

**ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DEL EFECTO DEL
BIS(MALTOLATO)OXOVANADIO(IV) SOBRE EL
METABOLISMO DE ALGUNOS ELEMENTOS TRAZA**



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

LORENZO RIVAS GARCÍA

2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Lorenzo Rivas García
ISBN: 978-84-9163-824-7
URI: <http://hdl.handle.net/10481/50905>



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

El doctorando Lorenzo Rivas García y los directores de la tesis Dr. Juan Llopis González y Dra. Cristina Sánchez González:

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral titulada “Estudios *in vivo* e *in vitro* del efecto del bis(maltolato)oxovanadio(IV) sobre el metabolismo de algunos elementos traza”, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 4 de diciembre de 2017.

Directores de la tesis:

Dr. Juan Llopis González

Dra. Cristina Sánchez González

Doctorando:

Lorenzo Rivas García



DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

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

D^a Cristina Sánchez González. Profesora Contratada Doctora del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Directores de la Memoria de Tesis Doctoral de título “Estudios *in vivo* e *in vitro* del efecto del bis(maltolato)oxovanadio(IV) sobre el metabolismo de algunos elementos traza”, realizada por el doctorando Lorenzo Rivas García, autorizan su presentación ante el tribunal que en su día se designe.

Y para que conste y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente a 4 de diciembre de 2017.

Fdo: Juan Llopis González

Fdo: Cristina Sánchez González

AGRADECIMIENTOS

“La vida es aquello que te pasa mientras estas ocupado haciendo otros planes”

“Cuando yo tenía 5 años, mi madre me decía que la felicidad era la clave de la vida. Cuando fui a la escuela, me preguntaron qué quería ser cuando fuera grande. Yo respondí “Feliz”. Me dijeron que yo no entendía la pregunta y yo les respondí que ustedes no entendían la vida”.

“Vivir es fácil con los ojos cerrados”

JOHN LENNON

Comienza la parte más difícil de la tesis, lo que ha ocupado parte de mi tiempo estos últimos cuatro años mientras hacía y deshacía otros planes, desde que comencé este proyecto muchas personas han formado parte de él, me han ayudado a iniciarme como científico y ampliar mis conocimientos: sin embargo, lo más importante me han enseñado a ser más paciente, humilde y lo que significa el esfuerzo, el compañerismo y el valor del trabajo bien hecho.

En primer lugar, quería dar las gracias al creador de este plan, mi director Juan, qué mejor primer contacto con la investigación que con él, muchas gracias por tu paciencia, tu apoyo y tu dedicación durante este tiempo.

A Cristina, mi directora, gracias por tu cariño, positividad, esfuerzo y simpatía conmigo, no podría imaginar una tutora para esta tesis mejor que tú. Gracias por enseñarme tanto, por tu buena disposición siempre y por confiar en mí; nunca dejes de inventar y crear nuevos planes en investigación, son geniales.

Todos los planes necesitan ser ejecutados y para hacer esta tesis he tenido que apoyarme en grandes compañeros, el primero de ellos es Carlos, te agradezco tu actitud, lo mucho que me has enseñado y estar dispuesto a resolver las dudas más ilógicas e inverosímiles que me surgían a pesar de la hora que fuese y la distancia.

A Laura, mi gran compañera de laboratorio, por su positividad y afecto, espero que muy pronto leas tu tesis.

También debo acordarme de Jesús Porres, gracias por tu amabilidad y por poder contar contigo desde el primer momento; a Chari y Gary por vuestro apoyo y consejos, a Paco Arrebola, sin ti no hubiese podido hacer muchos ensayos de esta tesis.

Como no acordarme de Jenifer, gracias por hacer tan fácil mi primera colaboración con doctorandos de otra universidad (otro de los fantásticos planes de

Cristina), así como de todos mis compañeros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia: Pilar, María, Dani, Elena... Muchas gracias por darme la bienvenida.

Además, quiero agradecer a mi familia su apoyo incondicional en los momentos más duros no sólo de esta tesis, por brindarme optimismo en las situaciones más difíciles, en especial a mi madre, gracias por inculcarnos valores como el respeto, el esfuerzo y hacernos saber siempre a mi hermana y a mí que lo más importante es ser feliz.

A Marina, ha sido un placer y una responsabilidad ser partícipe de tu vida, ver como crecías, sé que siempre cuento contigo y no nunca de creer en ti como lo haces en mí.

A Alicia, muchas gracias por ser como eres, por no callar nunca y no parar de darme ánimos, compartir contigo todo este tiempo ha sido muy fácil.

Por supuesto, a todos mis amigos: Fran, Gema, Juanjo, Bea, Sandra, Paloma... como olvidar estas vivencias, viajes y buenos momentos, gracias por estar siempre ahí y por sacarme una sonrisa.

También a Mari Carmen y Manu, sé que siempre cuento con vosotros y vuestras palabras de ánimo han sido fundamentales para terminar esta tesis y sin vosotros sería imposible haberla imprimido.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

ADNmt	ADN mitocondrial
BEOV	Bis (ethylmaltolato)oxovanadio(IV)
BMOV	Bis(maltolato)oxovanadio(IV)
Ca	Calcio
CAT	Catalasa
Co	Cobalto
Ctrl	Transportador de cobre Ctrl
Cu	Cobre
CuCl ₂	Cloruro de cobre (II)
Cu/Zn SOD	Cobre-zinc superóxidodismutasa
DAPI	2-(4amidinofenil)-1H-indol-3-carboxamida
dG	2' deoxyguanosina
DMSO	Dimetilsulfoxido
DMT1	Transportador de metales divalentes
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Fe	Hierro
FFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IC	Intervalo de confianza
IRS-1	Receptor de la insulina 1
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
MnCl ₂	Cloruro de manganeso (II)

Mo	Molibdeno
mRNA	RNA mensajero
MTT	Bromuro de 3 (4,5-dimetiltiazol 2 ilo)
MtSSB	Proteína de unión a cadena sencilla
Ni	Níquel
O ₂	Oxígeno
OH	Hidroxilo
OTM	Momento de cola según Olivé
PBS	Tampón fosfato salino
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato sódico
Se	Selenio
SOD	Superoxido dismutasa
TM	Momento de cola/ tail moment
V	Vanadio
VOSO	Vanadil (IV) sulfato
Zn	Zinc

ÍNDICE

RESUMEN.....	12
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	14
2. INTRODUCCIÓN.....	20
2.1. Vanadio.....	18
2.2. Cobre.....	30
2.3. Manganeso.....	40
2.4. Oxígeno y radicales libres.....	44
2.5. ADN mitocondrial.....	51
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	53
3.1. Estudios “ <i>in vitro</i> ”.....	53
3.2. Estudios “ <i>in vivo</i> ”.....	57
3.3. Protocolos.....	62
3.4. Tratamiento estadístico.....	71
4. RESULTADOS.....	74
4.1. Estudios de viabilidad celular.....	74
4.2. Estudios de daño en ADN nuclear. Comet.....	96
4.3. Estudio en células HepG2 de los cambios de concentración de V, Cu y Mn, tras 32 h de exposición a dichos elementos.....	101
4.4. Estudios de delección y efecto sobre el número de copias de ADN mitocondrial.....	102
4.5. Estudios “ <i>in vivo</i> ”.....	104
5. DISCUSIÓN.....	109
5.1. Estudios “ <i>in vitro</i> ” de viabilidad celular.....	112

5.1.1. Sobre los estudios de viabilidad de células expuestas a diferentes concentraciones de vanadio	112
5.1.2. Sobre los estudios de viabilidad de células expuestas a diferentes concentraciones de cobre	113
5.1.3. Sobre los estudios de viabilidad de células expuestas a diferentes concentraciones de manganeso	114
5.1.4. Sobre los estudios de viabilidad combinando dos metales, cobre y manganeso, vanadio y manganeso y vanadio y cobre	115
5.1.5. Sobre los estudios de viabilidad en combinación de tres metales	116
5.2. Estudios de daño en ADN nuclear. Comet	117
5.3. Sobre los cambios en el contenido de V, Cu y Mn en células HepG2 tras 32 horas de exposición a dichos elementos solos o combinados.....	121
5.4. Sobre los experimentos de delección y número de copias de ADN mitocondrial.....	123
5.5. Estudios realizados “ <i>in vivo</i> ”	125
5.5.1. Sobre los parámetros de peso, ingesta de agua y alimento y leptina	125
5.5.2. Sobre la utilización digestiva y metabólica del cobre y manganeso.	125
5.5.3. Sobre la cantidad de V, Cu y Mn en los tejidos estudiados.....	127
6. CONCLUSIONES.....	131
7. BIBLIOGRAFÍA.....	136

El vanadio es un elemento traza muy abundante en la naturaleza y esencial para algunas formas de vida, no obstante, su papel como nutriente, así como su esencialidad en el organismo humano no se encuentran completamente establecidas. Este metal se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza desempeñando una función importante en numerosos procesos industriales, uso en deportistas (Barceloux, 1999) y en los últimos años se ha puesto de manifiesto el papel del vanadio en la regulación, incremento del transporte y metabolismo de la glucosa.

Todo esto hacen del vanadio un metal importante en la investigación biomédica.

No obstante, numerosos autores han destacado el efecto tóxico que provoca el vanadio, muchos de ellos asociados a su efecto pro oxidante (Oster et al., 1993; Sánchez-González et al., 2014a; Sánchez-González et al., 2014b; Ścibior et al., 2006).

El manganeso y el cobre son metales ampliamente distribuidos en los alimentos y que tienen una función conocida en el organismo humano, formando parte del funcionamiento normal de numerosas enzimas, destacando en enzimas asociadas a la defensa antioxidante como la superóxido dismutasa en sus diversas formas (Kemmerer et al., 1931; Marklund, 1984).

El vanadio altera el metabolismo de algunos elementos traza como Mg, Fe, Cu o Zn; aunque existen diversos estudios aislados acerca de la combinación del vanadio con cobre y manganeso, no nos explican de forma fehaciente algunos aspectos de la toxicidad y metabolismo.

Por tanto, este estudio plantea cómo la exposición sola o combinada del vanadio con metales antioxidantes como cobre y manganeso afectan a la homeostasis de ratas sanas y en algunos estudios *in vitro* en líneas celulares colónicas y hepáticas.

Para la realización de estos experimentos se eligió el bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV), ya que algunos autores han sugerido que es el compuesto de vanadio que más ejerce el papel hipoglucemiante y el menos tóxico (Caravan et al., 1995) y además, es estable en soluciones acuosas.

Los estudios se realizaron en dos fases:

- a) Estudios “*in vitro*”: sobre líneas celulares colónicas (HT-29) y hepáticas (HepG2) se realizaron estudios de viabilidad celular (MTT y cristal violeta) sobre distintas combinaciones de metales de vanadio, manganeso y cobre.



Además, sobre la línea hepática se realizaron estudios encaminados a determinar el daño en el ADN, mediante el ensayo Comet.

También se incluyeron estudios encaminados a determinar cambios en la estructura del ADNmt determinando el número de copias y las deleciones.

b) Estudios “*in vivo*”: dos grupos de ratas Wistar sanas fueron alimentadas con dieta AIN93 durante 5 semanas, siendo uno de estos grupos suplementado con una cantidad de vanadio en forma de BMOV en el agua de bebida. A estos animales se les controló el peso y la ingesta de alimentos durante el periodo experimental y durante la última semana se recogieron heces y orinas. Posteriormente fueron sacrificados y aislado el suero, riñón, hígado, bazo y corazón. Se midió la leptina en suero y la expresión génica de la hepcidina en hígado.

En los estudios *in vitro*, apreciamos que el vanadio tiene un descenso en la viabilidad celular al ser expuestas células de cualquier tipo de las ensayadas, esto se ve reducido al combinarlas con metales antioxidantes. Respecto a los ensayos de daño en ADN nuclear, también se manifiesta el descenso en el daño al combinar el Mn y Cu (sin embargo, siguen produciendo un elevado daño en el ADN).

En los estudios *in vivo* se aprecia que en los animales hay un descenso en la ganancia de peso, agua y alimento, un aumento de la expresión génica de la hepcidina y un descenso de la leptina hepática. Además, no se ven cambios de Mn y Cu en los tejidos.



1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El vanadio es un metal ampliamente distribuido en la naturaleza y que está presente en los tejidos de los mamíferos; sin embargo, su papel como micronutriente en el organismo humano no está completamente establecido.

En los últimos años se ha aclarado la participación del vanadio en las vías metabólicas de glucosa y lípidos. Presenta diversos 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 normalmente está en ambos estados de oxidación y se encuentra unido a proteínas en su mayoría, fundamentalmente a la transferrina. Su depósito en el organismo es el hueso (mayoría), riñón e hígado

Recientemente el vanadio ha adquirido gran importancia farmacológica debido a la actividad que presentan ciertos complejos en los que se encuentra este elemento ejercen como hipoglucemiantes. Compuestos de vanadio orgánicos, tales como el bis(maltolato)oxovanadio(IV), bis(etilmaltolato)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 propuesto en estudios “*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. Es decir, 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.

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. El V 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 V con efectos pro-oxidantes porque altera el metabolismo de diversos elementos traza como el Mg, Fe, Cu, Zn and Se. La presencia

de estrés oxidativo se encuentra asociada con cambios en la producción de citokinas, cambios inflamatorios y la presencia de algunos tipos de tumores. No obstante, se ha sugerido que el vanadio puede actuar como inhibidor en diferentes formas de cáncer

Hoy día, el mecanismo por el cual el vanadio ejerce su efecto tóxico es poco conocido, por lo que consideramos interesante la realización de este estudio.

Cobre y manganeso son dos metales ampliamente distribuidos en los alimentos y cuyo papel en el correcto funcionamiento del organismo ha sido completamente descrito. Así, el cobre participa en el metabolismo de hueso y funcionamiento del sistema inmune y el manganeso está presente en el metabolismo y en la cicatrización de heridas. Entre los efectos de ambos elementos destacan su participación en el funcionamiento de ciertas enzimas, entre ellas algunas relacionadas con la defensa antioxidante, como la superóxido dismutasa enzima que cataliza reacciones de dismutación y es fundamental en la defensa antioxidante. Esta enzima presenta diversas formas en las que el cobre y el manganeso juegan un efecto importante; así, la Cu/Zn SOD está presente en el citosol y la forma en la que participa el Mn se distribuye ampliamente en mitocondrias.

El efecto del vanadio sobre el metabolismo de estos dos metales no ha sido descrito en profundidad. Existen algunos estudios que se han centrado en su efecto “*in vivo*” sobre animales de experimentación. Sin embargo, los estudios “*in vitro*” sobre el metabolismo de cobre y manganeso en diversas líneas celulares expuestas a vanadio son prácticamente inexistentes, por lo que consideramos de gran importancia los experimentos llevados a cabo en este proceso de investigación.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar en profundidad el efecto del tratamiento con vanadio sobre la viabilidad celular y su efecto sobre la integridad del ADN nuclear y mitocondrial en cultivos de células colónicas y hepáticas, así como la influencia de la incorporación de cobre y manganeso a dichos cultivos de células tratados con vanadio. Además, y con el fin de incrementar el conocimiento sobre las interacciones entre vanadio, cobre y manganeso, se abordará un estudio “*in vivo*” para conocer si la ingesta de vanadio puede alterar la homeostasis del cobre y manganeso en la rata. Los resultados obtenidos permitirán comprender mejor el papel del vanadio como micronutriente, su actividad biológica y sus efectos tóxicos.



2. INTRODUCCIÓN

2.1. Vanadio

El vanadio es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, que es esencial para algunas formas de vida, pero que su papel como micronutriente, esencialidad y actividad biológica y farmacológica aún no se encuentra completamente definida. Actualmente el incremento de los niveles de vanadio en el medio ambiente debido a su amplio uso en los procesos industriales, su incremento como suplemento por atletas y deportistas y el creciente interés por el uso farmacológico de algunos compuestos de vanadio como hipoglucemiante, han conducido a que el estudio del metabolismo del vanadio sea actualmente una importante área de investigación. Sin embargo, muchos aspectos metabólicos aún no han quedado bien establecidos, como son las interacciones digestivas y metabólicas con otros elementos involucrados en la defensa antioxidante.

2.1.1. Antecedentes históricos

Numerosos compuestos de vanadio han sido utilizados con intención terapéutica en los últimos dos siglos, el primero de ellos se hizo en 1899, siendo el primer ensayo clínico conocido sobre el vanadio (Lyonnet et al, 1899), éste consistía en la prueba de los investigadores Lyonnet y colaboradores de ciertos compuesto sobre algunos de sus pacientes (algunos de ellos diabéticos), consistía en la ingestión de 4-5 mg de metavanadato de sodio cada 24 h tres veces por semana; como conclusión de éste primer estudio se concretó que algunos pacientes diabéticos obtuvieron una leve bajada de la glucemia sin apreciarse efecto negativo alguno.

Tuvo que pasar un siglo desde este primer ensayo con un complejo de vanadio destinado a su aplicación en la terapia para pacientes de diabetes mellitus (Thompson y Orvig, 2006a). En este ensayo se evaluó la seguridad, tolerancia, farmacocinética y biodisponibilidad a diferentes dosis crecientes de un complejo de vanadio, el bis (ethylmaltolato)oxovanadio(IV) (BEOV), en un total de 40 sujetos.

Años más tarde, hubo numerosas investigaciones encaminadas a determinar su esencialidad (Schroeder et al., 1963), metabolismo (Hopkins Jr. y Mohr, 1974) y síntomas que provoca su deficiencia. Además, se descubrió que el vanadio actuaba como inhibidor enzimático.

Finalmente, McNeill y colaboradores (Heyliger et al., 1985), agregando ortovanadato de sodio al agua de bebida de ratas STZ durante semanas descubrieron que, aliviaba muchos signos y síntomas asociados a la diabetes, con pocos efectos secundarios.

También, a principio de los años 80 se observó el efecto insulinomimético del vanadio *in vitro* a concentraciones de iones vanadio en el rango de 0,2-3 mM.

Por último, en 1992 se comprobó que el compuesto bis(maltolato)oxovanadioIV (BMVO) (McNeill et al., 1992) era más potente que el vanadio inorgánico y presentaba menos toxicidad.

2.1.2. BMOV

El bis(matolato)oxovanadioIV es un compuesto de vanadio que es de 2 a 3 veces más potente que el vanadio inorgánico como reductor de la glucosa además de ser mucho mejor tolerado (Caravan et al., 1995), pudiendo administrarse a los animales de experimentación en el agua de bebida con una efectividad similar a la del sulfato de vanadio (Sakurai et al., 1998)

Se realizó un estudio farmacocinético usando BMOV y VOSO (vanadyl (IV) sulfato) en el que se demostró que el primero era capaz de incrementar la captación del ión vanadio en comparación con el compuesto inorgánico (Thompson et al., 2006)

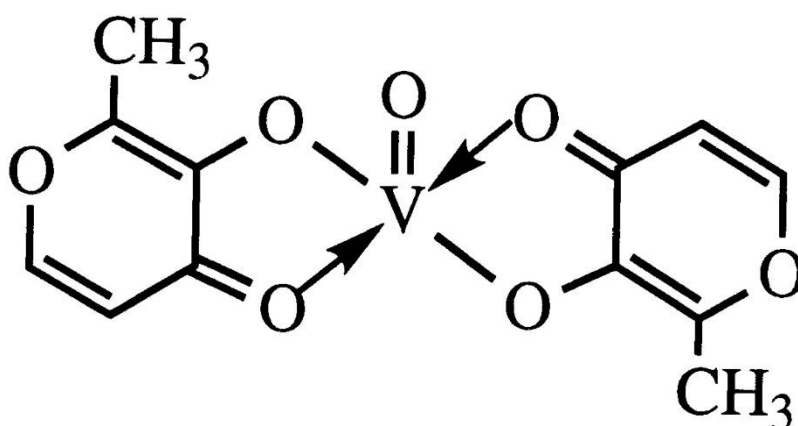


Figura 1. Bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV)

2.1.3. Fuentes de vanadio

El vanadio se encuentra presente en numerosos alimentos de diverso origen: tanto animal como es el caso de los mariscos como de origen vegetal estando presente en la sobre todo en semillas (pueden contribuir desde un 13 a un 30 % de las cantidades necesarias de vanadio en la dieta), pimienta negra o perejil; así como alimentos preparados.

Cabe destacar que podemos atribuir a ciertas bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza una fuente importante del vanadio en la dieta.

También el vanadio suele estar presente en alimentos de otra índole como edulcorantes o cereales para bebé (Mataix y Llopis., 2015)

2.1.4. Absorción y distribución

La mayoría del vanadio que se ingiere no se absorbe (sólo llegamos a absorber menos del 5% del vanadio consumido, siendo superior la del vanadato a la del vanadilo (Mataix y Llopis, 2015)) y por tanto, el restante se excreta a través de las heces (Nielsen, 1999). Normalmente, en personas no expuestas a vanadio encontramos menos de 0.8µg/L en la orina.

Se ha puesto de manifiesto que en ratas se absorbe el 35% de la dosis administrada como BMOV mediante técnicas de perfusión intestinal (Iglesias-González et al., 2012).

La mayoría de la absorción del vanadio tiene lugar en la parte superior del tracto gastrointestinal, el vanadio se transforma en el estómago en catión vanadil y así pasa al duodeno; sin embargo, otros estudios nos muestran que el vanadato puede entrar a las células a través de fosfato o por algún otro sistema de transporte de aniones, quizá esto pueda explicar el hecho de que el vanadio pentavalente es absorbido entre 3 y 5 veces más que el tetravalente. Además, debido al efecto que otros componentes de la dieta ejercen en las diferentes formas de vanadio en el estómago y la velocidad con la que pasa a tetravalente influye en el porcentaje total de vanadio que es absorbido.

Hay otros compuestos de vanadio que son inhalados y se dirigen directamente a los pulmones donde se depositan rápidamente, esto es importante en el caso de

trabajadores que están expuestos a vanadio ambiental presente en industrias (Venkataraman y Sudha, 2005).

En ratas se ha comprobado que el BMOV puede ser absorbido de forma rápida alcanzando una concentración máxima de vanadio de entre 0,6-0,4 horas tras la administración de una única dosis por vía subcutánea y de entre 2,4-0,9 horas tras la administración intragástrica de una dosis (Zhang et al., 2008).

Respecto a la distribución el vanadio se concentra principalmente en riñón, bazo, testículos, hígado y huesos. (Iglesias-González et al., 2012; Sánchez et al., 2011) En el caso del BMOV destaca en fémur, riñones e hígado (Sánchez et al., 2011; Katherine H. Thompson y Orvig, 2006a)

2.1.5. Mecanismo de acción del vanadio

El mecanismo de acción para los compuestos de vanadio es muy complejo, por lo que se han propuesto tres teorías:

- ✓ Que la formación in situ de peroxovanadatos permita la inhibición de las fosfatasa en la cascada de señalización de la insulina.
- ✓ Que el ion vanadil estimula las proteínas cinasas del citosol, evitando así los receptores de insulina.
- ✓ Que otros mecanismos juegan claramente un papel importante, como el llamado translocación de GLUT4 desde el compartimiento intracelular a la membrana plasmática (Katherine H. Thompson y Orvig, 2006b).

Además de las teorías propuestas se sabe hoy día que el ion vanadil y sus complejos actúan en al menos cuatro de los sitios involucrados en tirosin cinasa del receptor de la insulina, en las señales del transportador de transducción de la glucosa y fosfodiesterasa, en el mecanismo de ensamble que se encuentra principalmente en GLUT4 y fosfodiesterasa. Así como el papel del ion vanadil y sus complejos en la estimulación de la toma y degeneración de la glucosa (Kawabe et al., 2006).

La interacción pro-fármacos con proteínas séricas y entidades moleculares pequeñas, son un aspecto fundamental en el metabolismo de los fármacos, capaz de afectar de manera importante la distribución y biotransformación, así como el mecanismo de acción de agentes farmacéuticos (Thompson y Orvig, 2006b). Por ejemplo, la concentración de transferrina en el plasma tiene un 30% de sitios ligandos ocupados por Fe⁺, permitiendo sitios reservorios para la reacción metal-base fármacos.

Estos ligandos no toman lugar en ausencia del ion bicarbonato, el cual requiere el ion ligando vanadil para poder interactuar. Gracias a un sistema circulatorio depuratorio lento del ion vanadil, permite el incremento de la eficacia de éste *in vivo* (Thompson y Orvig, 2006a).

2.1.6. Transporte y excreción

Se han hallado dos proteínas de suero que podrían estar involucradas en el transporte del vanadio (transferrina y albúmina) (De Cremer et al., 2002)

La proteína más probable en la que se produzca es la transferrina, ésta se encuentra en una concentración de 37 mM y sólo un 30% de sus sitios de unión están ocupados quedando libre el resto para la unión con diversos metales (Nagaoka et al., 2004). Algunos estudios realizados *in vivo* han demostrado que la asociación del vanadio a la transferrina es independiente de la forma de vanadio, para ello primero se produce la disociación y posteriormente la forma vanadilo será la que se una definitivamente a la transferrina (Kiss et al., 2000)

El vanadio presenta una baja absorción a nivel gastrointestinal y el vanadio no absorbido se elimina a través de las heces (Venkataraman y Sudha, 2005).

La mayoría del vanadio absorbido se elimina a través de la orina, así como una porción que pueda excretarse por la bilis.

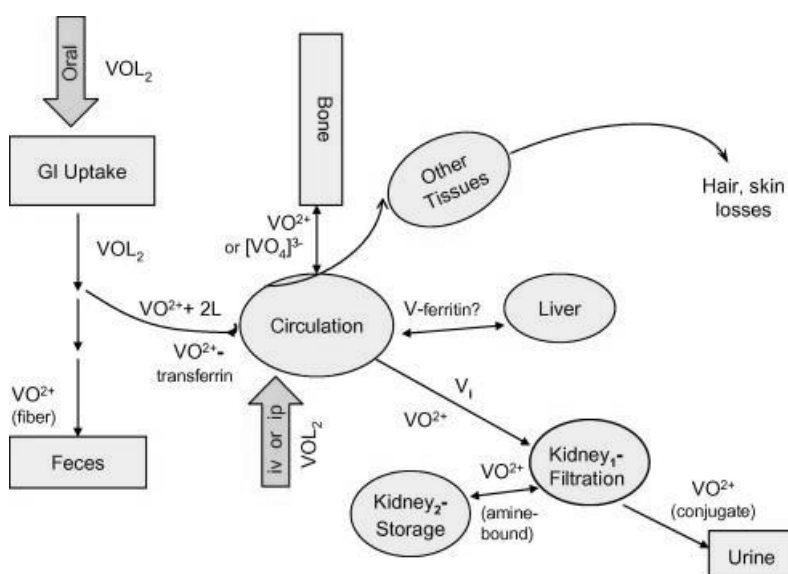


Figura 2.- Absorción, distribución y excreción del vanadio (Thompson y Orvig, 2006a)

2.1.7. Toxicidad

La toxicidad del vanadio varía según las dosis y el compuesto que se trate (Institute of medicine, 2001), así, dentro del amplio rango de compuestos el BMOV es aquel que ha mostrado menor toxicidad (Thompson y Orvig, 2006a) en contraposición al pentóxido de vanadio, que es el más tóxico (Institute of medicine, 2001).

En ratas se ha asociado una intoxicación de vanadio con síntomas como enteritis descamativa, congestión hepática con cambios en la composición de la grasa, alteraciones gastrointestinales (diarrea), lengua verde, retraso en el crecimiento y anorexia.

En seres humanos, no hay evidencia de intoxicación por vanadio asociada al consumo de alimentos, lo que puede deberse a su pobre absorción intestinal, sin embargo, si se ha visto en situaciones en las que hay una cantidad elevada de vanadio en el aire debido a la contaminación de origen industrial; en este caso, los síntomas fueron: molestias gastrointestinales, fatiga, lengua verde y en algunos casos calambres abdominales (Institute of medicine, 2001)

2.1.8. Intereses del vanadio

2.1.8.1. Vanadio y diabetes

a) Diabetes mellitus

Con el término diabetes mellitus se hace referencia a un síndrome de origen múltiple que se caracteriza por hiperglucemia con alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas (Conget, 2002) producida por deficiencias en la secreción de insulina, su acción o ambas causas.

El proceso de hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con alteraciones en órganos como ojos, riñones, nervios, corazón o vasos sanguíneos.

b) Clasificación

La American Diabetes Association estableció en el año 2011 cuatro tipos de diabetes:

- ✓ Diabetes tipo 1: es debida a la destrucción autoinmune de las células β del páncreas provocando una grave deficiencia en la secreción de insulina. Esta diabetes se da en el 5-10% de los casos.

Además, existe un tipo de diabetes tipo I: Diabetes Idiopática con etiología desconocida en la que los pacientes son propensos a la cetoacidosis, pero no hay evidencia de su origen autoinmune (Lozano, 2014).

- ✓ Diabetes tipo II: es la mayor incidencia (90-95%) de los casos, se debe a una resistencia en la acción de la insulina y acompañada en la mayoría de los casos por un defecto en su secreción. La prevalencia aumenta con la edad, obesidad y sedentarismo
- ✓ Diabetes gestacional: comprende al grado inicial de intolerancia a la glucosa que ocurre durante el embarazo; en la mayoría de los casos desaparece tras el parto (SEGO, 2013)
- ✓ Otros tipos de diabetes:
 - Defectos genéticos en las células β : algunos tipos están asociados a deficiencias en la función de estas células. Normalmente se presenta en edades tempranas.
 - Defectos genéticos en la acción de la insulina: estos se asocian a la mutación en los receptores de la insulina.
 - Enfermedades del páncreas exocrino: a veces, ciertas enfermedades pueden dañar el páncreas (pancreatitis, traumatismos, infecciones...) y generar diabetes.
 - Endocrinopatías: debido a un exceso de hormonas que contrarrestan la acción de la insulina
 - Medicamentos
 - Infecciones de ciertos virus

c) Acción del vanadio

En los últimos años ha quedado demostrado la acción hipoglucemiante e insulinomimética del vanadio tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* (Sánchez et al., 2011).

Así, el vanadio favorece el transporte y oxidación de la glucosa, síntesis de glucógeno, lipogénesis, inhibe la lipólisis y la gluconeogénesis. Sin embargo, el vanadio no reduce la incidencia de diabetes en ratones prediabéticos no obesos (Meyerovitch et al., 2000)

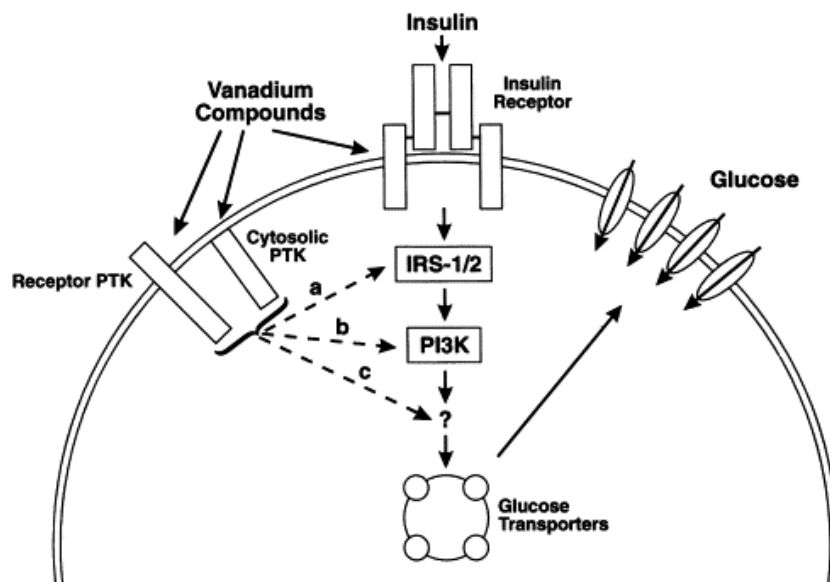


Figura 3: Mecanismo de acción de vanadio (Sakurai et al, 2008)

Otros aspectos ligados al vanadio han sido puestos de manifiesto en los últimos años, así, se ha demostrado que al administrar vanadio a ratas STZ disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada e incluso, en ensayos clínicos se ha comprobado que normaliza la glucosa en sangre y disminuye la hemoglobina glicosilada para pacientes con diabetes tipo I (Kurt et al., 2011).

Respecto a su implicación con la leptina muchos autores señalan que el vanadio incrementa la secreción de leptina (Chen et al., 2001), así como su señal de transducción (Wilsey et al., 2006).

Sin embargo, otros muestran que en ratas sanas hay un descenso significativo de la leptinemia tras tratarlas con vanadio (Sánchez-González et al., 2014a).

2.1.8.2. Vanadio y deporte

El uso del vanadio en culturistas es muy común (Gerrard et al., 1993), esto se debe a los efectos “insulinomiméticos” que presenta y a su carácter “anabólico”.

Así, con la suplementación de vanadio se pretende favorecer la entrada de glucosa al interior celular y, por tanto, su posterior almacenamiento en forma de glucógeno, que mejora el rendimiento y la recuperación. Además, favorece la activación de enzimas que degradan triglicéridos.

Sin embargo, otros estudios (Fawcett et al., 1996) realizados con la suplementación de sulfato de vanadilo (0,5 mg/kg/día) con deportistas, han demostrado que no hay mejora en la composición corporal ni en parámetros antropométricos.

No obstante, la formulación del vanadio (especialmente en forma de vanadilo) es muy frecuente en los complementos nutricionales destinados especialmente a culturistas.

2.1.8.3. Vanadio y medio ambiente

El vanadio es un elemento utilizado en diversas actividades económicas, destaca su empleo en la metalúrgica, formando aleaciones con otros metales (aluminio) para dar productos de alta resistencia y baja corrosión.

En la naturaleza no se encuentra de forma pura, por lo que suele reaccionar con otros compuestos. Su liberación a la atmósfera está causada por la actividad humana, por lo que puede considerarse como un contaminante ambiental. (64 mil toneladas descargadas anualmente, de las cuales el 91% proceden de la industria) (ICPS, 1988).

La presencia de altas cantidades de vanadio en la atmósfera puede ocasionar daños en los seres vivos, así, se han descrito daños en animales (Mochizuki et al., 1999) y en humanos se han descrito síntomas relacionados con la exposición prolongada a altos niveles de vanadio en trabajadores originando síntomas como molestias gastrointestinales, fatiga...

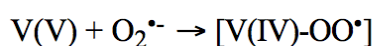
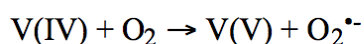
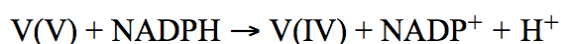
2.1.9. Vanadio y antioxidantes

El vanadio presenta efectos prooxidantes en algunos tejidos, especialmente eritrocitos, hígado y riñón asociado a que interacciona con elementos traza como hierro (Fe), cobre (Cu) y Zinc (Zn) (Ścibior et al., 2016; Yanardag y Tunali, 2006); también se considera que puede reducir los radicales libres que ocasionan el trastorno en el

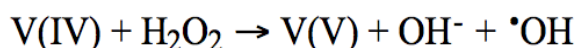
metabolismo de la glucosa, evitando el daño causado por diabetes (Yanardag y Tunali, 2006).

Al ser un metal de transición el vanadio tiene diferentes estados de transición; así, en plasma se reduce a vanadio (IV) por agentes antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para unirse posteriormente a proteínas plasmáticas.

Podemos considerar que las reacciones que aparecen en el interior celular son (Valko et al., 2005):



Las reacciones anteriores producen la formación de peroxovanadil [$V(IV)-OO^{\bullet}$] y vanadilo hidropéroxido [$V(IV)-OH^{\bullet}$]; el superóxido producido se transforma en H_2O_2 por dismutación con SOD. Por otra parte, se ha confirmado mediante estudios *in vivo* que se produce la reducción de un electrón no enzimática de vanadio mediada por fosfato y ascorbato y que esto supone una posibilidad importante del vanadio *in vivo*. Parece ser que en la inducción de lesión celular por vanadio tienen importancia las especies generadas por V (IV), H_2O_2 y por hidropéroxido de lípidos a través de la reacción de Fenton (Valko et al., 2005).



El $\bullet OH$ puede producir radical superóxido que se transforma en O_2 y H_2O por la superóxido dismutasa; incubando *in vitro* V(IV) con 2´deoxyguanosina (dG) o con ADN en presencia de H_2O_2 produjo un incremento de la 8-hidroxilo-2´deoxiguanosina (8-OH-dG) y roturas de la hebra de ADN. Si reacciona vanadio (IV) con t-butil hidropéroxido da lugar a radicales derivado del hidropéroxido que generan 8-OH-dG y rompen la cadena de ADN.

El vanadio (IV) rompe la cadena de ADN dependiente del oxígeno molecular de una forma similar a la que se ha medido para la hidroxilación de la dG (Valko et al., 2005).

