

**ESTUDIO EN RATAS DIABÉTICAS-STZ E *IN VITRO*  
DE INTERACCIONES DEL VANADIO CON EL CALCIO  
Y EL CINC**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN Y CIENCIAS DE LOS  
ALIMENTOS**

**LAURA MORENO TERRÓN**

**2020**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Laura Moreno Terrón  
ISBN: 978-84-1306-700-1  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/64584>

El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral, titulada “Estudio en ratas diabéticas-STZ e *in vitro* de interacciones del vanadio con el calcio y el zinc”, se ha cofinanciado gracias a las ayudas recibidas por el proyecto de excelencia de la Junta de Andalucía P06-CTS-01435, realizado en el Dpto. de Fisiología y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Granada

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta aventura empezó hace años, cuando volví a Granada llena de ilusión y con el convencimiento de que la investigación y la ciencia, tenían que formar parte de mi vida. Empezar a caminar no fue fácil, pero a veces la vida te hace un guiño y fue entonces cuando una luz se encendió gracias a Juan Llopis, mi director, quien ha sido una puerta abierta, una mano siempre cercana y sabia que guiaba este camino. Sin él, esto simplemente, no habría sido. A él, sin duda, mi primer agradecimiento.

También a mi directora, Cristina Sánchez, por su energía siempre llena, su alegría para hacer fácil lo difícil, sus ganas y su ejemplo.

A Lorenzo, quien es la definición de compañero, desinteresado y generoso, dispuesto a prestarme su experiencia y su conocimiento cuando el bloqueo acechaba. Por ser mi hermano mayor en esta aventura

Y a Chari, gracias por aquellas tardes en el laboratorio, por su paciencia y cariño para guiarme en mis primeros pasos.

A Carlos y al resto de compañeros que han hecho que este camino sea un bonito recorrido.

A mis pilares fundamentales:

Mis padres, Isabel y Miguel, quienes me han inculcado el gusto por aprender, las ganas de crecer, de avanzar. Ellos que, junto con mi hermana Isa, son mi centro, mi principio, el lugar desde donde soy. Por creer siempre, inquebrantablemente, en mí.

A Edu, por caminar a mi lado. Senderos fáciles o difíciles. Allá donde vayamos, pero siempre juntos.

A la familia que me habéis aportado, mis soles Hugo y Darío, y todos los demás, porque son la red en la que existo.

A mis amigos y amigas, porque sus colores en mi vida hacen mejor cualquier experiencia, pero en especial a Cruz y a José Antonio que, desde el primer segundo, entendieron lo que esto significaba para mí y compartieron

conmigo su importancia y su valor, y supieron, mucho mejor que yo, que lo haría.

A la vida que viene, y que trae consigo motivos, sonrisas y fuerzas nuevas, para que este último trecho sea, de nuevo, un principio.

A todos, otra vez y siempre, gracias.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
RESUMEN.....	8
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	16
2.1. Diabetes.....	16
2.2. Vanadio.....	30
2.3. Calcio.....	48
2.4. Cinc.....	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	87
3.1. Estudios “in vivo”.....	87
3.1.1. Diseño experimental.....	87
3.1.2. Animales y dietas.....	88
3.1.3. Técnicas analíticas.....	89
3.2. Estudios “in vitro”.....	93
3.2.1. Cultivos y condiciones.....	93
3.3. Tratamiento estadístico.....	95
4. RESULTADOS	98
4.1. Estudios “in vivo”.....	98
4.1.1. Resultados relativos a los indicadores de la evolución de los animales a lo largo del periodo experimental.....	98
4.1.2. Resultados relativos al estudio de los cambios en la homeostasis del calcio y cinc por el tratamiento con vanadio.....	103
4.2. Estudios “in vitro”.....	112
5. DISCUSIÓN.....	114
5.1. Estudios “in vivo”.....	116
5.1.1. Efecto del tratamiento con BMOV(IV) a ratas diabéticas sobre el peso corporal, ingesta de alimento y agua y niveles circulantes de leptina, glucosa e insulina.....	119
5.1.2. Sobre el calcio.....	122
5.1.3. Sobre el cinc.....	131
5.2. Estudios “in vitro”.....	138
6. CONCLUSIONES.....	144
7. BIBLIOGRAFÍA.....	147

## RESUMEN

El vanadio es un elemento traza ampliamente distribuido en la naturaleza y esencial para algunas formas de vida pero su papel como micronutriente, su esencialidad así como su actividad biológica y farmacológica no se encuentran completamente establecidas. Este elemento participa en la regulación, transporte y metabolismo de la glucosa, así como con el aumento de la sensibilidad al receptor de la insulina. Debido a los niveles de vanadio en el medio ambiente, por su amplio uso industrial, a su frecuente empleo como suplemento por diferentes tipos de atletas (fundamentalmente culturistas) y al creciente interés por sus efectos farmacológicos, el estudio del metabolismo del vanadio es actualmente una importante área de investigación. Aunque se han realizado ensayos clínicos para algunos compuestos de vanadio, se recomienda que el uso de los compuestos de vanadio debe estar controlado hasta que se disponga de más información sobre los efectos tóxicos observados de los tratamientos crónicos.

Como se ha mencionado muchos aspectos del metabolismo del vanadio no se encuentran bien establecidos, entre las que se encuentran las interacciones digestivas y metabólicas con otros elementos involucrados en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Según algunos autores, al favorecer la metabolización de la glucosa, el vanadio reduciría la producción de ROS y en consecuencia prevendría el daño oxidativo ocasionado por la hiperglicemia. Por otro lado, dado que el vanadio altera el metabolismo de diversos elementos traza tales como el Mg, Fe, Cu, Zn and Se, varios autores han asociado la acción del vanadio con efectos pro-oxidantes. La presencia de estrés oxidativo se encuentra asociada con cambios en la producción de citokinas proinflamatorias y la presencia de tumores pulmonares. En este contexto, otros autores han sugerido que el vanadio puede actuar como inhibidor en diferentes formas de cáncer.

Aunque existe cierto grado de información sobre interacciones entre el vanadio, calcio y cinc; la información sobre posibles alteraciones en el metabolismo del Ca y del Zn en ratas diabéticas tratadas con vanadio es muy

escasa. Ambos elementos están muy relacionados con el estado antioxidante y en el caso del Zn también con el metabolismo de la glucosa de modo similar al vanadio.

De acuerdo con los comentarios anteriores, en el presente estudio nos planteamos conocer si el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas altera la homeostasis del calcio y la del cinc.

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

El desarrollo del trabajo se ha realizado siguiendo el siguiente diseño experimental:

Se estudiaron los cambios en la homeostasis del calcio y cinc ocasionados por el tratamiento con BMOV a ratas a las que se les ha inducido diabetes tipo 1 mediante tratamiento con estreptozotocina (STZ). Para este estudio se utilizaron 4 grupos de 10 ratas. Un grupo control, un grupo de ratas diabéticas, un grupo de ratas diabéticas tratadas con 6.22 mg de BMOV / día (suministraba 1 mg V / día) y un grupo de ratas diabéticas tratadas con 18.66 mg de BMOV / día (suministraba 3mg V/día) durante 35 días. La dosis empleadas en el presente estudio (1mg V / día  $\approx$  5 mg V/ kg de peso/d y 3 mg V/ d  $\approx$  15 mg V / kg de peso / d) son superiores a la dosis menor descrita que causa efectos adversos en la rata (0.8 mg V / kg de peso / d) no obstante, estas dosis son bajas en comparación con las dosis utilizadas habitualmente en otros estudios y mucho menores que la LD50 (dosis letal 50 (40-90 mgV/kg peso/d).

En nuestro estudio se observó la presencia de desórdenes gastrointestinales en algunos animales de los grupos tratados con vanadio. Dichos animales fueron retirados del estudio. Estos desordenes gastrointestinales también han sido observados en otros estudios desarrollados en ratas sanas y diabéticas.

El estudio ha dado lugar a la siguiente publicación:

Sanchez-Gonzalez C, Moreno L, Lopez-Chaves C, Nebot E, Pietschmann P, Rodriguez-Nogales A, Galvez J, Montes-Bayon M, Sanz-Medeld A Llopis J. Effect of vanadium on calcium homeostasis, osteopontin mRNA expression, and bone microarchitecture in diabetic rats. *Metallomics*, 2017, 9, 258

Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con 6.22 mg BMOV / día (1mg V / día) a ratas diabéticas-STZ no tuvo ningún efecto antidiabético y solo se observaron efectos menores sobre la homeostasis del calcio y la microarquitectura del hueso, por lo que podemos decir que esta dosis no corrigió las alteraciones en el metabolismo del calcio y hueso ocasionadas por la diabetes. Este fenómeno se repitió para el cinc. Sin embargo, el tratamiento con 18.66 mg BMOV / día (3mg V / día) indujo un claro efecto antidiabético, normalizando la ingesta de alimentos y la glucemia en ayunas. A la vez que restableció los cambios en la absorción, retención y contenido tisular del calcio producidos por la diabetes. Además, los estudios de microarquitectura ósea permitieron concluir que la diabetes inducida por estreptozotocina, produjo un empeoramiento del proceso de mineralización del hueso que fue mejorado y restaurado tras el tratamiento con 18,66 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día, proceso que se encontró favorecido por el efecto inhibitor del vanadio sobre la expresión de la osteopontina.

En el caso del cinc se encontraron resultados semejantes. El tratamiento a ratas diabéticas con 6,22 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día no corrigió las alteraciones en el metabolismo ocasionadas por la enfermedad. Mientras que el tratamiento con 18,66 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día normalizó las alteraciones en la absorción y retención del catión presentes en las ratas diabéticas no tratadas y permitió restablecer los contenidos tisulares de cinc alterados por la diabetes.



## 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

## 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La diabetes Mellitus (DM) es un problema mundial de salud ya que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), actualmente se calcula que más de un 8,5% de la población adulta padece diabetes habiéndose registrado un aumento más pronunciado en los países con ingresos medios o bajos. La DM comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas principalmente por hiperglucemia, ocasionada por una secreción prácticamente nula de insulina, inadecuada o defectos en la absorción de esta hormona o ambos. En este sentido, un estado de hiperglucemia crónico se ha asociado con daño, disfunción y fallo de diferentes órganos. La deficiente acción de la insulina va acompañada de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. Además de afectar a los mencionados procesos metabólicos, también está asociada con alteraciones de la defensa oxidativa y el metabolismo de los elementos traza.

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

En los últimos años el vanadio ha adquirido gran importancia farmacológica debido a la actividad que ciertos complejos de dicho elemento ejerce como hipoglucemiantes. Compuestos de vanadio orgánicos, tales como el bis(maltolato)oxovanadio (IV), bis(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 insulunomimética del vanadio disminuyendo la

resistencia e incrementando la sensibilidad a la insulina y mejorando el transporte y metabolismo 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 producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Muchos autores han asociado el V con efectos pro-oxidantes porque altera el metabolismo de diversos elementos traza como el Mg, Fe, Cu y Se, por lo que consideramos interesante la realización de este estudio en el que se abordan las interacciones con calcio y cinc.

Calcio y cinc son dos metales esenciales cuyo papel en el correcto funcionamiento del organismo ha sido ampliamente descrito. Así, el calcio es un compuesto clave en la configuración estructural del hueso y dientes y uno de los más conocidos mensajeros intracelulares, ya que controla un amplio rango de procesos celulares interactuando con las proteínas y haciendo posible la activación de funciones específicas de dichas proteínas. La esencialidad del Zn viene determinada por su papel insustituible relacionado principalmente con sistemas enzimáticos de los procesos de división y multiplicación celular y con sistemas de regulación metabólico-hormonales. Se conoce que este elemento es un cofactor de miles de enzimas, implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, en los procesos de degradación y síntesis de ácidos nucleicos. Además, el cinc participa en la supresión de radicales libres, ya que junto con el cobre forma parte de enzima superóxido dismutasa (SOD).

Es conocida la existencia de alteraciones en la homeostasis del calcio y cinc como consecuencia de la diabetes. En el caso del calcio conducen a cambios en el metabolismo del hueso, tanto en humanos como en modelos animales. La osteoporosis es una de las complicaciones crónicas de la diabetes al reducirse el recambio óseo, la mineralización y la glicosilación del colágeno óseo. El cinc juega un papel clave en la síntesis y acción de la insulina, tanto fisiológica como en la diabetes mellitus. La relación entre cinc y diabetes se conoce desde hace tiempo, pero no se le ha prestado atención hasta las últimas décadas. Se sabe que en los sujetos diabéticos existe una

cincuria junto a un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y una disminución de las defensas antioxidantes

El efecto del vanadio sobre el metabolismo de estos dos metales no ha sido descrito en profundidad, y en el caso de la diabetes las publicaciones existentes son muy escasas. Actualmente, la información sobre los cambios en la homeostasis del calcio y el cinc en ratas diabéticas como consecuencia del tratamiento con vanadio es casi inexistente, tres elementos muy relacionados con el metabolismo óseo, metabolismo de la glucosa y presencia de estrés oxidativo. Por estas razones consideramos importante realizar el presente estudio sobre la interacción entre el vanadio y el calcio en ratas diabéticas.

Otro punto relevante en estos estudios, es la forma de administración del vanadio, reflejando la literatura existente que la naturaleza química de las especies de vanadio son determinantes a la hora de establecerse esa interacción entre vanadio y otros elementos, lo que actualmente se encuentra en el camino de una mayor clarificación y un mejor conocimiento con objeto de una utilización cada vez más eficiente.

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

De acuerdo con los anteriores comentarios el objetivo del presente trabajo es estudiar sí el efecto del tratamiento con vanadio a ratas diabéticas altera la biodisponibilidad y distribución tisular del calcio y cinc, así como su influencia sobre la microestructura del hueso. Los resultados obtenidos permitirán comprender mejor el papel del vanadio como micronutriente, su actividad biológica como agente antidiabético y sus efectos tóxicos.



## Z. INTRODUCCIÓN

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1. DIABETES**

La diabetes es un problema mundial de salud ya que, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los casos de diabetes han aumentado de 180 millones de pacientes en 1980 a 422 millones de personas que la padecen en 2014, es decir, un 8,5% de la población adulta padece diabetes habiéndose registrado un aumento más pronunciado en los países con ingresos medios o bajos.

La Diabetes Mellitus (DM) comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas principalmente por hiperglucemia, ocasionada por una secreción prácticamente nula de insulina, inadecuada o defectos en la absorción de esta hormona o ambos. En este sentido, un estado de hiperglucemia crónico se ha asociado con daño, disfunción y fallo de diferentes órganos, principalmente ojos, riñones, nervios, corazón y sangre venosa. Además, la deficiente acción de la insulina sobre los órganos diana, producirá alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas (American Association of Diabetes, 2011; Conget, 2005),

#### **2.1.1. Clasificación**

*La DM tipo 1 (DM1)*, representa del 5-10% de los casos de DM, la cual es debida a una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas, ocasionando una deficiencia absoluta de la secreción de insulina.

Diabetes Idiopática, en algunas formas de DM 1, una minoría, no se conoce su etiología, algunos pacientes permanecen en una insulinopenia permanente y son propensos a cetoacidosis, pero no hay evidencia de autoinmunidad (American Association of Diabetes, 2011).

*La DM tipo 2 (DM2)*, representa del 90-95 % de los casos de DM, causada por una combinación de resistencia a la acción de la insulina con una deficiencia relativa de insulina o debida a un defecto de la secreción de la insulina con resistencia a la insulina. Estos pacientes no necesitan tratamiento

con insulina para sobrevivir. Este tipo de pacientes parece tener niveles de insulina normales o elevados. El riesgo de desarrollar este tipo de DM incrementa con la edad, obesidad y sedentarismo, ver figura 3 (Conget 2005; American Association of Diabetes, 2011).

*Otros tipos específicos de diabetes:*

- *Defectos genéticos de las células  $\beta$ .*

Varias formas de diabetes se asocian con defectos genéticos en la función de las células  $\beta$ , este tipo de DM se presenta inicialmente como una hiperglucemia a edades tempranas aproximadamente antes de los 25 años de edad. Las formas más comunes se asocian con mutaciones en el cromosoma 12 en un factor de transcripción hepático. Una segunda forma está asociada con el gen (localizado en el cromosoma 7) que expresa la glucokinasa y ocasiona un defecto en la actividad de esta enzima, incrementando los niveles plasmáticos de glucosa. Otras formas son las anormalidades genéticas que incrementan la dificultad para convertir la proinsulina en insulina. Alteraciones genéticas en la expresión del gen *SLC308A* juegan un importante papel en la patogénesis de la DM 2 (Tamaki et al., 2013).

- *Defectos genéticos en la acción de la insulina.*

Asociados principalmente con mutaciones en el receptor de la insulina mostrándose desde una hiperinsulinemia y una modesta hiperglicemia a una diabetes severa. Algunos individuos con estas mutaciones presentan acantosis nigricans, en las mujeres pudieran presentar síndrome de ovario poliquístico (Welt, 2003).

- *Enfermedades del páncreas exocrino.*

Cualquier proceso que dañe difusamente el páncreas puede causar diabetes. Los procesos adquiridos incluyen pancreatitis, trauma, infección, pancreatectomía y carcinoma pancreático (Genuth et al., 2003; Masharani et al., 2004).

- *Endocrinopatías.*

Muchas hormonas antagonizan la acción de la insulina, por tanto, el exceso de estas puede causar DM. Esto ocurre principalmente en individuos con defectos en la secreción de insulina e hiperglicemia, que se resuelve al tratar el exceso de la hormona involucrada. También ciertos medicamentos

pueden inducir DM en individuos con resistencia a la insulina (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2004).

- *DM gestacional.*

Es cualquier grado inicial de intolerancia a la glucosa durante el embarazo. La mayoría de los casos se resuelve cuando se da a luz (Metzger et al., 2010).

### 2.1.2.-Sintomatología

Los síntomas característicos de la diabetes mellitus incluyen polidipsia, poliuria, polifagia, visión borrosa y pérdida de peso (debido al hipercatabolismo derivado de la hipoinsulinemia). En sus formas más graves se puede desarrollar, cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetónico y conducir a estupor, coma y, en ausencia de un tratamiento efectivo, la muerte.

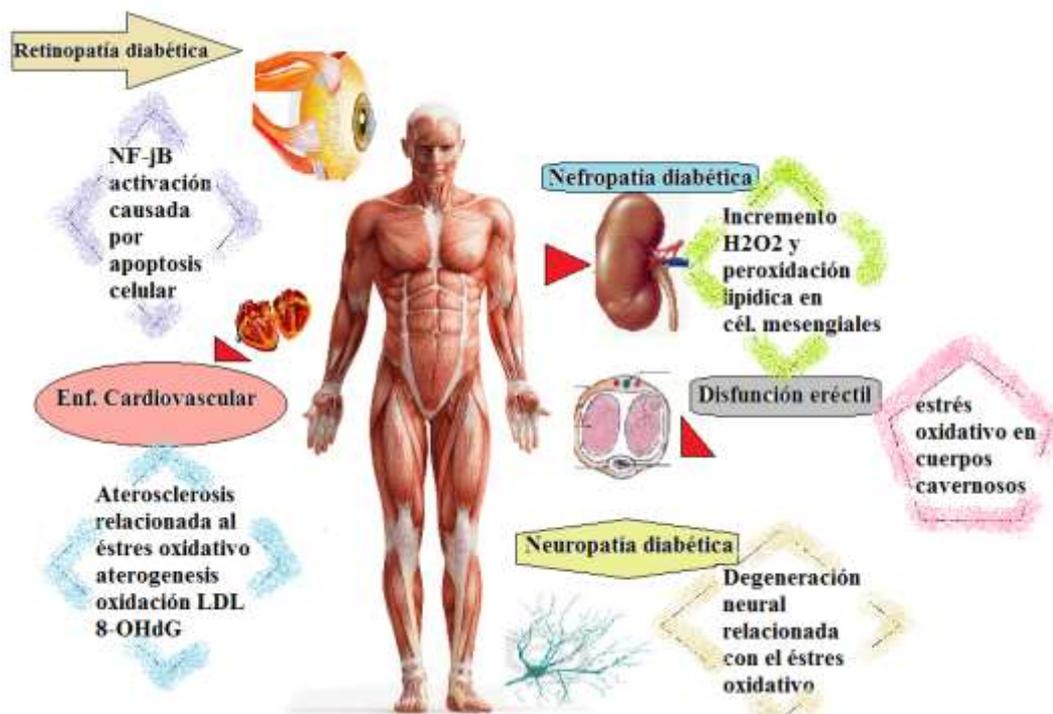


Figura 1.- Complicaciones de la diabetes mellitus

Los efectos a largo plazo de la diabetes mellitus incluyen el desarrollo progresivo de las complicaciones específicas como la retinopatía diabética, nefropatía diabética, neuropatía con riesgo de úlceras en los pies, amputaciones, articulaciones de Charcot, y las características de la disfunción

autonómica, incluyendo la disfunción sexual. Además, hay un incremento del riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular periférica y enfermedad cerebrovascular en pacientes con diabetes mellitus (American Association of Diabetes, 2011).

El grado de hiperglicemia puede ir cambiando con el tiempo dependiendo de la evolución del proceso (Fig. 2). Un proceso patológico puede estar presente pero no haber progresado lo suficiente para causar hiperglicemia. El mismo proceso patológico puede causar una alteración de la glucosa en ayunas y/o empeorar la tolerancia a la glucosa sin cumplir los criterios para ser diagnosticado como diabetes. En algunos individuos diabéticos, se puede conseguir un control de la glucemia mediante reducción de peso, ejercicio físico o hipoglucemiantes orales. Estos individuos no requieren insulina. Otros individuos, aunque presentan una secreción residual de insulina, requieren insulina exógena para un control efectivo de la glucemia, aunque pueden vivir sin ella

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

Figur 2.- Trastornos de la glucemia: tipos etiológicos y etapas. (Tomado de: American Association of Diabetes, 2011).

En las personas en las que se ha producido una destrucción masiva de células  $\beta$  pancreáticas y, por tanto, no disponen de una secreción residual de insulina, requieren insulina para sobrevivir. La severidad de las alteraciones metabólicas pueden progresar, regresar o permanecer. Por tanto, el grado de

hiperglicemia refleja la severidad de las alteraciones en los procesos metabólicos y el tratamiento que deben seguir, más que la naturaleza del proceso en sí mismo (Abou-Seif y Yossef, 2004; American Association of Diabetes, 2011).

### **2.1.3. Criterios diagnósticos**

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

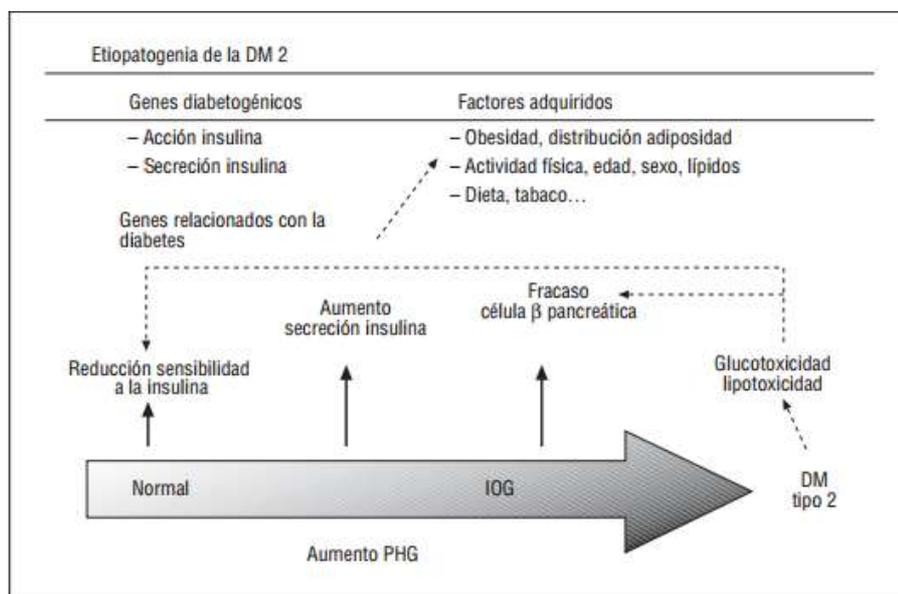
- 1.- Niveles de hemoglobina glicosilada  $\geq 6.5\%$ .
- 2.- Alteración de la glucosa en ayunas con valores  $\geq 126$  mg/dl (7.0 mmol/l).  
Ayuno se define como ninguna ingesta calórica durante por lo menos 8 hrs.
- 3.- Curva de tolerancia oral a la glucosa: a las 2 horas después de la carga oral de glucosa los niveles de glucosa plasmática deben ser  $\geq 200$  mg/dl (11.1 mmol/l). La prueba debe ser realizada según lo descrito por la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.
- 4.- En un paciente con síntomas clásicos de la hiperglucemia o crisis hiperglucémica, una glucosa plasmática al azar  $\geq 200$  mg/dl (11.1 mmol/l).

### **2.1.4. Etiopatogenia**

La diabetes mellitus es una enfermedad que se explica por una combinación de factores genéticos y una serie de factores ambientales (estilos de vida fundamentalmente), que actuarían como desencadenantes. Estos factores explicarían las marcadas diferencias que existen entre las tasas de prevalencia, de las distintas regiones del mundo y los distintos grupos étnicos. Hay aún muchos puntos por resolver en la patogenia de la diabetes, especialmente en la tipo 2. Las hipótesis más aceptadas orientan hacia un origen multifactorial de la DM 2, mientras que en la etiopatogenia de la DM 1 parecen implicarse marcadores genéticos e inmunológicos de base con un probable desencadenante vírico o tóxico. De los múltiples factores que se han investigado, los que presentan una asociación más consistente como factores de riesgo de la DM son:

*Edad:* La DM 2 presenta su pico máximo entre los 40-60 años. La DM 1 presenta su máxima incidencia entre los 10-13 años (Gerich, 2003).

*Factores genéticos:* Parece existir una relación entre la expresión de antígenos específicos del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) y una mayor susceptibilidad a padecer DM1. La DM 2 presenta un componente hereditario superior a la DM 1, aunque no se han encontrado hasta la actualidad marcadores genéticos concluyentes (Masharani et al., 2004; Sánchez Rodríguez, 2010).



*Fig. 3.- Etiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 2. PHG: producción hepática de glucosa; IOG: tolerancia disminuida a la glucosa. (Tomado de: Conget, 2005)*

*Obesidad:* El factor dietético que más incrementa el riesgo de DM2 es el sobrepeso. Desde un punto de vista práctico, la DM2 se asocia también a un conjunto heterogéneo de formas de DM con diversas alteraciones genéticas, metabólicas o clínicas. Es útil diferenciarla en dos grandes grupos: DM2 asociada a la obesidad y DM2 no asociada a la obesidad. El origen de esta pandemia es multifactorial y en su génesis se asocian de forma compleja componentes étnicogenéticos, no siempre compartidos por la obesidad y la DM2, y factores ligados al estilo de vida individual y colectivo (hábitos

nutricionales cualitativos/cuantitativos, erróneos y/o excesivos y sedentarismo), así como costumbres no saludables (excesivo consumo de alcohol y tabaco) y estrés de muy diversa índole. La distribución del tejido adiposo en exceso es otro determinante importante del riesgo de resistencia a la insulina y DM2; así, la grasa subcutánea troncal tiene mayor importancia que la intraperitoneal o retroperitoneal. Sin embargo, hay obesos en los que no se afecta la glucemia, lo que supone la necesidad de algún otro factor, quizá la herencia (Güven et al., 1999; Meigs et al., 2003; Sánchez Rodríguez, 2010).

*Tóxicos:* Se ha observado la aparición de diabetes insulinoresistente en personas que han ingerido el raticida Vacor o con la administración de estreptozotocina, L-asparaginasa, o pentamidina (Bermudez-Peña, 2014).

*Infecciones:* Ciertos virus se han asociado con la destrucción de células  $\beta$ . La diabetes DM 1 se ha asociado a infecciones por rubeola, Coxsackie B4 y parotiditis. No se ha observado relación entre DM 2 e infección por virus (American Diabetes Association, 2011).

*Daño oxidativo:* Aunque existe evidencia experimental que indica que el estrés oxidativo puede determinar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías de la diabetes mellitus, aún hay controversia acerca de si el incremento de este fenómeno es meramente asociativo más que causal en el caso de esta enfermedad metabólica. No obstante, se ha demostrado que existe un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución de las defensas antioxidantes en los sujetos diabéticos. Hay varios mecanismos implicados en el incremento del estrés oxidativo (ROS) en la diabetes mellitus, entre los cuales se encuentran: la autooxidación de la glucosa, la glicación de proteínas, la activación de la vía de los polioles y la disminución de las defensas antioxidantes. La glucosa, al igual que otros alfa-hidroxialdehídos, es capaz de autooxidarse a enediones (enolizarse) en solución acuosa y en presencia de metales de transición (Fe, Mn).



$O_2^{\circ-}$  a la pared vascular en los pacientes diabéticos (Wachnik et al., 1992; West, 2000; Calderón et al., 2013).

Se ha demostrado que la hiperglucemia favorece la producción de  $O_2^{\circ-}$  mitocondrial, lo que ocasiona, entre otros efectos adversos, la activación de la vía de los polioles (vías de los hexosaminas) y, consecuentemente, una disminución de NADPH, que constituye el cofactor de las enzimas generadoras de GSH. Es decir, es evidente que estamos frente a un mecanismo de retroalimentación positiva en el cual el estrés oxidativo activa a la vía de los polioles y, a su vez, contribuye a la generación de más radicales libres y, por tanto, a acentuar aún más el desbalance redox (Green et al., 2004).

