.001$), GSH-Px ($r = -0.414$; $P < 0.05$) and GST ($r = -0.817$; $P < 0.001$) activity, and positively with MDA ($r = 0.388$; $P < 0.05$).

Se intake correlated positively with Se content in the kidney ($r = 0.790$; $P < 0.001$), liver ($r = 0.840$; $P < 0.001$), spleen ($r = 0.593$; $P < 0.001$) and heart ($r = 0.529$; $P < 0.01$). Se absorbed correlated positively with the serum levels of Se ($r = 0.870$; $P < 0.001$), Se content in the kidney ($r = 0.876$; $P < 0.001$), liver ($r = 0.880$; $P < 0.001$), spleen ($r = 0.664$; $P < 0.001$) and heart ($r = 0.420$; $P < 0.05$). Se content in the liver correlated positively with GSH-Px ($r = 0.941$; $P = 0.001$) and negatively with MDA ($r = -0.529$; $P < 0.01$).

Discussion

Diabetes is a pathology that affects the metabolism of various trace elements and the activity of enzymes related to antioxidant defence. This circumstance may contribute to the development of the disease. It has been shown that V is a trace element associated with the regulation of glucose, improving its transport and metabolism and increasing the sensitivity of the insulin receptor⁽¹⁾. However, there are many aspects that remain to be determined, such as the interactions with other elements.

In view of the lack of information on Se–V interactions, the present study examines diabetic rats treated with different doses of V in order to determine Se bioavailability and tissue distribution, and its relationship to some indicators of the nutritional status of this element. Based on the study results, under our experimental conditions, the V treatment

Table 3. Fasting selenium, vanadium and insulin in serum on day 35 (Mean values with their standard errors)

Groups...	C		DM		DMV		DMVH		$P_{K-W \text{ test}}$
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Serum V ($\mu\text{mol/l}$)	0.045	0.004	0.12**	0.009	7.5***††	0.7	15.0***††††	1.5	<0.001
Serum Se ($\mu\text{mol/l}$)	1.03	0.03	1.15**	0.03	1.49**	0.06	0.86***††††	0.04	<0.001
Serum insulin (pmol/l)	313	40	38**	9	41**	12	34**	3	<0.001

** Mean value was significantly different from that of the C group ($P < 0.01$).
 †† Mean value was significantly different from that of the DM group ($P < 0.01$).
 ††† Mean value was significantly different from that of the DMV group ($P < 0.01$).



Table 4. Digestive and metabolic utilisation of selenium on days 28–35 of the study (Mean values with their standard errors)

Groups...	C (n 9)		DM (n 8)		DMV (n 8)		DMVH (n 8)		<i>P</i> _{K-W test}
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
<i>I</i> (μg/d)	0.99	0.04	2.18***	0.06	1.77***†††	0.04	0.91†††††	0.03	<0.01
<i>F</i> (μg/d)	0.20	0.03	0.39**	0.06	0.37**	0.04	0.54***‡	0.06	<0.001
<i>U</i> (μg/d)	0.26	0.02	0.59***	0.07	0.63***	0.04	0.17†††††	0.01	<0.001
<i>A</i> = (<i>I</i> - <i>F</i>) (μg/d)	0.79	0.05	1.80***	0.05	1.40***†††	0.04	0.37***†††††	0.07	<0.001
<i>A</i> (%) = (<i>A</i> / <i>I</i>) × 100	80	3	82	2	79	2	40***†††††	7	<0.001
<i>R</i> = (<i>I</i> - (<i>F</i> + <i>U</i>)) (μg/d)	0.53	0.05	1.20***	0.06	0.76***†††	0.06	0.19***†††††	0.07	<0.001
<i>R</i> (%) = (<i>R</i> / <i>I</i>) × 100	53	4	56	4	43*†	3	21***†††	7	<0.01

C, control rats; DM, diabetic streptozotocin rats; DMV, diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/d; DMVH, diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/d; *I*, intake; *F*, faecal excretion; *U*, urinary excretion; *A*, absorbed; *R*, retained. Mean value was significantly different from that of the C group: **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. Mean value was significantly different from that of the DM group: †*P*<0.05, ††*P*<0.01, †††*P*<0.001. Mean value was significantly different from that of the DMV group: ‡*P*<0.05, ‡‡*P*<0.01, ‡‡‡*P*<0.001.

caused a tissue depletion of Se that compromised Se nutritional status and antioxidant defences in the tissues

The doses of V used in the present study (1 mg V/d approximately 5 mg V/kg body weight per d and 3 mg V/d approximately 15 mg V/kg body weight per d) are higher than the lowest dose reported to cause adverse effects in rats (0.8 mg V/kg body weight per d). However, the doses used are low in comparison with those used in other studies and much lower than LD50 (lethal dose 50) (40–90 mg V/kg body weight per d)⁽¹⁷⁾. In each group treated with V, two rats (20%) were removed from the present study due to gastrointestinal disorders.

In the untreated diabetic rats (DM), there were no significant weight increases during the experimental period, due to the hypercatabolism that accompanies the disease, although the rats presented polyphagia. The diabetic rats treated with V did not present significant weight changes⁽⁴⁾, although food intake did significantly decrease as the V dose was increased, reaching values similar to those of the control rats in the case of the dose of 3 mg V/d. It has been suggested that the decrease in food intake could be because V heightens the catabolic effects of leptin, favouring body-weight loss and reducing food intake⁽¹⁸⁾.

The V treatment of 1 mg/d (DMV) did not significantly alter glycaemia levels in the diabetic rats during the first 28 d. The higher levels of glycaemia observed on day 35 in the DMV group, with respect to the DM group, could be because STZ produced more severe pancreatic damage in some rats, and

this circumstance was apparent at the end of the experimental period.

The dose of 3 mg V/d normalised glycaemia levels in the diabetic rats, from the first week of the treatment. These results coincide with those reported earlier^(19–21). Nevertheless, other authors have observed that although V exercises a hypoglycaemic effect, normal glycaemia levels are not achieved^(5,4,22,23). This inconsistency could be due to various factors, such as the use of different compounds and doses of V, the duration of assays, the method employed to determine glucose levels, the dose of STZ used and/or variability in the animals' responses.

The diabetic rats presented a level of insulinaemia that was well below that observed in the control rats, due to the destruction of β-cells caused by STZ. Treatment with V, independently of the dose applied, had no effect on the serum levels of insulin (Table 3).

Serum levels of Se in the DM group were higher than those in the control group, because the animals in the DM group consumed more food, which led to increases in the net quantities of Se absorbed and retained (Table 4). The increased body retention of Se caused by diabetes is assumed to be responsible for the increased serum levels and the content of Se in the tissues of the diabetic rats (Table 5). The correlations found between Se intake and its content in the tissues (see the Results section) corroborate this hypothesis.

The treatment of the diabetic rats with 1 mg V/d (DMV group) had no effect on fasting glycaemia, but in comparison

Table 5. Selenium content in muscle, kidney, liver, spleen, heart, adipose tissue and femur (mg/kg dry tissue) on day 35 (Mean values with their standard errors)

Groups...	C		DM		DMV		DMVH		<i>P</i> _{K-W test}
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
Gastrocnemius muscle	0.43	0.02	0.47	0.02	0.44	0.01	0.42	0.02	>0.05
Kidney	4.62	0.17	6.11***	0.14	5.71**	0.14	3.07***†††††	0.09	<0.001
Liver	2.38	0.11	3.73***	0.15	3.01***††	0.09	1.19***†††††	0.01	<0.001
Spleen	1.54	0.04	1.76*	0.06	1.54†	0.06	1.31***†††	0.07	<0.01

C, control rats; DM, diabetic streptozotocin rats; DMV, diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/d; DMVH, diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/d. Mean value was significantly different from that of the C group: **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001. Mean value was significantly different from that of the DM group: †*P*<0.05, ††*P*<0.01, †††*P*<0.001. Mean value was significantly different from that of the DMV group: ‡*P*<0.05, ‡‡*P*<0.01, ‡‡‡*P*<0.001.



Table 6. Total antioxidant status (TAS) in serum and activity of glutathione peroxidase (GSH-Px); glutathione reductase (GR) and glutathione transferase (GST), and malondialdehyde (MDA) levels in the liver on day 35 (Mean values with their standard errors)

Groups...	C		DM		DMV		DMVH		<i>P</i> _{K-W test}
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
TAS (mmol/l)	1.29	0.08	0.91*	0.08	0.95*	0.07	0.86*	0.10	<0.01
GSH-Px (μkat/g protein)	10.5	0.9	19.2***	0.6	14.4*††	1.0	7.3*†††††	1.0	<0.001
GR (μkat/g protein)	0.57	0.05	0.55	0.01	0.55	0.01	0.53	0.02	>0.05
GST (μkat/g protein)	4.68	0.05	4.10**	0.12	3.67***	0.12	3.48***††	0.12	<0.001
MDA (nmol/g liver)	48	4	42	3	49	2	62*†††	4	<0.05

C, control rats; DM, diabetic streptozotocin rats; DMV, diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/d; DMVH, diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/d.

Mean value was significantly different from that of the C group: **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001.

Mean value was significantly different from that of the DM group: ††*P*<0.01, †††*P*<0.001.

Mean value was significantly different from that of the DMV group: ‡*P*<0.05, ‡‡‡*P*<0.001.

with the untreated diabetic rats, there was a decrease in food intake and in the net quantities of Se absorbed and retained. In our opinion, the lower absorption and retention of Se in the DMV group appears to respond to the changes in food intake produced by the treatment. The reduced Se retention is responsible for the slight decrease in Se content in the liver and spleen.

The dose of 3 mg V/d given to the diabetic rats (DMVH group) had a clearly anti-diabetic effect, normalising glycaemia levels and reducing food intake to levels similar to those of the controls. Moreover, this dose of V produced a severe reduction in the absorption and urinary losses of Se. We believe that the main cause of the drastic reduction in absorbed Se may be due to reduced Se intake (Table 3). Nevertheless, the high concentration of V in the intestine could also have interfered with Se absorption^(24,25). The negative correlations found between the intake of V and the absorbed Se (see the Results section) corroborate the above remarks.

The reduction in the urinary losses of Se could be a compensatory mechanism to avoid its depletion. Under physiological conditions, the homeostasis of Se is basically regulated by urinary excretion^(7,26).

We believe that in the DMVH group, the reduced absorption is responsible for the lower Se content in serum (Table 3) and in the kidney, liver and spleen (Table 5).

In order to better determine whether Se tissue depletion had affected the oxidative status, we designed a study of serum TAS and of the activity of three GSH-dependent enzymes: GSH-Px and hepatic GR and GST.

The present results show that in the untreated diabetic rats, serum TAS decreased, while in the liver, the activity of GSH-Px increased, that of GR remained unchanged and that of GST diminished (Table 6). The increased GSH-Px activity could be related to the greater content of hepatic Se found in this group. Hepatic GSH-Px is known to be very effective in determining the nutritional status of Se⁽²⁷⁾ (Table 5). An earlier publication has reported lower levels of GSH in the erythrocytes of diabetic patients⁽²⁸⁾. In the present study conditions, the degradation of GSH would account for the reduced activity of GST found in this group.

The V treatment given to the diabetic rats did not affect TAS (Table 6), irrespective of the dose. Other authors, in previous studies⁽²⁹⁾, have observed no significant changes in TAS following the V treatment.

It has been reported that exposure to V results in the depletion of the cellular GSH pool, which increases the vulnerability to lipid peroxidation^(30–32). The results obtained in the present study show that the V treatment to the diabetic rats at 1 mg V/d does not modify glycaemia, but does produce slight decreases in food intake, Se absorbed and Se in the liver and spleen. The depletion of Se in the liver is accompanied by a reduction in the activity of GSH-Px and a non-significant increase in MDA, compared with the untreated diabetic rats. The treatment at 3 mg V/d induced a clearly anti-diabetic effect, as both food intake and glycaemia levels were normalised. In addition, there was a sharp decrease in Se absorption and Se content in various tissues. The strong depletion of Se in the liver (Table 5) could account for the reduced activity of GSH-Px. Studies^(4,31) have reported that the depletion of GSH could account for the reduced activity of GST and also contribute to that of GSH-Px. The lower levels of activity of these enzymes could be related to the higher levels of MDA. Bivariate analysis reveals a high positive correlation between the liver content of Se and the activity of GSH-Px, together with a negative correlation with MDA (see the Results section). We conclude that under our experimental conditions, the V treatment caused a tissue depletion of Se that compromised Se nutritional status and antioxidant defences in the tissues. However, further studies are needed to better determine the effects arising from these interactions.

Acknowledgements

The authors are grateful for support received from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Andalusian Regional Government (project P06-CTS-01435). All authors have made substantial contributions to all of the following: the conception and design of the study, or acquisition of the data, or analysis and interpretation of the data; drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; final approval of the version to be submitted. There are no



conflicts of interest of authors or consortium members, since this study was funded by public funds. This study is dedicated to basic research and there are no commercial interests.

References

- Thompson KH & Orvig C (2006) Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J Inorg Biochem* **100**, 1925–1935.
- Kawabe K, Yoshikawa Y, Adichi, *et al.* (2006) Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes. *Life Sci* **78**, 2860–2866.
- Yanardag R & Tunali S (2006) Vanadyl sulphate administration protects the streptozotocin-induced oxidative damage to brain tissue in rats. *Mol Cell Biochem* **286**, 153–159.
- Oster MH, Llobet JM, Domingo LJ, *et al.* (1993) Vanadium treatment of diabetic Sprague–Dawley rats results in tissue vanadium accumulation and pro-oxidant effects. *Toxicology* **83**, 115–130.
- Wiernsperger N & Rapin JR (2010) Trace elements in glucometabolic disorders: an update. *Diabetol Metab Syndr* **2**, 70–75.
- Xu TJ, Yuan BX, Zou YM, *et al.* (2010) The effect of insulin in combination with selenium on blood glucose and GLUT4 expression in the cardiac muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Fundam Clin Pharmacol* **24**, 199–204.
- Navarro-Alarcón M & Cabrera-Vique C (2008) Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ* **400**, 115–141.
- Erbayraktar Z, Yilmaz O, Artmann AT, *et al.* (2007) Effects of selenium supplementation on antioxidant defense and glucose homeostasis in experimental diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res* **118**, 217–226.
- Del Castillo E, Montes-Bayón M, Añón E, *et al.* (2008) Simultaneous determination of glycated haemoglobin, a long term biomarker of diabetes mellitus, and total haemoglobin by isotope dilution and HPLC–ICP–MS. *J Anal At Spectrom* **23**, 758–764.
- Flohé L & Günzler LWA (1984) Assay of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* **105**, 115–121.
- Trenzado CE, Hidalgo MC, García-Gallego M, *et al.* (2006) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. *Aquaculture* **254**, 758–767.
- Carlberg I & Mannervik B (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* **250**, 5475–5480.
- Habig WH, Pabst MJ & Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases – the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**, 7130–7139.
- Sanz A, Trenzado CE, López-Rodríguez MJ, *et al.* (2010) Study of antioxidant defense in four species of Perloidea (Insecta, Plecoptera). *Zoolog Sci* **27**, 952–958.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Anal Biochem* **72**, 248–256.
- Buege JA & Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol* **52**, 302–310.
- EFSA (2004) 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). *EFSA J* **33**, 1–22. <http://www.efsa.eu.int/>
- Wilsey J, Manthey MK & Scarpace PJ (2006) Oral vanadium enhances the catabolic effects of central leptin in young adult rats. *Endocrinology* **147**, 493–501.
- Majithiya JB, Balaraman R, Giridhar R, *et al.* (2005) Effect of bis[curcumino]oxovanadium on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elem Med Biol* **18**, 211–217.
- Sun Qian, Sekar N, Goldwaser I, *et al.* (2000) Vanadate restores glucose-6-phosphate in diabetic rats: a mechanism to enhance glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, 403–410.
- Cam M, Rodrigues B & McNeill JH (1999) Distinct glucose lowering and beta cell protective effects of vanadium and food restriction in streptozotocin-diabetes. *Eur J Endocrinol* **141**, 546–554.
- Facchini DM, Yuen VG, Batell ML, *et al.* (2006) The effects of vanadium treatment on bone in diabetic and non-diabetic rats. *Bone* **38**, 368–377.
- 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* **38**, 276–283.
- Arduser F, Wolfram S & Scharrer E (1985) Active absorption of selenate by ileum. *J Nutr* **115**, 1203–1208.
- Nielsen FH (1996) Other trace elements. Vanadium. In *Present Knowledge in Nutrition*, pp. 364–370 [EE Ziegler and LJ Fildes, editors]. Washington, DC: ILSI Press.
- Gammelgaard B, Gabel-Jensen C, Stürup S, *et al.* (2008) Complementary use of molecular and element-specific mass spectrometry for identification of selenium compounds related to human selenium metabolism. *Anal Bioanal Chem* **390**, 1691–1706.
- Hafeman DG, Sunde RA & Hoekstra WG (1974) Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* **104**, 580–587.
- Lei XG, Cheng W-H & McClung JP (2007) Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Ann Rev Nutr* **27**, 41–61.
- Scibior A, Zaporowska H, Wolinska A, *et al.* (2010) Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in the blood of rats co-treated with vanadium (V⁺⁵) and chromium (Cr⁺³). *Cell Biol Toxicol* **26**, 509–526.
- Valko M, Morris H & Cronin MTD (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* **12**, 1161–1208.
- Byczkowski 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.
- Cuesta S, Francés D & García GB (2010) ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicol Teratol* **33**, 297–302.

Aggravation by vanadium of magnesium deficiency in STZ-induced diabetic rats

M.C. Bermúdez-Peña³, C. López-Chaves, J. Llopis¹, F. Guerrero-Romero³,
M. Montes-Bayón², A. Sanz-Medel², C. Sánchez-González¹

¹ Institute of Nutrition and Food Technology and Department of Physiology, Campus Cartuja, University of Granada, E-18071 Granada, Spain; ² Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Oviedo, Spain; ³ Biomedical Research Unit, Mexican Social Security Institute, Victoria de Durango, Mexico

Correspondence: Cristina Sánchez-González. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. Centro de Investigaciones Biomédicas Lab. 115. Universidad de Granada, Parque Tecnológico de la Salud 18100 Armilla, Granada (Spain)

<crissg@ugr.es>

ABSTRACT. This study examined changes in the metabolism of magnesium (Mg), and related serum parameters, following treatment with vanadium (V) in streptozotocin-diabetic rats. Over a period of five weeks, four groups were examined: control, diabetic, diabetic-treated with 1 mg V/day or 3 mg V/day. The V was supplied in drinking water as bis(maltolato)oxovanadium(IV). The Mg levels were measured in food, faeces, urine, serum, muscle, kidney, liver, spleen, heart and femur. Albumin, uric acid, urea, total-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, aspartate-aminotransferase and alkaline-phosphatase were determined in serum. In the diabetic group, Mg retained and Mg content in serum and femur decreased, while levels of uric acid, urea, total-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and alkaline-phosphatase and aspartate-aminotransferase activity increased compared with control rats. In the diabetic group treated with 1 mg V/day, Mg retained, serum levels of Mg, urea and triglycerides, and alkaline-phosphatase activity remained unchanged, while levels of uric acid, total-cholesterol and LDL-cholesterol increased and the Mg content in femur and aspartate-aminotransferase activity decreased compared with the diabetic untreated group. In the diabetic rats treated with 3 mg V/day, food intake and glycaemia were normal. In this group, Mg content in serum, kidney and femur, levels of urea and aspartate-aminotransferase and alkaline-phosphatase activity decreased, whereas LDL-cholesterol increased, uric acid and total-cholesterol levels remained unchanged in comparison with untreated diabetic rats. In conclusion, although treatment with 3 mg V/day normalised the glycaemia, the hypomagnesaemia and tissue depletion of Mg seen in the diabetic rats, caused by the treatment with V, could have partially contributed to the fact that V did not normalise other serum parameters altered by the diabetes.

Key words: vanadium, magnesium, diabetes, interactions, blood parameters

Some complexes of vanadium (V) have been shown to possess hypoglycaemic effects, stimulating autophosphorylation of the insulin receptors and increasing the activity of tyrosine kinase, favouring the translocation of the glucose transporter GLUT 4 [1, 2]. The V complex, bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV), is known to be more effective than inorganic V as a glucose-lowering agent [1].

Although some V compounds are currently undergoing human clinical trials [1], many aspects remain to be determined, such as its interactions with other elements.

Magnesium (Mg) is an essential co-factor in the enzymatic pathways involved with energy, protein and lipid metabolism and the modulation of glucose transport through the cellular membrane [3, 4]. A reduction in the intracellular concentration of magnesium provokes a fall in the activity of tyrosine kinase in the insulin receptor [5, 6] and reduces the uptake of glucose by interfering with the translocation of the glucose transporter [GLUT 4]. Furthermore, Mg deficiency induces oxidative stress [7, 8]. A diet rich in Mg improves the homeostasis of glucose and insulin [9-13]. Moreover, it has been shown that abnormal magnesium homeostasis occurs in diabetes, frequently accompanied by hypomagnesaemia.

The fact that both Mg and V participate in glucose metabolism, intervening in the same processes, led us to consider that these two elements could be linked and might be acting jointly in the metabolism of carbohydrates [14]. Scibior *et al.* [15-18] studied the possible relationship between V and Mg in healthy rats. However, no data have been published on whether exposure to V might alter the metabolism of Mg in diabetic rats.

In a previous paper [19], it was reported that V treatment reduced the absorption, retention, serum level and femur content of Mg in control rats and that treatment with V of Mg-deficient rats corrected many of the alterations that had been generated by Mg deficiency. Thus, we considered it of interest to determine whether V treatment might affect the alterations in Mg metabolism associated with diabetes. Therefore, the aim of the present study was to examine changes in the metabolism of Mg, and related blood parameters, following treatment with bis(maltolato)oxovanadium (IV) of STZ-induced diabetic rats. The results obtained might help to clarify the role of V as an anti-diabetic agent, as well as its biological activity.

Methods and material

Animals and diets

Male Wistar rats weighing 190-220 g (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) were randomly divided into four groups. *Control group*: nine rats were fed the semi-synthetic diet AIN93M. This diet provided 456.4 mg Mg and 60 µg V/kg. *Diabetic group*: eight rats were fed the semi-synthetic diet AIN93M. *Diabetic group treated with 1 mg V/day*: 10 rats were fed the semi-synthetic diet AIN93M. In addition, the rats in this group received 6.22 mg BMOV/day in their drinking water, which supplied 1 mg V/day. *Diabetic group treated with 3 mg V/day*: 10 rats were fed the semi-synthetic diet AIN-93M. In addition, the rats in this group received 18.66 mg BMOV/day in their drinking water, which supplied 3 mg V/day.

In all cases, diabetes was induced in the rats by injection of streptozotocin at a dose of 60 mg/kg b.wt. To confirm diabetes, on day seven, blood samples were obtained from the tail and glucose concentrations were analysed. Animals with levels greater than 13.8 mmol/L were considered to be diabetic.

During the experimental period, the BMOV solution was prepared daily, and the weight gain and intake of food and water were monitored. Every seven days, the glucose level in peripheral blood was analysed. On day 35, the rats were anaesthetised with a solution of pentobarbital (0.5 g/100 mL, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), and exsanguinated by cannulating the posterior aorta. Blood was collected and centrifuged (Beckman, Fullerton, CA, USA) at 3,000 rpm for 15 min to separate the serum. The liver, gastrocnemius muscle, kidney, liver, spleen, heart and femur were removed, weighed, placed in preweighed polyethylene vials, and stored at -80°C. Over the last seven days of the experimental period, the faeces and urine were collected every 24 h and stored at -80°C in polyethylene bottles for subsequent analysis.

From day 0 of the experiment, all animals were housed in individual metabolic cages designed for the separate collection of faeces and urine. The cages were located in a well-ventilated, temperature-controlled room (21 ± 2°C) with relative humidity ranging from 40 to 60%, and a light:dark period of 12 h.

The following biological indices were calculated: absorbed as [I-F], absorption (%), as $[(I-F)/I] \times 100$, retained, as [I-(F+U)], and (%R/I) as $[I-(F+U)]/I \times 100$, where I = intake, F = faecal excretion, and U = urinary excretion.

All experiments were undertaken according to Directional Guides Related to Animal Housing and Care (European Community Council, 1986), and all procedures were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Granada.

Analytical methods

Determination of V and Mg in the diet, serum and tissues was performed by ICP-MS (Agilent 7500, Tokyo, Japan). All of the materials used in the analysis were previously cleaned with super-pure nitric acid and ultra-pure water (18.2 Ω) obtained using a Milli Q system.

Samples were prepared by digestion with nitric acid and hydrogen peroxide (super-pure quality, Merck), in a microwave digester (Milestone, Sorisole, Italy). When the sample had been digested, the extract was collected and made up to a final volume of 10 mL for subsequent analysis.

Calibration curves were prepared following the Ga addition technique as an internal standard, using stock solutions of 1,000 mg/L of each element (Merck).

The total metal content (V and Mg) in the tissues was analysed using ICP-MS techniques, and the accuracy of the method was evaluated by analysis of suitable, certified, reference materials, Seronorm (Billingstad, Norway) and NIST 8414, (Gaithersburg, MD 20899) and by recovery studies in samples of organs enriched with multi-element standards. The %CV obtained for Mg was 1.9% and that for V 5.6%. For each element we used the mean of five separate determinations of this reference material.

Glycaemia levels were determined using the sensor ACCU-CHEK AVIVA (Roche-Mannheim, Germany). Serum levels of insulin were determined using the SPI BIO (Montigny le Bretonneux, France) enzyme immune assay technique. Albumin, uric acid, urea, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase were determined using a BS-200 Chemistry Analyzer (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Hamburg, Germany).

Statistical analysis

Descriptive statistical parameters (means and standard deviations) were obtained for each of the variables studied. Taking into account the difficulty of determining whether the data follow a normal distribution, because the sample size (eight values per group) did not have enough power to test the normality of the variable, the Mann Whitney U test for two independent samples and the Kruskal-Wallis test for multiple independent samples were used in the analysis. For the bivariate analysis, Spearman's coefficient of correlation was calculated. All analyses were performed using the Statistical Package for Social Science 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

As a consequence of gastrointestinal disorders, two rats were removed from each V-treated group.

Table 1 shows the digestive and metabolic utilisation of Mg during the experimental period. Intake was higher in the diabetic and the diabetic group treated with 1 mg V/day than in the control group. However, the intake by the diabetic group treated with 3mg V/day was similar to that of the control group and lower than that of the other diabetic groups. A similar pattern was observed with respect to faecal excretion. Urinary excretion was higher in the diabetic groups than in the control group. However, in the diabetic group treated with 3 mg V/day, urinary excretion was lower than in the other diabetic groups. The net values of absorbed Mg were higher in the diabetic group and in the diabetic group treated with 1 mg V/day than in the control group. Nevertheless, in the diabetic group treated with 3 mg V/day, the absorbed value was lower than in the other diabetic groups.

Retention values were lower in the diabetic group and in the treated diabetic groups than in the control group. When expressed as a percentage (% absorption and %R/I), no significant changes were observed in % absorption, but the percentage of retention was lower in the diabetic and diabetic treated groups than in the control group.

Table 2 shows serum V and Mg on day 35 in the experimental groups. The streptozotocin-induced diabetic rats showed a significant increase in serum V and a decrease in Mg. The rats treated with 1 mg V/day did not present any changes in

Table 1. Digestive and metabolic utilisation of magnesium on days 28-35 of the study, for control rats (C), diabetic streptozotocin rats (DM), diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/day (DM-1 mg V/day), and diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/day (DM-3 mg V/day).