Para investigar el efecto del vanadio en la inflamación pulmonar y el papel de ERO se hizo un estudio en ratones demostrando que el vanadio produjo gran afluencia de leucocitos polimorfo nucleares en el espacio aéreo pulmonar incrementando la respuesta inflamatoria. También, se incrementó las células de pulmón apoptóticas. Los resultados anteriores determinan que hay múltiples especies oxidativas en la inflamación pulmonar y la apoptosis inducida por vanadio, jugando un papel importante el H_2O_2 (Valko et al., 2005)

2.1.10. Vanadio e interacción con otros metales

Vanadio y cobre

Diversos autores señalan que, en general, no hay diferencias significativas entre la absorción del cobre y la absorción de los compuestos de vanadio, aunque esto difiere de lo obtenido en otros estudios (Rucker et al., 2002), en este caso se comprobó que la absorción de cobre no se afectaba por la presencia de vanadio para tejidos como el hígado. Sin embargo, sí favorecía la presencia de vanadio para otros tejidos como la piel y tendones.

Vanadio y manganeso.

Se ha comprobado que a las mismas dosis y en las mismas condiciones, presentan valores similares en las pruebas de viabilidad celular. Algunos estudios reflejan que el tratamiento con vanadio ($NaVO_3$) ayuda a normalizar las concentraciones de los elementos traza tisulares, como el Mn. (Chen y Tan, 2012)

Sin embargo, algunos autores reflejan que el tratamiento con vanadio de ratas no afecta al status de Mn (Sánchez-González et al., 2014a).

2.2. Cobre

El cobre es un mineral esencial para el funcionamiento correcto del organismo humano; al principio, se demostró que era requerido junto con el hierro para evitar la anemia en ratas (Mataix y Llopis., 2015), posteriormente se ha conocido su presencia en diversas funciones enzimáticas, siendo fundamental como protector frente al estrés

oxidativo, sistema inmunológico y en la expresión génica de muchos genes (Wachnik, 1988).

El contenido de cobre en el organismo va desde los 50 hasta los 120 mg, en su distribución destaca su presencia en músculo en mayor medida (40%), hígado (13%) y cerebro (9%) (Mataix y Llopis., 2015).

En el organismo puede encontrarse en dos estados diferentes de oxidación (Cu^{2+} y Cu^+), aunque predomina la forma reducida

El mantenimiento de los niveles de Cu^{2+} juega un papel fundamental en la síntesis de hemoglobina, elastina, y colágeno (Wachnik, 1988), no obstante, su alteración en los niveles de Cu está relacionada con enfermedades neurodegenerativas (Brown y Kozlowski, 2004).

2.2.1. Fuentes de cobre

La ingesta diaria para este mineral es de 0,9 mg/día.

Los alimentos con una concentración más alta de este mineral son los cereales integrales, frutos secos (tales como almendra y nuez) y algunas leguminosas; también destacan otros alimentos como hígado, pescado y marisco.

En épocas pasadas una parte importante del cobre procedía de la contaminación presente en los alimentos debido al uso de utensilios de cobre, aunque ha desaparecido prácticamente (Mataix y Llopis., 2015).

2.2.2. Funciones del cobre en el organismo

La principal función del cobre en el organismo es la de regular los procesos enzimáticos participando en numerosas enzimas; aunque destaca su papel en el estrés oxidativo, también está presente en otros procesos del organismo:

a) Cobre y el sistema nervioso

El cobre participa en la formación y mantenimiento de la mielina (estructura que recubre a los axones) y en la síntesis de noradrenalina (Klinman, 2006) y de catecolaminas con la enzima dopamina-beta-hidroxilasa.

Ciertos autores (Pickart et al., 2012) exponen que la proteína precursora amiloide (APP), que se asocia con la enfermedad del Alzheimer es capaz de convertir el Cu^{2+} en Cu^+ , incrementando el daño oxidativo. Por tanto, se sugiere que la falta de cobre está íntimamente ligada al Alzheimer, así como a otras enfermedades neurodegenerativas (Akatsu et al., 2012).

b) Cobre y hueso

El cobre participa en la enzima lisil-oxidasa, que es la responsable de generar un tejido conectivo más flexible y resistente gracias a los puentes cruzados que se generan entre el colágeno y la elastina (Lucero y Kagan, 2006). Además, el cobre es capaz de reforzar la masa ósea, incluso su deficiencia puede provocar anomalías en el esqueleto.

c) Cobre y sistema cardiovascular

El cobre participa en la homeostasis del sistema cardiovascular a diferentes niveles, así, al provocar los enlaces cruzados entre la elastina y el colágeno da la resistencia y consistencia adecuada a vasos sanguíneos, en casos de deficiencia se han descrito daños relacionados con los vasos (aneurismas...)

También, afecta al metabolismo del colesterol, así, se ha observado que una baja concentración de cobre da lugar a un aumento de los niveles de LDL-colesterol y un descenso de los de HDL-colesterol (Ghaffari y Ghiasvand, 2010); por tanto, un desequilibrio en el cobre puede provocar hipercolesterolemia (Klevay, 2000).

Por otra parte, se ha demostrado que el ion cobre es capaz de oxidar a las lipoproteínas de baja densidad de una forma similar a la acaecida en la oxidación celular, así, se establece una gran responsabilidad del cobre en el proceso aterosclerótico.

d) Hierro y cobre

Tal y como señalaban los autores Mataix y Llopis, la relación entre hierro, cobre y anemia demuestra la esencialidad del cobre como nutriente.

El cobre participa en la ferroxidasa I (ceruloplasmina) y II, éstas catalizan la oxidación del ion ferroso al ion férrico y facilitando que el hierro presente en plasma se una a la transferrina y consiga su transporte (Healy y Tipton, 2007) por lo que juega un papel importante en la anemia junto con el hierro.

También, facilita la formación de hemoglobina, glóbulos rojos y participa en la hematopoyesis.

e) Cobre y sistema inmunológico

Una deficiencia de cobre puede tener efecto sobre la cantidad de leucocitos (neutrófilos y macrófagos), así como provocar disminución de los neutrófilos en sangre (neutropenia). Debido a que la presencia de cobre es esencial para el correcto funcionamiento del sistema inmune.

f) Otros procesos

El cobre está implicado en otra serie de enzimas de naturaleza diversa, así, interviene en la síntesis de melanina al formar parte de la tirosinasa (Olivares y Solano, 2009), siendo importante para la pigmentación de la piel. También influye en la expresión de genes, cicatrización de heridas o la formación de cerebrósidos.

2.2.3. Absorción, metabolismo y eliminación

a) Absorción

La absorción de este mineral oscila entre el 50-70% y se realiza en su mayor parte a través del duodeno, aunque una pequeña parte puede darse a través del estómago (Wapnir, 1998), su entrada a la célula intestinal puede darse a través de dos mecanismos: bien a través del transportador de metales divalentes (DMT1), que es

capaz de transportar tanto Fe^{2+} como Cu^{2+} o bien a través del transportador de cobre Ctr 1 (usado con mayor frecuencia), que es solamente específico para el transporte de Cu^{2+} .

El Ctr 1 presente tres dominios transmembrana que forman un canal por el que permite el paso del mineral y presenta más afinidad por el Cu^+ (Mataix y Llopis, 2015). Además, se ha observado que el hCtr 1 posee un dominio intracelular al cual, en situaciones de elevada concentración de cobre, se le une este ion, posibilitando la degradación de dicho transportador mediante una proteasa específica (Zhou y Gitschier, 1997).

Tras este paso y ya en el interior de la célula, el cobre puede seguir distintos caminos: ser quelado por las metalotioneínas o bien unirse a las chaperonas que lo transportará hasta las cuproenzimas o unirse a la proteína de Menkes (ATP7A), que es capaz de capturar los iones de cobre y liberarlos al torrente sanguíneo.

La absorción de cobre viene condicionada por diversos factores, así uno de los que puede afectarle es la presencia de otros metales como es el caso del zinc (Zn); así altos niveles de Zn estimulan la producción de metalotioneína bloqueando el transporte entre las células y por tanto, provocando un descenso de la absorción del cobre (Hall et al., 1979), también se han descrito otros metales que presentan acción inhibitoria como el hierro (Fe) (Lucero y Kagan, 2006) (Collins et al., 2010), níquel (Ni) y molibdeno (Mo) (Arthington, 2003).

También dificultan su absorción algunos compuestos ampliamente distribuidos en los alimentos como los fitatos, fructos o el ácido ascórbico; incluso la leche de vaca. Sin embargo, hay otros que favorecen su absorción como la proteína animal, la leche humana o la histidina (Mazo y Shirina, 2005).

Otro de los factores que condiciona su absorción es su forma química, así, al aumentar su solubilidad aumenta su absorción por lo que el pH juega un papel muy importante en este factor al facilitar su solubilidad y al modular la interacción con ligando y otros componentes del bolo digestivo.

A ingestas bajas, la absorción ocurre probablemente por un transporte activo saturable, mientras que a ingestas altas juega un papel importante la difusión pasiva.

b) Metabolismo

Tras su absorción el cobre se une fundamentalmente a la albúmina y en menor medida a la transcuprina para ser transportado hasta el hígado.

Una vez allí, para entrar a las células hepáticas puede hacerlo a través de los transportadores DMT1 y Ctr1 (de forma análoga a como lo hace en el intestino) una vez dentro se une a las metalotioneínas o es transportado por las chaperonas a tejidos y enzimas (WALSHE, 1963). pasando a formar parte de la ceruloplasmina y otras proteínas.

Así, al aumentar el nivel de cobre éste provoca una traslocación en la ATP7B permitiendo la entrada de cobre al interior y desde ahí ser liberado al plasma o conjugarse con la bilis para su posterior excreción.

Más tarde, la ceruloplasmina drena hasta la sangre donde hará tanto la función enzimática como la función de transporte del metal.

Se ha puesto de manifiesto que hay en algunos órganos sitios de unión específicos para la ceruloplasmina y que por tanto, facilitan la entrada de cobre (Healy y Tipton, 2007).

Además, hay una serie de factores fisiológicos (gestación), fármacos... que afectan a la síntesis y liberación normal de la ceruloplasmina.

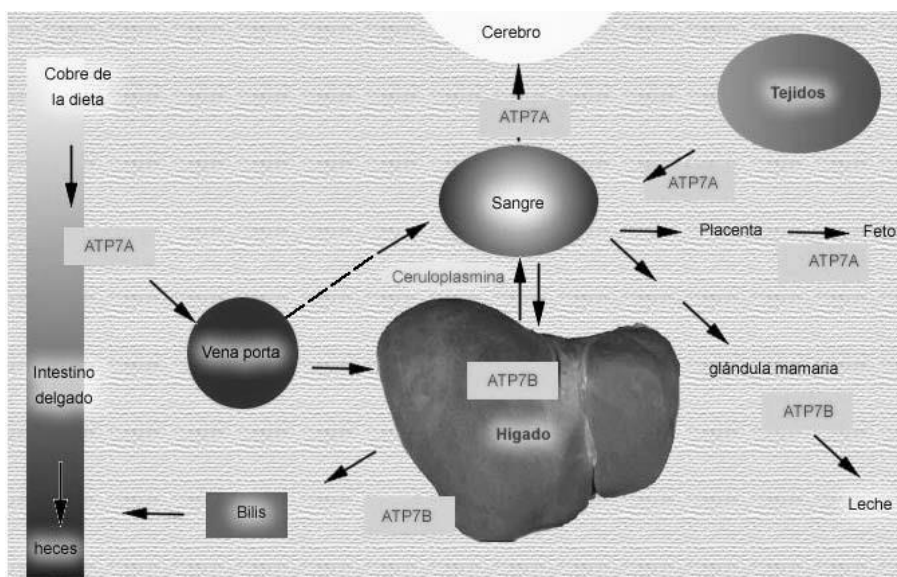


Figura 4: esquema de absorción, metabolismo y eliminación del cobre en el organismo

c) Eliminación

Una vez que actúa y llega a los tejidos, el cobre debe eliminarse, su excreción se realiza fundamentalmente a través del tracto gastrointestinal, fundamentalmente gracias a la bilis. La eliminación renal es muy poco importante (3%).

En el caso de la bilis su reabsorción a través de la circulación enterohepática es insignificante; sin embargo, en otras vías de eliminación como secreciones salivares, gástricas e intestinales esta reabsorción sí debe ser considerada.

2.2.4. Deficiencia

El cobre se encuentra presente fundamentalmente en el organismo humano órganos de gran actividad metabólica debido a su participación en los procesos enzimáticos, así, destaca en hígado y cerebro y, en menores proporciones, en riñón, páncreas y corazón.

El 40% del contenido se encuentra en músculo (formando la mayor reserva disponible) y podemos encontrarlo en bazo, huesos... en el caso de la sangre, en su mayoría, está presente unido a la ceruloplasmina (Turnlund et al., 1997).

El contenido corporal de cobre en los adultos es de 50-120 mg.

La deficiencia de cobre puede darse debido a numerosos orígenes: puede deberse a una disminución de los depósitos de cobre durante el nacimiento, a una inadecuada ingesta, a una pobre absorción, elevadas pérdidas o por un elevado requerimiento.

Hay algunas situaciones como quemaduras, diarreas, enfermedad intestinal, estrés, enfermedades de páncreas, enfermedad de Menkes (provoca una disminución del cobre disponible en el organismo), enfermos sometidos a diálisis... que generan unos requerimientos extra de este nutriente.

La deficiencia de cobre provocará una menor protección frente a los radicales libres al estar implicado en algunas enzimas antioxidantes y una disminución de la respuesta inmune, esta deficiencia se asocia con síntomas clínicos específicos como anemia, neutropenia y anormalidades óseas.

La deficiencia de cobre adquirida se asocia a síntomas hematológicos como anemia, granulocitopenia, desplazamiento a la izquierda de las curvas de maduración granulocíticas y eritrocitarias (Willis et al., 2005)

También se asocia síntomas a nivel neurológico, destacando la mielopatía que provoca movimientos espasmódicos (Bandmann et al., 2015.) y ataxia sensorial (Zara et al., 2008).

Además, otros autores han descrito manifestaciones como neuropatía periférica aislada, miopatía (Kumar et al., 2004) y neuritis óptica (Trebst et al., 2014), aunque su relación con la deficiencia adquirida de cobre no está establecida totalmente.

Una de las enfermedades ligadas a la deficiencia de cobre es la enfermedad de Menkes, esta es un síndrome genético autosómico recesivo ligado al cromosoma X ya que hay un error en el gen que codifica el ATP7A y provoca que el cobre quede atrapado en el enterocito, lo que genera una deficiente absorción de cobre, provocando un aumento de cobre a nivel intestinal (Vulpe et al., 1993).

Esta deficiencia aparece en los primeros meses de vida y se asocia a retraso en el crecimiento, defectos en la pigmentación y queratinización del cabello, degeneración de la elastina y deterioro mental progresivo.

2.2.5. Toxicidad

El cobre presenta una toxicidad baja por vía oral y sus efectos se deben tanto a la acción directa del metal como a su intervención en la absorción y distribución de otros metales como hierro y zinc.

En casos de intoxicación por cobre se pueden destacar daños hemolíticos y daño hepático y cerebral

Sin embargo, hay ciertas enfermedades que alteran el normal metabolismo del cobre en el organismo, como son la enfermedad de Menkes y de Wilson; ambas de debe a errores en los genes que codifican la ATP7A

Así, en la enfermedad de Wilson hay una disminución o ausencia de la enzima ATPasa (ATP7A), lo que impide el transporte de Cu desde el hígado hasta la circulación.

Por tanto, en estas circunstancias hay un acúmulo de cobre en diferentes tejidos como: hígado, riñón, córnea y sistema nervioso; además hay una menor síntesis de ceruloplasmina y menor excreción biliar.

Los síntomas causados por esta enfermedad incluyen: inflamación hepática crónica (cirrosis...), alteraciones neurológicas, psiquiátricas y en menor medida daños óseos, oftálmicos y hematológicos.

2.2.6. Cobre y defensa antioxidante

El cobre, gracias a su papel enzimático tiene una función importante en la defensa antioxidante, así, ayuda a neutralizar los radicales libres producidos durante los procesos metabólicos.

Entre las enzimas dependientes de cobre destacan:

-Superóxido dismutasa (SOD): es la principal enzima en la que interviene el cobre, es una de las oxidasas. Está presente en cerebro, tiroides e hígado.

-Lisil-oxidasa: está presente en el tejido conectivo y es esencial para su correcto funcionamiento. Deficiencias en esta enzima se asocian con daños estructurales en numerosos tejidos.

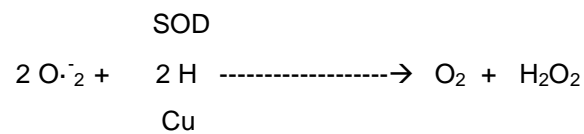
-Citocromo C oxidasa: cataliza la reacción de oxígeno a peróxido de hidrógeno durante la respiración celular. Está presente en hígado, cerebro y corazón.

La principal vía por la cual el cobre actúa como antioxidante se debe a su participación en la superóxido dismutasa, esta es una metaloenzima presente en las células que actúa como protectora frente al daño oxidativo; existen distintas formas de esta enzima: Cu/Zn-SOD (que requiere Zn y Cu para que esté activa), otra enzima que requiere manganeso para su actividad y que está localizada en mitocondrias y otra que está en plantas y requiere hierro.

La Cu/Zn-SOD está localizada en el citosol de la mayoría de los tejidos y es una parte integral del mecanismo de defensa del organismo contra las consecuencias del metabolismo del oxígeno. La Cu/Zn-SOD está localizada en el citosol de la mayoría de los tejidos y es una parte integral del mecanismo de defensa del organismo contra las consecuencias del metabolismo del oxígeno.

Es una enzima de estructura dimérica, dos subunidades, una de las cuales contiene cobre y la otra zinc.

La SOD cataliza la reacción de dismutación, por la cual los radicales superóxido formados en los procesos celulares son convertidos en oxígeno y peróxido de hidrógeno reduciendo la alta toxicidad (Hart et al., 1999). La SOD se encuentra en el interior de las células (citosol), no obstante, no hay presencia de SOD en el medio extracelular, por lo que las especies reactivas de oxígeno (ERO), producidas en esta zona, el organismo no puede defenderse por esta vía.



2.3. Manganeso

El Mn es un mineral esencial en el funcionamiento del organismo humano, desde 1931 se descubrió que era necesario para el crecimiento y reproducción de numerosos mamíferos (Kemmerer et al., 1931).

El contenido en el organismo es entre 10 y 20 mg, la mayor concentración se encuentra en el hígado y también destaca el contenido en hueso, aunque éste es sólo un almacén ya que no está disponible puesto que sólo se libera en ciertas condiciones (metabolismo normal del hueso o situaciones que aceleren la resorción ósea).

2.3.1. Fuentes de manganeso

Las concentraciones de este elemento en los alimentos oscilan entre 0,2 µg de Mn/g, en fuentes pobres como las carnes, productos lácteos y pescado, y 20 µg de Mn/g en fuentes importantes como frutos secos, cereales, legumbres y granos enteros. Las verduras y las frutas frescas suelen contener cantidades intermedias (0,2-2 µg de Mn/g).

También destacan té y el café, pudiendo éstos constituir hasta el 10% de la ingesta diaria para algunas personas (Gil, A; Gil, F; Navarro, 2010).

2.3.2. Funciones del manganeso en el organismo

El manganeso (Mn) tiene un papel importante en el correcto funcionamiento enzimático, ya que forma parte de las enzimas o actúa como activador.

a) Manganeso y metabolismo

El papel del manganeso es el funcionamiento de ciertas enzimas es evidente y está involucrado en el proceso metabólico; así, en la piruvato carboxilasa (enzima formada por un tetrámero que contiene un catión de Mn en cada unidad), ésta interviene en el proceso gluconeogénico catalizando la conversión de piruvato en oxalacetato (Kimura et al., 1996).

Otra de las enzimas en las que interviene es en la arginasa (metaloenzima de Mn) implicada en el ciclo de la urea (Ash, 2004), así como en la uricasa que forma parte de la síntesis de la urea.

También está presente en enzimas ligadas a la síntesis de ácidos grasos como es el caso de la acetil-CoA carboxilasa (Rasmussen et al., 1968)

Además, está implicado en el proceso de producción de glucosa a partir de sustratos distintos al glucógeno (gluconeogénesis), al participar en la fosfoenolpiruvato carboxikinasa.

b) Manganeso y hueso

El manganeso es el cofactor de las glicosiltransferasas que son necesarias para la síntesis de los proteoglicanos necesarios para la formación de cartílago y hueso (Strause y Saltman, 1987). Además, su deficiencia provoca un desarrollo anormal del esqueleto.

c) Otras funciones del manganeso

El manganeso se asocia a otras enzimas con propiedades muy diversas; está implicado en la síntesis de glucoproteínas y mucopolisacáridos que forman la protrombina y la heparina. Cabe destacar su papel en la cicatrización de heridas, ya que el manganeso es necesario para la activación de la prolidasa (Bhatti et al., 2006), enzima que tiene como función aportar prolina para la formación del colágeno en las células epiteliales.

También, en ocasiones puede actuar como metal divalente sustituyendo al magnesio (Mg) (Scorpio y Masoro, 1970).

2.3.3. Absorción y metabolismo y eliminación

a) Absorción

El manganeso presenta una absorción baja (en torno al 6% aproximadamente) en el ser humano (Mena et al., 1967) y que se realiza principalmente a nivel del intestino delgado, siendo mayor en jóvenes que en adultos.

El mecanismo de absorción es poco conocido, sin embargo, parece estar asociado íntimamente al transportador de metales divalentes (DMT1) (Au et al., 2008), además su absorción y la del hierro (Fe) parecen estar muy ligadas, probablemente debido a que presentan propiedades físico-químicas similares y algunos autores señalan que pueden compartir algunos procesos de absorción; así, altos niveles de Fe ejercen un

efecto negativo en la absorción del Mn y viceversa (se ha demostrado que hay mayor absorción de Mn en pacientes anémicos (Kim y Park, 2014; Thompson et al., 2007)).

También se han descrito comportamientos antagónicos con otros metales como calcio (Ca) y cobalto (Co) (Maas et al., 1969; Muzzarelli y Rocchetti, 1975).

Otros autores señalan que la absorción del manganeso también está condicionada por otros compuestos y no sólo por metales; por ejemplo, algunos componentes de la fibra dietética (sobre todo el ácido fítico) ejerce un efecto negativo en la absorción del metal ya que forma compuestos de gran tamaño que dificulta su absorción debido a su acción quelante (Gralak et al., 1996; James, 1980).

Por tanto, podemos concluir que la absorción se realiza en todo el tramo del intestino delgado en un proceso saturable, asociado a un transportado activo de elevada afinidad y baja capacidad que lo introducen en el interior de la mucosa (Gil, A; Gil, F; Navarro, 2010).

b) Metabolismo

Al igual que en el caso de la absorción, ciertos autores han planteado que el metabolismo del hierro está relacionado con el del manganeso, ya que una vez que el manganeso es absorbido una pequeña parte se oxida a la forma Mn^{3+} y se une a la transferrina y de esta forma es transportada a los tejidos (Gunter et al., 2013), utilizando una proteína de transporte que comparte con el hierro.

Sin embargo, en la mayoría de los casos una vez absorbido en forma de Mn^{2+} se une a la albúmina y a la α 2-macroglobulina y así es transportado hasta el hígado (Chapman et al., 1973).

c) Excreción

Su excreción se realiza a través de pérdidas fecales (99%) y sólo una pequeña parte se pierde por piel (0,7%) y orina (0,1%). Además, su vida media es corta 3-10 semanas.

2.3.4. Deficiencia y toxicidad

La toxicidad puede deberse a una excesiva exposición al metal como es el caso de mineros o bien por enfermos que presenten deficiencias en la excreción de

manganeso a nivel hepático (Bouchard et al. 2007); entre los síntomas se incluyen inestabilidad postural, cambios psiquiátricos (depresión, agitación...) (Mena et al. 1967), déficit cognitivos, se caracteriza por síntomas a nivel extrapiramidal similares al Parkinson (Guilarte, 2011); esto puede deberse a que el Mn se acumula en el hipocampo (Jackson et al., 2010) y esto puede ser el responsable de los trastornos derivados de la toxicidad de éste metal (Finkelstein et al., 2007).

Además, recientes estudios han puesto de manifiesto que la toxicidad del manganeso puede causar problemas auditivos (Ding et al., 2011).

La deficiencia de este mineral ha sido descrita en animales causando alteraciones en la tolerancia a la glucosa y problemas en el desarrollo fetal, también hay alteraciones en la función reproductora, debido a interferencias en la síntesis de hormonas y en alteraciones en la mineralización de hueso.

En humanos su deficiencia ha generado problemas en la coagulación y parece causar una deficiencia en la defensa antioxidante, debido a la acción que ejerce sobre numerosas enzimas

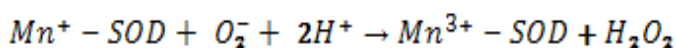
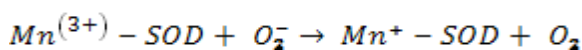
2.3.5. Manganeso y defensa antioxidante

El papel antioxidante del manganeso se debe a su participación en la estructura del superóxido dismutasa, una enzima implicada en el mecanismo en la eliminación del anión superóxido.

Ésta es una enzima con tres isoformas diferentes según el metal que ocupe su estructura, hay una variante que contiene Mn en el centro activo y se localiza principalmente en las mitocondrias (Marklund, 1984).

Forma parte del sistema de defensa antioxidante celular catalizando la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno.

Actualmente, se considera que muchos de los daños ocasionados en la deficiencia de Mn ocurren por los efectos tóxicos de la acumulación del anión superóxido (Rivera-Mancía et al., 2011)



2.4. Oxígeno y radicales libres.

El oxígeno apareció en la atmósfera terrestre hace dos mil millones de años y es esencial para la vida.

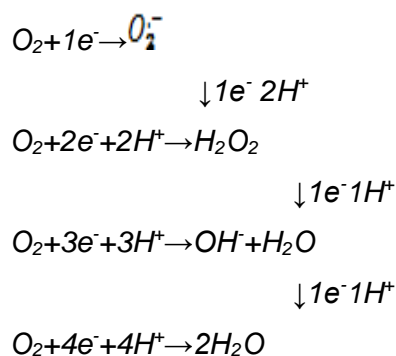
Sin embargo, a concentraciones elevadas e incluso a concentraciones parecidas a las de nuestra atmósfera puede resultar perjudicial para los seres vivos debido a que al entrar en contacto con otros factores que pueden provocar su reducción y causar radicales libres, que son los auténticos responsables de los efectos negativos que ejerce el oxígeno)

La molécula de oxígeno presenta en su estructura un electrón desapareado en cada orbital externo antienlazante π y aunque su reactividad es pequeña ya que la disposición de estos espines es de forma paralela. No obstante, su actividad puede aumentar si los espines tienen dirección antiparalela o bien si uno de los electrones se reduce y produce radicales libres de oxígeno.

Un radical libre es una molécula o fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo (van der Vliet et al., 1999), este electrón es el que le da una gran reactividad química.

Así, si damos energía suficiente a la molécula de oxígeno podemos invertir sus electrones externos y producir singlete de dos tipos: singlete delta ($^1\Delta_g O_2$), con una semivida larga y de gran importancia biológica o singlete sigma ($^1\Sigma_g^+$), mucho más reactivo, aunque con una semivida más corta.

Además, el oxígeno molecular puede reducirse de siguiendo los siguientes caminos dependiendo del número de electrones con el que interaccione:



2.4.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

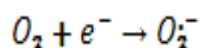
Hay una gran variedad de radicales libres que según el átomo del que provengan se denominan especies reactivas de ese elemento.

En la naturaleza destacan las provenientes del oxígeno, llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO); éstas se producen de forma natural continuamente, sin embargo, si se tienen una producción excesiva o cuando los sistemas de defensa son ineficaces pueden provocar daños celulares (Dixit y Cyr, 2003). También destacan las especies reactivas de nitrógeno (ERN).

La transferencia de los electrones a la molécula de oxígeno puede llevarse a cabo a través de la producción de intermedios reactivos, entre los que se encuentran:

a) Anión superóxido:

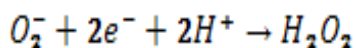
La molécula de oxígeno O_2 tiene dos electrones desapareados que al reaccionar con un electrón se convierte en el anión superóxido.



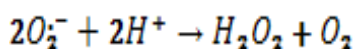
Aunque su actividad es muy escasa presenta una toxicidad alta debido a que a partir de él pueden producirse otros intermediarios muy reactivos, Así, se le considera una ERO primario que cuando interacciona con otras moléculas puede producir ERO secundarias (Valko et al., 2007).

b) Peróxido de hidrógeno

Se produce cuando el O_2 se reducen con dos electrones según la reacción:

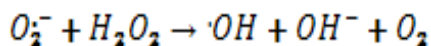


Otra forma de generarse consiste en la unión de dos aniones superóxido y dos protones dando lugar a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular, siguiendo esta reacción:

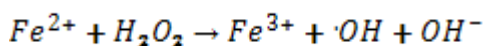
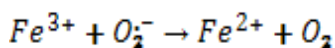


El peróxido de hidrógeno puede atravesar las membranas celulares y descomponerse en radical hidroxilo provocando procesos patológicos; ésta es la

reacción de Haber-Weiss, que se da al reaccionar directamente O_2^- con H_2O_2 (Cheeseman y Slater, 1993).



Otra de las posibles formas de generar iones hidroxilo es a través de la llamada reacción de Felton:



En esta reacción interviene el hierro (Fe), de hecho, algunas proteínas (apoproteínas...) son capaces de unirse a iones ferrosos y así tener cierta capacidad antioxidante.

2.4.2. Daño oxidativo.

Cuando hay un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes prevaleciendo las primeras se define estrés oxidativo (Chance et al., 1979); esto puede deberse a un exceso de prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o ambos de forma conjunta.

El estrés oxidativo está implicado en diversas patologías: así, procesos inflamatorios, tóxicos (Reuter et al., 2010) y metabólicos (Gerbitz, 1992; Reardon et al., 1992), carcinogénesis (Azad et al., 2010; Farinati et al., 2010), enfermedades cardiovasculares (Essick y Sam, 2010) e incluso en proceso fisiológico del envejecimiento (Haigis y Yankner, 2010)

Pueden interactuar con distintas moléculas biológicas:

a) Daño oxidativo en los ácidos nucleicos

Tanto ARN como ADN son susceptibles de interactuar con los radicales libres y las ERO, éstos actúan sobre el OH de las bases púricas y pirimidínicas y sobre las pentosas.

Los efectos derivados pueden ser alteración de las bases, rotura de la hélice e incluso modificaciones más complejas como adiciones o redistribuciones moleculares,

entrecruzamientos, mutaciones y en algunos casos daños profundos en el DNA que conllevan la muerte celular (Halliwell y Gutteridge, 1985)

b) Daño oxidativo en lípidos

Los ácidos grasos poli insaturados son los más susceptibles de ser atacados por los radicales libres (Cheeseman y Slater, 1993), puede provocar en ellos la peroxidación lipídica, que consiste en una reacción en cadena en la que el radical libre $\cdot\text{OH}$ y perhidroxilo junto con el oxígeno singlete reaccionan con los ácidos grasos para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens y Dix, 1991)

Este proceso comienza al quitar del radical libre un átomo de hidrógeno del metileno de la cadena hidrocarbonada originando un radical libre lipídico, éste para estabilizarse sufre un reajuste molecular produciendo un dieno conjugado que a su vez reacciona con el oxígeno formando radical peroxilo que puede dar endoperóxido o tomar un hidrógeno de un metileno de un ácido graso adyacente volviendo a formar un radical libre lipídico y un hidroperóxido; de esta forma se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo, esto produce alteraciones de sus propiedades: como alteración de su grado de fluidez y puede conducir a la inactivación de los receptores de membrana que en conjunto alterarán la función celular (Montuschi et al, 2004).

c) Daño oxidativo en glúcidos

Los glúcidos reaccionan fácilmente con los $\cdot\text{OH}$. Se conoce que algunos polisacáridos actúan como agentes protectores. Por ejemplo, la manosa y el manitol son eliminadores del $\cdot\text{OH}$. Su alteración es altamente importante en polisacáridos con función estructural ya que se fragmentan en unidades más sencillas

d) Daño oxidativo en proteínas

Las proteínas, son las especies químicas más susceptibles de ser atacadas por los radicales libres (Dalle-Donne et al., 2005). Todos los aminoácidos presentes en las proteínas contienen residuos susceptibles de ser atacados por radicales libres. Dentro de los aminoácidos destacan la tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína como los más susceptibles a procesos oxidativos (Davies et al., 1987)

El daño oxidativo, puede producirse por diferentes mecanismos: roturas de cadenas polipeptídicas y reacciones cruzadas, y pueden conducir a alteraciones funcionales

como inhibición enzimática, alteración de la unión a proteínas, alteración de la inmunogenicidad...

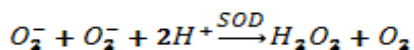
2.4.3. Antioxidantes

Las sustancias que, aun estando a bajas concentraciones presentan un sustrato oxidable que retrasa o previene la oxidación del mismo son las sustancias antioxidantes. Así, son capaces de impedir la oxidación que provocan los radicales libres. Podemos dividirlos en enzimáticos y no enzimáticos.

2.4.3.1. Antioxidantes enzimáticos

a) Superóxido dismutasa (SOD)

Son un conjunto de metaloproteínas ampliamente distribuidas; catalizan la reacción de formación del H_2O_2 a partir del anión superóxido acelerándola (aumenta la velocidad respecto a la espontánea unas 10.000 veces (Weisiger y Fridovich, 1973))



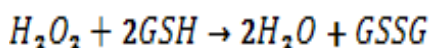
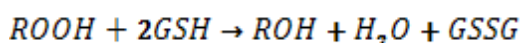
En los mamíferos se distinguen 3 formas de superóxido dismutasa en función del ion metálico de transición que encontremos en su estructura; así se distinguen 3 isoformas. Cu/Zn-SOD intracelular, es la forma mayoritaria, Mn-SOD, está en la matriz mitocondrial de todas las células y la Fe-SOD que se encuentra en procariotas.

La Cu/Zn-SOD es una proteína soluble que contiene como cofactores cobre y zinc. Existen muchas formas isoméricas localizándose la forma más abundante en el citosol y en menor cantidad en el núcleo (Chang et al., 1988) de todas las células. Esta isoforma, se encuentra en elevadas concentraciones en hígado, cerebro y testículos y en menor proporción en eritrocitos, pulmón y páncreas.

La Mn-SOD se encuentra mayoritariamente en la mitocondria de todas las células (Weisiger y Fridovich, 1973). Su presencia en la mitocondria es de gran importancia, puesto que la cadena respiratoria es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en las células (Boveris y Chance, 1973), evita los efectos del anión superóxido en el transporte electrónico mitocondrial.

b) Glutation peroxidasa

Cataliza la reacción de reducción de peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos. Está en el citosol de las células eucariotas aunque también puede estar en las mitocondrias.



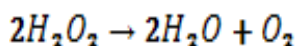
Existen dos isoformas una selenio dependiente y otra no selenio dependiente.

La selenio dependiente cataliza con gran eficacia la eliminación del peróxido de hidrógeno y se ve muy afectada su eficiencia por el selenio presente en la dieta (Baker et al., 1993).

c) Catalasa

La catalasa (CAT) participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno (Chance et al., 1979). Tiene una constante de velocidad bastante elevada, aunque tiene poca afinidad por el sustrato.

Su función se da cuando hay una elevada concentración de H_2O_2



2.4.3.2. Antioxidantes no enzimáticos.

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos destacan gran cantidad de sustancias, tomando especial importancia las vitaminas y minerales. Entre las vitaminas con poder antioxidante destaca: vitamina C, E y vitamina A.

Entre los minerales son muchos los que pueden desarrollar esa función, así se incluye el cobre, manganeso, vanadio, zinc o selenio.

También incluye otros elementos de naturaleza muy diversa como el glutatión (que está presente en casi todas las células y puede reaccionar con los radicales libres oxidándose él y reduciendo el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos o bien formando aductos covalentes), ubiquinona y bilirrubina.

Entre las vitaminas que actúan como antioxidantes se encuentran:

a) Vitamina C

Es un agente reductor y en esta propiedad se basa su poder antioxidante, aunque también es capaz de reducir Fe y Cu por lo que presenta un carácter doble prooxidante.

Así, reacciona con los radicales convirtiéndose en ácido dehidroascórbico que se regenera.

Destaca su presencia en cítricos.

b) Vitamina E.

Son una familia de compuestos fenólicos, destacando el α -tocoferol.

Su actividad antioxidante se debe al grupo $-OH$ fenólico. Debido a su liposolubilidad suelen concentrarse en membranas inhibiendo la peroxidación lipídica de éstas (Mejía-Toiber et al., 2006).