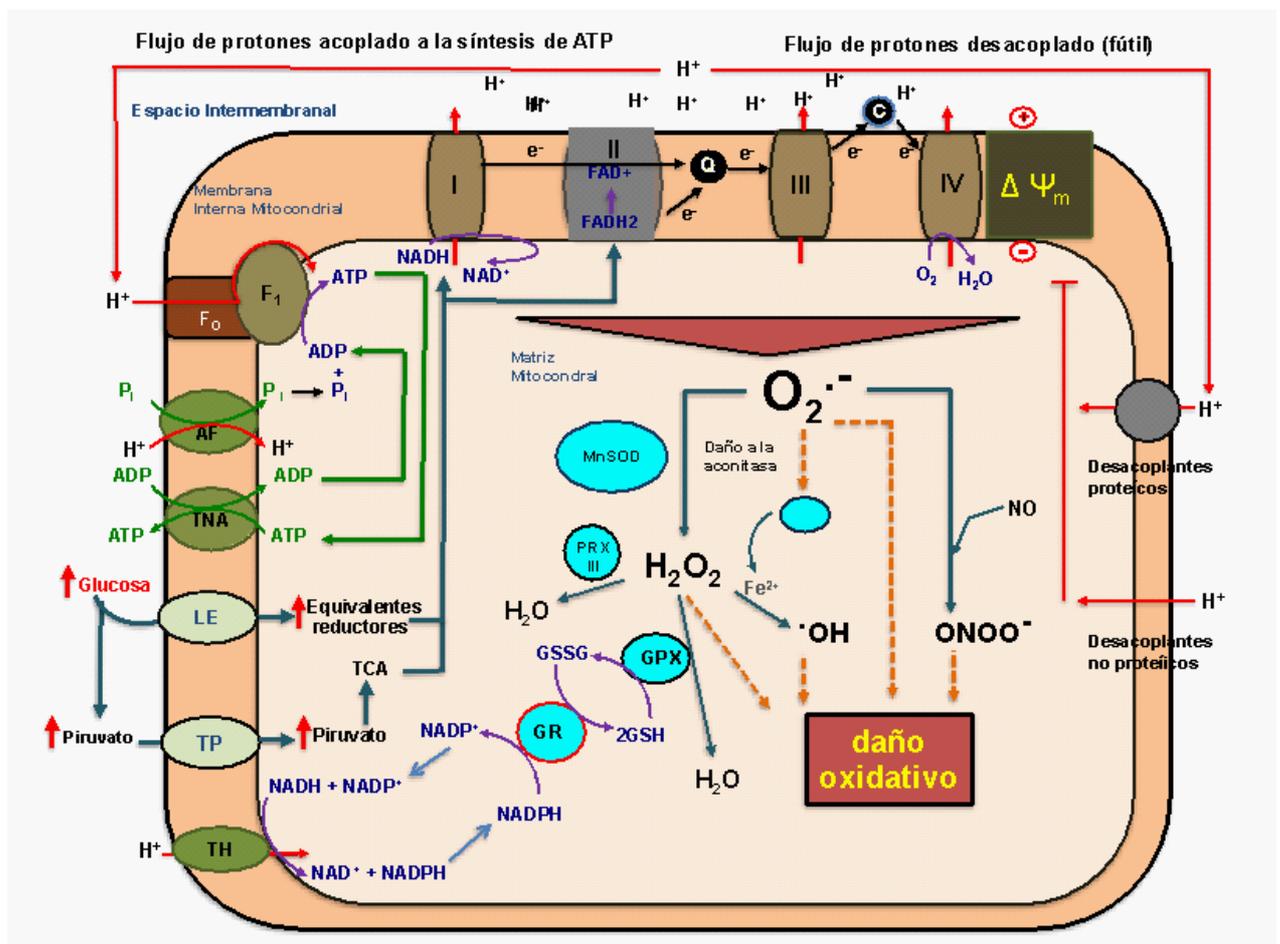


Fig.5.- Modelo propuesto para explicar la participación de la mitocondria en la inducción de daño oxidativo debido a hiperglucemia (Tomado de: Calderón et al., 2013)

En los individuos diabéticos existe también disminución de las defensas antioxidantes, entre las que se incluyen el GSH, y todas las enzimas y vitaminas antioxidantes, y un aumento del estrés nitrosante, lo que implica un incremento del radical peroxinitrito, potente oxidante lipídico y proteico, y de la actividad de la proteína quinasa C (Opara, 2001; Willsky et al., 2006).

Se ha precisado, además, que el desbalance entre los ROS y los antioxidantes es un elemento patogénico importante de la resistencia a la insulina, debido a que durante el estado de estrés oxidativo no se estimulan adecuadamente las vías de señalización mediadas por esta hormona. Así, también se ha comprobado que existe una correlación entre el nivel de control metabólico y el grado de severidad del estrés oxidativo en los individuos diabéticos. Se ha encontrado un incremento de la peroxidación lipídica, y oxidación proteica en la diabetes, que guardan relación con los procesos de nefropatía, neuropatía y retinopatía diabética (Wachnik et al., 1992; West, 2000).

### ***2.1.5. Epidemiología de la diabetes***

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO), el número de personas con diabetes ha aumentado de 108 millones en 1980 a 422 millones en 2014 (Figura 6).

La prevalencia de la diabetes ha aumentado con mayor rapidez en los países de ingresos medianos y bajos. Se estima que en 2015 la diabetes fue la causa directa de 1,6 millones de muertes. Otros 2,2 millones de muertes fueron atribuibles a la hiperglucemia en 2012. Aproximadamente la mitad de las muertes atribuibles a la hiperglucemia tienen lugar antes de los 70 años de edad. Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030 (Figura 6).

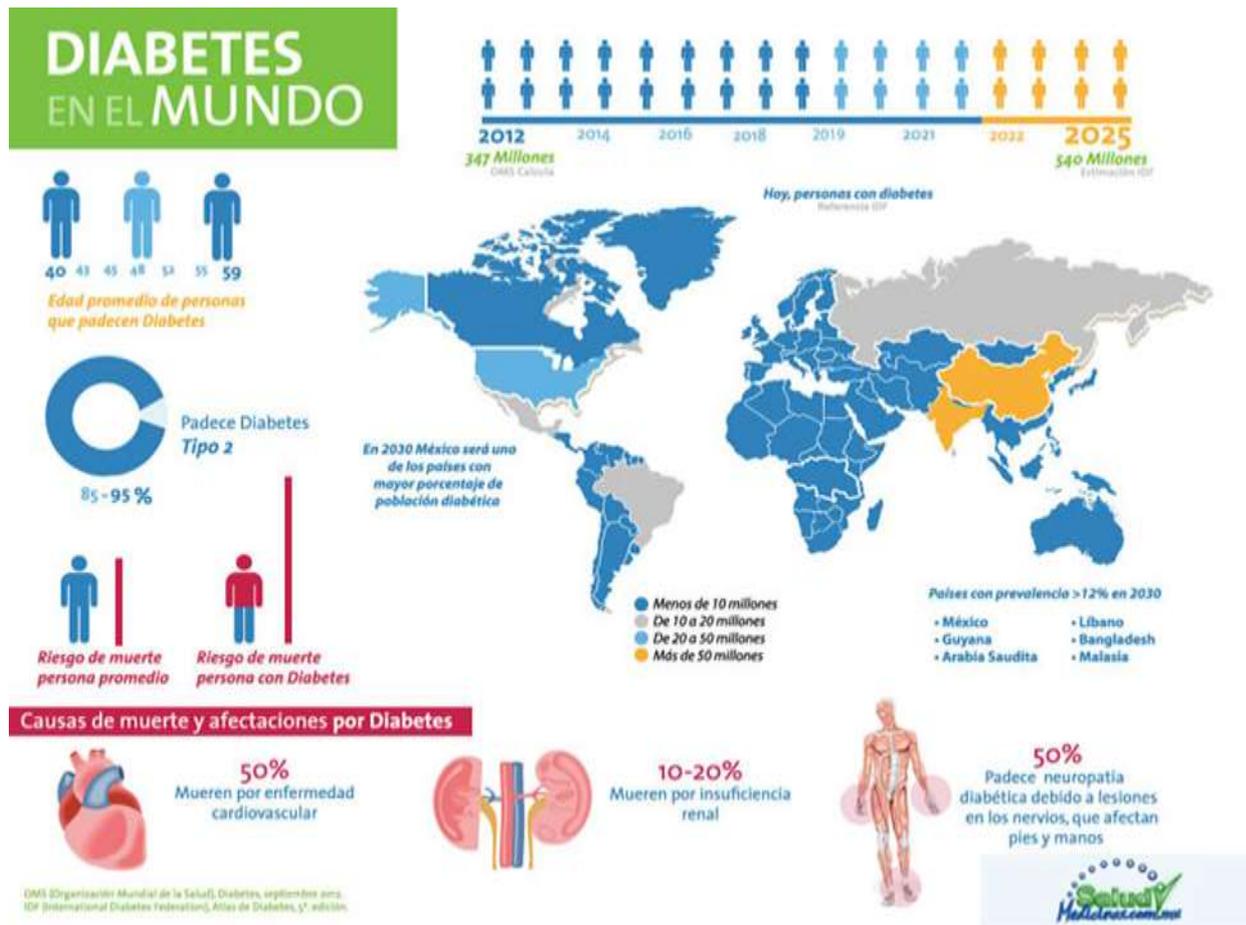


Fig. 6.- Distribución de la diabetes en el planeta (Fuente: [www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes).)

En cuanto a España (CIBERDEM, 2011), los datos superan los peores presagios, ya que demuestran que el 13,8% de los españoles mayores de 18 años tiene diabetes tipo 2, lo que equivale a más de 5,3 millones de compatriotas. De ellos, casi 3 millones ya estaban diagnosticados pero 2,3 millones, el 43% del total, desconocían que padecían la enfermedad. El trabajo también estudia las diferencias en el número de afectados según edad y sexo. Entre los 61 y los 75 años el 29,8% de las mujeres y el 42,4% de los varones presentan diabetes tipo 2, porcentajes que ascienden al 41,3% de las mujeres y el 37,4% de los varones de más de 75 años. Este estudio también ha arrojado otros datos preocupantes: el 12,6% de la población, más de 4,8 millones de personas, tienen intolerancia a a glucosa o glucosa basal alterada, situaciones que se consideran prediabéticas, mientras que cerca de 11 millones de españoles son obesos, lo que equivale al 28,2% de la población.

Es bien sabido que existe una estrecha relación entre obesidad y diabetes tipo 2. Como colofón, no podemos olvidar que a estos casos de diabetes tipo 2 (la más frecuente), hay que sumar los de la tipo 1, que supone entre el 5 y el 1% del total de personas con diabetes

	<b>% Personas afectadas mayores de 18 años</b>	<b>Núm. de personas afectadas mayores de 18 años</b>
Diabetes Mellitus (DM) Total	13.8	5.301.314
DM Conocida	7.8	2.996.395
DM no conocida	6.0	2.304.919
Tolerancia Anormal de la Glucemia	9.2	3.534.210
Glucemia Basal alterada	3.4	1.306.121
Obesidad (IMC>30kg/m <sup>2</sup> )	28.2	10.863.431

Tabla 1.- Fuente: Estudio [Di@bet.es](https://www.ciberdem.org), CIBERDEM, Sociedad Española de Diabetes, Federación Española de Diabetes (<https://www.ciberdem.org>)

### **2.1.6. Elementos traza y diabetes**

Los elementos traza como micronutrientes se definen como compuesto químico que es necesario en cantidades ínfimas para el crecimiento, desarrollo y fisiología de un organismo. En química analítica, es un elemento presente en una muestra que posee una media de concentración menor de 100 partes por millón. Los principales elementos traza son Fe, Mn, Cu, Zn, Se, I, Co, Cr, Ni, F y Mo (Bowen, 2002).

Los altos contenidos de glucosa en suero no explican todas las complicaciones de la diabetes. Como se ha comentado, existe un amplio número de estudios que demuestran un incremento del estrés oxidativo por la presencia de altos niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y avanzados productos de glicación (Díaz-Casasola et al., 2016). En paralelo con este hecho, se ha demostrado la existencia de alteraciones en la homeostasis de diferentes elementos tanto mayoritarios como Ca y Mg (Bermúdez-Peña et al., 2013; Sánchez-González et al., 2017), como elementos traza (Se, Cu, Fe, Mn, Zn, Cr, Co, V, etc. (Oster et al., 1993; Ekmekcioglu et al., 2001; Opara, 2002; Beletate et al., 2007; Kazi et al., 2008; Haase et al., 2008; Liu et al., 2011; Chimienti et al., 2011; Rodríguez-Flores et al., 2011; Maret, 2013b; Sánchez-González et al., 2011; 2014(a y b); Lowe et al., 2017; Rivas-García et al., 2020).

Los elementos traza, cumplen importantes papeles en los procesos metabólicos a nivel celular, de órganos y tejidos. Los minerales también cumplen una función estructural fundamentalmente a nivel óseo y son muy importantes para un crecimiento normal del organismo. Actualmente se encuentra bien establecido que los elementos traza juegan un papel importante en un amplio número de procesos biológicos, como activadores o inhibidores de reacciones enzimáticas, compitiendo con otros elementos o proteínas por los sitios de unión, modificando la permeabilidad de las membranas o a través de otros mecanismos. Por tanto, es razonable pensar que estos elementos podrían ejercer una acción, directa o indirectamente, a nivel del páncreas. Algunos elementos traza pueden intervenir como protectores al formar parte de esencial de enzimas claves de la defensa anti-oxidante. Su exceso o deficiencia pueden contribuir a un desequilibrio del balance pro-oxidante/anti-oxidante y, por tanto, en la progresión de determinadas enfermedades o en la aparición de complicaciones secundarias (Takita et al., 2004; Liu et al., 2011).

Tanto la DM1 como la DM2, van acompañadas de alteraciones en el metabolismo de micronutrientes. La mayor consecuencia de estas alteraciones puede ser el empeoramiento del balance oxidativo, con una pérdida de la capacidad para combatir la producción endógena de radicales libres (Oster et

al., 1993; Bermúdez-Peña et al., 2013; Sánchez-González et al., 2012<sup>a</sup> y b; 2014a y 2017; Rivas-García et al., 2020).

Determinados elementos traza se encuentran involucrados en el metabolismo de los hidratos de carbono por su intervención en la cascada de señalización de la insulina, entre los cuales encontramos el Zn, Cr y V. Otros elementos traza como el Fe, Cu, y Se pueden agravar la resistencia a la insulina y la diabetes favoreciendo la formación de ROS y activando procesos inflamatorios, como consecuencia de su acumulación o depleción asociada a la diabetes. Aunque los hallazgos más frecuentes asocian la diabetes a incrementos del contenido corporal de Fe y Cu, y descensos en las concentraciones de Zn y Se, los resultados son contradictorios (Skalnayaa et al., 2018).

Tanto los macro como los microelementos, bajo un punto de vista nutricional, se encuentran involucrados en la aparición de efectos secundarios en la diabetes mellitus, en este proceso adquieren gran importancia mantener los elementos que tienen efectos beneficiosos en la diabetes como los metales de transición Cu, Zn, Mn, Mo, Cr, V y Fe en los niveles óptimos (Lowe et al., 2017). Ellos forman parte de enzimas antioxidantes (Zn, Cu y Mn son cofactores de la superóxido-dismutasa, el Se de la glutatión peroxidasa, Cu y Fe de la citocromo C oxidasa, etc), pueden ser cofactores en una amplia variedad de procesos relacionados con el metabolismo de la glucosa y lípidos o pueden participar en procesos oxidativos catalíticos. Sin embargo, no debemos olvidar que los altos niveles de estos elementos, en general, suelen ser perjudiciales ya que favorecen el estrés oxidativo y la presencia de procesos inflamatorios (Liu et al., 2011; Djoussé et al., 2013; Sánchez-González et al., 2012a y b; 2014a y 2017).

### **2.1.7. Diabetes y hueso**

Es conocido que la DM (principalmente la DM tipo1) ocasiona mayor resorción ósea que conduce a un descenso de la densidad mineral. También, se ha encontrada asociada con osteoporosis (El-Maraghy y Mehana, 2015). Se ha visto, en estudios previos que existe una pérdida ósea relacionada con un incremento de la osteoclastogénesis y una disminución de la

osteoblastogénesis. El descenso en la actividad osteoblástica se ha relacionado con un descenso de factores osteotróficos (IGF) y trastornos en la microcirculación ósea, micro y macro angiopatías causan un descenso del flujo sanguíneo que podría ocasionar alteraciones metabólicas en el hueso. Por otra parte, la actividad osteoclastica se estimula en presencia de productos de glicosilación avanzada (AGE) en los componentes de la matriz extracelular (ECM) Entre estos componentes el colágeno sería una de las proteínas de los más afectadas, lo cual causaría un importante impacto en la formación del hueso (Hie y Tsukamoto, 2010).

## 2.2. VANADIO

El vanadio es un elemento químico, con número atómico 23, que se encuentra situado en el quinto grupo de la tabla periódica. El vanadio es un metal de transición con un gran número de derivados orgánicos e inorgánicos. Se encuentra de manera natural en minerales y en gran variedad de organismos. Ocupa el lugar número 21 en cuanto a lo que abundancia se refiere en la corteza terrestre y el segundo lugar de entre los metales de transición en las aguas marinas. Existe en diferentes estados de oxidación, siendo las formas más comunes las pentavalentes y tetravalentes. En los espacios extracelulares la forma más usual es la pentavalente, usualmente como anión vanadato ( $\text{VO}_3^-$ ), V(V). Mientras que en el espacio intracelular, aparece principalmente en la forma tetravalente, como catión vanadil ( $\text{VO}^{2+}$ ), V(IV). No obstante, la forma del vanadio intracelular depende del contenido total de oxidantes y reductores de la célula.

El vanadio presenta un efecto bifásico, es un elemento tóxico LD50 (40-90 mgV/kg peso/día), su toxicidad depende de diferentes factores, que incluyen la composición de la dieta el tipo de compuesto de vanadio (inorgánico / orgánico), naturaleza de los ligandos que forman los complejos de vanadio, valencia, ruta de entrada en el organismo, duración de la exposición y sensibilidad de la especie. Se conoce que es esencial para la supervivencia de algunas formas de vida, pero su rol como micronutriente, su esencialidad y su actividad farmacológica es objeto actual de estudio, ya que existen compuestos

del vanadio que, entre otras capacidades, imitan y potencian los efectos de la insulina. En este momento, existe un interés cada vez mayor en sus efectos farmacológicos como agente anabólico, hipoglucemiante y su relación con el estrés oxidativo y diferentes formas de cáncer (Sánchez-González et al., 2012; Sánchez-González et al., 2014; Scibior y Kurus, 2019; Quiles et al., 2020).

### **2.2.1. Historia**

El vanadio fue descubierto en 1801 por el geólogo español Andrés Manuel del Río que lo llamó "*eritronium*" por el color del compuesto. Sin embargo, el descubrimiento no le fue atribuido debido a un error de uno de los miembros de la Comisión del Instituto Nacional de Francia que lo confundió con cromo, no siendo aceptado el descubrimiento. Fue redescubierto en 1831 por el sueco Nils Gabriel Sefström, que lo llamó "*vanadium*" (Treviño et al., 2019).

El vanadio es un elemento que se ha empleado fundamentalmente en la industria del cristal, pintura, cerámica, fotografía, química y electroquímica, industrias metalúrgicas para la obtención de acero, industrias aeronáutica y espacial, etc.

Fue en 1899 cuando surgió el primer informe que trataba el uso de las sales de vanadio como agente metaloterapéutico. Se puede considerar que fueron Lyonnet y sus colegas quienes llevaron a cabo la primera "fase 0" de un estudio clínico acerca del vanadio. Se embarcaron en este proyecto siguiendo los ensayos médicos de la época, probando en primer lugar los compuestos de vanadio sobre sí mismos y después sobre 60 de sus pacientes. Para ello usaron 4-5mg de metavanadato de sodio, cada 24h y antes de comer, tres veces por semana. Tras el proceso, apreciaron una leve y transitoria disminución de la glucemia en alguno de sus pacientes, sin ningún efecto negativo.

En los años 60, la complejidad y versatilidad del oxovanadio (IV y V) empezó a tenerse en cuenta de manera creciente y, con la intención de aumentar su biodisponibilidad, así como su efectividad, se desarrollaron distintos complejos de coordinación del vanadio.

El vanadio es un cofactor que activa o inhibe enzimas. La inhibición de la actividad de las ATPasas tipo P (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, Ca<sup>2+</sup>-ATPasa y H<sup>+</sup>-ATPase) por el vanadato (Nechay y Saunders, 1978), fue uno de los efectos del vanadio investigados en los años 70, pero actualmente, otros muchas acciones farmacológicas se han descrito y/o se encuentran en estudio (Etchevarry et al., 2012; Aureliano, 2016)

Las sales inorgánicas marcaron la primera generación de remedios orales con base de vanadio. Después, en el siglo XX, los avances científicos descubrirían usos para el vanadio, no solo frente a la diabetes mellitus, sino también su efecto cardioprotector, propiedades contra el cáncer e incluso contra infecciones microbianas (virus, bacterias y parásitos) (Scibior et al., 2020).

Los años 80 trajeron consigo resultados sorprendentes respecto a los claros efectos que producía la adición de una sal de vanadio (ortovanadato de sodio) en el agua de bebida de ratas STZ a lo largo de varias semanas, cuando observaron la disminución de muchos síntomas y signos de la diabetes STZ con muy pocos efectos negativos. La fase I de un ensayo clínico relativo a un complejo del vanadio no tuvo lugar hasta cien años después de Lyonnet, con el bis(etilmaltolato)oxovanadio(IV) (BEOV), en 40 sujetos no diabéticos en los que se evaluaron la seguridad, la tolerabilidad, farmacocinética y biodisponibilidad de dosis cada vez mayores del complejo, con vistas a emplearlo en el tratamiento de la diabetes mellitus (Thompson y Orvig, 2006a).

Los avances tan significativos que han marcado la historia evolutiva del vanadio y sus usos farmacológicos, han implicado un trabajo interdisciplinar por parte de profesionales de la química, bioquímica, farmacología, medicina y cristalografía. Con la llegada del siglo XXI, la ciencia ha traído estudios centrados en complejos de vanadio quelado bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV) y bis(etilmaltolato)oxovanadio(IV) (BEOV) principalmente, que incluso han llegado a desarrollarse en su estadio clínico, es decir, los pacientes han vuelto a ser protagonistas del estudio de los resultados aportados en su salud por parte de estos complejos. Sin embargo, algunos estudios en Fase II sobre el BEOV, han tenido que ser suspendidos debido a la apreciación de

problemas digestivos y renales en algunos de los participantes. (Thompson y Orvig, 2006b).

Bajo el punto de vista de Sakurai y Adachi (2005) y Rehder (2013), hasta ahora, no existe la preparación que haya alcanzado el estatus de fármaco comercializable industrialmente. Las ligeras diferencias entre las dosis terapéuticas y las dosis tóxicas y la falta de datos sobre los efectos tras una administración prolongada del elemento en humanos, junto a la habilidad del metal para acumularse en órganos y tejidos, es un importante obstáculo para el uso farmacológico del vanadio (Ścibior y Kurus, 2019).

### **2.2.2. Funciones fisiológicas del vanadio.**

Las investigaciones sobre la actividad biológica del vanadio han demostrado que es un elemento con un importante papel en el metabolismo de los hidratos de carbono, (debido a sus efectos sobre las vías de la glucólisis, glucogenolisis, glucogénesis y glucogenogénesis), lípidos, (al estimular la lipogénesis e inhibir la lipólisis), fofolípidos y colesterol. También existen estudios sobre la influencia del vanadio sobre la mineralización del hueso, metabolismo tiroideo y de los eritrocitos, acumulación y transporte de calcio en las células, y síntesis de segundos mensajeros que participan en los procesos de señalización intracelulares (Scibior et al., 2020).

Como se ha comentado anteriormente, el vanadio presenta una alta capacidad inhibitoria de ATPasas y otros enzimas, entre los que se encuentran varias fosfatasas, ribonucleasas, fosfodiesterasas, glucosa-6-fosfatasa (Treviño et al., 2019)

### **2.2.3. Metabolismo del Vanadio**

#### **Absorción**

El vanadio ingerido por los humanos se estima aproximadamente entre 15-60 µg/día dependiendo de la dieta. Tras la ingesta, el vanadato (fundamentalmente como  $\text{VO}_4^-$ ) alcanza el tracto gastrointestinal y en el medio ácido del estómago gran parte del vanadato se transforma en vanadil ( $\text{VO}^{2+}$ ) que en un medio ligeramente alcalino, en parte precipita como  $[\text{VO}(\text{OH})_2]$  y es

excretado en heces. Parte del vanadio absorbido es excretado en orina, aproximadamente el 12% de la ingesta. La cantidad de vanadio absorbido, después de la ingesta, que el ser humano retiene es bastante reducida, apenas un 5% del total (Mataix y Llopis, 2015), aunque también se han descrito cantidades mayores al 10%. Sánchez et al.(2011) encontraron una absorción del 52% en ratas tratadas con bis(maltolato)oxovanadio(IV)(BMOV) suministrado en agua de bebida. En estudios realizados en ratas mediante técnicas de perfusión intestinal, revelaron que el BMOV se absorbe en aproximadamente el 35% de la dosis administrada (Iglesias-González et al., 2012). El BMOV, puede ser absorbido rápidamente llegando a unas concentraciones máximas en sangre a las 0,6 – 0,4 horas cuando la administración ha sido realizada por vía subcutánea y a las 2,4-0,9 horas, cuando la administración había sido por vía intragástrica (Zhang et al., 2008).

Crans y colaboradores, estudiaron la absorción de los compuestos de vanadio administrados a animales de experimentación a altas dosis y por largos periodos de tiempo, suministrándolos en el agua de bebida. Observaron que, de esta manera, el vanadio es absorbido más lentamente y cambian de estado de oxidación en el organismo. No obstante, es necesario remarcar que la cantidad de vanadio absorbido depende también de los otros componentes de la dieta y el efecto que puedan causar en la química del vanadio. Por tanto, la absorción de la mayor cantidad de vanadio, se produce en el tracto gastrointestinal superior, transformándose en catión vanadil al llegar al estómago y pasando con esta forma al duodeno. Sin embargo, según indican otros estudios, el vanadio podría entrar a las células a través del fosfato o de algún otro sistema de transporte de aniones. Esta explicación le daría un sentido lógico a que el vanadio pentavalente sea absorbido de 3 a 5 veces más que el vanadio tetravalente (Crans et al., 2004).

A nivel respiratorio, los compuestos solubles del vanadio que son inhalados y depositados en los pulmones se absorben rápidamente. Se ha observado que en las personas que trabajan con vanadio a nivel industrial, absorben aproximadamente el 25% del total inhalado.

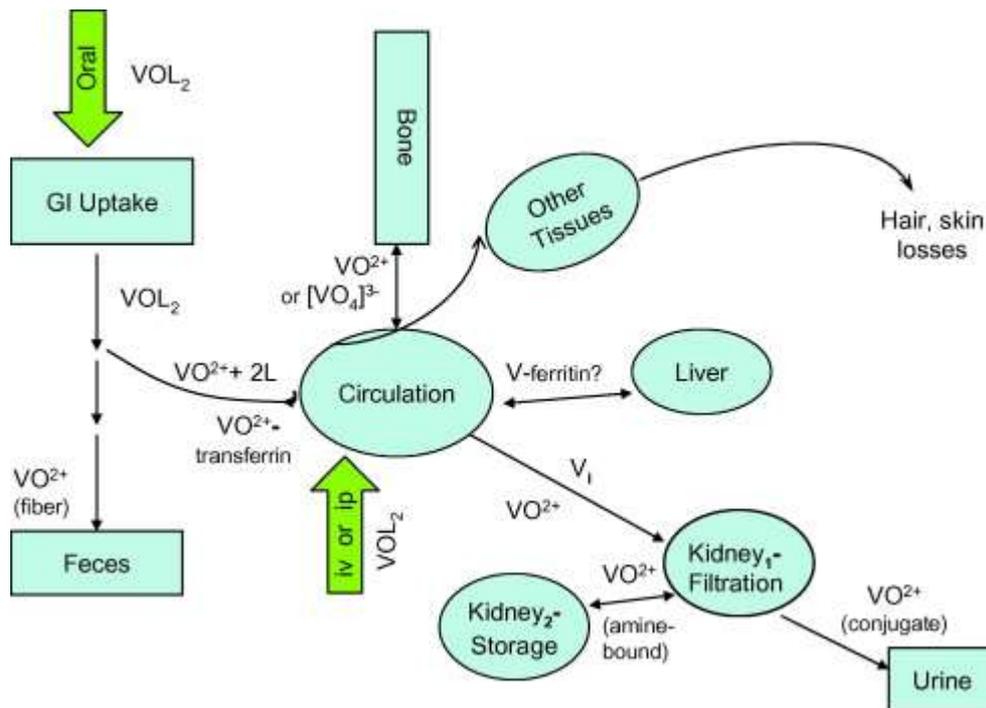


Figura 7. Absorción, distribución y excreción del vanadio (Tomado de Thompson y Orvig, 2006a)

### Distribución

La transferrina y la albúmina son las dos proteínas que se han descrito como las responsables del transporte del vanadio en el torrente sanguíneo, transportan 80-90% del vanadio tanto como V(IV) como V(V). En el plasma humano, la transferrina se encuentra a unas concentraciones de aproximadamente 37mM y cerca de un 30% de sus sitios de unión al metal (2 lugares para varios metales) están ocupados por el hierro (III), de manera que una cantidad importante de sitios de unión a metales quedan libres y disponibles para reaccionar con otros metales como fármacos sintetizados a base de compuestos metálicos (Iglesias-González et al., 2012).

Los estudios de Kiss y colaboradores revelan que, posiblemente, la asociación con vanadio ocurre igual, independientemente de la forma de vanadio que es añadida a las muestras de suero. Esto indicaría que los compuestos de vanadio (IV) se disocian y posteriormente la forma vanadilo se une a la transferrina. Por tanto, los complejos ternarios VL-Tf, (donde L es la molécula quelante de vanadio) no parecen ocurrir en el suero (Kiss et al., 2000)

La albúmina, también es un bioligando potencial de iones vanadio (IV) si bien en menor medida que la transferrina. Estos experimentos *in vitro* han sido confirmados por estudios recientes de uso integrado de HPLC-ICP-MS y MALDI-TOF en los que se ha podido estudiar los transportadores de vanadio en el torrente sanguíneo tras la administración de bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV) observándose que la transferrina sérica es el principal bioligando en plasma de rata. Además, se ha encontrado una pequeña fracción de vanadio eritrocitario en forma de complejos de bajo peso molecular (aproximadamente 3KDa) no unido a hemoglobina. Por otro lado, los aniones citrato también se han descrito como importantes ligandos para la circulación de iones vanadil, como también ocurre en otras interacciones pro-fármacos con estas pequeñas entidades moleculares (Jakusch et al., 2009; Iglesias-González et al., 2012).