	C (n = 9)		DM (n = 8)		DM-1 mg V/d (n = 8)		DM-3 mg V/d (n = 8)		P
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Intake Mg (mg/day)	6.8	0.9	15.1	1.1*	12.3	0.9*†	6.3	0.5†‡	<0.001
Faecal Mg (mg/day)	3.5	0.6	8.6	0.8*	6.6	0.8*†	3.3	0.7†‡	<0.001
Urinary Mg (mg/day)	0.4	0.2	4.8	1.2*	4.0	0.8*	1.3	0.3*†‡	<0.001
Absorbed Mg (mg/day)	3.3	0.9	6.5	1.1*	5.7	1.3*	3.0	0.6†‡	<0.001
Absorbed Mg (%)	48	9	43	5	46	8	48	9	NS
Retained Mg (mg/day)	2.9	0.9	1.7	0.8*	1.7	0.8*	1.7	0.6*	<0.05
Retained Mg (%)	42	9	11	5*	14	6*	27	9*†‡	<0.001

Values shown are means ±SD standard deviation;

*Mean value was significantly different from that of the C group.

†Mean value was significantly different from that of the DM group.

‡Mean value was significantly different from that of the DM-1mgV/d group.

P<0.05. NS non-significant

Absorbed as [I-F]; absorption (%), as [(I-F)/I] x 100; retained, as [I-(F+U)]; and retained (%) as [I-(F+U)]/I x100, where I = intake, F = faecal excretion, and U = urinary excretion.

Table 2. Serum vanadium and magnesium on day 35 of the study, for control rats (C), diabetic streptozotocin rats (DM), diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/day (DM-1mgV/d), and diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/day (DM-3mgV/d).

	C (n = 9)		DM (n = 8)		DM-1mgV/d (n = 8)		DM-3mgV/d (n = 8)		P _{K-W test}
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Serum V (µmol/L)	0.045	0.004	0.12	0.009*	7.5	0.7*†	15.0	1.5*†‡	<0.001
Serum Mg (mmol/L)	0.86	0.03	0.71	0.07*	0.62	0.07*	0.50	0.06*†‡	<0.001

Values shown are means ±SD standard deviation;

*Mean value was significantly different from that of the C group.

†Mean value was significantly different from that of the DM group.

‡Mean value was significantly different from that of the DM-1mgV/d group.

P<0.05.

serum Mg compared with the diabetic group. The group treated with 3mgV/day presented lower levels of serum Mg than the control and diabetic groups.

Figure 1 shows glycaemia and serum insulin levels on day 35 in the diabetic groups. The rats treated with 1 mg V/day presented increased glycaemia, but no changes in serum insulin compared with the diabetic group. The treatment with 3 mg V/day maintained glycaemia at levels similar to those found in the control group and presented lower levels of serum insulin than in the control group.

Table 3 shows the Mg content in the muscle, kidney, liver, spleen, heart and femur on day 35. Mg content decreased in the femur in the diabetic

groups, in comparison with the control group. The diabetic group treated with 1 mgV/day presented a lower content of Mg in the spleen and femur than the control and diabetic groups. The diabetic group treated with 3 mg V/day presented a lower content of Mg in the kidney than the other diabetic groups, and a lower Mg content in the liver, spleen and femur than the control group. Table 4 shows the changes in serum albumin, uric acid, urea, total cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase, caused by the diabetes and the V treatment.

The bivariate study revealed the existence of a significant relationship, among which the following are particularly important: fasting glycaemia correlated positively with uric acid (r = 0.54,

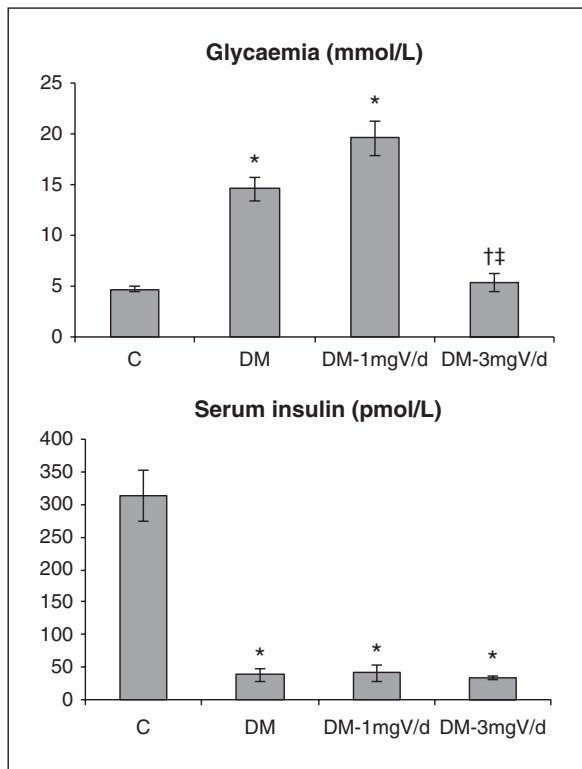


Figure 1. Fasting glycaemia and serum insulin on day 35, for control rats (C. n = 9), diabetic streptozotocin rats (DM. n = 8), diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/day (DM-1mgV/d. n = 8), and diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/day (DM-3mgV/d. n = 8). Values shown are means \pm SD standard deviation.

*Mean value was significantly different from that of the C group.

†Mean value was significantly different from that of the DM group.

‡Mean value was significantly different from that of the DM-1mgV/d group. $P < 0.05$.

$P < 0.01$), urea ($r = 0.80$, $P < 0.01$), total cholesterol ($r = 0.69$, $P < 0.01$), LDL-cholesterol ($r = 0.56$, $P < 0.01$) and triglycerides ($r = 0.59$, $P < 0.01$). Serum Mg correlated negatively with uric acid and urea ($r = -0.48$, $P < 0.05$ and $r = -0.42$, $P < 0.05$, respectively), total cholesterol ($r = -0.42$, $P < 0.05$), LDL-cholesterol ($r = -0.57$, $P < 0.01$) and triglycerides ($r = -0.53$, $P < 0.01$). Aspartate aminotransferase activity correlated positively with serum Mg ($r = 0.56$, $P < 0.01$) and alkaline phosphatase ($r = 0.64$, $P < 0.01$).

Discussion

Vanadium is a trace element associated with the regulation of glucose, improving its transport and metabolism and increasing the sensitivity of the insulin receptor [1]. Although some V compounds are currently undergoing human clinical trials [1], many aspects remain to be determined, such as its interactions with other elements. The present study was designed to obtain information on possible changes in the metabolism and distribution of Mg, and any associated alterations in biochemical parameters, following exposure to V. The results obtained reveal the existence or otherwise of interactions between these two elements in diabetic rats and could help to clarify the role of V as an anti-diabetic agent, as well as its toxicity.

The reasons for the specific doses used, and observations of toxicity problems observed in the animals thus treated, have been described in previous publications [19-21].

In the untreated diabetic rats, hyperphagia associated with diabetes led to increased intake of food and therefore of Mg. The absence of significant changes in the % absorption of Mg suggests that the increase in the net absorption of the cation in these rats is a consequence of the increased intake (table 1). Despite the increased net absorption, the sharp increase in urinary losses of Mg as a result of the polyuria caused by the altered endocrine state led to Mg retained in this group being less than in the control group (table 1), and also produced a decrease in plasma levels (table 2) [22].

The dose of 1 mg V/d did not produce any metabolic correction (figure 1), and so the behaviour of this group was similar to that of the group of untreated diabetic rats. However, serum Mg levels presented a downward trend. Previous studies performed by our research group showed that the treatment of healthy rats with 1 mg V/day also causes a decrease in serum Mg [19]. It is known that V stimulates Mg uptake in erythrocytes [14], this fact could have contributed to the hypomagnesaemia.

An earlier study [20] showed that treatment with 3 mgV/day produces a hypoglycaemic effect, normalising fasting blood glucose levels (figure 1) and food intake (table 1). Reduced intake causes a decrease in net Mg absorption, but does not modify the % absorption of Mg, which suggests that, at this dose, the changes observed in absorbed Mg

Table 3. Magnesium content in muscle, kidney, liver, spleen, heart and femur (mg/kg dry tissue) on day 35 for control rats (C), diabetic streptozotocin rats (DM), diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/day (DM-1mgV/d) and diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/day (DM-3mgV/d).

	C (n = 9)		DM (n = 8)		DM-1mgV/d (n = 8)		DM-3mgV/d (n = 8)		P _{K-W test}
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Gastrocnemius muscle	900	45	930	46	983	405	874	78	NS
Kidney	860	112	854	37	879	119	791	44 ^{††}	NS
Liver	922	123	849	130	817	111	787	35*	NS
Spleen	656	38	647	56	596	46*	600	71*	<0.05
Heart	713	67	719	106	706	51	676	79	NS
Femur	2,610	107	2,424	145*	1,869	367* [‡]	1,972	229* [‡]	<0.001

Values shown are means ±SD standard deviation.

*Mean value was significantly different from that of the C group.

[†]Mean value was significantly different from that of the DM group.

[‡]Mean value was significantly different from that of the DM-1mgV/d group.

P<0.05. NS : non-significant

Table 4. Blood parameters on day 35 for control rats (C), diabetic streptozotocin rats (DM), diabetic streptozotocin rats treated with 1 mg V/day (DM-1mgV/d), and diabetic streptozotocin rats treated with 3 mg V/day (DM-3mgV/d).

	C (n = 9)		DM (n = 8)		DM-1mgV/d (n = 8)		DM-3mgV/d (n = 8)		P _{K-W test}
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Albumin (g/L)	38	3	37	8	42	6	44	8	NS
Uric acid (μmol/L)	77	18	125	24*	262	71* [‡]	137	36* [‡]	<0.001
Urea (mmol/L)	13	2	35	5*	36	2*	26	3* [‡]	<0.001
Total cholesterol (mmol/L)	1.9	0.2	2.4	0.4*	3.8	0.2* [‡]	2.5	0.1* [‡]	<0.001
LDL cholesterol (mmol/L)	0.9	0.2	1.1	0.2 *	2.2	0.2* [‡]	1.6	0.1* [‡]	<0.001
Triglycerides (mmol/L)	0.8	0.2	1.2	0.07*	1.3	0.1*	1.1	0.08* [‡]	<0.001
Aspartate aminotransferase (U/L)	98	10	137	15*	88	11 [‡]	72	8* [‡]	<0.001
Alkaline phosphatase (U/L)	91	11	189	17*	172	21*	74	9* [‡]	<0.001

Values shown are means ±SD standard deviation.

*Mean value was significantly different from that of the C group.

[†]Mean value was significantly different from that of the DM group.

[‡]Mean value was significantly different from that of the DM-1mgV/d group.

P<0.05. NS: non-significant

are due to changes in intake, and that there are no interactions between the two elements in the digestive system.

The Mg retained in the diabetic group treated with 3 mg V/day was similar to that found in the other diabetic groups (table 1). However, serum Mg levels (table 1) were much lower than in the other groups. This fact could be explained on the basis that treatment of diabetic rats at a dose of 3 mg V/d produces higher renal losses of Mg than those found in the control group. The normalisation of the glycaemia (and consequently of the osmotic diuresis) found in diabetes could lead to

an assumption that the renal losses of Mg would improve. However, our results indicate that glycaemic control with V does not correct the renal losses of Mg observed in diabetic rats that worsen the Mg status. It has been found that V treatment of diabetic rats reduces renal Na⁺, K⁺-ATPase activity, but this does not occur in non-diabetic rats [23]. The decrease in the activity of renal Na⁺, K⁺-ATPase in diabetic rats may explain the renal losses of Mg. However, we also observed increased renal losses in both diabetic and non-diabetic rats treated with V [19]. In our opinion, in addition to the possible inhibition of renal Na⁺,

K⁺-ATPase activity, other renal processes could have been altered; for example the V may block the transport of Mg and/or alter the expression of Mg transporter proteins in the kidney.

The diabetic rats presented lower levels of Mg in the femur with respect to the control group, which could be the result of a mobilisation of the cation in order to prevent a further decline in serum levels and to maintain homeostasis of the cation [24]. This tissue is the largest reservoir of Mg in the body [25].

In the 1 mg V/day group, the mobilisation of Mg affected both the bone and the spleen. However, in the 3 mg V/day group, Mg mobilisation was observed in all of the tissues studied, although in the case of the heart, the difference was not statistically significant (*table 3*). In the latter group, the hyperphagia was corrected and intake remained similar to that of the control group, although renal excretion was higher. This situation, coupled with increased Mg uptake by erythrocytes, may have been responsible for the increased hypomagnesaemia. In our opinion, the cause of the greater mobilisation of Mg from some tissues toward the extracellular space was the need to maintain ion homeostasis.

To determine whether the hypomagnesaemia caused by the diabetes and aggravated by the V treatment (*table 2*) affected the metabolic status of the rats, we examined certain biochemical parameters related to the metabolism of Mg (*table 4*) [26]. The results obtained show that diabetes causes an increase in the levels of circulating uric acid and urea, which may be due to an increased catabolism of amino acids [27] and to the existence of kidney problems [28]. Furthermore, it has been reported that even when glycaemia is controlled with insulin, levels of urea remain significantly increased [27].

Treatment with 1 mg V/day provoked a sharp rise in the levels of both metabolites, while a dose of 3 mgV/day significantly reduced both values. However, in the latter group, the uric acid levels were similar to those found in untreated diabetic rats but higher than those of the control rats; urea levels remained above those of the control rats. Increased levels of plasma urea in diabetic rats exposed to V have also been observed when other compounds of V are used [29, 30].

Furthermore, it is known that Mg deficiency affects the metabolism of proteins and nucleic acids [26, 31, 32]. Our results indicate that diabetes produces hypomagnesaemia, which worsens

with V treatment, in a dose-related fashion. In addition, serum Mg levels correlated negatively with those of uric acid and urea (see results). This suggests that hypomagnesaemia may be involved in the above-mentioned metabolic disorders.

The mobilisation of fatty acids as a result of diabetes is known to produce alterations in lipid metabolism. It is also known that Mg deficiency alters the metabolism of lipoproteins by reducing the activity of lecithin-cholesterol acyltransferase and of lipoprotein lipase [33-35].

In the present study, diabetes was also found to increase total-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides. The treatment with 1mgV/day increased total-cholesterol and LDL-cholesterol, in comparison with untreated diabetic rats, whereas a dose of 3 mg V/day produced a downward trend in these parameters in comparison with a dose of 1 mg V/day, approaching those found in the untreated diabetic rats. In relation to the effect of V treatment on the lipid profile in diabetic rats, the literature is contradictory. Although some authors have observed increases in cholesterol [36], others have not [37], while various authors [30, 36, 38, 39] have found that in treated diabetic rats, the levels of circulating cholesterol and triglycerides tend to decrease, but in many cases the reduction is only partial. In general, the effects obtained vary greatly depending on the compound, dose, and duration of treatment. Comparing our results with those obtained with V doses close to the highest one used in our study (3 mg V/day), some authors, using a slightly lower dose, reported no changes in levels of cholesterol and triglycerides [37], and others, at a slightly higher dose, only observed a small decrease in cholesterol levels, compared to untreated diabetic rats [30]. In neither of the cases discussed were data on Mg presented.

The fact that at a dose of 3 mg V/day, levels of urea, uric acid, total-cholesterol and triglycerides tended to fall in comparison with the dose of 1 mg V/day, approaching values found in the untreated diabetic rats – despite the fact that hypomagnesaemia found in the group treated with the dose of 3 mg V/day remained higher than in the group treated at the dose of 1 mg V/day – led us to consider that the metabolic improvement found in the diabetic group treated at the highest dose tested could be related to a direct effect of V on the lipid and protein metabolism, acting not only as a hypoglycaemic agent, but also as an insulin-mimetic agent [1, 2]. Hypomagnesaemia would tend to

aggravate the metabolic alterations caused by diabetes, while the improvement in lipid and protein metabolism derived from the insulin-mimetic effect of vanadium would favour its normalisation. This would explain the fact that the higher dose reduced these values, even though the levels in the control rats were not reached.

Alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase exhibit similar behaviour patterns; diabetes increases their activity, while V treatment tends to decrease it, with a dose of 3 mg V/day causing the activity of both enzymes to fall below that of the control rats. There is no current consensus as to how V affects the activity of these enzymes. Some authors have described a partial normalisation of their activity after the exposure of diabetic rats to V [30], but others have found no such effect, or have obtained indeterminate results [29, 40]. Alkaline phosphatase is known to be an Mg-dependent enzyme [26] that is necessary for the uptake of pyridoxal-5-phosphate (vitamin B₆) by the tissues, and this vitamin is a coenzyme of aspartate aminotransferase. Furthermore, Mg deficiency is associated with decreased alkaline phosphatase activity and a deficit of vitamin B₆ [41]. In our opinion, hypomagnesaemia may also account for the decrease in alkaline phosphatase activity and thus in aspartate aminotransferase activity. The positive correlations between aspartate aminotransferase activity, serum Mg and alkaline phosphatase (see results), support this opinion.

In conclusion, under our experimental conditions, treatment with 3 mg V/day, as BMOV, to diabetic rats normalised glycaemia, but increased the renal losses of Mg, that induced tissue depletion of Mg. This effect could have partially contributed to the fact that the highest dose of V tested, failed to normalise the lipid and protein metabolism biomarkers studied. However, further studies of Mg dietary supplementation in diabetic rats are needed to determine better the effects arising from these interactions.

Disclosure

Financial support: we are grateful for support received from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Andalusian Regional Government (Project P06-CTS-01435). Conflict of interest: none.

References

1. Thompson KH, Orvig C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J Inorg Biochem* 2006; 100: 1925-35.
2. 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.
3. Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Review Article. Complementary therapies for diabetes: The case for chromium, magnesium, and antioxidants. *Arch Med Res* 2005; 36: 250-7.
4. Barbagallo M, Dominguez LJ. Magnesium metabolism in type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and insulin resistance. *Arch Biochem Biophys* 2007; 458: 40-7.
5. Barbagallo M, Domínguez LJ, Galioto A, Ferlisi A, Cani C, Malfa L, Pineo A, Busardo A, Paolisso G. Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardio-metabolic syndrome X. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 39-52.
6. 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.
7. Weglicki WB, Dickens BF, Wagner TL, Chmielinska JJ, Phillips TM. Immunoregulation by neuropeptides in magnesium deficiency: ex vivo effect of enhanced substance P production on circulating T lymphocytes from magnesium-deficient rats. *Magnes Res* 1996; 9: 3-11.
8. Petraut I, Zimowska W, Mathieu J, Bayle D, Rock E, Favier A, Rayssiguier Y, Mazur A. Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1586: 92-8.
9. Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. *Acta Diabetol* 2002; 39: 209-13.
10. 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: 134-40.
11. Curiel-García JA, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Hypomagnesemia and mortality in patients with type 2 diabetes. *Magnes Res* 2008; 21: 163-6.
12. Simental-Mendia LE, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Failure of β -cell function for compensate variation in insulin sensitivity in hypomagnesemic subjects. *Magnes Res* 2009; 22: 151-6.

M.C. BERMÚDEZ-PEÑA, ET AL.

13. Barbagallo M, Domínguez LJ, Galioto A, Pineo A, Belvedere M. Oral magnesium supplementation improves function in elderly diabetic patients. *Magnes Res* 2010; 23: 131-7.
14. Barbagallo M, Domínguez LJ, Resnick LM. Insulin-mimetic action of vanadate: Role of intracellular magnesium. *Hypertension* 2001; 38: 701-4.
15. Ścibior 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.
16. Ścibior A, Zaporowska H, Niedźwiecka I. Lipid peroxidation in the liver of rats treated with V and/or Mg in drinking water. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 619-28.
17. Ścibior 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.
18. Ścibior A, Zaporowska H. Effect of combined vanadate and magnesium treatment on erythrocyte antioxidant defence in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010; 30: 153-61.
19. Sánchez C, Torres M, Bermúdez-Peña C, 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.
20. Sánchez-González C, Bermúdez-Peña C, Guerrero-Romero F, Trenzado CE, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Effect of bis(maltolato) oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *Br J Nutr* 2012; 108: 893-899.
21. Sánchez-González C, Bermúdez-Peña C, Trenzado CE, Goenaga-Infante H, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics* 2012; 4: 814-9.
22. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 161-70.
23. Morsy MD, Abdel-Razek HA, Osman OM. Effect of vanadium on renal Na⁺, K⁺-ATPase activity in diabetic rats: a possible role of leptin. *J Physiol Biochem* 2011; 67: 61-9.
24. Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 2003; 24: 27-37.
25. 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: 577-81.
26. Durlach J. Magnesium in clinical practice. John Libbey Eurotext. Paris. 1988 pp 10.
27. Freyser EJ, Rebrin K, Schneider T. Increased urea synthesis in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic: effect of portal insulin administration and food protein content. *Diabetes* 1996; 45: 667-74.
28. Blessing OI, Olorunfoba F, Olarewaju MO. Plasma glucose, creatinine and urea levels in type 2 diabetic patients attending a Nigerian teaching hospital. *Res J Med Sci* 2011; 5: 1-3.
29. Domingo JL, Gomez M, Llobet JM, Corbella J, Keen CL. Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology* 1991; 66: 279-87.
30. Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL. Tiron administration minimizes the toxicity of vanadate but not its insulin mimetic properties in diabetic rats. *Life Sci* 1992; 50: 1311-7.
31. Günther T, Vormann J, Förster R. Functional compartmentation of intracellular magnesium. *Magnes Bull* 1984; 6: 77-81.
32. Rico MC, Lerma E, Planells E, Aranda P, González JL. Changes in the nutritive utilization of protein induced by Mg deficiency in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1995; 65: 122-6.
33. Rayssiguier Y. Magnesium, lipids and vascular diseases. *Magnesium* 1986; 5: 182-90.
34. Rayssiguier Y. Lipoprotein metabolism: Importance of magnesium. *Magnes Bull* 1986; 8: 186-93.
35. Gueux E, Mazur A, Cardot P, Rayssiguier Y. Magnesium deficiency affects plasma lipoprotein composition in rats. *J Nutr* 1991; 121: 1222-7.
36. Al-Bayati MA, Giri SN, Raabe OG. Time and dose-response study of protein, cholesterol, glucose, calcium and inorganic phosphate. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1990; 10: 206-13.
37. Majithiya JB, Balaraman R, Giridhar R, Yadav MR. Effect of bis[curcumino]oxovanadium on non-diabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elem Med Biol* 2005; 18: 211-7.
38. Ramachandran B, Subramanian S. Amelioration of diabetic dyslipidemia by macrocyclic binuclear oxovanadium complex on streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2005; 272: 157-64.
39. Tas S, Sarandol E, Ziyank S, Ayvalik SZ, Dirican M. 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: 276-83.
40. Macara IG. Vanadium - an element in search of a role. *Trends Biochem Sci* 1980; 5: 92-4.
41. Planells E, Lerma A, Sánchez-Morito N, Moreno MJ, Aranda P, Llopis J. Effect of magnesium deficiency on vitamin B2 and B6 status in the rat. *J Am Coll Nutr* 1997; 16: 352-6.

5. –DISCUSIÓN

El vanadio es un elemento traza ampliamente distribuido en la naturaleza, esencial para algunas formas de vida, pero su papel como micronutriente, su esencialidad y su actividad biológica y farmacológica no se encuentran completamente establecidas. Dicho elemento se asocia con la regulación, incremento del transporte y metabolismo de la glucosa, así como con el aumento de la sensibilidad al receptor de la insulina. Debido a los altos niveles de vanadio presentes en el medio ambiente, su amplio uso industrial, su frecuente empleo como suplemento por diferentes tipos de atletas (fundamentalmente culturistas) (Barceloux et al, 1999) y al creciente interés por sus efectos farmacológicos, el estudio del metabolismo del vanadio constituye actualmente una importante área de investigación (Domingo et al, 1991; Oster et al, 1993; Domingo et al, 1995; Zaparowska et al, 1998; Thompson et al, 2006; Michibata, 2012). Aunque para algunos compuestos de vanadio se han completado los ensayos clínicos (Thompson et al, 2006), se ha recomendado que el uso de los compuestos de vanadio debe estar controlado hasta que se disponga de más información sobre sus posibles efectos tóxicos derivados de los tratamientos crónicos.

Como se ha comentado anteriormente, actualmente muchos aspectos del metabolismo del vanadio no se encuentran bien establecidos, como lo son las interacciones digestivas y metabólicas con otros elementos envueltos en la defensa antioxidante.

Según algunos autores (Thompson et al, 2006b, Kawabe et al, 2006; Yanardag et al, 2006), el vanadio al favorecer la metabolización de la glucosa, reduciría la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y en consecuencia prevendría el daño oxidativo ocasionado por la hiperglicemia. Pero muchos autores han asociado el vanadio con efectos pro-oxidantes porque altera el metabolismo de diversos elementos traza como el Mg, Fe, Cu, Zn and Se (Oster et al, 1993; Scibior et al, 2006;, 2009, 2010a, 2014; Sánchez et al, 2011, 2012, 2014 a,b). La presencia de estrés oxidativo se encuentra asociada con cambios en la producción de citocinas (Dye et al, 1999), cambios inflamatorios (Pierce et al, 1996) y la presencia de tumores pulmonares (Assem et al, 2012). Sin embargo, otros autores han sugerido que el vanadio puede actuar como inhibidor en diferentes formas de cáncer (Das et al, 2012).

Aunque existe cierto grado de información sobre interacciones entre el vanadio y selenio (Haider et al, 1998; Kumar et al, 1993; Zwolak et al, 2012) y entre el vanadio y magnesio en ratas no diabéticas (Scibior et al, 2006,2009,2010, 2012, 2014), no existe información sobre posibles alteraciones en la homeostasis del selenio y del magnesio en ratas diabéticas como consecuencia del tratamiento con vanadio, dos elementos muy relacionados con la presencia de estrés oxidativo. Además, de su relación con el estrés oxidativo, también se ha puesto de manifiesto que ambos elementos se encuentran relacionados con el metabolismo de la glucosa, y de modo similar al vanadio, participan en el control del metabolismo de la glucosa favoreciendo la activación de kinasas del receptor de la insulina la translocación del transportador GLUT 4 en las ratas diabéticas.

De acuerdo con los comentarios anteriores, en el presente estudio nos planteamos profundizar en el efecto de la exposición a vanadio en ratas sanas, y aportar nuevos datos sobre si el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas alteraba la homeostasis del selenio y del magnesio, además, dada la ausencia de publicaciones sobre este tema, también consideramos de interés estudiar si el tratamiento podría afectar a los cambios en el metabolismo del magnesio ocasionados por la DM.

Para la realización del estudio se seleccionó el bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV), porque se ha sugerido que dicho compuesto es más efectivo como hipoglucemiante, mejor tolerado y menos tóxico en los modelos animales que los compuestos inorgánicos de vanadio (Caravan et al, 1995; Thompson et al, 2006b). Además, es un compuesto estable en soluciones acuosas (Caravan et al, 1995).

El desarrollo del trabajo se ha realizado en dos fases:

1. En la primera fase se estudió la influencia de la exposición de ratas sanas al BMOV sobre la homeostasis del selenio y magnesio.
2. En una segunda fase se estudiaron los cambios en la homeostasis del selenio y magnesio ocasionados por el tratamiento con BMOV a ratas a las que se les ha inducido una DM tipo I mediante tratamiento con STZ.

Queremos destacar que para la realización de la primera fase (estudios realizados en ratas sanas) se empleo una única dosis de vanadio (1 mg V / día), mientras que para la realización de la segunda fase (estudios realizados en ratas diabéticas) se emplearon dos dosis de V (1 y 3 mgV / día), este hecho se explica porque al tratar a las ratas diabéticas con la dosis de 1 mg V / día, no obtuvimos efecto hipoglucemiante lo que nos

condujo a la utilización de una dosis mayor con la finalidad de poder asociar el efecto hipoglucemiante con los cambios en la homeostasis de ambos elementos.