Destaca su presencia en aceites vegetales como el aceite de oliva.

c) Vitamina A

El retinol (vit. A) tiene una gran cantidad de precursores destacando fundamentalmente el β -caroteno, el retinol sólo está presente como tal en alimentos de origen animal, aunque en vegetales se encuentra en forma de carotenos (precursores) que se transforman en el organismo en vitamina A.

Los carotenos son los responsables de la acción antioxidante ya que desactivan el oxígeno singlete y los radicales peroxilos, aunque son las condiciones fisiológicas las que determinan el carácter prooxidante o antioxidante de éstos

d) Metales

Destaca la presencia de numerosos metales con capacidad antioxidante, entre ellos se encuentran:

- Cobre: el papel fundamental del cobre como antioxidante se debe a su participación en la actividad de cuatro enzimas; así, está presente junto con el Zn en la Cu/Zn-SOD intracelular, también actúa en la SOD extracelular, otra es la metalotionina que une Cu y que puede actuar como secuestrante de especies reactivas de oxígeno y la ceruloplasmina que elimina diversas especies reactivas de oxígeno protegiendo a los ácidos grasos de las membranas del daño oxidativo.
- Manganeso: forma parte de la superóxido dismutasa mitocondrial actuando como coenzima para el correcto funcionamiento de la enzima y permitiendo la eliminación de las especies reactivas producidas en la mitocondria.

2.5. ADN mitocondrial.

Cada mitocondria contiene su propio genoma en un número de copias que oscila entre uno y diez. El ADNmt es una molécula circular de doble cadena que se encuentra formando parte de complejos nucleoproteicos asociados a la membrana mitocondrial interna denominados, por analogía a los cromosomas bacterianos, nucleoides (Bogehagen et al., 2013). Dichos nucleoides se consideran la unidad de transmisión y herencia del ADNmt. En humanos se han descrito 27 proteínas presentes en los nucleoides junto al ADNmt, de estas 27 sólo 11 están directamente implicadas en el metabolismo del ADNmt tales como la ADN polimerasa mitocondrial γ , una proteína con actividad 5'-3' ADNhelicasa (Twinkle), la proteína de unión a cadena sencilla (mtSSB), o el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM).

En humanos, la molécula de ADNmt tiene un tamaño de 16549 pares de bases y su secuencia completa fue publicada en 1981. Su capacidad codificante es muy limitada puesto que codifica exclusivamente 37 genes: 13 polipéptidos que forman parte de complejos OXPHOS, 2 ARN ribosómicos (ARNr 12S y 16S) y 22 ARN de transferencia (ARNt) (Wang y Bogehagen, 2006).

Las trece proteínas codificadas en el genoma mitocondrial son subunidades estructurales de los complejos del sistema OXPHOS: 7 subunidades (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 y ND6) de las 46 que forman el complejo I (NADH deshidrogenasa), una (citocromo b, Cit b) de las 11 del complejo III (complejo bc1), tres (COI, COII, COIII) de las 13 del complejo IV (citocromo C oxidasa) y dos (ATP6 y ATP8) de las 16 proteínas que forman el complejo V (ATP sintasa). El resto de subunidades

polipeptídicas que forman estos complejos, juntamente con todas las subunidades del complejo II, y todas las proteínas reguladoras del metabolismo del ADNmt, están codificadas por el genoma nuclear. Todas ellas se traducen en el citoplasma y son importadas a la mitocondria mediante translocasas localizadas en las membranas mitocondriales (Herrmann y Neupert, 2000).

En mamíferos, la composición de nucleótidos de las dos cadenas del ADNmt es diferente: una de ellas es rica en residuos de guanina y timina y se denomina cadena pesada (H), mientras que la otra se denomina cadena ligera (L). Algunas de las características del ADNmt se pueden considerar consecuencias evolutivas de su pasado. Así, los genes estructurales del ADNmt no poseen ni 5' ni 3' UTR; no contienen intrones, y los espacios intergénicos son mínimos, llegando en algunos casos a solapar entre ellos. En la única región no codificante, que se denomina D-loop en mamíferos, se localizan el origen de replicación de la cadena pesada (ori H) y los promotores a partir de los cuales se inicia la transcripción mitocondrial (LSP y HSP).

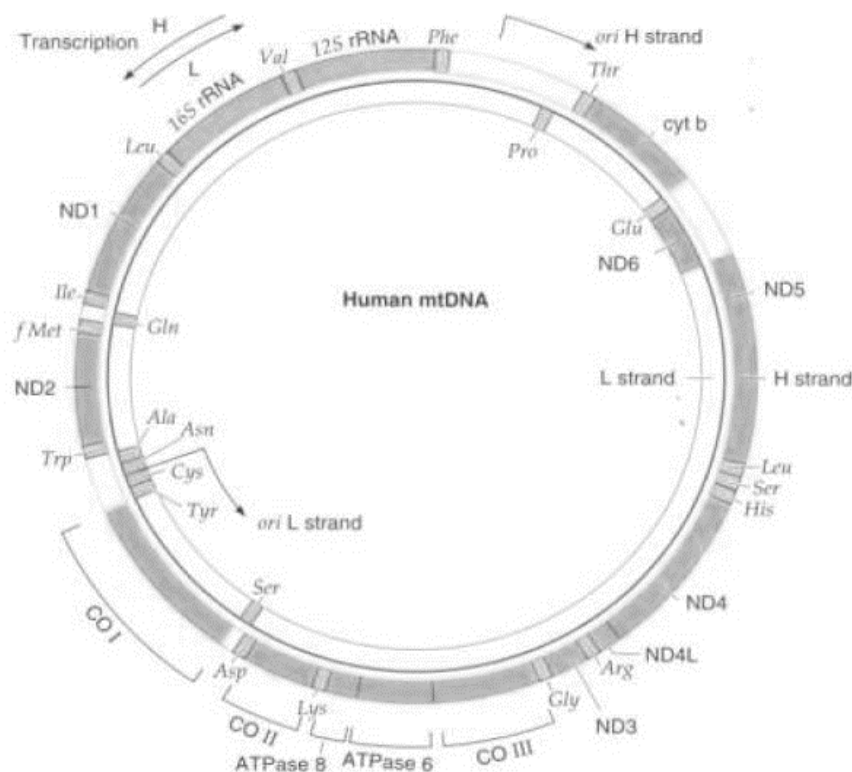


Figura 5: representación de ADNmt humano

2.5.1. Alteraciones de ADN mitocondrial.

El ADNmt presenta una mayor tasa de mutación que el ADN nuclear debido a la exposición a radicales libres procedentes del metabolismo oxidativo, mecanismos de reparación de los errores de la polimerasa deficientes y una elevada replicación (Zhou et al., 2014). Por tanto, el estudio de las alteraciones en el ADN mitocondrial es muy útil y dos de los parámetros más utilizados para abordarlo son las deleciones y la variación del número de copias.

En el caso de las deleciones, éstas pueden ser sencillas o múltiples y son una de las causas que se asocian a fallos en el ADNmt. Su abordaje tiene especial interés por 3 razones:

-Las deleciones esporádicas sencillas causan en ocasiones fallos en el funcionamiento de las mitocondrias (Schaefer et al., 2008).

-En algunos casos individuos con alteraciones mitocondriales presentan múltiples deleciones en el ADNmt en los tejidos afectados como el músculo y el sistema nervioso central (Taylor y Turnbull, 2005).

-Hay evidencias que relacionan las deleciones en el ADNmt en tejidos con enfermedades neurodegenerativas (Bender et al., 2006).

También, algunos autores han propuesto que la mayoría de las deleciones ocurren durante el proceso de reparación del ADN que ha sido previamente dañado, más que durante el proceso de replicación (Krishnan et al., 2008), por lo que medir la cantidad de deleciones de ciertos genes podría ayudar a conocer el grado de daño que han sufrido.

Respecto a las alteraciones en el número de copias, éstos repercuten en la eficiencia energética de la mitocondria y pueden inducir sobre los mecanismos apoptóticos. Así, es un marcador de la renovación mitocondrial, así, un descenso el número de copias de ADNmt puede indicar que la síntesis de nuevas mitocondrias está reducida bien debido a un problema en la biosíntesis o bien porque las existentes son suficientemente funcionales y no es necesario renovarlas.

Para abordar las alteraciones relacionadas con el AND mt, deben estudiarse las deleciones y las alteraciones relacionadas con el número de copias. En el caso de las deleciones, éstas son el 30% de las alteraciones aparecidas en pacientes. Pueden ser esporádicas o múltiples. Gran parte de los estudios realizados por otros autores señalan que tanto para las deleciones como para la alteración en el número de copias deben estudiarse la relación entre dos genes del ADNmt, el ND1 y ND 4, debido a que el gen ND1 es más vulnerable a los cambios y el ND4 es más resistente (Krishnan et al., 2007).

Así la cuantificación entre ambos nos dará una idea de cómo se encuentra dañado el AND mt (Grady et al., 2014).

El estudio de los daños producidos en el ADNmt, ha sido propuesto por algunos autores como un biomarcador asociado a los procesos relacionados con el estrés oxidativo (Huang et al., 2016).



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Estudios “*in vitro*”

Cultivos y condiciones

Se utilizaron dos líneas celulares siendo ambas suministradas por el banco de células del CIC de la universidad de Granada.

Se empleó la línea celular HepG2; éstas fueron aisladas por primera vez de un carcinoma hepatocelular bien diferenciadas de un adulto caucásico de 15 años. Tienen una morfología epitelial y la línea HT-29, en este caso estas células se aislaron por primera vez en una mujer caucásica de 44 años y fueron establecidas en 1975 derivadas de células de adenocarcinoma de colon. Presentan morfología epitelial

Los cultivos iniciales fueron mantenidos en frascos con medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con suero bovino fetal (SBF, Sigma) y glutamina 2 Mm (Sigma).

Las células se mantenían incubadas en una estufa a 37°C y una atmósfera de CO₂ al 5%. Los subcultivos (en frascos o placas) se hicieron en condiciones de esterilidad usando una campana de flujo laminar vertical.

Las células se mantenían cambiando el medio cada 1-2 días tras tres lavados con tampón fosfato salino (PBS, Sigma). Cuando se llegaba a un 70-80% de confluencia, las células eran subcutivadas, para ello tras retirar el medio y lavarlas con PBS se despegaban del soporte con tripsina-EDTA (0,25% tripsina-1 mM EDTA, Sigma) durante 7-8 minutos en estufa; posteriormente, se le añadía doble cantidad de medio que de tripsina para inactivarla y se centrifugaba a 1000 g durante 6 minutos.

Por último, antes de volver a sembrarlas se les agitaba con una pipeta Pasteur estéril.

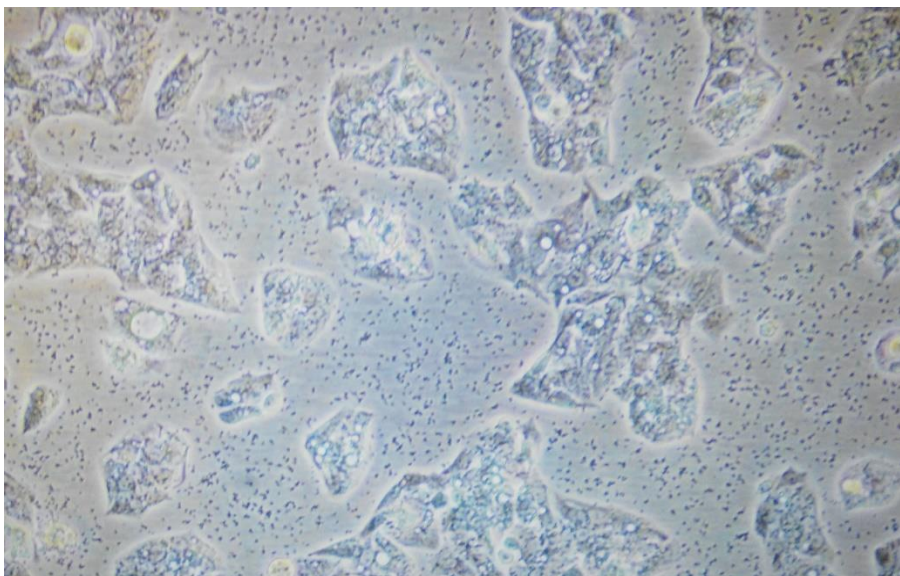


Figura 6: células HepG2 vistas con microscopio óptico (20x).

- **Exposición a cobre**

Para la exposición de las células a cobre se utilizó el cloruro de cobre CuCl_2 (Panreac), éste ya ha sido empleado en otros experimentos con células (Ferruzza et al., 2000) preparando diluciones a una concentración de 1 mg/L, 2 mg/L y 3 mg/L en agua bidestilada.

- **Exposición a manganeso.**

Para la exposición de las células a cobre se utilizó el cloruro de manganeso MnCl_2 (Sigma), éste compuesto ha sido utilizado en otros experimentos con células (Jiang et al., 2014), se prepararon diluciones a una concentración de 1 $\mu\text{g/L}$, 2 $\mu\text{g/L}$ y 3 $\mu\text{g/L}$ en agua bidestilada.

- **Exposición a vanadio.**

En el caso del vanadio el compuesto a estudiar fue el bis(maltolato)oxovanadio (IV), preparado en el momento de la administración a partir de sulfato de vanadio (IV) hidratado (Sigma) y maltol (3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona) (Sigma) disueltos en agua bidestilada.

Elemento	Compuesto	Concentraciones	Ensayos	Líneas celulares
V	BMOV (IV)	350 µg V/L 750µg V/L 1,5 mg V/L 3 mg V/L	Viabilidad celular: MTT y cristal violeta	HT 29- HepG2
Cu	CuCl ₂	1 mg Cu/L 2 mg Cu/L 3 mg Cu/L	Viabilidad celular: MTT y cristal violeta	HT 29- HepG2
Mn	MnCl ₂	1 µg Mn/L 2 µg Mn/L 3 µg Mn/L	Viabilidad celular: MTT y cristal violeta	HT 29- HepG2
V-Cu	BMOV (IV) CuCl ₂	1,5 mg V/L-1 mg Cu/L 1,5 mg V/L-3 mg Cu/L 3 mg V/L-1 mg Cu/L 3 mg V/L- 3 mg Cu/L	Viabilidad celular: MTT y cristal violeta	HT 29- HepG2
V-Mn	BMOV (IV) MnCl ₂	1,5 mg V/L-1 µg Mn/L 1,5 mg V/L-3 µg Mn/L 3 mg V/L-1 µg Mn/L 3 mg V/L-3 µg Mn/L	Viabilidad celular: MTT y cristal violeta	HT 29- HepG2
Cu-Mn	CuCl ₂ MnCl ₂	1 mg Cu/L-1 µg Mn/L 1 mg Cu/L-3 µg Mn/L 3 mg Cu/L-1 µg Mn/L 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L	Viabilidad celular: MTT	HepG2
V-Cu-Mn	BMOV (IV) CuCl ₂ MnCl ₂	1 mg Cu/L-1 µg Mn/L-1,5 mg V/L 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L-3 mg V/L 3 mg Cu/L-1 µg Mn/L-3 mg V/L 1 mg Cu/L-3 µg Mn/L-3 mg V/L 1 mg Cu/L-1 µg Mn/L-Mn-3 mg V/L 1 mg Cu/L-1 µg Mn/L-V 1,5 mg V/L 3 mg Cu/L-1 µg Mn/L-1,5 mg V/L 1 mg Cu/L-3 µg Mn/L-1,5 mg V/L 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L-1,5 mg V/L	Viabilidad celular: MTT	HepG2
V	BMOV (IV)	3 mg V/L	-Comet (Daño ADN nuclear) -Captación celular del metal - N° de copias y delección de ADN mitocondrial	HepG2
Cu	CuCl ₂	3 mg Cu/L	-Comet (Daño ADN nuclear) -Captación celular del metal - N° de copias y delección de ADN mitocondrial	HepG2

Mn	MnCl ₂	3 µg Mn/L	-Comet (Daño ADN nuclear) -Captación celular del metal - N° de copias y delección de ADN mitocondrial	HepG2
Cu-Mn	CuCl ₂ MnCl ₂	3 mg Cu/L-3 µg Mn/L	-Comet (Daño ADN nuclear) -Captación celular del metal - N° de copias y delección de ADN mitocondrial	HepG2
V-Cu	BMOV (IV) CuCl ₂	3 mg V/L- 3 mg Cu/L	-Comet (Daño ADN nuclear) -Captación celular del metal - N° de copias y delección de ADN mitocondrial	HepG2
V-Mn	BMOV (IV) MnCl ₂	3 mg V/L-3 µg Mn/L	-Comet (Daño ADN nuclear) -Captación celular del metal - N° de copias y delección de ADN mitocondrial	HepG2
V-Cu-Mn	BMOV (IV) CuCl ₂ MnCl ₂	3 mg V/L-3 µg Mn/L-3 mg Cu/L	-Comet (Daño ADN nuclear) -Captación celular del metal - N° de copias y delección de ADN mitocondrial	HepG2

Tabla 1. Diseño de experimentos *in vitro*

3.2. Estudios “*in vivo*”

Animales y dietas

Los experimentos fueron llevados a cabo durante 5 semanas, para ello se utilizaron ratas Wistar macho de un peso comprendido entre 190-220 gr (proporcionadas por los laboratorios Charles River, L’Abresde, Francia), éstos animales fueron divididos al azar en dos grupos: un grupo control y un grupo sometido a una suplementación con vanadio.

El grupo control (C) estuvo formado por 10 ratas sanas alimentadas con la dieta semi-sintética AIN93M, que contenía 44,5 mg de Cu, 12,8 mg de Mn y 60 mg de V por kg de alimento y se les permitió durante todo el periodo experimental el acceso “ad libitum” al alimento y agua de bebida (calidad mili-Q).

El grupo suplementado con vanadio (V) estaba constituido por 10 ratas sanas alimentadas con la misma dieta AIN93M. El vanadio se suministró como

bis(maltolato)oxdovanadio(IV) (BMOV) en el agua de bebida, la cual contenía 6,22 mg de BMOV por día, lo que suministraba 1 mg V/ día. En todos los casos, la solución de BMOV se preparó y administró diariamente en el agua de bebida durante todo el periodo experimental (Sánchez-Gonzalez et al., 2012b).

Grupo	Dieta	Suplementación	Parámetros monitorizados y recogida de muestras	
Grupo Control	AIN93M Agua <i>ad libitum</i>	Ninguna	Semanal	Evolución de peso corporal Ingesta de agua y alimento
			Final	Suero Riñón, bazo, hígado y corazón Heces y orina
Grupo Tratado	AIN93M Agua <i>ad libitum</i>	1 mg V/día en agua de bebida	Semanal	Evolución de peso corporal Ingesta de agua y alimento
			Final	Suero Riñón, bazo, hígado y corazón Heces y orina

Tabla 2. Diseño de experimento *in vivo*

A lo largo del periodo experimental, fue controlado el peso de los animales y el consumo de agua y de comida.

Cada mañana a las 9.00 a.m. el resto de agua del día anterior fue reemplazado por agua nueva y se calculó la cantidad consumida. El día 35, después de una noche de ayuno, las ratas se anestesiaron por inyección intraperitoneal de 5 mg de pentobarbital sódico/100 gr de peso (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y desangradas por canulación de la aorta posterior.

La sangre se recogió y se centrifugó a 1200 G durante 15 minutos para separarla del suero. Algunos tejidos como riñón, bazo, hígado y corazón se retiraron, pesaron, se colocaron en viales de polietileno y se almacenaron a -80°C.

Durante los últimos 7 días del periodo experimental, se recogieron las heces y orina cada 24 h y se almacenaron a -80°C en envases de polietileno para su análisis. Todos los animales fueron mantenidos en jaulas individuales desde el primer día, estas jaulas están diseñadas para la recogida selectiva de heces y orina. Las jaulas se han

mantenido en un lugar bien ventilado, en habitaciones de temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) con una humedad relativa ambiental del 40-60% y en 12 horas de luz-periodo oscuro.

Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las guías de cuidado y mantenimiento animal y todos los procesos fueron aprobados por el Comité ético de experimentación animal de la Universidad de Granada.

3.3. Protocolos

Recuento celular

Para proceder al conteo celular se empleó la cámara de Neubauer, para ello se introdujo en la cámara una dilución con las células y una dilución de azul tripan y PBS (0,4%, Sigma). Para el recuento se empleó un microscopio con el aumento adecuado (20x). Este conteo nos permitió conocer el número de células que había en la dilución y hacer una siembra adecuada a los ensayos a realizar.

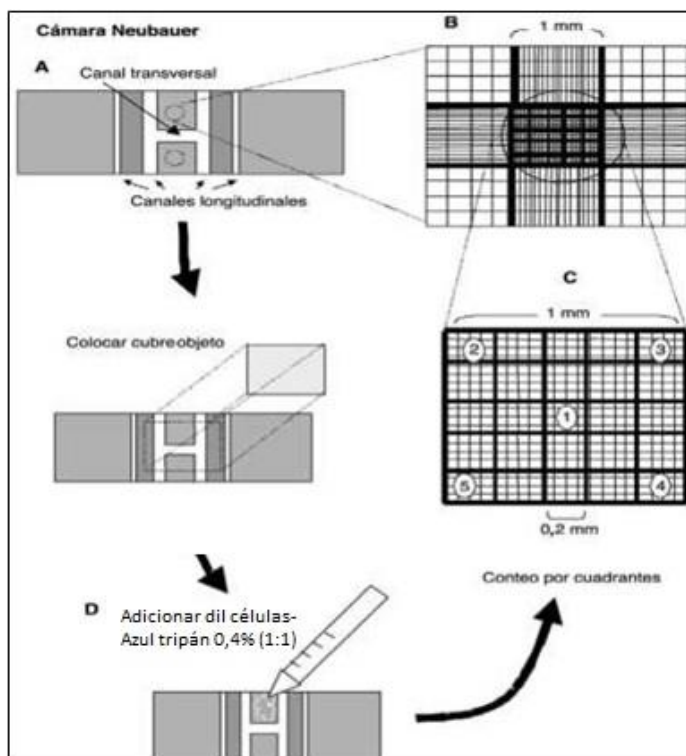


Figura 7: esquema de manejo de la cámara Neubauer

Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El ensayo de MTT fue desarrollado por Mosmann en 1983 (Mosmann, 1983) y posteriormente modificado por Denizot y Lang 3 años más tarde en 1986 (Denizot y Lang, 1986), se basa en la reducción del bromuro de 3 (4,5-dimetiltiazol 2 ilo) 2,5-difeniltetrazol (reactivo conocido como MTT, Sigma) por la succinato deshidrogenasa mitocondrial produciendo formazán de color azulado, que tiene un máximo de absorbancia a 570 nm; así, la cantidad de formazán producida es proporcional a la cantidad de células vivas.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (20.000 cél/ pocillo) y fueron mantenidas hasta que alcanzaron un 70% de confluencia, posteriormente se le añadió una dilución de medio de cultivo/MTT (0,5 mg/ml) y se mantuvo durante 3 horas en la estufa a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se retiró el medio y se le añadió dimetilsulfóxido (DMSO) y tampón glicina de Sorensen (que facilita la disolución del MTT/formazán en el DMSO).

Ensayo de viabilidad celular cristal violeta

En ensayo cristal violeta fue descrito en 1992 por Okajima para la determinación de la viabilidad celular (Okajima et al., 1992).

Para proceder a este ensayo las células una vez sembradas en la placa de 96 pocillos se les mantiene en estufa cambiando el medio progresivamente hasta alcanzar una confluencia celular del 70%.

Una vez alcanzada se les somete a diferentes concentraciones de los metales a estudio y se les mantiene en incubación durante un tiempo estipulado.

Posteriormente se retira el medio con el metal y se añade metanol durante 30 minutos con la intención de fijar las células en el fondo del pocillo, una vez retirado se le añade cristal violeta y se les mantiene en contacto durante 20 minutos para teñir las células.

Después se lavará en dos partes, una para retirar el cristal violeta y en otra se aclarará hasta que el agua salga limpia.

Más tarde, se mantiene en la estufa a una temperatura de 37 °C hasta que se elimine toda el agua.

Por último, se añade SDS (dodecil sulfato sódico) al 1% y rápidamente se mide con un lector de placa a una longitud de onda de 570 nm.

Ensayo Comet

El ensayo Comet o electroforesis en gel de células individuales es un método desarrollado por primera vez en el año 1984 por Östling y Johansson (Ostling y Johanson, 1984) y posteriormente modificado por otros autores (Olivé y Banáth, 2006; Singh et al., 1988).

Se emplea para medir el daño en el ADN y así estimar el daño ocurrido en el material genético.

Se basa en que en el núcleo celular el ADN que se encuentra íntegro tiene una asociación organizada con las proteínas nucleares formando una estructura compacta; sin embargo, al dañarse las cadenas de ADN pierden su estructura ordenada y se mueven hacia fuera del núcleo. Por tanto, al aplicar un campo eléctrico al ADN, este se irá hacia la parte positiva del ánodo (ya que presenta una carga neta negativa); por el contrario, la parte no dañada permanecerá cerca del núcleo debido a que sus es más grande.



Figura 8: esquema de ensayo comet

Así, la cantidad de ADN que sale del núcleo es una medida del daño en el ADN celular; para medir la cantidad de daño emplearemos un marcador fluorescente como 2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida (DAPI) o el bromuro de etidio que se

intercala en las cadenas de ADN y mediremos la intensidad de fluorescencia del ADN migrado con un análisis de imagen.

Al verlos al microscopio la estructura se asemeja a la de un cometa (por ello el nombre de ensayo de Comet), con una cabeza que corresponde al ADN intacto nuclear y la cola con el ADN dañado, su longitud y luminiscencia será proporcional al daño producido.

Para proceder al ensayo de Comet tendremos la precaución de emplear oscuridad para evitar un daño adicional en las células causado por la luz y del uso de hielo para impedir que se repare el DNA.

El primer paso a realizar será la preparación de las capas de agarosa, para ello se preparará una solución al 0,5% de agarosa de punto de fusión normal y se hace una extensión en el portaobjetos de tal forma que forme una extensión sin grumos.

Tras ello, se dispone una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión en la que se incluirán las células (con un 65-75% de confluencia disueltas en PBS), todo ello en una concentración de 0,5%. Para su disposición, se dispondrá la mezcla dibujando una ligera línea en el portaobjetos sobre la capa de agarosa anterior y pondremos el cubreobjetos evitando que se formen burbujas. Una vez colocado se deja enfriar a 4°C durante unos 20 minutos para permitir la solidificación de las capas de agarosa.

Una vez fijado, se debe retirar el cubreobjetos con mucho cuidado para no despegar la capa formada y a continuación pasar a la etapa de lisis de las membranas celulares, así, se incuyen los portaobjetos en un recipiente con 200 ml de solución de lisis preparada en ese mismo instante, esta solución está compuesta por: 89% tampón de lisis (solución que contiene 29,22 g de NaCl 2,5 M, 7,44 g de Na₂EDTA, 0,24 g de tris 10 Mm y 2 g de NaOH 0,25M; todo esto ajustado a un pH 10), 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1% de tritón X100. Permanecerá a 4°C durante 1h.

Posteriormente, se pasará a la fase de desnaturalización, para ello se preparará la solución de desnaturalización, formada por 30 ml de Na₂EDTA 1Mm y 180 ml de NaOH 300 mM y se completa hasta 3 litros de agua bidestilada cerciorándose que tiene un valor de pH superior a 13. Después, se debe montar la cubeta de electroforesis con hielo abundante y cerciorándonos de que se encuentra nivelada; colocando los

portaobjetos pegados los unos a los otros con la parte biselada hacia la derecha evitando espacios entre ellos.

Añadir dicha solución hasta que los portaobjetos queden cubiertos por una capa y la dejaremos reposar 20 minutos.

A continuación, se pasa a la fase de electroforesis en la que se conectará una corriente continua de 300 mA durante 20 minutos.

Una vez finalizada se continua con la fase de neutralización, poniendo los portaobjetos una vez terminada la electroforesis en una solución de tris 0,4 M con pH 7,5 y dejándolo reposar en frío durante 5 minutos. Repetir esta operación 3 veces.

Seguidamente se parará la fase de fijación, sumergiendo los portaobjetos en etanol puro frío durante 3 minutos.

Finalmente, una vez secos se parará a la tinción y su observación en el microscopio de fluorescencia; para ello, haremos la tinción utilizando 2-(4-amidinofenil)-1H -indol-6-carboxamida (DAPI) en una concentración de 1µg/L de agua bidestilada.

Para su observación se utilizó el microscopio de fluorescencia y para el análisis de las imágenes obtenidas se empleó el software CASP (Koca et al., 2003) y los parámetros analizados fueron tanto el momento de cola (“tail moment”) consistente en la distancia de la migración del DNA del cuerpo nuclear como el momento de la cola según Olivé (“Olivé tail moment”). Ambos son indicadores del daño producido en el ADN.

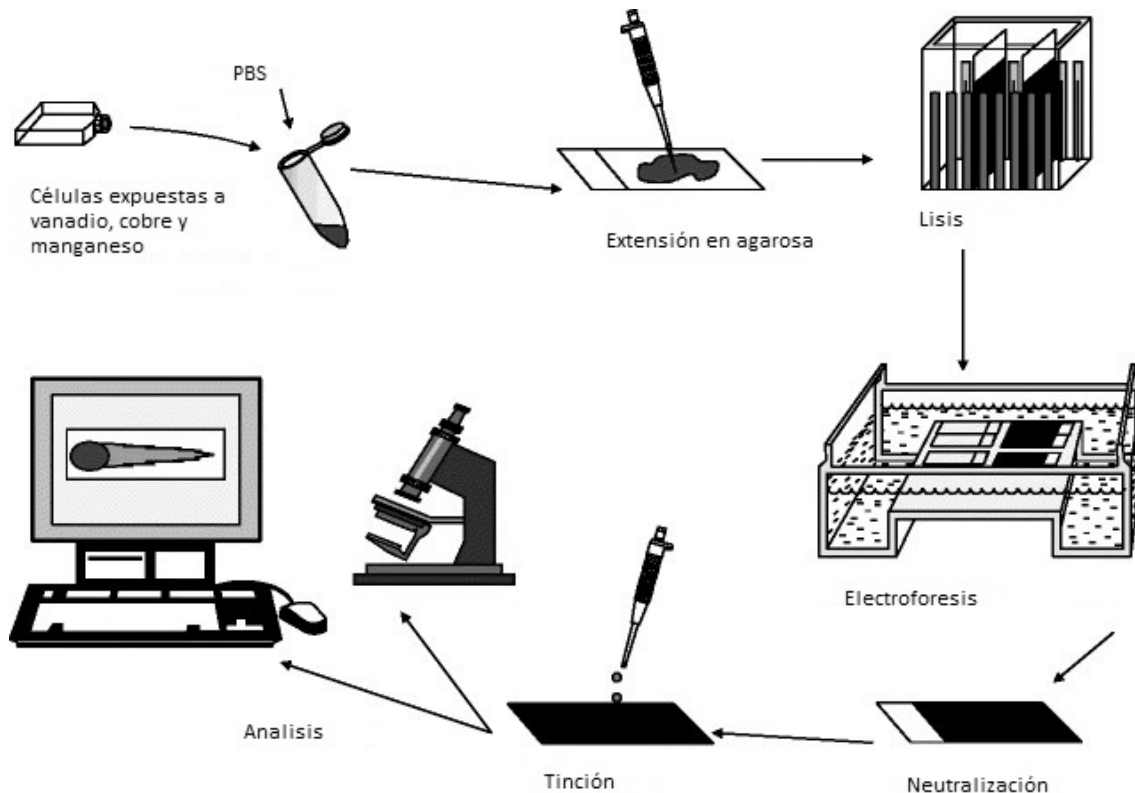


Figura 9: esquema de realización por partes del ensayo Comet

Determinación de leptina en suero

La leptina se determinó mediante el kit Milliplex MAP Rat Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, RECYTMAG-65K, con el sistema de detección Luminex xMAP (EMD, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Análisis de la expresión genética de la hepcidina en hígado por RT-qPCR

El ARN hepático total de 9 muestras control y 8 muestras expuestas a V fue extraído usando Trizol según las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Todas las muestras de ARN se cuantificaron con el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 y 2 µg de ARN fue transcrito de forma inversa empleando los cebadores oligo(dT) (Promega, Southampton, UK).

La amplificación en tiempo real de PCR y detección fue realizada en placas de 48 pocillos en ECO™ Real-Time PCR System (Illumina, CA, USA) con 20 ng de cDNA, el KAPA SYBR_FAST qPCR Master Mix (Illumina, CA, USA).

La primera secuencia de cebadores para HAMP, que codificaron la proteína hepcidina fue 30 GTTGTCTGCTCTGTCTGATGC-5', reverso 3'-GAATCACGGTAGAACGGAAGA-5'. Para normalizar la expresión del RNA mensajero (mRNA), se midió la expresión de gen constitutivo gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con la siguiente secuencia de cebador: 3'-ccatcaccatctccaggag-5', inverso 3'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-5'. Para la cuantificación relativa de mRNA se usó el método DDCT.

Determinación de metales mediante ICP masas

La determinación de la concentración total de metales en dieta y muestras obtenidas de los animales de experimentación, así como en células, se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado por inducción ICP-MS (Agilent 7700, Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipado con un sistema de nebulización tipo Meinhard y dotado de un sistema de celdas de colisión (usando He como gas de colisión).

Previo a su análisis se procedió a la digestión de las muestras por digestión ácida en microondas (Milestone, Sorisole, Italy). La digestión fue llevada a cabo mediante el ataque con HNO₃ y H₂O₂ (calidad suprapure; Merck, Darmstadt, Germany). Cuando la muestra fue digerida, el extracto obtenido se llevó a volumen final con agua ultrapura para su posterior análisis. En el caso de las muestras de tejidos y dieta, se llevó a cabo un proceso de liofilización previo a la digestión.

Todos los contenedores utilizados fueron limpiados previamente con ácido nítrico puro y agua pura (18,2 Ω) obtenida usando un sistema mili-Q (millipore, Bedford, MA, USA).

Las curvas de calibración fueron preparadas a partir de soluciones madre de 1000 mg/L para cada elemento (Merck) y mediante la adición de Ga como patrón interno. Para validar el método de análisis de Cu, Mn y V en muestras y dieta, se utilizó un material de referencia certificado de musculo bovino (NIST 8414, Gaithersburg, MD

20899) o suero humano Seronorm (SERO AS, Billingstad, Norway), además de estudios de recuperación en muestras enriquecidas con estándares multielementales. Las recuperaciones para cada elemento fueron de entre el 95 y el 105% en todos los casos para un promedio de 5 determinaciones

Determinación deleciones y número de copias en ADN mitocondrial

El ADN fue aislado utilizando el kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Alemania) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante para cultivos celulares. La deleción y el número de copias de ADN mitocondrial (ANDmt) fueron evaluados por el método de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (QRT-PCR). Así, para evaluar la deleción común de ADNmt se cuantificó la cantidad relativa de dos genes mitocondriales: Mt-nd1 y Mt-nd4. Adicionalmente, para determinar el número de copias de ADNmt, se evaluó un gen nuclear de copia única.

En este caso fue elegida la fosfoproteína ribosómica ácida (gen PO 36B4), un gen bien conservado localizado en el cromosoma 7 y que se asume constante en todas las muestras. Se amplifican todas las secuencias de ADN en un MicroAmp Optical 384-well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando el Applied Biosystem's 7900HT Fast Real- Time PCR system. Las muestras fueron medidas por duplicado, para ello 5 ng de ADN celular se secaron durante la noche a temperatura ambiente en placa de 384 pocillos y se resuspendieron en 10 μ l de la mezcla de reacción de PCR; la mezcla de reacción para Mt-nd1 consiste en 5 μ l de QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 μ l de colorante ROX (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 200 nM de Mt-nd1 "forward primer" (5'-CCCTAAAACCCGCCACATCT'-3'), 200 nM de Mt-nd1 "reverse primer" (GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT-3') y agua bidestilada; una mezcla similar fue preparada para la cuantificación de Mt-nd4, sin embargo, en este caso se usó su "forward primer" correspondiente (5'-CCATTCTCCTCCTATCCCTCAAC-3') y el "reverse primer" (5'-CACAATCTGATGTTTTGGTTAAACTATATTT-3').

La mezcla de reacción para 36B4 fue similar excepto que incluía 300 nM de "forward primer" (5'-CTG CAG ATT GGC TAC CCG AC-3') y 500 nM de "reverse

primer" (5'-CAC AGA CAA AGC CAG GAC CC-3'). Las condiciones de la reacción se fijaron a 95°C durante 2 minutos seguidos de 40 ciclos de colección que consisten en una desnaturalización a 95°C durante 8 segundos y un "annealing/extension" a 58°C durante 15 segundos, 60°C durante 15 segundos y 95°C durante 15 segundos fue realizado al final de cada reacción para verificar una amplificación específica. Para compensar y evaluar las variaciones interplacas, cada placa de 384 pocillos contenía una curva estándar de 9 puntos desde 1,17 a 75 ng usando ADN celular derivado de las mismas muestras. El ADN fue diluido en forma seriada utilizando agua bidestilada y en cada dilución se incluyó en placas de 384 pocillos por triplicado para cada secuencia.