El vanadio (IV) puede ser captado por las células mediante el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) (Mackenzie et al., 2007) y difusión pasiva (Sanna et al., 2014). El vanadio transportado con transferrina es internalizado por endocitosis, vía receptor de transferrina TfR1 (Treviño et al., 2019). Los iones V(V) pueden entrar en las células por canales para aniones como los fosfato o sulfato (Rehder, 2013), en las células V(V) se reduce a V(IV) mediante sustancias reductoras como el ascorbato, en el caso de los eritrocitos es reducido a V(IV) principalmente por glutatiion (GSH), el cual se une la hemoglobina (De Cremer et al., 2002). también se ha descrito que algunas especies de V pueden entrar en las células a través de los transportadores de citrato, lactato y transportadores de aniones orgánicos (Treviño et al., 2019).

En los animales de experimentación, se ha comprobado que la acumulación de vanadio se produce principalmente en bazo, riñón, testículos, hígado y huesos. Mientras que el BMOV, en las ratas estudiadas se acumuló sobre todo en huesos (fémur) riñones e hígado (Sánchez-González et al., 2012a; Iglesias-González et al., 2012). En el hígado y bazo formando compuestos vanadil-ferritina y en hueso formando parte de hidroxapatita sustituyendo al fosfato (Rehder, 2015)

## **Excreción**

Como se ha comentado anteriormente, la orina es la principal vía de excreción para el vanadio absorbido probablemente unido a proteínas y especies de bajo peso molecular (complejos de V(IV), si bien existe pequeñas cantidades excretadas también por la bilis (Sánchez et al., 2011; Rehder, 2015).

### **2.2.4. Toxicidad**

El vanadio lo encontramos en pequeñas cantidades en los alimentos. Su ingesta estimada oscila en un amplio rango, entre los 60 µg/día en USA a los 7 µg/día en Tailandia. También se encuentra presente en el agua en concentraciones aproximadamente de 1 µg/L, siendo su ingesta dependiente del volumen ingerido. Es frecuente el uso de suplementos de V en atletas y culturistas y por sus propiedades terapéuticas como antiparasitario, antitrombótico, antihipertensivo, antibacteriano, antiviral, antidiabético y anticancerígeno. Sin embargo, se ha recomendado que el uso de compuestos de V debe evitarse hasta que exista más información sobre sus posibles efectos tóxicos, fundamentalmente en los tratamientos crónicos (Barceloux, 1999; Domingo, 2000; Treviño et al., 2019).

Se ha observado que altas concentraciones de los compuestos de vanadio provocan efectos tóxicos, en tanto en cuanto que inhiben diversas ATPasas y diversos enzimas, entre los que encontramos fosfatasas, ribonucleasas, fosfodiesterasas, fosglucomutasas y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Assem y Oskarsson, 2015; Franqueza et al., 2019). Los estudios de toxicología en animales han concluido que los efectos tóxicos del vanadio dependen de diversos factores como son el tipo de compuesto, el estado de oxidación de los iones vanadio, la dosis o el tiempo de administración. En ratas, se ha descrito una intoxicación aguda de vanadio, presentando una enteritis descamativa, congestión hepática leve y una ligera degeneración del parénquima de los túbulos renales. En ratones una dosis subcutánea de 20 mg/kg de metavanadato amónico produjo necrosis tubular aguda tras 6-7 horas postinyección. Otros estudios en animales han mostrado desde alteraciones gastrointestinales (diarrea), lengua verde, retraso en el

crecimiento, anorexia y muerte (Institute de Medicine (US) Panel on Micronutrients, 2001).

Refiriéndonos a los compuestos orgánicos del vanadio, en los estudios en animales han mostrado una mayor seguridad. Los efectos tóxicos agudos del vanadio que se han encontrado, han sido una leve degeneración de los túbulos renales, congestión hepática e inflamación intestinal (Crans et al., 2019).

En seres humanos, actualmente no existe evidencia de los efectos adversos ocasionados por el vanadio asociados al contenido de este en los alimentos, ya que es la mayor fuente de exposición a dicho elemento, para la población en general, además gracias a la baja absorción gastrointestinal de dicho elemento, no es altamente toxico para los seres humanos. En los humanos los efectos adversos ocasionados por los compuestos de V fueron molestias gastrointestinales a dosis de 100mg de V por día (Thompson et al., 2006a; Treviño et al., 2019). Otros efectos adversos atribuidos al vanadio descritos en seres humanos han sido irritación del tracto respiratorio, broncoespasmo, lengua verde, fatiga, letargo y lesiones neurofocales y en algunos casos calambres abdominales y diarrea. Además la Agencia Internacional para la Investigación del Cancer ha clasificado al V(V) como posible cancerígeno (Assem y Oskarsson, 2015). Posteriormente también se ha descrito efectos neurotóxicos del vanadio en diferentes partes del sistema nervioso central, atribuido a la capacidad del V para generar ROS (Ngwa et al., 2017).

La mayor parte de los caso de toxicidad descrita en humanos se han debido a una alta exposición industrial en los niveles de aire, en la forma de pentóxido de vanadio, la cual es la forma más toxica de dicho elemento (Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients, 2001). Es en la función mitocondrial donde se observa principalmente la toxicidad del vanadio. Los compuestos de vanadio inducen estrés oxidativo de la mitocondria lo que provoca la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm), consecuentemente se colapsa el potencial transmembrana en la mitocondria y se libera el citocromo C como inicio del proceso apoptótico. Sin

embargo, el nivel de toxicidad depende del compuesto del vanadio en solución. La toxicidad del vanadio puede darse por dos vías distintas. Una dependiente y otra independiente de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la cual puede ser bloqueada por catalasa o glutatión ( Aureliano y Ohlin, 2014).

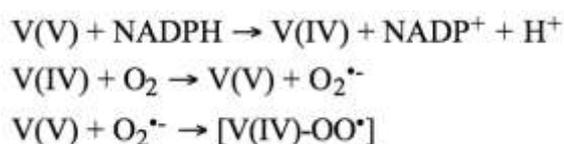
Los resultados obtenidos hasta la fecha apuntan a que el uso farmacológico del vanadio y sus derivados se haga de manera conjunta a agentes antioxidantes y proapoptóticos (Gruzewska, et al., 2014).

### **2.2.5. Vanadio y estrés oxidativo.**

Se ha sugerido que el vanadio, debido a su capacidad insulínimimética, puede reducir la producción de radicales libres (ROS) resultantes del trastorno en el metabolismo de la glucosa (Figuras 4 y 5), y de este modo evitar el daño oxidante causado por la diabetes (Thompson y Orvig, 2006b).

Debe enfatizarse que el vanadio puede actuar como un potente oxidante incrementando el estrés oxidativo originando un imbalance celular prooxidante/antioxidante. En muchas ocasiones esta situación se encuentra asociada a interacciones con otros elementos traza (Ścibior et al., 2019).

Como ya se ha comentado, el vanadio tiene diferentes estados de transición. Podemos considerar que las reacciones que aparecen en el interior celular son:



Las reacciones anteriores producen la formación de peroxovanadil [V(IV)-OO<sup>•</sup>] y vanadilo hidropéroxido [V(IV)-OH<sup>•</sup>]; el superóxido producido se transforma en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por dismutación con Superóxido dismutasa (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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por hidropéroxido de lípidos a través de la reacción de Fenton (Valko et al., 2005).



El  $\cdot\text{OH}$  puede producir radical superóxido que se transforma en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por la superóxido dismutasa; incubando *in vitro* V(IV) con 2´deoxyguanosina (dG) o con ADN en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produjo un incremento de la 8-hidroxi-2´deoxyguanosina (8-OH-dG) y roturas de la hebra 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).

Los complejos [V(IV)-OO $\cdot$ ] pueden ser los responsables de la estimulación de la peroxidación lipídica observada en un amplio número de publicaciones (Ścibior et al., 2006; Ścibior et al 2009; Ścibior et al 2010a y b; Sánchez-González et al., 2012a; Sánchez-González et al., 2012b).

En relación al efecto del vanadio sobre las enzimas antioxidantes (Figura 8) superóxido-dismutasa SOD, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), no existe acuerdo. Algunos autores han descrito que el V(V) inhibe su actividad enzimática, mientras que otros no encuentran tal efecto. Además, se ha investigado la interacción del V(V) con GSSG y NADPH y los efectos ejercidos sobre la glutatión reductasa (GR), los resultados obtenidos sugieren que la interacción con GSSG y NADPH contribuye al descenso de la actividad de la GR. También se ha descrito la capacidad del V(IV) y V(V) para inhibir a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P-OH) lo que puede ocasionar un descenso de los equivalentes reductores necesarios lo que contribuye a un incremento de los niveles de peróxido. Con respecto a la familia de la glutatión transferasa (GST) (citosólica, mitocondrial y microsomal), se ha descrito que se une al V(IV) pero que dicha unión no afecta su actividad (Ścibior y Kurus, 2019).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, en relación a los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes en ratas diabéticas tratadas con BMOV (IV), muestran que el complejo ocasiona un descenso en la actividad de la GST y NQO1 (quinina-oxidoreductasa1). Incremento la actividad de la CAT, mientras que la actividad de SOD, GR y GPx no se vio modificada (Sánchez-González et al., 2012a y Sánchez-González et al., 2014a). Sin

embargo, cuando se exponen ratas sanas a BMOV (IV) se aprecia un descenso en la actividad de GPx, GST y NQO1, no observándose variaciones en la actividad de la CAT (Sánchez-González et al., 2012b).

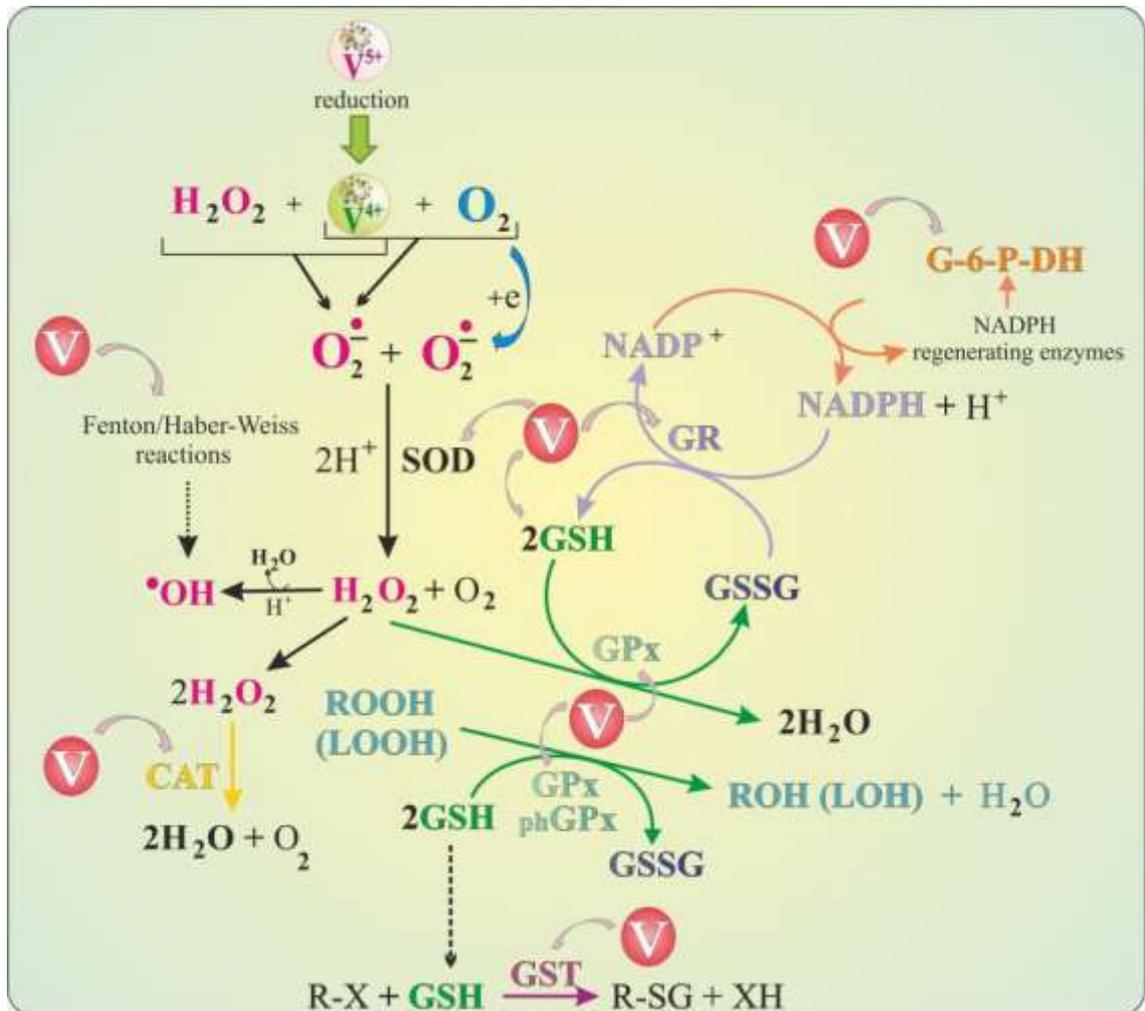


Fig. 8 Antioxidantes enzimáticos modulados por V and y su impacto sobre la formación de ROS y mecanismos de defensa antioxidante

V: vanadium; V<sup>5+</sup>: pentavalent vanadium; V<sup>4+</sup>: tetravalent vanadium; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: superoxide anion radical; HO<sup>•</sup>: hydroxyl radical; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide; SOD: superoxide dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; phGPx: glutathione peroxidase of lipid peroxides; GR: glutathione reductase; GST: glutathione transferase; G-6-P-OH: glucose-6-phosphate dehydrogenase; GSH: reduced glutathione; GSSG: glutathione disulfide; ROOH: organic peroxide; LOOH: lipid peroxide; ROH: corresponding alcohol; LOH: lipid-alcohol; R-X: electrophilic substrate; R-SG: glutathione adduct (glutathione conjugate); NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (Tomado de Ścibior y Kurus, 2019).

También se ha estudiado el efecto del vanadio sobre antioxidantes no enzimáticos, se ha sugerido que la GSH es capaz de reducir V(V) a V(IV). Dicha reducción juega un importante papel en las primeras etapas del metabolismo del V y puede ser indirectamente asociada a los mecanismos de detoxificación del V. Otro mecanismo de interacción propuesto es la formación de complejos del V(IV) con GSH y la interacción del V(IV) con la forma oxidada de GSH (GSSG), lo que sugiere que ambas formas participarían en la estabilización del V en el medio celular. La unión del V a GSH y su conversión en GSSG puede ser un importante factor que contribuiría a incrementar el nivel de peróxidos de la membrana. Por último se ha sugerido que el ácido ascórbico es capaz de reducir el V(V) a V(IV) (Ścibior y Kurus, 2019).

### **2.2.6. Vanadio y diabetes**

A lo largo de las diferentes revisiones existentes sobre el rol biológico del vanadio y de algunos de los compuestos que forma, cabe destacar su función hipoglucemiante y antihiperlipidémica (Figuras 9 y 10). También es importante remarcar que las investigaciones actuales sitúan que los complejos de vanadio con ligandos orgánicos son más efectivos y seguros que las sales inorgánicas, en modelos animales (Fedorova et al., 2014; Thompson y Orvig, 2006a).

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).

Las propiedades insulinoiméticas e hipoglucemiantes ocurren porque el V es capaz de incrementar la actividad del receptor del factor de crecimiento I similar a la insulina (IFG1), estimular la síntesis de glucógeno, incrementar el número de transportadores GLUT-4 en la membrana celular y disminuir la gluconeogénesis. Sumado a esto, los compuestos del vanadio incrementan la síntesis de ácidos grasos, reduciendo la concentración de glucosa en la sangre. Gracias a estas propiedades mitóticas, bajas concentraciones de compuestos del vanadio son capaces de inducir la regeneración de las células  $\beta$ -pancreáticas. Los exámenes clínicos están probando que los compuestos del

vanadio pueden ser usados como fármacos antidiabéticos con una toxicidad baja. Sin embargo, el intervalo de las concentraciones terapéuticas es muy estrecho; a concentraciones tan bajas, algunos micromoles de compuestos de vanadio, resulta inhibida la proliferación celular, causan apoptosis, necrosis e inflamación (Korbecki et al., 2016).

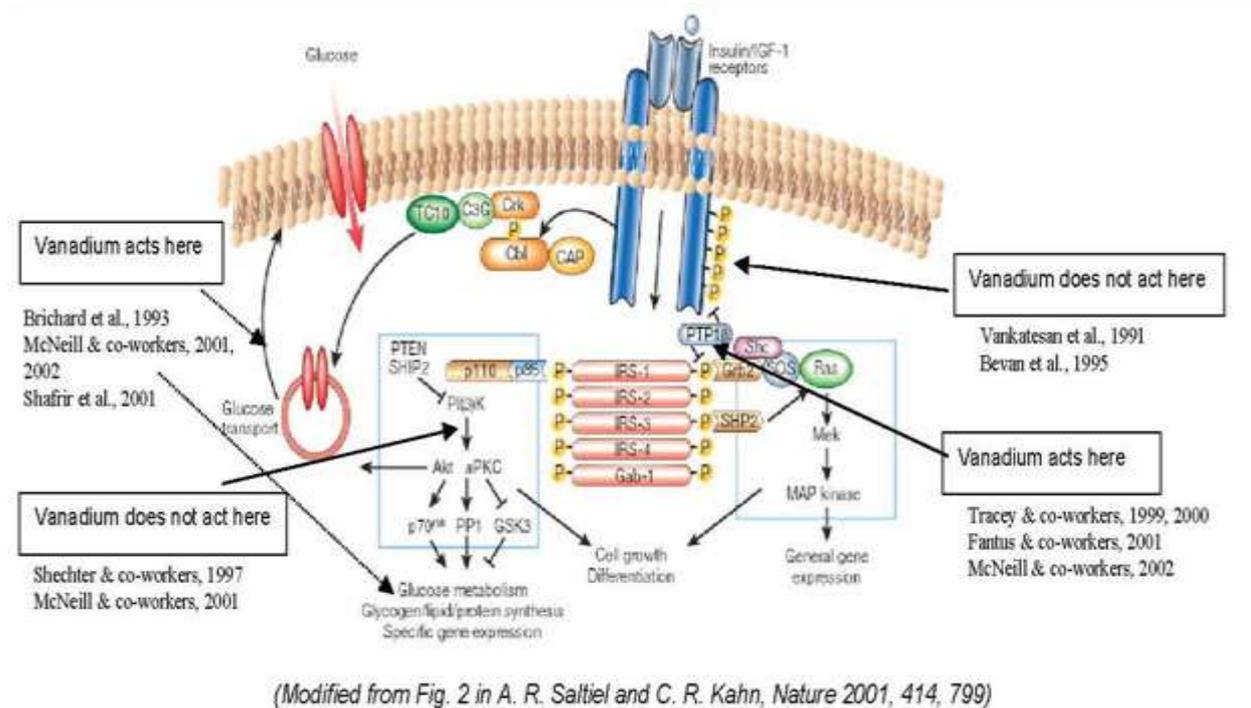


Figura 9. Efecto del vanadio en la cadena de señalización de la insulina.

Un hito importante en el camino del conocimiento de las propiedades antidiabéticas del vanadio, sobrevino con el descubrimiento del efecto de los compuestos del vanadio como inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa. La proteína tirosina fosfatasa 1B, es un modulador negativo de la señalización mediada por receptores tirosina quinasa, lo cual provoca el bloqueo del receptor de la insulina y conduce a una resistencia a ésta. La inhibición de la proteína tirosina fosfatasa viene estudiándose como diana terapéutica en el tratamiento de la diabetes tipo 2, ya que se observó un aumento de su expresión y de su actividad en el hígado de ratones con resistencia a la insulina inducida. El descubrimiento de este efecto del vanadio sobre la proteína tirosina fosfatasa fue inesperado y tuvo lugar a partir de una preparación

comercial de ATP que contenía vanadio (Sigma Chemical Co.) Con esta preparación concreta, las tasas catalíticas en ensayos de ATPasa estándar resultaron anormalmente bajas. La explicación a este aspecto tuvo que esperar hasta el desarrollo de diversos estudios posteriores, en los que se concluyó que la inhibición del transporte de cationes se originaba en el lado citoplasmático de la membrana de la célula y que el vanadato impedía un cambio conformacional de la enzima desfosforilada. (Beaugé y Glynn, 1978)

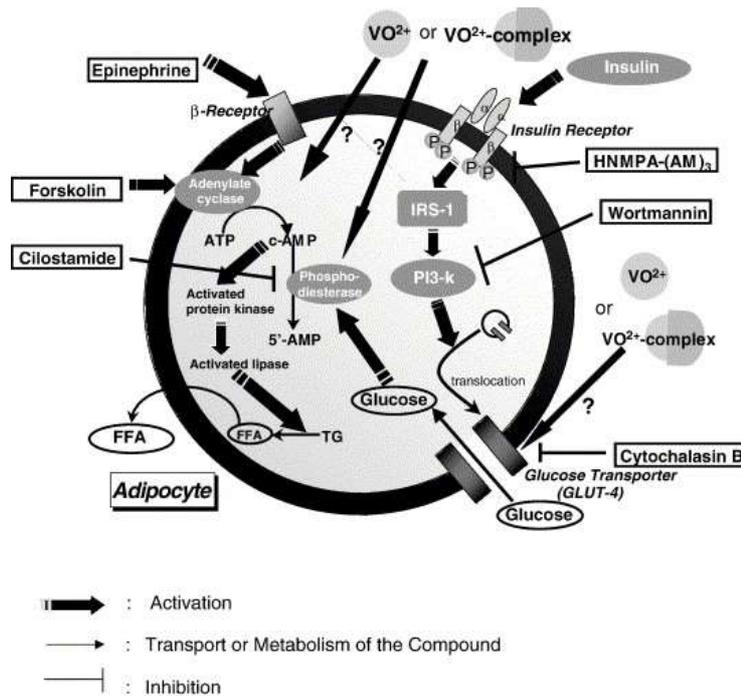


Figura 10. Mecanismo de acción propuesto para el vanadio en los adipocitos de las ratas diabéticas. (Tomado de Goldwaser et al., 2005)

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

Iglesias-Gonzalez y colaboradores demostraron que la administración de sulfato de vanadil disminuye los niveles de hemoglobina glicosilada HbA1c en ratas diabéticas-STZ (Iglesias-González et al., 2012).

El efecto del vanadio sobre la leptina y su implicación en el desarrollo de la diabetes mellitus es hoy día objeto de investigación. Nuestro grupo de investigación ha encontrado que en ratas sanas el tratamiento con BMOV conduce a un descenso de los niveles séricos de leptina, lo cual debería ocasionar un incremento de la ingesta de alimento y del peso corporal, sin embargo, el efecto que se observa es el opuesto, disminuye la ingesta de agua, alimento y el peso corporal (Sanchez-Gonzalez et al., 2014b). Este hecho parece encontrarse relacionado con que este metal activa la cadena de señalización (JAK2/STAT3) de la leptina, inhibiendo la síntesis del neuropeptido Y (NPY) y su liberación del hipotálamo (Wilsey et al., 2006). Esta situación daría lugar a un descenso del apetito y de la masa corporal.

Aunque se atribuye al vanadio un efecto lipogénico y antilipolítico, junto a cierta capacidad para reducir la biosíntesis de lípidos, colesterol total (CT), al inhibir la 3-metil-glutari-coenzima A reductasa (3-HMG-CoA), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG), los resultados obtenidos por diversos autores son inconsistentes, dependiendo mucho del tipo de compuesto y dosis empleada (Bermúdez-Peña et al., 2013; Treviño et al., 2019).

### **2.2.7. Vanadio y hueso**

Tras su absorción el vanadio se deposita en diversos órganos, particularmente en riñón, hígado y hueso. Las interacciones del vanadio con otros iones como el calcio no se encuentran bien establecidas. Algunos compuestos de vanadio se han mostrado como agentes osteogénicos debido a su acción sobre la formación de colágeno. Además, es conocida la capacidad de los iones vanadato ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) en el hueso para reemplazar a los iones fosfato en la hidroxiapatita. También se ha sugerido que este hecho permite incrementar la formación del hueso en las ratas diabéticas (Facchini et al., 2006).

Las incorporaciones del vanadato en el lugar del fosfato, solo produce ligeras distorsiones en la estructura mineral del hueso. Estos hechos permiten asumir que el hueso tiene un papel activo en los procesos de detoxificación cuando los organismos son expuestos a altas concentraciones de vanadio. También se conoce que el ión vanadil podría no incorporarse a la hidroxiapatita, aunque es absorbido fuertemente en la superficie. Sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto relevantes interacciones entre el oxovanadio (IV) con el nitrógeno del colágeno. Además, Los compuestos del vanadio (IV) han mostrado resultados positivos en proliferación, diferenciación y mineralización de la matriz extracelular en células óseas MC3T3E1 en cultivos. Estos estudios han sugerido que los complejos de V(IV) presentan sobre los osteoblastos propiedades osteogénicas más potentes que los derivados de V(V) (Etcheverry et al., 2012). Otros autores han observado que la administración de  $\text{NaVO}_3$  a ratas sanas disminuye el contenido de Ca (Ścibior et al., 2014) y no incrementa la peroxidación lipídica en el hueso (Ścibior et al., 2018).

La osteopontina, glicoproteína asociada con el desarrollo de osteoclastos y macrófagos se considera un factor importante en el metabolismo óseo (ver apartado 1.3.2.). La relación entre la osteopontina y el vanadio no cuenta con muchos datos actualmente. Sun et al. (1997) no encontró relación entre la expresión *in vitro* de osteopontina y dosis citotóxicas de vanadio. Posteriormente ha sido estudiada como factor susceptible al tratamiento con vanadio y, por tanto, como elemento mediante el cual el vanadio podría, no solo mejorar el metabolismo de la glucosa, sino también actuar sobre una de las consecuencias negativas que subyacen a la enfermedad diabética, como es el caso de la afectación del hueso en este tipo de pacientes (Sánchez-González et al., 2017).

#### **2.2.8. Bis(maltolato)oxovanadio (IV) (BMOV)**

Es un compuesto de vanadio, que cuenta con ligandos no tóxicos (figura 11). El BMOV es absorbido rápidamente y extensamente distribuido a lo largo de varios tejidos, acumulándose en gran medida en el fémur (Domingo et al., 1995).

Este complejo ha demostrado ser más efectivo que el sulfato de vanadilo como agente hipoglucemiante, mejor tolerado que las sales de vanadio inorgánico, y ha ocasionado una disminución de la glucemia en todos los modelos animales diabéticos ensayados (Caravan et al,1995; Yuen et al, 1995). El BMOV en estudios animales mostró que puede administrarse en el agua de bebida con una eficacia equivalente a la de sulfato de vanadio. Un estudio farmacocinético realizado con BMOV y  $\text{VOSO}_4$  demostró de forma concluyente que el vanadio procedente del complejo, incrementaba la captación del vanadio en comparación con el compuesto inorgánico (Thompson et al, 2006b).

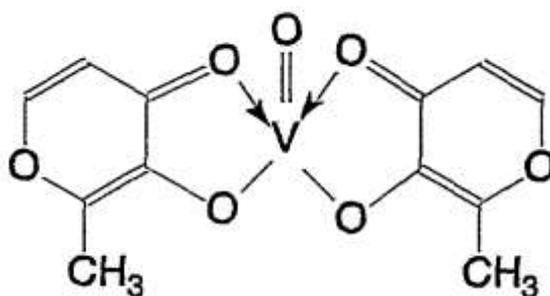


Figura 11. Bismaltolato oxovanadium (BMOV)

Desde hace una década, nuestro grupo de investigación viene estudiando tanto “in vivo” como “in vitro” el efecto de la exposición a BMOV, con la finalidad de aportar conocimiento sobre su actividad farmacológica como agente hipoglucemiante, su relación con el estrés oxidativo e inflamatorio, sus interacciones con otros elementos nutricionalmente esenciales y su toxicidad.

Los resultados obtenidos en estos estudios han mostrado que el tratamiento con BMOV a ratas a las que se les ha inducido la diabetes con STZ, mejora la hiperglucemia y hemoglobina glicosilada (Iglesias-González et al., 2012) el estrés oxidativo e inflamatorio, la expresión genética de la hepcidina y osteopontina, junto a alteraciones en la homeostasis de diversos micronutrientes como el Mg (Sánchez et al., 2011; Bermudez-Peña et al., 2013), Se (Sánchez-González et al., 2012a), Fe (Sánchez-González et al., 2014a) y Ca (Sánchez-González et al., 2017) ocasionados por la diabetes. La

exposición de ratas sanas al complejo de vanadio, empeora el estrés oxidativo e inflamatorio y la homeostasis del Se (Sánchez-González et al., 2012b) y Fe, mientras que no parece alterar la homeostasis del Mn (Sánchez-González et al., 2014b).

En los estudios realizados “in vitro” con el BMOV, hemos observado que la exposición al complejo conduce a daños del DNA nuclear y mitocondrial en células HepG2 y que la exposición conjunta a V y Mn, V y Cu o V,Mn y Cu mejora los daños observados en el DNA y la viabilidad celular (Rivas-García, 2018, Rivas-García et al., 2020)

## **2.3. CALCIO**

El calcio es el elemento más abundante en el organismo. Los cristales de hidroxapatita en diente y esqueleto suponen el 99% del almacén de calcio del organismo. Sin embargo, el 99% del calcio del esqueleto no está disponible para la homeostasis inmediata. Para este fin, solo contamos con un 1% disponible que se encuentra en plasma y fluido extravascular.

### **2.3.1 Contenido corporal**

#### ***Calcio extracelular***

El calcio en sangre existe en una concentración entre 2,25 y 2,75 mM (2,5 mM de media que corresponde aproximadamente a 9,5 mg/dL), cantidad que suele descender lentamente con la edad, lo que se correlaciona con los niveles plasmáticos de albúmina.

El calcio extracelular se encuentra en tres formas distintas:

- Unido a proteínas plasmáticas, principalmente albúminas y globulinas (40%). El grado de unión depende del pH, de tal modo que si es ácido ésta es menor.

- Combinado en distintas sustancias del líquido extracelular (sangre y líquido intersticial) como citrato y fosfato de tal modo que puede difundir, pero no está en forma ionizada (10% del contenido plasmático total).
- Calcio ionizado, y por tanto capaz de difundir que es la forma fisiológicamente activa (50% del contenido plasmático total), cuya actuación se trata con detalle posteriormente.