La dosis empleadas en el presente estudio (1mg V / día \approx 5 mg V/ kg de peso/d y 3 mg V/ día \approx 15 mg V / kg de peso / día) son superiores a la menor dosis descrita que causa efectos adversos en la rata (0.8 mg V / kg de peso / día), pero estas dosis son bajas en comparación con las dosis utilizadas habitualmente en otros estudios y mucho menores que la LD50 (dosis letal %0 (40-90 mgV/kg peso/día) (EFSA 2004). No obstante, las dosis empleadas se eligieron cuidadosamente tras una larga revisión de los estudios realizados anteriormente y representan dosis intermedias de BMOV entre las empleadas en la bibliografía (Yuen et al, 1993; Dai et al, 1995).

En nuestro estudio se observaron la presencia de desordenes gastrointestinales en dos animales de cada uno de los grupos tratados con vanadio. Dichos animales fueron retirados del estudio. Estos desordenes gastrointestinales también han sido observados en otros estudios en ratas sanas (Scibior et al, 2006) y diabéticas (Oster et al, 1993).

El estudio ha dado lugar a diversas publicaciones entre las que destacamos por mayor relación con la Tesis que se presenta:

Sánchez C, Torres M, Bermúdez-Peña C, Aranda P, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient rats. *MagnesRes* 2011; 24: 196-208.

Sánchez-González C, Bermudez-Peña C, Trenzado CE, Goenaga-Infante H, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics* 2012; 4: 814 – 819

Sánchez-González C, Bermúdez-Peña C, Guerrero- Romero F, Trenzado CE, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Effect of bis(maltolato) oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *Br J Nutr* 2012; 108: 893-899.

Bermúdez-Peña C, López-Chaves C, Llopis J, Guerrero- Romero F, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Sánchez-González C. Aggravation by vanadium of magnesium deficiency in STZ-induced diabetic rats. *MagnesRes* 2013; 26: 74-82.

Con la finalidad de facilitar el seguimiento del estudio su discusión no se realizara siguiendo la cronología de las publicaciones, sino basándonos en los estudios realizados para cada elemento. De este modo, en primer lugar abordaremos la discusión de los resultados obtenidos sobre los cambios en la homeostasis del selenio y tanto en ratas sanas como en diabéticas, y posteriormente continuaremos con los cambios en la homeostasis del magnesio.

5. 1. Estudios sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del selenio.

5.1.1. Estudios en ratas sanas. (Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics* 2012; 4: 814 – 819; Exposure to vanadium (IV) increases levels of hepcidin mRNA and impairs the homeostasis of iron, *Acta Physiologica* 2014; 212 S 698: 66).

El selenio es un elemento traza esencial asociado a un amplio número de selenoproteínas que participan en un gran número de procesos biológicos como la defensa antioxidante, la síntesis de hormonas tiroideas, la protección contra la toxicidad debida a metales pesados, respuesta inmunitaria, etc. (Mataix y Llopis, 2009).

Existen pocos estudios en los que se relacione las acciones del vanadio y selenio en mamíferos, pero los resultados obtenidos muestran que el selenio puede interactuar con el vanadio (Zwolak et al, 2012). También se ha descrito que el selenio puede proteger contra los efectos neurotóxicos del vanadio en todas las áreas cerebrales (Haider et al, 1998) y ayudar a proteger el hígado contra los efectos tóxicos del vanadio (peroxidación lipídica y daños estructurales, cuando se suministra en combinación con el agente quelante Tiron (Srivastava et al, 2005). También se ha sugerido que el selenio puede actuar como protector contra los efectos tóxicos del vanadio en cultivos celulares de neuronas Balb/3 T3 (Zwolak et al, 2012). Además se conoce que el selenio al igual que el vanadio participa en la cadena de señalización de la insulina activando la MAP y S6 kinasas (Hei et al, 1998).

En este trabajo, nuestro objetivo fue determinar los cambios en la biodisponibilidad y distribución tisular del selenio y en la defensa antioxidante tras la exposición a BMOV en ratas sanas.

5.1.1.1. Efecto de la exposición al V (IV) sobre el peso corporal, ingesta de alimentos y agua y niveles circulantes de glucosa y leptina.

La ingesta de vanadio (1 mg V /día) como BMOV causó una reducción en la ingesta de alimentos y agua (\approx 15% y 50% respectivamente), la cual se asoció con una reducción en la ganancia de peso (\approx 20%) (Tabla 1).

Grupos	C	V
Peso corporal en el día 0 (g)	200 \pm 14	198 \pm 8
Peso corporal en el día 35 (g)	296 \pm 30	236 \pm 24 ^a
Ingesta de alimento (g/día)	15.5 \pm 2.5	13.2 \pm 1.6 ^a
Ingesta de agua (mL/día)	16.6 \pm 4.3	8.3 \pm 1.9 ^a
Ingesta de V (μ g/día)	1.01 \pm 0.2	1038 \pm 208 ^a
Leptina sérica en el día 35 (ng/L)	16.3 \pm 4.4	5.9 \pm 2.3 ^a
Glucemia en ayunas en el día 35 (mg/dL)	90 \pm 7	79 \pm 7

Tabla 1. Peso de las ratas al inicio y fin del periodo experimental e ingestas medias de alimento, agua y vanadio, en la última semana de estudio (días 28-35) y niveles circulantes de leptina y glucosa en ayunas en el día 35 de estudio. Valores medios \pm SD, C (ratas control; V (ratas expuestas a 1mgV/día). ^a C vs. V, $P < 0.05$.

Estos efectos del vanadio sobre las ingestas de alimento y agua, así como su repercusión sobre la ganancia de peso también han sido observados por otros autores en anteriores publicaciones (Oster et al, 1993; Scibior A et al, 2006). Como se muestra en la Tabla 1, el vanadio también disminuye los niveles séricos de leptina. La leptina es una adipoquina sintetizada principalmente por el tejido adiposo. Esta hormona participa en la regulación del apetito ya que reduce la ingesta de alimento y el gasto energético (Jéquier, 2002; Almanza-Perez, 2008). La menor ganancia de peso ocasionada por la ingesta de vanadio, indica la presencia de una menor masa de tejido adiposo, lo que conduciría a menores niveles de leptina sérica y a un incremento de la ingesta de alimento y peso corporal. Sin embargo, en nuestro estudio se encontró lo contrario, lo que pudo deberse a la acción directa del catión sobre el sistema nervioso central estimulando la captación local de glucosa (Meyerovitch et al, 1989).

También se ha observado que el vanadio incrementa la transducción de la señal

de la leptina (Wilsey et al, 2005). Esto podría explicar el por que niveles menores de leptina estuvieron acompañados de una reducción de la ingesta de alimento y del peso corporal. Otros autores han referido que el vanadio reduce la ingesta de alimentos pero no el peso corporal (Adachi et al, 2000).

Algunas de estas discrepancias podrían deberse a las diferentes dosis y tipos de compuestos de vanadio utilizados, así como el tiempo de duración de los experimentos descritos.

El tratamiento con 1 mg V/día no ha mostrado un efecto significate en los niveles de la glucosa en ayunas de las ratas sanas. Este hecho ha sido también observado en estudios previos (Oster et al, 1993; Majithiya et al, 2005) (Tabla 1).

5.1.1.2. Efecto de la exposición del vanadio (IV) sobre la absorción del selenio

La absorción del selenio fue calculada como la diferencia entre la ingesta y la excreción fecal del selenio. En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con vanadio ocasionó un fuerte decremento (42%) en la absorción del selenio (control 0.79 ± 0.05 vs. tratadas 0.49 ± 0.15 mg Se por día, $P < 0.01$). Creemos que este hecho es debido a la participación de varios factores. Por un lado, la reducción de la ingesta permitió una reducción en la absorción del selenio; sin embargo, el leve decremento en la ingesta (15%) no fue suficientemente para representar la caída en el selenio absorbido. Por otro lado, es conocido que el vanadio puede inhibir la actividad de Na^+/K^+ ATPasa en diferentes tejidos (Ardüser et al, 1985). La inhibición de la ATPasa podría ser uno de los mecanismos responsables de la reducción en la absorción. Además, las altas concentraciones del vanadio en el digestivo podría desplazar el selenio desde sus ligandos de unión (Nielsen, 1996), favoreciendo así una reducción en la absorción del selenio.

Estos resultados muestran que, a nivel del aparato digestivo, el tratamiento tiene un importante efecto negativo en la absorción del selenio de las ratas sanas.

5.1.1.3. Efecto de la exposición al vanadio (IV) sobre parámetros hematológicos y distribución del selenio en los tejidos.

Actualmente existen discrepancias en relación a los cambios hematológicos provocados por el tratamiento con vanadio en ratas no diabéticas. Algunos autores han encontrado que estos valores disminuyen (Zaparowska et al, 1998; Scibior et al, 2006) mientras que otros, utilizando altas dosis de BMOV (9.2 mg V por kg peso/día) por periodos prolongados (12 semanas) no han observado tales cambios (Dai et al, 1995). Se ha indicado que el vanadio produce cambios peroxidativos en la membrana eritrocitaria reduciendo la deformidad eritrocitaria lo que favorecería la hemólisis. También se ha sugerido que el tratamiento puede provocar un desorden en la eritropoyesis y la maduración eritrocitaria (Zaparowska et al, 1998; Scibior et al, 2006).

En nuestras condiciones experimentales las ratas sanas expuestas al BMOV también presentaron una tendencia a la reducción en el número de eritrocitos y de hemoglobina (Fig. 10).

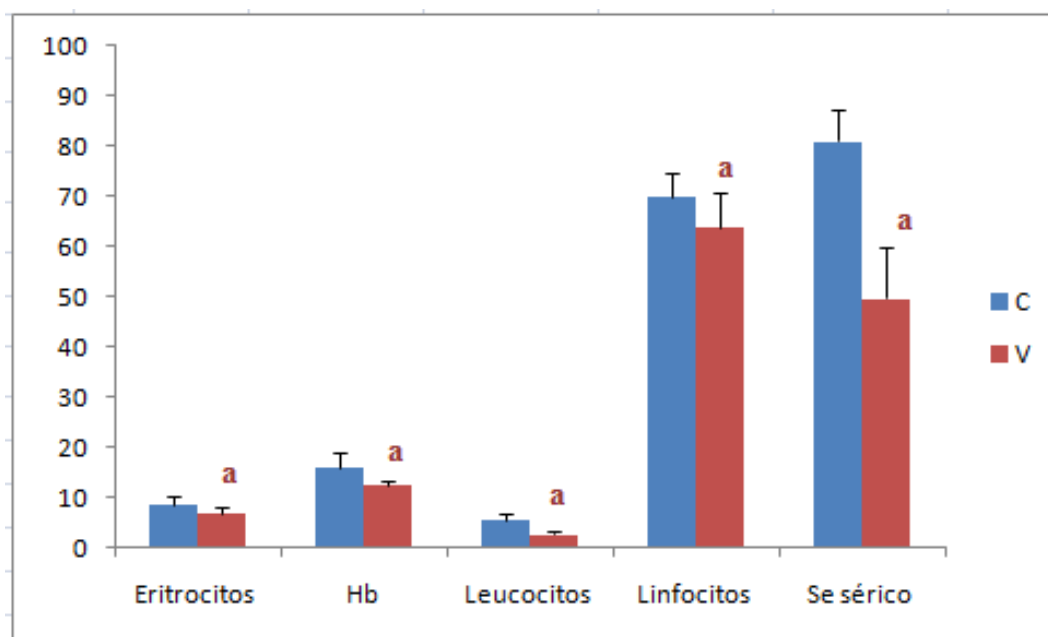


Figura 10.- Parámetros hematológicos y contenido de selenio sérico.

Grupo control (C); grupo tratado con 1mg de V por día (V). (a) P<0.05

Eritrocitos ($\times 10^6 \text{ mm}^{-3}$); Hb (g dl^{-1}); Leucocitos ($\times 10^3 \text{ mm}^{-3}$); Linfocitos (%); Se sérico (mg l^{-1}).

El decremento en los linfocitos pareció deberse principalmente a la leucopenia provocada por el vanadio. No obstante, no existe consenso sobre como el vanadio afecta al número de leucocitos (Domingo et al, 1995; Zaparowska et al, 1998; Scibior et al, 2006).

En cuanto a la concentración del selenio en los tejidos, el tratamiento provocó un fuerte descenso en el contenido de selenio sérico (Fig. 10), riñones e hígado (Fig. 11). Sin embargo, el contenido de selenio en el fémur, corazón incremento ligeramente y permaneció sin cambios en el músculo y el tejido adiposo. En nuestra opinión, la reducción de la absorción podría ser el principal factor responsable de la depleción del selenio en los tejidos. Sin embargo, el hecho de que la depleción fue medida en el riñón e hígado, órganos con altas concentraciones de selenio (Navarro-Alarcón et al, 2008) y donde mayormente se acuso el incremento del contenido del vanadio (Sánchez et al, 2011) nos permitió suponer que el vanadio provocó un desplazamiento del selenio desde sus ligandos de unión en estos tejidos, agravando la depleción tisular.

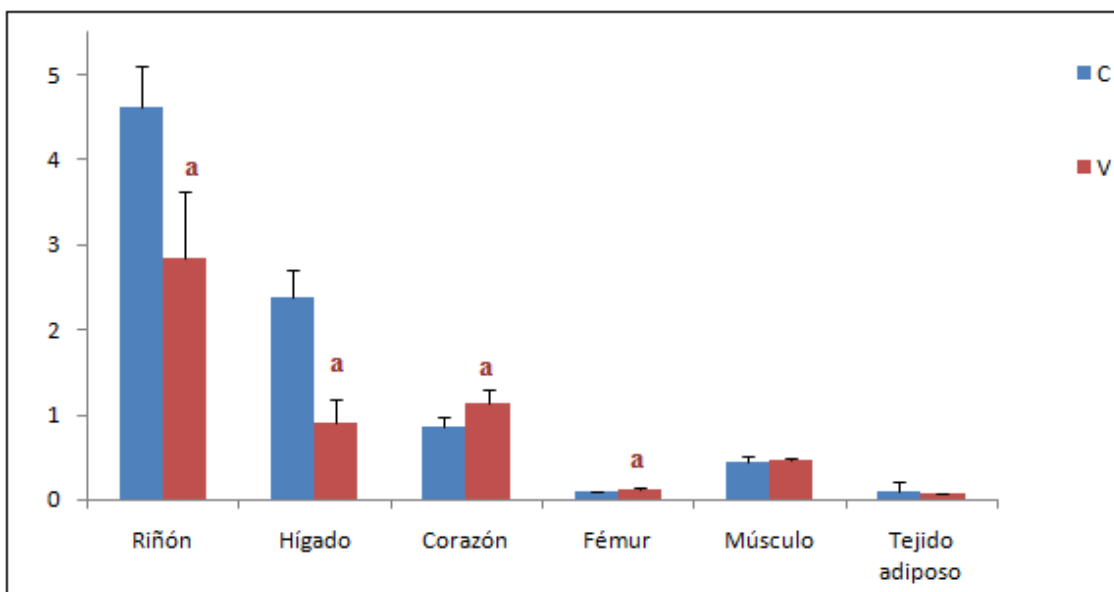


Figura 11.- Contenido de selenio en riñones, hígado, corazón, fémur, músculo gastrocnemio y tejido adiposo (mg / kg de tejido seco) en el día 35. Grupo control (C); grupo tratado con 1mg de V por día (V).
(a) P<0.05

Los resultados del análisis bivariado confirmó la existencia de una fuerte relación inversa entre la ingesta de vanadio y los niveles séricos del selenio ($r = -0.888$; $p < 0.001$), del contenido de selenio en riñón ($r = -0.821$; $p < 0.001$) y del contenido de selenio en el hígado ($r = -0.929$; $P < 0.001$).

5.1.1.4. Efecto de la exposición al vanadio (IV) sobre parámetros relacionados con la defensa antioxidante y con la respuesta inflamatoria.

Con el fin de determinar si la depleción tisular del selenio afecta el estado antioxidante, determinamos la capacidad total antioxidante (CTA) del suero y la actividad de cuatro enzimas (GPx, GST, CAT y NQO1), de peroxidación lipídica (MDA, Malondialdehído) y oxidación proteica (grupos carbonilo) en el hígado. El tratamiento disminuyó la actividad de la GPx, GST y la NQO1 (Fig. 12), no tuvo efectos significativos sobre la CTA (Fig. 13) y actividad de la CAT, y provocó un incremento en el nivel de la lipoperoxidación lipídica (MDA) y oxidación proteica (grupos carbonilo). La GPx es una selenoproteína que está relacionada con la defensa oxidativa y se encuentra muy relacionada con el estado nutricional del selenio (Hafeman et al, 1974). NQO1 es una enzima citosólica la cual cataliza la reducción de quinona, así protege las células del daño oxidativo. La actividad de la NQO1 incrementa en respuesta a xenobioticos, oxidantes, metales pesados y carcinogénesis, lo que sugiere que la enzima pudiera ofrecer protección contra el efecto toxico de estos agentes (Dai et al, 1995; Foppoli et al, 2005).

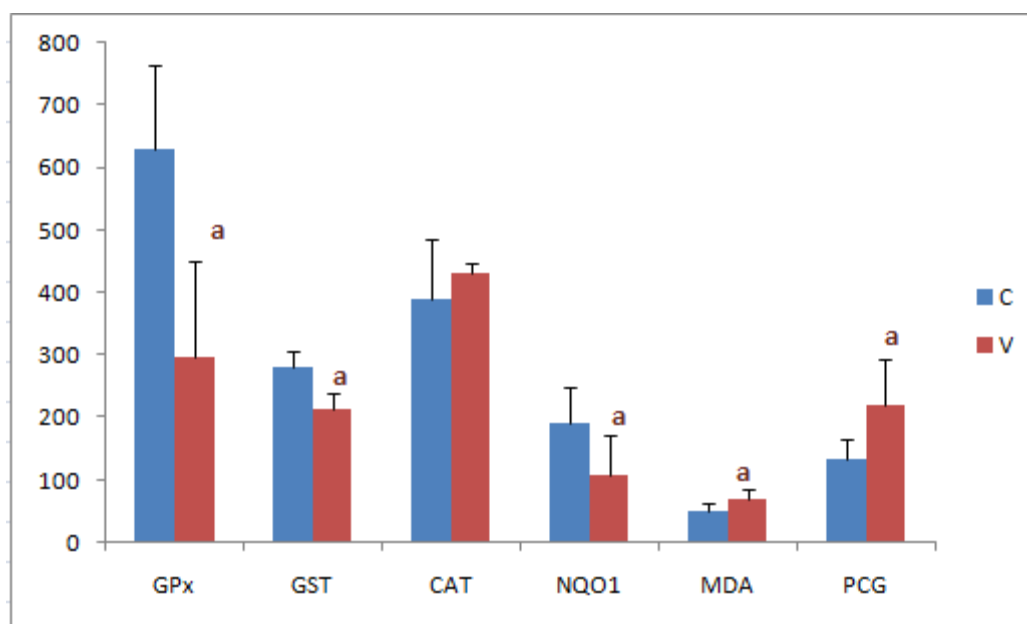


Figura 12.-Actividad de la GPx (Glutation peroxidasa) (mU mg^{-1} proteína); GST (Glutation transferasa) (mU/ mg proteína); CAT (Catalasa) (U/ mg proteína); NQO1 (NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I) (mU/ mg proteína); MDA (Malondialdehído) (nmol/ g hígado); PCG (grupos carbonilo) (pmol/mg proteína), en el hígado en el día 35 del periodo experimental. Grupo control (C); grupo tratado con 1mg de V por día (V). (a) $P < 0.05$

En anteriores estudios, también se ha observado que el tratamiento con vanadio reducía la actividad de la GPx Se-dependiente en el hígado (Oster et al, 1993), aunque en este estudio no se relaciono con el contenido hepático de selenio, y en los eritrocitos (Scibior et al, 2010b). Sin embargo, otros autores no han encontrado modificaciones en la actividad de la GPx, pero si una reducción de la actividad de la GST en los eritrocitos (Scibior et al, 2010). Las discrepancias en los resultados obtenidos por estos autores podría deberse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas en cada caso.

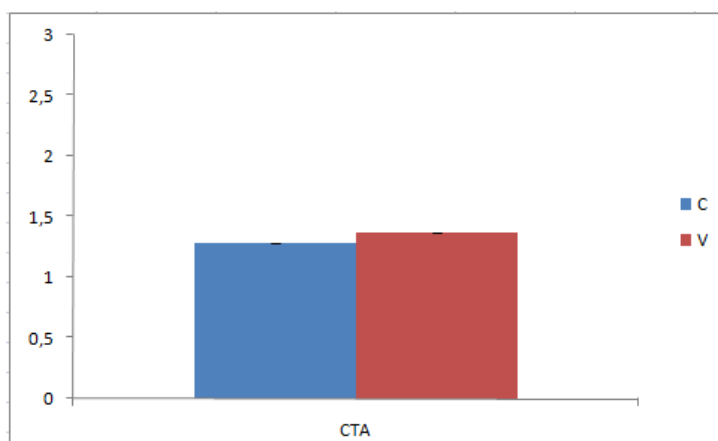


Figura 13.- Niveles séricos de la CTA (capacidad total antioxidante) (mmol/L) , en el hígado en el día 35 del periodo experimental. Grupo control (C); grupo tratado con 1mg de V por día (V). (a) $P < 0.05$

El análisis bivariado reveló que existe una alta correlación positiva entre el contenido de selenio en el hígado y la actividad de la GPx ($r = 0.873$; $P < 0.001$) y GST ($r = 0.813$; $P < 0.001$). La MDA fue inversamente correlacionada con el contenido de selenio en el hígado ($r = -0.708$; $P < 0.01$).

En nuestra opinión, la depleción del selenio pudo favorecer la reducción de la actividad de la GPx y GST.

En el estudio no observamos cambios significativos en la actividad de la catalasa hepática (CAT). Estudios previos, tampoco han observado cambios en la CAT eritrocitaria utilizando una dosis de 9mg V / kg peso corporal / 24 horas (Scibior et al, 2010c). Sin embargo, si hubo cambios cuando la dosis fue incrementada hasta 12 mg V/kg peso corporal / 24 horas (Scibioret al, 2010b) (en ambos casos el compuesto empleado fue el metavanadato sódico). En nuestro caso, la dosis utilizada fue menor que las anteriormente mencionadas (5 mg V / kg peso corporal / 24 horas).

Recientemente estudios “in vivo” con células HepG2 (Abdelhamid et al, 2010) mostraron que la exposición a vanadio (metavanadato amónico) decrementó la actividad de la NQO1. Estos autores sugieren que el vanadio inhibe la expresión génica del NQO1. Aunque hemos utilizado un compuesto diferente de vanadio y nuestros resultados fueron obtenidos “in vivo”, estos coinciden con lo anteriormente mencionado. El descenso de la actividad de los mencionados enzimas junto al incremento de la peroxidación lipídica y oxidación proteica, sugiere la existencia de un daño oxidativo hepático.

Se ha descrito la existencia una correlación inversa entre la aparición de enfermedad coronaria y un bajo nivel del selenio sérico (Arnaud et al, 2006; Navarro-Alarcon et al, 2008). Por tanto, la reducción de los niveles del selenio sérico posteriores al tratamiento con vanadio (Fig. 11) podrían favorecer el riesgo de enfermedad cardiovascular, por compromiso de la defensa antioxidante.

La presencia del estrés oxidativo se ha asociado a la respuesta inflamatoria y la exposición al vanadio se ha relacionado con la aparición de cambios inflamatorios en el tracto respiratorio (Pierce et al, 1996). La génesis de especies reactivas de oxígeno es crítica en la producción de citokinas inducidas por efecto del vanadio (Dye et al, 1999). Se ha descrito que el V^V causó un fuerte incremento de los niveles pulmonares de citokinas, que explicarían los efectos tóxicos de este metal cuando es inhalado (Ghio et al, 2005; Prophete et al, 2006; Cohen et al 2010). Nuestro grupo, en otros estudios, ha puesto de manifiesto que la ingesta de vanadio incrementa significativamente los niveles de IL-6, TNF- α . y la expresión génica de la hepcidina hepática (Sánchez-González et al, 2014a). La síntesis hepática de hepcidina se encuentra regulada a nivel transcripcional por la IL-6 (Nemeth et al, 2004b). El incremento en la producción de hepcidina mediada por el proceso inflamatorio favorece el secuestro de Fe en los tejidos, lo que limitaría la disponibilidad de hierro para la eritropoyesis y contribuiría a la aparición de anemia (Ganz et al, 2011; Sánchez-González et al, 2014a).

En nuestro estudio, el vanadio causa la aparición de una anemia moderada (Fig. 10), resultados que está de acuerdo con estudios anteriores (Scibior et al, 2006, 2012).

Aunque la estimulación de la producción de hepcidina por IL-6 se está bien definida, no podemos olvidar que otros efectos derivados de la producción de especies reactivas de oxígeno e inflamación pueden haber contribuido a la aparición de la anemia, como la reducción de la vida media de los eritrocitos debida a la hemólisis, la activación de macrófagos y el descenso de la eritropoyesis debida a un efecto directo de las citocinas sobre los precursores de los eritrocitos junto a una inhibición parcial de la eritropoyetina (Ganz et al, 2011).

5.1.2. Estudios en ratas diabéticas (Effect of bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. British Journal of Nutrition, 2012; 108: 893-899)

La DM es una patología que afecta el metabolismo de varios elementos traza, así como la actividad de enzimas relacionadas con la defensa antioxidante. Estas circunstancias junto con los cambios metabólicos inducidos por la hiperglucemia, pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad.

Se ha demostrado que el vanadio es un elemento traza asociado con la regulación del metabolismo de la glucosa (Thompson et al, 2006a). Sin embargo, hay poca información sobre las interacciones del vanadio con otros elementos en la diabetes. Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento con vanadio a ratas sanas causó una depleción tisular del selenio, la cual comprometió el estado nutricional del selenio y las defensas antioxidantes en los tejidos.

En vista de la falta de información entre las interacciones entre el Se-V en ratas diabéticas, decidimos tratar ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) en las mismas condiciones que habíamos empleado en las ratas sanas. Sin embargo, como ya se ha comentado, la falta de efecto hipoglucemiante de la dosis de 1 mg V/día, nos condujo a repetir los experimentos con dosis mayores (3mg V/día aproximadamente 15 mg V/kg de peso corporal por día) con el fin de estudiar la biodisponibilidad y distribución tisular del selenio, y su relación con algunos indicadores del estado nutricional de este elemento, antioxidantes e inflamatorios.

5.1.2.1. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ sobre los niveles de glucosa e insulina séricos.

El tratamiento con vanadio de 1mg /día (DMV) no causó cambios significativos en los niveles glucémicos durante los primeros 28 días, cuando se comparan con las ratas diabéticas no tratadas (DM). Los altos niveles de glucemia observados en el día 35 en el grupo DMV, con respecto al grupo DM, podría deberse a que la estreptozotocina puede producir un daño pancreático más severo en algunas ratas (variabilidad interindividual), y esta circunstancia se pudo presentar al final del período experimental.

La dosis de 3mg V/d normalizó los niveles glucémicos en las ratas diabéticas, desde la primera semana del tratamiento. Estos resultados coinciden con los aportados en publicaciones anteriores (Majithiya et al, 2005; Qian et al, 2000; Cam et al, 1999) (Fig. 14).