Los valores de umbral se establecieron en 0,6 por secuencia. Se usó el Detector Systems versión 2.4 y los resultados de PCR en tiempo real fueron exportados a excel para su análisis. La curva estándar fue trazada desde la media Cq vs el logaritmo de la concentración de las diluciones seriadas, excluyendo los puntos más allá de la línea de rango.

La concentración relativa de Mt-nd1 fue dividida entre los Mt-nd4 de acuerdo a los valores obtenidos de sus curvas. El valor obtenido para cada muestra se dividió por el valor promedio obtenido de las muestras control. Esto permitió obtener un ratio Mt-nd1/Mt-nd4 que permite hacer una estimación de la cantidad de moléculas de ADNmt presentes en una delección de la secuencia de Mt-nd4 por ejemplo. Por otro lado, la cantidad relativa de Mt-nd1 se dividió por la encontrada para los genes nucleares y multiplicada por 2 para obtener los valores de número de copias de ADNmt para cada muestra. El valor resultante expresa la cantidad relativa de moléculas de ADNmt por célula.

Estos ensayos se llevarán a cabo en células hepáticas expuestas a diversas dosis de Mn, V y Cu. Siendo las concentraciones de cada uno de los elementos por separado: 3 mg V/L, 3 mg Cu/L y 3 µg Mn/L, para la combinación de dos elementos: 3 mg V/L-3 mg Cu/L, 3 mg V/L- 3 µg Mn/L y 3 mg Cu/L- 3 µg Mn/L y para la combinación de los tres elementos: 3 mg V/L- 3 µg Mn/L- 3mg Cu/L.

Para todos los ensayos el tiempo de exposición será de 32 horas.

3.4. Tratamiento estadístico.

Los estadísticos descriptivos (medias y desviaciones estándar) se obtuvieron a partir de las diferentes variables estudiadas. Los datos experimentales se analizaron mediante el empleo de pruebas para muestras no paramétricas, utilizándose las pruebas de Kruskal-Wallis seguida de la U de Mann Whitney para las comparaciones de muestras independientes. Los coeficientes de correlación de Spearman se calcularon para el 95% del IC. Todos los análisis se realizaron con la versión 20.0 del Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS, Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas a al nivel de probabilidad $< 5\%$.



4. RESULTADOS

4.1. Estudios de viabilidad celular

a) Estudios de viabilidad de células HT-29 expuestas a diferentes concentraciones de vanadio

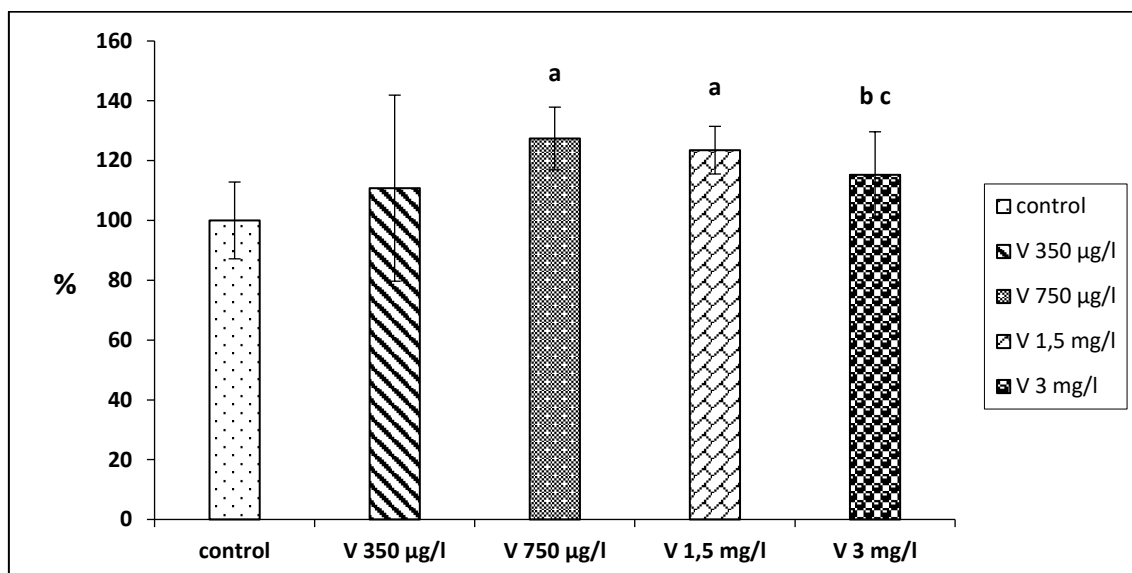


Diagrama 1. Viabilidad celular de la línea HT 29 según el ensayo cristal violeta tras someterlas a diferentes concentraciones de V durante 16 h.

(a) Diferente de control; (b) diferente de concentración de 750 µg V/L (c); diferente de concentración de 1,5 mg V/L. ($P < 0,05$).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	29	0.2342	0.3861	0.29120	0.0374
350 µg V/L	15	0.2686	0.4335	0.3226	0.0906
750 µg V/L	13	0.3214	0.4108	0.3710	0.0305
1,5 mg V/L	13	0.3133	0.3806	0.3596	0.0232
3 mg V/L	14	0.2695	0.3911	0.3356	0.0419

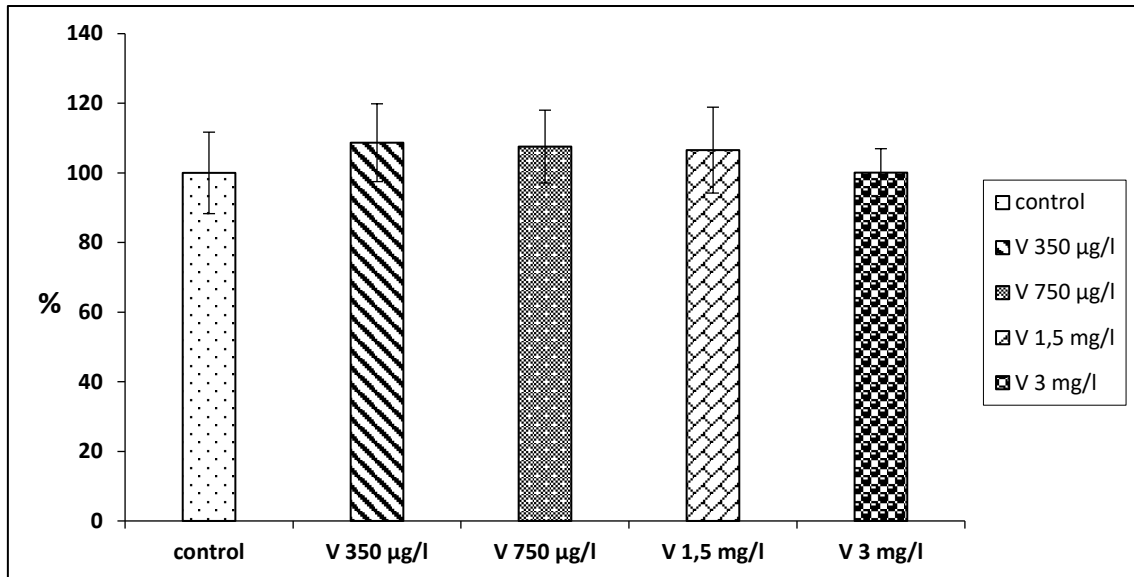


Diagrama 2. Viabilidad celular de la línea HT 29 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V durante 16 h.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	30	0,2093	0,3345	0,2675	0,0313
350 µg V/L	13	0,2332	0,3258	0,2907	0,0299
750 µg V/L	14	0,2375	0,3172	0,2877	0,028
1,5 mg V/L	13	0,2351	0,3325	0,2850	0,033
3 mg V/L	14	0,2331	0,3140	0,2677	0,0184

En los diagramas 1 y 2 muestran los resultados del estudio de la viabilidad celular tras la exposición de células colónicas a distintas concentraciones de vanadio con un tiempo de exposición de 16 horas.

En el diagrama 1, que corresponde al ensayo con cristal violeta, se muestra un aumento general de la viabilidad para todas las concentraciones ensayadas respecto al control, siendo más elevado para las concentraciones de 750 µg V/L y 1,5 mg V/L, en la que hay un aumento significativo respecto al control.

Además, la concentración más elevada de vanadio expuesta (3 mg V/L), produce un descenso significativo de su viabilidad respecto a las concentraciones 750 µg V/L y 1,5 mg V/L.

En el diagrama 2 se muestran los resultados del ensayo MTT en las mismas condiciones experimentales que el anterior; en este caso, se encuentran resultados

semejantes al de cristal violeta, aunque es ente caso no se aprecian diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas.

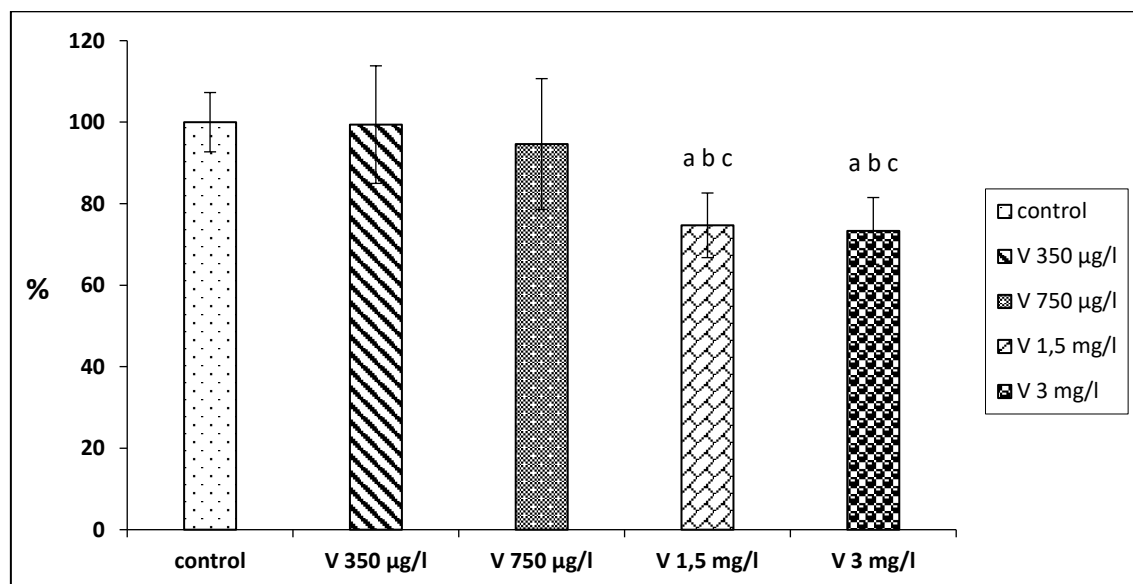


Diagrama 3. Viabilidad celular de la línea HT 29 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V durante 32 h.

(a) Diferente de control; (b) diferente de concentración 350 µg V/L; (c) diferente de concentración de 750 µg V/L . (P<0,05).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	18	1,4636	2,0033	1,7609	0,1281
350 µg V/L	16	1,3922	2,1490	1,7504	0,2540
750 µg V/L	14	1,2971	2,1980	1,6664	0,2827
1,5 mg V/L	16	1,0824	1,5505	1,3153	0,1396
3 mg V/L	14	1,0683	1,5030	1,2911	0,1442

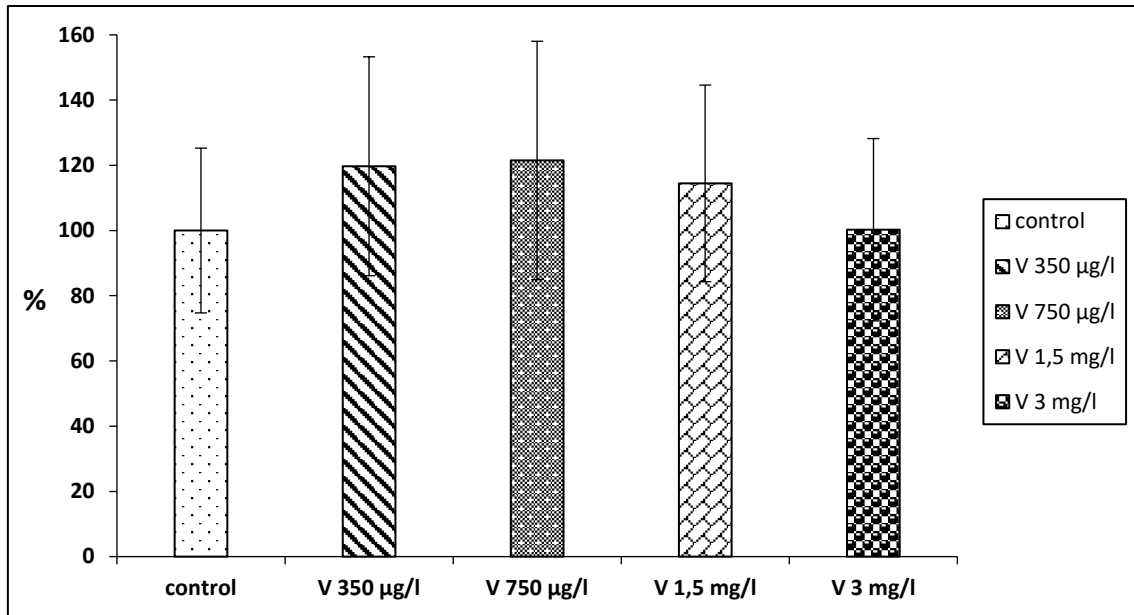


Diagrama 4. Viabilidad celular de la línea HT 29 según el ensayo cristal violeta tras someterlas a diferentes concentraciones de V durante 32 h.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	14	1,4908	3,6702	2,1713	0,5486
350 µg V/L	16	1,6227	4,2816	2,5990	0,7288
750 µg V/L	16	1,5371	4,1520	2,6381	0,7931
1,5 mg V/L	16	1,5245	3,6585	2,4851	0,6544
3 mg V/L	15	1,4580	3,6944	2,1766	0,6069

Los diagramas 3 y 4 muestran la viabilidad celular cuando se dobla el tiempo de exposición pasando de 16 a 32 horas.

El estudio con el cristal violeta (Diagrama 4), presenta una pauta similar a la obtenida en los ensayos de 16 horas, con una tendencia a disminuir a medida que incrementa la dosis, pero sin que se aprecien cambios significativos. Sin embargo, en el ensayo MTT sí se aprecian descensos significativos respecto al control y el resto de dosis para las mayores concentraciones de vanadio (1,5 mg V/L y 3 mg V/L).

b) Estudios de viabilidad de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de vanadio

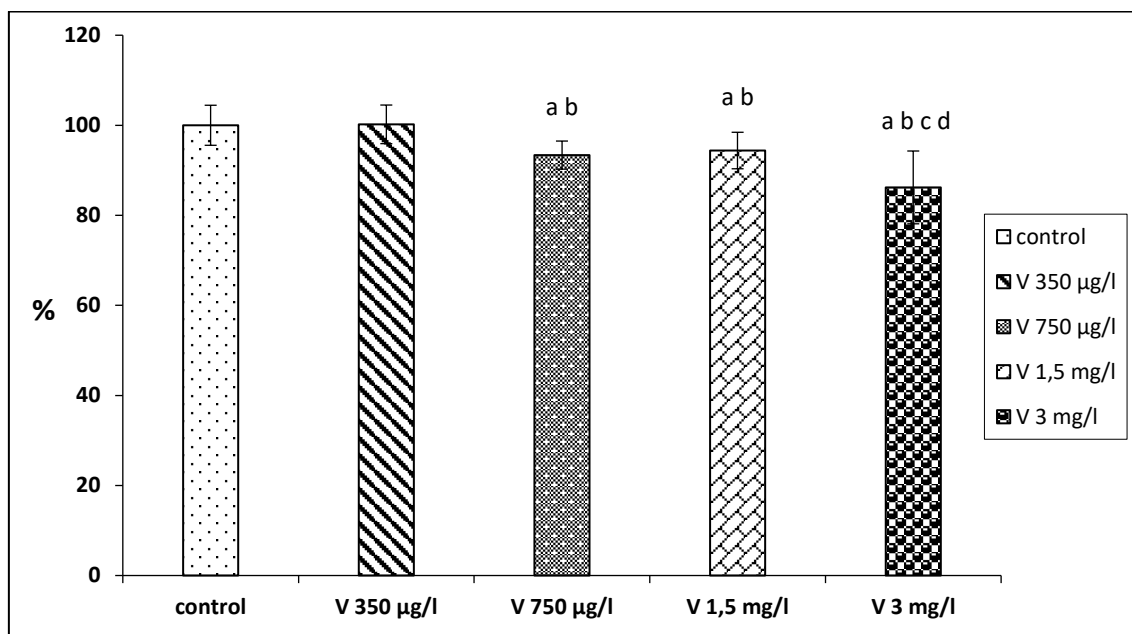


Diagrama 5. Viabilidad celular de la línea HepG2 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V durante 32 h.

(a) Control vs concentración 750 µg V/L o concentración 1,5 mg V/L o concentración 3 mg V/L; (b) Concentración 350 µg V/L vs concentración 750 µg V/L o concentración 1,5 mg V/L o concentración 3mg V/L; (c) concentración 750 µg V/L vs concentración 3 mg V/L; (d) Concentración 1,5 mg V/L vs concentración 3 mg V/L

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	27	3,0898	3,7186	3,3351	0,1483
350 µg V/L	15	3,0647	3,5828	3,3421	0,1430
750 µg V/L	13	2,9235	3,2676	3,1141	0,1042
1,5 mg V/L	14	2,9268	3,3212	3,1481	0,1352
3 mg V/L	16	2,2458	3,3069	2,8749	0,2696

En el diagrama 5 se representa el estudio de viabilidad con MTT de células hepáticas (HepG2) usando las mismas concentraciones de vanadio y un tiempo de exposición de 32 horas, en este caso a excepción de la concentración más baja (350 µg V/L), todas las concentraciones presentan una viabilidad significativamente inferior al control y a la dosis más baja ensayada.

La concentración 3 mg V/L presenta un valor de viabilidad bastante inferior al resto y presenta diferencias con todos los grupos tratados y con el control en nuestras condiciones experimentales.

c) Estudios de viabilidad de células HT-29 expuestas a diferentes concentraciones de cobre

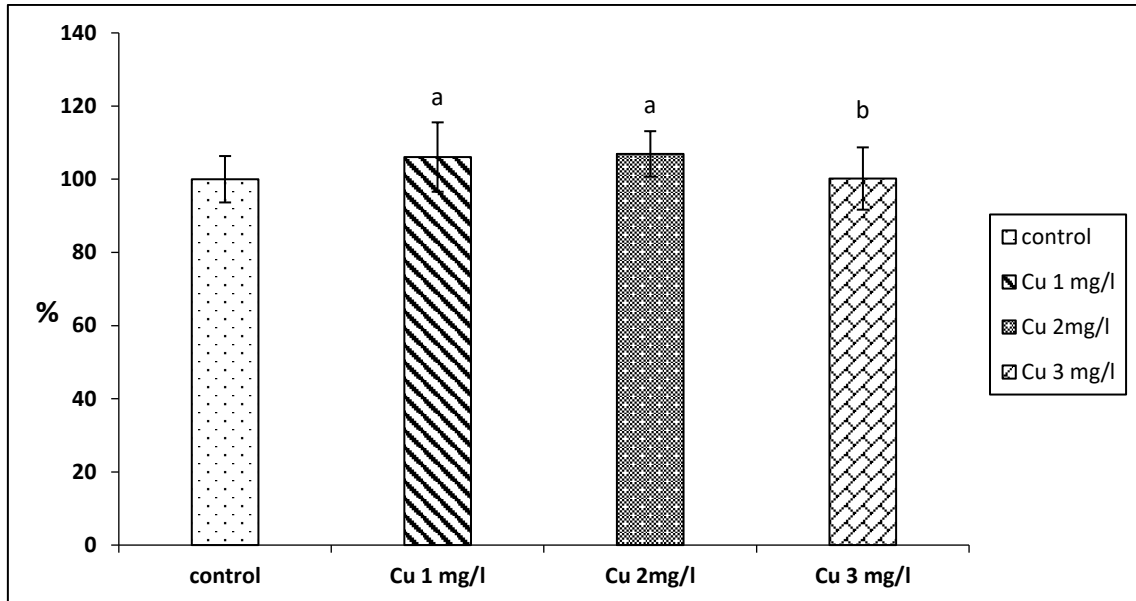


Diagrama 6.-Viabilidad celular de la línea HT-29 según el estudio MTT tras someterlas a diferentes dosis de Cu durante 16 h.

(a) Diferente de control; (b) diferente de concentración de 2 mg Cu/L ($P < 0,05$)

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	22	1,4221	1,8001	1,6267	0,1031
1 mg Cu/L	15	1,4473	2,0030	1,7254	0,1543
2mg Cu/L	13	1,5462	1,8662	1,7394	0,1010
3 mg Cu/L	14	1,3887	1,8341	1,6299	0,1385

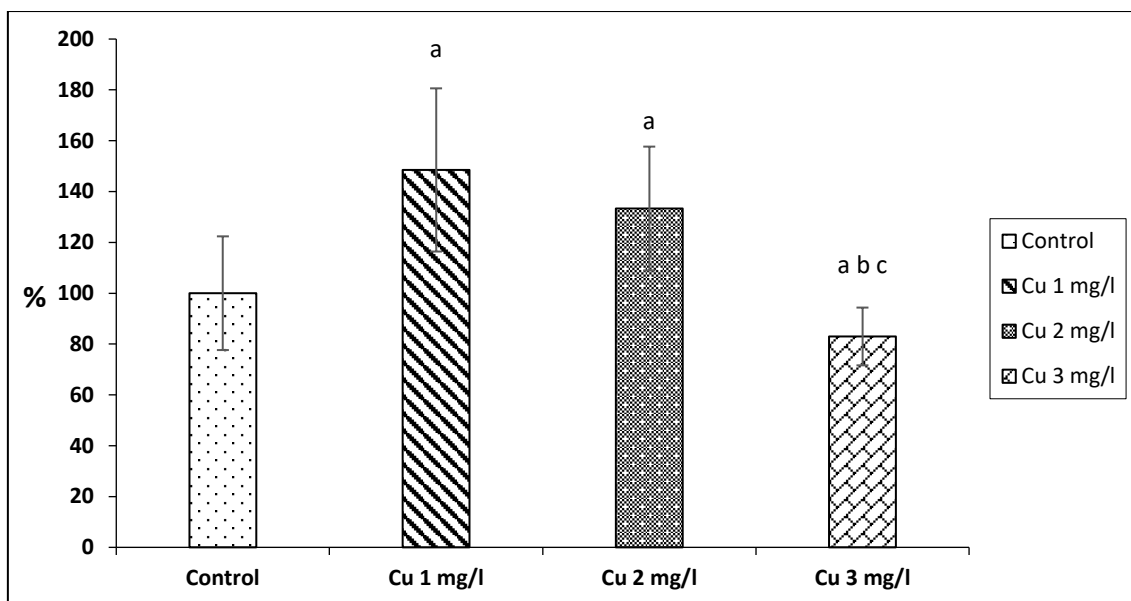


Diagrama 7. Viabilidad celular de la línea HT-29 según el ensayo cristal violeta tras someterlas a diferentes concentraciones de Cu durante 16 h.

(a) Diferente de control; (b) diferente de concentración de 1 mg Cu/L; (c) diferente de concentración de 2 mg Cu/L. ($P < 0,05$).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	26	1,4983	2,9995	2,1863	0,4890
1 mg Cu/L	14	2,2545	4,3790	3,2467	0,7019
2 mg Cu/L	14	2,2916	3,7716	2,9149	0,5325
3 mg Cu/L	13	1,4983	2,3064	1,8142	0,2484

En los diagramas 6 y 7 se muestra el efecto de la exposición de células HT-29 a diferentes concentraciones de cobre durante un tiempo de 16 horas.

Los resultados obtenidos en los ensayos de MTT (Diagrama 6) ponen de manifiesto un aumento significativo de la viabilidad celular en todos los casos, siendo el más alto para la concentración de 2 mg Cu/L.

Para el ensayo cristal violeta, (Diagrama 7), se encuentra al igual que en el caso anterior una mayor viabilidad en las concentraciones intermedias, en este caso, las concentraciones de 1 mg Cu/L y 2 mg Cu/L presentan un aumento significativo de la viabilidad respecto al control, que disminuye para las concentraciones altas. Además, al

contrario que en el ensayo MTT, la viabilidad para concentración de 3 mg Cu/L es inferior al valor del control.

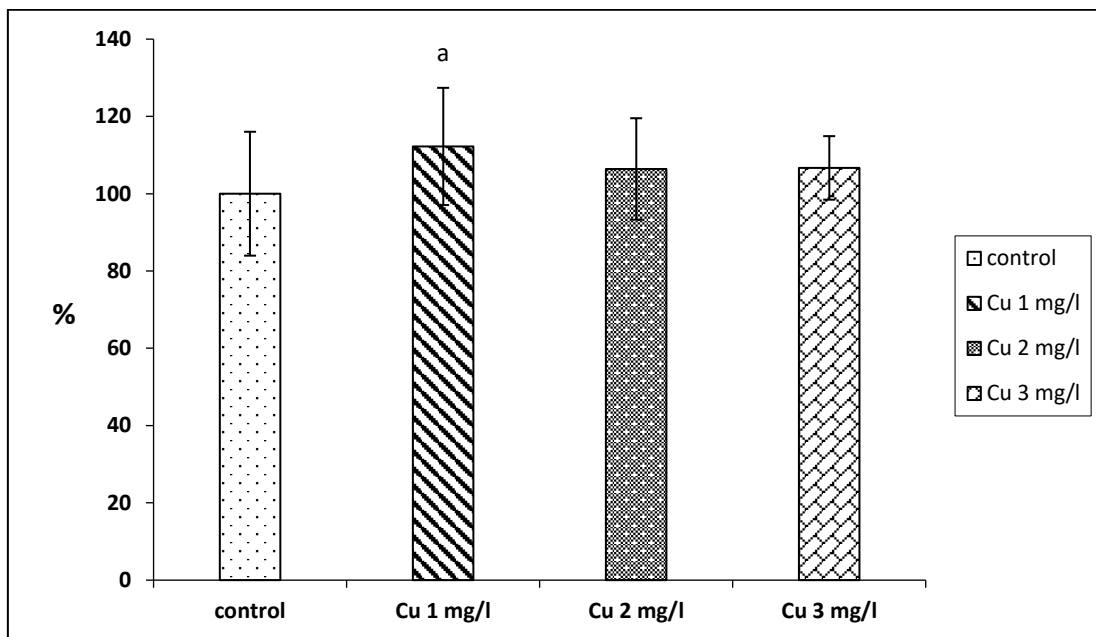


Diagrama 8. Viabilidad celular de la línea HT-29 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de Cu durante 32 h.

(a) Diferente de control. ($P > 0,05$)

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	30	1,6397	2,9275	2,2235	0,3564
1 mg Cu/L	14	2,0537	3,1502	2,4953	0,3372
2 mg Cu/L	13	1,8305	2,8259	2,3657	0,2921
3 mg Cu/L	15	2,1793	2,7334	2,3719	0,1828

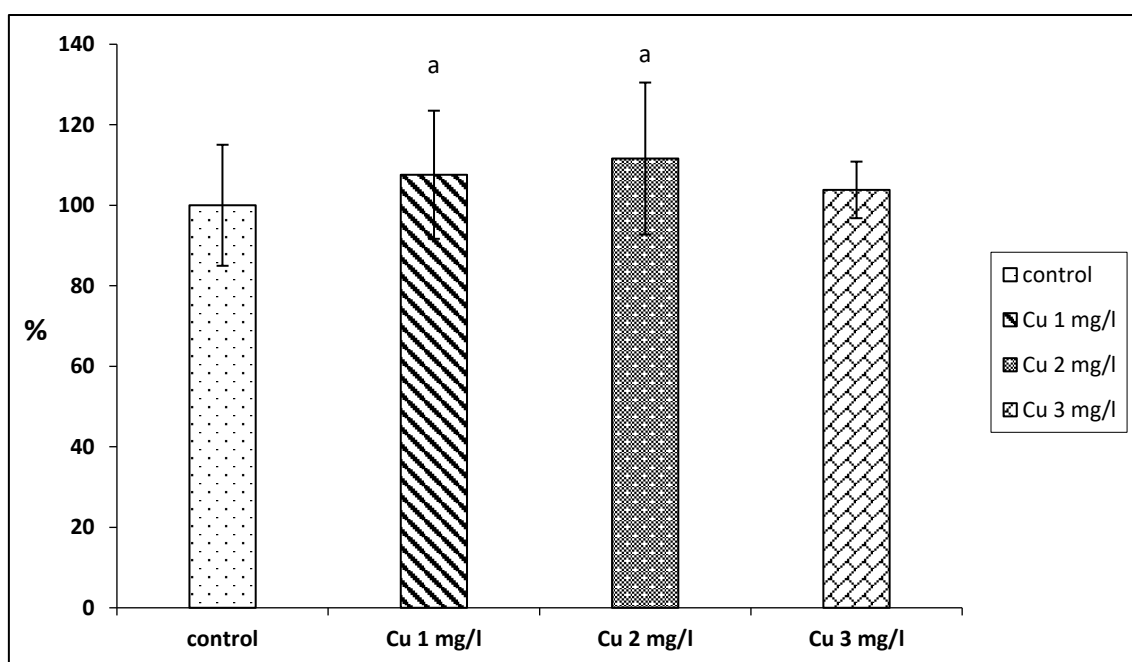


Diagrama 9. viabilidad celular de la línea HT-29 según el ensayo cristal violeta tras someterlas a diferentes concentraciones de Cu durante 32 h.

(a)Diferente de control. (P>0,05).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	28	1,7696	2,9275	2,2599	0,3398
1 mg Cu/L	16	1,9703	3,1502	2,4312	0,3597
2 mg Cu/L	16	1,8305	3,2452	2,5224	0,4265
3 mg Cu/L	14	2,1793	2,6028	2,3462	0,1588

Al cambiar el tiempo de exposición y elevarlo hasta 32 horas, obtenemos resultados similares tanto en el ensayo MTT como en el ensayo cristal violeta.

En el caso del ensayo MTT (Diagrama 8) la concentración de 1 mg Cu/L presenta un aumento significativo respecto al control y en el cristal violeta (Diagrama 9) son las concentraciones intermedias (1 mg Cu/L y 2 mg Cu/L) las que presentan incrementos significativos respecto a control.

d) Estudios de viabilidad de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de cobre.

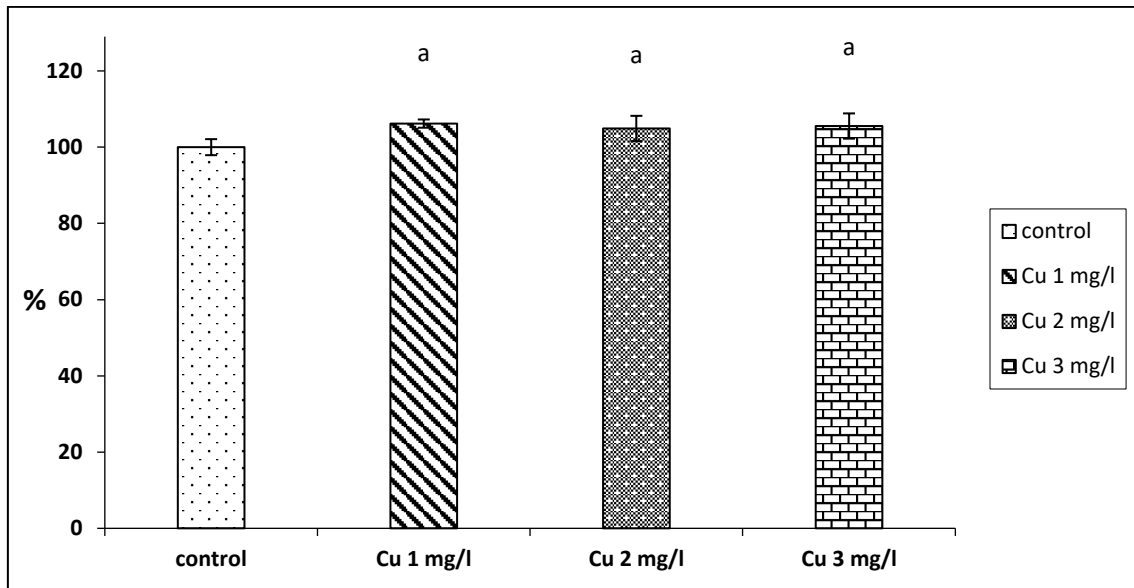


Diagrama 10. Viabilidad celular de la línea HepG2 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de Cu durante 32 h.

(a) Control vs concentración de 1 mg Cu/L o concentración 2 mg Cu/L o concentración 3 mg Cu/L

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	30	1,504	1,632	1,569	0,033
1 mg Cu/L	13	1,636	1,690	1,666	0,017
2 mg Cu/L	15	1,562	1,722	1,646	0,052
3 mg Cu/L	15	1,560	1,729	1,656	0,052

En el diagrama 10 se representan los resultados obtenidos al realizar el ensayo MTT sobre células HepG2, estudiando las diferentes concentraciones de cobre durante una exposición de 32 horas. En este caso se observan resultados similares a los obtenidos con el mismo tiempo sobre células intestinales, muestra un aumento significativo de la viabilidad respecto al control para todas las concentraciones estudiadas

Se observa que a las 32 horas la tendencia es similar independientemente de la naturaleza de las células; si bien estos cambios se hacen más significativos en las células hepáticas.

e) Estudios de viabilidad de células HT-29 expuestas a diferentes concentraciones de manganeso.

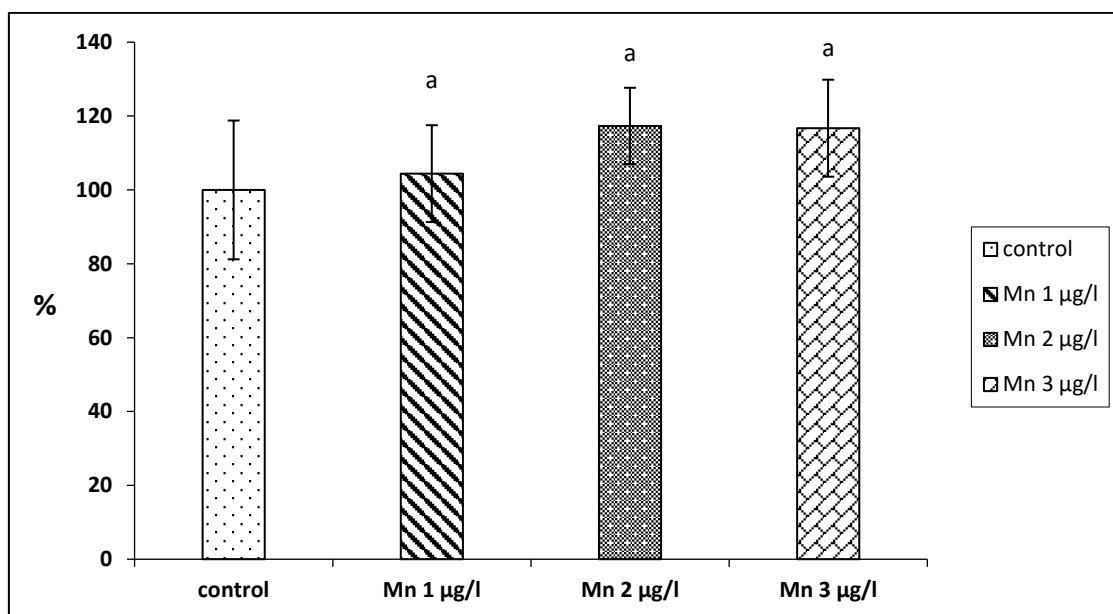


Diagrama 11. Viabilidad celular de la línea HT-29 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de Mn durante 16 h.