### **Calcio óseo**

La estructura ósea está compuesta de un 35% en peso de una matriz orgánica (colágeno (94%), sustancia fundamental (5%) y lípidos (1%)) y un 65% de componentes inorgánicos (calcio y fosfato principalmente).

El calcio óseo se encuentra en dos formas:

- a) Calcio intercambiable o difusible, el cual es fácilmente depositado y reabsorbido, encontrándose mayoritariamente constituyendo cristales amorfos de fosfato monocálcico poco fijados al hueso, lo que permite que se movilicen con facilidad. Representa tan sólo de 5 a 10 g, es decir, un 1% aproximadamente del calcio óseo total.
- b) Calcio en depósito, es menos intercambiable, constituyendo el resto del calcio, o sea el 99% del calcio óseo. Se encuentra principalmente formando cristales de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  en los cuales además hay en baja proporción otros iones como sodio, potasio, magnesio, fluor, carbonatos, citratos, etc. La relación normal calcio/fósforo en el hueso es de 1,5/1, ligeramente menor que la que se encuentra cuando se considera sólo el hidroxiapatita (Mataix y Llopis, 2015).

### **Tipos de hueso**

Morfologicamente existen dos tipos de hueso: cortical o compacto y trabecular o esponjoso.

- a) Hueso compacto: Constituye el 80% de la masa esquelética. Forma la superficie externa de la totalidad de los huesos, encontrándose la mayor parte en la diáfisis de los huesos largos. Se compone de láminas concéntricas

dispuestas alrededor de pequeños canales (sistemas de Havers). Su remodelado es lento.

b) Hueso esponjoso, reticular o trabecular: Está constituido por una malla rígida de hueso mineralizado que forma la mayor parte de las vértebras, también esta presente en la epífisis de huesos largos y cresta ilíaca. Representa el 20% de la masa esquelética. Las trabéculas se disponen para resistir fuerzas deformantes y su número, tamaño y distribución aparecen en relación con estas fuerzas. Este hueso proporciona un gran área de superficie y es la parte metabólicamente más activa del esqueleto, con una velocidad de recambio mucho mayor que la del hueso compacto (Sosa y Gómez de Tejada, 2004).

### **Dinámica ósea**

Durante el primer trimestre de gestación el depósito de calcio en el feto es muy escaso, apreciándose incrementos significativos y graduales desde ese momento hasta llegar al último trimestre del embarazo, en donde aumentan los contenidos cálcicos fetales debido al incremento de los niveles maternos de parathormona (PTH) y de la absorción intestinal de calcio. Al final de la gestación los niveles corporales fetales del mineral alcanzan unos 20-30 g.

El crecimiento y calcificación ósea en la infancia requiere una retención media de calcio de 150 mg/día, alcanzando en la adolescencia una retención máxima de entre 275 mg/día y 500 mg/día, lo que está justificado por el estirón puberal y la calcificación de los cartílagos epifisarios.

En la edad adulta existe un equilibrio entre depósito de calcio y reabsorción ósea (remodelado óseo) que es de aproximadamente 180 g de calcio al año (15-18% de turnover anual) y que permite que no haya cambio neto en la masa ósea. El remodelado es un ciclo continuo de formación y destrucción que se produce a lo largo de la vida en los humanos.

A partir de la cuarta o quinta década de la vida se produce una alteración de ese equilibrio, predominando la reabsorción (destrucción) ósea sobre la deposición (construcción), como consecuencia de lo cual hay una pérdida de masa ósea que es variable especialmente en función del sexo, siendo mayor para la mujer, en donde esa pérdida puede alcanzar el 1% al año. La citada

disminución es independiente de las variaciones en la ingesta cálcica y otros hábitos alimentarios.

La formación y reabsorción óseas dependen de tres tipos de células:

- a) Osteoblastos. Los osteoblastos proceden de células progenitoras mesenquimales, las cuales son atraídas por proteínas óseas, denominadas factores de crecimiento esquelético y que dan lugar a su diferenciación en osteoblastos. Éstos son responsables de la formación ósea, siendo responsables de sintetizar, segregar y mineralizar la matriz ósea.
- b) Los osteocitos. Son osteoblastos diferenciados que han formado la matriz orgánica y se encuentran embebidos y rodeados por material óseo.
- c) Osteoclastos. Son células multinucleadas que proceden de la fusión de células precursoras que son las mismas que dan lugar a monocitos circulantes y macrófagos tisulares, y son responsables de la destrucción ósea.

#### *Osteopontina*

La osteopontina, glicoproteína asociada con el desarrollo de osteoclastos y macrófagos, y por consiguiente un factor importante en la remodelación ósea, se encuentra en diversos fluidos corporales como el suero, leche, fluido seminal y orina. Es sintetizada en diversos tipos tejidos como fibroblastos, preosteoblastos, osteoblastos, osteocitos, osteoclastos, algunas células de la médula ósea, células musculares lisas, miofibroblastos del músculo esquelético, y macrófagos. Encontrándose en diversos tejidos como riñón, cerebro, hígado, tracto gastrointestinal, epitelio uterino, etc (Ramaiah and Rittling, 2008). La osteopontina incrementa el potencial invasor de las células cancerígenas participando activamente en la progresión y metástasis (Boudjadi et al., 2013; Shevde y Samant, 2014).

Se ha puesto de manifiesto que la hipocalcemia y la hipofosfatemia, factores que promueven la síntesis 1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) estimula la expresión de OPN en el hueso (Kasugai et al., 1991), la diferenciación de los osteoclastos y la resorción ósea (Sodek et al., 2000). La OPN también se encuentra asociada con el desarrollo de los osteoclastos y macrófagos y constituye un importante factor en el remodelado óseo (Khaless et

al., 2014). Durante la mineralización normal del hueso, la osteopontina de los osteoclastos inhibe la formación de hidroxapatita (Hunter et al., 1996) al iniciar el proceso por el cual los osteoclastos desarrollan el borde en cepillo para iniciar la resorción ósea. La asociación entre expresión de OPN y la formación de cristales sugieren una función en los procesos de mineralización inhibiendo el crecimiento de cristales (Sodek et al., 2000). Se ha sugerido que la OPN incrementa la supervivencia de los osteoclastos y la resorción ósea mediante activación de NFTA (calcium-nuclear factor of activated T cells), lo cual se ha relacionado con la supervivencia de los osteoclastos y la resorción ósea (Tanabe et al., 2011).

Los niveles plasmáticos de OPN se han encontrado asociados con diversos procesos inflamatorios. Se ha observado que juega un importante y conflictivo papel en el sistema inmunitario pudiendo actuar como pro y anti-inflamatorio en respuesta a daños en los tejidos (Denhardt et al., 2001). La expresión de OPN también ocurre tras la exposición de células a citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), interleucina IL-1 $\beta$  (IL- $\beta$ ), IL-2, IL-3, NO, angiotensina II, factor de transformación de los fibroblastos  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Los mecanismos moleculares que regulan la expresión de la OPN en los macrófagos durante la inflamación no es bien conocido (Kahles et al., 2014).

Se ha demostrado que la expresión de OPN incrementa el potencial invasivo de las células cancerígenas y juega un importante papel en la progresión del cáncer (Sudhir et al., 2012). La osteopontina se encuentra sobreexpresada en tumores humanos y con frecuencia correlaciona con la agresividad de los tumores (Denhardt et al., 2001). Se ha sugerido que la OPN promueve la metástasis al incrementar el crecimiento del tumor, la migración celular y la degradación de la matriz extracelular (Boudjadi et al., 2013). Además, se ha mostrado crítica en la metástasis de los cánceres de mama, colon e hígado (Li et al., 2013). Su aparente capacidad para incrementar la supervivencia celular por inhibición de la apoptosis, podría explicar por qué la metástasis de las células tumorales incrementa cuando incrementa la expresión de la OPN (Sodek et al., 2000; Denhardt et al., 2001). Actualmente se ha mostrado que puede ser un útil biomarcador para indicar la

progresión de múltiples tipos de cáncer (Shevde y Samant, 2014). La osteopontina también se ha asociado con la diabetes, aunque su rol no está del todo claro, algunos autores apuntan a un aumento de la susceptibilidad frente al desarrollo de diabetes tipo 1 (Khaless et al., 2014).

### **2.3.2. Funciones fisiológicas del calcio**

Las funciones del calcio se pueden englobar en diferentes tipos:

#### a) Estructural

Como se acaba de comentar, el calcio es un compuesto clave en la configuración estructural del hueso y dientes, representando este papel el 99% del total corporal como ya se ha indicado.

#### b) Mensajero intracelular

El calcio es uno de los más conocidos mensajeros intracelulares, ya que controla un amplio rango de procesos celulares. El radio iónico del calcio y su capacidad para formar enlaces de coordinación (reversibles) con hasta doce átomos de oxígeno (como por ejemplo de los aminoácidos glutámico y aspártico), le permite localizarse en los pliegues de cadenas peptídicas, interactuando con ellas y haciendo posible la activación de funciones específicas de las correspondientes proteínas. Algunas proteínas relacionadas con el calcio son: Calbindina (participa en el depósito y transporte de Ca), calmodulina (regulación de proteínasas), Fosfolipasa A (síntesis de ácido araquidónico), proteínasa C (fosforilación de proteínas), troponina C (contracción muscular). Existen diversas funciones adscritas al calcio, como la excitabilidad nerviosa, la contracción muscular, movimientos y adhesión celular, secreciones glandulares, procesos de división celular y transcripción genética. El mecanismo de acción del calcio sería el de participar como un transmisor de la información desde el exterior al interior celular, y como un activador de proteínas funcionales. El calcio implicado en este mecanismo sería el calcio ionizado, que es el transmisor biológico de señales más común (Salido, 2009; Feno et al., 2019)

### *Situación de reposo celular*

En reposo muchas células requieren calcio para, debidamente activadas, llevar a cabo su función. El catión a nivel citosólico debe estar a una concentración extremadamente baja, puesto que en caso contrario la activación simultánea de proteínas funcionales dependientes de calcio podría conducir a la disfunción o muerte celular. La concentración del calcio iónico citosólico es de aproximadamente 0,1 mmol, que es diez mil veces inferior a la que existe a nivel extracelular, lo cual es posible por diversos mecanismos:

- Limitada permeabilidad para el calcio de la membrana plasmática.
- Eliminación del catión desde el citosol por expulsión al exterior celular mediante una bomba ligada a una ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$  1b, que es activada por una calmodulina intracelular que a su vez se estimula por calcio y se inhibe cuando disminuyen los niveles citosólicos del mismo. También se reducen los niveles citados secuestrando el calcio en orgánulos celulares, concretamente el retículo endoplásmico/ retículo sarcoplásmico en músculos, merced también a una bomba activada por una ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$  1b y la mitocondria mediante el transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Existen a su vez otros mecanismos que actúan sobre el flujo de calcio iónico a través de la membrana plasmática, pero son al parecer de menor trascendencia que los acabados de describir.

### *Situación de activación*

La activación celular se produce por diferentes tipos de estímulos internos o externos (físicos, químicos, eléctricos), como puede ser una hormona o un neurotransmisor al interactuar con un receptor o una proteína G de membrana. Esto puede permitir la entrada de calcio desde el líquido extracelular al interior celular, a través de canales específicos para el catión no dependiente del voltaje y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , elevando los niveles de calcio citosólico (Figura 12). Además, las células excitables contienen canales específicos de calcio en la membrana plasmática dependientes del voltaje, que se genera en las mismas. De esta manera el calcio entra en gran cantidad en el interior celular. El calcio que alcanza el citoplasma en esta situación, también puede proceder de orgánulos celulares como retículo endoplásmico/ retículo

sarcoplásmico a través del receptor de trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>R) o la mitocondria mediante el intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> y el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) (Görlach et al., 2015).

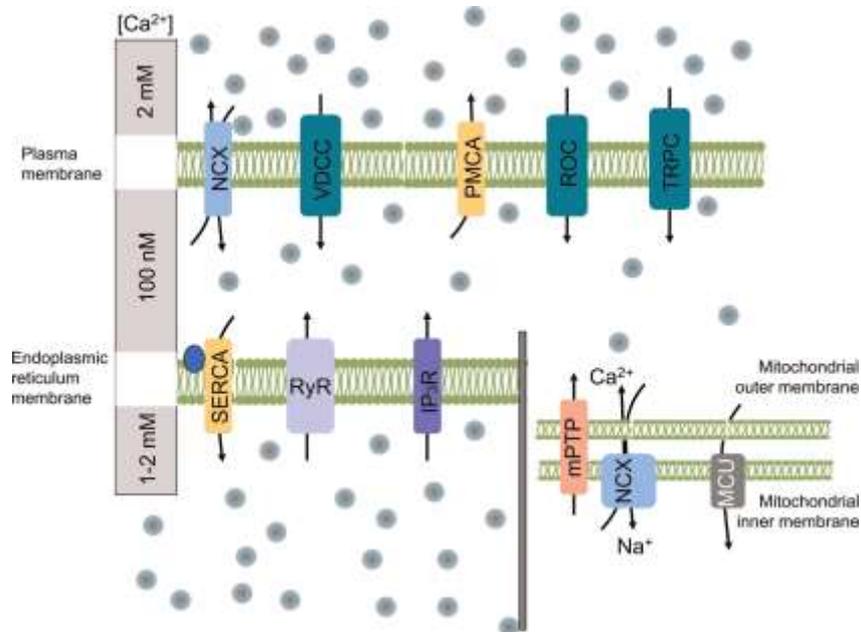


Figura 12. Transporte de calcio en la membrana plasmática, retículo endoplásmico membrana mitocondrial. NCX – intercambiador sodio-calcio; VDCC – canales voltaje-dependientes de calcio; PMCA –Calcio-ATPasa; ROC – receptor de canales; SERCA –ATPasa del retículo sarco/endoplásmico ;IP<sub>3</sub>R– receptor del trifosfato de inositol; mPTP – poro de permeabilidad transitoria mitocondrial; MCU – uniporte mitocondrial de calcio (Tomado de Görlach et al., 2015).

### c) Cofactor proteico

El calcio es asimismo un cofactor de proteasas diversas que estabiliza y potencia su actividad entre las cuales se encuentran la gliceraldehido deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y α-cetoglutarato deshidrogenasa. Asimismo es un cofactor fundamental para la actuación de diversos factores de coagulación (Stipanuk, 2006).

### 2.3.3. Metabolismo del calcio

#### Absorción

La absorción de calcio dietético tiene lugar a nivel intestinal y depende de algunos factores como la edad, la cantidad ingerida, la presencia de

compuestos dietéticos como la lactosa y ciertos aminoácidos, o la concentración en plasma de ciertas hormonas, como la vitamina D, que favorecen su absorción; o por el contrario de la existencia de otros como oxalatos y fitatos que la dificultan. Atendiendo a estas consideraciones, la absorción total puede ir del 25 al 70%. Durante el período de crecimiento (período de formación de masa ósea) la absorción alcanza hasta el 75%, mientras que en los adultos disminuye al 30-60%. Otros factores, como la práctica de ejercicio físico regular, estimulan la absorción intestinal y el depósito de calcio en el hueso, mientras que la pérdida de masa ósea se ve favorecida por el sedentarismo.

El calcio se absorbe por el epitelio intestinal o bien a través de la célula (vía transcelular) o bien también entre las células (vía paracelular).

El transporte transcelular (Figura 13) es un proceso activo saturable, que se encuentra finamente regulado, localizándose en el intestino proximal, principalmente duodeno y yeyuno proximal. Probablemente el calcio entra en las células duodenales mediante canales dependientes de vitamina D (elementos vitamina D dependientes capaces de fijar calcio). En este sentido se ha identificado en la membrana en cepillo dos miembros de la subfamilia de proteínas V capaces de fijar calcio dependiente de vitamina D (TRPV6/5). La entrada se realiza a favor de un gradiente electroquímico de tal manera que probablemente esta proteína no sea un factor limitante en el transporte de calcio transcelular. Una vez que el calcio ha penetrado en el enterocito, éste difunde a través del interior celular hasta la membrana basolateral, donde tiene lugar su salida. La difusión intracelular de calcio se lleva a cabo mediante una proteína citosólica fijadora de calcio (CaBP: Calcium Binding Protein) denominada calbindina D9K, estando aquella difusión en proporción directa a la cantidad de la CaBD, otras proteínas ligandos como la calmodulina también podrían participar en menor grado. La hormona D regula asimismo la síntesis de calbindina D9K a través de la transcripción de DNA, una vez fijada aquélla a los específicos receptores nucleares. La salida del calcio de la célula por la membrana basolateral se lleva a cabo contra un gradiente químico y es realizada por una ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$  1b (PMAC<sub>1b</sub>), también al parecer dependiente de la hormona D. Además de la ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$ , muchas células contienen

intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , pero este sistema no se encuentra tan ampliamente distribuido como el anterior en las células duodenales. Existen algunas evidencias de que el  $\text{Ca}^{2+}$  también puede ser transportado a través de la célula mediante vesículas (endosómicas y lisosómicas) y salir de la célula mediante exocitosis (Figura 13). Además, los canales de calcio voltaje dependientes tipo-L subtipo 1.3 ( $\text{Ca}_v1.3$ ) también participan en la captación intestinal de  $\text{Ca}$  en presencia de nutrientes despolarizantes en el lumen como glucosa o galactosa y algunos aminoácidos (Wongdee et al., 2018).

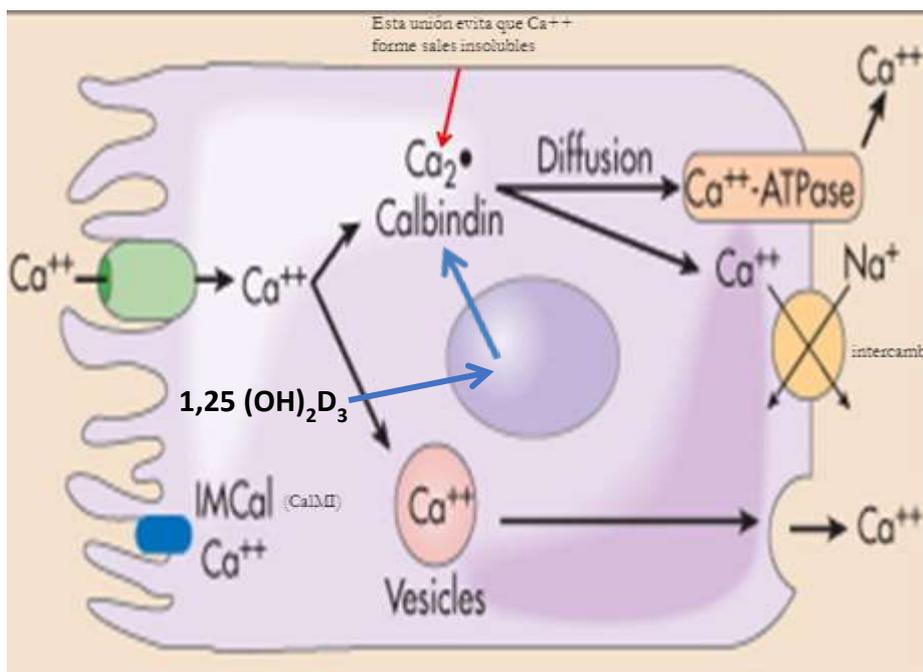


Figura 13. Transporte transcelular de calcio (Modificado de Tortora y Derrickson, 2016)

La segunda ruta de absorción es el transporte paracelular, este permite el paso de calcio por los espacios intercelulares. Esta ruta de transporte puede ser pasivo (dependiente de gradiente) o activo (dependiente de energía). En este último caso la energía es generada por una salida sodio desde los enterocitos lo que crearía un espacio hiperosmótico en el espacio paracelular que ocasionaría una difusión de agua (corriente de agua) desde el lumen al plasma arrastrando las pequeñas moléculas permeables incluido el calcio. En cuanto al transporte paracelular pasivo el transporte de calcio se encuentra dirigido por el gradiente de concentración entre el lumen y el plasma y participa

fundamentalmente cuando existen altas ingestas de catión. Este transporte también viene determinado por el tamaño y las propiedades de la carga selectiva de las uniones apretadas, que crean barreras específicas al ión. Las claudinas son la mayor familia de proteínas asociadas a las uniones apretadas. Las claudinas -2, -12 y -15 tienen un papel significativo en el transporte paracelular de calcio. La claudina -2 tiene aminoácidos cargados negativamente en el dominio extracelular que sobresale formando un poro. La claudina cargada negativamente es permeable a los cationes. Cuando se sobreexpresa el calcio es fácilmente permeable (Wongdee et al., 2018).

A bajas ingestas de calcio, el transporte activo o transcelular es el que actúa promoviendo la absorción del catión, pero cuando la ingesta aumenta y el citado mecanismo está saturado, el sistema utilizado es el paracelular. Algunas sustancias que incrementan la absorción de calcio como lactosa, aminoácidos (L-lisina), triglicéridos de cadena media o algunas sustancias anfipáticas como las sales biliares, actúan a través de esta vía paracelular (Stipanuk, 2006; Tortora y Derrickson, 2016).

La absorción del catión puede verse afectada por factores hormonales y dietéticos.

Entre los factores hormonales encontramos: La 1,25 dihidroxicolecalciferol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ), u hormona D, es un importante regulador de la absorción de calcio. Como anteriormente se ha comentado, el transporte transcelular requiere la actuación hormonal que incrementa la entrada de calcio en la célula. Asimismo, la síntesis de la proteína intestinal transportadora de calcio calbindina es hormona D dependiente y de la hormona también depende el aumento de la actividad de la ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$ . La hormona paratiroidea (parathormona o PTH) aumenta el transporte intestinal del catión, de manera indirecta, estimulando la síntesis del  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . La calcitonina no afecta el transporte intestinal de calcio. La cortisona y otros corticoides, a altas dosis, pueden disminuir la absorción del ión. Otras hormonas relacionadas con la citada absorción son la hormona del crecimiento y somatomedina, estrógenos (probablemente no actúen directamente), hormonas tiroideas, insulina y glucagón. Precisamente los aumentos de absorción en gestación y lactación se explican por la situación endocrina en estas dos condiciones fisiológicas.

Asimismo se explica en gran parte la menor absorción en la postmenopausia y en la edad avanzada. Recientemente se han descrito dos factores, el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF-23) y la estanniocalcina que disminuyen al absorción de calcio evitando la excesiva absorción de calcio en determinadas condiciones. El FGF-23 activa el receptor sensible al calcio (CaSR) lo que disminuye la absorción en el intestino delgado pero la incrementa en el intestino grueso. La estanniocalcina disminuye la expresión de los transportadores TRPV6/5 y de la calbindina (Stipanuk 2006; Tortora y Derrickson, 2016; Wongdee et al., 2018)

En relación a los factores dietéticos se ha sugerido que el fosfato y ciertos iones (sodio, potasio, estroncio, magnesio) disminuyen la absorción intestinal de calcio. Asimismo, se ha indicado la existencia de sustancias quelantes capaces de precipitar el mineral, disminuyendo la proporción de calcio disponible para ser absorbido, entre las cuales se encuentran los oxalatos y fitatos. El inhibidor más potente de la absorción del mineral es el ácido oxálico cuya función en el reino vegetal es precisamente fijar el calcio para impedir la muerte celular. En sentido contrario, mejorando la absorción, se encuentran azúcares (lactosa, sacarosa) y ciertos aminoácidos (lisina, arginina). El papel de la lactosa es controvertido pues parece que es cierto en lactantes, pero deja de favorecer en adultos. La calidad y cantidad proteica mejoran la absorción del mineral y la grasa sólo tiene un efecto reductor en el caso de esteatorrea al formarse jabones insolubles de sales cálcicas de los ácidos grasos. Además, el ejercicio físico realizado de forma regular estimula la absorción, mientras que el sedentarismo favorece la desmineralización del hueso (Mataix y Llopis, 2015; Wongdee et al., 2018).

### ***Distribución***

El calcio absorbido entra a formar parte del pool circulante extracelular, a partir del cual es captado por todos los tejidos del organismo, estableciéndose una especial relación con el hueso. El pool extracelular de calcio está en equilibrio con el pool óseo de tipo intercambiable (Figura 14).

La regulación homeostática del calcio plasmático se lleva a cabo de una manera muy exacta. Para ello se precisa de la actuación de varias hormonas que actúan a nivel del calcio intercambiable.

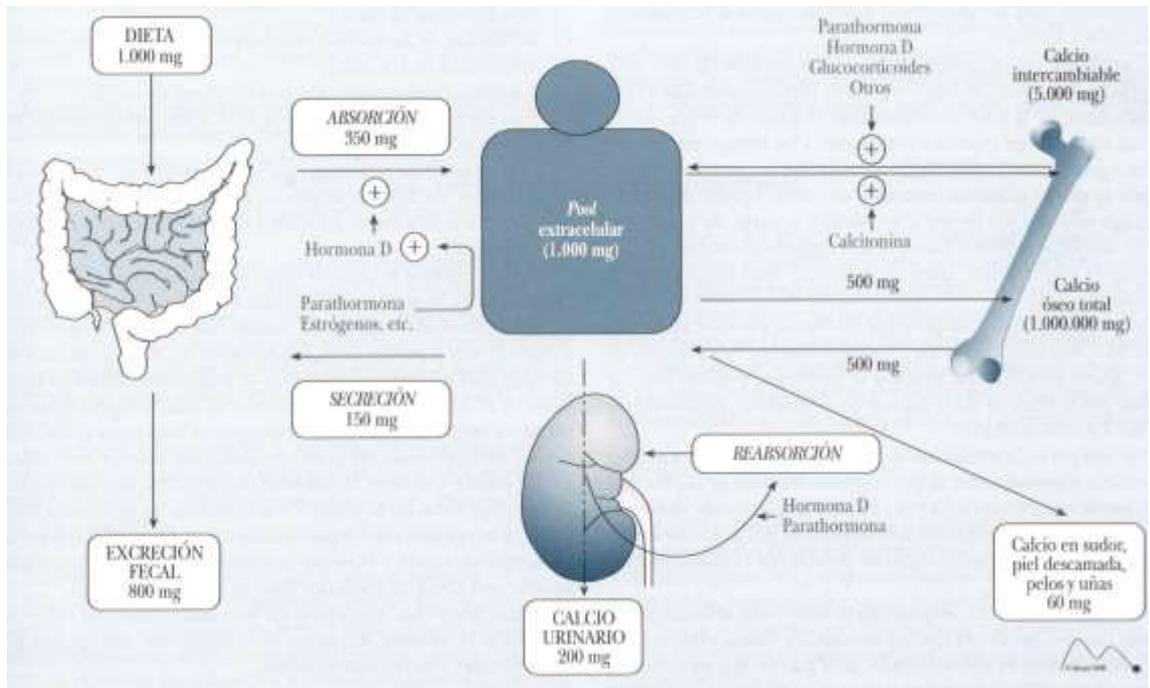


Figura 14. Balance corporal de calcio (Tomado de Mataix y Llopis, 2015)

Cuando la concentración de calcio plasmático disminuye se libera parathormona (PTH) que produce los siguientes efectos:

- Aumento del aclaramiento renal de fosfato, para no disminuir la relación Ca/P.
- Activación de la vitamina D para producir la forma activa u hormona D (1,25[OH]<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), que incrementa la absorción intestinal de calcio.
- Activación de las zonas de reabsorción ósea, con aumento de la actividad osteoclástica.
- Aumento de la reabsorción tubular renal de calcio.

Para estos dos últimos efectos la PTH actúa sinérgicamente con la hormona D.

El riesgo de una hipercalcemia se evita a través de la calcitonina, la cual reduce o detiene la actividad osteoclástica, disminuyendo la reabsorción ósea.

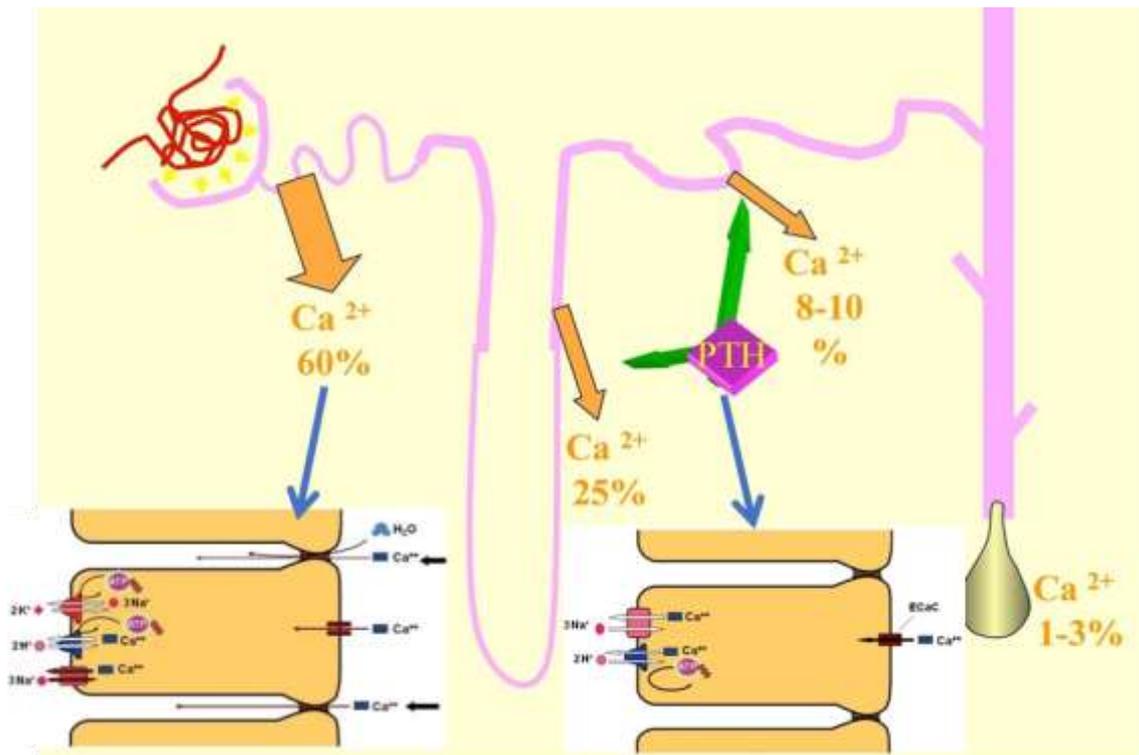
En la figura 14 se muestran las hormonas implicadas en la reabsorción y deposición de calcio. Otras hormonas implicadas en los movimientos del calcio del hueso son la insulina, hormona de crecimiento, estrógenos, glucocorticoides y hormonas tiroideas.