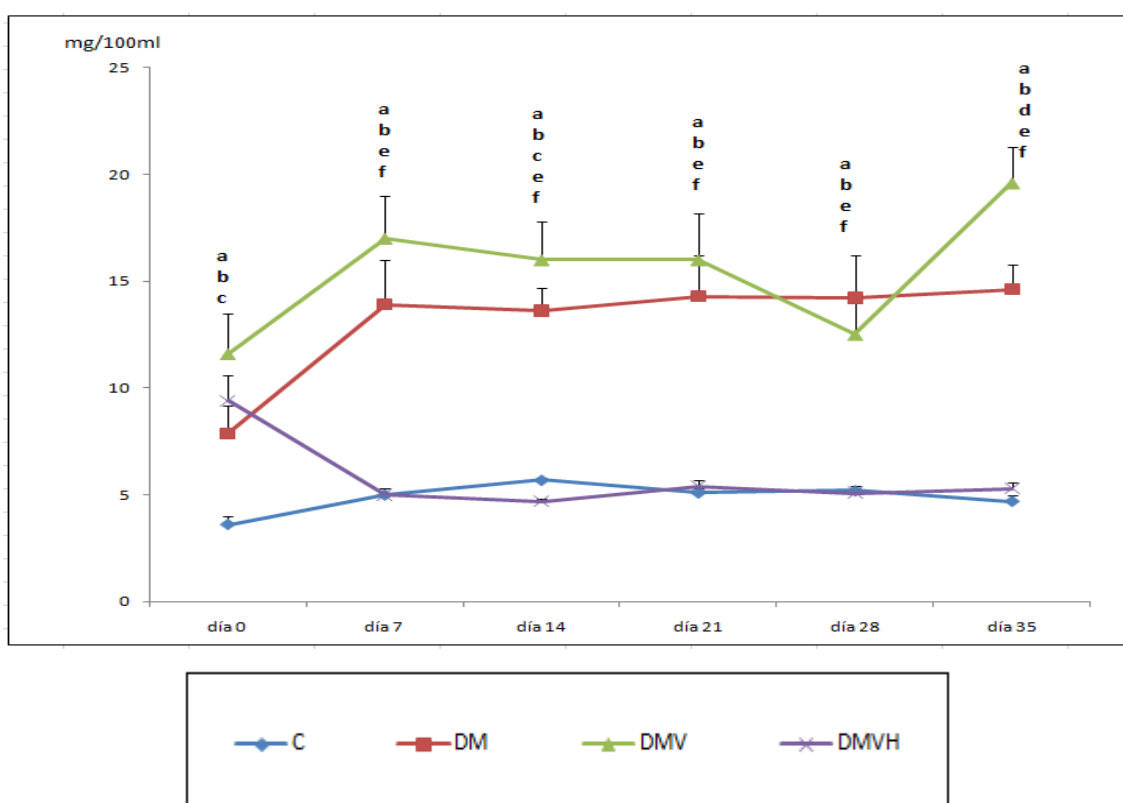


Figura 14.- Glucemia en ayunas durante el periodo experimental (mmol/l).

(a)C vs DM; (b) control vs DMV; (c) control vs DMVH; (d) DM vs DMV; (e) DM vs DMVH; (f) DMVvs DMVH. P<0.05.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

No obstante, algunos autores han observado que aunque el vanadio ejerce un efecto hipoglucemiante, los niveles glucémicos normales no fueron alcanzados (Yanardag et al, 2006; Oster et al, 1993; Facchini et al, 2006; Tas et al, 2007). Esto podría deberse a varios factores: como es el uso de diferentes compuestos y dosis del vanadio, la duración de los ensayos, la metodología empleada para determinar los niveles de glucosa, la respuesta a la dosis de estreptozotocina utilizada o la variabilidad en los animales.

Las ratas diabéticas presentaron un nivel de insulinemia inferior al observado en el grupo control, debido a la destrucción de las células beta causada por la estreptozotocina. El tratamiento con vanadio, independientemente de la dosis aplicada, no tuvo efectos en los niveles séricos de insulina (Fig. 15).

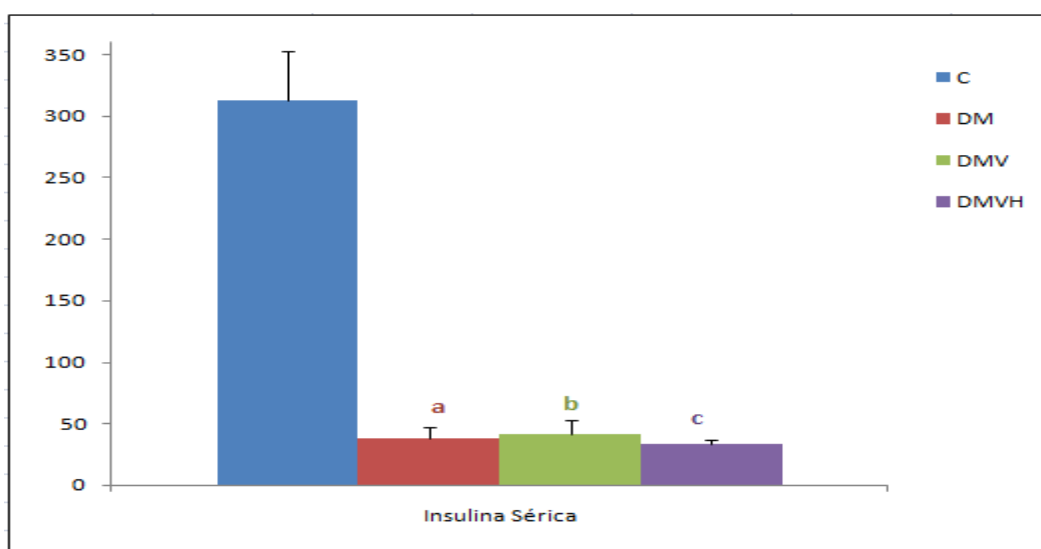


Figura 15.- Insulina sérica (ng/mL) en el día 35 del periodo experimental. (a) Valores significativamente diferentes al grupo control (C); (b) Valores significativamente diferentes al grupo de ratas diabéticas-STZ (DM); (c) Valores significativamente diferentes al grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día (DMV). $P < 0.05$.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

5.1.2.2. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre el peso corporal, ingesta de alimentos y agua y niveles circulantes de leptina.

En las ratas diabéticas control (no tratadas) (DM) no se apreció un incremento del peso corporal significativo durante el periodo experimental (Fig. 16), debido al hipercatabolismo que acompaña a la enfermedad, aunque las ratas presentaron polidipsia y polifagia.

La ratas diabéticas tratadas con vanadio (grupos DMV y DMVH) no presentaron cambios significativos en el peso (Oster et al, 1993) (Fig. 16), aunque la ingesta de alimentos disminuyó con el tratamiento, siendo dicho descenso paralelo al incremento de la dosis de vanadio y alcanzando valores similares al grupo de ratas control en el caso de la dosis de 3mg V/d (Fig.17).

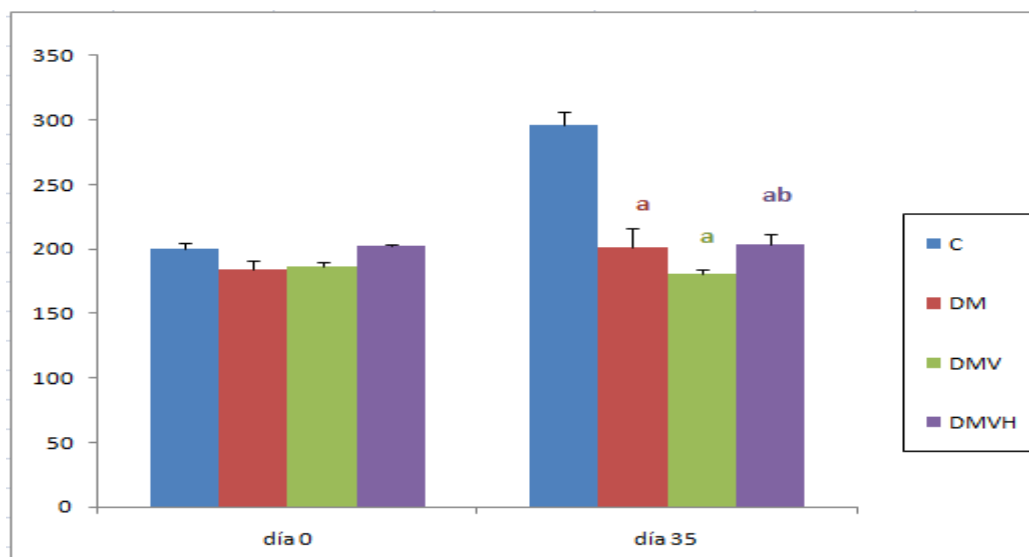


Figura 16.- Peso corporal en los días 0 y 35 (g).

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. P<0.05.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

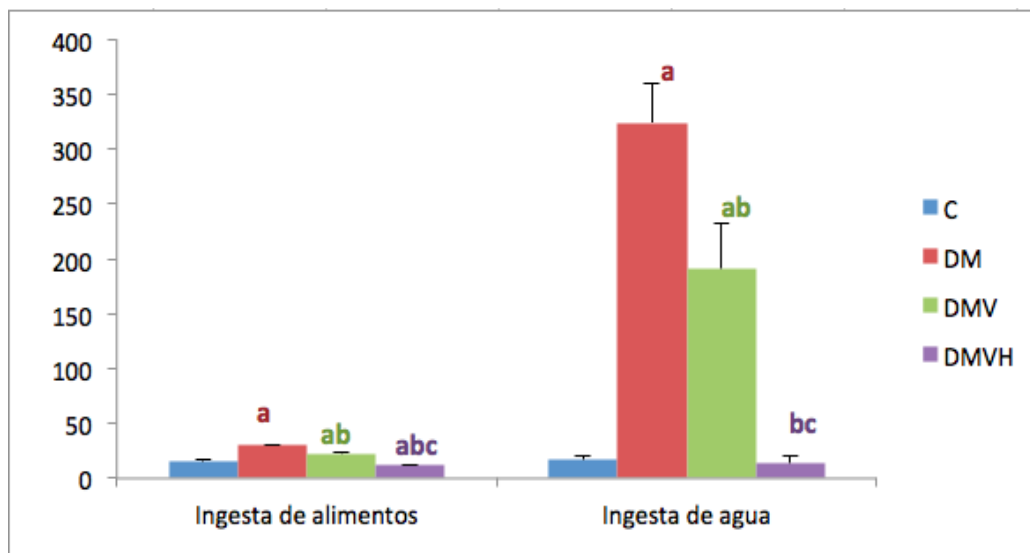


Figura 17.-Ingesta de alimentos (g/día) e ingesta de agua (mL/día) durante el periodo experimental.

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. P<0.05.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

El descenso de los niveles séricos de leptina (Fig. 18) en las ratas diabéticas-STZ (DM), probablemente causado por las pérdidas de peso corporales, debería haber causado un fuerte incremento del apetito dirigido a restaurar los depósitos corporales de energía y ser el responsable de la hiperfagia presente en este grupo (Kirel et al, 2000). Como se ha comentado la leptina es una adipokina que participa en la regulación del apetito y que es sintetizada principalmente en el tejido adiposo.

Del mismo modo que ocurre con las ratas sanas el tratamiento con 1 mg V/día (DMV) produce una reducción de los niveles séricos de leptina, de las ingestas de alimento y agua y del peso corporal, cuando comparamos este grupo con las ratas control. Estos resultados confirman los obtenidos en las ratas sanas (anteriormente descritos) y la hipótesis de que se han podido deber a la acción directa del catión sobre el sistema nervioso central incrementando la transducción de la señal de la leptina (Wilsey et al, 2006).

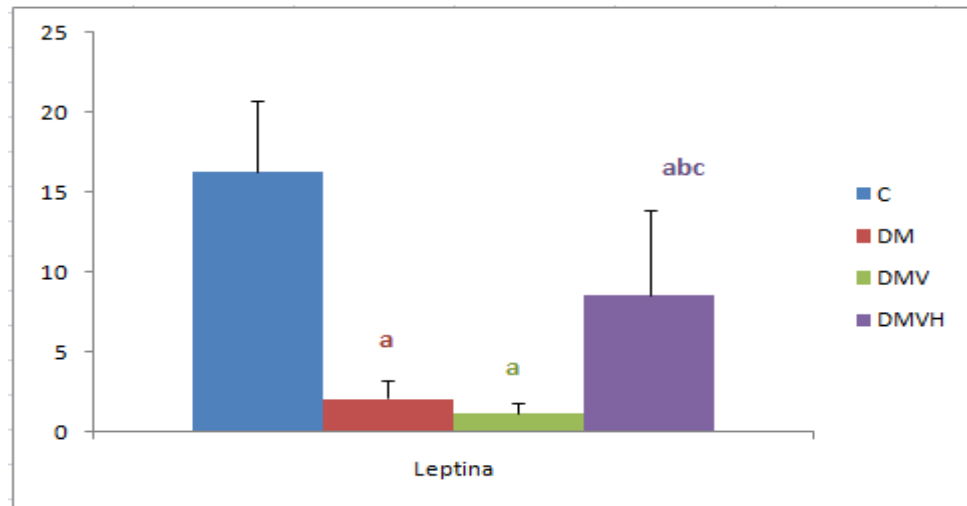


Figura 18.-valores séricos de leptina (ng/L) en el día 35 del periodo experimental.

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

El tratamiento con 3 mg V/día (DMVH) disminuyó las ingestas de alimento y agua (redujo la hiperfagia y polidipsia) e incremento los niveles circulantes de leptina aproximándose a los valores controles (Fig. 18). Estos hechos ponen de manifiesto que dicha dosis tuvo un claro efecto antidiabético. Los mayores niveles de leptina podrían explicar la reducción de las ingestas de alimento y agua cuando se comparan con los grupos DM y DMV. Sin embargo, la ganancia de peso en este grupo fue similar a la observada en los grupos DM y DMV. Por tanto, las ratas del grupo DMVH tenían una masa adiposa similar a la de los grupos DM y DMV. Como se ha mencionado anteriormente, la secreción de leptina se encuentra directamente relacionada con la masa de tejido adiposo, pero también se conoce que una gran proporción de la variabilidad interindividual en los niveles circulantes de leptina es independiente de la grasa corporal (Jéquier, 2002). Se sabe que la secreción de leptina se encuentra regulada por mediadores inflamatorios (Likuni et al, 2008). Los niveles de leptina incrementan tras la exposición a citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 y IL-6 (Li et al, 2006.) y, a la vez, la producción de leptina facilita la secreción de citocinas proinflamatorias (Likuni et al, 2008).

	C	DM	DMV	DMVH	P _{test}
PCR (mg/L)	2.0±0.4	2.1±0.3	5.9±0.8 ^{a, b}	5.3±1.2 ^{a, b}	<i>P</i> < 0.001
IL-1β (pg/mL)	56±28	51±25	65±54	80±42	NS
IL-6 (pg/mL)	127±69	69±22	139±51 ^b	240±78 ^{a, b, c}	<i>P</i> < 0.01
TNF-α (pg/mL)	7.7±2.0	7.1±3.9	10.7±3.1	9.9±4.9	NS

Tabla 2.- Niveles séricos de proteína-C reactiva (PCR), interleukina-1β (IL-1β), interleukina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en el día 35. Valores medios ± SD; ^(a) Valores significativamente diferentes al grupo control (C); ^(b) Valores significativamente diferentes al grupo de ratas diabéticas-STZ (DM); ^(c) Valores significativamente diferentes al grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día (DMV). *P*<0.05.

En nuestra opinión, el fuerte incremento de los niveles circulante de IL-6 producidos por la dosis de 3 mg V/día (Tabla2), podrían haber causado el incremento de la secreción de leptina, aunque la masa de tejido adiposo de las ratas de este grupo fue similar a las de los grupos DM y DMV. Además, el incremento de la secreción de leptina podría haber favorecido el efecto hipoglucemiante del vanadio, ya que la leptina también mejora la tolerancia a la glucosa (Jéquier, 2002).

5.1.2.3. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre la absorción, retención y contenido de selenio en tejidos.

La diabetes (DM) incrementó los valores netos de selenio absorbido y retenido, aunque cuando se expresan como % de absorción o % de la retención, no se encuentran cambios significativos (Figs. 20 y 21). Los incrementos de los valores netos de selenio absorbido y retenido, fueron una consecuencia de las mayores ingestas de alimento (Fig. 19) y esta mayor absorción fue la responsable de los mayores niveles séricos de selenio encontrados en el grupo de ratas diabéticas (Fig. 22).

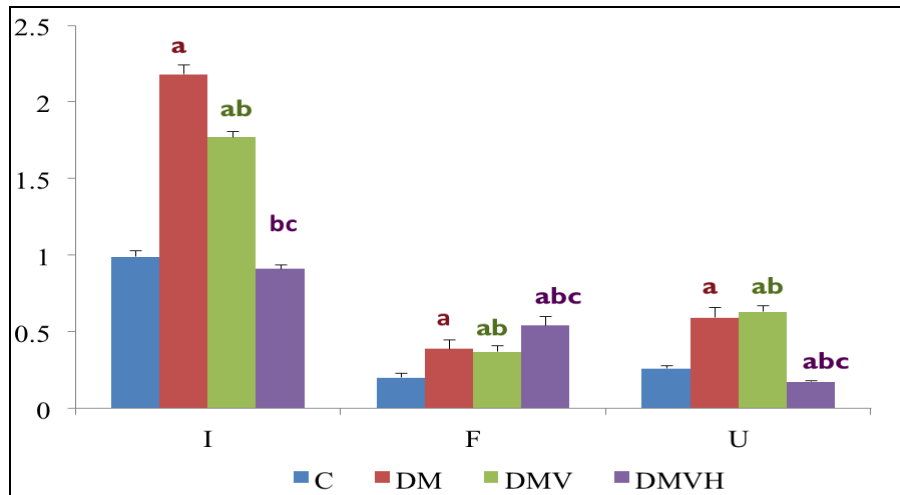


Figura 19.- Ingesta (I) (g/día), excreción fecal (F) (µg/día), y excreción urinaria (U) (µg/día) de selenio en la última semana del periodo experimental (días 28 y 35).

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. P<0.05.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

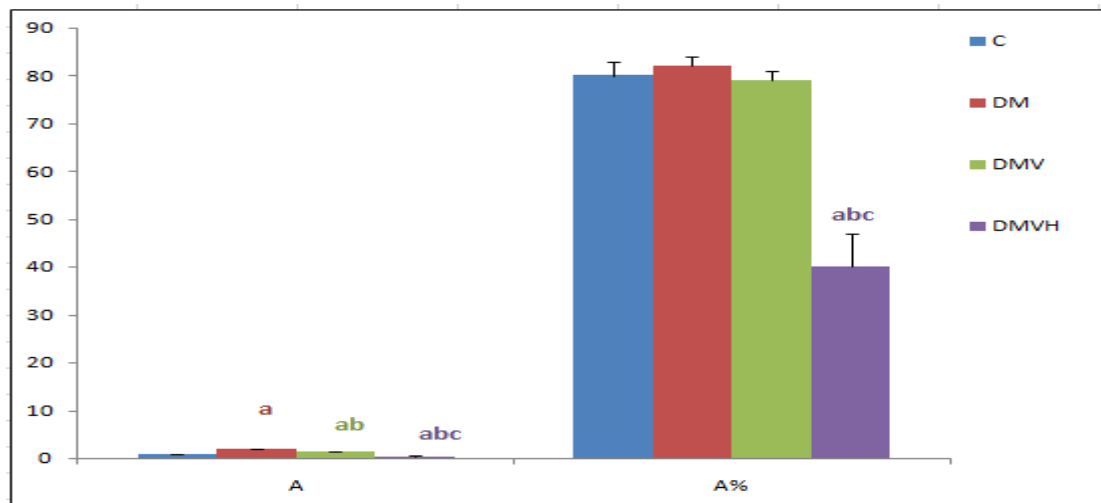


Figura 20- Selenio absorbido (A=(I- F) (µg/día) y % de absorción de Se (A%=(A/I)x100) en la última semana del periodo experimental (días 28 y 35).

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. P<0.05.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día).

El tratamiento con 1mg V/d (grupo DMV) no ejerció ningún efecto sobre la glucemia en ayunas, pero en comparación con las ratas diabéticas no tratadas (DM), hubo un decremento en la ingesta de alimento y en las cantidades netas del selenio absorbido y retenido (Figuras 20 y 21). En nuestra opinión, la menor absorción y retención del selenio en el grupo DMV pareció responder a los cambios en la ingesta de alimentos producida por el tratamiento.

La dosis de 3mg V/d (DMVH) tuvo un claro efecto antidiabético, normalizando los niveles glucémicos (Fig. 14) y reduciendo la ingesta de alimentos a niveles similares a los encontrados en el grupo control (Fig. 19).

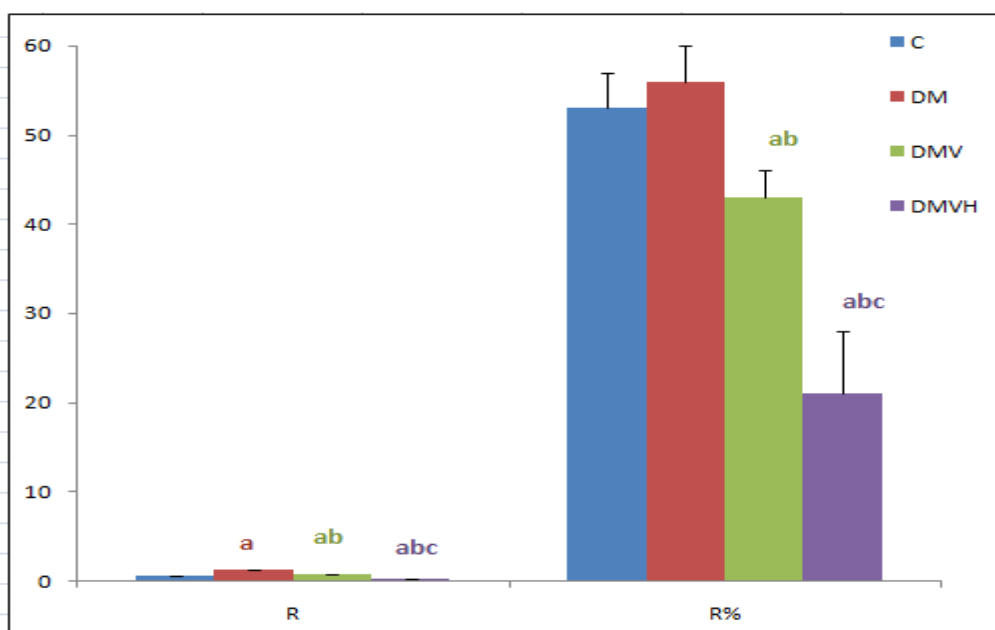


Figura 21.- Retención ($R = I - (F+U)$ (µg/día) y% de retención ($R\% = (R/I) \times 100$) del selenio en la última semana del periodo experimental (días 28 y 35).

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

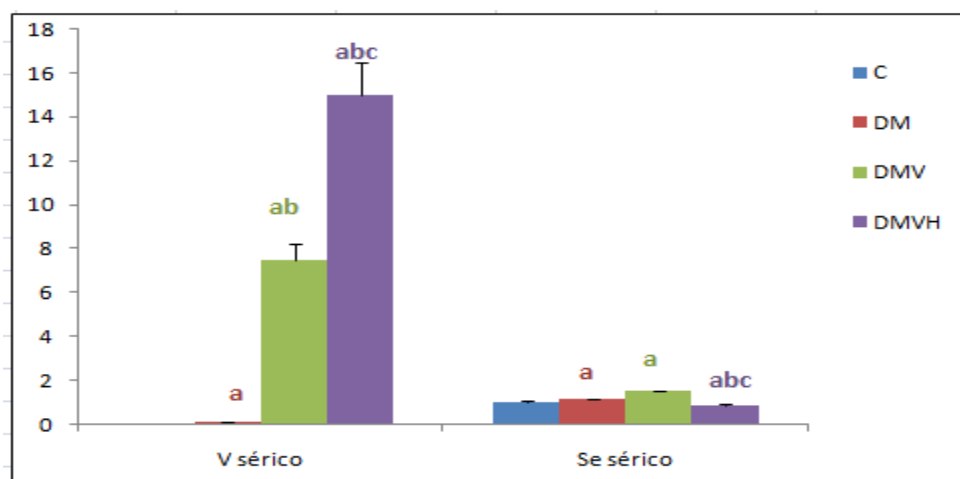


Figura 22.- Selenio y vanadio séricos en el día 35 del periodo experimental.

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

Además, a esta dosis el vanadio produjo una severa reducción en las pérdidas urinarias (Fig. 19) y de la absorción (Fig. 20). Creemos que la causa principal de esta drástica reducción en el selenio absorbido podría deberse a la reducción de la ingesta de selenio (Fig. 19). Sin embargo, la alta concentración de vanadio en el intestino pudiera también interferir con la absorción del selenio (Ardüser et al, 1985; F. H. Nielsen, 1996). Las correlaciones negativas encontradas entre la ingesta de vanadio y del selenio absorbido ($r = -0.556$; $p < 0.01$) corroboran las observaciones anteriores. La reducción de la pérdidas urinarias de selenio que se observa en este grupo (Fig. 19), pueden haber constituido un mecanismo compensador para evitar un depleción del ion. Bajo condiciones fisiológicas, la homeostasis del selenio se encuentra básicamente regulada por la excreción urinaria (Navarro-Alarcón et al, 2008; Gammelgaard et al, 2008). En nuestra opinión, la reducción de la absorción encontrada en el grupo DMVH, habría sido la causante de los menores niveles séricos de selenio en suero (Fig. 22) y en los tejidos (riñón, hígado y bazo) (Fig. 22)

El incremento de la retención corporal del selenio causada por la diabetes se explica por el incremento de los niveles séricos y del contenido de selenio en los tejidos en las ratas diabéticas (Fig. 23).

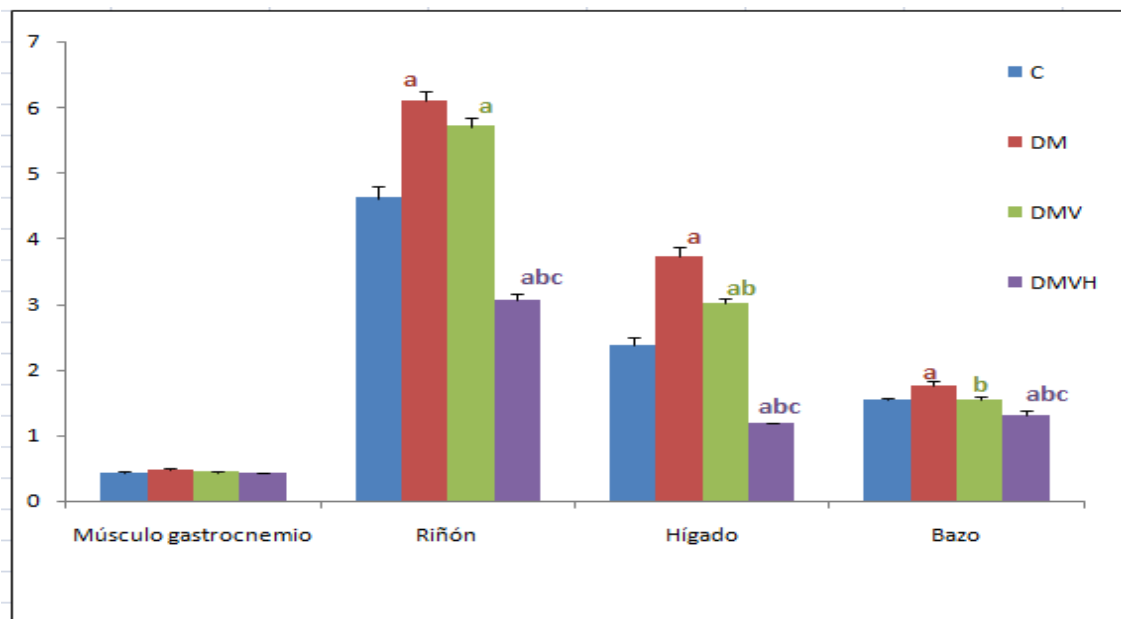


Figura 23.- Contenido de selenio en músculo gastrocnemio, riñón, hígado y bazo (mg/kg tejido seco) en el día 35 del período experimental.