(a) Diferente de control. ($P > 0,05$).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	32	0,7690	1,4290	1,0967	0,2060
1 µg Mn/L	16	0,9240	1,3750	1,1451	0,1438
2 µg Mn/L	16	1,1100	1,4450	1,2867	0,1133
3 µg Mn/L	15	1,0090	1,5590	1,2800	0,1440

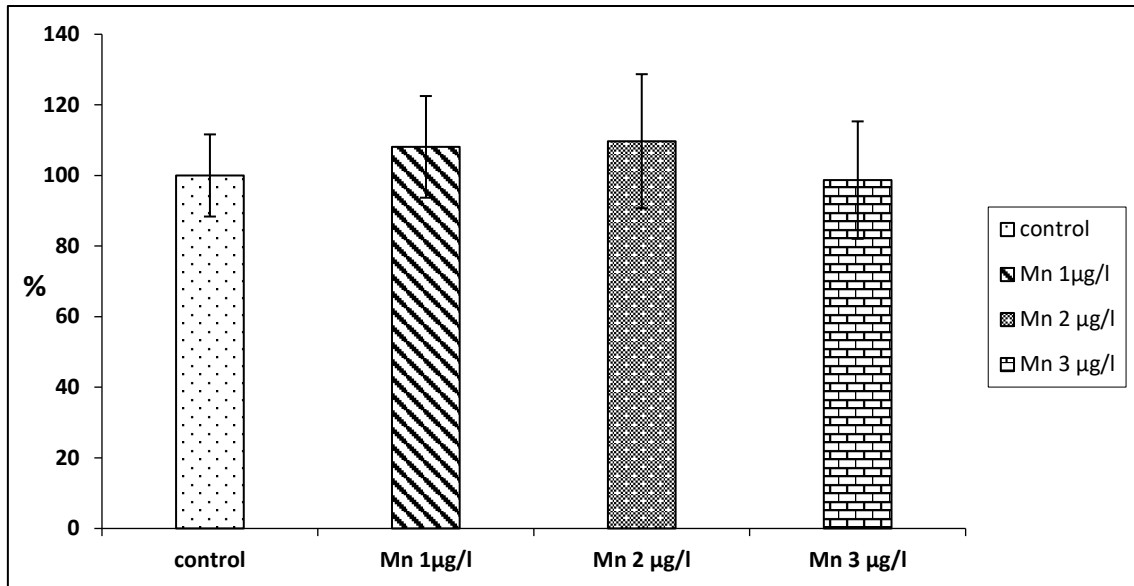


Diagrama 12. Viabilidad celular de la línea HT-29 según el ensayo cristal violeta tras someterlas a diferentes concentraciones de Mn durante 16 h.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	25	1,1809	1,8347	1,5471	0,1800
1 µg Mn/L	13	1,4531	2,0969	1,6725	0,2228
2 µg Mn/L	15	1,1199	2,2501	1,6971	0,2939
3 µg Mn/L	13	1,1599	2,0142	1,5269	0,2573

Al estudiar los cambios en la viabilidad al añadir diferentes dosis de manganeso sobre células HT-29 y un tiempo de exposición de 16 horas, se aprecia que para el ensayo MTT (Diagrama 11) hay un aumento de la viabilidad al añadir Mn al medio respecto al control, aunque no hay cambios significativos entre las diferentes concentraciones usadas.

En el ensayo cristal violeta (Diagrama 12) también se aprecia un ligero aumento de la viabilidad para las dosis de manganeso 2 µg Mn/L y 3 µg Mn/L respecto al control. No obstante, no se ven diferencias significativas entre las diferentes concentraciones.

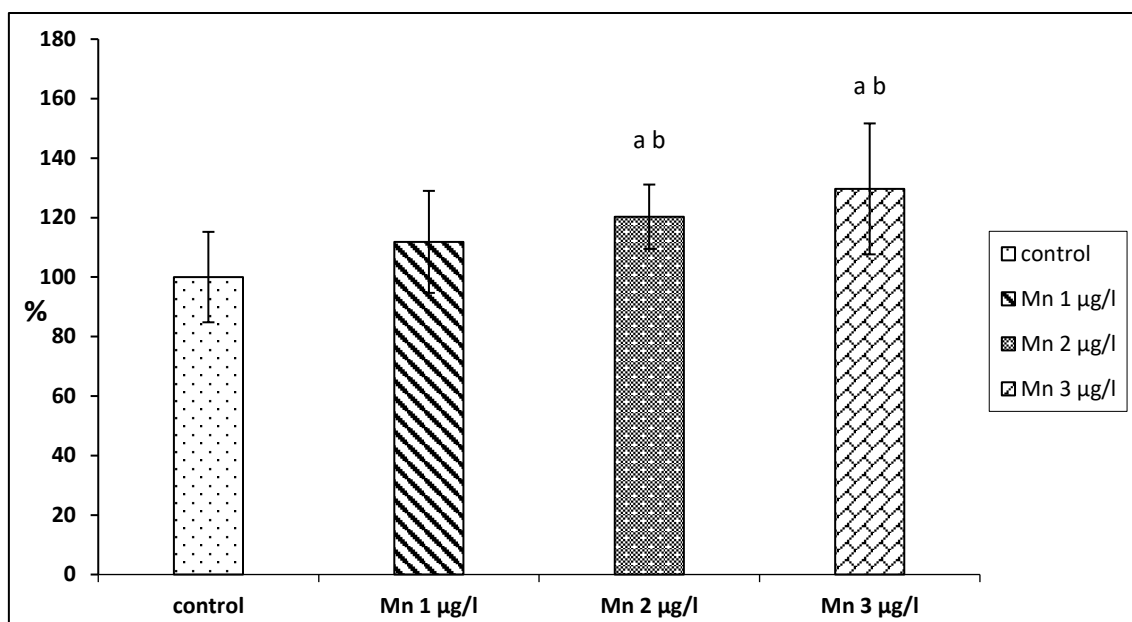


Diagrama 13. Viabilidad celular de la línea HT 29 según el ensayo cristal violeta tras someterlas a diferentes concentraciones de Mn a 32 h.

(a) Diferente de control; (b) diferente de concentración de 1 µg Mn/L

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	15	1,3441	2,5612	2,0455	0,3110
1 µg Mn/L	16	1,8189	3,0819	2,2875	0,3508
2 µg Mn/L	15	2,1256	2,8130	2,4605	0,2213
3 µg Mn/L	16	1,8352	3,4655	2,6521	0,4502

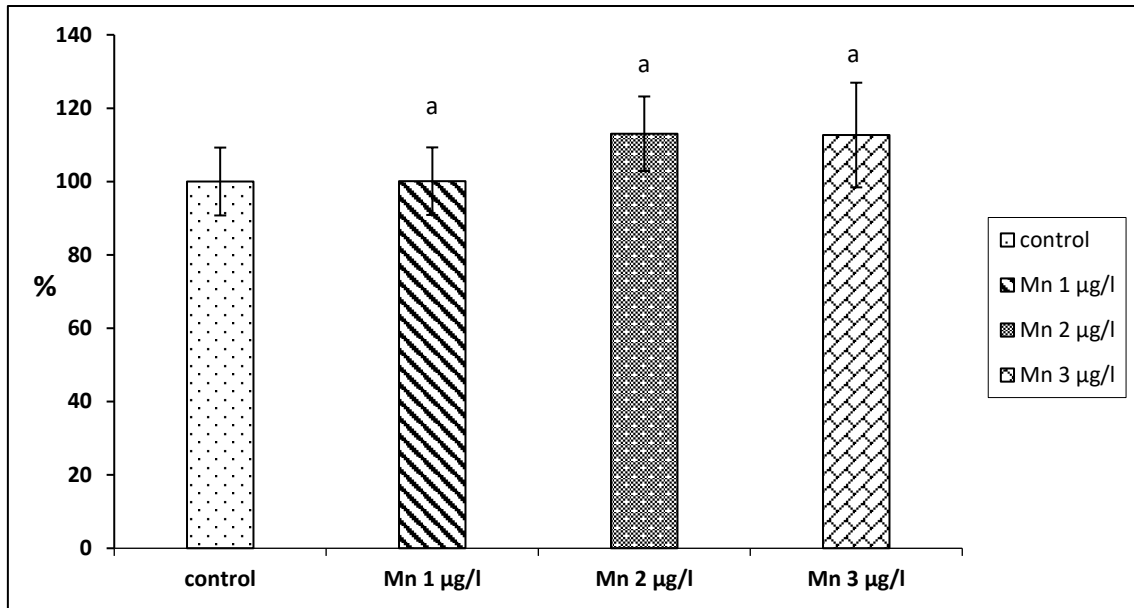


Diagrama 14. Viabilidad celular de la línea celular HT-29 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de Mn durante 32 h.

(a) Diferente de control. ($P > 0,05$).

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	20	1,8342	2,5612	2,1770	0,2014
1 µg Mn/L	14	1,8189	2,4405	2,1790	0,2006
2 µg Mn/L	15	2,1256	2,8130	2,4605	0,2213
3 µg Mn/L	12	1,8352	2,7869	2,4529	0,3106

En los diagramas 13 y 14 podemos ver la viabilidad celular al aumentar el tiempo de exposición al manganeso sobre células de la misma naturaleza.

En un ensayo de cristal violeta (Diagrama 13) se aprecia un aumento creciente de la viabilidad dependiente de la dosis de manganeso; para este caso, las dosis más altas presentan una diferencia significativa respecto al grupo control y a la dosis de 1 µg Mn/L.

En el ensayo MTT se aprecia un aumento significativo de la viabilidad de todas las dosis empleadas respecto al control.

f) Estudios de viabilidad de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de manganeso.

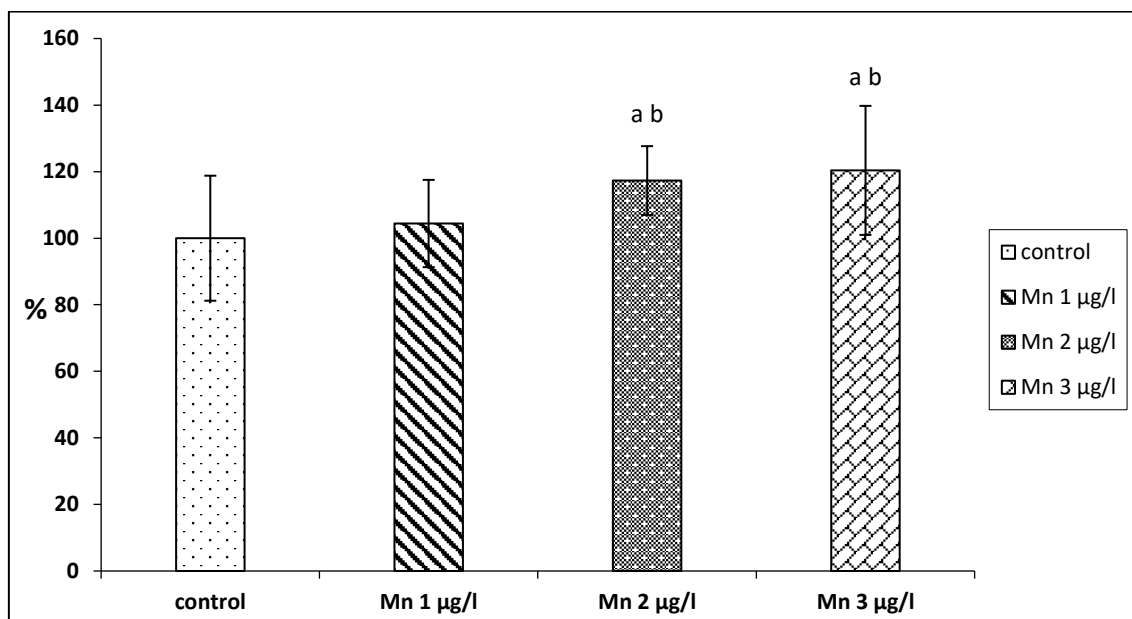


Diagrama 15. Viabilidad celular de la línea celular HepG2 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de Mn durante 32 h.

(a) Control vs concentración de 2 µg Mn/L o concentración de 3 µg Mn/L; (b) Concentración de 1 µg Mn/L vs concentración de 2 µg Mn/L o concentración de 3 µg Mn/L

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
control	32	0,7690	1,4290	1,0967	0,2060
1 µg Mn/L	16	0,9240	1,3750	1,1451	0,1438
2 µg Mn/L	16	1,1100	1,4450	1,2867	0,1133
3 µg Mn/L	16	1,0090	1,9230	1,3202	0,2126

En los ensayos con células hepáticas, los resultados obtenidos son similares a los encontrados en los ensayos con HT-29 para el mismo tiempo y dosis.

En este caso, se ve que el valor que 1 µg Mn/L es similar al control y que para las concentraciones elevadas: 2 µg Mn/L y 3 µg Mn/L son más elevadas y se aprecian diferencias significativas con el control y el grupo 1 µg Mn/L.

g) Estudios de viabilidad de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de cobre y manganeso

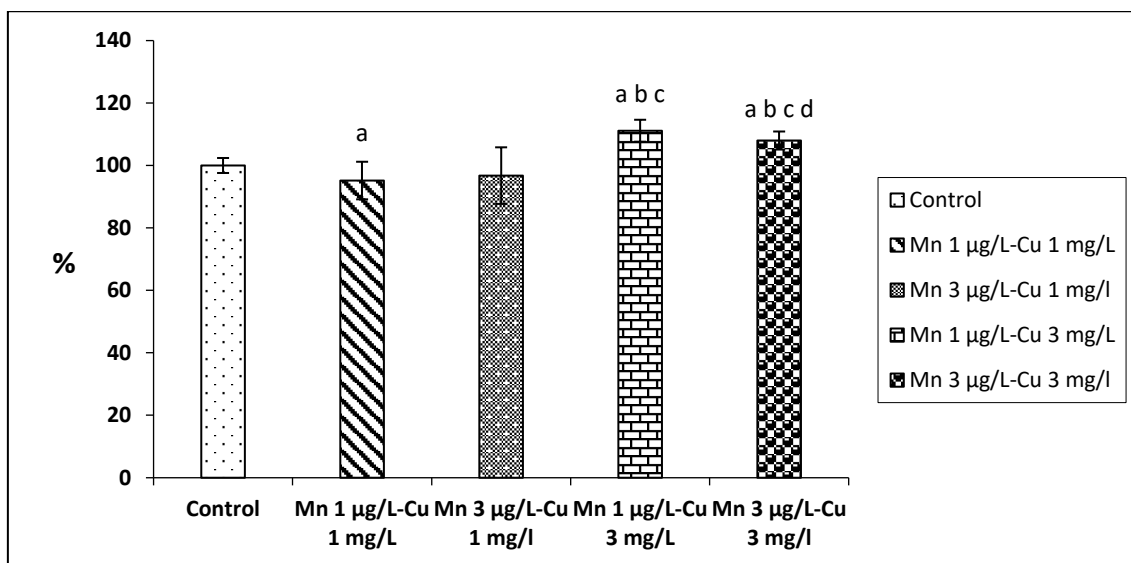


Diagrama 16. Viabilidad celular de la línea HepG2 según ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de Cu y Mn durante 32 h.

(a) Control vs concentración 1 mg Cu/L-1 µg Mn/L o concentración 3 mg Cu/L-1 µg Mn/L o concentración 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L; (b) Concentración 1 mg Cu/L-1µg Mn/L vs Concentración 3 mg Cu/L-1µg Mn/L o concentración 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L; (c) Concentración 1 mg Cu/L-3 µg Mn/L vs Concentración 3 mg Cu/L-1 µg Mn/L o concentración 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L; (d) Concentración 3 mg Cu/L-1 µg Mn/L vs concentración 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	32	1,5464	1,6789	1,6092	0,0386
1 µg Mn/L-1 mg Cu/L	15	1,3609	1,6471	1,5316	0,0968
3 µg Mn/L-1 mg Cu/L	16	1,3524	1,8172	1,5570	0,1459
1 µg Mn/L-3 mg Cu/L	16	1,6953	1,8764	1,7883	0,0566
3 µg Mn/L-3 mg Cu/L	16	1,6439	1,8010	1,7379	0,0465

El diagrama 16 representa los estudios de viabilidad combinando diferentes concentraciones de cobre y manganeso. Se ha empleado células tipo HepG2 y un tiempo de exposición de 32 horas; las dosis usadas son las más bajas y más altas para cada uno de los metales que se utilizaron en los estudios individuales.

Se observa un descenso de la viabilidad significativo respecto al control para las concentraciones más bajas de ambos metales (1 mg Cu/L-1 µg Mn/L). Mientras que las concentraciones más altas de cobre ocasionan incrementos significativos de la viabilidad (3 mg Cu/L-1 µg Mn/L y 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L) independientemente de la

concentración de manganeso. Además, en estas combinaciones se ve a su vez un aumento significativo de la viabilidad celular respecto a las menores concentraciones de cobre.

h) Estudios de viabilidad celular de células HT-29 expuestas a diferentes concentraciones de vanadio y manganeso o vanadio y cobre

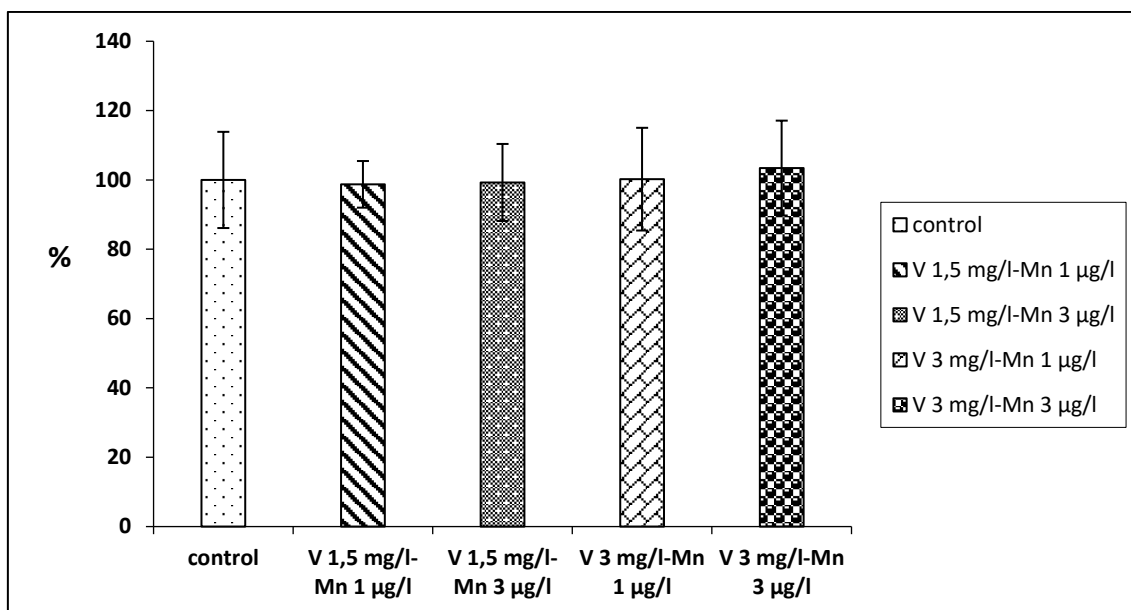


Diagrama 17. Viabilidad celular de la línea HT-29 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V y Mn durante 32 h.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	24	1.5778	2.4976	1.8542	0.2573
1,5 mg V/L-1 µg Mn/L	16	1.6340	2.0643	1.8306	0.1247
1,5 mg V/L-3 µg Mn/L	16	1.5600	2.2780	1.8405	0.2061
3 mg V/L-1 µg Mn/L	16	1.5484	2.3613	1.8583	0.2747
3 mg V/L-3 µg Mn/L	15	1.6495	2.4782	1.9177	0.2537

El siguiente paso en la investigación consistió en la combinación de ciertas dosis de vanadio con manganeso o cobre, obtenidas en los resultados anteriores en los que sólo se experimentó con un metal por separado.

En el diagrama 17 se aprecia la viabilidad de células de colon durante 32 horas combinando las dosis de vanadio más elevadas de los apartados anteriores (1,5 mg V/L- 3 mg V/L) con la dosis más alta y más baja empleada en los estudios de manganeso.

En este caso no se aprecian diferencias para los valores de viabilidad de las células ensayadas.

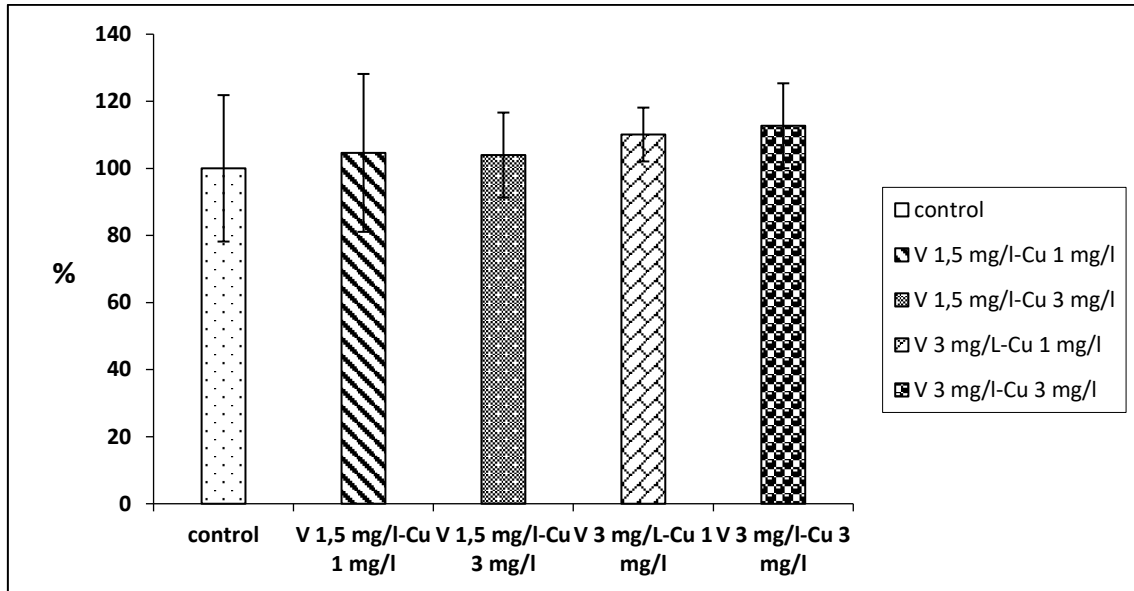


Diagrama 18. Viabilidad celular de la línea celular HT-29 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V y Cu durante 32 h.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	26	1.2231	2.28	1.4645	0.3197
1,5 mg V/L-1 mg Cu/L	16	1.2004	2.4546	1.5320	0.3447
1,5 mg V/L-3 mg Cu/L	13	1.2981	1.9213	1.5225	0.1856
3 mg V/L-1 mg Cu/L	10	1.3979	1.7930	1.6122	0.1175
3 mg V/L-3 mg Cu/L	8	1.3654	1.8684	1.6504	0.1854

El diagrama 18 representa otra combinación de vanadio y cobre sobre células intestinales, en este caso se mantienen las mismas concentraciones de vanadio y se añade cobre a 1 mg Cu/L y 3 mg Cu/L. A pesar de este cambio se aprecian unos resultados similares, es decir, la viabilidad celular se mantiene sin apenas diferencias entre los grupos y respecto a los grupos con el control.

i) Estudios de viabilidad celular de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de vanadio y manganeso o cobre

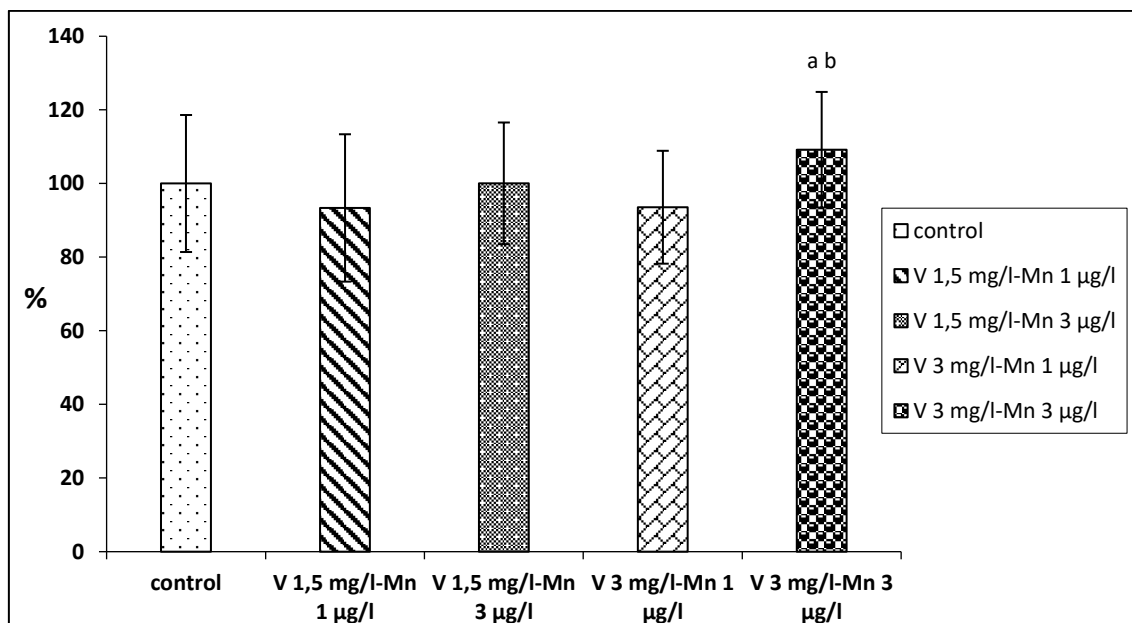


Diagrama 19. Viabilidad celular de la línea HepG2 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V y Mn durante 32 h.

(a) Concentración 1,5 mg V/L-1 µg Mn/L vs concentración 3 mg V/L-3 µg Mn/L; (b) Concentración 3 mg V/L-1 µg Mn/L vs concentración de 3 mg V/L-3 µg Mn/L.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
control	32	0,6810	1,1227	0,9389	0,1747
1,5 mg V/L-1 µg Mn/L	16	0,5560	1,2130	0,8766	0,1879
1,5 mg V/L-3 µg Mn/L	16	0,6100	1,1830	0,9394	0,1551
3 mg V/L-1 µg Mn/L	16	0,6600	1,0840	0,8784	0,1439
3 mg V/L-3 µg Mn/L	16	0,8600	1,3830	1,0251	0,1474

El diagrama 19 representa misma combinación de metales y tiempos que en el apartado (h)

Solo se observan cambios para las concentraciones más altas de Mn y V, en este caso se aprecia una mayor viabilidad que las combinaciones 1,5 mg V/L-1 µg Mn/L y 3 mg V/L-1 µg Mn/L; es decir, respecto a los grupos expuestos a una concentración baja de manganeso.

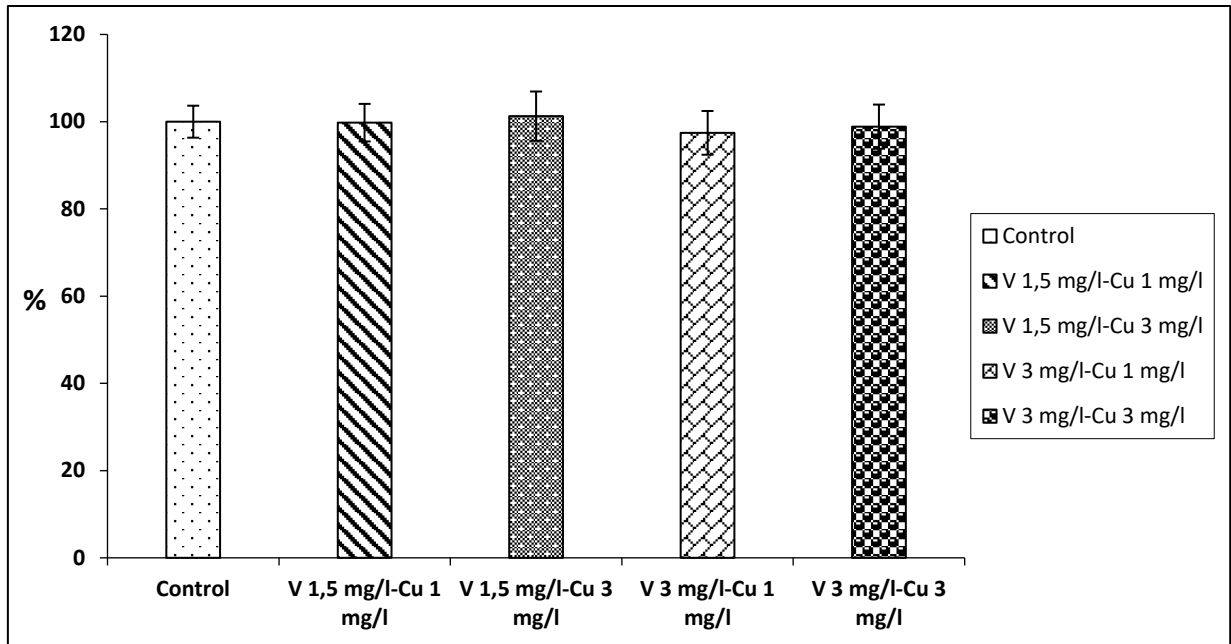


Diagrama 20. Viabilidad celular de la línea celular HepG2 según ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de Cu y V durante 32 h.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	27	1,8916	2,1725	2,0384	0,0747
1,5 mg V/L-1 mg Cu/L	15	1,8680	2,1653	2,0339	0,0877
1,5 mg V/L-3 mg Cu/L	16	1,8716	2,2463	2,0643	0,1152
3 mg V/L-1 mg Cu/L	16	1,8235	2,1642	1,9862	0,1022
3 mg V/L-3 mg Cu/L	16	1,8782	2,2064	2,0151	0,1033

En el diagrama 20, se repiten las dosis y tiempo de vanadio y cobre, en este caso, se observa un resultado similar al encontrado en células HT-29, al no haber diferencias significativas entre cada uno de los grupos y el control.

j) Estudios de viabilidad celular de células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones de vanadio, cobre y manganeso

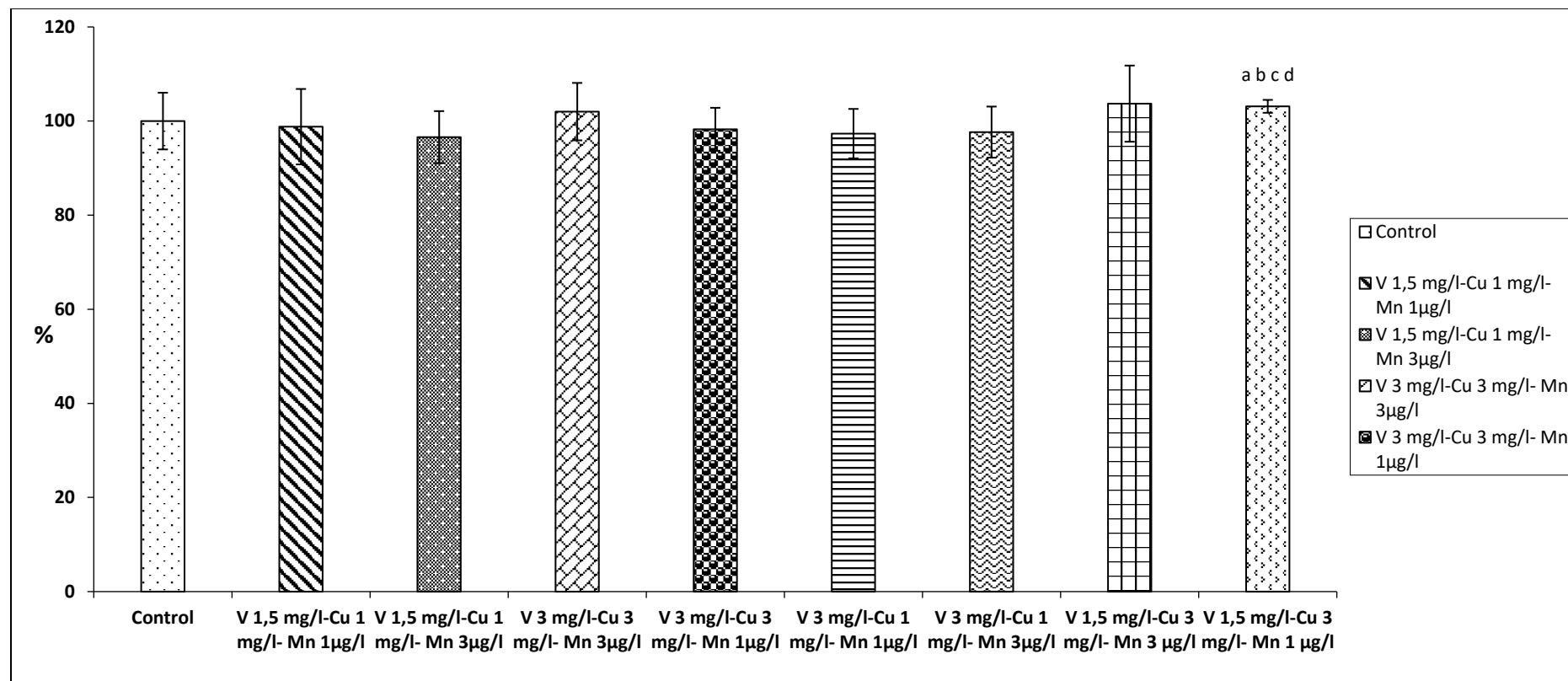


Diagrama 21. Viabilidad celular de la línea celular HepG2 según ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V, Cu, y Mn durante 32 h.

(a) Concentración 3 µg Mn/L-1 mg Cu/L-1,5 mg V/L vs concentración 1µg Mn/L-3 mg Cu/L-1,5 mg V/L; (b) Concentración 1 µg Mn/L-3 mg Cu/L-3 mg V/L vs concentración 1 µg Mn/L-3 mg Cu/L-1,5 mg V/L; (c) Concentración 1 µg Mn/L-1 mg Cu/L-3mg V/L vs concentración 1 µg Mn/L-3 mg Cu/L-1,5 mg V/L; (d) Concentración 3 µg Mn/L-1 mg Cu/L-3mg V/L vs concentración 1 µg Mn/L-3 mg Cu/L-1,5 mg V/L.

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Típ.
Control	16	1,3850	1,6740	1,5318	0,0923
1,5 mg V/L-1 mg Cu/L-1µg Mn/L	8	1,3380	1,6930	1,5135	0,1228
1,5 mg V/L-1 mg Cu/L-3 µg Mn/L	8	1,327	1,602	1,4795	0,0847
3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L	8	1,418	1,675	1,5625	0,0935
3 mg V/L-3 mg Cu/L-1 µg Mn/L	8	1,36	1,596	1,5050	0,0700
3 mg V/L-1 mg Cu/L-1 µg Mn/L	8	1,389	1,6	1,4909	0,0804
3 mg V/L-1 mg Cu/L-3 µg Mn/L	8	1,377	1,598	1,4958	0,0832
1,5 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L	8	1,4690	1,7750	1,5885	0,1240
1,5 mg V/L-3 mg Cu/L-1 µg Mn/L	7	1,5530	1,6150	1,5797	0,0210

Finalmente, en el diagrama 21 se representa la viabilidad sobre células HepG2 para un tiempo de exposición de 32 horas todas las posibles combinaciones de los tres metales estudiados empleando las dosis que se usaba en los estudios en los que se combinaban dos metales diferentes. En este caso sólo se aprecia un aumento de la viabilidad celular significativo para las concentraciones 3 µg Mn/L-1 mg Cu/L-1,5 mg V/L respecto a las concentraciones 3 µg Mn/L-1 mg Cu/L-1,5 mg V/L, 1 µg Mn/L-1 mg Cu/L-3 mg V/L; 3 µg Mn/L-1 mg Cu/L-3 mg V/L y 1 µg Mn/L-3 mg Cu/L-3 mg V/L.