### **Excreción**

El calcio se excreta por vía renal y por vía gastrointestinal. La fracción de calcio de la dieta que no ha sido absorbida, responde al calcio fecal, así como restos celulares de la mucosa, jugos digestivos y bilis.

La cantidad de calcio filtrado a través del glomérulo renal está determinada por la tasa de filtración glomerular y la concentración plasmática de calcio ultrafiltrable (calcio ionizado más el unido a aniones de bajo peso molecular, no el unido a proteínas). Del calcio filtrado más del 98% se absorbe a nivel tubular renal, haciéndolo dos terceras partes en el túbulo proximal y el tercio restante en el asa de Henle, túbulo contorneado distal y túbulos colectores. El calcio no reabsorbido se excreta en la orina.

En el túbulo proximal el calcio del lumen de la nefrona es reabsorbido por vía paracelular mediante un mecanismo pasivo no bien establecido y en menor proporción por vía transcelular, lo cual implica una entrada en la célula mediante canales de calcio y salida fundamentalmente vía ATPasa  $\text{Ca}^{2+}$ . A nivel de la porción delgada del asa de Henle la reabsorción es mínima, mientras que en la rama gruesa ascendente hay un transporte fundamentalmente pasivo. En el túbulo contorneado distal la reabsorción se produce básicamente por transporte activo y en el colector por vía paracelular (Figura 13). La hormona  $\text{D}_3$  incrementa la reabsorción transcelular de calcio en el túbulo contorneado distal de manera análoga a como lo hace en el intestino, permitiendo la síntesis de la CaBP (calbindina D28K). Además de la vitamina D, el otro gran regulador de la excreción renal de calcio es la parathormona (PTH) que incrementa la reabsorción tubular del ión mientras incrementa la excreción de fosfato. El mecanismo podría ocurrir incrementando la síntesis de AMPc (Figura 15). Los estrógenos disminuyen la excreción del calcio (Stipanuk, 2006; Tortora y Derrickson, 2016).



*Figura 15. Excreción renal de calcio*

La proteína afecta al calcio óseo en dos sentidos. La deficiencia conduce a la descalcificación especialmente en la mujer y el exceso también, aunque los mecanismos en este caso son varios, destacando la acidez producida por el sulfato proveniente del metabolismo de aminoácidos azufrados. El calcio alimentario guarda una relación, que es de tipo exponencial, con el urinario, de forma que grandes variaciones en la ingesta conducen paralelamente a leves cambios en la excreción. Por otra parte la excreción urinaria está más afectada por la absorción de calcio intestinal que por la ingesta, de tal modo que cuanto más eficaz sea la absorción mayor será el cambio absoluto en el calcio urinario para una determinada ingesta de ese elemento. También existen pequeñas pérdidas a través del sudor, piel descamada, pelo y uñas (Mataix y Llopis, 2015).

### **2.3.4. Deficiencia**

Las causas más importantes por las que se produce deficiencia de calcio y desmineralización ósea son escaso aporte de vitamina D, insuficiente suministro de calcio a través de la dieta, excreción aumentada del catión,

relación Ca/P muy baja en la dieta y todos los factores que estimulan la secreción de la PTH. Los factores implicados en la desmineralización ósea progresiva con la edad son: disminución de la relación estrógenos/andrógenos, menor actividad física y el tipo de dieta consumida. El ejercicio físico realizado con regularidad a lo largo de la vida reduce significativamente las pérdidas de mineral a expensas del esqueleto óseo. Por el contrario, la ausencia de actividad física lleva consigo el incremento de la velocidad de desmineralización de los huesos. Aún no está claramente demostrado el mecanismo por el que ocurren estos hechos, pero de alguna forma deben influir PTH y calcitonina (Mataix y Llopis, 2015).

### **2.3.5. Toxicidad**

Una hipercalcemia no se produce por ingestión de alimentos y sólo ocurre por ingestión de grandes cantidades de calcio medicinal, generalmente tomado junto con sustancias alcalinas que elevan el pH urinario facilitando la precipitación de calcio a nivel renal. La hipercalcemia puede llegar a producir una pérdida importante de tono muscular, estreñimiento, poliuria, náuseas y finalmente confusión mental, coma y muerte. En cuanto a problemas de litiasis renal por ingesta excesiva de calcio, no ocurre prácticamente nunca salvo en casos muy concretos e individuos susceptibles. Cuando esa situación sucede se debe más bien y fundamentalmente a una gran excreción urinaria de calcio, en general producida por una reabsorción ósea aumentada (Mataix y Llopis, 2015).

### **2.3.6. Calcio y estrés oxidativo**

Es conocido que los oxidantes causan un rápido incremento de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma en muchos tipos de células. Este incremento parece deberse a la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares como el retículo endoplásmico/sarcoplásmico, así como como a la entrada desde el espacio extracelular a través de la membrana plasmática, dependiendo del tipo de oxidante y el nivel de estrés oxidativo. Se ha observado que un estrés oxidativo medio, causado por moderadas concentraciones de peróxido de hidrógeno solo incrementa la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico desde los depósitos intracelulares (retículo

endoplásmico/sarcoplásmico), mientras que un estrés oxidativo alto provoca una elevación del ión en el citosol desde depósitos intracelulares y espacio extracelular (Ermak y Davis, 2001; Salido, 2009). Por tanto, el papel del calcio como mensajero intracelular se encuentra afectado por el estrés oxidativo,

Las interacciones entre especies reactivas de oxígeno (ROS) y calcio son bidireccionales, los ROS pueden regular la misión intracelular del calcio, mientras que el calcio es esencial para la producción de ROS, activando enzimas que generan la formación de radicales libres. Sin embargo, estas interacciones son dependientes del tipo de célula y tejido, se han estudiado con profundidad en el tejido cardíaco y en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o Alzheimer (Görlach et al., 2015). Los oxidantes pueden atacar las membranas celulares originando peróxidos lipídicos que activan la fosfolipasa A<sub>2</sub>, y alteran la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> el cual, a la vez, modula la actividad de la fosfolipasa A<sub>2</sub> en las células endoteliales, proceso en el que se encuentra implicada la proteína quinasa C y el trifosfato de inositol. Además, los altos contenidos de Ca<sup>2+</sup> citosólico pueden activar otras enzimas que producen radicales libres como el óxido nítrico sintetasa. Por tanto, al elevar los contenidos citoplasmáticos de Ca<sup>2+</sup>, los oxidantes pueden aumentar la producción de oxidantes e incrementar los niveles de Ca<sup>2+</sup> (Salido, 2009; Ermak y Davis, 2001).

La mitocondria es un orgánulo que juega un papel fundamental en la producción de energía y en el control de muchos procesos incluido la muerte celular. La cadena transportadora de electrones, la mayor fuente de ATP en la célula, se encuentra acoplada con la producción de ROS que (Figura 5), mantenida en niveles fisiológicos por el eficiente sistema antioxidante de la mitocondria. Se conoce que rápidos cambios en los niveles de ROS, acoplados a funciones esenciales celulares, son fundamentales en los procesos de señalización celular. El calcio mitocondrial tiene en estos procesos un papel fundamental ya que participa en los estímulos de activación celular y producción de ROS, fenómeno que juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis celular en diversos tejidos (Görlach et al., 2015).

La concentración de calcio en la mitocondria es dependiente de la citoplasmática, esta depende del flujo del ión a través de los canales del

retículo endoplásmico/sarcoplásmico y de la membrana plasmática . En la mitocondria, en condiciones fisiológicas, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  promueve la síntesis de ATP al estimular las enzimas del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, el incremento de la tasa metabólica ocasionaría un mayor consumo de oxígeno, provocado por un incremento de la actividad de la cadena transportadora de electrones que conduciría a la génesis de ROS que son contrarrestados por la actividad del sistema antioxidante mitocondrial. También hay evidencias de que el estado metabólico de la mitocondria determina el efecto del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la formación de ROS en la misma. Cuando el potencial de membrana es alto, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  ocasiona un descenso en la generación de ROS. Sin embargo, cuando el potencial de membrana está próximo a la despolarización, se estimula la formación de ROS dependiendo de la carga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los cambios rápidos en el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico afectan de modo importante el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria aunque de una duración muy corta, equilibrado por la salida del catión. Sin embargo, en condiciones patológicas, donde las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se encuentran elevadas de forma sostenida, la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria resulta desmesurada y conduce a efectos como la activación del sistema uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, con la consiguiente saturación de los sistemas de salida de calcio, obteniendo como resultado cambios drásticos en el interior de la mitocondria (Figura 16).

La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria facilita el ensamblaje y apertura del PPTm, que permite el paso al citoplasma de moléculas de tamaño inferior a 1,5 kDa (factores pro-apoptóticos). La consecuente despolarización permanente de la membrana conduce a un descenso en la producción de ATP, descoplamiento de la fosforilación oxidativa, transporte inverso de electrones y reducción de  $\text{NAD}^+$  a NADH. Proceso que ocasiona un fuerte incremento de la producción de ROS.

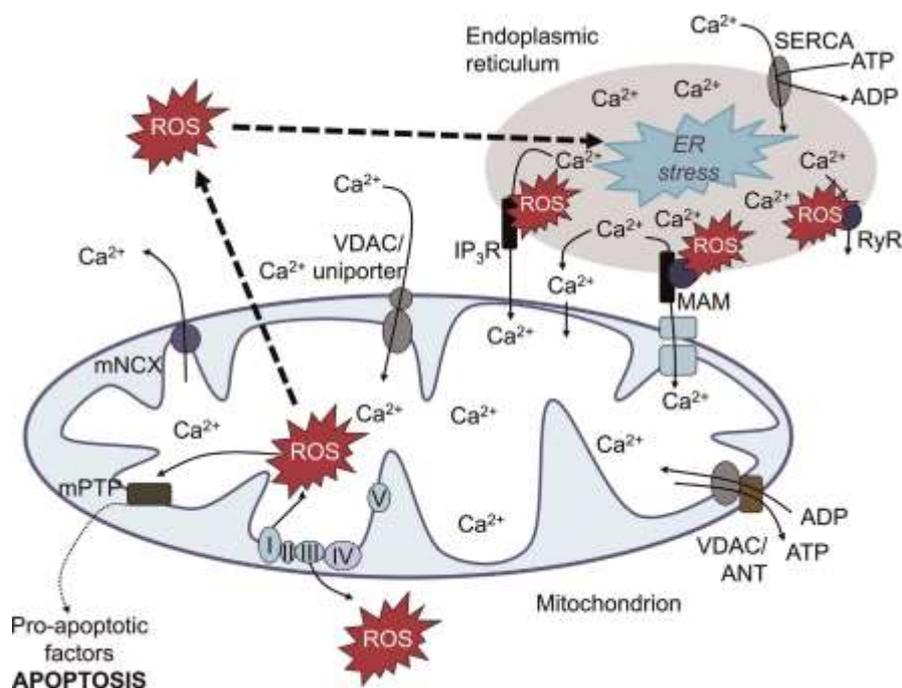


Figura 16. Interacciones  $\text{Ca}^{2+}$ -ROS entre el retículo sarco/endoplásmico y mitocondria. SERCA – retículo sarco/endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase; Receptor  $\text{IP}_3\text{R}$  –  $\text{IP}_3$  receptor del trifosfato de inositol; VDAC – canal voltaje-dependiente; ANT – transportador de adenina-nucleotido; mPTP – poro de permeabilidad transitoria; mNCCX – intercambiador mitocondrial sodium/calcio. (Tomado de Görlach et al, 2015)

Cuando el equilibrio redox se altera, debido a un alto acúmulo de ROS, se ven influenciadas un gran número de rutas de señalización celular, lo que conduce a una disfunción celular y al desarrollo de diversas patologías (cardiovasculares, musculares, neurodegenerativas, diabetes y cáncer). Por tanto, el calcio mitocondrial y los ROS son dos entidades funcionales que deben cooperar de modo coordinado, con el fin de contribuir a mantener la homeostasis celular (Görlach et al., 2015; Feno et al., 2019).

### 2.3.7. Calcio y diabetes

Se han observado alteraciones en la homeostasis del calcio como consecuencia de la diabetes, conduciendo a cambios en el metabolismo del hueso, tanto en humanos como en modelos animales. La osteoporosis es una de las complicaciones crónicas de la diabetes al reducirse el recambio óseo, la mineralización y la glucosilación del colágeno óseo (El-Maraghy y Mehana, 2015). Estudios sobre el metabolismo fosfocálcico han demostrado una

hipercalciuria, hiperfosfaturia e hipermagnesuria en pacientes diabéticos: No obstante, esta descompensación metabólica en la DM también se relaciona con el desarrollo de un hiperparatiroidismo funcional secundario (García, 2004).

Además existen otros mecanismos patofisiológicos relacionados con la diabetes tipo 2, como la resistencia osteoblástica a la insulina, fallos en la producción de factores de crecimiento osteogénicos, sobreproducción de citoquinas pro-inflamatorias, hiperglicemia y dislipemias, que también agravan la osteopatía diabética (Yan y LI, 2013). Además, la diabetes mellitus causa trastornos en la función de factores endocrinos relacionados con el metabolismo mineral como la hormona paratiroidea, la 1,25´dihidroxitamina D<sub>3</sub> y el factor de crecimiento fibroblástico-23. (Napoli et al., 2017)

Según se ha observado, este efecto negativo sobre el metabolismo del calcio, aparece tanto en la DM tipo 1 como en diabetes tipo 2, como consecuencia de una absorción intestinal de calcio alterada. La DM tipo 1, está asociada a una baja densidad mineral y a osteoporosis, mientras que los cambios esqueléticos en la diabetes tipo 2 son más variables, sin embargo, en ambas se ve comprometida la calidad ósea (ver apartado 1.1.7) (Wongdee y Krishnamra, 2017).

### **2.3.8. Interacciones calcio-vanadio**

El efecto que las sales de vanadio pueden tener sobre la absorción y excreción de otros elementos químicos sigue siendo un campo de estudio en constante evolución, ya que algunas de estas interacciones pueden resultar trascendentales a la hora de valorar el impacto que el tratamiento con vanadio tiene sobre el organismo.

Algunas de estas interacciones han sido estudiadas con bastante profundidad, y los resultados obtenidos han sido decisivos arrojando luz sobre el alcance real que las distintas sales de vanadio y los diferentes modos de administración tienen sobre la homeostasis de otros elementos.

Existe poca información sobre las interacciones que la exposición a vanadio produce sobre el metabolismo del calcio. En un estudio realizado en cobayas suplementadas con vanadio y ascorbato, se describe que éste hecho

tenía un impacto positivo en las concentraciones minerales óseas (Seaborn et al., 1991). La interacción entre el vanadio y la modulación en la acumulación de calcio celular, parece depender de la naturaleza de las especies de V formadas tras la disolución en el medio (Aureliano et al., 2005)

En otro estudio realizado en ratas STZ, se observó que la suplementación con compuestos de vanadio daba lugar a incrementos en el contenido de calcio en diversos órganos, aunque los mayores acúmulos correspondían al hierro. En el caso del calcio, las concentraciones fueron superiores en animales suplementados con vanadio que en los que no lo estaban. Siendo las ratas diabéticas tratadas con insulina las que presentaron los niveles más bajos de calcio y las ratas diabéticas tratadas con vanadio las que presentaron los niveles más altos, variando el estado de oxidación del vanadio en su influencia en la concentración de calcio (Krośniak et al., 2013a,b y 2014).

Estudios en los que se suministra metavanadato sódico a ratas, muestran que el vanadio incrementa el contenido de Ca en el hígado y bazo, lo disminuye en el riñón y no lo modifica en los hemisferios cerebrales (Scibior et al., 2014), y que no modifican el contenido de calcio en la diáfisis femoral, sin embargo, si se aprecia la existencia de interacciones V-Ca en este tejido (Scibior et al., 2018).

En relación a los niveles plasmáticos, en otro estudio realizado en cabras lactantes (Tripathi et al., 2019), encontraron un incremento de los niveles plasmáticos de calcio tras la suplementación dietética con complejos del vanadio. En este mismo estudio, atendiendo al balance mineral general se obtuvo como resultado que en aquellos animales cuya dieta había sido suplementada con vanadio, la retención de calcio estaba aumentada.

En suma, lo que parece claro es que el estatus de calcio en el organismo no permanece ajeno al efecto del vanadio. De hecho, parece existir una interacción clara entre los dos elementos en varios órganos, aunque no es todos los que se ha estudiado previamente esta relación. En general, parece existir una respuesta positiva entre los niveles de vanadio y los niveles de

calcio, viéndose los niveles de calcio aumentados cuando se produce una exposición al vanadio, con algunas excepciones.

Los efectos del vanadio sobre el metabolismo del hueso son tratados ampliamente en la revisión de Etcheverry et al., (2012), en la que se abordan con profundidad las interacciones del vanadio con la hidroxiapatita, matriz orgánica extracelular y células óseas, así como el mecanismo de acción y sus efectos osteogénicos en ratas diabéticas.

Otro punto relevante es la forma de administración del vanadio, reflejando la literatura existente que la naturaleza química de las especies de vanadio son determinantes a la hora de establecerse esa interacción entre vanadio y calcio, lo que actualmente se encuentra en el camino de una mayor clarificación y un mejor conocimiento con objeto de una utilización cada vez más eficiente.

## **2.4.- CINC**

### **2.4.1.- Contenido corporal**

La concentración de Zn en los tejidos blandos como músculo, cerebro, pulmón y corazón, es relativamente estable e independiente de los niveles en la dieta dentro de un amplio rango. Las concentraciones más altas de este catión se encuentran en la piel, cabello, uñas, retina y tejidos gonadales del varón. Los niveles plasmáticos de cinc se encuentran próximos a 100 µg/dL.

### **2.4.2.- Funciones**

La esencialidad del Zn viene determinada por su papel insustituible relacionado principalmente con sistemas enzimáticos de los procesos de división y multiplicación celular y con sistemas metabólico-hormonales de regulación (Olivares et al., 2010). Actualmente, se conoce que este elemento es un cofactor de alrededor de 3000 proteínas, implicadas en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, en los procesos de degradación y síntesis de ácidos nucleicos, en el transporte del dióxido de carbono y en muchas otras reacciones. Asimismo, al formar parte de diferentes deshidrogenasas, actúa en los mecanismos de desintoxicación corporal del

alcohol etílico a través de la enzima alcohol deshidrogenasa. El cinc también participa en la síntesis hepática de la proteína transportadora de retinal, y en el metabolismo de la vitamina A (posibilitando la conversión de retinol en retinal y viceversa). Puede afectar a la unión de proteínas a las membranas, lo cual se acompaña de una redistribución celular del ion en los microsomas y citosol con incremento de la actividad de la proteincinasa C. Este papel bioquímico podría explicar su importante papel en la regulación de las señales de membrana celular posreceptor. También juega un papel importante en la estabilización de membranas celulares (Chesters, 1997; Maret, 2013a; Mataix y Llopis, 2015).

El cinc participa en la supresión de radicales libres en las células, una vez iniciada la formación de peróxidos, ya que se requiere junto con el cobre para que la enzima superóxido dismutasa (SOD) actúe eficazmente eliminando los aniones superóxido. La (Cu/Zn)-SOD se encuentra localizada en el citosol y en menor cantidad en el núcleo. En la (Cu/Zn)-SOD, el cinc juega un papel principalmente estructural, confiriendo estabilidad a la proteína, mientras que el cobre constituye el centro catalítico, de modo que las formas libres de Zn mantienen una alta actividad catalítica (Figura 17). Además, diferentes metales como  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ , pueden sustituir al cinc con modestos efectos sobre la actividad catalítica de la enzima (D'Orazio y Battistoni, 2013)

Existen evidencias de que las ARN polimerasa I, II y III son enzimas dependientes de cinc. Los efectos del ion sobre la síntesis proteica podrían ocurrir a través de cambios en la actividad de estas enzimas. La dependencia del cinc en el control de la transcripción genética también puede explicarse a través de los factores de transcripción dependientes del metal. En este sentido se ha puesto de manifiesto que las concentraciones nucleares de cinc reflejan la ingesta dietética (Chesters, 1997).

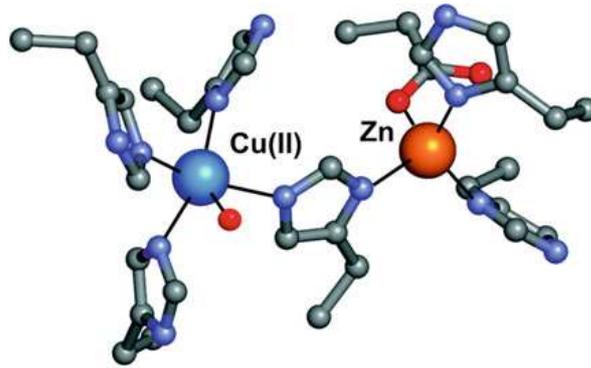


Fig. 17.- Esquema de la Cu-Zn SOD (Tomada de: Maret, 2013a)

A nivel del sistema inmune, el déficit de cinc eleva los niveles plasmáticos de glucocorticoides, lo cual puede tener importantes efectos adversos sobre los componentes del sistema inmune. Así, el aumento en los citados niveles de corticosterona originada por el déficit de cinc causa depleción de células B de la médula ósea y atrofia del timo. Como consecuencia de ello, se produce una disminución de la capacidad de respuesta mediada por células y anticuerpos (Haase y Rink, 2013).

En el crecimiento y multiplicación celular está involucrado en sistemas enzimáticos como, deoxitimidin kinasa, ribonucleótido reductasa, adenosintetrafosfato adenosina sintasa, etc. Pero el punto que establece la relación con el crecimiento corporal parece estar en la regulación hormonal del crecimiento celular. Participa en la actividad de la IGF-1, así como de prolactina (Olivares et al., 2010). Aunque forma parte de la estructura de la insulina, no hay evidencias claras que muestren una alteración de esta hormona ante una deficiencia nutricional de Zn. También se ha demostrado que el cinc participa en el mantenimiento de la integridad de la retina (Chesters, 1997; Olivares et al et al., 2010; Mataix y Llopis, 2015).

El cinc se describe frecuentemente como un antioxidante. Sin embargo, este catión no puede ejercer tal función directamente, ya que su estado redox no cambia en las células y permanece siempre como  $Zn^{2+}$ , por lo que el término pro-antioxidante puede ser más apropiado (Maret, 2008). El cinc actúa como pro-antioxidante en un rango de concentraciones. La deficiencia y sobrecarga de cinc son condiciones pro-oxidantes. Estos hechos nos ponen de

manifiesto la importancia del mantenimiento de las concentraciones intracelulares de cinc. Los efectos pro-antioxidante del Zn parecen ser debidos a su capacidad para unirse y proteger a los grupos sulfhidrilo (R-SH) frente a la oxidación, compitiendo con iones metálicos de transición y suprimiendo la producción de radicales libres e induciendo la expresión genética de enzimas antioxidantes. La deficiencia de Zn compromete estas funciones y en consecuencia ocasiona una situación pro-oxidante. Las elevadas concentraciones de Zn inhiben a los enzimas antioxidantes y la cadena respiratoria mitocondrial, lo que da lugar a un incremento en la formación de radicales libres. Los umbrales que determinan las concentraciones de Zn que afectan a su función como pro-antioxidante y como pro-oxidante, no se encuentran bien establecidas (Maret, 2013a).

### **2.4.3. Metabolismo del cinc**

#### **Absorción.**

El cinc de los alimentos se encuentra asociado fundamentalmente con proteínas y ácidos nucleicos, lo que requiere de un normal proceso digestivo (gástrico y pancreático), para que una vez liberado, pueda estar disponible para la absorción correspondiente.

El cinc se absorbe fundamentalmente en el intestino delgado, aunque no existe consenso sobre la contribución relativa de los diferentes segmentos del mismo en este proceso. La absorción aparente del cinc oscila del 20 al 50%, según el tipo de dieta, y tiende a disminuir con la edad. Actualmente se acepta que en la absorción de cinc participan dos procesos: El transporte activo (Figura 18), que es un mecanismo saturable a altas concentraciones intraluminales de cinc y se encuentra incrementado a bajas ingestas del mineral. La vía de absorción es de tipo transcelular. Se han propuesto varios tipos de transportadores para la absorción de cinc, correspondientes a las familias ZIP1-14 (codificado por *SLC39A1-14*), ZnT1-10 (codificada por *SLC30A 1-10*) y DMT1(familia Nramp) (Jansen et al., 2009; Espinoza et al., 2012; Chabosseau y Rutter, 2016; Nishito y Kambe, 2018). Los ZIP se encuentran localizados en la membrana apical e importan cinc a través de la membrana plasmática al citoplasma. Su presencia incrementa cuando existe

deficiencia de cinc y disminuye en las situaciones de normalidad (Maret, 2013a).

El transportador de metales divalentes-1 (DMT1) se encuentra localizado en un amplio número de tejidos, destacando duodeno, yeyuno, riñón y medula ósea. Este transportador participa permitiendo la entrada de cinc en los enterocitos (Gunshin H et al., 1997). Los mecanismos de transporte de cinc en el enterocito, desde la membrana apical a la basolateral, no son bien conocidos. Se ha propuesto otro transportador, el ZnT1 como responsable de la salida del cinc en la membrana basolateral, otros miembros de la familia de transportadores ZnT (ZnT2-ZnT8) se encuentran asociados a la captación de cinc a nivel de vesículas intracelulares (Maret, 2013a).

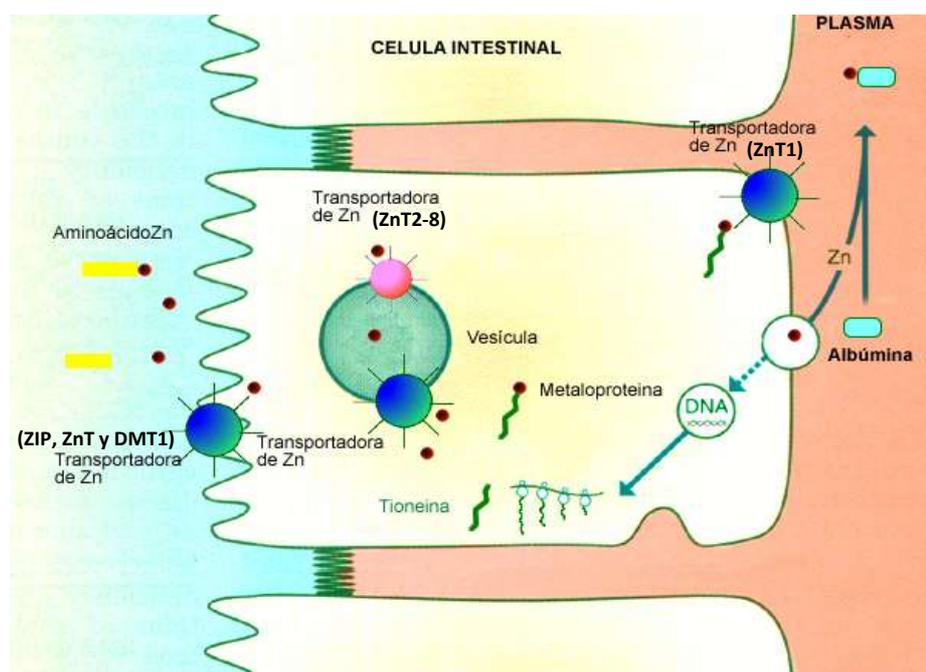


Figura 18. Absorción intestinal de Zn; ZIP, ZnT Y DMT1, familias de transportadores que participan en el proceso (Modificado de Diccionario ilustrado de términos médicos. <https://www.iqb.es/nutricion/zinc/zinc.htm>).

El cinc procedente del intestino puede unirse a diferentes especies moleculares en el enterocito, estando bien identificadas las metalotioneínas (MT). Estas proteínas de bajo peso molecular, son ricas en cisteína (30%) y

pertencen al grupo más abundante de proteínas intracelulares que unen cinc en las células eucariotas (Olivares et al., 2010, Maret, 2013a). La expresión del gen de la MT se encuentra directamente correlacionada con la ingesta de cinc. Esta proteína actúa como un ligando que amortigua la absorción del mismo. Actualmente se conoce que la expresión de MT viene determinada por el estatus corporal del cinc. En una situación de déficit, las bajas concentraciones de MT en las células de la mucosa, permitirán una mayor absorción. La corrección del estatus deficitario de cinc daría lugar al fenómeno opuesto y, por tanto, a un descenso de la absorción (Chesters, 1997).

El cinc también se absorbe mediante difusión, mecanismo no saturable, en donde la absorción que es proporcional a la concentración intraluminal de cinc parece llevarse a cabo por transporte paracelular. Los mecanismos descritos han conducido a algunos autores a afirmar que el intestino constituye el principal órgano regulador en el mantenimiento del balance de cinc (Chesters, 1997).

Existen diversos factores que afectan a la absorción intestinal de cinc, los cuales podrían agruparse fundamentalmente en dos:

- *estatus del cinc en el organismo*. La cantidad de cinc absorbida depende de las necesidades corporales del catión, lo cual puede estar mediado por mecanismos complejos de tipo hormonal o semejante. En este sentido, se ha descrito que las prostaglandinas pueden modificar la absorción del catión, y así la prostaglandina E2 (PGE2) parece incrementarla, mientras que la PGF2 tendría un efecto inhibitorio;

- *factores alimentarios*. El cinc puede unirse a ligandos exógenos que, mejorando su solubilidad o a través de otros mecanismos, incrementan o no su absorción. Algunos componentes de la dieta como la fibra y los fitatos, muy abundantes en alimentos elaborados a base de cereales integrales, disminuyen su absorción. En general, el cinc procedente de vegetales es menos disponible que el proporcionado por alimentos de origen animal, fundamentalmente debido a la presencia de ácido fítico en aquellos que forma complejos insolubles que no son absorbidos en el tracto gastrointestinal. Determinados minerales pueden alterar la absorción de cinc, como el hierro

inorgánico a dosis farmacológicas. El cobre y el calcio parecen tener poco efecto sobre la absorción del metal, aunque los suplementos de calcio pueden incrementar las pérdidas intestinales del mismo. Las interacciones entre distintos minerales pueden ser uno de los factores que más influencia tenga en la disponibilidad del cinc. Así, se ha observado que algunos preparados infantiles fortificados con hierro y no suplementados con cinc han dado lugar a retrasos en el crecimiento y que la suplementación con altas dosis de hierro durante el embarazo puede modificar los niveles plasmáticos de cinc (Mataix y Llopis, 2015).