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día).

Las correlaciones encontradas entre la ingesta de selenio y su contenido en los tejidos corroboran esta hipótesis. La ingesta de selenio correlacionó positivamente con el contenido de selenio en el riñón ($r = 0.790$; $P < 0.001$), hígado ($r = 0.840$; $P < 0.001$), bazo ($r = 0.593$; $P < 0.001$) y corazón ($r = 0.529$; $P < 0.01$). El selenio absorbido correlacionó positivamente con sus niveles séricos ($r = 0.870$; $P < 0.001$), contenido en el riñón ($r = 0.876$; $P < 0.001$), hígado ($r = 0.880$; $P < 0.001$), bazo ($r = 0.664$; $P < 0.001$) y corazón ($r = 0.420$; $P < 0.05$).

Pensamos que la reducción del selenio retenido es responsable del leve decremento del contenido de selenio en el hígado y el bazo.

5.1.2.4. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre el estado antioxidante.

Con el fin de determinar si la depleción tisular del selenio afectaba el estado antioxidante, estudiamos la capacidad total antioxidante del suero (CTA) y la actividad de diversas enzimas glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión transferasa (GST), catalasa (CAT) y NAD(P)H:quinona-oxireductasa-1 (NQO1), y los niveles de peroxidación lipídica (MDA, Malondialdehído) y oxidación proteica (grupos carbonilo) en el hígado. Los resultados mostraron que en las ratas diabéticas sin tratamiento (DM), los niveles de CTA disminuyeron, mientras que en el hígado, la actividad de la GPx y NQO1 incremento, que la GR permaneció sin cambios y la GST y CAT disminuyeron (Figs. 24 y 25). El incremento de la actividad de la GPx está relacionada con el mayor contenido hepático de selenio encontrado en este grupo. La GPx hepática se ha puesto de manifiesto que se encuentra altamente relacionada con el estado nutricional del selenio (Shuang-Qing Zhang et al, 2008). En relación a la GSH, en publicaciones anteriores se ha observado la presencia de bajos niveles de GSH en los eritrocitos de paciente diabéticos (Lei XG et al, 2007). En las condiciones experimentales de nuestro estudio, la degradación del GSH explicaría la reducción de la actividad de la GST encontrada en este grupo.

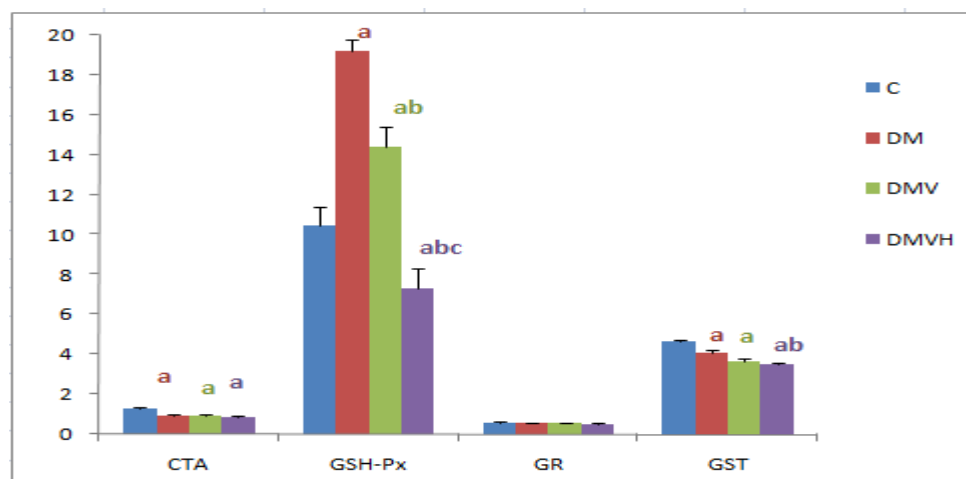


Figura 24.- Capacidad total antioxidante (CAT) (mmol/l) en el plasma y de los niveles de las enzimas: glutatión peroxidasa (GSH-Px) (μkat/g protein); glutatión reductasa (GR) (μkat/g protein), glutatión transferasa (GST) (μkat/g protein) en el día 35 del periodo experimental.

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. P<0.05.

C (control); DM (grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

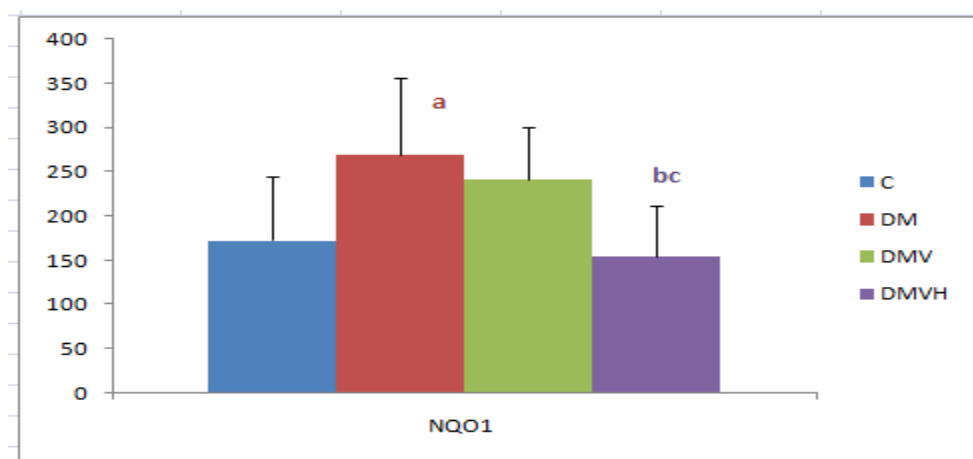


Figura 25.- NAD(P)H: quinina-oxidoreductasa-1 (NQO1) (mU/mg proteína).

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$.

C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

El tratamiento con vanadio, independientemente de la dosis empleada, no afectó la CTA (Fig. 24). Otros autores, en estudios previos (Scibior et al, 2010c), han observado que no hay cambios significativos en CTA tras el tratamiento con vanadio.

Se ha observado que la exposición al vanadio resulta en una depleción de las reservas de GSH, las cuales incrementan la vulnerabilidad de la peroxidación lipídica (Valko et al, 2005; Byczkowski et al, 1998; Cuesta et al, 2011). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el tratamiento con 1mg /día de V (DMV) a ratas diabéticas no modifica la glucemia (Fig. 14), pero produce un leve decremento en la ingesta de alimento, selenio absorbido y retenido en el hígado y bazo (Fig. 23). La disminución del selenio en el hígado va acompañada por una reducción en la actividad de la GPx (fig. 24), incrementos de la oxidación proteica hepática (grupos carbonilo) y sin cambios significativos de la peroxidación lipídica (MDA) (Fig. 26), cuando lo comparamos con el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento (DM).

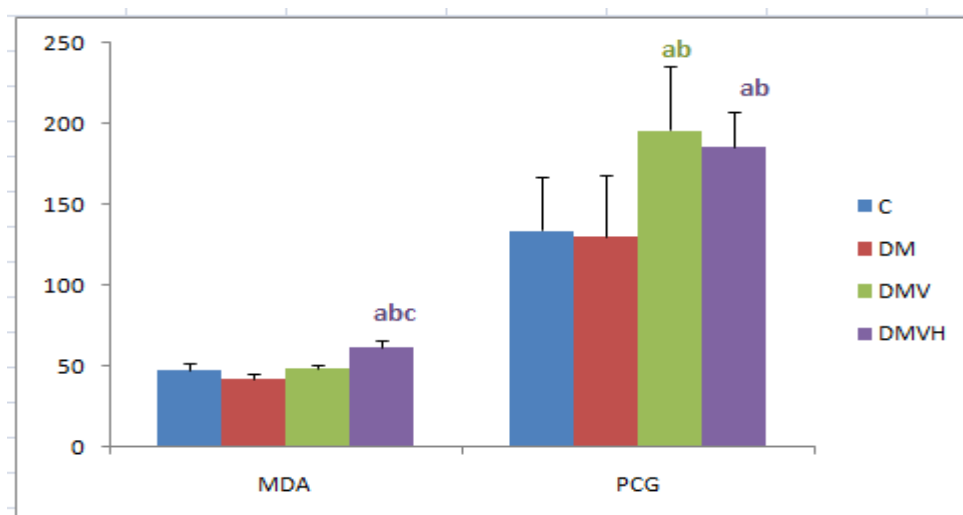


Figura 26.- Malondialdehído (MDA) (nmol/g hígado) y niveles de grupos carbonilo (pm/mg proteína). (a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$. C (control); DM (grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

El tratamiento con 3mg V/d induce un claro efecto antidiabético, normalizando la ingesta de alimentos y la glucemia en ayunas (Fig. 14 y 17). Además, produjo un descenso en la absorción del selenio y el contenido de este en varios tejidos (Fig. 20 y 23). Esta fuerte depleción del selenio en hígado podría ser responsable de la reducción de la actividad de la GPx. Diversos estudios (Oster et al, 1993; Byczkowski et al, 1998) han mostrado que la disminución de la GSH (Valko et al, 2005; Byczkowski et al, 1998; Cuesta et al, 2011) podría ser responsable de la reducción de la GST y también contribuir a la menor actividad de la GPx. Los niveles más bajos de la actividad de estas enzimas podría estar relacionado con los altos niveles de MDA y grupos carbonilo en el hígado encontrados en este grupo (Fig. 26). El análisis bivariado mostró una alta correlación positiva entre el contenido hepático del selenio y la actividad de la enzima GPx ($r = 0.941$; $p < 0.001$), y una correlación negativa con MDA ($R = - 0.529$; $p < 0.01$).

Como se ha comentado para las ratas sanas tratadas con vanadio, la presencia del estrés oxidativo se encuentra asociado a la respuesta inflamatoria y la exposición al vanadio se ha relacionado con la aparición de cambios inflamatorios. La génesis de especies reactivas de oxígeno es de gran importancia en la producción de citocinas inducidas por efecto del vanadio (Dye et al., 1999).

En este estudio hemos puesto de manifiesto que la ingesta de vanadio incrementa significativamente los niveles de PCR y IL-6 (Tabla 2). Actualmente se piensa que los incrementos de los niveles de citocinas pueden explicar, en parte, los efectos tóxicos de este metal cuando es inhalado (Ghio and Cohen, 2005; Prophete et al., 2006; Cohen et al., 2010).

Por tanto, bajo nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas causó una depleción tisular del selenio que comprometió el estado nutricional del selenio y las defensas antioxidantes en los tejidos, lo que condujo a un incremento de algunos de los parámetros antiinflamatorios estudiados.

5.2. Estudios sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del magnesio.

5.2.1. Efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del magnesio. (Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient ratas. Magnesium-Research, 2011; 24 (4): 196-208).

El magnesio juega un papel estructural y regulador muy importante en nuestro organismo. Entre sus funciones destaca el ser un ión que activa un amplio número de sistemas enzimáticos siendo esencial en el metabolismo de diversos nutrientes. Bajo el punto de vista fisiológico, las funciones del magnesio son bien conocidas y se encuentran descritas en un amplio número de publicaciones. Por otro lado, estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que, en amplios porcentajes de la población, las ingestas de magnesio en los países occidentales se encuentra por debajo de las ingestas recomendada. Además, se ha observado que la hipomagnesemia esta presente en un amplio número de la población adulta europea (Durlach 1988; Mataix et al, 2006). También es bien conocida la relación entre el déficit nutricional de magnesio, resistencia a la insulina, las alteraciones en el metabolismo y transporte de glucosa y el riesgo de desarrollar DM tipo 2 (Guerrero–Romero et al, 2002; Barbagallo et al, 2003; Lopez-Ridaura R et al, 2004; Curiel-García et al, 2008; Barragán-et al, 2008; Guerrero–Romero et al, 2008; Simental-Mendia et al, 2009; Barbagallo et al 2010), dicho mecanismo se basa en el hecho de que la reducción del magnesio intracelular inhibe la actividad de la tirosina kinasa en el receptor de la insulina, reduce la captación de glucosa, al interferir con la translocación del transportador de la glucosa (GLUT 4) y la

utilización intracelular de la glucosa. El resultado de esta situación es un incremento de la resistencia periférica a la insulina (Yeh, et al 2003). También se ha observado que el déficit de magnesio induce estrés oxidativo (Petrault et al, 2002).

El hecho de que magnesio y vanadio participen en el metabolismo de la glucosa, interviniendo en los mismos procesos, nos conduce a pensar que ambos elementos puedan estar relacionados y actúen conjuntamente en el metabolismo de los hidratos de carbono. Por tanto, el estudio de posibles interacciones entre ambos elementos, podría ayudar a clarificar el papel del vanadio como micronutriente y agente antidiabético.

5.2.1.1. Efecto de la exposición a vanadio (IV) sobre la absorción, retención y contenido de magnesio en los tejidos.

La absorción de magnesio en ratas control presenta valores semejantes a los observados en publicaciones anteriores (Lerma et al, 1993). El tratamiento con vanadio (1 mg V/día) BMOV no modificó la excreción fecal ni la absorción de magnesio (Tabla3).

	C	V
Mg Ingerido (mg/día)	6.8±0.89	5.9±0.75 ^a
Mg Fecal (mg/día)	3.53±0.93	3.44±1.11
Mg Urinario (mg/día)	0.4±0.43	1.4±1.01 ^a
Mg absorbido (mg/día)	3.3±1.23	2.4±0.95
Mg absorbido (%)	48±14.4	41±16.3
Mg retenido (mg/día)	2.9±1.64	1.0±1.47 ^a
Mg retenido (%)	43±13.2	17±14.2 ^a
Mg Serico (mg/L)	21 ± 1.0	17 ± 2.0 ^a
V sérico (µg/L)	2.4 ± 0.57	456 ± 53 ^a

Tabla 3. Utilización digestiva y metabólica del Mg en la última semana de estudio (días 28-35) y valores séricos de Mg y V en el día 35. Valores medios ± SD, C (ratas control; V (ratas expuestas a 1mgV/día). ^a C vs. V, P<0.05.

Sin embargo, el vanadio produjo un incremento de las pérdidas urinarias de magnesio, causando un descenso de la retención del catión. Estas pérdidas podrían justificar la caída de los niveles de magnesio sérico en los animales que ingieren vanadio (Tabla 2). Estos resultados nos muestran la existencia de interacciones entre el vanadio y el magnesio a nivel renal.

La menor retención de magnesio encontrada en las ratas tratadas queda reflejada, además de en los menores niveles circulantes de magnesio, en los menores contenidos de magnesio en el fémur (Tabla 4). El hueso constituye la mayor reserva corporal de magnesio y como consecuencia de la menor retención, el catión fue movilizado con la finalidad de mantener su homeostasis (Lerma et al, 1993).

	Control	V treated
Músculo	899.86±44.87	901.01±72.11
Riñón	859.59±111.72	867.82±106.83
Hígado	922.07±123.47	900.34±141.96
Tejido adiposo	19.67 ± 5.31	17.16 ± 7.08
Femur	2609.62±107.203	2130.16±312.68 ^a

Tabla 4.- Contenido de magnesio en músculo gastrocnemio, riñones, hígado, tejido adiposo y fémur (mg/ kg de tejido seco) en el día 35. Grupo control (C); grupo tratado con 1mg de V por día (V). ^aP<0.05.

Podemos concluir este apartado, diciendo que el tratamiento con vanadio a ratas sanas produce un incremento de las pérdidas renales de magnesio que conduce a un descenso de la retención del catión en el organismo, reflejado en la caída de los niveles séricos y el menor contenido de magnesio en el fémur.

5.2.1.2. Efecto de la exposición a vanadio (IV) sobre diversos parámetros bioquímicos.

Con el fin de determinar si la hipomagnesemia causada por el tratamiento y afectó el estado metabólico de las ratas, examinamos un conjunto de parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo del magnesio (Tabla 5).

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con 1mg V/d provocó un incremento de los niveles de urea. Se sabe que la deficiencia de magnesio afecta el metabolismo de las proteínas y los ácidos nucleicos (Durlach, 1988; Rico et al, 1995), lo que sugiere que la hipomagnesemia pudiera haber causado la alteración metabólica mencionada.

	C	V
Albúmina (g/L)	38±3	40±2
Ácido úrico (μmol/L)	77±18	49±15
Urea (mmol/L)	13±2	21±3 ^a
Colesterol total (mmol/L)	1.9±0.2	1.7±0.4
Colesterol LDL (mmol/L)	0.9±0.2	0.7±0.3
Triglicéridos (mmol/L)	0.8±0.2	0.6±0.3
Aspartato aminotransferasa (U/L)	98±10	100±21
Fosfatasa alcalina (U/L)	91 ± 11	77 ± 13 ^a

Tabla 5.-Niveles séricos de albúmina, ácido úrico y urea, colesterol total, colesterol LDL y actividad de la aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina del suero en el día 35. Grupo control (C); grupo tratado con 1mg de V por día (V). ^aP<0.05.

En relación al efecto del tratamiento con vanadio sobre el perfil lipídico de las ratas, en nuestro estudio se observa una ligera tendencia a disminuir sin ocasionar cambios significativos.

La actividad de la aspartato aminotransferasa no sufre cambios como consecuencia del tratamiento, sin embargo, la actividad de la fosfatasa alcalina disminuye significativamente. Actualmente no existe un consenso de cómo el vanadio afecta la actividad de dichas enzimas. (Domingo et al, 1991; Macara, 1980). La fosfatasa alcalina se sabe que es una enzima magnesio dependiente (Durlach, 1988) la cual es necesaria para el consumo de piridoxal-5 fosfatasa (vitamina B6) por los tejidos y esta vitamina es una coenzima de la aspartato aminotransferasa. También, se conoce que la deficiencia de magnesio está asociada con un decremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y una deficiencia de la vitamina B6 (Planells et al. 1997). En nuestra opinión, la hipomagnesemia podría haber influido en el descenso de la actividad de la fosfatasa alcalina, pero dicho descenso ha sido insuficiente para llegar a afectar la actividad de la aspartato aminotransferasa.

5.2.2. Estudios sobre el efecto del tratamiento con vanadio a ratas diabéticas sobre la homeostasis del magnesio. (Aggravation by vanadium of magnesium deficiency in STZ-induced diabetic rats. Magnesium-Research, 2013; 26: 74-82).

Como se ha comentado anteriormente, magnesio y vanadio son dos elementos asociados con la regulación, incremento del transporte y metabolismo de la glucosa, así como el aumento de la sensibilidad al receptor de la insulina.

Este artículo se realizó con el fin de obtener información sobre los posibles cambios en el metabolismo y distribución tisular del magnesio y parámetros bioquímicos asociados al metabolismo del magnesio, tras el tratamiento de ratas diabéticas con BMOV.

Los resultados obtenidos pueden ayudar a clarificar el papel del vanadio como agente antidiabético, así como su toxicidad.

5.2.2.1. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre la absorción, retención y contenido de magnesio en los tejidos.

En este apartado no comentaremos los resultados relativos a cambios de peso e ingesta, ya que se han realizado anteriormente en el apartado (4.1.2.2).

La ausencia de cambios significativos en el % de absorción del magnesio nos sugiere que los cambios encontrados en los niveles de magnesio absorbido en todos los grupos estudiados son una consecuencia de los cambios de la ingesta (Figs. 27 y 28).

La dosis de 1mg V/d (DMV), como se ha comentado, no produjo ninguna corrección metabólica (Figs. 14 y 17), y el comportamiento de este grupo fue similar al del grupo de ratas diabéticas sin tratamiento (DM). No obstante, los niveles séricos de magnesio presentaron una tendencia a disminuir (Fig. 30). En el apartado anterior (4.2.1.1), se ha comentado que el tratamiento en ratas sanas con 1mg V/día también causaba un decremento del magnesio sérico.

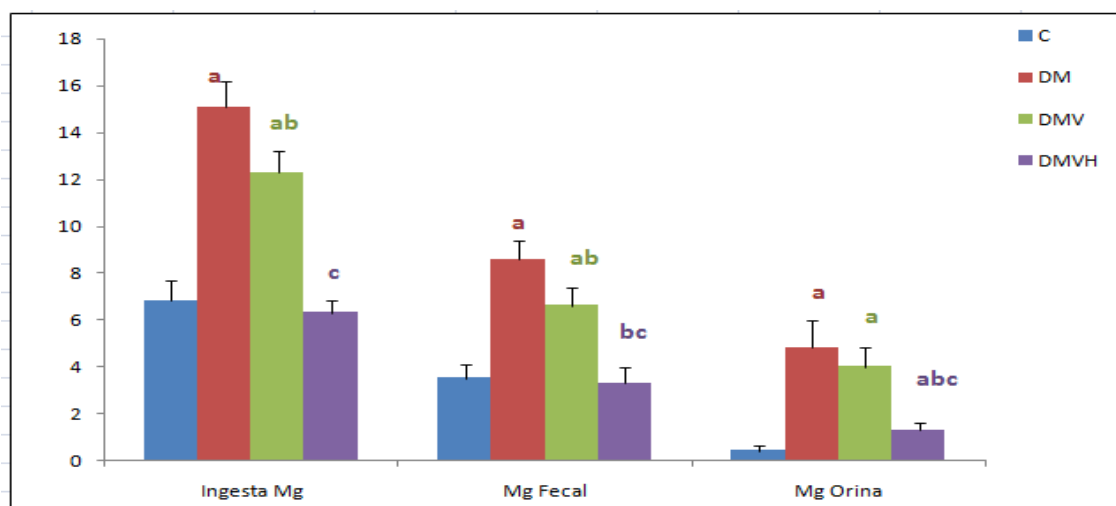


Figura 27.-Valores medios de Mg ingerido, fecal y urinario en los días 28-35 del estudio.(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. P<0.05. C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

A pesar del incremento de la absorción neta del magnesio observada en las ratas diabéticas no tratadas (DM) (fig.28),el fuerte incremento de las pérdidas urinarias de magnesio como consecuencia de la poliuria causada por el estado endocrino alterado, provocó un descenso del magnesio retenido en este grupo (Fig. 29) y además, ocasionó un decremento en los niveles plasmáticos (Abou-Seif et al, 2004) (Fig. 30).

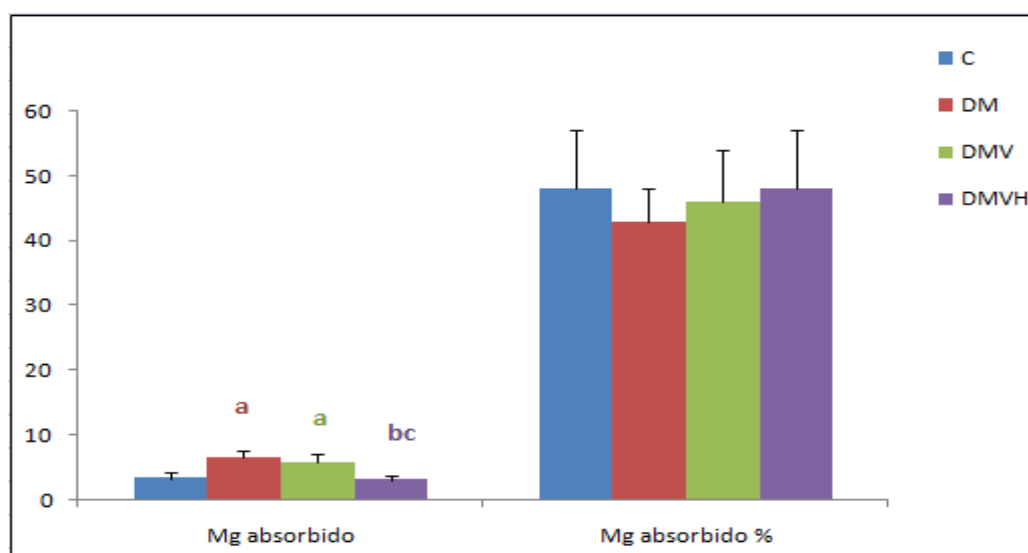


Fig 28.- Magnesio absorbido en los días 28-35 del estudio. Absorbido como (I-F): absorción (%) como $((I-F)/I) \times 100$..(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. P<0.05. C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

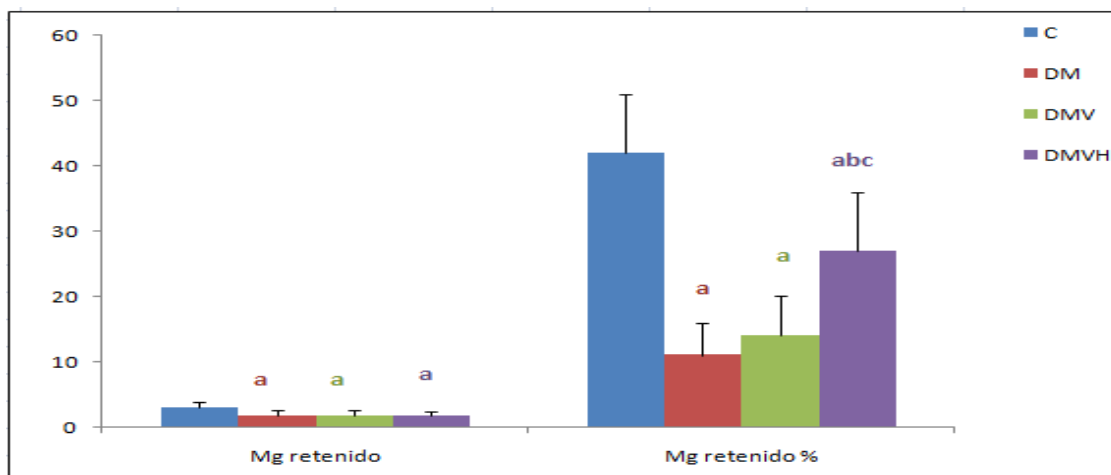


Figura 29.- Magnesio retenido en los días 28-35 del estudio. Retenido como (I-(F+U)) y retención (%) como (I-(F+U))/I x100. I= ingesta, F= excreción fecal y U= excreción urinaria. .(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV oDMVH ; (c) DMV vs DMVH. P<0.05. C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

El tratamiento con 3 mgV/d produce un efecto hipoglucémico, normalizando los niveles de glucosa al azar (Fig. 14) y la ingesta de agua y alimentos (Fig. 17). La menor ingesta estuvo acompañada de una disminución en la absorción neta del magnesio, pero no modificó el porcentaje de absorción del magnesio, lo cual sugiere, que a esta dosis, los cambios observados en la absorción del magnesio (Fig. 28) son una consecuencia de los cambios en la ingesta (Fig. 27) y que no existen interacciones entre estos dos elementos a nivel digestivo.

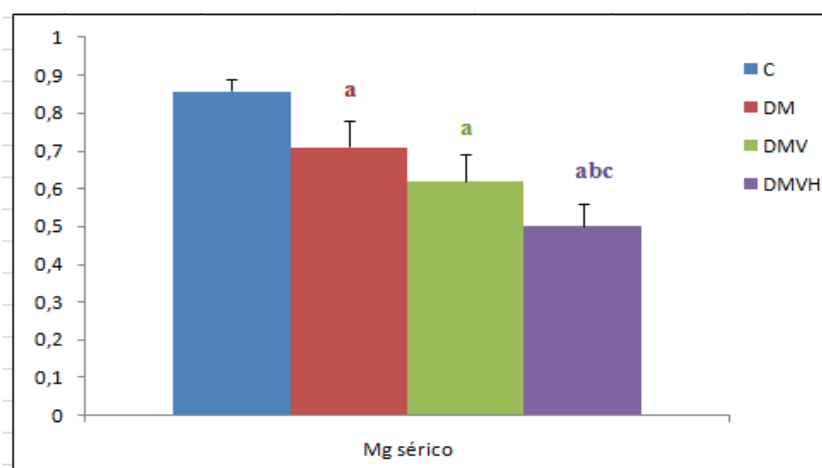


Figura 30.-Magnesio sérico en el día 35. (a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. P<0.05. C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

El magnesio retenido en el grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/d (DMVH) fue similar al encontrado en los otros grupos de ratas diabéticas (Fig. 29).