4.2. Estudios de daño en ADN nuclear. Comet

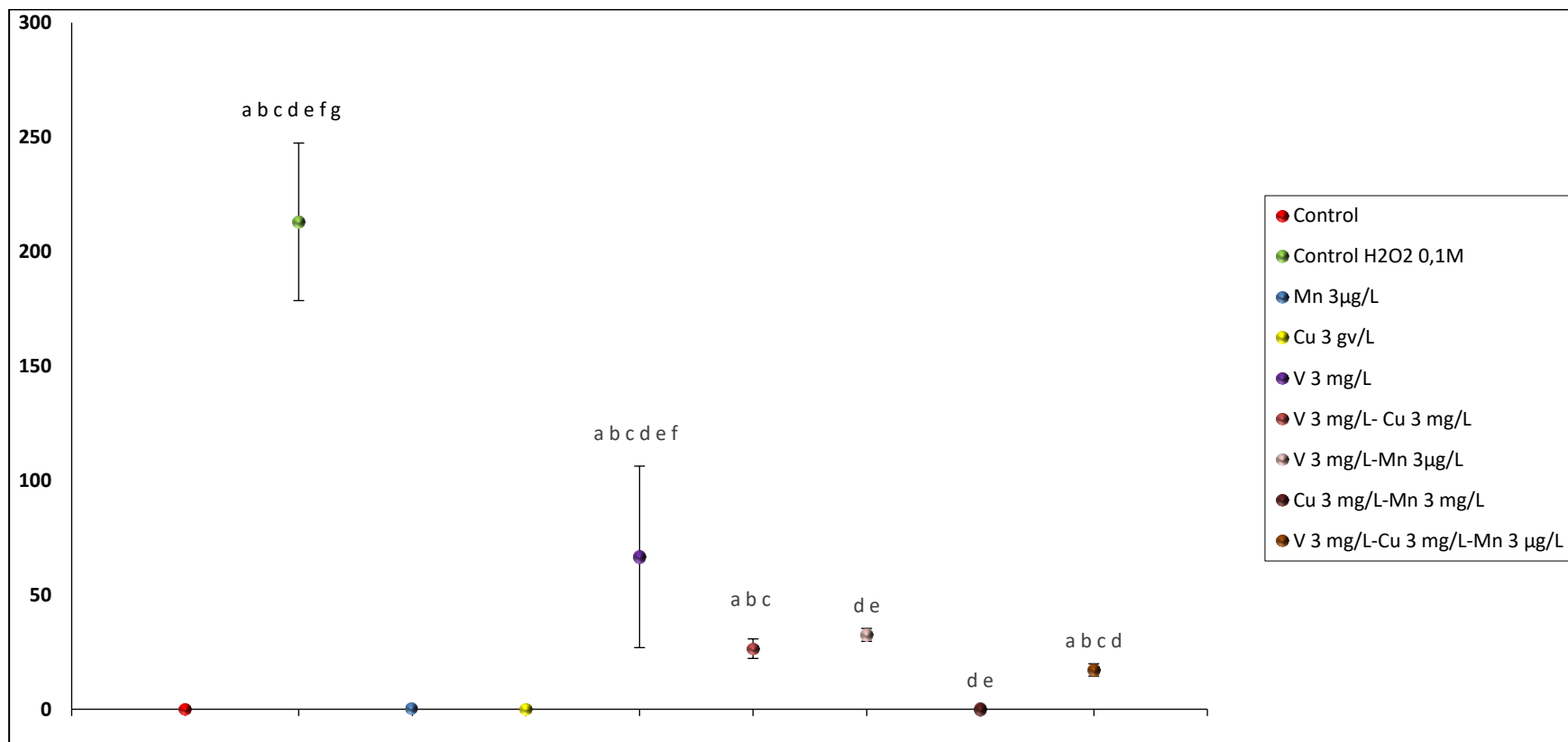


Diagrama 22. Momento de cola (“tail moment”) de la línea HepG2 tras someterlas a diferentes dosis y combinaciones de Cu, Mn y V durante 32 h

(a) Control vs concentración 3mg V/L-3mg Cu/L o concentración 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3µg Mn/L o concentración 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o concentración 3mg V/L- 3µg Mn/L; (b) Concentración de 3 mg Mn/L vs concentración 3 mg V/L-3 mg Cu/L o concentración 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L o concentración 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o concentración 3mg V/L- 3µg Mn/L; (c) Concentración 3 mg Cu/L vs concentración 3 mg V/L-3 mg Cu/L o 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L o concentración 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o concentración 3mg V/L-3µg Mn/L (d) Concentración 3mg V/L-3 mg Cu/L vs 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L o concentración 3mg Cu/L-3µg Mn/L o concentración 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o concentración 3mg V/L-3µg Mn/L; (e) Concentración 3mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L vs concentración 3mg Cu/L-3µg Mn/L o concentración 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o concentración 3mg V/L-3µg Mn/L; (f) Concentración 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L vs concentración 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o concentración 3mg V/L-3µg Mn/L (g) Concentración V 3 mg/L vs H₂O₂ 0,1 M o concentración 3mg V/L-3µg Mn/L.

	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	8,01E-06	0,0039	0,0013	0,0019
Mn 3µg/L	2,02E-07	0,0037	0,0011	0,0018
Cu 3 gv/L	4,48E-07	0,0081	0,0014	0,0033
V 3 mg/L- Cu 3 mg/L	22,3497	31,5908	26,4558	4,2764
V 3 mg/L-Cu 3 mg/L-Mn 3 µg/L	14,3015	19,9034	17,1515	2,7070
Cu 3 mg/L-Mn 3 mg/L	2,38E-07	0,0044	0,0007	0,0018
V 3 mg/L	17,6181	123,5270	66,5720	39,6558
Control H ₂ O ₂ 0,1M	173,9900	242,1670	212,9670	34,4277
V 3 mg/L-Mn 3µg/L	28,3188	34,2174	32,4937	2,8165

En los ensayos de Comet, se utilizaron células hepáticas y un periodo de exposición de 32 horas y la combinación de metales.

Para el parámetro momento de cola (“tail moment” TM), se aprecia que hay 3 grupos que presentan un valor similar al control, formado por las células que han sido expuestas a metales solos como 3 µg Mn/L y 3 mg Cu/L, así como la combinación de ambas (3 µg Mn /L- 3 mg Cu/L); todos estos grupos tienen un valor cercano a 0, lo que indica que apenas hay daño en su ADN nuclear. Todos estos grupos tienen diferencias significativas respecto a los otros grupos del experimento.

Por otra parte, se utilizó un grupo control al que se le sometió a un elemento altamente oxidante como el peróxido de hidrógeno, y fue usado como control positivo, al comparar este grupo con los demás se observa que su valor del tail moment es muy elevado y es significativamente superior al resto de los grupos estudiados.

El valor de TM más elevado en los grupos estudiados corresponde a la exposición por separado de 3 mg V/L, éste presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros grupos.

También se observan dos grupos con un valor de TM inferior al grupo de 3 mg V/L, éstos corresponden a la asociación de vanadio con algún otro metal, son los grupos 3 mg V/L-3 mg Cu/L y 3 mg V/L-3 µg Mn/L. Muestran diferencias significativas respecto al resto de grupos, pero no muestra entre ellos.

Finalmente, se aprecia un grupo intermedio formado por la asociación del vanadio y los dos metales (3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L); como se puede observar, en este caso presenta diferencias respecto al resto de grupos, presentando un descenso en el valor de TM respecto a 3 mg V/L y un aumento respecto al resto.

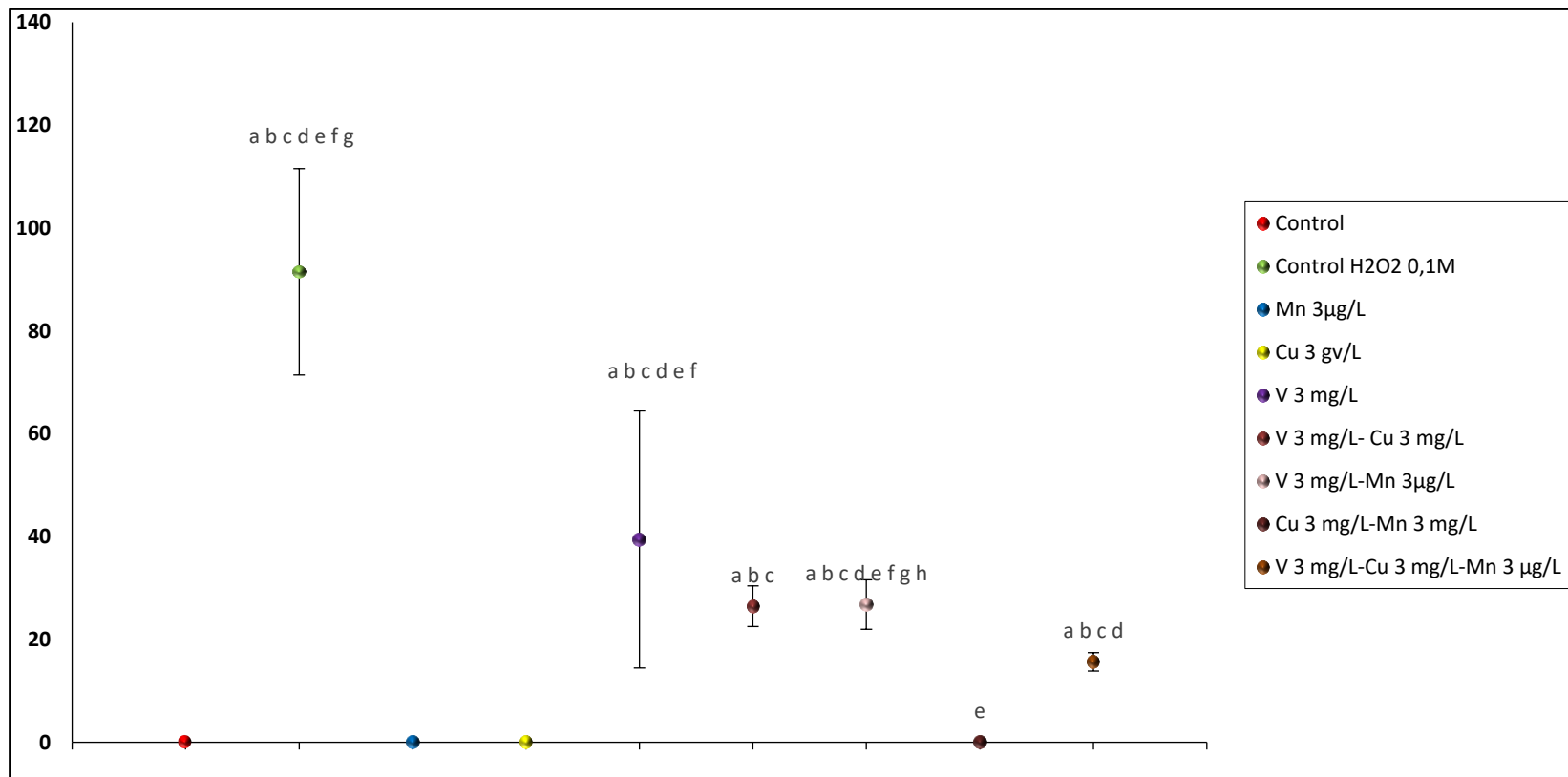


Diagrama 23. Momento de cola según Olivé (“Olivé tail moment”) de la línea HepG2 tras someterlas a diferentes dosis y combinaciones de Cu, Mn y V durante 32 h

(a) Control vs 3mg V/L-3 mg Cu/L o 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3µg Mn/L o 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o 3mg V/L-3µg Mn/L; (b) 3 µg Mn/L vs 3 mg V/L-3 mg Cu/L o 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L o 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o V 3mg/L-Mn 3µg/L; (c) 3 mg Cu/L vs 3 mg V/L-3 mg Cu/L o 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L o 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o 3mg V/L-3µg Mn/L; (d) 3mg V/L-3 mg Cu/L vs 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L o 3mg V/L o H₂O₂ 0,1 M; (e) 3mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L vs 3mg Cu/L-3µg Mn/L o 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o 3mg V/L-3µg Mn/L; (f) 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L vs 3 mg V/L o H₂O₂ 0,1 M o 3mg V/L-3µg Mn/L; (g) 3 mg V/L vs H₂O₂ 0,1 M o 3mg V/L-3µg Mn/L; (h) H₂O₂ 0,1 M vs 3mg/ VL- 3µg Mn/L

	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Control	2,82E-04	0,0892	0,0259	0,0370
Mn 3µg/L	8,52E-06	0,0753	0,0302	0,0369
Cu 3 gv/L	1,96E-05	0,1048	0,0176	0,0427
V 3 mg/L- Cu 3 mg/L	16,7740	25,2841	26,4558	3,9553
V 3 mg/L-Cu 3 mg/L-Mn 3 µg/L	12,7638	17,6344	15,6315	1,7903
Cu 3 mg/L-Mn 3 mg/L	7,90E-06	0,0703	0,0205	0,0321
V 3 mg/L	3,0716	79,5118	39,4390	24,9979
Control H ₂ O ₂ 0,1M	67,1058	116,1900	91,4934	20,0553
V 3 mg/L-Mn 3µg/L	22,9048	33,6616	26,7789	4,8156

En el caso del parámetro momento de la cola Olivé (OTM), la concentración V 3mg/L-Cu 3mg/L no presenta diferencias estadísticamente significativas frente a la concentración V 3 mg/L-Cu 3 mg/L-Mn 3µg/L ni frente a la concentración V 3mg/L-Mn 3 µg/L como sí las presentaba cuando se usaba el parámetro TM, aunque la tendencia sí es similar.

4.3. Estudio en células HepG2 de los cambios de concentración de V, Cu y Mn, tras 32 h de exposición a dichos elementos.

	V ng / l	Cu ng / l	Mn ng / l
Medio de cultivo	34 ± 3,12	11104 ± 230	1090 ± 257
V, Cu y Mn añadidos al cultivo	V ng/ 10 ⁶ células	Cu ng/ 10 ⁶ células	Mn ng/ 10 ⁶ células
Control	5.54 ± 0,64	327 ± 120	43 ± 12
V 3 mg/L	46 ± 4,24 ^a	560 ± 110 ^a	66 ± 13 ^a
Cu 3 mg/L	4,84 ± 0,35 ^b	5340 ± 1555 ^{a,b}	40 ± 9 ^b
Mn 3 mg/L	2,12 ± 0,28 ^{a,b,c}	128 ± 70 ^{b,c}	20 ± 7 ^{a,b,c}
Cu 3 mg/L-Mn 3µg/L	3,5 ± 0,63 ^{a,b,c}	1060 ± 212 ^{a,b,c,d}	29 ± 7 ^{a,b,c,d}
V 3 mg/L-Cu 3 mg/L	17 ± 0,71 ^{a,b,c,d,e}	707 ± 99 ^{a,c,d,e}	31 ± 15 ^{b,d}
V 3 mg/L-Mn 3µg/L	15 ± 2,80 ^{a,b,c,d}	148 ± 21 ^{a,b,c,d,f}	20 ± 5 ^{a,b,c,f}
Cu 3 mg/L-Mn 3µg/L-Cu 3 mg/L	42 ± 2,12 ^{a,c,d,f,g}	2255 ± 707 ^{a,b,c,d,f,g}	30 ± 17 ^{b,d,g}

Tabla 3. Contenido de V, Cu y Mn en el medio de cultivo y células HepG2 expuestas a 3 mg/L de V y Cu y 3 µg/L de Mn durante 32 h.

Valores medios ± DS.

- (a) Vs Control.
- (b) Vs exposición a 3mg V/L
- (c) Vs exposición a 3mg Cu/L
- (d) Vs exposición a µg Mn/L
- (e) Vs exposición a 3mg Cu/L-3µg Mn/L
- (f) Vs exposición a 3mg V/L-3mg Cu/L
- (g) Vs exposición a 3mg V/L-3µg Mn/L

En la tabla 3 se muestran el contenido en V, Cu y Mn de células HepG2 que han sido sometidas a la exposición de estos elementos solos o combinados, durante 32 h.

Los resultados muestran que la exposición a vanadio da lugar a incrementos significativos del contenido intracelular de Cu y Mn. Mientras que la exposición a Cu solo incrementa el contenido intracelular de Cu, no viéndose modificados significativamente los de V y Mn. Sin embargo, la exposición a Mn solo da lugar a un descenso significativo del contenido de V, del propio Mn y del Cu, aunque para este último elemento los cambios no son significativos.

La exposición a Cu y Mn conjuntamente tiende a recuperar las concentraciones intracelulares de V y Mn, pero no llegan a alcanzar los valores controles. En el caso del Cu se observa un fuerte incremento de su contenido.

El tratamiento combinado de los hepatocitos con V/Cu o V/Mn conduce a un aumento de la concentración intracelular de V en ambos casos, sin alcanzar los valores hallados cuando solo se exponen a V. La exposición conjunta a V y Cu incrementa la concentración de Cu pero los valores de este elemento son inferiores a los observados cuando las células se tratan con Cu solo o con Cu/Mn, mientras que el Mn retorna a valores próximos a los controles. La exposición a V y Mn, disminuye el contenido de Cu y Mn a valores inferiores a los controles.

Por último, el tratamiento con V, Cu y Mn conjuntamente incrementa el contenido de V, alcanzando valores semejantes a cuando las células son tratadas solo con este elemento, incrementa el contenido de Cu de modo importante, pero permanece en valores inferiores a cuando se tratan solo con el Cu, y devuelve el contenido de Mn a niveles próximos a los controles.

4.4. Estudios de delección y efectos sobre el número de copias de ADN mitocondrial.

El estudio de la presencia de delecciones de ADNmt (diagrama 24) muestra un efecto deletéreo del V, especialmente relevante cuando es administrado de forma aislada. La administración de V conjuntamente con otros elementos, especialmente Mn, reduce significativamente la presencia de delecciones en el ADN mitocondrial. La exposición a Cu o Mn de forma aislada o conjunta no induce cambios en la presencia de delecciones.

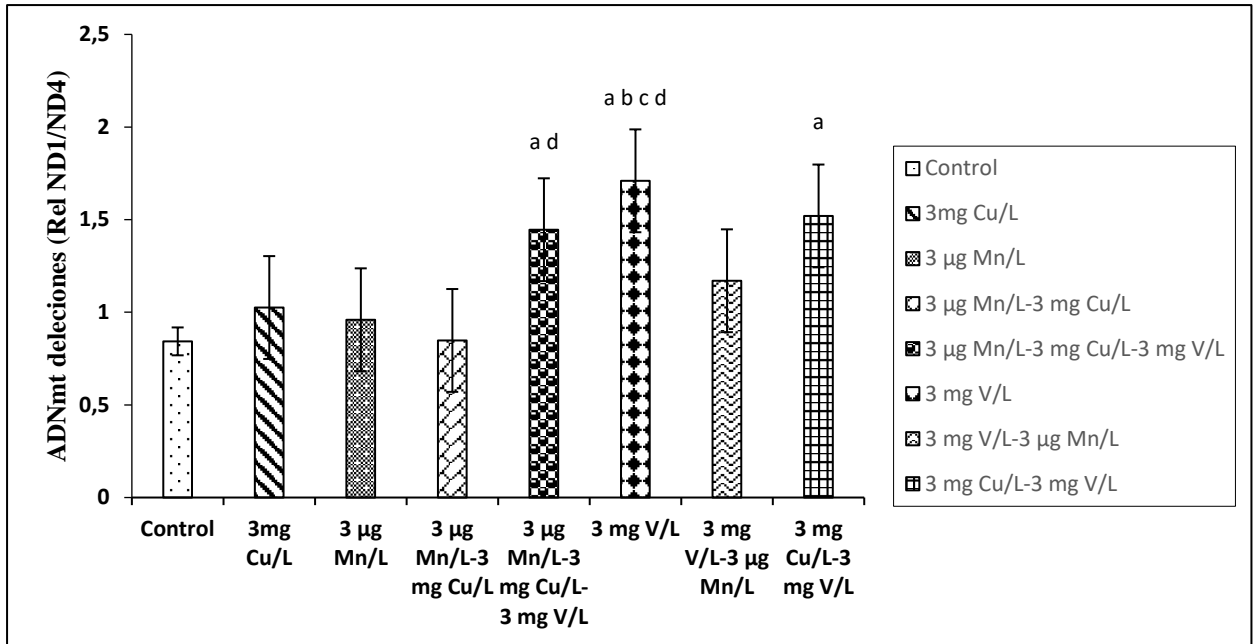


Diagrama 24. Variaciones en la deleción de ADN mitocondrial de células HepG2 tras la exposición a distintas dosis de metales durante 32 h.

a) vs control; b) vs 3 mg Cu/L; c) vs 3 µg Mn/L d) vs 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L; e) vs 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L

El tratamiento con Cu y con Mn de forma combinada produce un descenso en el número de copias de ADNmt (Diagrama 25), efecto que parece ser neutralizado por la adición de V.

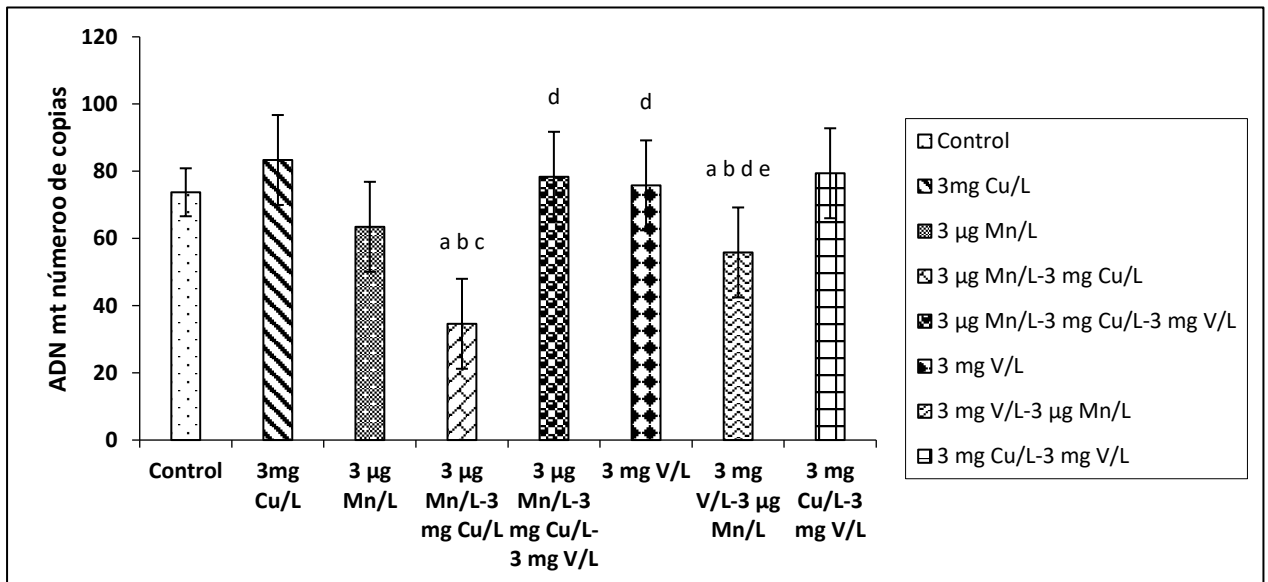


Diagrama 25. Variaciones en el número de copias en el ADN mitocondrial de células HepG2 tras la exposición a distintas dosis de metales durante 32 h.

a) vs control; b) vs 3 mg Cu/L; c) vs 3 µg Mn/L d) vs 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L; e) vs 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 µg Mn/L

4.5. Estudios “*in vivo*”.

En los resultados *in vivo* en las primeras experiencias se aprecia que la administración a las ratas de 1 mg V/ día en forma de BMOV causó una reducción de la ingesta de alimento, ingesta de agua y del incremento de peso corporal (Tabla 4).

Grupos	C	V
Peso corporal en el día 35 (g)	296±30	236±24 ^a
Alimento ingerido (g/día)	15.5±2.5	13.2±1.6 ^a
Agua ingerida (mL/día)	16.6±4.3	8.3±1.9 ^a
V ingerido (µg/día)	1±0.1	1038 ± 208 ^a

Tabla 4. Peso corporal en el día 35 y alimento, agua y vanadio ingeridos en los días 28-35 del estudio. ^a C vs. CV, P<0.05

Grupos	C	V
V (µg v/L)	2.3±0.5	456±73 ^a
Cu (µgv/L)	851±117	860±39
Mn (µg v/L)	1.6±0.4	1.4±0.5
Leptina (ng/ml)	16.3±4.4	5.9±2.3 ^a
Expresión génica de hepcidina	1,0±0.3	2.2±0.4 ^a

Tabla 5. Niveles séricos de V, Cu, Mn, leptina y expresión génica hepática de hepcidina (veces que incrementa). ^a C vs. CV, P<0.05

La Tabla 5 muestra los niveles séricos de V, Cu, Mn, leptina y la expresión génica de hepcidina en el hígado. Se ve un incremento de los niveles séricos de vanadio, no se observándose cambios significativos en los niveles de Cu y Mn. El tratamiento ocasiona un descenso significativo en los niveles de leptina y un incremento de la expresión genética de la hepcidina en el hígado.

Grupos	C	V
<u>Cobre</u>		
Cu ingerido (I) (µg/día)	98 ± 16	79 ± 35^a
Cu fecal (F) (µg/día)	55 ± 10	51 ± 11
Cu urinario (U) (µg/día)	3.4 ± 0.9	2.5 ± 0.8
Cu absorbido (µg/día)	43 ± 9	28 ± 8^a
Absorción de Cu (%)	44 ± 10	37 ± 10
Cu retenido (µg/día)	39 ± 9	26 ± 7^a
Retención de Cu (%)	40 ± 9	33 ± 12
<u>Manganeso</u>		
Mn ingerido (I) (µg/día)	192 ± 25	169 ± 21^a
Mn fecal (F) (µg/día)	124 ± 25	115 ± 22
Mn urinario (U)	2.4 ± 0,1	2.0 ± 0.1
Mn absorbido (µg/día)	68 ± 17	54 ± 11^a
Absorción de Mn (%)	35 ± 9	32 ± 10
Mn retenido (µg/día)	66 ± 17	52 ± 11^a
Retención de Mn (%)	34 ± 10	31 ± 8

Tabla 6. Utilización digestiva y metabólica del Cu y Mn en los días 28-35 del estudio. ^a C vs. CV, P<0.05. Absorbido = I-F; (%) Absorción = (I-F) x100 / I; Retenido= I- (F+U); % Retención = [I- (F+U)] x 100 / I

La tabla 6 muestra la utilización digestiva de Cu y Mn; en este caso, se observa que el grupo de ratas que han sido expuestas a vanadio presentan una menor ingesta de cationes y una menor absorción y retención, cuando expresamos ese parámetro en valores absolutos. No obstante, si lo expresamos como porcentaje de la ingesta no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

En cuanto a la cantidad de metales en los diferentes tejidos estudiados (Tabla 7), se observa que la suplementación con BMOV produce incrementos de vanadio en todos los tejidos. Además, hay un aumento de Cu en el riñón.

Por otra parte, el contenido de Mn en los tejidos estudiados no se ve afectado por el tratamiento con vanadio.

Grupos	C	V
<u>Hígado</u>		
V (mg/kg tejido seco)	0.043 ± 0.01	8.8 ± 2.5 ^a
Cu (mg/kg tejido seco)	15 ± 1.4	14 ± 3.6
Mn (mg/kg tejido seco)	8.2 ± 1.2	8.3 ± 1.0
<u>Riñón</u>		
V (mg/kg tejido seco)	0.12 ± 0.02	28 ± 6 ^a
Cu (mg/kg tejido seco)	23 ± 6	41 ± 10 ^a
Mn (mg/kg tejido seco)	3.5 ± 0.5	3.8 ± 0.2
<u>Bazo</u>		
V (mg/kg tejido seco)	0.048 ± 0.01	0.19 ± 0.18 ^a
Cu (mg/kg tejido seco)	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.08
Mn (mg/kg tejido seco)	0.63 ± 0.05	0.66 ± 0.07
<u>Corazón</u>		
V (mg/kg tejido seco)	0.007 ± 0.002	1.25 ± 0.18 ^a
Cu (mg/kg tejido seco)	12 ± 1.6	12 ± 0.9
Mn (mg/kg tejido seco)	1.2 ± 0.14	1.4 ± 0.13

Tabla 7. Contenido de V, Cu y M en los diversos tejidos estudiados en el día 35 experimental. ^a C vs. V, P<0.05



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 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 V presentes en el medio ambiente, su amplio uso industrial, su frecuente empleo como suplemento por diferentes tipos de atletas (fundamentalmente culturistas) (Barceloux, 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., 1995, 1991; Michibata, 2012; Oster et al., 1993; Thompson y Orvig, 2006a; Zaparowska y Ścibior., 1998). Aunque para algunos compuestos de vanadio se han completado los ensayos clínicos (Thompson y Orvig, 2006a), sin embargo, 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 (Kawabe et al., 2006; Thompson y Orvig, 2006a; Yanardag y Tunalı, 2006), el V 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 V con efectos pro-oxidantes porque altera el metabolismo de diversos elementos traza como el Mg, Fe, Cu, Zn y Se (Oster et al., 1993; Sánchez-Gonzalez et al., 2012a; Sánchez-González et al., 2014a; Sánchez-Gonzalez et al., 2012b; Sánchez-González et al., 2014b; Ścibior et al., 2014; 2010, 2009; 2006). La presencia de estrés oxidativo se ha encontrado asociada con cambios en la producción de citokinas (Dye et al., 1999), cambios inflamatorios (Pierce et al., 1996) y la presencia de tumores pulmonares (Assem y Levy, 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 V, Cu y Mn (Rucker et al., 2002, Chen y Tan, 2012, Sánchez-González et al., 2014a).

En la presente tesis tiene como objetivo profundizar en el efecto de la exposición al vanadio en en modelos “*in vitro*” e “*in vivo*” y aportar nuevos datos sobre si el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas altera la homeostasis del Cu y del Mn.

Para la realización del estudio se seleccionó el compuesto organometálico bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV), en lugar de la sal inorgánica ya que ha demostrado ser más efectivo como agente hipoglucemiante, presenta mejor tolerancia y menor toxicidad en modelos animales (Caravan et al., 1995; Thompson et al., 2006). Además, es un compuesto estable en soluciones acuosas (Caravan et al., 1995).

El desarrollo del trabajo se ha realizado en dos fases:

A) En una primera fase se investigó el efecto de los tres metales, así como las diferentes combinaciones entre éstos sobre células de colon y de hígado. En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de viabilidad con los ensayos MTT y cristal violeta de varias dosis de cada uno de los metales estudiados (cobre y manganeso) por separado durante tiempos de exposición de 16 y 32 horas.

Tras esto, se seleccionaron ciertas dosis extraídas de los estudios individuales para evaluar cómo afecta la combinación de distintas dosis de metales a la viabilidad celular con el método MTT.

Posteriormente, para comprobar el posible daño ocurrido en el DNA se determinaron los parámetros momento de cola (tail moment) y momento de cola Olivé (Olivé tail moment) con el ensayo Comet sobre células hepáticas. Del mismo modo se analizaron parámetros relativos al DNA mitocondrial.

El interés creciente del estudio de las aplicaciones del vanadio como agente insulino mimético y sus posibles usos para el tratamiento de la diabetes (Adam et al., 2017), así como de los estudios realizados combinando diversos metales como cobre y manganeso (Li et al, 2017), nos condujo a plantear estos experimentos para poder conocer con mayor exactitud el efecto de estos metales.

Para la realización del estudio se seleccionaron células tumorales colónicas HT 29 y HepG2, esto responde al papel fisiológico que ejerce el hígado y el intestino en los procesos de metabolismo y digestión en el organismo humano; quizá pueda pensarse más adecuada la elección de células que proceden del duodeno, tales como la línea Caco-2, células de morfología epitelial ya que es la región donde se produce la mayor absorción de estos compuestos, no obstante, la literatura muestra que gran parte de los estudios realizados sobre exposición de vanadio “*in vitro*” han sido desarrollados en líneas celulares HT-29, debido a que pertenecen a células colónicas en las que se ha detectado la presencia de ciertos transportadores que están involucrados en la absorción de metales, como el transportador de iones divalente DMT1 (Johnston et al., 2006; Takeuchi et al., 2005). Estas células también han sido empleadas en experimentos en los que se estudia el metabolismo y absorción de metales como hierro (Laparra et al., 2009), vanadio (León et al., 2015) y cobre (Zeng y Botnen, 2004). Son células de rápido crecimiento y fácil manejo.

Las células HepG2 son células ampliamente utilizadas en ensayos con metales, así se han empleado en estudios “*in vitro*” de selenio (Renko et al., 2017), hierro (Krungchanuchat et al., 2017) y vanadio (Cunha-de Padua et al., 2017). Sobre la base de los resultados obtenidos con las células HT-29, para los ensayos con la línea HepG2 solo se han llevado a cabo los estudios de viabilidad celular a 32h con MTT.

B) En una segunda fase se abordó “*in vivo*” el estudio del efecto del tratamiento con 1mg/día a ratas, sobre la utilización digestiva y metabólica del cobre y el manganeso y su relación con los niveles de leptina circulante, expresión génica de hepcidina en hígado y el contenido del vanadio, cobre y manganeso en el suero, riñón, hígado, bazo y corazón, con el fin de conocer si el tratamiento produce interacciones a nivel digestivo y tisular con los mencionados elementos.

5.1. Estudios "in vitro" de viabilidad celular.

5.1.1. Sobre los estudios de viabilidad de células expuestas a diferentes concentraciones de vanadio.

En primer lugar, ensayamos cuatro concentraciones de vanadio (350, 750, 1500 y 3000 $\mu\text{g/L}$), estas concentraciones fueron seleccionadas en función de los niveles plasmáticos y hepáticos de vanadio que nuestro grupo encontró en estudios realizados anteriormente *in vivo* (Sánchez-Gonzalez et al., 2012a; Sánchez-Gonzalez et al., 2012b; Sánchez-González et al., 2014a).

Al finalizar los tiempos de exposición (16 y 32 h) se determinó la viabilidad celular usando los métodos de MTT y cristal violeta. La elección de los tiempos de exposición se realizó en base a que la mayoría de la literatura científica en los ensayos de exposición celular a metales varía entre las 14 y 72h (Chiarelli y Roccheri, 2012; Kaczmarek et al., 2010).

Los resultados obtenidos muestran, tras la exposición de las células HT-29 a las cuatro concentraciones de vanadio durante 16 horas, aumento de la viabilidad a todas las concentraciones ensayadas, aunque en el ensayo MTT no muestra efectos significativos. Se puede concluir que ambos ensayos muestran patrones semejantes, aunque sólo se alcanza la significación estadística en los ensayos de cristal violeta.

Sin embargo, los ensayos de exposición a BMOV durante 32h muestran, tanto con células HT-29 como con células HepG2, una caída significativa de la viabilidad celular respecto a los controles (Diagramas 1-5). Los resultados ponen de manifiesto que la línea celular hepática es más sensible a la sobreexposición a vanadio que la colónica, hecho que se plasma en que los primeros hallazgos relativos al descenso de viabilidad celular a tiempo de exposición 32h se encuentran en la línea HepG2 a concentración de 750 $\mu\text{g V/L}$, concentración que no muestra efectos en la línea HT-29.

El hecho que la línea HepG2 sea más sensible concuerda con lo obtenido por otros autores respecto a que la captación de algunos compuestos es dependiente de la línea celular estudiada (Gonzales et al., 2015). Además, esta línea HepG2 ha sido la de

elección para el estudio de la captación tras la exposición de BMOV (Nischwitz et al., 2013).

Estos resultados, muestran que el tratamiento crónico con BMOV a las dos dosis superiores presenta efectos tóxicos sobre las células intestinales y hepáticas, lo cual podría estar relacionado con los efectos prooxidante y proinflamatorios encontrados por nuestro grupo en ratas en los experimentos "in vivo" (Sánchez-Gonzalez et al., 2012a; Sánchez-Gonzalez et al., 2012b, Sánchez-González et al., 2014a). También podría encontrarse relacionado con la hepatotoxicidad señalada por otros autores en animales de experimentación (Srivastava, 2000).

5.1.2. Sobre los estudios de viabilidad de células expuestas a diferentes concentraciones de cobre.

Otro grupo de los ensayos que realizamos fue el examen del efecto de la exposición a diferentes dosis de cobre, éstos se hicieron manteniendo las mismas condiciones experimentales que las empleadas para el estudio de la de vanadio.

Las dosis elegidas de cobre corresponden la más baja al valor sérico normal (1 mg Cu/L) y junto a ésta se ensayaron valores dobles y triples (2 y 3 mg Cu/L).

En todos los ensayos llevados a cabo con células HT-29, tanto a 16 como a 32 h y para ambas técnicas ensayadas, las dosis 1 y 2 mg Cu/L tienden a mejorar la viabilidad celular; mientras que la de 3 mg Cu/L se mantiene en valores próximos a la de los controles (Diagramas 6-9).

No obstante, para células HepG2 a 32 h, hay un aumento de la viabilidad celular en todas las concentraciones ensayadas, independientemente de la dosis (Diagrama 10).

Este aumento de la viabilidad celular asociada a dosis similares o ligeramente superiores a las fisiológicas de cobre, quizá pueda deberse a sus diversas acciones entre las que destaca la capacidad antioxidante (Gaetke y Chow, 2003; Grasso et al., 2017). Así, la forma de la superóxido dismutasa que se sitúa en citoplasma y núcleo celular, requiere la presencia de cobre para su centro catalítico sea activo, debido a esto, al tener un aporte extra de cobre favorecerá el desarrollo de la acción de la SOD y protegerá a las células de los posibles radicales libres aumentando su viabilidad.

Se puede concluir, por tanto, que en nuestras condiciones experimentales, la exposición a cobre mejora la viabilidad celular de células HT-29 dependiente de la dosis e independiente del tiempo de exposición. Mientras que sobre las células HepG2 ejerce su efecto independientemente de la dosis.

5.1.3. Sobre los estudios de viabilidad de células expuestas a diferentes concentraciones de manganeso.

Posteriormente procedimos a realizar los estudios de la exposición con manganeso, repitiendo las condiciones que se hicieron con cobre. Al igual que en el cobre, las dosis empleadas correspondieron a la dosis sérica normal (1 $\mu\text{g Mn/L}$) y valores dobles y triples de esa cantidad (2 y 3 $\mu\text{g Mn/L}$).