### ***Distribución***

El cinc liberado desde las células intestinales en los capilares mesentéricos es transportado por la sangre al hígado, siendo la albúmina la proteína transportadora más importante en la sangre portal. La concentración plasmática de albúmina puede, en parte, determinar su absorción al afectar la proporción de catión transferido desde los enterocitos. Existen otros componentes del plasma que contienen cinc, como la  $\alpha_2$ -macroglobulina, transferrina, y una glicoproteína rica en cisteína. Aunque se conocen diferentes tipos de transportadores en las células endoteliales, la captación de albúmina por endocitosis parece ser el mayor mecanismo de internalización, ya que el cinc circula en el plasma en alta proporción unido a la albúmina (Figura 18) (Olivares et al., 2010).

Los diferentes tejidos captan de la sangre cantidades variables del catión, siendo el hígado el que presenta una mayor captación, seguido del hueso, la piel, el riñón y el timo. La incorporación tisular de cinc se encuentra influenciada por diversos factores como la ingesta del ion y los glucocorticoides. Éstos disminuyen los niveles plasmáticos (aumentan el aclaramiento plasmático) e incrementan la captación hepática. La ingesta de cinc, glucocorticoides e interleucinas 1 y 6 incrementan la expresión del gen de la metalotioneína, concomitantemente con la depresión plasmática del ion. El estrés, la inflamación y los procesos agudos dan lugar a una redistribución del cinc corporal mediante la secreción de citoquinas (fundamentalmente interleucinas 1 y 6) (Mataix y Llopis, 2015) .

Como se ha comentado en el apartado sobre la absorción, se conocen tres familias de proteínas transportadoras: las ZIP, las ZnT y el grupo Nramp2 (más conocido como DMT1, DCT1 y SLC11A2) (Ghio et al., 2005) . Se han caracterizado 14 transportadores ZIP en mamíferos (ZIP1- ZIP14) para el transporte de cinc al citosol desde el medio extracelular o desde los compartimentos intracelulares (Zip 7, 9 y 13). En cuanto a los transportadores ZnT, se han identificado diez (ZnT1-ZnT10) y éstos se encargan de facilitar la salida de cinc desde el citosol al exterior o a compartimentos celulares. El cinc en las células se une a MT, proteína que presenta múltiples isoformas en el humano. La MT es rápidamente inducida en hígado, riñón, páncreas e intestino por exposición a altas dosis de metales pesados, particularmente cinc y cadmio (Maret, 2013a).

### ***Excreción***

A diferencia de lo que sucede con otros iones, el cinc no se almacena en el organismo y el exceso es eliminado del cuerpo. La excreción del mismo se realiza vía fecal a través de la secreción pancreática, biliar, mucosal y asimismo por células mucosales descamadas. Esta secreción endógena puede llegar a representar la mitad del contenido en el lumen, encontrándose una parte unida a distintas enzimas digestivas. Las pérdidas superficiales por descamación, crecimiento del cabello o sudor también contribuyen a la excreción del cinc. En condiciones normales, la excreción urinaria es pequeña, en ella participan las familias de transportadores descritos anteriormente, localizados en los túbulos renales (Davenport, 2015). Las pérdidas renales pueden incrementar de modo importante en las enfermedades que dan lugar a un excesivo catabolismo muscular o proteinuria por disfunción renal (Chesters, 1997).

La homeostasis del cinc está regulada fundamentalmente por cambios en la absorción, aunque también por la excreción, en respuesta a las distintas ingestas dietéticas. Durante los períodos de bajas ingestas, el mantenimiento de la homeostasis se debe tanto al incremento de la absorción como a una reducción de la excreción urinaria y endógena fecal mientras que, frente a altas

ingestas, en la regulación de la homeostasis juega un papel primordial el aumento de las pérdidas endógenas.

#### **2.3.4. Deficiencia**

Una deficiencia moderada de cinc se ha asociado a una amplia variedad de condiciones como el déficit nutricional, síndrome de malabsorción, enfermedad hepática por alcoholismo, insuficiencia renal crónica y síndrome de debilidad crónica. La deficiencia de Zn también puede encontrarse originada por un incremento de su excreción en las enfermedades inflamatorias, como la diabetes o la hepatitis o por la edad (Haase y Rink, 2013).

Además, existen dos enfermedades con base genética relacionadas con la deficiencia de cinc. La acrodermatitis enteropática, enfermedad en la que esta alterada la absorción y metabolismo de cinc. La segunda es la alteración que tienen algunas madres para concentrar cinc en la leche materna, con lo cual los hijos alimentados al pecho de forma exclusiva presentan síntomas de deficiencia nutricional de cinc.

Los estudios realizados en muchachos jóvenes de Irán y Egipto (1960) pusieron de manifiesto que la deficiencia de cinc daba lugar a anorexia, reducción del crecimiento y alteraciones en la maduración sexual.

La deficiencia nutricional de cinc, en los países desarrollados, es una causa importante en la presencia de infecciones y parasitismos, conduciendo a una importante pérdida de calidad de vida con la edad (Rink, 2011). El hecho de que la deficiencia de cinc se encuentre asociada a un incremento en la frecuencia de infecciones, indica que este metal participa de un modo importante en el mantenimiento del sistema inmune (Haase, 2008). Diversas publicaciones han puesto de manifiesto que la deficiencia de Zn conduce a una reducción de la fagocitosis y que se corrige con la suplementación. In vivo, se ha observado que la deficiencia de este elemento conduce a un incremento de citoquinas proinflamatorias (IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ ) en ausencia de patógenos y que la producción de estas citoquinas empeora durante la infección. Se ha sugerido que la desregulación en la producción de citoquinas con la edad avanzada podría normalizarse con la suplementación de cinc. La formación de anticuerpos en respuesta a la vacunación empeora en la deficiencia del metal,

aunque, actualmente los estudios sobre suplementación con Zn son incapaces de demostrar que esta mejora la respuesta a las vacunas. Recientes estudios han indicado que el cinc podría actuar como un señalizador en las células inmunes, de modo similar a un segundo mensajero y cambios en su concentración iónica intracelular, podría regular un alto número de funciones en el sistema inmune (Haase y Rink, 2013)

Adicionalmente se ha observado otros síntomas, producidos por la carencia del catión como lesiones cutáneas (orales , anales y genitales), diarrea, pérdida del cabello, pérdida del sentido del gusto, alteraciones de la olfacción, ceguera nocturna, cicatrización lenta de heridas, alteraciones del desarrollo psicomotor, etc.

En personas con quemaduras o alteraciones renales suelen producirse déficit de cinc, y asimismo es posible encontrar deficiencias en individuos sometidos a nutrición parenteral o hemodiálisis.

Las personas que consumen dietas ovo-lacto-vegetarianas son un grupo de riesgo de deficiencia de Zn. Estas dietas tienen un alto contenido en fitatos que dificultan su absorción intestinal. Los niños con este tipo de alimentación se encuentran en especial riesgo de deficiencia de este elemento (Olivares, 2010, Maret, 2013a, Mataix y Llopis, 2015).

### **2.3.5. Toxicidad**

Desafortunadamente se dispone de pocos datos sobre el exceso del mismo. Dada la distribución del cinc en alimentos y en otros productos potencialmente tóxicos, es poco frecuente el exceso de cinc. Se han comunicado casos aislados de ingestas excesivas del catión con signos clínicos digestivos (vómitos, diarreas).

El principal efecto tóxico parece ser el resultado de la interferencia con el cobre, dando lugar a anemia por deficiencia de cobre. Erosión gástrica, caída de la función inmune y reducción del colesterol-HDL plasmático, alteraciones gustativas (sabores metálicos), dolor de cabeza, náuseas, vómitos, también pueden ser el resultado de un exceso de cinc.

Se han observado intoxicaciones por cinc como resultado del consumo de alimentos (frutas y bebidas) preparadas en recipientes galvanizados, por cesión del metal a partir de los mismos (Olivares, 2010, Mataix y Llopis, 2015).

### **2.3.6. Cinc y diabetes.**

El cinc juega un papel clave en la síntesis y acción de la insulina, tanto fisiológica como en la diabetes mellitus (Rossetti 1990).

Las interacciones entre cinc y diabetes en diferentes estados de la enfermedad son obvias. Ejemplo de estas interacciones incluyen la función del cinc en un alto número de proteínas relevantes para la enfermedad (insulina, fosfatasas, proteinasas, dehidrogenasas, factores de transcripción, transportadores y metalotioneinas). La relación entre cinc y diabetes se conoce desde hace mucho tiempo, pero no se le ha prestado atención hasta las últimas décadas. En 1930 se reconoció que el páncreas de los individuos diabéticos que sucumbieron a la enfermedad, solo contenía la mitad de cinc que un páncreas sano. También se ha documentado en muchas ocasiones la presencia de una cincuria significativa en diabéticos. Sin embargo, la deficiencia de cinc en la diabetes no es siempre evidente.

Las tres áreas en las que los estudios moleculares han relacionado intensamente el cinc con la diabetes son: a) el papel del cinc en la fisiología de las células  $\beta$  del páncreas; b) la cadena de señalización de la insulina en los tejidos periféricos; c) en el metabolismo redox (Chimienti et al., 2011).

#### ***Fisiología del cinc en las células $\beta$ pancreáticas***

El cinc se encuentra almacenado formando complejos en los gránulos de secreción de las células  $\beta$  del páncreas, en los que dos iones de cinc se unen por un hexámero de insulina (Figura 19).

El transportador ZnT8, que se expresa preferencialmente en las células pancreáticas, permite la incorporación del cinc a la insulina almacenada en los gránulos de secreción. Diversos investigadores han puesto de manifiesto una fuerte asociación entre una mutación en el ZnT8 y la presencia de DM2 (Tamaki et al., 2013; Chabosseau y Rutter, 2016). Además, se conoce que la proteína mutante es un autoantígeno en la DM1 (Rutter, 2010). También se ha

descrito que en ratones knock-out para el ZnT8 en las células  $\beta$  pancreáticas, disminuye el cinc en los gránulos de estas células, llegando a ser amorfos y provocándose la alteración la secreción de insulina. Actualmente, se conoce que otros transportadores de las familias ZnT (5, 6, 7) y Zip (6 y 9) participan en el metabolismo del cinc en las células  $\beta$  pancreáticas y se han asociado a DM2 (Maret, 2013b; Chabosseau y Rutter, 2016).

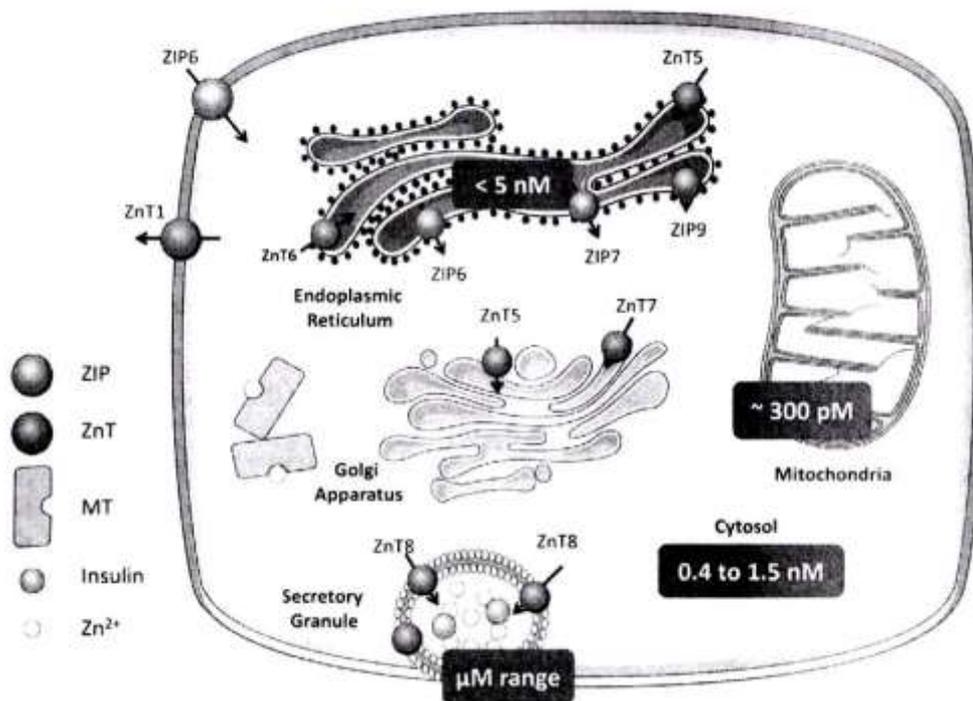


Fig. 19. Homeostasis dl Zn en las células  $\beta$  del páncreas (Tomado de: Jansen et al., 2009)

### **Fisiología del cinc en las células diana para la insulina**

Se conoce desde hace más de 50 años que la deficiencia de cinc disminuye la sensibilidad a la insulina. En la década de los 80 se conoció que el cinc estimulaba la lipogénesis y afectaba la captación de glucosa por los tejidos y que, en cultivos de tejidos, el cinc podía reemplazar a la insulina. Estos experimentos demostraban que el cinc era un insulino-mimético.

En la actualidad, conocemos que el cinc incrementa la fosforilación del receptor de la insulina e incrementa la fosforilación de un gran número de

proteínas en la cadena de señalización de esta hormona (sustrato del receptor de la insulina IRS-1, la kinasa PKB, el factor de transcripción FOX1a, etc.) al inhibir las tirosin-fosfatasa, en particular la PTP1B. La PTP1B es el mayor regulador del estado de fosforilación del receptor de la insulina (Figura 20)(Haase y Maret, 2005).

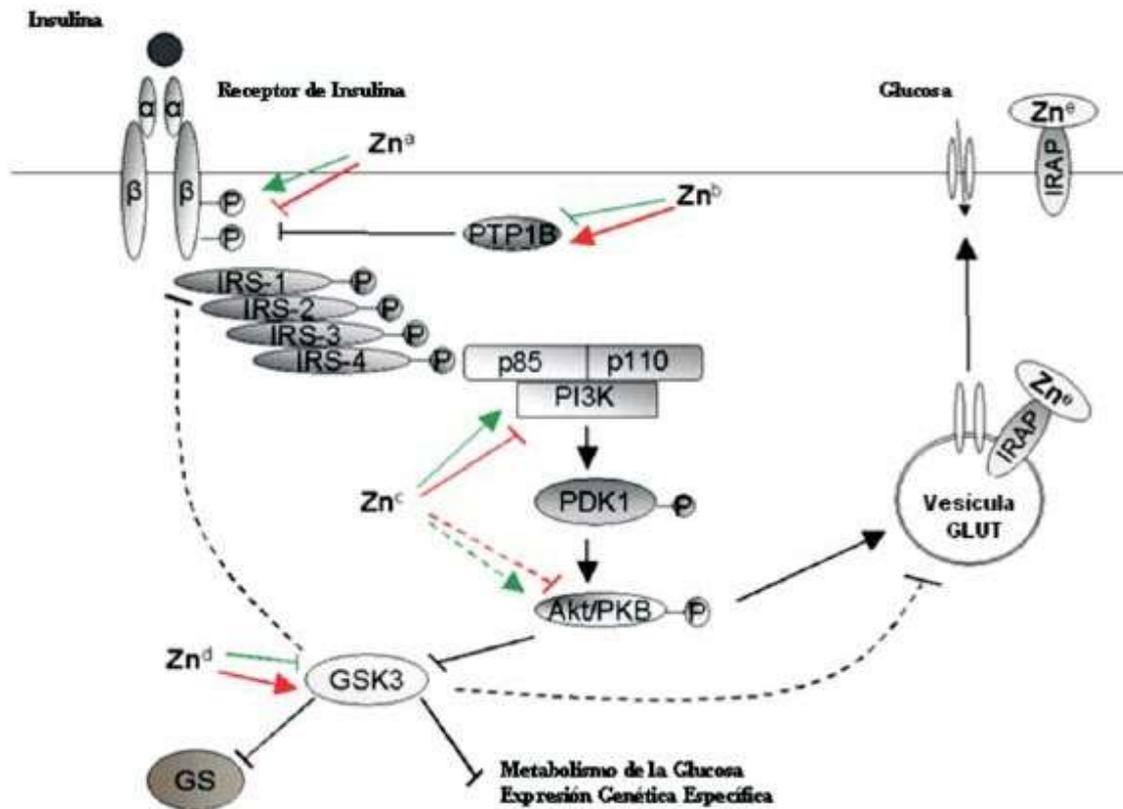


Fig. 20. Participación del Zn en la cascada de señalización de la insulina (Tomado de: Jansen et al., 2009)

### 2.3.7. Cinc y estrés oxidativo.

Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que en los sujetos diabéticos existe un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución de las defensas antioxidantes. La hiperglucemia conduce a una glicación de las proteínas ocasionando la aparición de los productos avanzados de la glicación de las proteínas y dichos productos favorecen un incremento de la formación de grupos carbonilos (Diaz-Casasola y Luna-Pichardo, 2016). Dichos grupos carbonilos modifican los

grupos sulfhidrilo, que son ligandos del cinc, disminuyendo su capacidad para quelar el cinc el medio intracelular y probablemente conduzca a una pérdida de cinc tisular, lo que podría producir un incremento del estrés oxidativo (la deficiencia de cinc es una condición pro-oxidante), iniciando de este modo un círculo vicioso. La oxidación de los ligandos del Zn de la cisteína favorece la disociación del metal, mientras que la reducción de la cisteína oxidada restaura la funcionalidad de los grupos sulfhidrilo incrementando su capacidad para unir cinc y, por tanto, favoreciendo la unión de cinc a las proteínas. Se conoce que los incrementos en el contenido de metalotioneínas (MT), protegen al páncreas contra la diabetes inducida químicamente, y al corazón y al riñón de los daños ocasionados por la diabetes (Li et al, 2007).

De los comentarios anteriores, se deduce que el cinc incrementa la acción de la insulina en los tejidos periféricos, tiene una función pro-antioxidante protegiendo al páncreas endocrino y tejidos periféricos y juega un papel importante en el almacenamiento de la insulina y secreción en las células  $\beta$  pancreáticas y en todas estas funciones se encuentran involucradas las metalotioneínas. En roedores, se ha observado que la insulina es menos efectiva en la deficiencia de cinc y que la suplementación favorece los efectos de la insulina. Si la deficiencia de cinc puede causar diabetes o es la consecuencia de la diabetes, se encuentra aún por determinar. No hay evidencia clara de que la suplementación con cinc pueda prevenir la diabetes tipo II (Beletate et al., 2007). La cuestión sería si la suplementación con cinc podría prevenir la diabetes en individuos deficientes en cinc. En contraste con la capacidad de prevención, sobre la que no existen suficientes datos, existe una amplia evidencia sobre las propiedades antidiabetogénicas e insulinomiméticas que presentan diversos compuestos de cinc (Sakurai y Adachi, 2005, López-Viseras et al., 2014). En una situación de estrés oxidativo mantenido, el suministro de cinc podría empeorar la situación más que beneficiarla, porque en esta situación la capacidad de fijar cinc a sus proteínas se encuentra reducida, lo que ocasionaría un incremento del ion libre que permitiría que se uniera a dianas no fisiológicas. Se ha indicado que en la diabetes existe un incremento del contenido de cinc libre, por tanto, la

restauración previa del equilibrio redox podría ser necesaria antes de la suplementación con dicho elemento (Maret, 2013b)

En los últimos años se ha estudiado la relación entre la ingesta de cinc y el riesgo de padecer DM. Aunque la mayor parte de estos estudios concluyen que el incremento de la ingesta de cinc puede disminuir el riesgo de padecer diabetes, los resultados no son concluyentes. Un amplio número de estudios realizados en la última década pone de manifiesto que la suplementación con cinc tiene efectos beneficiosos en el control de la glucemia en pacientes diabéticos (Su et al., 2009; Jayawardena et al., 2012; Capdor et al., 2013; Ruz et al., 2013; Ranasinghe et al., 2015; Jafarnejad et al., 2019). Sin embargo, un reciente meta-análisis (Fernández-Cao et al., 2019) revela que ingestas moderadamente superiores a las Ingestas Recomendadas (IR) pueden disminuir el riesgo de padecer DM 2. No obstante, las elevadas concentraciones de cinc plasmático incrementan el riesgo de padecer DM 2 un 64%. Además, en algunos estudios con pacientes DM1 se han encontrado efectos negativos sobre el control de la glucemia (Maret, 2013b).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, la diabetes mellitus es una patología multifactorial y en la que se aprecia que el estatus del cinc se encuentra adversamente afectado. La participación del cinc en diversos procesos del desarrollo y progresión de la diabetes enfatiza las alteraciones en el metabolismo de este elemento provocadas por la diabetes y nos proporciona nuevas posibilidades de prevención y terapia.

### **2.3.8. Interacciones Cinc-Vanadio**

Como en el caso del calcio, la literatura sobre las interacciones entre los complejos de vanadio y el metabolismo del Zn son escasos.

Oster et al., (1993) no observan cambios en los niveles plasmáticos y contenido hepático de Zn en ratas sanas o diabéticas tratadas con vanadato sódico. Sin embargo, encuentran incrementos en el contenido renal de Zn en las ratas diabéticas, en las que el tratamiento produce un descenso aproximando el contenido renal de Zn a los valores normales.

En un estudio donde se aborda el efecto del estado de oxidación del vanadio sobre la homeostasis del Zn, muestra que la ingesta de metavanadato amónico durante 12 semanas, causó un incremento de los depósitos de Zn en hueso e hígado, no encontrando cambios significativos en riñón y músculo esquelético. Sin embargo, no se aprecian cambios cuando se suministró BMOV(IV) (Thompson et al., 2002). También se ha descrito, en estudios realizados “in vitro” que el Zn a una concentración 5  $\mu$ M, no protege contra las acciones adversas inducidas por el metavanadato sódico a concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu$ M (Zwolak y Zaporowska, 2009). Kiss et al., (2009), han sugerido que aunque ambos metales pueden ser transportados por la albúmina sérica, el vanadio (IV) es principalmente transportado en el torrente circulatorio por transferrina, mientras que el Zn lo es por la albúmina.

En personas con DM tipo 2 se ha encontrado un descenso de los niveles séricos de vanadio, mientras que no se aprecian cambios en los de Zn (Rodríguez-Flores et al., 2011). Sin embargo, a nivel del páncreas, la diabetes causa una disminución de los niveles de zinc en este órgano, afectando a la síntesis de insulina, a la secreción y a la señalización. Existen investigaciones que nos muestran que la administración de vanadio provoca un incremento en la concentración de zinc (Krosniak et al., 2014), siendo estos niveles superiores a los encontrados en los animales diabéticos tratados con insulina. En esta publicación también se aprecia que el incremento de los niveles de zinc depende del tipo de complejo de vanadio empleado en el tratamiento. En riñón y bazo, el tratamiento con vanadio a ratas diabéticas, también incrementa los niveles de Zn en dicho órgano (Krosniak et al., 2013a,b), en este caso también se observa que los niveles de Zn en las ratas tratadas con vanadio son superiores a los encontrados en los animales diabéticos tratados con insulina.

Scibior et al., (2014), en ratas tratadas con metavanadato sódico, encuentran un incremento del contenido de Zn en el hígado, pero no describen cambios significativos a nivel del riñón bazo o hemisferios cerebrales, aunque en el riñón se aprecia una clara tendencia a incrementar el contenido de Zn. Estos mismos autores, en una publicación posterior trabajando en las mismas condiciones experimentales, no observan cambios en el contenido femoral de Zn (Scibior et al., 2018).

Recientemente se ha sugerido que a bajas concentraciones (0,5  $\mu\text{M}$ ) el Zn tiene un efecto significativamente menor que el V(IV) sobre la expresión de los transportadores GLUT 4 en los adipocitos. Sin embargo, a altas concentraciones (25  $\mu\text{M}$ ) este efecto se invierte de manera altamente significativa (Tsavé et al., 2018).

En el estudio de Tripathi et al., (2019), se encontró que los niveles plasmáticos de zinc no se vieron afectados por la suplementación dietética de vanadio en cabras lactantes, así como tampoco se observaron diferencias significativas en la retención de zinc como porcentaje de la ingesta, en los animales cuya dieta había sido suplementada con vanadio.

Parece, por tanto, bastante evidente que el estatus de zinc no permanece impasible al efecto del tratamiento con vanadio. Sin embargo, aún queda un largo camino por recorrer para esclarecer la manera en que estos dos elementos se interrelacionan en cada uno de los sistemas que conforman el organismo.



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1. ESTUDIOS “IN VIVO”**

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

##### **3.1.1. Diseño experimental**

El diseño experimental se basó en los siguientes grupos de animales:

- 1.- Grupo control (C) constituido por 9 ratas no sometidas a ningún tipo de tratamiento.
- 2.- Grupo diabéticas no tratadas (DM), constituido 10 ratas a las que se les indujo una diabetes por métodos farmacológicos mediante inyección de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 60 mg/kg de peso disuelta en un tampón citrato a pH 4.5.
- 3.-Grupo DMV, constituido por 10 ratas a las que se les indujo una diabetes por métodos farmacológicos mediante inyección de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 60 mg/kg de peso disuelta en un tampón citrato a pH 4.5. Este grupo recibía 6,22 mg de bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV) por día en el agua de bebida, el cual suministraba 1 mg V/día
- 4.- Grupo DMVH, constituido por 10 ratas a las que se les indujo una diabetes por métodos farmacológicos mediante inyección de estreptozotocina (STZ) a una dosis de 60 mg/kg de peso disuelta en un tampón citrato a pH 4.5. Este grupo recibía 18,66 mg de bis(maltolato)oxovanadio(IV) por día en el agua de bebida, el cual suministraba 3 mg V/día.

Siete días tras la inyección de STZ, se confirmó la inducción de la diabetes mediante la determinación de la glucosa en ayunas (>140 mg/dL) y glucosa al azar en sangre (> 250 mg/dL) y la presencia de poliuria, polidipsia e hiperfagia. Todos los días a la 9 de la mañana, se retiró el agua del día anterior y se midió el agua ingerida por para cada rata. En todos los casos la solución de BMOV se preparó y suministro diariamente en el agua de bebida durante todo el periodo experimental.

El periodo experimental tuvo una duración de 5 semanas (35 días) y durante este se controlaron semanalmente los siguientes parámetros, evolución del peso, ingesta de alimentos y agua en las ratas control y niveles de glucemia. La ingesta de agua en las ratas diabéticas se controló diariamente.

Durante la última semana experimental se recogieron heces y orina para realizar el estudio de absorción y retención. En el día 35 los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Sigma Chemical Co, St Louis, MI, USA) (5 mg/ 100g de peso) canulados en la aorta posterior. Se recogió la sangre y se centrifugó (Beckman, Fullerton, CA, USA) a 1200xg durante 15 minutos para separar el suero. También se fueron separados los diferentes tejidos seleccionados para el estudio (hígado, riñón, bazo, músculo gastrocnemio, corazón y fémur) y almacenados a -80°C hasta el momento de realizarse las correspondientes determinaciones.

### **3.1.2. Animales y dietas.**

Para el estudio se utilizaron ratas macho Wistar adultas (180-200 g de peso al inicio de los experimentos) que consumieron una dieta semisintética recomendada por el Instituto Americano de Nutrición (AIN-93M) (Reeves et al, 1993). La dieta suministraba 60 µg de V, 6,5 g de Ca y 40,6 mg de Zn /kg de dieta.

Durante los periodos experimentales los animales se mantuvieron en jaulas individuales de metabolismo (Figura 21), que permitieron la recogida separada de las excretas, ubicadas en una habitación termorregulada  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa controlada y un fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad. A los animales se les suministró la dieta semisintética (AIN 93M) y agua bidestilada “ad libitum”.



*Figura 21. Jaulas de metabolismo*

Durante los últimos siete días del periodo experimental, se recogieron las heces y la orina cada 24h y se almacenaron a -80 °C en frascos de polietileno para su posterior análisis.

Se calcularon los Índices Biológicos:

Absorbido como la diferencia  $[I-F]$ , % Absorción (CDA) como  $[(I-F)/I] \times 100$ , Retenido como  $[I-(F+U)]$ , (%) R/A (porcentaje retenido del ingerido) como  $[(I-(F+U)) / I] \times 100$ . Donde I = ingesta, F = excreción fecal y U = excreción urinaria.

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

### **3.1.3. Técnicas analíticas.**

#### **3.1.3.1. Determinación de vanadio calcio y cinc en la dieta, suero, órganos, medio de cultivo y células HepG2**

Para la determinación del V, Ca y Zn en dietas, suero, órganos, medio de cultivo y células Hep G2, se utilizó un equipo ICP-MS (Agilent 7500, Agilent Technologies, Tokyo, Japan), equipado con un nebulizador tipo

Meinhard (Glass Expansion, Romainmotier, Switzerland) y equipado con celda de colisión. Todo el material empleado para el análisis se limpió previamente con ácido nítrico de calidad suprapur y con agua ultrapura (18.2  $\Omega$ ) obtenida en un sistema Milli Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Las muestras de tejidos y órganos fueron liofilizados (Teistar, Madrid, España) y homogeneizadas empleando un mortero de ágata. La preparación de la muestra se llevó a cabo mediante el ataque con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno (calidad suprapure: Merck, Darmstadt, Germany) en un microondas digestor de la casa Milestone (Soriso, Italy) tanto las muestras como el material de referencia utilizado para validar el método de análisis se prepararon por el mismo procedimiento. Una vez digerida la muestra se recogió el extracto y se llevó con agua ultrapura a una dilución final de 1/10 (peso/volumen) para su análisis posterior.

Una solución estándar de 100  $\mu\text{g/L}$  de Mg, Se, Co, Y, In, Ce, Ba, Pb, Bi y U en % (v/v) de  $\text{NO}_3\text{H}$  se preparó a partir de una solución multi-elemental (1000 mg/L) (Merk) y utilizada diariamente para la optimización del ICP-MS. Se prepararon las curvas de calibrado para vanadio, calcio y cinc a partir de disoluciones estándar de 1000 mg/L en 1% de ácido nítrico de cada elemento de la casa Merck específicas para ICP-MS. A cada uno de los patrones de la curva y a cada una de las muestras se le añadió la misma cantidad del patrón interno elegido para la determinación de estos elementos: Ga e Y.