Sin embargo, los niveles de magnesio sérico fueron mucho más bajos comparados con los otros grupos (Fig. 30).

Este hecho podría explicarse sobre la base de que el tratamiento a ratas diabéticas con de 3mg V/d produjo mayores pérdidas renales de magnesio que las encontradas en el grupo control (Fig.27).

La normalización de la glucemia (y consecuentemente de la diuresis osmótica) encontrada en la DM, permitía asumir que las pérdidas renales de magnesio deberían mejorar.

No obstante, nuestros resultados indicaron que el control glucémico con esta dosis de vanadio, no corrigió las pérdidas renales del magnesio observadas en ratas diabéticas, empeorando el estado nutricional en magnesio. Se ha descrito que el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas reduce la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal, pero que esto no ocurre en ratas no diabéticas (Morsy et al, 2011).

El descenso en la actividad de la Na^+ , K^+ -ATPasa renal podría explicar las pérdidas renales de magnesio en el grupo de ratas diabéticas no tratadas (DM). Sin embargo, en este estudio, hemos observamos un incremento de las pérdidas renales en ambos grupos diabéticos (Bermudez-Peña et al, 2013) y en ratas sanas (Sánchez et al, 2011) tratadas con vanadio. En nuestra opinión, además de una posible inhibición de la actividad de Na^+ , K^+ -ATPasa, otros procesos renales podrían estar alterados, por ejemplo el vanadio podría haber bloqueado el transportador del magnesio y /o alterar la expresión de las proteínas transportadoras de magnesio en los túbulos renales.

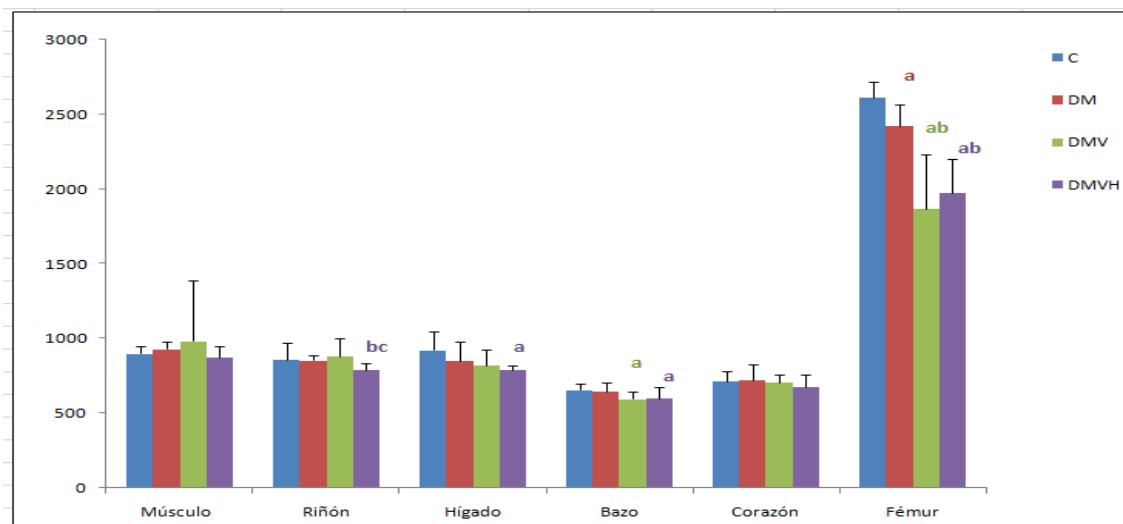


Figura 31.-Contenido de magnesio en el tejido músculo gastrocnemio, riñones, hígado, bazo, corazón y fémur (mg/kg tejido seco) en el día 35.(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$. C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

Las ratas diabéticas (DM) presentaron niveles bajos de magnesio en el fémur con respecto al grupo control, lo cual pudiera ser el resultado de una movilización del catión con el fin de evitar un descenso de los niveles séricos dirigido a mantener la homeostasis del catión (Vormann, 2003), ya que el fémur es el mayor reservorio de magnesio en el cuerpo (Lerma et al, 1995). En el grupo tratado con 1mg V/d (DMV), la movilización del magnesio afecto al hueso y bazo. No obstante, el grupo tratado con 3mg V/d (DMVH), la movilización del magnesio se observo en todos los tejidos estudiados, aunque en el caso del corazón, la diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 31). En este último grupo (DMVH), la hiperfagia fue corregida y la ingesta permaneció similar a la ingesta del grupo control, aunque la excreción renal fue mayor (Fig. 27).

Esta situación, junto con el incremento de la captación de magnesio por los eritrocitos, pudiera ser responsable del incremento de la hipomagnesemia. Pensamos que la causa de la gran movilización del magnesio desde los tejidos a través del espacio extracelular fue necesaria para mantener la homeostasis.

5.2.2.2. Efecto del tratamiento con vanadio (IV) a ratas diabéticas-STZ, sobre los parámetros bioquímicos.

Con el fin de determinar si la hipomagnesemia causada por la DM y agravada por el tratamiento con vanadio (Fig. 30) afectó el estado metabólico de las ratas, como en el caso de las ratas sanas, examinamos un conjunto de parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo del magnesio (Durlach, 1988) (Figs. 32, 33 y 34).

Los resultados obtenidos mostraron que la DM causa un incremento en los niveles de ácido úrico y de la urea circulante (Fig. 32), los cuales son debidos al incremento del catabolismo de los aminoácidos y a la posible existencia de problemas renales (Blessing et al, 2011). Además, se ha puesto de manifiesto que incluso cuando la glucemia está bajo control con insulina, los niveles de la urea permanecen significativamente elevados (Freyser et al, 1996).

El tratamiento con 1mg V/d (DMV) provocó un incremento de los niveles de ambos metabolitos, mientras que las dosis de 3mg V/d (DMVH) reduce ambos valores significativamente (Fig. 32). Sin embargo, en el último grupo, los niveles de ácido úrico fueron similares a los encontrados en el grupo de ratas diabéticas no tratadas pero mayores que en el grupo de ratas control; los niveles de urea también se mantuvieron por encima de los del grupo control.

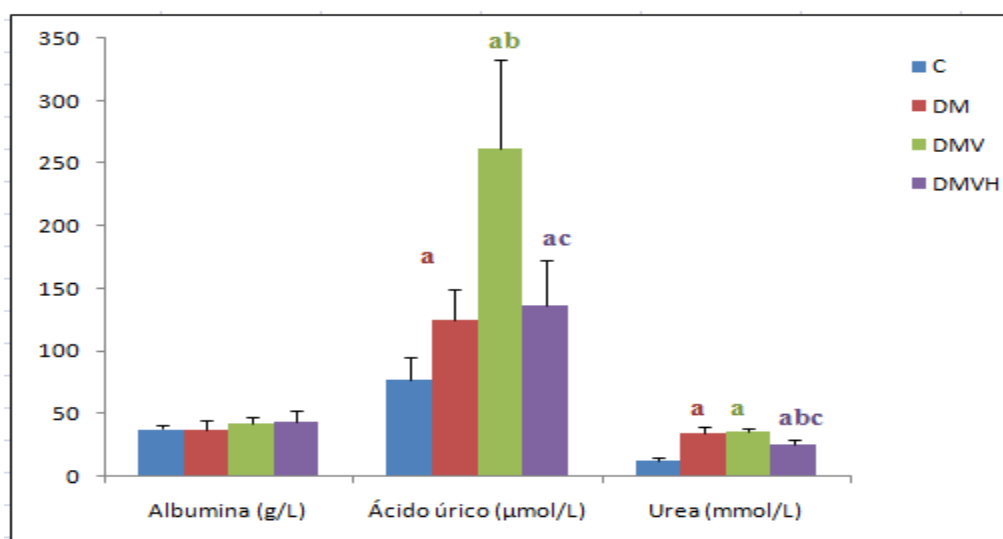


Figura 32.- Niveles séricos de albúmina, ácido úrico y urea en el día 35.(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$. C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día)

El incremento de los niveles de urea plasmática en ratas diabéticas expuestas al vanadio, también se han observado cuando se emplearon otros compuestos del vanadio (Domingo et al, 1991, 1992).

Es conocido que la deficiencia de magnesio afecta el metabolismo de las proteínas y los ácidos nucleicos (Durlach, 1988; Rico et al, 1995). Nuestros resultados indican que la diabetes produjo hipomagnesemia, la cual empeoró con el tratamiento con vanadio, existiendo una relación dosis-efecto (Fig. 30).

Además, los niveles séricos de magnesio correlacionaron negativamente con aquellos de ácido úrico ($r = -0.48$, $p < 0.05$) y urea ($r = -0.42$, $p < 0.05$). Estos resultados sugieren que la hipomagnesemia pudiera estar involucrada con los desordenes metabólicos mencionados previamente.

La movilización de los ácidos grasos como resultado de la DM, da lugar a alteraciones en el metabolismo lipídico. También se conoce que la deficiencia de magnesio altera el metabolismo de las lipoproteínas por reducción de la actividad de la lecitina-colesterol aciltransferasa y de la lipoproteína lipasa (Rayssiguier, 1986 a,b; Gueux et al, 1991)

En el presente estudio, se encontró que la DM incrementa el colesterol total, el colesterol-LDL y los triglicéridos. El tratamiento con 1mg V/d (DMV) incrementó el colesterol total y el LDL en comparación con las ratas diabéticas sin tratamiento, mientras que la dosis de 3mg V/d (DMVH) produjo una tendencia a la baja en estos parámetros en comparación con la dosis de 1mg V/d, aproximándose estos resultados a los hallados en las ratas diabéticas sin tratamiento (DM) (Fig. 33).

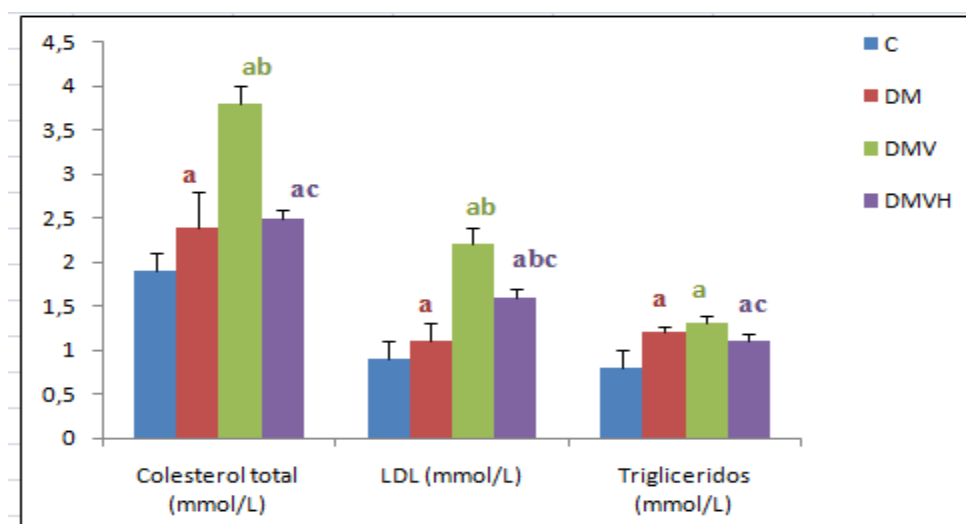


Figura 33.- Niveles séricos de colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos en el día 35.

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH. $P < 0.05$.

C (control); DM (grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día).

En relación al efecto del tratamiento con vanadio sobre el perfil lipídico de las ratas diabéticas, la literatura es contradictoria. Algunos autores han observado incrementos en el colesterol (Al-Bayati et al, 1990), otros no (Majithiya et al, 2005), mientras varios autores (Domingo et al, 1992; Al-Bayati et al, 1990; Ramachandran et al, 2005; Tas et al, 2007) han observado que el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas, mostraron que niveles de colesterol circulante y triglicéridos tienden a disminuir, pero en muchos casos la reducción es solamente parcial. En general, los efectos obtenidos varían ampliamente dependiendo del compuesto, la dosis y la duración del tratamiento.

Comparando nuestros resultados con los resultados de estudios que utilizaron dosis de vanadio cercanas a la dosis más alta de nuestro estudio (3mg V/d), algunos autores, usando una dosis ligeramente menor, no encontraron cambios en los niveles de colesterol y triglicéridos (Gueux et al, 1991), otros autores, empleando dosis ligeramente superiores, solo observaron un pequeño decremento en los niveles de colesterol (Domingo et al, 1992). En ninguno de los casos discutidos se muestran datos sobre el magnesio.

El hecho de que la dosis de 3mg V/d (DMVH), los niveles de urea, ácido úrico, colesterol total y triglicéridos tendieron a bajar en comparación con la dosis de 1mg V/d (DMV), aproximándose a los valores encontrados en ratas diabéticas sin tratamiento (Figs. 32 y 33), a pesar del hecho que la hipomagnesemia encontrada en el grupo DMVH fue mas elevada que en el grupo DMV, nos permitió pensar que la mejora encontrada a nivel metabólico en el grupo de ratas diabéticas tratadas a altas dosis, pudiera estar relacionado directamente con el efecto del vanadio sobre el metabolismo de los lípidos y las proteínas, al actuar como agente hipoglucemiante, e insulinoimético (Kawabe, 2006). La hipomagnesemia tiende a agravar las alteraciones metabólicas causadas por la diabetes, mientras que la mejoría en el metabolismo de los lípidos y proteínas derivado desde el efecto insulinoimético del vanadio favorecería su normalización. Esto explicaría el hecho de que a dosis altas estos valores se reducen, aunque no se alcancen los niveles de los del grupo control.

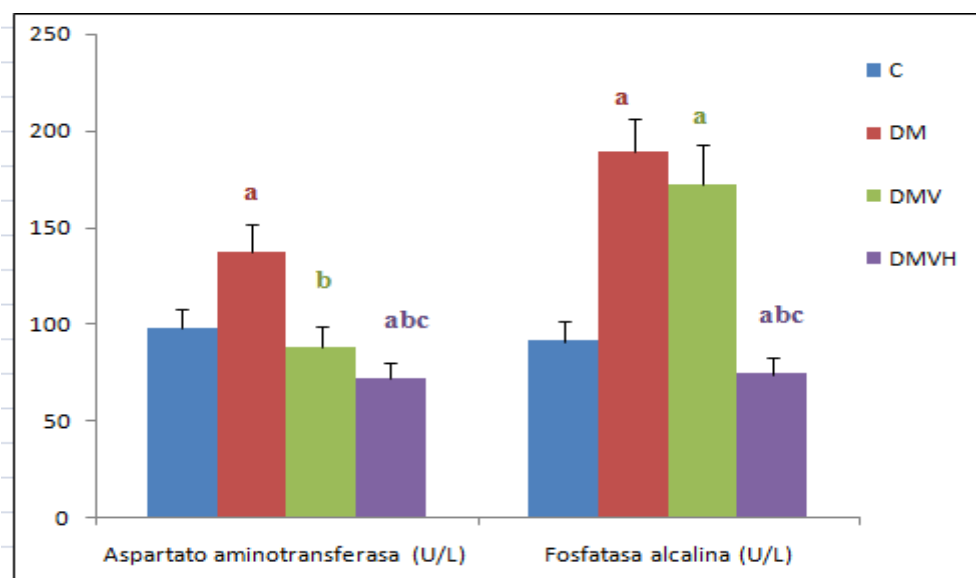


Figura 34- Actividad de la aspartato aminotransferasa y la fosfatasa alcalina en suero.

(a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH ; (c) DMV vs DMVH. P<0.05. C (control) ; DM(grupo de ratas diabéticas-STZ); DMV (grupo de ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (grupo de ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día).

La fosfatasa alcalina y la aspartato aminotransferasa exhibieron un patrón de comportamiento similar; la diabetes incrementó su actividad, mientras que el tratamiento con vanadio tendió a disminuirla, con la dosis de 3mg V/d la actividad de ambas enzimas cayeron a valores semejantes a los encontrados en el grupo de ratas control (Fig. 34).

Actualmente no existe un consenso de cómo el vanadio afecta la actividad de

dichas enzimas. Algunos autores han descrito que existe una parcial normalización de la actividad después de la exposición al tratamiento en ratas diabéticas (Domingo et al, 1992), pero otros no han obtenido tal efecto (Domingo et al, 1991; Macara, 1980). Como se ha comentado anteriormente, la fosfatasa alcalina es una enzima magnesio dependiente (Durlach, 1988) la cual es necesaria para el consumo de piridoxal-5 fosfatasa (vitamina B6) por los tejidos, y esta vitamina es una coenzima de la aspartato aminotransferasa. Además, la deficiencia de magnesio está asociada con un decremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y una deficiencia de la vitamina B6 (Planells et al, 1997). En nuestra opinión, la hipomagnesemia podría haber influido en el descenso de la actividad de la fosfatasa alcalina y de este modo en la actividad de la aspartato aminotransferasa, hecho que no fue observado en las ratas sanas (Tabla 5). Las correlaciones positivas entre la actividad de la aspartato aminotransferasa, el magnesio sérico y la actividad de la fosfatasa alcalina, apoyan esta hipótesis. La actividad de la aspartato aminotransferasa correlacionó positivamente con el Mg sérico ($r = 0.56$; $p < 0.01$) y la actividad de la fosfatasa alcalina ($r = 0.64$; $p < 0.01$)

En conclusión, bajo nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con 3 mg V/d, como BMOV, a ratas diabéticas normalizo la glucemia, pero incremento las pérdidas renales de magnesio, lo que indujo la depleción tisular del magnesio. Este efecto podría haber contribuido en parte al hecho de que a altas dosis el vanadio no normalizara los marcadores del metabolismo lipídico y proteico empleados.

5.2.3. Estudios “in vitro” del efecto de la exposición a vanadio sobre el transporte de Mg^{2+} en células embrionarias renales humanas HEK293. (Estudios en realización)

El hecho de que el tratamiento con vanadio, tanto a ratas sanas como a ratas diabéticas, provoque hipomagnesemia como consecuencia de un incremento de las pérdidas renales de magnesio, nos hizo pensar que podría ser de gran interés conocer la causa de dicho efecto tóxico del vanadio. Nuestra hipótesis de partida fue que probablemente el vanadio había alterado el comportamiento del intercambiador Na^+/Mg^{2+} ya que el vanadio inhibe la actividad de la $ATPasa-Na^+,K^+$ renal.

Para la realización de este estudio se empleó la línea de células embrionarias renales humanas HEK293 inducidas con tetraciclina durante 15 horas (*flag-hSLC41A1*). Dichas células sobreexpresan hSLC41A1, proteína que se comporta como un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ (Kolisek et al. 2012). En dichos experimentos se evaluó el efecto de la exposición a insulina y del vanadio, como Cl_4V , sobre el flujo de salida del Mg^{2+} de las células HEK293 previamente cargadas con el catión. Para la determinación de los cambios en el flujo de salida de Mg^{2+} desde las células se empleo la prueba Mag-Fura2. En todos los experimentos se utilizó como referencia el flujo estándar de salida del Mg^{2+} con el fin de determinar el efecto

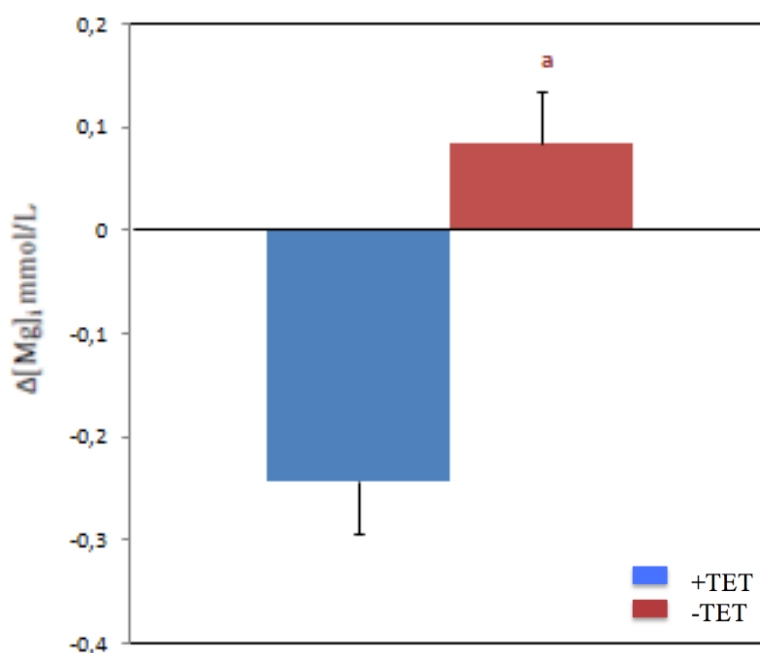


Figura 35.-Flujo de salida de Mg^{2+} en condiciones de trabajo estándar. +TET: células HEK293 inducidas con tetraciclina, con un periodo de incubación de 15 horas. -TET: células HEK293 no inducidas durante el periodo experimental.

(a) +TET vs -TET. $P < 0.05$

Los resultados obtenidos mostraron que la inducción con tetraciclina da lugar a un fuerte incremento de salida del Mg^{2+} , lo que confirma la existencia de una sobreexpresión de hSLC41A1 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ en dichas células (Fig. 35).

La exposición a $400\mu\text{U}$ de insulina produjo una reducción del flujo de salida del elemento, lo cual nos indicaría que la insulina puede inhibir la actividad de hSLC41A1 $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$ evitando las pérdidas renales de magnesio.

La exposición a diferentes dosis de vanadio como Cl_4V (Fig. 36) (se empleó este compuesto porque el BMOV colorea la disolución y entorpece la medida), ocasionó una caída del flujo de salida muy similar al encontrado para la insulina cuando se emplea la dosis de $60 \mu\text{M}$, lo que nos podría hacer pensar en un efecto insulinomimético del vanadio.

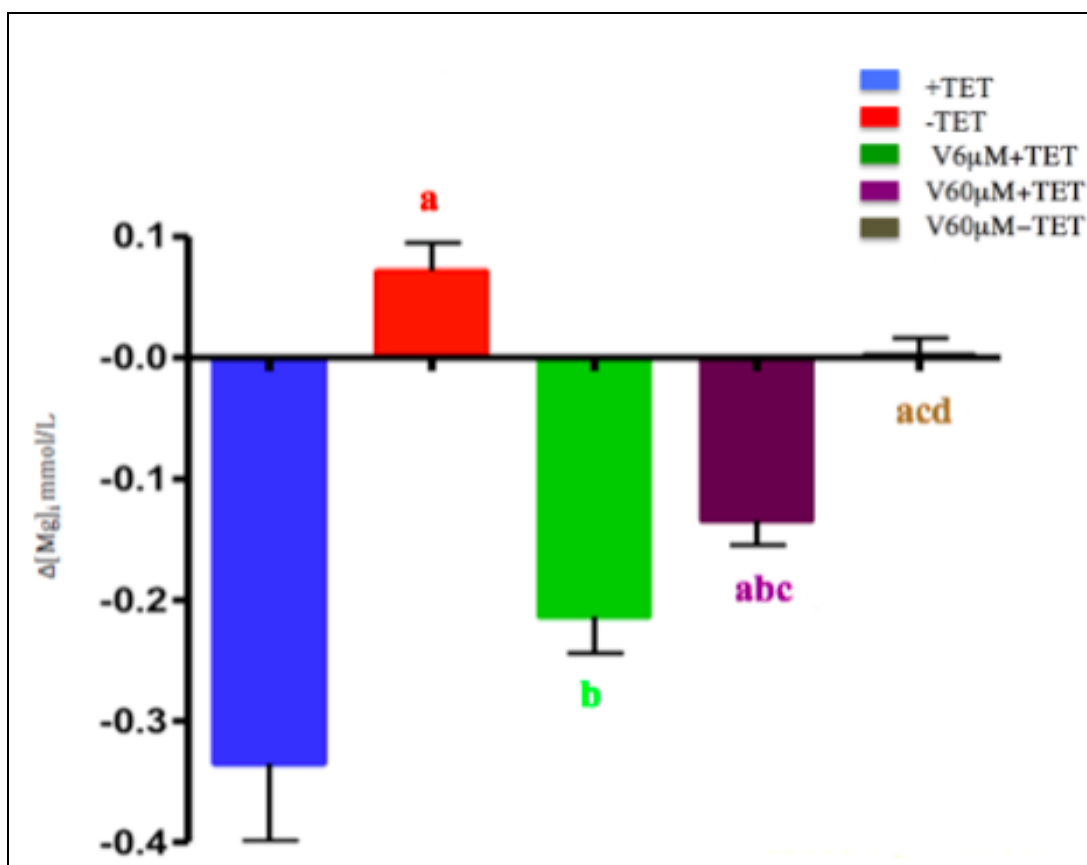


Figura 36.- Flujo de salida de Mg^{2+} tras la exposición a Cl_4V .

+TET: células HEK293 inducidas con tetraciclina, con un periodo de incubación de 15 horas. **-TET:** control células HEK293 no inducidas durante el periodo experimental. **V6μM+TET:** células HEK293 inducidas con tetraciclina, con un periodo de incubación de 15 horas, cargadas con el buffer de HBSS, durante la medición se agregaron 6 micromoles de Cl_4V . **V60μM+TET:** células HEK293 inducidas con tetraciclina, con un periodo de incubación de 15 horas, cargadas con el buffer de HBSS, durante la medición se agregaron 60 micromoles de Cl_4V . **V60μM-TET:** células HEK293 no inducidas, cargadas con el buffer de HBSS, durante la medición se agregaron 60 micromoles de Cl_4V .

(a) +TET vs -TET, V60μM+TET, V60μM-TET. $P < 0.05$

(b) -TET vs V6μM+TET, V60μM+TET. $P < 0.01$

(c) V6μM+TET vs V60μM+TET, V60μM-TET. $P < 0.05$, $P < 0.01$

(d) V60μM+TET vs V60μM-TET. $P < 0.01$

Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que se haya producido una sobresaturación de la membrana por vanadio ocasionando un bloqueo del transportador.

Al comparar los resultados del vanadio “in vivo” e “in vitro”, podemos pensar en que son contradictorios. Cuando calculamos la concentración del vanadio en la orina de las ratas que ingieren la mayor dosis (3mgV/día) encontramos que es $\approx 6 \mu\text{M}$, concentración que en los estudios “in vitro” ya ejerce un efecto significativo. Pero no podemos olvidar que “in vivo” las ratas se encuentran sometidas a un gran número de procesos metabólicos, endocrinos, etc, que pueden haber sido los causantes de los resultados obtenidos. Además, desconocemos si ha podido afectar el hecho de cambiar el compuesto de vanadio utilizado. Por último, debemos indicar que los resultados mostrados son resultados previos basados en un número pequeño de medidas para obtener conclusiones definitivas. Por tanto, es necesario realizar nuevas determinaciones que confirmen los resultados obtenidos.

5.3. Estudio de la influencia de los cambios del contenido de selenio y magnesio en el suero e hígado sobre los parámetros séricos y hepáticos estudiados

A lo largo del presente estudio hemos encontrado que el tratamiento con vanadio da lugar a cambios metabólicos y en el estado oxidativo e inflamatorio de los animales. Los cambios observados, tanto en ratas sanas como en diabéticas son muy semejantes, pero que las ratas sanas presentan mayor sensibilidad al tratamiento que las diabéticas.

Basándonos en este hecho y que en ambos casos el tratamiento conducía, por diferentes caminos, a alteraciones en la homeostasis del selenio y magnesio que se manifestaron con descensos del contenido sérico y tisular de ambos elementos, decidimos realizar un pequeño estudio estadístico que pudiera orientarnos sobre que alteración homeostática (del selenio o magnesio) había tenido mas influencia sobre los cambios en los parámetros séricos y hepáticos estudiados.