Los ensayos de exposición al Mn presentan evoluciones semejantes tanto a las 16h y 32h y son similares para las dos líneas celulares estudiadas (Diagramas 11-15).

En general, se puede afirmar que la exposición a Mn tiende a mejorar la viabilidad celular y esta es independiente de la dosis empleada. Sin embargo, cabe reseñar que la viabilidad mejora al aumentar el tiempo de exposición y que dichos resultados son más patentes con los ensayos de MTT.

Este incremento de la viabilidad en las células es atribuible a las propiedades antioxidantes del manganeso al participar en la estructura de numerosas enzimas entre la que destaca la superóxido dismutasa y que ya han sido reflejadas por otros autores en otro tipo de ensayos (Cai et al., 2017; Coassin et al., 1992). La superóxido dismutasa que necesita el Mn en su centro activo se encuentra en la membrana mitocondrial y por tanto, influye en gran medida en la defensa antioxidante, así, se puede intuir que la presencia de Mn en el medio favorece su acción e impide que las especies reactivas de oxígeno dañen a las células y permite un aumento de la viabilidad celular.

No obstante, otros autores reflejan que dosis altas de Mn provocan un descenso en la viabilidad celular con el ensayo MTT originando una toxicidad al manganeso por un mecanismo no muy bien conocido (Marreilha dos Santos et al., 2008); Las dosis empleadas en el mencionado estudio para realizar la exposición a las células fueron muy superiores a las usadas en nuestros ensayos, por lo que se puede concluir que nuestras dosis no producen esa toxicidad.

5.1.4. Sobre los estudios de viabilidad combinando dos metales, cobre y manganeso, vanadio y manganeso y vanadio y cobre.

En primer lugar, una vez seleccionadas las dosis que provocan los efectos representativos de cada uno de los metales individuales, se procedió a la exposición combinada de parejas de metales.

En el caso del cobre y manganeso se usaron la concentración sérica fisiológica y la más alta empleada en los ensayos individuales. Para el vanadio se seleccionaron las concentraciones de 1,5 mg y 3 mg V/L, ya que son las concentraciones que en los estudios individuales producían efecto en las células sobre la viabilidad. El tiempo de exposición en todos los casos fue de 32 horas, ya que los ensayos realizados a 16 horas de exposición no produjeron efectos tóxicos en las células.

El ensayo empleado en todos los casos fue el MTT ya que mostró detectar con mayor sensibilidad los cambios ocurridos en la viabilidad celular.

Se estudió la combinación del vanadio con Mn y Cu con la finalidad de conocer si la adición de estos metales a cultivos con vanadio podría compensar el efecto tóxico que produce este elemento y mejorar la viabilidad celular.

Al combinar cobre y manganeso en células HepG2 encontramos que para dosis de cobre elevadas se producía un aumento de la viabilidad independientemente de la cantidad de manganeso; esto contrasta con los resultados obtenidos anteriormente y nos da la posible indicación de que en la combinación de estos metales es el cobre el que ejerce un papel más importante en la protección de las células; incluso a dosis bajas de los dos metales su viabilidad era inferior que para el grupo control (Diagrama 16).

Estos datos avalan que la exposición de las células a estos metales genera un aumento de la viabilidad asociado fundamentalmente a la cantidad de cobre.

Algunos autores han realizado estudios con la combinación de algunos elementos traza en los que se incluyen cobre y manganeso, para asociar la cantidad de estos metales y el papel que estos juegan en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Sohrabi et al., 2017), encontrando que niveles normales de Cu y Mn en diferentes tejidos protege de la acción de otros metales tóxicos como el aluminio (Al).

Tras la adición de Mn a dosis de 1 ó 3 $\mu\text{g/L}$ al medio de cultivo de células HT-29, expuestas a las mayores dosis de vanadio, se aprecia una corrección del descenso en la viabilidad celular provocada por el vanadio en condiciones semejantes (Diagrama 17). Este hecho se repite cuando combinamos V y Cu en las condiciones descritas (Diagrama 18).

Por tanto, en cultivos celulares de HT-29 no se observaron cambios significativos entre las diferentes muestras ensayadas independientemente de la cantidad y del metal adicionado, lo que nos lleva a pensar que el efecto antioxidante ejercido por estos metales ha compensado el daño producido por el vanadio (Diagrama 3) permitiendo una mayor supervivencia de las células a las dosis altas de vanadio.

En el caso de los cultivos de HepG2 los resultados mostraron en términos generales, que la adición Mn o Cu da lugar a resultados semejantes a los encontrados con HT-29 (Diagramas 19 y 20). No obstante, hay que resaltar que la combinación V 3mg/L- Mn 3 $\mu\text{g/L}$ conduce a una mejora significativa de la viabilidad celular en esta línea celular (Diagrama 19).

5.1.5. Sobre los estudios de viabilidad en combinación de tres metales.

Para este ensayo se seleccionaron las dosis más altas de cada uno de los metales (V, Cu, Mn) en los experimentos anteriores, ya que con ellas se pusieron de manifiesto el efecto tóxico del vanadio y los efectos protectores del cobre y manganeso. Los ensayos de viabilidad se han realizado con MTT en células HepG2 a 32h de exposición (Diagrama 21).

Al combinarlas en general no se observan diferencias significativas entre cada uno de los grupos, mostrando sin embargo, una tendencia a presentar los valores de viabilidad celular más altos en los grupos en los que la cantidad de vanadio es más baja. El único cambio significativo se encontró en las células que habían sido expuestas a la concentración de vanadio más baja y a la concentración de cobre más alta. Además, los ensayos frente a los que presentó diferencias significativas en la viabilidad celular, la mayoría presentaban la concentración superior de vanadio y la inferior de cobre.

Por tanto, podemos suponer que en este ensayo la asociación de metales antioxidantes ejerce un efecto protector a las células HepG2 tras adicionarles vanadio y

que este efecto es más intenso con la presencia de dosis altas de cobre, al igual que ocurría en los ensayos realizados por parejas de cobre y manganeso solos, en las que las dosis altas de cobre ejercían un efecto beneficioso en la viabilidad celular.

Por otra parte, contrasta con lo encontrado en la asociación entre vanadio y manganeso por separado, en la que dosis altas de manganeso provocaban un aumento de la viabilidad, por lo que podemos concluir que cuando ambos metales están presentes, el efecto protector parece deberse en mayor medida al cobre.

5.2 Sobre los estudios de daño en ADN nuclear. Comet.

En los ensayos de viabilidad celular se puso de manifiesto el efecto protector que ejerce la adición de metales antioxidantes como el manganeso y el cobre a células expuestas a vanadio, pero no el mecanismo involucrado.

Para profundizar en el estudio, células HepG2 se sometieron a las mismas dosis de metales (V, Cu y Mn) y se llevó a cabo el ensayo de Comet, obteniendo los parámetros tail moment (TM) y tail moment Olivé (OTM).

La figura 10 muestra que la exposición por separado de cobre o manganeso o de ambos conjuntamente, no ocasionan daño alguno en el ADN, esto concuerda con los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad, en los que en estas concentraciones había un aumento de la viabilidad respecto a control.

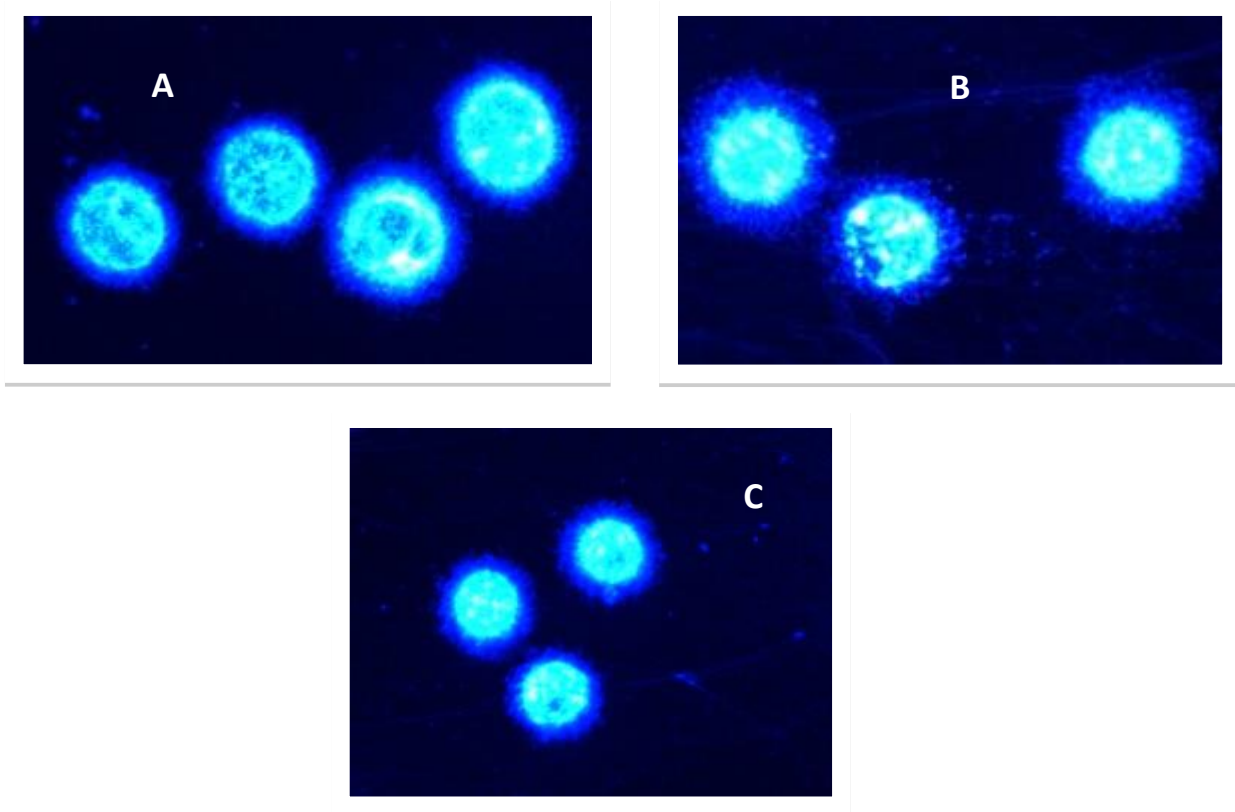


Figura 10: imágenes obtenidas tras la exposición de células HepG2 a metales antioxidantes: A) concentración 3 mg Cu/L; B) concentración 3 mg Cu/L-3 µg Mn/L; C) concentración 3µg Mn/L.

Estos efectos, quizá se deban al papel antioxidante de estos metales como ya han puesto de manifiesto por otros autores que han señalado la mejoría del status antioxidante asociado al cobre en estudios *in vivo* (Gu et al., 2017.; Mohamed, 2017). También se ha descrito su acción antioxidante asociada normalmente al papel que ejerce la superóxido dismutasa (Gu et al., 2017) e incluso se han realizado ensayos focalizados sobre la importancia de la superóxido dismutasa asociada al manganeso como antioxidante (Long et al., 2017). En otros trabajos, se estudia la asociación del manganeso con otros metales destacando su papel antioxidante (Aguirre y Culotta, 2012), en este caso se estudiaba la relación con el hierro y se hace hincapié en el papel que juega el Mn como cofactor de la superóxido dismutasa.

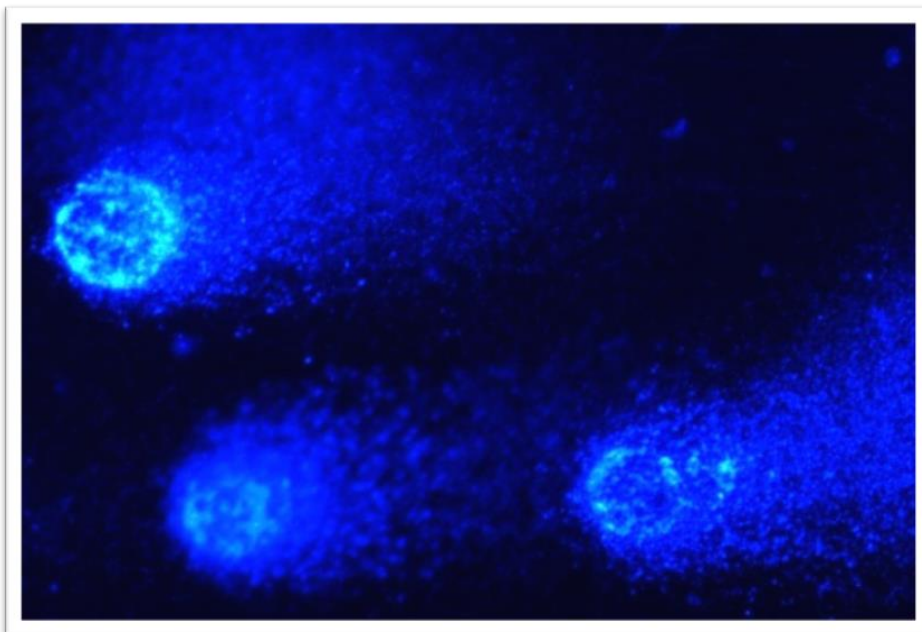


Figura 11: imágenes obtenidas tras la exposición de células HepG2 a una concentración de vanadio 3 mg/L.

La figura 11 muestra un gran daño en la estructura del núcleo celular causada por la exposición a vanadio. Esto concuerda con los resultados obtenidos en los estudios de viabilidad para el vanadio y ha sido reflejado por otros autores, que han manifestado la toxicidad producida por el vanadio a nivel cardiovascular, respiratorio y en el sistema reproductor, provocada por la exposición al vanadio (Domingo, 1996); incluso en los últimos años se ha comprobado las alteraciones en la memoria y neurológicas atribuidas al vanadio en ratas (Sun et al., 2017).

Las siguientes imágenes (Fig 11) muestran que al combinar el vanadio con algún metal antioxidante disminuye tanto el valor de TM como el de OTM. En el caso del OTM, los valores encontrados al añadir los metales antioxidantes son similares entre ellos. Sin embargo, para el TM se aprecia un descenso significativo al combinar con vanadio los dos metales a la vez, mientras que no se observan diferencias entre los ensayos en los que solo se combinan vanadio y cobre o vanadio y manganeso.

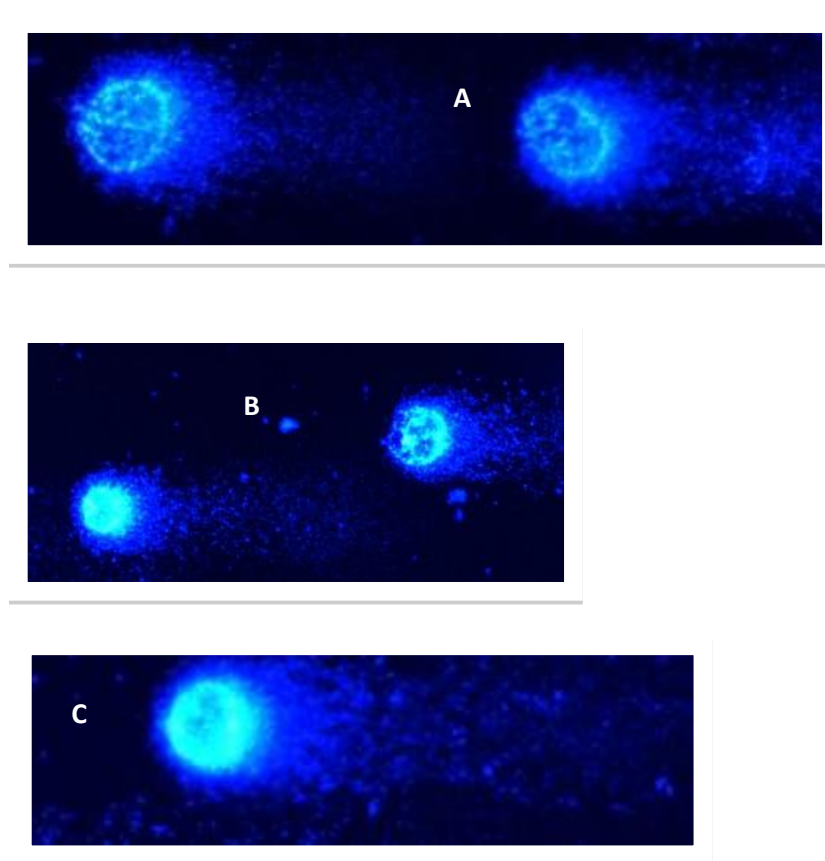


Figura 12: imágenes obtenidas tras la exposición de células HepG2 a metales antioxidantes: A) concentración 3 mg V/L-3 mg Cu/L; B) concentración 3 mg V/L-3 μ g Mn/L; C) concentración 3 mg V/L-3 mg Cu/L-3 μ g Mn/L.

Este hallazgo no concuerda con los estudios de viabilidad en los que al combinar el metal antioxidante con el vanadio la viabilidad celular volvía a ser similar a la control, en este caso se aprecia que aunque disminuye el daño ocasionado a nivel del ADN, este daño sigue presente y es significativamente superior a las células control, este hecho nos lleva a pensar que a pesar del daño que ocasiona en ADN, puede que esta lesión no sea suficiente para ocasionar un descenso en la viabilidad celular significativo.

Por otra parte, los resultados de TM muestran que la combinación del cobre con el vanadio tiene un valor inferior a la combinación con manganeso, lo que lleva a pensar que el cobre ejerce un efecto protector mayor que el manganeso al combinarlos solos con el vanadio (al igual que ocurría en los estudios de viabilidad combinando el vanadio con un único metal); sin embargo, al combinarlos los tres se apreciaba un efecto más intenso ejercido por el cobre (al igual que en el caso del TM). Además, el valor de TM fue inferior al combinar vanadio con cobre, esto es similar a lo ocurrido con los estudios

de viabilidad en los que al combinar todos los metales las combinaciones que contenían menor concentración de cobre eran las que presentaban una viabilidad más baja, lo que lleva a pensar que en nuestras condiciones experimentales el cobre ejerce un efecto protector más intenso que el manganeso.

Globalmente estos resultados permiten afirmar que la presencia de vanadio genera un daño oxidativo en el ADN alteraciones que son provocadas por las ERO que alteran los ácidos nucleicos, ciertos estudios ponen de manifiesto que la exposición al vanadio en ratas genera daños en la defensa antioxidante dando como resultado un descenso de algunas enzimas antioxidantes en el suero (Kurt et al., 2011) y que este daño disminuye al estar presente metales con papel antioxidante como el cobre, el manganeso o ambos, probablemente debido a su papel en el correcto funcionamiento de ciertas enzimas; siendo más intenso el papel corrector de estos metales al estar los dos presentes.

5.3. Sobre los cambios en el contenido de V, Cu y Mn en células HepG2 tras 32 horas de exposición a dichos elementos aislados o combinados (Tabla 5).

Es conocido que cobre y manganeso pueden ser transportados a través de la membrana celular por el mismo transportador, el transportador de metales divalentes (DMT1) (Gunshin et al., 1997; Mackenzie et al., 2007). Sin embargo, existe poca información sobre la capacidad del vanadio para modificar la expresión del transportador. Del mismo modo se desconoce si la sobreexposición a vanadio puede alterar la funcionalidad del transportador. Recientemente se ha observado que en ratas expuestas a VO_3Na , suministrado en el agua de bebida, la expresión del DMT1 en los hemisferios cerebrales y en hígado, no se modifica significativamente, mientras que disminuye en riñón (Ścibior et al., 2014).

La exposición de los cultivos celulares a V y Cu, individualmente, conduce a un incremento del contenido celular de ambos metales como era de esperar. La exposición a V, además, incrementa el contenido intracelular de Cu y Mn y la exposición a Cu, incrementa el contenido intracelular de este metal, sin modificar los de V y Mn. Estos resultados indican que la presencia de V en el medio de cultivo facilita la entrada de Cu

y Mn en las células, lo que parece indicar que el vanadio es capaz de cotransportar Cu y Mn. Sin embargo, estos resultados solo han podido ser confirmados parcialmente en los estudios “*in vivo*” (se discuten en el siguiente apartado), en los que solo se han encontrado incrementos tisulares de Cu en el riñón, en las ratas tratadas con vanadio (Sanchez-González et al., 2014a); (Tabla 7).

La exposición a Mn ocasiona el efecto opuesto, induce una salida de los hepatocitos de los tres metales. Parece que el Mn no solo bloque su propia entrada, sino que además facilita el movimiento de los tres elementos hacia el exterior. Curiosamente cuando las células se exponen a los dos elementos conjuntamente (Cu y Mn), los tres metales alcanzan una concentración intracelular intermedia entre las observadas cuando exponen a Cu o Mn por separado. Parece que existe una compensación entre el efecto encontrado para el Cu solo (promueve la entrada Cu y no modifica movimientos de V y Mn) y el observado para el Mn (promueve la salida de los tres).

La exposición conjunta a V y Cu o a V y Mn, en general, da lugar a una repetición de las tendencias en los movimientos de iones descritos para los tratamientos individuales. Cuando se expuso a las células a V y Cu de forma combinada, incrementaron los niveles intracelulares de ambos elementos, pero sin alcanzar los valores observados en las exposiciones individuales. El Cu tampoco alcanzó dichos niveles cuando las células se expusieron a Cu y Mn conjuntamente. La presencia de V permite entrada de Cu semejante a la que se aprecia en el tratamiento individual de V, a pesar de la adición de Cu en el medio. En nuestra opinión la presencia de V en el medio limita significativamente la entrada de Cu en los hepatocitos, aunque no la impide. El tratamiento conjunto con V y Mn, permite una entrada de V semejante a la ocasionada por V y Cu, pero como ocurría con la exposición a Mn solo, se observa un descenso del contenido de Cu y Mn, alcanzando valores semejantes a los observados en el mencionado experimento. Se puede pensar, que de nuevo, la presencia de Mn no solo bloquea la entrada de Cu y Mn, si no que facilita su salida.

Por último, la incorporación al medio de cultivo de los tres metales da lugar a una incorporación de V y Cu a los hepatocitos, alcanzando el V valores semejantes a los encontrados cuando las células se exponen solo a V y en el caso del Cu encontramos un contenido intracelular, aproximadamente, la mitad al observado con el tratamiento de Cu solo. En el caso del Mn, la concentración encontrada es semejante a la descrita para

los tratamientos Cu/Mn y V/Cu. En este caso de nuevo se observa el mismo fenómeno, la presencia de Cu favorece la incorporación de Mn, aproximándolo a valores próximos a los controles, compensando, en parte, la salida de Mn que se produce cuando se expone a él solo o con V.

En general, se puede afirmar que existen interacciones entre los metales ensayados, resultando de gran interés el comportamiento del Mn individualmente, que parece ocurrir en contra de lo esperado; la capacidad del V para limitar el transporte de Cu y el efecto del Cu favoreciendo la incorporación del Mn a los hepatocitos. Estos efectos que, como se ha mencionado, los consideramos de gran interés, en estos momentos desconocemos las causas que los originan.

Los resultados obtenidos en estos experimentos, apoyan en parte los obtenidos en los experimentos de viabilidad, confirmando la importancia de la presencia del Cu. En nuestra opinión estas interacciones entre los tres elementos merecen ser investigados con mayor profundidad por su posible repercusión sobre la toxicidad del vanadio.

5.4. Sobre los experimentos de delección y número de copias de ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial humano (ADNmt) tiene una estructura circular con 16569 pares de bases, que codifica 13 polipéptidos de cadena respiratoria y dos ribosomales y 22 ARN de transferencia (Yamada et al., 2006).

El estudio de las delecciones y de las variaciones en el número de copias del ADNmt han sido muy empleadas en los últimos años ya presentan asociaciones con el desarrollo de ciertas enfermedades como la diabetes mellitus (Yamada et al., 2006) y ciertos tipos de cáncer (Yu., 2011).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, a diferencia del Cu y el Mn, el vanadio produce un efecto deletéreo significativo en el ADNmt, efecto que se reduce cuando es coadministrado con Cu y Mn, pero de un modo significativo con Mn, componente de la enzima SOD mitocondrial, dependiente de Mn

Estos resultados obtenidos sobre el ADN mitocondrial están en consonancia con los obtenidos en el estudio del ADN nuclear por el ensayo del comet, observando que el

efecto deletéreo del vanadio en el que sigue el mismo patrón. Esto confirma el daño oxidativo del V y que su toxicidad está ligada al daño provocado en la estructura del ADN. Además, ambos ensayos muestran que dicha toxicidad disminuye al añadir los metales con características antioxidantes (estos metales están muy relacionados con el funcionamiento de las mitocondrias, especialmente el Mn que participa en la SOD mitocondrial) y que el efecto protector es mayor al combinar los dos metales, pero que no lleva a valores similares al control.

Esta tendencia también es observada en los estudios de viabilidad, en la que la viabilidad es menor tras la exposición a V y disminuye significativamente este efecto al exponer a las células de forma simultánea con Cu y/o Mn.

La retención celular de vanadio disminuye cuando es coadministrado con Cu o con Mn, pero es semejante a cuando se administran los 3 metales simultáneamente. Este efecto muestra una concordancia directa con los hallazgos de deleciones mitocondriales. Es posible que el efecto reductor de las deleciones cuando se administra por pares V/Cu o V/Mn se deba al descenso en la retención celular de V, mientras que la administración conjunta de los 3 metales mantiene el semejante nivel de retención de V intracelular, lo que ocasionaría el mayor efecto deletéreo sobre el ADNmt observado.

Por otra parte puede observarse que el número de copias de ADNmt es significativamente inferior en los grupos expuestos a los pares Mn/Cu y Mn/V, grupos en los que a esas mismas dosis, se encontró un incremento significativo de la viabilidad celular. Algunos autores señalan el valor del número de copias como un marcador del recambio o “turnover” mitocondrial (Fukuoh et al., 2014; Ikeda et al., 2013), cabe pensar en este caso que al ser el Mn un elemento implicado en la defensa antioxidante mitocondrial, sus células presentan una menor tasa de reposición ya que son menos castigadas, y por tanto con mayor tasa respiratoria, demostrando que este metal ejerce ese “efecto protector” sobre las mitocondrias.

Este mismo efecto pero a la inversa es encontrado para la concentración de 3 mgV/L donde se han encontrado un incremento significativo del número de copias de ADNmt conjuntamente con un descenso de la viabilidad celular (prueba del MTT) en células HT29 al cabo de 32 horas, un incremento en el daño en ADN nuclear (ensayo de comet) y un aumento de la presencia de deleciones en el ADN mitocondrial. En este caso, el aumento del número de copias de ADNmt podría deberse a un aumento del

turnover mitocondrial, aumentando la biogénesis mitocondrial para compensar la presencia de mitocondrias dañadas y con baja funcionalidad.

5.5. Estudios realizados “*in vivo*”

5.5.1. Sobre los parámetros de peso, ingesta de agua y alimento y leptina.

En el presente estudio se ha encontrado que el vanadio disminuye la ingesta de alimento y de agua (Tabla 3), dichos efectos han sido asociados con la menor ganancia de peso (Sánchez-Gonzalez et al. 2012a; Oster et al. 1993; Ścibior et al. 2006). El vanadio también ocasiona un descenso de los niveles séricos de leptina (Tabla 4). La leptina es una adipokina sintetizada principalmente en el tejido adiposo, en cantidades directamente relacionadas con la masa del tejido adiposo. Esta hormona participa en la regulación del apetito (reduciendo la ingesta de alimentos) y por tanto en el consumo energético (Jéquier, 2006; Almanza-Perez et al. 2008). La menor ganancia de peso observada en el grupo tratado con vanadio indica que estas ratas tienen una menor cantidad de tejido adiposo, lo que podría explicar los menores niveles circulantes de leptina. El descenso de la leptina sérica debería haber causado un incremento de la ingesta de alimento y por tanto, del peso corporal; no obstante, en nuestro estudio se ve el efecto opuesto, quizá este efecto se deba a una acción directa del vanadio en el sistema nervioso central. Así, algunos autores han puesto de manifiesto que el vanadio incrementa la transducción de la señal de la leptina (Wilsey et al., 2006), lo cual podría explicar cómo, en nuestro estudio, menores niveles de leptina se encuentran acompañados de una reducción de la ingesta de alimentos y del peso corporal

5.5.2. Sobre la utilización digestiva y metabólica del cobre y manganeso.

Los resultados obtenidos muestran que las ratas que han sido tratadas con vanadio tienen una ingesta menor de ambos cationes objeto de este estudio (Cu y Mn, Tabla 3), la menor ingesta va acompañada de una menor absorción y retención cuando se expresan en valor absolutos, no obstante, al expresarlo como porcentaje de la ingesta no hay diferencias significativas entre ellas.

El hecho que disminuya la absorción de Cu y Mn con la presencia de V puede deberse a diversos factores, así, puede estar condicionado simplemente por una menor ingesta de alimento. Por otro lado, se conoce que el transportador de metales divalentes (DMT-1) está ampliamente distribuido a lo largo del duodeno e interviene en la absorción de Cu y Mn (Zheng et al., 2012) y que este transportador también participa en la absorción de V (Mackenzie et al., 2007), sin embargo, se conoce muy poco sobre si el vanadio es capaz de bloquear y/o modificar la expresión del transportador. Para analizar la posibilidad de que la ingesta de vanadio pudiera interferir bloqueando y/o modificando la expresión de DMT-1 a nivel intestinal, estudiamos la absorción digestiva de Cu y Mn, cationes que como ya se ha comentado son transportados por dicho transportador. Los resultados obtenidos en este presente estudio muestran que no hay diferencias significativas cuando la absorción de ambos cationes se expresa como porcentaje y por tanto, las menores cantidades absorbidas en valores absolutos son una consecuencia directa de la menor ingesta. Esto nos hace pensar que el vanadio no bloquea ni afecta la expresión del transportador DMT-1. Nuestro grupo ha analizado la expresión del DMT-1 en el riñón y no ha observado cambios significativos entre las ratas control y las tratadas con vanadio (resultados no publicados)

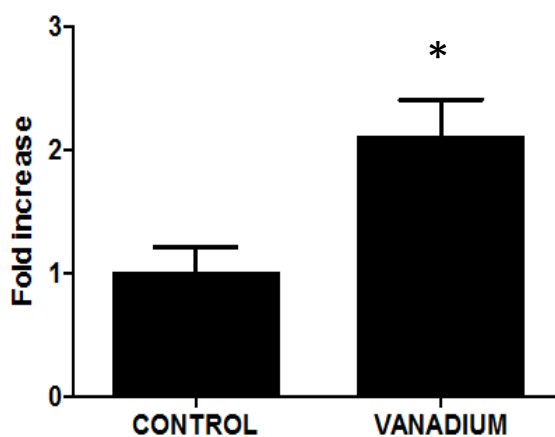


Figura 13. Efecto del tratamiento con vanadio sobre la expresión genética de la hepcidina en hígado (* $P < 0.05$ vs grupo control).

Por otro lado, se ha sugerido que el Mn podría modular la expresión de la hepcidina, y en consecuencia los cambios plasmáticos de Mn podrían atenuar o incrementar los niveles de hepcidina (Bartnikas, 2012), también se ha sugerido que el Mn es un sustrato de para la ferroportina. Sin embargo, no se han observado cambios en la salida de Mn^{54} en oocitos que expresan ferroportina (Mitchell et al., 2014). Por

tanto, en nuestras condiciones experimentales, el Mn no parece verse afectado por el incremento de la expresión de hepcidina encontrada en las ratas tratadas con vanadio (Tabla 4), este hecho sí que parece encontrarse ligado a cambios en la homeostasis de hierro (Sánchez-González et al., 2014b).

Los resultados obtenidos en este punto ponen de manifiesto que las diferencias observadas en el cobre y manganeso absorbido y retenido se deben al efecto del tratamiento sobre la ingesta de alimento y no a efectos del vanadio sobre la utilización digestiva y metabólica de ambos elementos.

5.5.3. Sobre el contenido de V, Cu y Mn en los tejidos estudiados.

Los resultados encontrados ponen de manifiesto que la exposición de ratas sanas a 1 mgV/día, aunque produce un descenso significativo en la ingesta, absorción y retención absoluta del Cu y Mn, no modifica los niveles circulantes de ambos elementos (Tablas 3 y 4).

El tratamiento tampoco modifica significativamente el contenido de ambos iones en hígado, bazo y corazón, solo encontramos un incremento significativo de la concentración de cobre en el riñón (Tabla 7).

Nuestro grupo en publicaciones anteriores puso de manifiesto que el tratamiento con vanadio a ratas sanas o diabéticas normalmente conduce a una redistribución tisular de los distintos elementos estudiados. En algunos casos se ha observado que podría ser debido a interacciones con el vanadio, en otros se ha asociado a cambios en la utilización digestiva y metabólica del elemento ocasionada por el tratamiento, sin embargo, en otros casos no se ha podido asociar a ninguna de las causas anteriores (Sánchez-Gonzalez et al., 2012a; Sánchez-González et al., 2014a; Sánchez-Gonzalez et al., 2012b; Sánchez-González et al., 2014b).

En el presente trabajo hemos encontrado tanto el vanadio ingerido, como los niveles de vanadio circulantes correlacionados linealmente con el contenido de Cu en el riñón ($r=0.554$ y $r=0.510$ respectivamente; $P<0.05$ en ambos casos). La presencia de las mencionadas correlaciones hacen pensar en la posible existencia de interacciones entre

el vanadio y el cobre a nivel renal y, además, justificaría la tendencia a disminuir la excreción urinaria de cobre, aunque dicha tendencia no alcance significación estadística.



6. CONCLUSIONES

Sobre los estudios “*in vitro*”.

1^a.- La exposición de las células HT-29 a las cuatro concentraciones de vanadio durante 16 horas, aumenta su viabilidad a todas las concentraciones ensayadas

2^a.- El bis(matolato)oxovanadio(IV) a las dos dosis superiores ensayadas a las 32 horas de exposición, muestra efectos tóxicos tanto sobre las células intestinales como las hepáticas, lo que podría estar relacionado con los efectos prooxidantes y proinflamatorios encontrados por nuestro grupo en ensayos realizados en ratas

3^a.- En términos generales, la adición de cobre y/o manganeso al medio de cultivo tiende a mejorar la viabilidad celular, tanto en las células HT-29 como en las HepG2. En nuestras condiciones experimentales el efecto de la exposición al cobre es debido a la dosis y no al tiempo de exposición, mientras que los efectos ocasionados por la exposición al manganeso se encuentran relacionados con el tiempo de exposición y son independientes de la dosis empleada. Al exponer la línea celular HepG2 de forma simultánea a cobre y manganeso a la dosis más elevada de cobre, se produjo un aumento de la viabilidad celular independientemente de la concentración de manganeso, lo que indica que en la combinación de estos metales es el cobre el que ejerce un papel más importante en la protección de las células.

4^a.- La adición de cobre o manganeso separadamente al medio de cultivo tras la adición de vanadio, mejora la viabilidad celular, eliminando los efectos tóxicos producidos por el tratamiento con vanadio, siendo las dosis altas de cobre las que ejercen un efecto beneficioso en la viabilidad celular. La adición conjunta de cobre y manganeso ejerce un efecto protector en las células HepG2 tras adicionarles vanadio, siendo este efecto más intenso para las altas dosis de cobre, al igual que ocurre en los ensayos realizados por parejas.

5^a.- Los resultados ponen de manifiesto que la línea celular hepática es más sensible a la sobreexposición a vanadio que la colónica, hecho que se plasma en que los primeros hallazgos relativos al descenso de viabilidad celular se encuentran en la línea HepG2 a concentración de 750 µg V/L, concentración que no muestra efectos en la línea HT-29 a tiempo de exposición 32h

6^a.- La exposición a vanadio genera un daño oxidativo en el ADN nuclear, daño que disminuye al adicionar al cultivo cobre y/o manganeso, siendo más intenso el papel “corrector” de estos metales cuando ambos están presentes.

7^a.- La retención celular de vanadio disminuye cuando es coadministrado con Cu o con Mn, pero es semejante a cuando se administran los 3 metales simultáneamente. Este efecto muestra una concordancia directa con los hallazgos de deleciones mitocondriales. Es posible que el efecto reductor de las deleciones cuando se administra por pares V/Cu o V/Mn se deba al descenso en la retención celular de V, mientras que la administración conjunta de los 3 metales mantiene el semejante nivel de retención de V intracelular, lo que ocasionaría el mayor efecto deletéreo sobre el ADNmt observado cuando las células son expuestas a V de forma combinada.