Para validar el método de análisis se utilizó materiales de referencia suero (SERNORM; SERO AS, Billingstad, Norway) y músculo bovino (NIST 8414, Gaithersburg, MD, USA) que contenían los elementos objeto del análisis y mediante estudios de recuperación en muestras de órganos enriquecidos con estándares multielementales. Los CV obtenidos fueron 5,6% para el V, 1.1% para el Ca y 2.5% para el Zn. Para cada elemento se utilizó la media de cinco determinaciones del material de referencia.

### **3.1.3.2. Determinación de glucosa en sangre.**

Para la determinación de la glucemia se ha empleado el sensor ACCU-SHEK AVIVA (Roche-Mannheim, Alemania), que permite medir los valores en sangre en el intervalo comprendido entre 10 y 600mg/dL, mediante el uso de

tiras reactivas ACCU-SHEK Sensor Comfort Glucosa que actúan como sensores bioquímicos. El sensor ACCU-SHEK AVIVA determina el valor de la glucemia por un método amperimétrico, es decir, indica el flujo electrónico entre el electrodo de medición y el de comparación.

#### **3.1.3.3. Determinación de insulina sérica**

Los niveles séricos de insulina se determinaron utilizando la técnica de enzimoimmunoensayo BIO SPI (Montigny le Bretonneux; Francia)

#### **3.1.3.4. Determinación de leptina**

Leptina fue determinada en suero usando un BS-200 Chemistry Analyser (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Hamburg, Germany). Para la determinación de leptina se utilizó 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). The analysis was performed using a Luminex system (Millipore, Germany). Siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.1.3.5. Análisis de la expresión génica del transportador de metales divalentes (DMT1).**

El RNA total de las muestras de riñón, fue extraído usando RNAqueous MicroRNA isolation Kit, de Ambion ®RNA Life Technologies, siguiendo el protocolo de la casa comercial. Cada reacción comprendió 6,25 µL de TaqMan Master Mix, y cada amplificación incluyó una concentración de primer de 1,25µL en 0.5µl de cDNA para la reacción de la transcriptasa inversa, y agua ultrapura para biología molecular hasta un volumen final de 20µL.

El programa de ciclos térmicos (para TaqMan Fast) consistió en un primer paso de activación de 2 minutos a 50°C y 20 segundos a 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización e hibridación a 95°C durante 3 segundos, y 30 segundos a 60°C. La fluorescencia se midió al final de cada ciclo para monitorizar el proceso de amplificación y las curvas de disociación se añadieron para confirmar la especificidad de la señal de amplificación en cada caso. Como gen constitutivo de control se usó β-actina.

### **3.1.3.6. Análisis de la expresión genética de osteopontina.**

El RNA total de las muestras de hígado, fue aislado usando un minikit RNeasy® (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo el protocolo de la casa comercial. En cada reacción se emplearon 5 µL de KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (KapaBiosystems, Inc. Wilmington, MA, USA). Para la amplificación se empleó una concentración de 10 µL de cada cebador, 20ng de cDNA de la reacción de retrotranscripción y agua grado-PCR hasta un volumen final de 20 µL. El programa que se empleó comenzó con un primer paso de desnaturalización de 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a la temperatura de hibridación (63 °C). La fluorescencia se midió al final del periodo de hibridación de cada ciclo para controlar el proceso de amplificación para monitorizar el progreso de la amplificación, y se añadieron curvas de disociación para confirmar la especificidad de la señal de amplificación en cada caso. Para normalizar la señal de la expresión del mRNA se midió la expresión del gen constitutivo, gliceraldehido-3 fosfatodeshidrogenasa (GAPDH), se midieron, con las siguientes secuencias de cebadores: forward primer 3'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-5', reverse primer 3'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-5'.

Para cada muestra, tanto el gen constitutivo como el diana se amplificaron por triplicado y las medias se emplearon para el cálculo. La cantidad relativa de mRNA se calculó empleando el método  $\Delta\Delta C_t$ . El cebador específico fue SPP1 y su secuencia: forward primer 5'-CCGAACAGGCAAAGCAAAC-3', reverse primer 5'-GCAGGACTGAAGGAGCTAAG-30.

### **3.1.3.7. Estudio de la microarquitectura del hueso: Análisis de tomografía computerizada (micro CT).**

La microarquitectura del hueso se analizó en el fémur distal mediante micro tomografía computerizada (CT), usando un micro CT-35 (Scanco Medical AG, Switzerland). El sistema de imagen micro-tomográfico estaba equipado con una fuente de rayos X con un foco de 0,5 mm.

El eje longitudinal de los fémures se orientó a lo largo del eje de rotación del escáner. El tubo de rayos X se hizo funcionar a 70 kVp y 114 µA con un

tiempo de integración de 300 ms. Los escáneres se realizaron a una resolución isotrópica, nominal y espacial de 10  $\mu\text{m}$  (alta resolución). Para obtener los parámetros corticales, un total de 345 cortes (*slices*) en la diáfisis media (mitad del fémur) se obtuvieron como resultado de hueso cortical, fijando una línea de referencia en la mitad del fémur (50% de la longitud del fémur) y posteriormente se analizaron 4,14 mm de la diáfisis en sentido distal. Para obtener los parámetros trabeculares en la metáfisis se realizaron 231 cortes, seleccionando en primer lugar la articulación de la rodilla como punto de inicio (línea de referencia) y situando el primer corte (*slice*) a 1.5 mm de dicha línea de referencia, y luego analizando 1.39 mm del fémur en sentido distal.

Se analizaron los siguientes parámetros relacionados con la microarquitectura ósea:

A nivel de la metáfisis (hueso trabecular): TV, volumen total; BV, volumen óseo; BV/TV, densidad de volumen óseo; Conn. D, conectividad trabecular; SMI, índice de estructura del modelo; Tb.N, número trabecular; Tb.Th, espesor (grosor) trabecular; Tb.Sp, separación (espacio) trabecular; densidad media del TV; densidad media del BV.

A nivel de la diáfisis (hueso cortical): TV, volumen total; BV, volumen óseo; BV/TV, densidad de volumen óseo; grosor cortical; diámetro medio del poro, densidad media del TV; densidad media del BV.

## **3.2. ESTUDIOS “IN VITRO”**

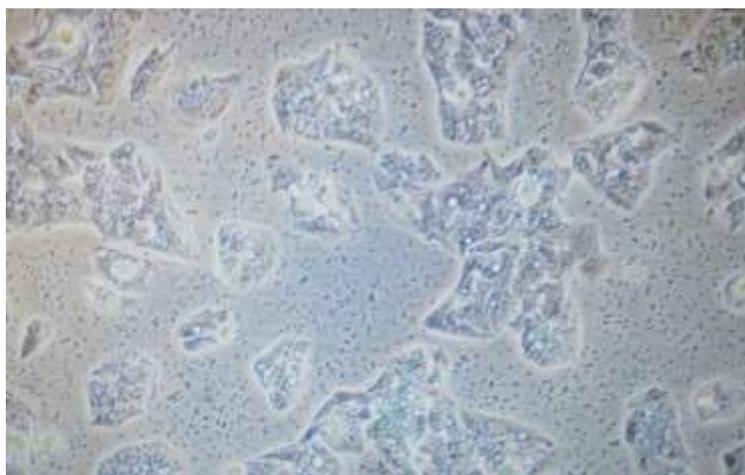
### **3.2.1. Cultivos y condiciones**

Se empleó la línea celular HepG2 suministradas por el banco de células del CIC de la universidad de Granada. Esta línea fue aislada por primera vez de un carcinoma hepatocelular bien diferenciadas de un adulto caucásico de 15 años. 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 CO<sub>2</sub> al 5%. Los subcultivos (en flascos 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 subcultivadas, 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 xg durante 6 minutos.

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



*Figura 22: Células HepG2 vistas con microscopio óptico (20x).*

### **3.2.3. Protocolos seguidos en los estudios “in vitro”**

#### **Recuento celular**

Para proceder al conteo celular se empleó la cámara de Neubauer (Figura 23), para ello se introdujo en la cámara una dilución con las células y una dilución de azul tripán 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.

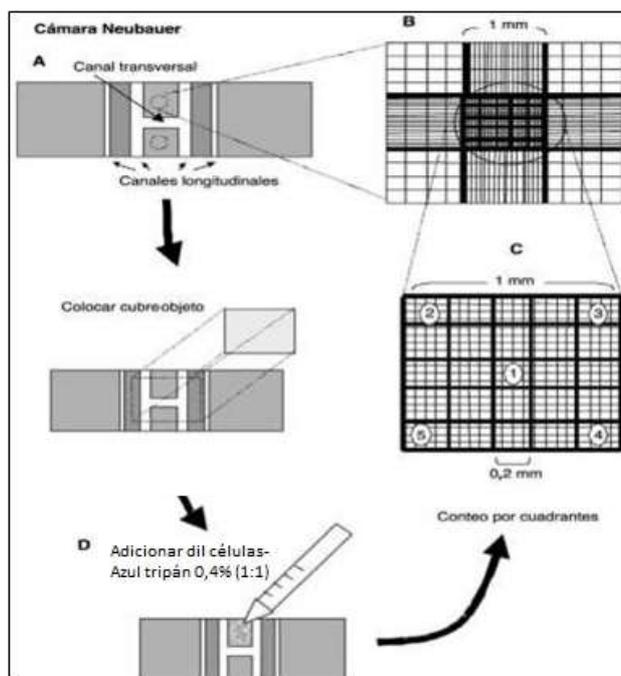


Figura 23: esquema de manejo de la cámara Neubauer

### Exposición a vanadio.

En el caso del vanadio el complejo empleado, como en los estudios “in vivo” 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	Complejo	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	HepG2

Para los estudios de captación de ambos elementos por las células HepG2 solo se utilizó la dosis de 3 mg V/L

### 3.3. 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 mediante el test de la U de Mann Whitney para las comparaciones de dos muestras independientes. Los coeficientes de correlación de Spearman se calcularon para el 95% del IC. Todos los análisis se realizaron con la versión 15.0 del Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS, Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas al nivel de probabilidad  $<5\%$



## 4. RESULTADOS

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTUDIO “IN VIVO”

**4.1.1. Resultados relativos a los indicadores de la evolución de los animales a lo largo del periodo experimental** (Iglesias-González et al., 2012; Sánchez-González et al., 2012a y 2014a; Bermudez-Peña, 2014).

Dos ratas diabéticas fueron retiradas del estudio por su alto grado de deterioro y en cada uno de los grupos tratados con vanadio, también dos ratas fueron retiradas del estudio por presentar problemas gastrointestinales.

**Tabla 2.- Cambios ponderales a lo largo del período experimental (g).**

Grupos	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
C	200±14	219±15	241±17	255±21	288±26	295±30
DM	184±18	179±30 <sup>a</sup>	190±41 <sup>a</sup>	192±41 <sup>a</sup>	190±25 <sup>a</sup>	201±44 <sup>a</sup>
DMV (1mg/día)	157±9 <sup>a, b</sup>	162±13 <sup>a, b</sup>	154±17 <sup>a, b</sup>	155±19 <sup>a, b</sup>	142±16 <sup>a, b</sup>	147±22 <sup>a, b</sup>
DMVH (3mg/día)	240±19 <sup>a, b, c</sup>	181±12 <sup>a, c</sup>	177±12 <sup>a, c</sup>	180±12 <sup>a, b, c</sup>	194±17 <sup>a, c</sup>	204±21 <sup>a, c</sup>

Valores Medios  $\pm$  DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV.  $P < 0.05$

La Tabla 2, muestra la evolución del peso a lo largo de las cinco semanas experimentales. En el grupo de ratas diabéticas hay un leve incremento del peso al finalizar el periodo experimental, produciéndose pérdidas y ganancias leves a lo largo de los 35 días, (en la segunda semana y en la quinta semana aparecen descensos leves).

Cuando se suministra el tratamiento de vanadio en ratas diabéticas la dosis de 1mg V/día (grupo DMV), observamos que ocasiona una pérdida de peso de los animales, en los que incluso se ha llegado a producir una ligera pérdida neta de peso al finalizar el periodo experimental. La dosis de 3mg V/día (grupo DMVH) mantiene el peso de las ratas en valores semejantes a los las ratas diabéticas no tratadas (grupo DM).

**Tabla 3.- Ingesta media de alimentos (g/día) a lo largo del período experimental.**

Grupos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
C	14,2±3,9	15,7±1,9	16,2±2,0	16,6±1,5	15,0±2,0
DM	21,8±6,0 <sup>a</sup>	30,7±1,6 <sup>a</sup>	37,9±1,4 <sup>a</sup>	33,5±2,0 <sup>a</sup>	33,1±2,4 <sup>a</sup>
DMV (1mg/día)	26,5±3,9 <sup>a</sup>	23,1±9,4	16,7±9,6 <sup>b</sup>	19,6±7,9 <sup>b</sup>	26,9±2,0 <sup>a, b</sup>
DMVH (3mg/día)	10,2±4,6 <sup>b, c</sup>	10,7±1,4 <sup>a, b, c</sup>	10,7±1,4 <sup>a, c</sup>	12,3±1,0 <sup>a, b, c</sup>	13,8±1,1 <sup>b, c</sup>

*Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05*

La Tabla 3, muestra la ingesta de alimento (gr/día), a lo largo del periodo experimental (5 semanas). Los resultados muestran que los grupos de ratas diabéticas y diabéticas tratadas con vanadio (a dosis de 1 mg /día) presentan una ingesta de alimento superior al resto de los grupos. El grupo de ratas diabéticas sigue un incremento gradual a lo largo del experimento, sin embargo en el grupo de ratas DMV, comienzan con un consumo alto de alimentos para producirse un descenso de ingesta en la segunda, tercera y cuarta semana, incrementándose levemente en la última semana del experimento.

Las ratas diabéticas tratadas con dosis de Vanadio de 3 mg/día (grupo DMVH), tienen a lo largo de todo el experimento una ingesta de alimento inferior a los demás grupos, manteniéndose constante a lo largo de las tres primeras semanas y presentando un ligero incremento en las dos últimas semanas.

**Tabla 4.- Agua ingerida ml/día a lo largo del período experimental (mL/día).**

Grupos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5
C	17,1±4,7	19,6±6,8	16,3	17,6±4,3	16,6±4,3
DM	156±53 <sup>a</sup>	184±46 <sup>a</sup>	233±57 <sup>a</sup>	200±43 <sup>a</sup>	324±36 <sup>a</sup>
DMV (1mg/día)	167±33 <sup>a</sup>	214±37 <sup>a</sup>	186±60 <sup>a</sup>	181±88 <sup>a</sup>	191±41 <sup>a</sup>
DMVH (3mg/día)	22,4±15,2 <sup>b,c</sup>	12,2±5,2 <sup>a,b,c</sup>	12,1±5,9 <sup>b,c</sup>	15,2±8,1 <sup>b,c</sup>	13,6±7,2 <sup>b,c</sup>

Valores Medios  $\pm$  DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV.  $P < 0.05$

Las ratas diabéticas presentaron polidipsia, el tratamiento con 1 mg V /día no logró normalizar el consumo de agua, pero sí la dosis de 3 mg V /día (Tabla 4).

La diuresis y excreción fecal medidas en la 5<sup>a</sup> semana de estudio fueron inferiores en el grupo control que en los grupos de ratas diabéticas. El tratamiento con vanadio redujo la diuresis y el peso de las heces, con la dosis más alta (grupo DMVH), en el que la diuresis alcanza valores inferiores a los controles, mientras que el peso de las heces se mantiene en niveles semejantes (Tabla 5).

**Tabla 5.- Heces excretadas (g/día) y volumen de orina excretado (ml/día) durante la última semana del período experimental (días 28-35).**

Grupos	C	DM	DMV	DMVH
Diuresis (mL/día)	17,1±4,0	203±31 <sup>a</sup>	187±48 <sup>a</sup>	13,9±7,0 <sup>a,b,c</sup>
Heces (g/día)	1.08±0.13	2.47±0.55 <sup>a</sup>	1,9±0,3 <sup>a,b</sup>	0,9±0,1 <sup>b,c</sup>

Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05

**Tabla 6.- Leptina (ng/L), Glucemia al azar y en ayunas (mg/dL), hemoglobina glicosilada (%) e insulina (pmol/L) en suero al final del periodo experimental (día 35).**

Grupos	C	DM	DMV	DMVH
Leptina	16,4±4,7	2,6±1,0 <sup>a</sup>	1,4±0,5 <sup>a</sup>	8,0±5,1 <sup>a,bg,c</sup>
Glucemia al azar	119±13	620±35 <sup>a</sup>	428±32 <sup>a,b</sup>	188±26 <sup>a,b,c</sup>
Glucemia en ayunas	86±6	276±22 <sup>a</sup>	363±32 <sup>a,b</sup>	98±6 <sup>b,c</sup>
Hemoglobina glicosilada	6±1	21±4 <sup>a</sup>	23±4 <sup>a</sup>	15±5 <sup>a,b,c</sup>
Insulina	2,05±0,26	0,25±0,06 <sup>a</sup>	0,27±0,08 <sup>a</sup>	0,22±0,02 <sup>a</sup>

Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05. (Sánchez-González et al., 2012a y2014a; Iglesias-González et al., 2012)

Las ratas control mostraron niveles de glucosa al azar y hemoglobina glicosilada inferiores al resto de los grupos. Sin embargo, en el caso de la glucosa en ayunas el grupo control presentó valores inferiores a las ratas diabéticas (DM) y diabéticas tratadas con 1 mg V / día (DMV), pero semejantes a los encontrados para el grupo de rats tratadas con 3 mg V/ día (DMVH). En cuanto a los resultados obtenidos para la insulina, en las ratas control se apreciaron niveles circulantes significativamente superiores al resto de grupos de ratas tratadas con estreptozotocina (Tabla 6).

En las ratas diabéticas se apreciaron niveles superiores de vanadio sérico que las controles. El tratamiento con 1 o 3 mg V / día incrementa significativamente el contenido de este elemento en el suero. La diabetes produjo un descenso de los niveles séricos de calcio mientras que el tratamiento con las dos dosis de vanadio empleadas devolvieron dichos valores a niveles semejantes a los controles (Tabla 7). Tanto la diabetes como el tratamiento con 1 mg V / día incrementaron los valores séricos de cinc. Sin embargo, el tratamiento con 3mgV/día disminuyó la concentración plasmática de Zn por debajo de los valores controles

**Tabla 7.- Niveles séricos de Vanadio ( $\mu\text{g/L}$ ), calcio ( $\text{mg/L}$ ) y cinc ( $\mu\text{g/L}$ ) al final del periodo experimental (día 35).**

<b>Grupos</b>	<b>C</b>	<b>DM</b>	<b>DMV</b>	<b>DMVH</b>
<b>Vanadio</b>	<b>2,3<math>\pm</math>0,5</b>	<b>6,1<math>\pm</math>0,5<sup>a</sup></b>	<b>383<math>\pm</math>36<sup>a,b</sup></b>	<b>766<math>\pm</math>77<sup>a,b,c</sup></b>
<b>Calcio</b>	<b>912<math>\pm</math>40</b>	<b>852<math>\pm</math>20<sup>a</sup></b>	<b>880<math>\pm</math>92</b>	<b>928<math>\pm</math>80<sup>b</sup></b>
<b>Zinc</b>	<b>1510<math>\pm</math>137</b>	<b>1739<math>\pm</math>78<sup>a</sup></b>	<b>1778<math>\pm</math>189<sup>a</sup></b>	<b>1327<math>\pm</math>157<sup>a,b,c</sup></b>

*Valores Medios  $\pm$  DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV.  $P < 0.05$*

**4.1.2. Resultados relativos al estudio de los cambios en la homeostasis del calcio y cinc por el tratamiento con vanadio (Sánchez-González et al., 2017).**

En la Tabla 8 se muestran los resultados correspondientes a la utilización digestiva y metabólica del Ca determinados en la última semana experimental, (semana 5).

Las ratas control mostraron una ingesta de Ca inferior a la de las ratas diabéticas y diabéticas tratadas con 1mgV/día, pero semejantes al encontrado en el grupo de ratas diabéticas tratadas con la dosis más alta (DMVH).

La excreción fecal, urinaria, Ca absorbido y retenido, se apreciaron unas pautas semejantes a las descritas para la ingesta. No obstante, hay que destacar que la excreción urinaria de Ca en las ratas del grupo DMVH fue inferior al de las ratas control. Cuando se expresa la absorción y retención como porcentaje (%) del ingerido, se produjo el efecto contrario, las ratas de los grupos DM y DMV presentaron un porcentaje de absorción y retención inferior a las rats de los grupos C y DMVH.

En el caso de las ratas DMV se observó una tendencia a incrementar el % de absorción y retención, aproximándose a los valores controles.

La Tabla 9 muestra los aspectos digestivos y metabólicos del Zn, durante la última semana del periodo experimental. Como ya se ha comentado la ingesta de los elementos estudiados es superior en las ratas diabéticas y tratadas con 1mg de V. También se apreciaron incrementos significativos de la concentración de este elemento en heces y orina en los mencionados grupos,

En los grupos D y DMV también incrementó el Zn absorbido y retenido. Sin embargo, cuando la absorción y la retención se expresan como porcentaje, no se observan cambios estadísticamente significativos

**Tabla 8.- Utilización digestiva y metabólica del calcio durante la última semana del periodo experimental (días 28-35).**

<b>Grupo</b>	<b>C</b>	<b>DM</b>	<b>DMV</b>	<b>DMVH</b>
<b>Ingerido (I) (mg/day)</b>	<b>98±13.0</b>	<b>216±15<sup>a</sup></b>	<b>176±13<sup>a,b</sup></b>	<b>90±7<sup>b,c</sup></b>
<b>Faecal (F) (mg/day)</b>	<b>44±6</b>	<b>139±17<sup>a</sup></b>	<b>90±23<sup>a,b</sup></b>	<b>42±8<sup>b,c</sup></b>
<b>Urinario (U) (mg/day)</b>	<b>4±2</b>	<b>17±6<sup>a</sup></b>	<b>12±4<sup>a</sup></b>	<b>1.3±1.1<sup>a,b,c</sup></b>
<b>Absorbido (A); A= (I-F) (mg/day)</b>	<b>54±4</b>	<b>77±10<sup>a</sup></b>	<b>86±23<sup>a</sup></b>	<b>48±9<sup>b,c</sup></b>
<b>% Absorbido % A = (A x 100 / I)</b>	<b>57±6</b>	<b>36±5<sup>a</sup></b>	<b>49±13</b>	<b>53±9<sup>b</sup></b>
<b>Retenido (R) R=[I-(F+U)] (mg/day)</b>	<b>50±4</b>	<b>60±5<sup>a</sup></b>	<b>74±20<sup>a</sup></b>	<b>47±7<sup>b,c</sup></b>
<b>% Retenido; % R= (R x 100 / I)</b>	<b>51±5</b>	<b>28±3<sup>a</sup></b>	<b>42±9<sup>a,b</sup></b>	<b>52±9<sup>b</sup></b>

*Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05.*

**Tabla 9.- Utilización digestiva y metabólica del cinc durante la última semana del periodo experimental (días 28-35).**

Grupo	C	DM	DMV	DMVH
Ingerido (I) ( $\mu\text{g/day}$ )	609 $\pm$ 80	1342 $\pm$ 95 <sup>a</sup>	1090 $\pm$ 81 <sup>a, b</sup>	560 $\pm$ 45 <sup>b, c</sup>
Faecal (F) ( $\mu\text{g/day}$ )	294 $\pm$ 49	606 $\pm$ 177 <sup>a</sup>	473 $\pm$ 107 <sup>a</sup>	259 $\pm$ 62 <sup>b, c</sup>
Urinario (U) ( $\mu\text{g/day}$ )	3,8 $\pm$ 1,4	40 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	34 $\pm$ 2 <sup>a, b</sup>	5,6 $\pm$ 2,9 <sup>b, c</sup>
Absorbido (A); A= (I-F) ( $\mu\text{g/day}$ )	323 $\pm$ 85	736 $\pm$ 145 <sup>a</sup>	615 $\pm$ 126 <sup>a</sup>	302 $\pm$ 57 <sup>b, c</sup>
% Absorbido % A = (A x 100 / I)	52 $\pm$ 9	55 $\pm$ 12	56 $\pm$ 10	54 $\pm$ 10
Retenido (R) R=[I-(F+U)] ( $\mu\text{g/day}$ )	318 $\pm$ 84	681 $\pm$ 136 <sup>a</sup>	586 $\pm$ 127 <sup>a</sup>	297 $\pm$ 59 <sup>b, c</sup>
% Retenido; % R= (R x 100 / I)	51 $\pm$ 9	51 $\pm$ 11	54 $\pm$ 10	53 $\pm$ 10

Valores Medios  $\pm$  DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05

En la tabla 10 se exponen el contenido en V, Ca y Zn en los órganos y tejidos estudiados.

En los animales controles se aprecian las mayores concentraciones de vanadio en el riñón y las menores en el corazón y músculo esquelético, expresadas en mg/kg de tejido seco.

La diabetes produce un incremento significativo del contenido de vanadio en todos los órganos estudiados excepto en el hígado. Los tratamientos con 1 o 3 mgV/día, como era de esperar, incrementan el contenido

de este elemento en todos los órganos proporcionalmente a la dosis empleada. Con respecto al Ca y Zn, cuando se comparan las ratas diabéticas frente a las controles, se observan concentraciones significativamente mayores de estos cationes en todos los órganos estudiados, excepto en el caso del riñón para el Ca y del corazón para el Zn en los que no se aprecian cambios significativos y del fémur, donde la diabetes produce un descenso significativo del contenido de Ca.

El tratamiento con 1mgV/día, tiende a no modificar los cambios ocasionados por la diabetes sobre el contenido de Ca y Zn en los órganos y tejidos. No obstante, en el caso del Ca el tratamiento produce un incremento del catión en el músculo y un descenso en el corazón. En el caso del Zn esta situación tiende a aproximar a los valores controles su contenido en el riñón, hígado, bazo y fémur, pero estos cambios no muestran significación estadística.

La exposición a 3mgV/día, en términos generales, tiende a corregir los efectos ocasionados por la diabetes aproximando las concentraciones de ambos elementos a los valores controles, incluso produciendo descensos significativos en algunos órganos, como es el caso del contenido de Zn en riñón e hígado y del Ca en el bazo (Tabla 10).

En la Tabla 11 se muestran los coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles séricos de los elementos y las concentraciones en los tejidos estudiados. La ingesta de alimento aparece relacionada negativamente con el contenido de V en suero, riñón, hígado, bazo y corazón y positivamente con el contenido de vanadio en el fémur. En el caso del Ca, la cantidad de alimento ingerido se correlaciona negativamente con el Ca sérico, hepático y óseo, mientras que lo hace positivamente con el contenido de Ca en el bazo y músculo. La dieta ingerida se encuentra correlacionada directamente con el contenido de Zn en suero, riñón, hígado músculo y fémur. El vanadio sérico se encuentra directamente correlacionado con su contenido de los diferentes órganos estudiado, excepto en el caso del fémur donde la correlación es negativa. Además, el contenido de V en suero aparece inversamente relacionado con el contenido de Zn en riñón e hígado.

**Tabla 10.- Concentración de Vanadio, Calcio y Cinc (mg/kg tejido seco) en órgano al final del periodo experimental (día 35).**

Tejidos	Grupos	Control	DM	DMV	DMVH
Riñón	V(mg/kg)	0,121±0,023	0,205±0,103 <sup>a</sup>	13±2,3 <sup>a,b</sup>	33±5,3 <sup>a,b,c</sup>
	Ca(mg/kg)	294±36	327±49	316±27	300±2
	Zn(mg/kg)	101±12	140±17 <sup>a</sup>	128±19 <sup>a</sup>	79±10 <sup>a,b,c</sup>
Hígado	V(mg/kg)	0,042±0,009	0,070±0,045	5,4±1,0 <sup>a,b</sup>	11±3,5 <sup>a,b,c</sup>
	Ca(mg/kg)	124±20	97±20 <sup>a</sup>	91±12 <sup>a</sup>	115±7 <sup>b,c</sup>
	Zn(mg/kg)	121±18	148±19 <sup>a</sup>	141±18	69±7 <sup>a,b,c</sup>
Músculo	V(mg/kg)	0,014±0,008	0,040±0,016 <sup>a</sup>	0,62±0,02 <sup>a,b</sup>	1,1±0,20 <sup>a,b,c</sup>
	Ca(mg/kg)	199±6	228±16 <sup>a</sup>	283±40 <sup>a,b</sup>	206±12 <sup>b,c</sup>
	Zn(mg/kg)	36±4,8	46±8,4 <sup>a</sup>	57±24 <sup>a</sup>	39±4
Bazo	V(mg/kg)	0,048±0,008	0,100±0,045 <sup>a</sup>	4,7±2,1 <sup>a,b</sup>	14,2±4,0 <sup>a,b,c</sup>
	Ca(mg/kg)	144±11	169±15 <sup>a</sup>	165±22 <sup>a</sup>	124±13 <sup>a,b,c</sup>
	Zn(mg/kg)	76±3,8	80±3,4 <sup>a</sup>	77±5	75±10
Corazón	V(mg/kg)	0,007±0,002	0,023±0,015 <sup>a</sup>	0,72±0,08 <sup>a,b</sup>	1,70±0,54 <sup>a,b,c</sup>
	Ca(mg/kg)	137±21	177±20 <sup>a</sup>	128±26 <sup>b</sup>	145±28 <sup>b</sup>
	Zn(mg/kg)	67±8	65±9,0	63±3	61±5
Fémur	V(mg/kg)	0,040±0,013	0,102±0,073 <sup>a</sup>	7,8±2,3 <sup>a,b</sup>	25±5,6 <sup>a,b,c</sup>
	Ca (g/kg)	137±3	129±6 <sup>a</sup>	139±6 <sup>b</sup>	141±8 <sup>b</sup>
	Zn(mg/kg)	66±2,7	82±8,7 <sup>a</sup>	72±16	69±10 <sup>b</sup>

Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05

**Tabla 11.- Resultados del análisis bivariado: coeficientes de correlaciones de Spearman entre niveles séricos de los elementos y concentraciones tisulares de estos (n=35).**

Tejido /Órgano	Elemento	Alimento ingerido	V suero	Ca suero	Zn suero
Suero	V	-,390(*)	-	,451(*)	ns
	Ca	-,433(*)	,451(*)	-	ns
	Zn	,712(**)	ns	ns	-
Riñón	V	-,420(*)	,956(**)	,379(*)	-,459(**)
	Ca	ns	ns	ns	Ns
	Zn	,788(**)	-,543(**)	-,624(**)	,520(**)
Hígado	V	-,406(*)	,895(**)	,418(*)	-,473
	Ca	-,599(**)	ns	ns	-,407(*)
	Zn	,703(**)	-,676(**)	-,463(*)	,655(**)
Bazo	V	-,477(**)	,806(**)	ns	-,539(**)
	Ca	,409(*)	ns	ns	ns
	Zn	ns	ns	ns	,490(+*)
Músculo esquelético	V	ns	,925(**)	ns	ns
	Ca	,555(**)	ns	ns	ns
	Zn	,375(*)	ns	ns	,436(*)
Corazón	V	-,432(*)	,920(**)	ns	-,460(*)
	Ca	ns	ns	ns	ns
	Zn	ns	ns	ns	ns
Fémur	V	,767(**)	-,496(*)	ns	,452(*)
	Ca	,459(*)	,463(*)	ns	ns
	Zn	,510(**)	ns	ns	,518(**)

(\*\*). La correlación es significativa al nivel 0,01. (\*). La correlación es significativa al nivel 0,05, (ns). No significativo

El Ca sérico se encuentra relacionado positivamente con el V sérico y hepático e inversamente con el Zn renal y hepático. Por último, el Zn sérico apare inversamente asociado al V renal, hepático en el bazo y corazón y directamente con el v en fémur y el Zn en riñón, hígado, bazo, músculo y fémur.