Siguiendo el consejo de los especialistas en estadística consultados y teniendo en cuenta el número de ratas utilizadas en el estudio, decidimos abordar este estudio realizando un análisis bivariado empleando el coeficiente de correlación de Spearman como indicador del grado de relación entre las variables del modelo.

Los resultados obtenidos para los parámetros determinados en el suero en las ratas sanas, nos muestran que la mayor parte de los parámetros séricos no aparecen correlacionados con los niveles circulantes de selenio o magnesio.

Observamos que la actividad de fosfatasa alcalina que aparece correlacionada con los cambios séricos de selenio y no con el magnesio, mientras que los niveles de ambos elementos se encuentran correlacionados con los cambios en la PCR e IL-6 de un modo muy semejante. Sin embargo, los cambios en el TNF α parecen más dependiente del magnesio y los de la leptina del selenio (Tabla 6).

En cuanto a la relación existe entre el contenido hepático de selenio o magnesio con las actividades de las enzimas determinadas y los niveles de peroxidación lipídica (MDA) y oxidación proteica (grupos carbonilo). Los resultados nos muestran que los parámetros que tuvieron cambios significativos (Fig. 12) aparecen correlacionados con la depleción hepática de selenio, no encontrándose ninguna correlación con el contenido hepático de magnesio (Tabla 7). Estos resultados en cierto modo eran previsibles ya que el contenido hepático de magnesio, aunque disminuye ligeramente, no se ve modificado significativamente por el tratamiento (Tabla 4).

	Se suero	Mg suero
CTA (mmol/L)	-0,111	-0,120
Ac. Úrico (mg/dL)	0,215	0,200
Urea mg/dL	-0,277	-0,451
C-T mg/dL	0,381	0,160
C-LDL mg/dL	0,176	0,286
Triglicéridos mg/dL	0,308	0,468
AST U/L	0,044	0,227
FA U/L	0,576 ^a	0,251
PCR mg/L	0,884 ^a	0,819 ^a
IL-1 β pg/ml	0,160	0,337
IL-6pg/ml	-0,617 ^a	-0,760 ^a
TNF α pg/ml	-0,531	-0,562 ^a
Leptina pg/ml	0,476 ^a	0,405

Tabla 6.- Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles séricos de selenio y magnesio (mg/L) y los parámetros bioquímicos séricos determinados en ratas sanas. CTA (capacidad total antioxidante); C-T (colesterol total); C-LDL (colesterol de muy baja densidad); AST (aspartatoaminotransferasa); FA (fosfatasa alcalina); PCR (proteína C reactiva); IL-1 β (interleucina 1- β); IL-6 (interleucina-6); TNF α (factor de necrosis tumoral α). ^aP<0.05.

Contenido hepático	Se	Mg
GPxmU/mg proteína	0,873 ^a	0,046
GR mU/mg proteína	0,203	0,123
GST mU/mg proteína	0,813 ^a	0,105
SOD U/mg proteína	-0,188	0,134
CAT U/mg proteína	-0,354	0,139
NQO1U/mg proteína	0,435	0,113
MDA nmol/g tejido	-0,773 ^a	-0,217
GC pm/mg proteína	-0,598 ^a	0,343

Tabla 7.- Coeficientes de correlación de Spearman entre las actividades de las enzimas, MDA y niveles de grupos carbonilos y el contenido de selenio y magnesio en hígado (mg/kg) en ratas sanas . GPx (Glutacionperoxidasa), GR (Glutacionreductasa), GST (Glutaciontransferasa), SOD (superóxidodismutasa), CAT (Catalasa), NQO1 (NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I), MDA (*malonaldehido*), GC (Grupo carbonilo).^aP<0.05.

En las ratas diabéticas podemos observar un mayor grado de correlación entre los parámetros bioquímicos y los niveles de magnesio que con el selenio circulante. Encontramos asociado al magnesio la capacidad antioxidante total, la urea la AST y la PCR y IL-6, como en el caso de las ratas sanas. El selenio aparece correlacionado con la Fosfatasa alcalina, AST, IL-6, TNF α y leptina (Tabla 8).

	Se suero	Mg suero
CTAmmol/L	-0,099	0,520 ^a
Ac. Úrico mg/dL	0,218	-0,363
Urea mg/dL	0,294	-0,515 ^a
C-T mg/dL	0,155	-0,366
C-LDL mg/dL	-0,089	-0,296
Triglicéridos mg/dL	-0,155	-0,336
AST U/L	0,540 ^a	0,427 ^a
FA U/L	0,796 ^a	0,098
PCR mg/L	-0,051	-0,693 ^a
IL-1 β pg/ml	-0,121	0,059
IL-6 pg/ml	-0,461 ^a	-0,448 ^a
TNF α pg/ml	-0,530 ^a	-0,209
Leptina pg/ml	-0,618 ^a	0,160

Tabla 8 - Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles séricos de selenio y magnesio (mg/L) y los parámetros bioquímicos séricos determinados en ratas diabéticas. CTA (capacidad total antioxidante); C-T (colesterol total);C-LDL(colesterol de muy baja densidad);AST (aspartatoaminotransferasa); FA (fosfatasa alcalina); PCR (proteína C reactiva);IL-1 β (interleucina 1- β); IL-6 (interleucina-6); TNF α (factor de necrosis tumoral α). ^aP<0.05.

	Se	Mg
GPxmU/mg proteína	0,498 ^a	0,160
GR mU/mg proteína	0,179	-0,010
GST mU/mg proteína	0,775 ^a	0,056
SOD U/mg proteína	-0,224	0,078
CAT U/mg proteína	-0,651 ^a	-0,331
NQO1U/mg proteína	-0,011	-0,031
MDA nmol/g tejido	-0,468 ^a	-0,139
GC pm/mg proteína	-0,487 ^a	-0,115

Tabla 9 . - Coeficientes de correlación de Spearman entre las actividades de las enzimas, MDA y niveles de grupos carbonilos y el contenido de selenio y magnesio en hígado (mg/kg) en ratas diabéticas. GPx (Glutathionperoxidasa), GR (Glutathionreductasa),GST (Glutathiontransferasa), SOD (superóxidodismutasa),CAT (Catalasa), NQO1 (NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I), MDA (*malonaldehido*), GC (Grupo carbonilo). ^a P<0.05.

En cuanto a la relación existe entre el contenido hepático de selenio o magnesio con las actividades de las enzimas determinadas y los niveles de peroxidación lipídica (MDA) y oxidación proteica (grupos carbonilo) en las ratas diabéticas. Los resultados nos muestran un comportamiento semejante al observado en las ratas sanas. Aunque en este caso la CAT también aparece correlacionada con el selenio hepático, en general los coeficientes de correlación encontrados son menores (Tabla 9).

Aunque la interpretación de los resultados obtenidos en este apartado es complejo, por el bajo número de ratas disponible, y su validez es relativa. No obstante, los resultados muestran que en las ratas diabéticas existe una mejor relación entre los indicadores de inflamación y el selenio sérico que con el magnesio, aunque la PCR parece estar mejor relacionada con los cambios en el magnesio (Tabla 8). Además, tanto en ratas sanas como en diabéticas, los del estado oxidativo aparece solo relacionado con el contenido hepático de selenio (Tablas 7 y 9). Por tanto, en nuestra opinión, podemos decir que los cambios en la homeostasis del selenio parece haber tenido una mayor repercusión en la presencia de estrés oxidativo y el proceso inflamatorio.

Por último, con el fin de confirmar si el proceso oxidativo se encuentra asociado al inflamatorio. Hemos estudiado el grado de correlación existente entre los resultados de los parámetros de estrés oxidativo (determinados en suero e hígado) y los del estado inflamatorio (determinados en suero). Los resultados nos han mostrado, que tanto en ratas sanas como en diabéticas, la IL-6 aparece correlacionada con la GPx ($r = -0.48$ y $r = -0.67$, para ratas sanas y diabéticas respectivamente; $p < 0.05$ en ambos casos) y la catalasa ($r = 0.56$ y $r = -0.84$, para ratas sanas y diabéticas respectivamente; $p < 0.05$ en ambos casos), y en el caso de las ratas diabéticas encontramos la PCR relacionada con la GPx ($r = -0.39$; $p < 0.05$), GST ($r = -0.74$; $p < 0.05$), niveles hepáticos de MDA ($r = 0.47$; $p < 0.05$) y niveles hepáticos de grupos carbonilo ($r = 0.62$; $p < 0.05$). Estos resultados apoyan la hipótesis mantenida a lo largo del estudio sobre la existencia de una relación entre ambos procesos y que parecen estar mas relacionados con la alteración de la homeostasis de selenio que la del magnesio.

6.- CONCLUSIONES (CONCLUSIONS)

Sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del selenio

1.- El tratamiento con 6.22 mg de bis (maltolato)oxovanadio (IV) / día a ratas sanas, produjo una caída de la absorción del selenio que ocasiono un descenso de los niveles séricos de selenio y una depleción tisular del catión que afecto fundamentalmente al riñón e hígado. Las pérdidas hepáticas de selenio estuvieron acompañadas por una reducción de la actividad de la glutathion peroxidasa, glutathion transferasa y NAD(P)H:quinona-oxidoreductasa I y por el incremento de la peroxidación lipídica y oxidación proteica en el hígado, lo que indica un deterioro de las defensas antioxidantes y la presencia de un daño oxidativo hepático. Además, esta situación va acompañada de un incremento de los niveles circulantes de citocinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF α). Ambos factores podrían haber sido la causa del moderado estado anémico observado en estas ratas.

2.- Mientras que el tratamiento a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina con 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día (1mg V/día) no tuvo ningún efecto antidiabético, el tratamiento con 18.66 mg bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día (3mg V/día) induce un claro efecto antidiabético, normalizando la ingesta de alimentos y la glucemia en ayunas. Además, el tratamiento con 3mg V/día causo un descenso en la absorción del selenio, depleción tisular, daño oxidativo hepático e incremento de los niveles circulantes de parámetros pro-inflamatorios. Por tanto, podemos decir que en las ratas diabéticas se han observado efectos semejantes a los encontrados en las ratas sanas pero empleando una dosis tres veces superior.

Sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del magnesio

3.- El tratamiento con 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día ratas sanas, produjo un incremento de las pérdidas renales de magnesio que ocasionó un descenso de la retención del catión en el organismo, reflejado en la caída de los niveles séricos del catión, menor contenido de magnesio en el fémur y de la actividad de la fosfatasa alcalina y por el incremento de los niveles de urea circulante.

4.- El tratamiento a ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, con 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día no tuvo ningún efecto sobre la homeostasis del

magnesio cuando se compara con las ratas diabéticas no tratadas, mientras que el tratamiento con 18.66 mg bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día (3mg V/día), además de tener un claro efecto antidiabético, produjo un incremento las pérdidas renales del magnesio, que indujeron una hipomagnesemia y depleción tisular de magnesio . Esta situación podría haber contribuido a que a altas dosis el vanadio no normalizaran los marcadores del metabolismo lipídico y proteico analizados. En este caso, volvemos a observar la mayor sensibilidad de las ratas sanas que las diabéticas al efecto del vanadio.

Conclusión general

5.- En términos generales podemos concluir que las ratas sanas presentan una mayor sensibilidad que las ratas diabéticas al bis(maltolato)oxovanadio (IV). Que este compuesto altera la homeostasis del selenio y del magnesio, lo que facilita la presencia de estrés oxidativo y la aparición de un proceso inflamatorio. Ambos procesos parecen estar mas relacionados con las alteraciones la homeostasis del selenio que con la de magnesio.

On the effect of vanadium treatment on the homeostasis of selenium

1.- Treatment of healthy rats with 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /day produced a decrease in the absorption of Se and a consequent fall in serum levels of selenium and tissue depletion of this cation, primarily affecting the kidneys and liver. The liver selenium losses were accompanied by a reduction in the activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase and NAD(P)H:quinone oxidoreductase I, together with increased lipid peroxidation and protein oxidation in the liver, indicating impaired antioxidant defences and the presence of hepatic oxidative damage. Furthermore, this situation was accompanied by increased circulating levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF α). Both factors may have been the cause of the moderately anaemic state observed in these rats.

2.- While treatment of estroptozotocin-induced diabetic rats with 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /day (1 mg V/day) had no antidiabetic effect, treatment with 18.66 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /day (3 mg V/day) induced a clear antidiabetic effect, normalising food intake and fasting glucose. Furthermore, treatment with 3 mg V/day led to a decrease in selenium absorption, tissue depletion and oxidative liver damage and increased the circulating levels of pro-inflammatory parameters. In summary, the diabetic rats presented effects similar to those found in the healthy rats, but only when a dose three times higher was used.

On the effect of vanadium treatment on the homeostasis of magnesium

3.- Treatment of healthy rats with 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /day caused an increase in renal losses of magnesium and thus reduced its retention in the body, as reflected by the fall in serum levels, the lower magnesium content in the femur, the reduced activity of alkaline phosphatase and the increased circulating levels of urea.

4.- Treatment of rats with estroptozotocin-induced diabetic rats 6.22 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /day had no effect on the homeostasis of magnesium, compared with the untreated diabetic rats, while treatment with 18.66 mg bis(maltolato)oxovanadium (IV) /day (3 mg V/day), besides having a clear antidiabetic effect, led to an increase in renal losses of Mg, which induced hypomagnesaemia and

tissue depletion of the magnesium. This situation may have contributed to the fact that high doses of vanadium did not normalise the markers of lipid and protein metabolism used. We again observed a greater sensitivity of healthy than diabetic rats to the effect of the vanadium.

General Conclusion

5.- Overall, we conclude that healthy rats are more sensitive than diabetic ones to BMOV. This compound alters the homeostasis of selenium and magnesium, which facilitates the presence of oxidative stress and the onset of an inflammatory process. Both processes seem to be more related to the alteration of Se homeostasis than to that of magnesium.

7.-BIBLIOGRAFIA

- Abdelhamid G, Anwar-Mohamed A, Elmazar MM, El-Kadi AO. Modulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by vanadium in human hepatoma HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 2010; 24, 1554-1561.
- Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346, 161-170.
- Adachi, K. Ogawa, Y. Tsushi, N. Nagao and T. Okano. Balance, excretion and tissue distribution of vanadium in rats after short-term ingestion. *J. Health Sci* 2000; 46, 59–62.
- Al-Bayati MA, Giri SN, Raabe OG. Time and dose-response study of protein, cholesterol, glucose, calcium and inorganic phosphate. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1990; 10, 206-213.
- Almanza-Perez, J.C., Blancas-Flores, G., Garcia-Macedo, R., Alarcon-Aguilarb, F.J., Cruz, M. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitas tipo2. *Gac Med Mex* 2008; 144, 535–542.
- American Association of Diabetes. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2011; 34,562-569.
- Aranda P, López-Frías M, López Jurado M, Llopis J, Mataix J, Rivero M, Urbano G. Recovery study in Mg-deficient rats given an organic source of Mg. *Ann Nutr Metab* 1990; 34, 244-251.
- Ardüser F, Wolfram S, Scharrer E. Active absorption of selenate by rat ileum. *J Nutr* 1985; 115, 1203-1208.
- Arnaud J, Akbaraly TN, Hininger I, Roussel AM, Berr C. Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: the EVA study. *J Nutr Biochem* 2007;18, 482-487 (a)
- Arnaud J, Bost M, Vitoux D, Labarère J, Galan P, Faure H, Hercberg S, Bordet JC, Roussel AM, Chappuis P; Société Francophone d'Etudes et de Recherche sur les Eléments Toxiques et Essentiels. Effect of low dose antioxidant vitamin and trace element supplementation on the urinary concentrations of thromboxane and prostacyclin metabolites. *J Am Coll Nutr* 2007;26,405-411 (b).
- Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* 1998;379,1201-1205.
- Assem, F.L., Levy, L.S. Chapter 10: Inhalation toxicity of vanadium. In: Michibata, H. (Ed.), *Vanadium. Biochemical and Molecular Biological Approaches: Part IV Medicinal Functions of Vanadium*. Springer, London, New York, 2012,145–224.
- Awad JA, Morrow JD, Hill KE, Roberts LJ, Burk RF. Detection and localization of lipid peroxidation in selenium- and vitamin E-deficient rats using F2-isoprostanes. *The Journal of Nutrition* 1994; 124,810-816.
- Ayaz M., Can B., Ozdemir S., Turan B. Protective effect of selenium treatment on diabetes-induced myocardial structural alterations. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89, 215–226 .
- Badmaev V, Prakash S, Majeed M., *Vanadium : A Review of its Potential Role in the Fight Against Diabetes*. *Journal Of Alternative And Complementary Medicine* 1999; 5, 273-291.
- 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, E745-752.

- 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.
- 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.
- Barbagallo M, Domínguez LJ, Resnick LM. Insulinmimetic action of vanadate: Role of intracellular magnesium. *Hypertension* 2001; 38, 701-704.
- Barceloux DG, Vanadium, *Clinical Toxicology*. 1999; 37, 265–278.
- 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.
- Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys* 2009; 55,1-23.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48,1-9.
- Beck MA, Levander OA. Dietary oxidative stress and the potentiation of viral infection. *Annu Rev Nutr* 1998;18,93-116.
- Becker DJ, Reul B, Ozcelikay AT, Buchet JP, Henquin JC, Brichard SM. Oral selenate improves glucose homeostasis and partly reverses abnormal expression of liver glycolytic and gluconeogenic enzymes in diabetic rats. *Diabetologia* 1996;39,3-11.
- Behne D, Wolters W. Distribution of Selenium and Glutathione Peroxidase in the Rat, *J Nutr* 1983;113,456-461.
- Behne D. et al, Speciation of selenium in the mammalian organism. *Analyst* 1998;123,871–873.
- Berry MJ, Larsen PR. The role of selenium in thyroid hormone action. *Endocr Rev* 1992;13,207-219.
- Blessing OI, Oloruntoba F, Olarewaju MO. Plasma glucose, creatinine and urea levels in type 2 diabetic patients attending a Nigerian teaching hospital. *ResJ Med Sci* 2011; 5, 1-3.
- Bleys J, Navas-Acien A, Guallar E. Serum Selenium and Diabetes in U.S. Adults. *Diabetes Care* 2007;30,829-834.
- Boosalis M. The Role of Selenium in Chronic Disease. *Nutrition in Clinical Practice* 2008;23,152-160.
- Boyd JC, Bruns DE, Wills MR Frequency of hypomagnesaemia in hypokalemic states. *Clin Chem* 1983; 29, 178–179
- Brown KM, Arthur JR., Selenium, selenoproteins and human health: a review, *Public Health Nutrition* 2001; 4, 593-599.
- Burk RF, Brown DG, Seely RJ, Scaief CC . Influence of Dietary and Injected Selenium on Whole-body Retention, Route of Excretion, and Tissue Retention of $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ in the Rat, *J. Nutrition* 1972;102, 1049-1056.
- Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, Lyons PR. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 1995;21,561-569.

- Bussi re 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.
- Byczkowski JZ & Kulkarni AP. Nriagu, editor . Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. In *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*. New York: John Wiley, Sons 1998;. 235–264 .
- Cam M, Rodrigues B & McNeill JH. Distinct glucose lowering and beta cell protective effects of vanadium and food restriction in streptozotocin-diabetes. *Eur J Endocrinol* 1999;141, 546–554.
- Can B, Ulusu NN, Kilinc K, Leyla Acan N, Saran Y, Turan B: Selenium treatment protects diabetes-induced biochemical and ultrastructural alterations in liver tissue. *Biol Trace Elem Res* 2005; 105,135-150.
- Can B., Ulusu N.N., Kilinc K., Leyla Acan N., Saran Y., Turan B. Selenium treatment protects diabetes-induced biochemical and ultrastructural alterations in liver tissue. *Biol Trace Elem Res* 2005; 105, 135–150.
- Caravan P., Gelmini L., Glover N., Herring F.G., Li H., McNeill J.H., Rettig S.J., Setyawati I.A., Shuter E., Sun Y., Tracey A.S., Yuen V.G., Orvig C.. Reaction Chemistry of BMOV, Bis(maltolato)oxovanadium(IV) - A Potent Insulin Mimetic Agent *J. Am. Chem. Soc* 1995;117,12759–12770.
- Carmignani M, Boscolo P, Volpe AR, Togna G, Masciocco L, Preziosi P. Cardiovascular system and kidney as specific targets of chronic exposure to vanadate in the rat: functional and morphological findings. *Arch Toxicol Suppl*. 1991;14,124-127.
- 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.
- Castiglioni S, Cazzaniga A, Albisetti W, Maier JA. Magnesium and Osteoporosis: Current State of Knowledge and Future Research Directions. *Nutrients*. 2013; 5,3022-3033.
- Chaudhary DP, Sharma R, Bansal DD. Implications of magnesium deficiency in type 2 diabetes: a review. *Biol Trace Elem Res* 2010 ;134, 119-129.
- Chen L, Pan DD, Zhou J, Jiang YZ. Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on CCl4-induced liver injury in mice and its possible mechanisms. *World J Gastroenterol* 2005;11,5795-5800.
- Chen MD, Yang VC, Alexander PS, Lin PY, Song YM. Effects of selected minerals on leptin secretion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226,836-840.
- Chernow B, Bamberger S, Stoiko M, Vadnais M, Mills S, Hoellerich V, Warsaw AL Hypomagnesaemia in patients in postoperative intensive care. *Chest* 1989; 95, 391–397
- Cisneros, Pupo ,C spedes .Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peroxidasa. *Rev. Cubana Investigación Biom dica* 1997;16, 10-15.
- Cohen, M.D., Sisco, M., Prophete, C., Yoshida, K., Chen, L., Zelikoff, J.T., Smee, J., Holder, A.A., Stonehuerner, J., Crans, D.C., Ghio, A.J. Effects of metal compounds with distinct physicochemical properties on iron homeostasis and anti-bacterial activity in the lungs: Cr and V *Inhal Toxicol* 2010; 22, 169–178.

- Conget. Diabetes y enfermedades cardiovasculares (I) Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus, *Rev Esp Cardiol* 2002;55,528-535
- Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds, *Chem. Rev* 2004; 104, 849-902.
- Cuesta S, Francés D, García GB. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicol Teratol* 2011;33,297-302.
- Curiel-García JA, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Hypomagnesemia and mortality in patients with type 2 diabetes. *Magnes Res* 2008; 21, 163-166.
- 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, 1414-1417.
- Dai S, Vera E, McNeill JH. Lack of haematological effect of oral vanadium treatment in rats. *Pharmacol Toxicol* 1995;76,263-268.
- Das, S., Chatterjee, M., Janarthan, M., Ramachandran, H., Chatterjee, M., Michibata, H. (Ed.). Chapter 8: Vanadium in cancer prevention. *Vanadium. Biochemical and Molecular Biological Approaches: Part IV Medicinal Functions of Vanadium*. Springer, London, New York, 2012, 163-186.
- Dastych M, Cienciala J, Krbec M. Changes of Selenium, Copper, and Zinc Content in Hair and Serum of Patients with Idiopathic Scoliosis. *J Orthop Res* 2008;26,1279-1282.
- De Cremer K, Van Hulle M, Chery C, Cornelis R, Strijckmans K, Dams R, Lameire N, Vanholder R. Fractionation of vanadium complexes in serum, packed cells and tissues of Wistar rats by means of gel filtration and anion-exchange chromatography. *J Biol Inorg Chem* 2002;7,884-890.
- Dickens BF, Weglicki WB, Li YS, Mak IT. Magnesium deficiency in vitro enhances free radical induced intracellular oxidation and cytotoxicity in endothelial cells. *FEBS Journal* 1992; 3, 187-191.
- Domingo J., vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicity, *Reproductive Toxicology* 1996; 3, 175-182.
- Domingo JL, Gómez M, Llobet JM, Corbella J, Keen CL. Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology* 1991; 66, 279-287.
- Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL. Tiron administration minimizes the toxicity of vanadate but not its insulin mimetic properties in diabetic rats. *Life Sci* 1992; 50, 1311-1317.
- Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL. Toxicology of 152.-vanadium compounds in diabetic rats: The action of chelating agents on vanadium accumulation. *Mol Cell Biochem* 1995;153,233-240.
- Domingo. Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol Cell Biochem*. 2000; 203,185-187
- Douillet C., Bost M., Accominotti M., Borson-Chazot F., Ciavatti M. Effect of selenium and vitamin E supplements on tissue lipids, peroxides, and fatty acid distribution in experimental diabetes. *Lipids* 1998; 33, 393-399.
- Douillet C., Tabib A., Bost M., Accominotti M., Borson-Chazot F.,

Ciavatti M. A selenium supplement associated or not with vitamin E delays early renal lesions in experimental diabetes in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 211, 323–331.

- 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.
- 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
- Durlach J. Magnesium in clinical practice. John Libbey Eurotext. & Company Ltd Paris1988, 10.
- Dye, J.A., Kenneth, B.A., Richards, J.H., Dreher, K.L. Role of soluble metals in oil fly ash-induced airway epithelial injury and cytokine gene expression. *Am. J. Physiol: Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277, L498–L510.
- Eby GA, Eby KL Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Med Hypotheses* 2006; 67,362–370
- EFSA (2004) 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). *EFSA J* 33, 1–22. [http:// www.efsa.eu.int/](http://www.efsa.eu.int/)
- Ehrenreich, K. Forchhammer, P. Tormay, B. Veprek y A. Böck Selenoprotein synthesis in *E. coli*. Purification and characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. *Eur. J. Biochem* 1992;206,767 - 773.
- Elin RJ Magnesium metabolism in health and disease. *Dis Mon* 1988; 34,161–218
- Elin RJ, Armstrong WD, Singer L Body fluid electrolyte composition of chronically magnesiumdeficient and control rats. *Am J Physiol* 1971; 220, 543–548.
- Erine A. Kupetsky-Rincon Jouni Uitto. Magnesium: Novel Applications in Cardiovascular Disease – A Review of the Literature. *Ann Nutr Metab* 2012;61,102–110.
- Esaki N, Nakamura T, Tanaka H, Soda K. Selenocysteine Lyase, a Novel enzyme That Specifically Acts on Selenocysteine. *J Biol Chem*.1982 Apr 25;257,4386-4391.
- Ezaki O.. The Insulin-like Effects of Selenate in Rat Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry. J Biol Chem* 1990;265,1124-1128 .
- Facchini DM, Yuen VG, Battell ML, McNeill JH, Grynpsas MD. The effects of vanadium treatment on bone in diabetic and non-diabetic rats. *Bone* 2006;38,368-377.
- Flohé L., Glutathione peroxidase, *Basic Life Sci*1988;49,663-668.
- Foppoli C, De Marco F, Blarzino C, Perluigi M, Cini C, Coccia R. Biological response of human diploid keratinocytes to quinone-producing compounds: role of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37,852-863.