8^a.- Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, a diferencia del Cu y el Mn, el vanadio produce un efecto deletéreo significativo en el ADNmt, efecto que se reduce cuando es coadministrado con Cu y Mn, pero de un modo significativo con Mn, componente de la enzima SOD mitocondrial, dependiente de Mn

9^a.- El número de copias de ADNmt es significativamente inferior en los grupos expuestos a los pares Mn/Cu y Mn/V, grupos en los que a esas mismas dosis, se encontró un incremento significativo de la viabilidad celular, hecho que puede atribuirse a que, al ser el Mn un elemento implicado en la defensa antioxidante mitocondrial, sus células presentan una menor tasa de reposición y posiblemente con mayor tasa respiratoria. De un modo inverso, en células expuestas a la mayor concentración de vanadio ensayada, se han encontrado un incremento significativo del número de copias de ADNmt conjuntamente con un descenso de la viabilidad celular en células HT29 al cabo de 32 horas, un incremento en el daño en ADN nuclear y un aumento de la presencia de deleciones en el ADN mitocondrial. En este caso, el aumento del número de copias de ADNmt podría deberse a un aumento del turnover mitocondrial, aumentando la biogénesis mitocondrial para compensar la presencia de mitocondrias dañadas y con baja funcionalidad.

Sobre los estudios “*in vivo*”.

10^a.- Los descensos del cobre y manganeso absorbido y retenido, encontrado en las ratas tratadas con vanadio cuando se expresan en valores absolutos, se encuentran ocasionadas por el efecto del tratamiento sobre la ingesta de alimento, y no a efectos del vanadio sobre la utilización digestiva y metabólica de ambos elementos.

11^a.- En nuestras condiciones experimentales, el tratamiento con vanadio a ratas aumenta significativamente la expresión genética de hepcidina hepática. El incremento en la expresión de esta hormona no modifica la homeostasis de ambos metales.

12^a.- El tratamiento con vanadio no modifica significativamente el contenido de cobre o manganeso en suero hígado, bazo y corazón, solo se encontró un incremento significativo de la concentración de cobre en el riñón. En términos generales, se puede afirmar que la exposición de las ratas a 1 mg V/día, suministrado en el agua de bebida como bis (matolato) oxovanadio IV, no altera de modo relevante la homeostasis de los elementos estudiados.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Adam., A.M.A., Naglah, A.M., Al-Omar, M.A., Refat, M.S., 2017. Synthesis of a new insulin-mimetic anti diabetic drug containing vitamin A and vanadium (IV) salt: chemico-biological characterizations. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*.30, 272-281.
- Aguirre, J.D., Culotta, V.C., 2012. Battles with iron: manganese in oxidative stress protection. *The Journal of biological chemistry*.287, 13541-13548.
- Aikens, J., Dix, T.A., 1991. Peroxy radical (HOO.) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides. *The Journal of biological chemistry*. 266, 15091-15098.
- Akatsu, H., Hori, A., Yamamoto, T., Yoshida, M., Mimuro, M., Hashizume, Y., Tooyama, I., Yezdimer, E.M., 2012. Transition metal abnormalities in progressive dementias. *BioMetals* 25, 337-350.
- Almanza-Pérez, C, Blancas-Flores, G, García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar FJ, Cruz, M., 2008. Leptina y su relación con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. *Gaceta médica de Mexico*. 144, 535-542.
- Arthington, J., 2003. Copper antagonists in cattle nutrition. 14th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, 0, 1-9.
- Ash, D.E., 2004. Structure and function of arginases. *The Journal of Nutrition*. 134, 2760S-2764S.
- Assem, F.L., Levy, L.S., 2012, Inhalation toxicity of vanadium. En: Michibata, H., Vanadium. *Biochemical and Molecular Biological Approaches: Part IV Medicinal Functions of Vanadium*. Springer, Londres, Nueva York, pp. 145-224.
- Au, C., Benedetto, A., Aschner, M., 2008. Manganese transport in eukaryotes: the role of DMT1. *Neurotoxicology*. 29, 569-76.
- Azad, N., Iyer, A., Vallyathan, V., Wang, L., Castranova, V., Stehlik, C., Rojanasakul, Y., 2010. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1203, 1-6.
- Baker, R.D., Baker, S.S., Larosa, K., Whitney, C., Newburger, P.E., 1993. Selenium Regulation of Glutathione Peroxidase in Human Hepatoma Cell Line Hep3B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 304, 53-57.
- Bandmann, O., Weiss, K.H., Kaler, S.G., 2015. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol*. 14, 103-113.
- Barceloux, D.G., 1999. Vanadium. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 37, 265-278.
- Bartnikas, T.B., 2012. Known and potential roles of transferrin in iron biology. *BioMetals*. 25, 677-686.
- Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature Genetics*. 38, 515-517.

- Bhatti, M.S., Ahmad, I., Ahmad, N., Lodhi, L.A., Ahmad, M., 2006. Epidemiological survey of genital prolapse in buffaloes kept under different systems and serum micro mineral contents. *Pakistan veterinary Journal*. 26, 197-200.
- Bogenghagen, D.F., Wang, Y. Shen, E.L., Kobayashi, R., 2003. Protein components of mitochondrial DNA nucleoids in higher eukaryotes. *Molecular & cellular proteomics*. 2, 1205-1216.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical journal*. 134, 707-716.
- Brown, D.R., Kozlowski, H., 2004. Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases. *Dalton Transactions*. 0, 1907-1917.
- Cai, H.R., Yang, Q.H., Tan, B.P., Dong, X.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., Zhang, S., 2017. Effects of dietary manganese source and supplemental levels on growth performance, antioxidant enzymes activities, tissue Mn concentrations and cytosolic manganese superoxide dismutase (cMnSOD) mRNA expression level of juvenile *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition* 23, 603-610.
- Caravan, P., Gelmini, L., Glover, N., Geoffrey Herring, F., Li, H., McNeill, J.H., Rettig, S.J., Setyawati, I.A., Shuter, E., Sun, Y., Tracey, A.S., Yuen, V.G., Orvig, C., 1995. Reaction chemistry of BMOV, bis(maltolato)oxovanadium(IV) - A potent insulin mimetic agent. *Journal of the American Chemical Society* 117, 12759-12770.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*. 59, 527-605.
- Chang, L.Y., Slot, J.W., Geuze, H.J., Crapo, J.D., 1988. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *The Journal of cell biology*. 107, 2169-79.
- Chapman, B.E., MacDermott, T.E., O'Sullivan, W.J., 1973. Studies on manganese complexes of human serum albumin. *Bioinorganic Chemistry*. 3, 27-38.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*. 49, 481-93.
- Chen, H., Tan, C., 2012. Prediction of Type-2 Diabetes Based on Several Element Levels in Blood and Chemometrics. *Biological Trace Element Research*. 147, 67-74.
- Chen, M.D., Yang, V.C., Alexander, P.S., Lin, P.Y., Song, Y.M., 2001. Effects of selected minerals on leptin secretion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Experimental biology and medicine*. 226, 836-40.
- Chiarelli, R., Roccheri, M.C., 2012. Heavy metals and metalloids as autophagy inducing agents: focus on cadmium and arsenic. *Cells* 1, 597-616.
- Coassin, M., Ursini, F., Bindoli, A., 1992. Antioxidant effect of manganese. *Archives of biochemistry and biophysics*. 299, 330-3.

- Collins, J.F., Prohaska, J.R., Knutson, M.D., 2010. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutrition reviews*. 68, 133-47.
- Conget, I., 2002. Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de Cardiología*. 55, 528-535.
- Cunha-de Padua, M.M., Suter Correia Cadena, S.M., de Oliveira Petkowicz, C.L., Martinez, G.R., Merlin Rocha, M.E., Mercê, A.L.R., Noletto, G.R., 2017. Toxicity of native and oxovanadium (IV/V) galactomannan complexes on HepG2 cells is related to impairment of mitochondrial functions. *Carbohydrate polymers*. 173, 665-675.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: The contribution of redox proteomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 24, 55-99.
- Das, S., Chatterjee, M., Janarthan, M., Ramachandran, H., 2012. Vanadium in cancer prevention. En: Michibata, H. *Vanadium. Biochemical and Molecular Biological Approaches: Part IV Medicinal Functions of Vanadium*. Springer, Londres, Nueva York, pp. 145-224.
- Davies, K.J., Delsignore, M.E., Lin, S.W., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *Journal of Biological Chemistry*. 262, 9902-9907.
- De Cremer, K., Van Hulle, M., Chéry, C., Cornelis, R., Strijckmans, K., Dams, R., Lameire, N., Vanholder, R., 2002. Fractionation of vanadium complexes in serum, packed cells and tissues of Wistar rats by means of gel filtration and anion-exchange chromatography. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 7, 884-890.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*. 89, 271-277.
- Ding, D., Roth, J., Salvi, R., 2011. Manganese is toxic to spiral ganglion neurons and hair cells *in vitro*. *NeuroToxicology*. 32, 233-241
- Dixit, R., Cyr, R., 2003. Cell damage and reactive oxygen species production induced by fluorescence microscopy: effect on mitosis and guidelines for non-invasive fluorescence microscopy. *The Plant journal*. 36, 280-90.
- Domingo, J.L., 1996. Vanadium: a review of the reproductive and developmental toxicology. *Reproductive Toxicology*. 10, 175-182.
- Domingo, J.L., Gomez, M., Llobet, J.M., Corbella, J., Keen, C.L., 1991. Oral vanadium administration to streptozotocin-diabetic rats has marked negative side-effects which are independent of the form of vanadium used. *Toxicology*. 66, 279-287.
- Domingo, J.L., Gomez, M., Sánchez, D.J., Llobet, J.M., Keen, C.L., 1995. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: the action of chelating agents on vanadium accumulation. *Molecular and cellular biochemistry*. 153, 233-240.
- Dye, J.A., Adler, K.B., Richards, J.H., Dreher, K.L., 1999. Role of soluble metals in oil fly ash-induced airway epithelial injury and cytokine gene expression. *The American journal of physiology*. 277, 498-510.

- Essick, E.E., Sam, F., 2010. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 3, 168-77.
- Farinati, F., Piciocchi, M., Lavezzo, E., Bortolami, M., Cardin, R., 2010. Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase induction in carcinogenesis. *Digestive diseases*. 28, 579-584.
- Fawcett, J.P., Farquhar, S.J., Walker, R.J., Thou, T., Lowe, G., Goulding, A., 1996. The effect of oral vanadyl sulfate on body composition and performance in weight-training athletes. *International journal of sport nutrition*. 6, 382-90.
- Ferruzza, S., Sambuy, Y., Ciriolo, M.R., De Martino, A., Santaroni, P., Rotilio, G., Scarino, M.L., 2000. Copper uptake and intracellular distribution in the human intestinal Caco-2 cell line. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 13, 179-85.
- Finkelstein, Y., Milatovic, D., Aschner, M., 2007. Modulation of cholinergic systems by manganese. *NeuroToxicology*. 28, 1003-1014.
- Fukuoh, A., Cannino, G., Gerads, M., Buckley, S., Kazancioglu, S., Scialo, F., Lihavainen, E., Ribeiro, A., Dufuor, E., Jacobs, H.T., 2014. Screen for mitochondrial DNA copy number maintenance genes reveals essential role for ATP synthase. *Molecular Systems Biology*. 10,734.
- Gaetke, L.M., Chow, C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*. 189, 147-63.
- Gerbitz, K.D., 1992. Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes? *Diabetologia*. 35, 1181-6.
- Gerrard, D.F., Fawcett, J.P., Farquhar, S.J., 1993. Vanadium use by athletes. *The New Zealand medical journal*. 106, 259.
- Ghaffari, M.A., Ghiasvand, T., 2010. Kinetic study of low density lipoprotein oxidation by copper. *Indian journal of clinical biochemistry*. 25, 29-36.
- Gil, A; Gil, F; Navarro, M., 2010. Selenio, manganeso, cromo, molibdeno, yodo y otros oligoelementos minoritarios. En: Gil, A., *Tratado de nutrición*,. Ed. Médica Panamericana, Madrid, pp. 716-717.
- , G.B., Van Camp, J., Vissenaekens, H., Raes, K., Smagghe, G., Grootaert, C., 2015. Review on the Use of Cell Cultures to Study Metabolism, Transport, and Accumulation of Flavonoids: From Mono-Cultures to Co-Culture Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14, 741-754.
- Grady, J.P., Murphy, J.L., Blakely, E.L., Haller, R.G., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Tuppen, H.A.L., 2014. Accurate measurement of mitochondrial DNA deletion level and copy number differences in human skeletal muscle. *Plos one*. 9, 1-15.
- Gralak, M.A., Leontowicz, M., Morawiec, M., Bartnikowska, E., Kulasek, G.W., 1996. Comparison of the influence of dietary fibre sources with different proportions of soluble and insoluble fibre on Ca, Mg, Fe, Zn, Mn and Cu apparent absorption in rats. *Archiv fur Tierernahrung*. 49, 293-9.

- Grasso, G.I., Bellia, F., Arena, G., Satriano, C., Vecchio, G., Rizzarelli, E., 2017. Multitarget trehalose-carnosine conjugates inhibit A β aggregation, tune copper(II) activity and decrease acrolein toxicity. *European journal of medicinal chemistry*. 135, 447-457.
- Gu, Y., Lian, X., Sun, W., Gao, B., Fu, Y., 2017. Diabetes Mellitus induces alterations in metallothionein protein expression and metal levels in the testis and liver. *Journal of international medical research*. 0, 1-10.
- Guilarte, T.R., 2011. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. *Environmental health perspectives*. 16, 4549-4566.
- Gunter, T.E., Gerstner, B., Gunter, K.K., Malecki, J., Gelein, R., Valentine, W.M., Aschner, M., Yule, D.I., 2013. Manganese transport via the transferrin mechanism. *Neurotoxicology*. 34, 118-127.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, M.A., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 338, 482-488.
- Haigis, M.C., Yankner, B.A., 2010. The aging stress response. *Molecular cell*. 40, 333-44.
- Hall, A.C., Young, B.W., Bremner, I., 1979. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat. *Journal of inorganic biochemistry*. 11, 57-66.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 1985. Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence and death. En: Halliwell, B., *Free radicals in biology and medicine*. Ed. Oxford University press. Nueva York, pp. 145-178.
- Hart, P.J., Balbirnie, M.M., Ogihara, N.L., Nersissian, A.M., Weiss, M.S., Valentine, J.S., Eisenberg, D., 1999. A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry*. 38, 2167-2178.
- Healy, J., Tipton, K., 2007. Ceruloplasmin and what it might do. *Journal of neural transmission*. 114, 777-781.
- Herrmann, J.M., Neupert, W., 2000. Protein transport into mitochondria. *Current Opinion in Microbiology*. 3, 210-214.
- Heyliger, C., Tahiliani, A., McNeill, J., 1985. Effect of vanadate on elevated blood glucose and depressed cardiac performance of diabetic rats. *Science* 227, 1474-1477.
- Hopkins Jr., L.L., Mohr, H.E., 1974. Proceedings: Vanadium as an essential nutrient. *Federation Proceedings*. 33, 1773-1775.
- Huang, J., Tan, L., Shen, R., Zhang, L., Zuo, H., Wang, D.W., 2016. Decreased Peripheral Mitochondrial DNA Copy Number is Associated with the Risk of Heart Failure and Long-term Outcomes. *Medicine*. 95, 3323.
- ICPS, 1988. International programme on chemical safety. Vanadium. *Environmental Health Criteria*. World Health Organisation.

- Iglesias-González, T., Sánchez-González, C., Montes-Bayón, M., Llopis-González, J., Sanz-Medel, A., 2012. Absorption, transport and insulin-mimetic properties of bis(maltolato)oxovanadium (IV) in streptozotocin-induced hyperglycemic rats by integrated mass spectrometric techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402, 277-285.
- Institute of medicine, 2001. Dietary reference intakes. National Academic of Sciences. 532-543.
- Ikeda, M., Ide, T., Fujino, T., Hata, Y., Takehara, T., Onitsuda, K., Tobushi, T., Sakamoto, K., Saku, K., Kakino, T., Tyynismaa, H., Suomalainen, A., Sunugawa, K., 2013. The increase of mitochondrial DNA copy number attenuates eccentric cardiac remodeling in volume overload model. *The FASEB Journal*. 27, 1129-11.
- Jackson, S.J., Hussey, R., Jansen, M.A., Merrifield, G.D., Marshall, I., Maclulich, A., Yau, J.L.W., Bast, T., 2010. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI) of rat brain after systemic administration of MnCl₂: Hippocampal signal enhancement without disruption of hippocampus-dependent behavior. *Behavioural Brain Research*. 216, 293-300.
- James, W.P.T., 1980. Dietary Fiber and Mineral Absorption. En: Spiller, G.A., *Medical Aspects of Dietary Fiber*, Ed. Springer US, Boston, pp. 239-259.
- Jéquier, E., 2006. Leptin Signaling, Adiposity, and Energy Balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 967, 379-388.
- Jiang, J., Shi, S., Zhou, Q., Ma, X., Nie, X., Yang, L., Han, J., Xu, G., Wan, C., 2014. Downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is involved in manganese-induced neurotoxicity in rat striatum and PC12 cells. *Journal of neuroscience research*. 92, 783-794.
- Johnston, K.L., Johnson, D.M., Marks, J., Srail, S.K., Debnam, E.S., Sharp, P.A., 2006. Non-haem iron transport in the rat proximal colon. *European journal of clinical investigation*. 36, 35-40.
- Kaczmarek, R., Zaczyńska, E., Misiuk-Hojło, M., 2010. Antiproliferative properties of mycophenolic acid on human retinal pigment epithelial cells *in vitro*. *Klinika oczna*. 112, 201-4.
- Kawabe, K., Yoshikawa, Y., Adachi, Y., Sakurai, H., 2006. Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes. *Life sciences*. 78, 2860-2866.
- Kemmerer, A.R., Elvehjem, C.A., Hart, E.B., 1931. Studies on the relation of manganese to the nutrition of the mouse. *Journal of biological chemistry*. 92, 623-630.
- Kim, Y., Park, S., 2014. Iron deficiency increases blood concentrations of neurotoxic metals in children. *Korean journal of pediatrics*. 57, 345-50.
- Kimura, M., Ujihara, M., Yokoi, K., 1996. Tissue manganese levels and liver pyruvate carboxylase activity in magnesium-deficient rats. *Biological trace element research*. 52, 171-179.

- Kiss, T., Kiss, E., Garribba, E., Sakurai, H., 2000. Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *Journal of inorganic biochemistry*. 80, 65-73.
- Klevay, L.M., 2000. Symposium : trace element nutrition and human health cardiovascular disease from copper deficiency — A history. *The journal of nutrition*. 130, 489-492.
- Klinman, J.P., 2006. The copper-enzyme family of dopamine beta-monooxygenase and peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase: resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation. *The journal of biological chemistry*. 281, 3013-3016.
- Koca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gód, S., Koza, Z., Wojcik, A., 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research*. 534, 15-20.
- Krishnan, K.J., Bender, A., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2007. A multiplex real-time PCR method to detect and quantify mitochondrial DNA deletions in individual cells. *Analytical Biochemistry*. 370, 127-129.
- Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., 2008. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?. *Nature Genetics*. 40, 275-279.
- Krungchanuchat, S., Thongtem, T., Thongtem, S., Pilapong, C., 2017. Characterization and cellular studies of molecular nanoparticle of iron (III)-tannic complexes; toward a low cost magnetic resonance imaging agent. *Biointerphases*. 12, 21005-21008.
- Kumar, N., Gross, J.B., Ahlskog, J.E., 2004. Copper deficiency myelopathy produces a clinical picture like subacute combined degeneration. *Neurology*. 63, 33-9.
- Kurt, O., Ozden, T.Y., Ozsoy, N., Tunali, S., Can, A., Akev, N., Yanardag, R., 2011. Influence of vanadium supplementation on oxidative stress factors in the muscle of STZ-diabetic rats. *BioMetals*. 24, 943-949.
- Laparra, J.M., Glahn, R.P., Miller, D.D., 2009. Different responses of Fe transporters in Caco-2/HT29-MTX cocultures than in independent Caco-2 cell cultures. *Cell Biology International*. 33, 971-977.
- León, I.E., Cadavid-Vargas, J.F., Tiscornia, I., Porro, V., Castelli, S., Katkar, P., Desideri, A., Bollati-Fogolin, M., Etcheverry, S.B., 2015. Oxidovanadium(IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. *Journal of biological inorganic chemistry*. 20, 1175-1191.
- Li, X.T., Yu, P.F., Gao, Y., Guo, W.H., Wang, J., Liu, X., Gu, A.H., Ji, G.X., Dong, Q., Wang, B.S., Cao, Y., Zhu, B.L., Xiao, H., 2017. Original Article Association between plasma metal levels and diabetes risk: a case-control study in China. *Biomedical and environmental sciences*. 30, 482-491.

- Long, B., Gan, T.-Y., Zhang, R.-C., Zhang, Y.-H., 2017. miR-23a regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting manganese superoxide dismutase. *Molecules and Cells*. 40, 542-549.
- Lozano, E. E., 2014. Algunas consideraciones sobre la diabetes mellitus. *Correo Científico Médico de Holguín*. 18, 122-125.
- Lucero, H.A., Kagan, H.M., 2006. Lysyl oxidase: An oxidative enzyme and effector of cell function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63, 2304-2316.
- Lyonnet, B.M., Martz, F., Martin, E.E.M.M., 1899. L'emploi therapeutiques des derives du vanadium. *La Presse Med*. 7, 191-192.
- Maas, E. V, Moore, D.P., Mason, B.J., 1969. Influence of calcium and magnesium on manganese absorption. *Plant physiology*. 44, 796-800.
- Mackenzie, B., Takanaga, H., Hubert, N., Rolfs, A., Hediger, M.A., 2007. Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochemical Journal* 403, 59-69.
- Marklund, S.L., 1984. Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. *The biochemical journal*. 222, 649-655.
- Marreilha dos Santos, A.P., Santos, D., Au, C., Milatovic, D., Aschner, M., Batoréu, M.C.C., 2008. Antioxidants prevent the cytotoxicity of manganese in RBE4 cells. *Brain Research*. 1236, 200-205.
- Mataix J, Llopis, J., 2015. Minerales. En: Mataix, J, *Nutrición y alimentación humana*, Ed: Ergón, Madrid, pp 265-302.
- Mazo, V.K., Shirina, L.I., 2005. Copper in nutrition man: absorption and bioavailability. *Voprosy pitaniia*. 74, 52-9.
- McNeill, J.H., Yuen, V.G., Hoveyda, H.R., Orvig, C., 1992. Bis (maltolato) oxovanadium (IV) is a potent insulin mimic. *Journal of medicinal chemistry*. 35, 1489.
- Mejía-Toiber, J., Montiel, T., Massieu, L., 2006. d-β-Hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition *in vivo*. *Neurochemical research*. 31, 1399-1408.
- Mena, I., Marin, O., Fuenzalida, S., Cotzias, G.C., 1967. Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover. *Neurology*. 17, 128-136.
- Meyerovitch, J., Waner, T., Sack, J., Kopolovic, J., Shemer, J., 2000. Attempt to prevent the development of diabetes in non-obese diabetic mice by oral vanadate administration. *The israel medical association journal*. 2, 211-4.
- Michibata, H., 2012. Vanadium. *Biochemical and Molecular Biological Approaches: Part IV Medicinal Functions of Vanadium*. Ed. Springer, Londres, Nueva York, pp. 145-224.
- Mitchell, C.J., Shawki, A., Ganz, T., Nemeth, E., Mackenzie, B., 2014. Functional properties of human ferroportin, a cellular iron exporter reactive also with cobalt and zinc. *American journal of physiology. Cell physiology*. 306, 450-459.

- Mochizuki, M., Ueda, F., Sasaki, S., Hondo, R., 1999. Vanadium contamination and the relation between vanadium and other elements in wild birds. *Environmental pollution*. 106, 249-51.
- Mohamed, N.E.-S., 2017. Protective effect of origanum oil on alterations of some Trace elements and antioxidant levels induced by mercuric chloride in male rats. *Biological trace element research*. 10, 1-8.
- Montuschi, P., Barnes, P.J., Roberts, L.J., 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB journal:official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* . 18, 1791-1800.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65, 55-63.
- Muzzarelli, R.A.A., Rocchetti, R., 1975. Atomic-absorption determination of manganese, cobalt and copper in whole blood and serum, with a graphite atomizer. *Talanta*. 22, 683-685.
- Nagaoka, M.H., Akiyama, H., Maitani, T., 2004. Binding patterns of vanadium to transferrin in healthy human serum studied with HPLC/high resolution ICP-MS. *The analyst*. 129, 51-54.
- Nielsen, F., 1999, Ultratrace minerals. En: Ross, C, *Modern nutrition in health and disease*, (Ed.) Lippincott Williams & Wilkins, Pennsylvania USA, pp. 297-299.
- Nischwitz, V., Davies, J.T., Marshall, D., González, M., Gómez Ariza, J.L., Goenaga-Infante, H., 2013. Speciation studies of vanadium in human liver (HepG2) cells after in vitro exposure to bis(maltolato)oxovanadium(iv) using HPLC online with elemental and molecular mass spectrometry. *Metallomics*. 5, 1685.
- Okajima, T., Nakamura, K., Zhang, H., Ling, N., Tanabe, T., Yasuda, T., Rosenfeld, R.G., 1992. Sensitive colorimetric bioassays for insulin-like growth factor (IGF) stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. *Endocrinology*. 130, 2201-2212.
- Olivares, C., Solano, F., 2009. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment cell & melanoma research*. 22, 750-760.
- Olivé, P.L., Banáth, J.P., 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*. 1, 23-29.
- Oster, M.H., Llobet, J.M., Domingo, J.L., German, J.B., Keen, C.L., 1993. Vanadium treatment of diabetic sprague-dawley rats results in tissue vanadium accumulation and pro-oxidant effects. *Toxicology*. 83, 115-30.
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 123, 291-298.
- Pickart, L., Vasquez-Soltero, J.M., Margolina, A., 2012. The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 0, 1-8

- Pierce, L.M., Alessandrini, F., Godleski, J.J., Paulauskis, J.D., 1996. Vanadium-Induced Chemokine mRNA Expression and Pulmonary Inflammation. *Toxicology and applied pharmacology*. 138, 1-11.
- Rasmussen, R.K., Klein, H.P., 1968. Effects of Metals on Acetyl-Coenzyme A Carboxylase Activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*. 95260, 727-728.
- Reardon, W., Ross, R.J., Sweeney, M.G., Luxon, L.M., Pembrey, M.E., Harding, A.E., Trembath, R.C., 1992. Diabetes mellitus associated with a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *Lancet*. 340, 1376-1379.
- Renko, K., Martitz, J., Hybsier, S., Heynisch, B., Voss, L., Everley, R.A., Gygi, S.P., Stoedter, M., Wisniewska, M., Köhrle, J., Gladyshev, V.N., Schomburg, L., 2017. Aminoglycoside-driven biosynthesis of selenium-deficient Selenoprotein P. *Scientific Reports*. 7, 4391.
- Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*. 49, 1603-1616.
- Rivera-Mancía, S., Ríos, C., Montes, S., 2011. Manganese accumulation in the CNS and associated pathologies. *BioMetals*. 24, 811-825.
- Rucker, R.B., Cui, C.T., Tchapanian, E.H., Mitchell, A.E., Clegg, M., Uriu-Hare, J.Y., Keen, C.L., 2002. Dietary Vanadium, P-ATPase-7A Expression and the Influence on Lysyl Oxidase and Cu Accumulation in Rat Skin and Liver. En: Roussel, A., Trace Elements in Man and Animals, Ed. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 186-187.
- Sakurai, H., Watanabe, H., Tamura, H., Yasui, H., Matsushita, R., Takada, J., 1998. Insulin-mimetic vanadyl-dithiocarbamate complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 283, 175-183.
- Sánchez-Gonzalez, C., Bermudez-Peña, C., Trenzado, C., Goenaga-Infante, H., Montes-Bayon, M., Sanz-Medel, A., Llopis, J., 2012a. Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics*. 4, 814-819.
- Sánchez-Gonzalez, C., Bermudez-Peña, C., Guerrero-Romero, F., Trenzado, C.E., Montes-Bayon, M., Sanz-Medel, A., Llopis, J., 2012b. Effect of bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *British Journal of Nutrition*. 108, 893-899.
- 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., 2014a. Exposure to bis(maltolato)oxovanadium(IV) increases levels of hepcidin mRNA and impairs the homeostasis of iron but not that of manganese. *Food and Chemical Toxicology*. 73, 113-118.
- Sánchez-González, C., López-Chaves, C., Trenzado, C.E., Aranda, P., López-Jurado, M., Gómez-Aracena, J., Montes-Bayón, M., Sanz-Medel, A., Llopis, J., 2014b. Changes in Iron Metabolism and Oxidative Status in STZ-Induced Diabetic Rats Treated with Bis(maltolato) Oxovanadium (IV) as an Antidiabetic Agent. *The Scientific World Journal*, 1-6.

- Sánchez, C., Torres, M., Bermúdez-Peña, M.C., Aranda, P., Montes-Bayón, M., Sanz-Medel, A., Llopis, J., 2011. Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient rats. *Magnesium Research* 24, 196-208.
- Schaefer, A.M., McFarland, R., Blakely, E.L., He, L., Whittaker, R.G., Taylor, R.W., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M., 2008. Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Annals of Neurology*. 63, 35-39.
- Schroeder, H.A., Balassa, J.J., Tipton, I.H., 1963. Abnormal trace metals in man. Vanadium. *Journal of Chronic Diseases*. 16, 1047-1071.
- Ścibior, A., Adamczyk, A., Mroczka, R., Niedźwiecka, I., Gołębiowska, D., Fornal, E., 2014. Effects of vanadium (V) and magnesium (Mg) on rat bone tissue: mineral status and micromorphology. Consequences of V–Mg interactions. *Metallomics*. 6, 2260-2278.
- Ścibior, A., Llopis, J., Holder, A.A., Altamirano-Lozano, M., 2016. Vanadium toxicological potential versus its pharmacological activity: New developments and research. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 1-2.
- Ścibior, A., Zaporowska, H., Niedźwiecka, I., 2010. Lipid peroxidation in the kidney of rats treated with V and/or Mg in drinking water. *Journal of Applied Toxicology*. 30, 487-496.
- Ścibior, A., Zaporowska, H., Niedźwiecka, I., 2009. Lipid peroxidation in the liver of rats treated with V and/or Mg in drinking water. *Journal of Applied Toxicology* 29, 619-628.
- Ścibior, A., Zaporowska, H., Ostrowski, J., 2006. Selected Haematological and Biochemical Parameters of Blood in Rats After Subchronic Administration of Vanadium and/or Magnesium in Drinking Water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 287-295.
- Scorpio, R.M., Masoro, E.J., 1970. Differences between manganese and magnesium ions with regard to fatty acid biosynthesis, acetyl-coenzyme A carboxylase activity and malonyl-coenzyme A decarboxylation. *The Biochemical journal*. 118, 391-9.
- SEGO (Grupo español de diabetes y embarazo), 2013. *DIABETES*. 129-130.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 175, 184-191.
- Sohrabi, M., Gholami, A., Azar, M.H., Yaghoobi, M., Shahi, M.M., Shirmardi, S., Nikkhab, M., Kohi, Z., Salehpour, D., Khoonsari, M.R., Hemmasi, G., Zamani, F., Sohrabi, M., Ajdarkosh, H., 2017. Trace element and heavy metal levels in colorectal cancer: comparison between cancerous and non-cancerous tissues. *Biological trace element research* 1-8.
- Srivastava, A.K., 2000. Anti-diabetic and toxic effects of vanadium compounds. *Molecular and cellular biochemistry*. 206, 177-82.
- Strause, L., Saltman, P., 1987. Role of Manganese in Bone Metabolism. En: Kies, C., *Nutritional bioavailability of manganese*. Ed. American Chemical Society. pp. 46-55.

- Sun, L., Wang, K., Li, Y., Fan, Q., Zheng, W., Li, H., 2017. Vanadium exposure-induced striatal learning and memory alterations in rats. *NeuroToxicology*. 62, 124-129.
- Takeuchi, K., Bjarnason, I., Laftah, A.H., Latunde-Dada, G.O., Simpson, R.J., McKie, A.T., 2005. Expression of iron absorption genes in mouse large intestine. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 40, 169-177.
- Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature reviews. Genetics*. 6, 389-402.
- Thompson, K., Molina, R.M., Donaghey, T., Schwob, J.E., Brain, J.D., Wessling-Resnick, M., 2007. Olfactory uptake of manganese requires DMT1 and is enhanced by anemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 21, 223-30.
- Thompson, K.H., Barta, C.A., Orvig, C., 2006. Metal complexes of maltol and close analogues in medicinal inorganic chemistry. *Chemical Society Reviews*. 35, 545-556.
- Thompson, K.H., Orvig, C., 2006. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton transactions*. 0, 761-764.
- Thompson, K.H., Orvig, C., 2006. Vanadium in diabetes: 100 years from phase 0 to phase I. *Journal of inorganic biochemistry*. 100, 1925-1935.
- Trebst, C., Jarius, S., Wildemann, Á.B., Berthele, A., Paul, F., Borisow, Á.N., Schippling, S., Aktas, O., Kümpfel, T., 2014. Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: Recommendations of the neuromyelitis optica study group (NEMOS). *Journal of neurology*. 261, 1-16.
- Turnlund, J.R., Scott, K.C., Peiffer, G.L., Jang, A.M., Keyes, W.R., Keen, C.L., Sakanashi, T.M., 1997. Copper status of young men consuming a low-copper diet. *The American journal of clinical nutrition*. 65, 72-8.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39, 44-84.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T.D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*. 12, 1161-208.
- Van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Cross, C.E., Koostra, J.M., Volz, W.G., Halliwell, B., Louie, S., 1999. Determination of low-molecular-mass antioxidant concentrations in human respiratory tract lining fluids. *The American journal of physiology*. 276, 289-296.
- Venkataraman B.V., Sudha S, 2005. Vanadium toxicity. *Asian journal of experimental sciences*. 19, 127-134.
- Vulpe, C., Levinson, B., Whitney, S., Packman, S., Gitschier, J., 1993. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature genetics*. 3, 7-13.
- Wachnik, A., 1988. The physiological role of copper and the problems copper nutritional deficiency. *Die Nahrung*. 32, 755-765.

- Walshe, J.M., 1963. Copper metabolism and the liver. *Postgraduate medical journal*. 39, 188-92.
- Wang, Y., Bogenhagen, D.F., 2006. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *The journal of biological chemistry*. 281, 25791-25802.
- Wapnir, R.A., 1998. Copper absorption and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 67, 1054-1060.
- Weisiger, R.A., Fridovich, I., 1973. Superoxide dismutase. Organelle specificity. *The Journal of biological chemistry*. 248, 3582-92.
- Willis, M.S., Monaghan, S.A., Miller, M.L., McKenna, R.W., Perkins, W.D., Levinson, B.S., Bhushan, V., Kroft, S.H., 2005. Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. *American journal of clinical pathology*. 123, 125-31.
- Wilsey, J., Matheny, M.K., Scarpace, P.J., 2006. Oral vanadium enhances the catabolic effects of central leptin in young adult rats. *Endocrinology*. 147, 493-501.
- Yamada, S., Nomoto, S., Fuji, T., Kaneko, T., Takeda, S., Inoue, S., Kanazumi, N., Nakao, A., 2006. Correlation between copy number of mitochondrial DNA and clinico-pathologic parameters of hepatocellular carcinoma. *European journal of surgical oncology*. 32, 303-307.
- Yanardag, R., Tunali, S., 2006. Vanadyl sulfate administration protects the streptozotocin-induced oxidative damage to brain tissue in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 286, 153-159.
- Yu, M., 2011. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life sciences*. 89, 65-71.
- Zaparowska H., Ścibior, A., 1998. Vanadium and its significance in animal cell metabolism. En: Nriagu, J.O., *Vanadium in the Environment, Part 2: Health Effects*, Ed. John Wiley & Sons Inc, pp. 135–157.
- Zara, G., Grassivaro, F., Brocadello, F., Manara, R., Pesenti, F.F., 2008. Case of sensory ataxic ganglionopathy–myelopathy in copper deficiency. *Journal of the Neurological Sciences*. 277, 184-186.
- Zeng, H., Botnen, J.H., 2004. Copper may interact with selenite extracellularly in cultured HT-29 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 15, 179-184.
- Zhang, S.-Q., Zhong, X.-Y., Chen, G.-H., Lu, W.-L., Zhang, Q., 2008. The anti-diabetic effects and pharmacokinetic profiles of bis(maltolato)oxovanadium in non-diabetic and diabetic rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 60, 99-105.
- Zheng, G., Chen, J., Zheng, W., 2012. Relative contribution of CTR1 and DMT1 in copper transport by the blood–CSF barrier: Implication in manganese-induced neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 260, 285-293.
- Zhou, B., Gitschier, J., 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 7481-6.

Zhou, W., Zhu, M., Gui, M., Huang, L., Long, Z., Wang, L., Chen, H., Yin, Y., Jiang, X., Dai, Y., Tang, Y., He, L., Zhong, K., 2014. Peripheral Blood Mitochondrial DNA Copy Number Is Associated with Prostate Cancer Risk and Tumor Burden. *Plos one.* 9, 109470.