- Foster LH, Sumar S. Selenium in health and disease: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1997;37,211-228.
- Freyser EJ, Rebrin K, Schneider T. Increased urea synthesis in insulin-dependent diabetic dogs maintained normoglycemic: effect of portal insulin administration and food protein content. *Diabetes* 1996; 45, 667-674.
- 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
- 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.
- Gammelgaard B, Gabel-Jensen C, Stürup S, Hansen HR. Complementary use of molecular and element-specific mass spectrometry for identification of selenium compounds related to human selenium metabolism. *Anal Bioanal Chem* 2008;390,1691-706.
- Ganz, T., Nemeth, E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu Rev Med*2011;62,347-360.
- Ge K, Xue A, Bai J, Wang S. Keshan disease an endemic cardiomyopathy in China. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*1983;401,1-15.
- Gebre-Medhin M., Ewald U., Tuvemo T. Serum selenium is related to low-density lipoproteins in healthy children but not in children with diabetes. *Ups. J. Med. Sci.* 1988; 93, 57–62.
- Ghio, A.J., Cohen, M.D. Disruption of iron homeostasis as a mechanism of biologic effect by ambient air pollution particles. *Inhal Toxicol*2005;17,709-716.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Rad BiolMed* 2000; 29,1106-1114.
- Giorgio, M.; Trinei, M.; Migliaccio, E.; Pelicci, P.G. Hydrogen peroxide: A metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2007;8, 722–728.
- Giuseppe Paolisso y Mario Barbagallo. Hypertension, Diabetes Mellitus, and Insulin Resistance. The Role of Intracellular Magnesium. *Am J Hypertens* 1997;10,346-355.
- Goldwasser, D. Gefel, E. Gershonov, M. Fridkin, and Y. Shechter, "Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications," *Journal of Inorganic Biochemistry* 2000;80, 21-25.
- 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.
- Guerrero-Romero F, Rodríguez-Morán M. Low serum magnesium levels and metabolic syndrome. *Acta Diabetológica* 2002; 39, 209-213.
- Gueux E, Mazur A, Cardot P, Rayssiguier Y. Magnesium deficiency affects plasma lipoprotein composition in rats. *J Nutr* 1991; 121, 1222-1227.
- Guney, M.; Erdemoglu, E.; Mungan, T. Selenium-vitamin E combination and melatonin modulates diabetes-induced blood oxidative damage and fetal outcomes in pregnant rats. *Biol. Trace Elem. Res* 2011; 143, 1091–1102.

- Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 1974;104,580-7.
- Haider SS, Abdel-Gayoum AA, el-Fakhri M, Ghwarsha KM. Effect of selenium on vanadium toxicity in different regions of rat brain. *Exp. Toxicol* 1998; 17, 23–28.
- Hans CP, Chaudhary DP, Bansal DD. Magnesium deficiency increases oxidative stress in rats. *Indian J Exp Biol* 2002; 40,1275–1279.
- Hayes JP, Ryan MF, Brazil N, Riordan TO, Walsh JB, Coakley D . Serum hypomagnesaemia in an elderly day-hospital population. *Ir Med J* 1989;82,117-119.
- Hei YJ, Farahbakhshian S, Chen X, Battell ML, McNeill JH. Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes., *Mol. Cell. Biochem* 1998; 178, 367–375.
- Hill KE, Xia Y, Akesson B, Boeglin ME, Burk RF. Selenoprotein P Concentration in Plasma Is an Index of Selenium Status in Selenium-Deficient and Selenium-Supplemented Chinese Subjects. *J Nutr* 1996;126 ,138-145.
- 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
- Holben DH, Smith AM. The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins: A Review. *J Am Diet Assoc* 1999;99 ,836-843.
- Hwang D, Seo S, Kim Y, Kim C, Shim S, Jee S, Lee S, Jang M, Kim M, Yim S, Lee SK, Kang B, Jang I, Cho J..Selenium acts as an insulin-like molecule for the down-regulation of diabetic symptoms via endoplasmic reticulum stress and insulin signalling proteins in diabetes-induced non-obese diabetic mice.*J Biosci* 2007; 32,723-735.
- Iglesias-González T, Sánchez-González C, Montes-Bayón M, Llopis-González J, Sanz-Medel A. 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
- Institute of medicine, , chapter 6 magnesium, Dietary reference intakes, National Academic of Sciences, Washington D.C., USA, 1997 p. 190-249.
- Institute of medicine, chapter 13: arsenic, boron, nickel, silicon and vanadium, Dietary reference intakes, National Academic of Sciences, Washington D.C., USA, 2001, 532-543.
- Institute of medicine, chapter 7: selenium, Dietary reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids, National Academic of Sciences, Washington D.C., USA, 2000, 284-324.
- Jéquier, E., 2002. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 2002;967,379-388.
- Kandeel FR, Balon E, Scott S, Nadler JL. Magnesium deficiency and glucose metabolism in rat adipocytes. *Metabolism* 1996; 45,838-43.
- Karmaker S, Saha TK, Sakurai H. Antidiabetic Activity of the Orally Effective Vanadyl-Poly (c-Glutamic Acid) Complex in Streptozotocin(STZ)-induced Type 1 Diabetic Mice. *J Biomater Appl* 2008;22,449-464.
- Kawabe K, Yoshikawa Y, Adachi Y, Sakurai H. Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes. *Life Sci* 2006;78 ,2860-2866.

- Kim S.S., Koo J.H., Kwon I.S., Oh Y.S., Lee S.J., Kim E.J., Kim W.K., Lee J., Cho J.Y. Exercise training and selenium or a combined treatment ameliorates aberrant expression of glucose and lactate metabolic proteins in skeletal muscle in a rodent model of diabetes. *Nutr Res Pract* 2011; 5, 205–213.
- Kingston ME, Al-Siba'i MB, Skooge WC (1986) Clinical manifestations of hypomagnesemia. *Crit Care Med* 1989; 14,950–954.
- Kirel, B., Dogruel, N., Korkmaz, Ü., Kiliç, F.S., Özdamar, K., Uçar, B. Serum leptin levels in type 1 diabetic and obese children: Relation to insulin levels. *Clin Biochem* 2000;33, 475-480.
- Kiss T, Kiss E, Garribba E, Sakurai H. Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J Inorg Biochem* 2000; 80,65-73.
- Kobrin SM, Goldfarb S. Magnesium deficiency. *Semin Nephrol* 1990; 10,525–535
- Kolisek M, Nestler A, Vormann J, Schweigel-Röntgen M., Human gene SLC41A1 encodes for the Na⁺/Mg²⁺ exchanger., *Am J Physiol Cell Physiol* 2012;302,C318-326
- Kroll MH, Elin RJ Relationship between magnesium and protein concentrations in serum. *ClinChem* 1985; 31,244–246
- Kurt O, Ozden TY, Ozsoy N, Tunali S, Can A, Akev N, Yanardag R, Influence of vanadium supplementation on oxidative stress factors in the muscle of STZ-diabetic rats, *Biometals*. 2011, 24,943–949.
- Lacourciere GM, Stadtman TC. The NIFS Protein Can Function as a Selenide Delivery Protein in the Biosynthesis of Selenophosphate. *J. Biol. Chem* 1998, 273,30921-30926
- Lei XG, Cheng W-H & McClung JP . Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr* 2007;27,41-61.
- 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.
- Lerma A, Planells E, Aranda P, Llopis J. Evolution of Mg-deficiency in rats. *Ann Nutr Metab* 1993; 37,210-217.
- Levander OA. The Selenium-Coxsackievirus Connection: Chronicle of a Collaboration. *J Nutr* 2000; 130, 485S-488S.
- Li, J., Li, F., Zhao, A. Inflammation and leptin. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2006;3, 387-393
- Likuni, N., Lam, Q. L. K., Lu, L., Matarese, G., La Cava, A. Leptin and inflammation *Curr. Immunol. Rev* 2008;4, 70–79
- 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, 134-40.
- Macara IG. Vanadium - an element in search of a role. *Trends Bioch Sci* 1980;5, 92-94.
- Majithiya JB, Balaraman R, Giridhar R, Yadav MR. Effect of bis[curcumino]oxovanadium on nondiabetic and streptozotocin-induced diabetic rats. *J Trace Elem Med Biol* 2005; 18, 211-217.
- 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.

- Manuel y Keenoy B, Moorkens G, Vertommen J, Noe M, Neve J, De Leeuw I. Magnesium status and parameters and the oxidant-antioxidant balance in patients with chronic fatigue: effects of supplementation with magnesium. *J Am Coll Nutr* 2000; 19, 374-382.
- 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;223,147-157.
- 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;143,4636-4645.
- Mataix J, Aranda P, López-Jurado M, Sánchez C, Planells E, Llopis J. Calcium, phosphorus and magnesium intake in an adult population from Southern Spain: Influence of lifestyle factors. *Eur J Nutr* 2006; 45, 349-354.
- Mataix J., , Llopis J. Editor: Mataix. Capítulo 9: Minerales. Nutrición y alimentación humana 2ª. Edición, Ergon, Madrid 2009,265-301.
- Matschinsky FM Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cells and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39, 647-652.
- McConnell, Portman Ow, Toxicity of dimethyl selenide in the rat and mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1952;79,230-241.
- Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions, *Molecules* 2013; 18, 3292-3311
- Meyerovitch J, Shechter Y, Amir S. Vanadate stimulates in vivo glucose uptake in brain and arrests food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 1989;45, 1113-1116.
- Meyerovitch J, Waner T, Sack J, Kopolovic J, Shemer J. Attempt to prevent the development of Diabetes in Non-Obese Diabetic Mice by Oral Vanadate Administration. *IMAJ* 2000; 2, 211-214.
- Michibata, H.. Vanadium. *Biochemical and Molecular Biological Approaches: Part IV Medicinal Functions of Vanadium*. Springer, London, New York 2012, 145-224.
- Morsy MD, Abdel-Razek HA, Osman OM. Effect of vanadium on renal Na⁺, K⁺-ATPase activity in diabetic rats: a possible role of leptin. *J Physiol Biochem* 2011; 67, 61-69.
- Mozier NM, McConnell KP, Hoffman JL. S-Adenosyl-L-methionine: Thioether S-Methyl transferase, a New Enzyme in Sulfur and Selenium Metabolism, the journal of biological chemistry 1988; 263, 4527-4531.
- Muchová J, Liptáková A, Országhová Z, Garaiová I, Tison P, Cársky J, Duracková Z. Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1999;16, 74-78.
- Mueller AS, Most E, Pallauf J. Effects of a supranutritional dose of selenate compared to selenite on insulin sensitivity in type II diabetic dbdb mice. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2005;89,94-104.
- Mueller AS, Pallauf J, Rafael J. The chemical form of selenium affects insulinomimetic properties of the trace element: investigations in type II diabetic dbdb mice. *J Nutr Biochem* 2003;14,637-647.

- Mueller AS, Pallauf J. Compendium of the antidiabetic effects of supranutritional selenate doses. In vivo and in vitro investigations with type II diabetic db/db mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2006; 17, 548–560.
- Nagaoka MH, Akiyama H, Maitani T. Binding patterns of vanadium to transferrin in healthy human serum studied with HPLC/high resolution ICP-MS. *Analyst* 2004;129,51-54.
- Navarro Alarcón M. Selenio, Manganeso, Cromo, molibdeno, yodo y otros oligoelementos minoritarios. In: Gil DA, editor(s). *Tratado de nutrición. Tomo I Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 2da. Edición.* España: Panamericana 2010, 707-716.
- Navarro-Alarcón M, López-Martínez MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases: *Sci Total Environment* 2000; 249,347-371.
- Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ* 2008; 400, 115–141.
- Naziroglu, M.; Cay, M. Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Biol. Trace Elem. Res* 2001;79, 149–159.
- Nechay, Nanninga LB, Nechay PS. Vanadyl (IV) and vanadate (V) binding to selected endogenous phosphate, carboxyl, and amino ligands; calculations of cellular vanadium species distribution archives of biochemistry and biophysics. *Arch Biochem Biophys* 1986; 15; 251,128-138.
- Nemeth, E., Rivera, S., Gabayan, V., Keller, C., Taudorf, S., Pedersen, B.K., Ganz, T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest* 2004; 113,1271-1276 (b).
- Nielsen F.H, Other trace elements. Vanadium, in *Present Knowledge in Nutrition*, ed. E. E. Ziegler and L. J. Filde, ILSI Press, Washington, D.C. 1996, 364–370.
- Nielsen F.H., Chapter 22 Vanadium, *Handbook of nutritionally essential mineral elements*, O'Dell, B. L.; Sunde, R. A. (editors), 1st edition, Marcel Dekker, New York, USA 1997, 619-630.
- Nielsen, F.H., Chapter 16. Ultratrace Minerals, in *Modern Nutrition in Health and Disease*, Maurice E Shills < James A. Olson, Moshe Shike, A. Chatarine Ross (editors) , 9th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 1999, 297-299.
- Noronha JL, Matuschak GM Magnesium in critical illness: metabolism, assessment, and treatment. *Intensive Care Med* 2002; 28, 667–679
- Nriagu JO. Vanadium in the environment, Part 2: Health effects. In: *Wiley Series in Advances in Environmental Science and Technology*. New York, NY: Wiley 1998; 31,21-37,92-120
- Oster MH, Llobet JM, Domingo JL, German JB, Keen CL. Vanadium treatment of diabetic Sprague-Dawley rats results in tissue vanadium accumulation and pro-oxidant effects. *Toxicology* 1993; 83, 115–130.
- Otten J., Chapter selenium, *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*, National Academies Press 2006, 381-386.
- Ozelik D, Tuncdemir M, Ozturk M, Uzun H. Evaluation of trace elements and oxidative stress levels in the liver and kidney of streptozotocin

induced experimental diabetic rat model. *Gen Physiol Biophys* 2011;30, 356-363.

- Paolisso G, Sgambato S, Gambardella A, Pizza G, Tesauro P, Varricchio M, D'Onofrio F. Daily magnesium supplements improve glucose handling in elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1992; 55, 1161–1167
- Pennington JA, Jones JW. Molybdenum, nickel, cobalt, vanadium, and strontium in total diets. *J Am Diet Assoc.* 1987 Dec;87,1644-1650.
- Petrault I, Zimowska W, Mathieu J, Bayle D, Rock E, Favier A, Rayssiguier Y, Mazur A. Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency. *BBA-Molecular Basis of Disease* 2002; 1586,92-98.
- Pierce, L.M., Alessandrini, F., Godleski, J.J., Paulauskis, J.D. Vanadium-induced chemokine mRNA expression and pulmonary inflammation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;138, 1-11.
- Planells E, Aranda P, Lerma A, Llopis J. Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc caused by magnesium deficiency in rats. *Brit J Nutr* 1994; 72, 315-323.
- Planells E, Lerma A, Sánchez-Morito N, Moreno MJ, Aranda P, Llopis J. Effect of magnesium deficiency on vitamin B2 and B6 status in the rat. *J Am Coll Nutr* 1997; 16, 352-356.
- Planells E, Llopis J, Peran F, Aranda J. Changes in tissue calcium and phosphorus content and plasma concentration of parathyroid hormone and calcitonine after long-term magnesium deficiency in rats. *J Am Coll Nutr* 1995; 14, 292-298.
- Prophete, C., Maciejczk, P., Salnikow, K., Gould, T., Larson, T., Koenig, J., Jaques, P., Sioutas, C., Lippmann, M., Cohen, M. Effects of select PM-associated metals on alveolar macrophage phosphorylated ERK 1 and -2 and iNOS expression during ongoing alteration in iron homeostasis. *J Toxicol Environ Health A* 2006;69,935-951.
- Puchau, B, Zulet, M A, González de Echávarri, A; Navarro-Blasco, I, Martínez, J A. Selenium intake reduces serum C3, an early marker of metabolic syndrome manifestations, in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* 2009;63,858-864.
- Quilliot D., Dousset B., Guerci B., Dubois F., Drouin P., Ziegler, O. Evidence that diabetes mellitus favors impaired metabolism of zinc, copper, and selenium in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22, 299–306.
- Ramachandran B, Subramanian S. Amelioration of diabetic dyslipidemia by macrocyclic binuclear oxovanadium complex on streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2005; 272, 157-164.
- Rasekh HR, Potmis RA, Nonavinakere VK, Early JL, Iszard MB. Effect of selenium on plasma glucose of rats: role of insulin and glucocorticoids. *Toxicology Letters* 1991; 58, 199-207.
- 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.
- Rayssiguier Y. Lipoprotein metabolism: Importance of magnesium. *Magnes Bull* 1986; 8, 186-193.
- Rayssiguier Y. Magnesium, lipids and vascular diseases. *Magnesium* 1986; 5, 182-190.

- 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* 1993; 123, 1939-1951.
- Reilly C., Phil, Ed. Selenium in Food and Health; Springer Science Media: New York, NY, USA, 2006
- Rhee, S.G. Redox signaling: Hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med* 1999; 31, 53–59.
- Rico MC, Lerma E, Planells E, Aranda P, González JL. Changes in the nutritive utilization of protein induced by Mg deficiency in rats. *Int J Vitam NutrRes* 1995; 65,122-126.
- Rocourt CR, Cheng WH. Selenium supranutrition: are the potential benefits of chemoprevention outweighed by the promotion of diabetes and insulin resistance?. *Nutrients* 2013;5, 1349-1365
- 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.
- 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
- Rude RK. Magnesium deficiency and diabetes mellitus. Causes and effects. *Postgrad Med* 1992; 92, 217–219
- Ryzen E Magnesium homeostasis in critically ill patients. *Magnesium* 1989; 8, 201–212
- Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, Watanabe Y, Suzuki M, Saito E, Takahashi K. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein p. *J Biol Chem* 1999;274,2866-2871.
- Sakurai H, Yoshikawa Y, Yasui H. Current state for the development of metallopharmaceutics and anti-diabetic metal complexes, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 2383–2392
- Sakurai H., Tsuchiya K., Nukatsuka M., Kawada J., Ishikawa S., Yoshida H., Komatsu M. Insulin-mimetic action of vanadyl complexes. *J. Clin. Biochem. Nutr*1990;8,193–200.
- Sales CH, Pedrosa Lde F.. Review. Magnesium and diabetes mellitus: Their relation. *Clinical Nutrition* 2006;25,554–562.
- Sánchez C, Torres M, Bermúdez-Peña C, Aranda P, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient rats. *MagnesRes* 2011; 24,196-208.
- Sánchez-González C, López-Chaves C, Trenzado CE, Aranda P, López-Jurado M, Gómez-Aracena J, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Changes in iron metabolism and oxidative status in STZ-induced diabetic rats treated with bis(maltolato) oxovanadium (IV) as an antidiabetic agent. *Scientific World Journal* 2014;5, 2014:706074. doi: 10.1155/2014/706074
- Sánchez-González C, Rivas-García L, López-Chaves C, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Gálvez J, Gómez-Aracena J, Vera-Ramírez L, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Exposure to bis(maltolato)oxovanadium(IV)

increases levels of hepcidin mRNA and impairs the homeostasis of iron but not that of manganese. *Food Chem Toxicol* 2014; 73, 113-118.

- Sanchez-Gonzalez C, Bermudez-Peña C, Guerrero-Romero F, Trenzado CE, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Effect of bis (maltolato) oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *British Journal of Nutrition* 2012; 108, 893–899(b).

- Sanchez-Gonzalez C, Bermudez-Peña C, Trenzado CE, Goenaga-Infante H, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J.. Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics* 2012; 4, 814 – 819(a).

- 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.

- 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.

- 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.

- Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver: Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol* 1993;45,539-542.

- Schroeder HA, Balassa JJ, Tipton IH.. Abnormal trace metals in man-vanadium. *J chron Dis* 1963; 16,1047-1071.

- Scibior A, Adamczyk A, Gołębiewska D, Niedźwiecka I, Fornal E. The influence of combined magnesium and vanadate administration on the level of some elements in selected rat organs: V-Mg interactions and the role of iron-essential protein (DMT-1) in the mechanism underlying altered tissues iron level. *Metallomics* 2014;6,907-920.

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

- 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, 487-496 (a).

- Scibior A, Zaporowska H, Wolińska A, Ostrowski J. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in the blood of rats co-treated with vanadium (V(+5)) and chromium (Cr (+3)). *Cell Biol Toxicol* 2010;26,509-26 (b).

- Scibior A, Zaporowska H. Effects of combined vanadate and magnesium treatment on erythrocyte antioxidant defence system in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010; 30, 153-161(c).

- 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; 51,287-295.

- Scibior, A., Adamczyk, A., Gołębiewska, D., Niedźwiecka, I. Effect of 12-week vanadate and magnesium co-administration on chosen haematological parameters as well as on some indices of iron and copper metabolism

and biomarkers of oxidative stress in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012;34,235-252.

- Scott JA, King GL. Oxidative Stress and Antioxidant Treatment in Diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031,204-213.
- Seelig M.S., Rosanoff A. *The Magnesium Factor*. Avery; New York, NY, USA: 2003.
- Setyawati I.A., Thompson K.H., Sun Y., Lyster D.M., Vo C., Yuen V.G., Battell M., McNeill J.H., Ruth T.J., Zeisler S., Orvig C. Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of ⁴⁸V-labeled compounds in rats. *J. Appl. Physiol* 1998;8, 569–575.
- Sheng X.Q., Huang K.X., Xu H.B. New experimental observation on the relationship of selenium and diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res* 2004; 99, 241–253.
- Shills ME Magnesium in health and disease. *Annu Rev Nutr* 1988; 8, 429–460.
- Shills ME Experimental human magnesium depletion. *Medicine* 1969; 48, 61–85.
- Simental-Mendia LE, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. Failure of β -cell function to compensate variation in insulin sensitivity in hypomagnesemic subjects. *Magn Res* 2009; 22, 151-156.
- Skripchenko N.D., Sharafetdinov K., Plotnikova O.A., Meshcheriakova V.A., Mal'tsev G. Effect of selenium enriched diet on lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus type 2. *Vopr Pitan* 2003; 72, 14–17.
- Srivastava AK, Mehdi MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabet Med* 2005;22,2-13.
- Stapleton SR. Selenium: an insulin-mimetic. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci* 2000; 57,1874–1879.
- Stone, J.R.; Yang, S. Hydrogen peroxide: A signaling messenger. *Antioxid. Redox Signal* 2006; 8, 243–270.
- Stranges S, Marshall JR, Natarajan R, Donahue RP, Trevisan M, Combs GF, Cappuccio FP, Ceriello A, Reid ME. Effects of Long-Term Selenium Supplementation on the Incidence of Type 2 Diabetes. A Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2007;147,217-223.
- Stranges S, Sieri S, Vinceti M, Grioni S, Guallar E, Laclaustra M, Muti P, Berrino F, Krogh V.. A prospective study of dietary selenium intake and risk of type 2 diabetes. *Public Health* 2010;10,564
- Styler L. *Biochemistry*, 3rd edn. Freeman, New York, 1988.
- 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; 38,1262-1270.
- Sun Q, Sekar N, Goldwaser I, Gershonov E, Fridkin M, Shechter Y., "Vanadate restores glucose 6-phosphate in diabetic rats : a mechanism to enhance glucose metabolism Vanadate restores glucose 6-phosphate in diabetic rats : a mechanism to enhance glucose metabolism," *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279,E403-410.
- Sunde RA, Raines AM. Selenium Regulation of the Selenoprotein and Nonselenoprotein Transcriptomes in Rodents. *American Society for Nutrition Adv Nutr* 2011;2,138–150.

- Swanson CA, Patterson BH, Levander OA, Veillon C, Taylor PR, Helzlsouer K, McAdam PA, Zech LA. Human [⁷⁴Se]selenomethionine metabolism: a kinetic model. *Am J Clin Nutr* 1991;54,917-926.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother* 2003; 57,134-144.
- Tas S, Sarandol E, Ziyank S, Ayvalik SZ, Dirican M. 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.
- Thompson K.H., Barta C.A., Orvig C. Metal complexes of maltol and close analogues in medicinal inorganic chemistry. *Chem. Soc Rev* 2006; 35, 545–556.
- Thompson KH and Orvig C., Vanadium in diabetes: 100years from Phase 0 to Phase I. *J Inorg Biochem* 2006;100,1925-1935.
- Thompson KH, McNeill JH, Orvig C. Vanadium Compounds as Insulin Mimics, *Chem. Rev* 1999;99, 2561-2571.
- Thomson C.D. y Robinson M.F. Urinary and fecal excretions and absorption of a large supplement of selenium: superiority of selenate over selenite. *Am J Clin Nutr* 1986;44,659-663.
- 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
- Tosiello L. Hypomagnesemia and diabetes mellitus. A review of clinical implications. *Arch Intern Med* 1996; 156, 1143–1148
- Touyz RM. Role of magnesium in the pathogenesis of hypertension. *Molecular Aspects of Medicine* 2003; 24, 107–136.
- Tramer Martin R., Schneider Jurg, Marti Rene-Andreas, Rifat Kaplan. Role of Magnesium Sulfate in Postoperative Analgesia. *Anesthesiology* 1996; 84,340-347 .
- Ulusu NN, Turan B.. Beneficial Effects of Selenium on Some Enzymes of Diabetic Rat Heart. *Biological Trace Element Research* 2005; 103, 207-215.
- Valko M, Morris H and Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12, 1161–1208.
- Van Vleet JF. Current knowledge of selenium-vitamin E deficiency in domestic animals, *J Am Vet Med Assoc* 1980;176, 321-5.
- Veal, E.A.; Day, A.M.; Morgan, B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* 2007; 26, 1–14.
- Venkataraman B.V. and Sudha S, Vanadium Toxicity, *Asian J. Exp. Sci* 2005; 19,127-134.
- Venu L, Kishore YD, Raghunath M. Maternal and perinatal magnesium restriction predisposes rat pups to insulin resistance and glucose intolerance. *J Nutr* 2005; 135, 1353-1358.
- Vormann J. Magnesium: nutrition and metabolism. *Mol Aspects Med* 2003; 24, 27-37.
- 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.

- Waschulewski IH, Sunde RA. Effect of Dietary Methionine on Utilization of Tissue Selenium from Dietary Selenomethionine for Glutathione Peroxidase in the Rat, *J Nutr* 1988; 118,367-374.
- Weglicki WB, Dickens BF, Wagner TL, Chmielinska JJ, Phillips TM. Immunoregulation by neuropeptides in magnesium deficiency: ex vivo effect of enhanced substance P production on circulating T lymphocytes from magnesium-deficient rats. *Magnes Res* 1996; 9, 3-11.
- Wei D, Li M, Ding W. Effect of vanadate on gene expression of the insulin signaling pathway in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Blood* 2007,1265-1273.
- West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 2000;17,171-180
- 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
- Wiernsperger N, Rapin J. Trace elements in glucometabolic disorders: an update. *Diabetol Metab Syndr* 2010;2,70.
- Wilsey J, Matheny MK, Scarpace PJ. Oral vanadium enhances the catabolic effects of central leptin in young adult rats. *Endocrinology* 2006;147,493-501.
- 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
- Xu TJ, Liu Y, Yuan B. Effect of insulin in combination with selenium on Irs/PI3K mediated GLUT4 expression in cardiac muscle of diabetic rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011;15,1452-1460.
- Yadav S., Day J.P., Mohan V., Snehathatha C., Braganza, J.M. Selenium and diabetes in the tropics. *Pancreas* 1991; 6, 528–533.
- 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.
- Yang GQ, Ge KY, Chen JS, Chen XS. Selenium-related endemic diseases and the daily selenium requirement of humans. *World Rev Nutr Diet* 1988;55,98-152.
- 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.
- Yoshida K, Hirokawa J, Tagami S, Kawakami Y, Urata Y, Kondo T. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus: regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia* 1995;38,201-210.
- Yuen V.G., Orvig C., McNeill J.H.. 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.
- Yuen VG, Orvig C, McNeill JH. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71, 263-269.

-
- Zaporowska H. and Scibior A., in *Vanadium in the Environment. Part 2: Health Effects*, ed. J. O. Nriagu, John Wiley & Sons Inc, New York, 1998; 16, 135–157.
 - Zatalia S.R. and Sanusi H., *The Role of Antioxidants in the Pathophysiology, Complications, and Management of Diabetes Mellitus*. *Acta Med Indones* 2013;45,141-147.
 - Zhang SQ, Zhong XY, Chen GH, Lu WL, Zhang Q., *The anti-diabetic effects and pharmacokinetic profiles of bis(maltolato)oxovanadium in non-diabetic and diabetic rats*. *JPP* 2008, 60, 99–105.
 - 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; 104,371-378.
 - Zheng HT, Zhou LN, Huang CJ, Hua X, Jian R, Su BH. *Selenium inhibits high glucose- and high insulin-induced adhesion molecule expression in vascular endothelial cells*. *Arch Med Res* 2008; 39,373-379.
- Zwolak I, Zaporowska H.. *Selenium interactions and toxicity: a review*. *Selenium interactions and toxicity*. *Cell Biol Toxicol* 2012; 28,31–46 .