**Tabla 12.- Cambios en la expresión genética de osteopontina en hígado (%)**

En la Tabla 12 se muestran el efecto del tratamiento con vanadio sobre la expresión de la osteopontina. Los resultados obtenidos indican que la diabetes incrementa la expresión mientras que el vanadio la disminuye proporcionalmente a la dosis.

Grupos	C	DM	DMV	DMVH
Osteopontina (mRNA)	1,00±0,41	2,23±0,42 <sup>a</sup>	1,25±0,98 <sup>b</sup>	0,70±0,27 <sup>a,b,c</sup>

Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05.

El efecto de la diabetes y de la exposición de ratas diabéticas a diferentes dosis de vanadio sobre la microarquitectura del hueso trabecular y cortical se muestran en la Tabla 13. Los resultados indican que a nivel trabecular (metáfisis), la diabetes disminuye significativamente la relación volumen óseo (BV) / volumen total (VT), el espesor trabecular (Tb,Th) y la densidad media de TV, cuando comparamos con el grupo control. El tratamiento con 1mgV/día (DMV) disminuye el volumen óseo (BV), la relación BV/TV, el grosor de la trabécula (Tb,Th) y la densidad media del volumen total (TV). Igual que ocurre con los resultados obtenidos en las ratas diabéticas (DM), en el grupo DMV también incrementa el SMI frente al grupo control. No aparecen diferencias significativas entre los grupos DM y DMV para el resto de parámetros determinados a nivel de metáfisis.

**Tabla 13 . Efecto de la exposición a vanadio sobre la microarquitectura del hueso trabecular y cortical.**

	<b>C</b>	<b>DM</b>	<b>DMV</b>	<b>DMVH</b>
<b>Metaphysis (trabecular)</b>				
TV (mm <sup>3</sup> )	21.4 ± 2.7	22.6 ± 4.6	20.5 ± 2.2	21.3 ± 2.8
BV (mm <sup>3</sup> )	4.55 ± 1.64	3.13 ± 1.04	2.40 ± 0.50 <sup>a</sup>	3.34 ± 1.18
BV/TV (1)	0.21 ± 0.06	0.14 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.05
Conn. D (1/mm <sup>3</sup> )	147 ± 48	127 ± 67.8	106 ± 28 <sup>a</sup>	111 ± 29.4
SMI (1)	0.92 ± 0.52	2.02 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.86 ± 0.44 <sup>a</sup>
Tb.N (1/mm)	2.52 ± 0.69	2.59 ± 0.57	2.76 ± 0.69	2.86 ± 0.66
Tb.Th (mm)	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.007 <sup>a</sup>
Tb.Sp (mm)	0.46 ± 0.12	0.43 ± 0.13	0.40 ± 0.09	0.37 ± 0.10
Densidad media de TV (mg HA/cm <sup>2</sup> )	144 ± 63	73 ± 40 <sup>a</sup>	63 ± 29 <sup>a</sup>	140 ± 42 <sup>b,c</sup>
Densidad media de BV (mg HA/cm <sup>2</sup> )	821 ± 20	819 ± 21	819 ± 16	815 ± 24
<b>Diaphysis (cortical)</b>				
TV (mm <sup>3</sup> )	45 ± 3	40 ± 7	33 ± 4 <sup>a</sup>	43 ± 5 <sup>c</sup>
BV (mm <sup>3</sup> )	16.2 ± 1.20	13.4 ± 2.56 <sup>a</sup>	10.9 ± 1.53 <sup>a</sup>	14.9 ± 0.72 <sup>a,c</sup>
BV/TV (1)	0.36 ± 0.03	0.33 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03
Grosor de la corteza (mm)	0.51 ± 0.01	0.46 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.43 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>b,c</sup>
Diametro medio del poro (mm)	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.07	0.07 ± 0.04
Densidad media de TV (mg HA/cm <sup>2</sup> )	1001 ± 14	1007 ± 15	994 ± 16.48	1003 ± 11
Densidad media de BV (mg HA/cm <sup>2</sup> )	1054 ± 16	1060 ± 11	1053 ± 17	1052 ± 11

Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05

(TV), volume total; (BV), volumen óseo; BV/TV, densidad del volume óseo; Conn. D, conectividad trabecular; SMI, índice de la estructura del modelo; Tb.N, número trabecular; Tb.Th, espesor trabecular; Tb.Sp, espacio trabecular; HA, hydroxyapatita.

El tratamiento con 3mgv/día tiende a mejorar los parámetros óseos estudiados, aproximándolos a los valores controles. Sin embargo, Tb,Th no recupera el nivel de las ratas control y aunque el SMI disminuye (cuanto mas alto peor es la estructura del modelo), este permanece en valores superiores a los del grupo C. Además, esta dosis incrementa la densidad media de TV en el hueso esponjoso de la metáfisis en comparación con los grupos DM y DMV y tiende a mejorar la geometría de la estructura trabecular como lo sugiere el cambio en el SMI

A nivel de diáfisis (hueso cortical), la diabetes disminuye BV, la relación BV/TV y el espesor cortical comparados con el grupo control. El tratamiento con vanadio (grupo DMV) disminuye el TV, mientras que el tratamiento con 3mgV/día tiende a corregir los cambios causados por la diabetes. El grupo DMVH muestra un volumen total (TV) y grosor cortical semejante al grupo control. Sin embargo, en el caso del volumen óseo (BV) los valores siguen siendo inferiores a los controles (Tabla 14). La administración de la alta dosis de vanadio se asoció con una significativa mejora de los parámetros corticales analizados.

Los cambios en la expresión genética del transportador de metales divalentes 1 (DMT 1) se expresan en la tabla 14. La diabetes incrementa la expresión del DMT1, mientras que la exposición a vanadio disminuye la expresión de dicho transportador cuando se compara con las ratas diabéticas no tratadas (DM) (Tabla 14).

**Tabla 14.- Cambios en la expresión genética del transportador de metales divalentes (DMT1) en riñón (%)**

Grupos	C	DM	DMV	DMVH
DMT1 (mRNA)	1,00±0,06	1,41±0,15 <sup>a</sup>	0,92±0,08 <sup>b</sup>	1,04±0,04 <sup>b</sup>

Valores Medios ± DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media ± desviación típica. a - Diferente del C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV. P<0.05.

#### 4.2. ESTUDIOS “IN VITRO”

Tabla 15. Contenido de V, Ca y Zn en el medio de cultivo y células HepG2 expuestas a 3 mg/L de V durante 32 h.

	V ng/ L	Ca µg/L	Zn ng/ L
<b>Medio de cultivo</b>	37 ± 4,20	33 ± 0,22	217 ± 0,66
V añadido al cultivo	V ng/ 10 <sup>6</sup> células	Ca mg/ 10 <sup>6</sup> células	Zn ng/ 10 <sup>6</sup> células
<b>Control</b>	5.54 ± 0,64	377 ± 46	5,37 ± 0,21
<b>V 3 mg/L</b>	46 ± 4,24 <sup>a</sup>	565 ± 10 <sup>a</sup>	8,48 ± 0,47 <sup>a</sup>

Valores medios ± DS. (a) vs Control.  $P < 0,05$

En la tabla 17 se muestran el contenido en V, Ca y Zn de células HepG2 que han sido sometidas a la exposición a BMOV (3 mgV/L) durante 32 h.

Los resultados muestran que la exposición a vanadio da lugar a incrementos significativos del contenido intracelular de Ca y Zn.



## 5. DISCUSIÓN

## 5. DISCUSIÓN

La diabetes es una patología que afecta a un gran número de procesos metabólicos en la que se ha puesto de manifiesto la existencia de alteraciones en la concentración de diversos elementos (magnesio, selenio, hierro, cobre o zinc) en los tejidos y enzimas relacionados con la defensa antioxidante (Oster et al., 1993; Sánchez-González 2012 a y b; 2014a y b; Bermudez-Peña et al., 2013; Rivas-García et al., 2020). Esta circunstancia junto a los cambios metabólicos ocasionados por la hiperglucemia pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad (Valko et al., 2005).

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 está definitivamente establecido. Dicho elemento se asocia con la regulación, incremento del transporte y metabolismo de la glucosa, así como con el aumento de la sensibilidad al receptor de la insulina. Debido a los altos niveles de vanadio presentes en el medio ambiente, su amplio uso industrial, su frecuente empleo como suplemento por diferentes tipos de atletas y al creciente interés por sus efectos farmacológicos, el estudio del metabolismo del vanadio constituye actualmente una importante área de investigación (Domingo, 2000 Thompson et al, 2006a; Scibior et al., 2018; Scibior y Kurus, 2019). Aunque para algunos compuestos de vanadio se han completado los ensayos clínicos (Thompson et al, 2006a), 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 existen muchos aspectos del metabolismo del vanadio que no son bien conocidos, entre los que se encuentran las interacciones digestivas y metabólicas con otros elementos envueltos en la defensa antioxidante.

Según algunos autores (Thompson et al, 2006b), el vanadio al favorecer la metabolización de la glucosa, reduciría la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en consecuencia prevendría el daño oxidativo ocasionado

por la hiperglicemia. Pero muchos autores han asociado el vanadio con efectos pro-oxidantes porque altera el metabolismo de diversos elementos traza como el Mg, Fe, Cu, Zn and Se (Sánchez-González et al, 2011, 2012, 2014; Scibior y Kurus, 2019; Treviño et al., 2019; Rivas-García et al., 2020). La presencia de estrés oxidativo se encuentra asociada con cambios en la producción de citokinas

y la presencia de tumores pulmonares (Assem et al, 2015). Sin embargo, otros autores han sugerido que el vanadio puede actuar como inhibidor en diferentes formas de cáncer (Treviño et al., 2019).

Aunque existe cierto grado de información sobre interacciones entre el vanadio y Ca (Kròsniac et al., 2013b; Kròsniac et al., 2014; Scibior et al., 2018; Tripathi et al., 2019) y entre el vanadio y Zn (Kròsniac et al., 2014; Scibior et al., 2014 y 2018), la información disponible sobre posibles alteraciones en la homeostasis del Ca y del Zn, dos elementos relacionados con la presencia de estrés oxidativo, en ratas diabéticas, como consecuencia del tratamiento con vanadio es muy escasa. Además, de su relación con el estrés oxidativo, en el caso del Zn también se conoce que este elemento se encuentra asociado al metabolismo de la glucosa de modo similar al vanadio. Participa favoreciendo la activación de kinasas del receptor de la insulina y la translocación del transportador GLUT 4 en las ratas diabéticas.

De acuerdo con los comentarios anteriores, en el presente estudio nos planteamos profundizar en el efecto de la exposición a vanadio en ratas diabéticas alteraba la homeostasis del Ca y del Zn. Además, dada poca información sobre este tema, también consideramos de interés estudiar si el tratamiento podría afectar a los cambios en la estructura del hueso ocasionados por la diabetes.

Para la realización del estudio se seleccionó el bis(maltolato)oxovanadio(IV) (BMOV) porque se ha sugerido que dicho compuesto es más efectivo como hipoglucemiante, mejor tolerado y menos tóxico en los modelos animales que los compuestos inorgánicos de vanadio

(Caravan et al, 1995; Thompson et al, 2006b). Además, es un compuesto estable en soluciones acuosas (Rivas-García et al., 2020).

La dosis de Vanadio utilizadas en este estudio (1mgV/día ~ 5mgV/kg /día y 3mgV/día ~ 15mgV/kg/día) son más elevada que la baja dosis descrita como causante de efectos adversos en ratas (0.8 mg V/kg/día). Sin embargo la dosis usada es una dosis baja si se compara con las dosis utilizadas por otros autores y es mucho más baja que la dosis letal 50(LD50) (40-90 mgV/kg./día) (Domingo et al., 1995; EFSA, 2004). No obstante, las dosis empleadas se eligieron cuidadosamente tras una larga revisión de los estudios realizados anteriormente y representan dosis intermedias de BMOV entre las empleadas en la bibliografía.

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

## **5.1. ESTUDIOS “IN VIVO”**

***5.1.1. Efecto del tratamiento con BMOV(IV) a ratas diabéticas sobre el peso corporal, ingesta de alimento y agua y niveles circulantes de leptina, glucosa e insulina (Iglesias-González et al., 2012; Sánchez-González et al., 2012a y 2014a).***

Como es conocido la diabetes induce hiperglucemia y pérdidas de peso debidas al hipercatabolismo que acompaña a la enfermedad (Figura 23), junto a un incremento del porcentaje de hemoglobina glicosilada (indicador de la hiperglucemia crónica) (Tabla 6) (Iglesias-González et al., 2012). En nuestro estudio hemos observado que en el grupo DM no se producen incrementos de peso durante el periodo experimental (Tabla 2; Figura 23) aunque las ratas muestran hiperfagia, polidipsia y poliuria (Tablas 3, 4 y 5; Figuras 24 y 25). El descenso de los niveles de leptina (Tabla 6; Figura 25) causado por la pérdida de peso corporal y tejido adiposo, ayudaría a justificar la hiperfagia presente en este grupo (DM). Esta hormona (leptina) es una adipokina sintetizada

principalmente en el tejido adiposo, en cantidades directamente relacionadas con la masa de tejido adiposo. La leptina participa en la regulación del apetito, reduciendo la ingesta de alimento y por tanto el consumo energético (Jéquier, 2002; Almanza-Pérez et al., 2008).

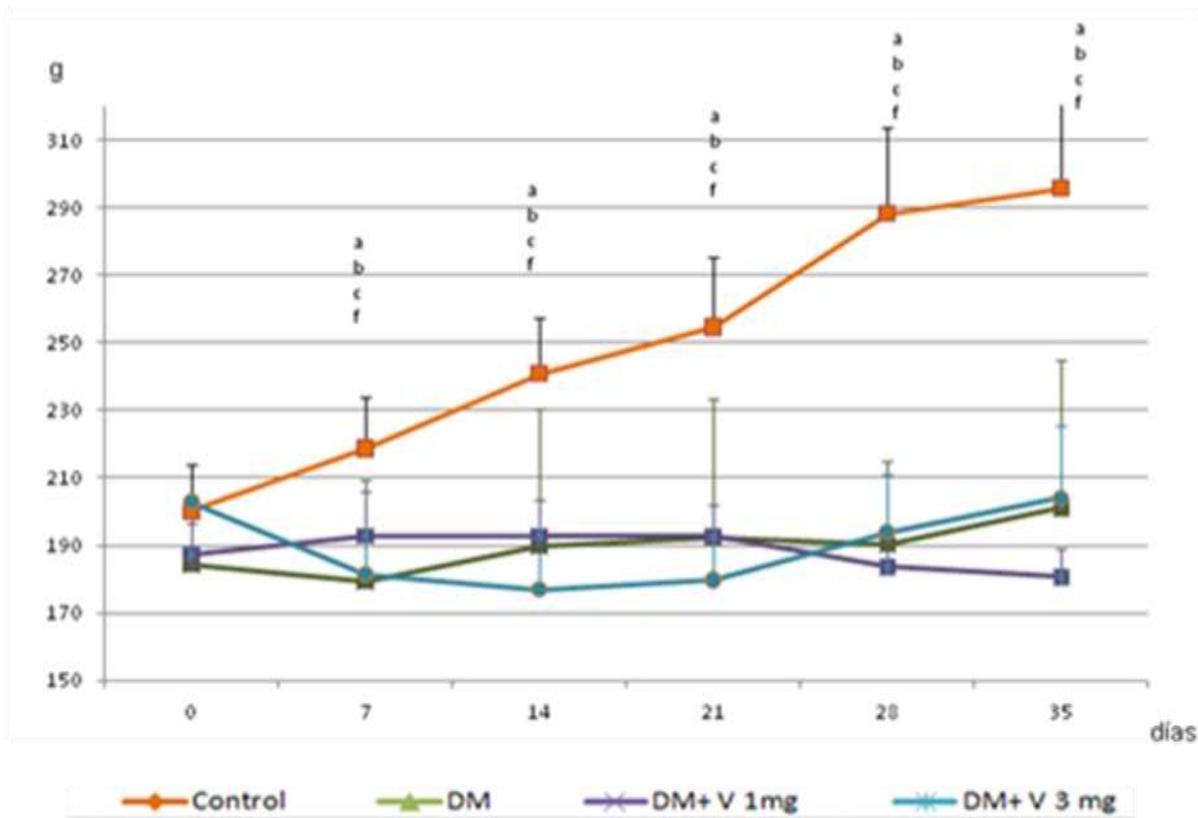


Figura 23. Cambios de peso durante el periodo experimental. Valores Medios y DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). (a) C vs DM; (b) C vs DMV; (c) C vs DMVH; (d) DM vs DMV; (e) DM vs DMVH; (f) DMV vs DMVH;  $P < 0.05$

El tratamiento con V a ratas diabéticas no modifica significativamente la evolución del peso cuando se comparan con el grupo DM (Tabla 2; Figura 23) aunque la ingesta de alimento y agua disminuye drásticamente a medida que incrementa la dosis de V, normalizándose con la mayor dosis (Tablas 2 y 4; Figura 24). La reducción de la ingesta y de peso corporal seguida a la administración de vanadio ha sido observada en diversos estudios (Scibior et al., 2010; Sánchez-González et al., 2012a).

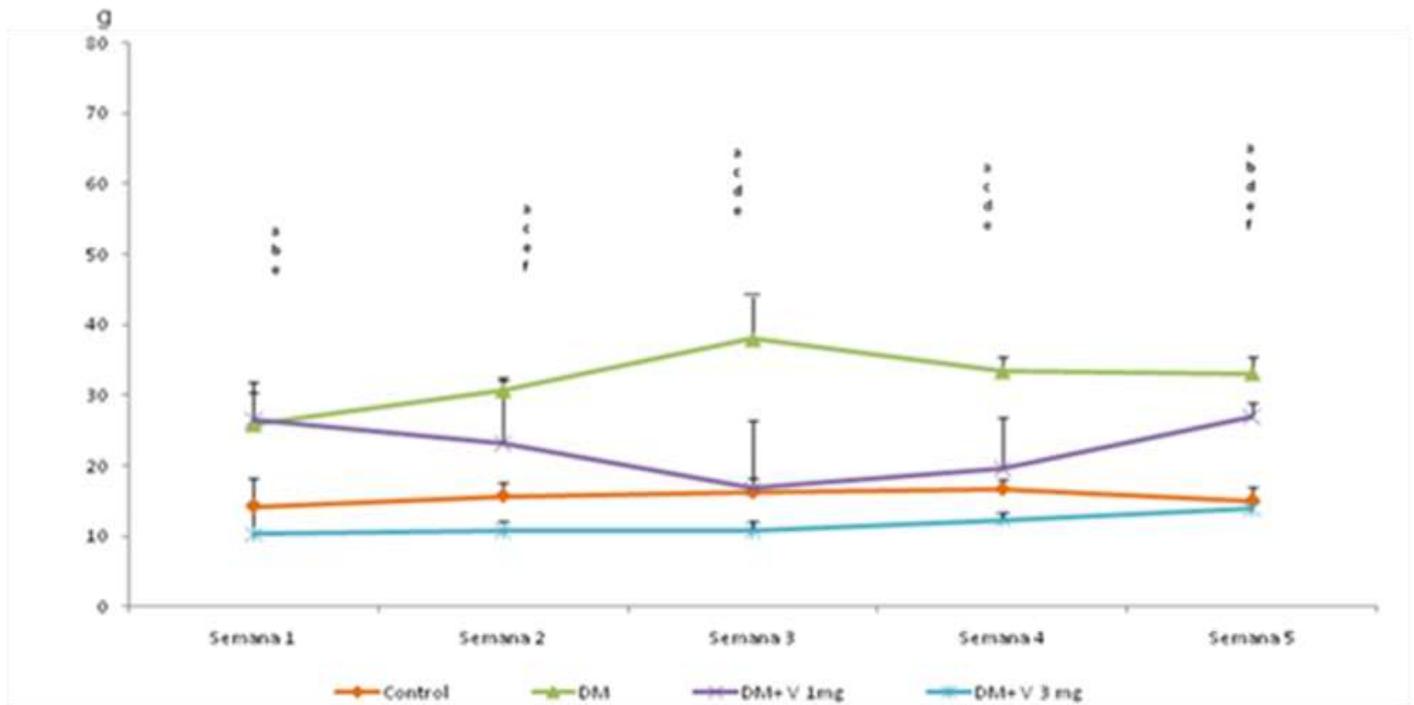


Figura 24. Ingesta de alimento durante el periodo experimental. Valores Medios y DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). (a) C vs DM; (b) C vs DMV; (c) C vs DMVH; (d) DM vs DMV; (e) DM vs DMVH; (f) DMV vs DMVH:  $P < 0.05$

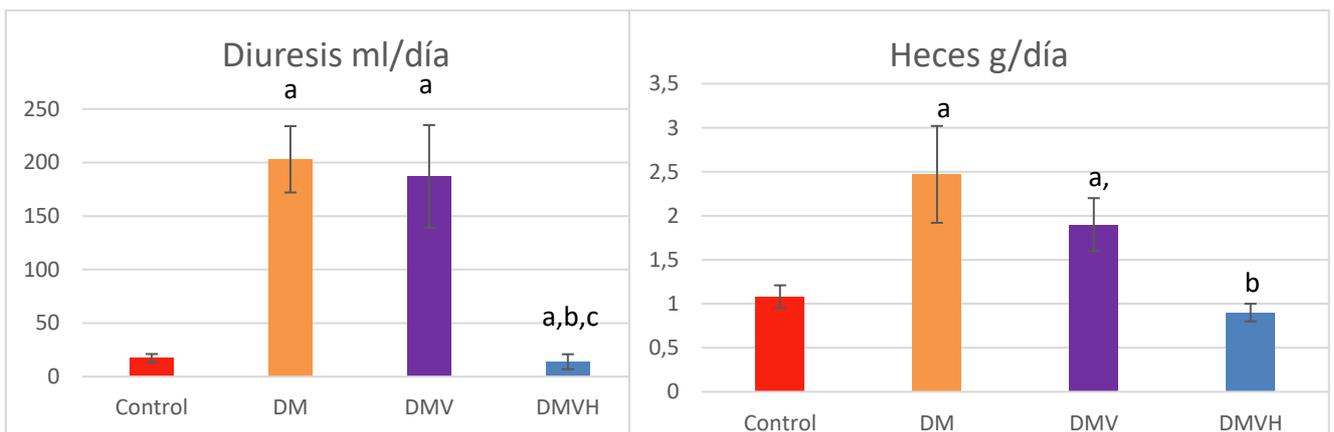


Figura 25. Excreción urinaria y fecal en la última semana del periodo experimental (días 28-35) Valores Medios  $\pm$  DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente de C; b - Diferente de DM; c - Diferente de DMV.  $P < 0.05$ .

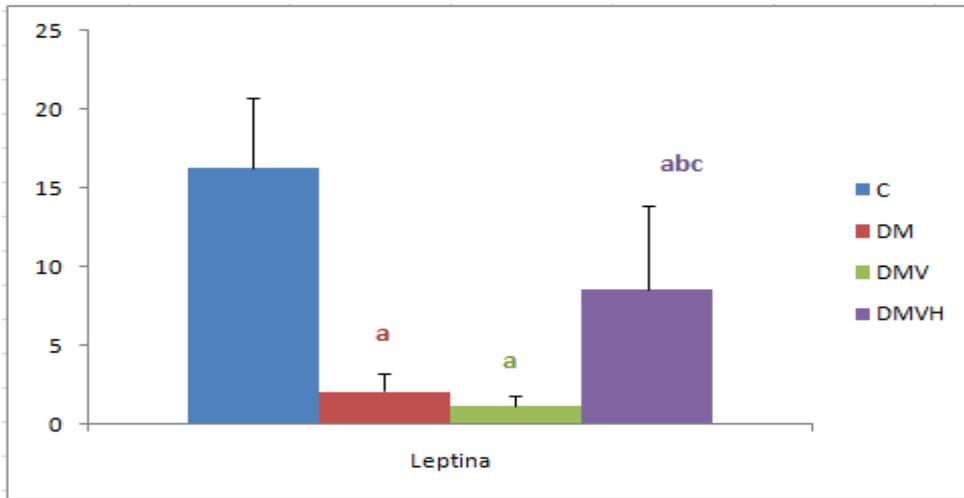
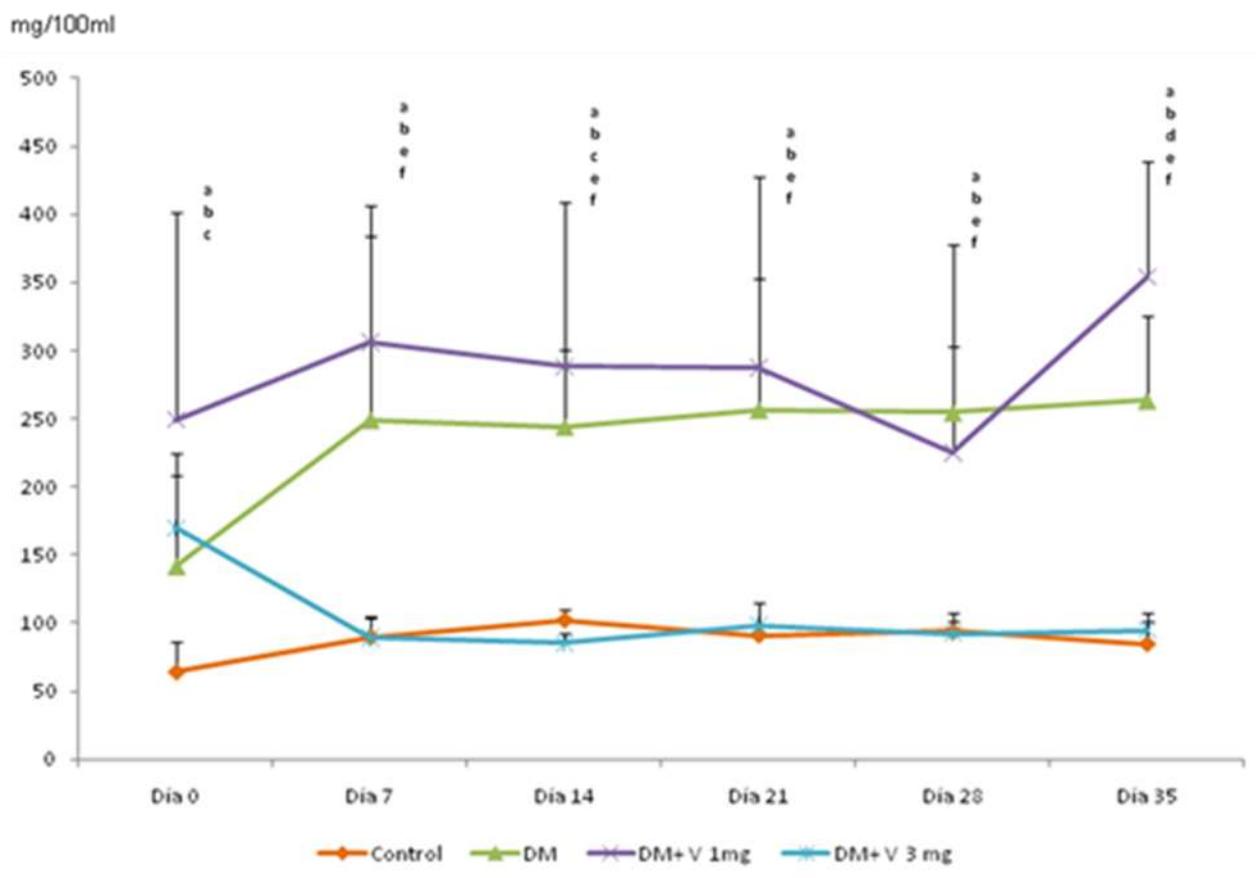


Figura 26. Valores séricos de leptina (ng/L) en el día 35 del periodo experimental. Valores Medios y DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). (a) C vs DM o DMV o DMVH; (b) DM vs DMV o DMVH; (c) DMV vs DMVH;  $P < 0.05$ .

Se ha descrito que el V incrementa la secreción de leptina (Chen et al., 2001) y la señal de transducción de esta hormona (Wilsey et al., 2006). Sin embargo, en nuestro estudio la exposición a 1mgV/día produce un descenso de los niveles circulantes de leptina semejante al encontrado en las ratas diabéticas (Tabla 6; Figura 26). El descenso de la leptina sérica debería haber causado un incremento de la ingesta de alimento y por tanto, del peso corporal; no obstante, encontramos el efecto opuesto, quizás esto se deba a la acción directa del vanadio en el sistema nervioso central incrementando la señal de transducción de la hormona y de este modo, su efecto sobre la ingesta de alimento (Wisley et al., 2006).

En nuestro estudio, el tratamiento con 1mgV/día (grupo DVM), no ocasionó cambios metabólicos significativos, cuando se compara con el grupo DM. Esta dosis de V no altera la hiperglucemia ni el % hemoglobina glicosilada (Tabla 6) ocasionada por la diabetes (Tabla 6; Figura 27). Los altos niveles de glucemia encontrados en el día 35 podría deberse a que la estreptozotocina puede haber producido un daño más severo en algunas ratas (variabilidad

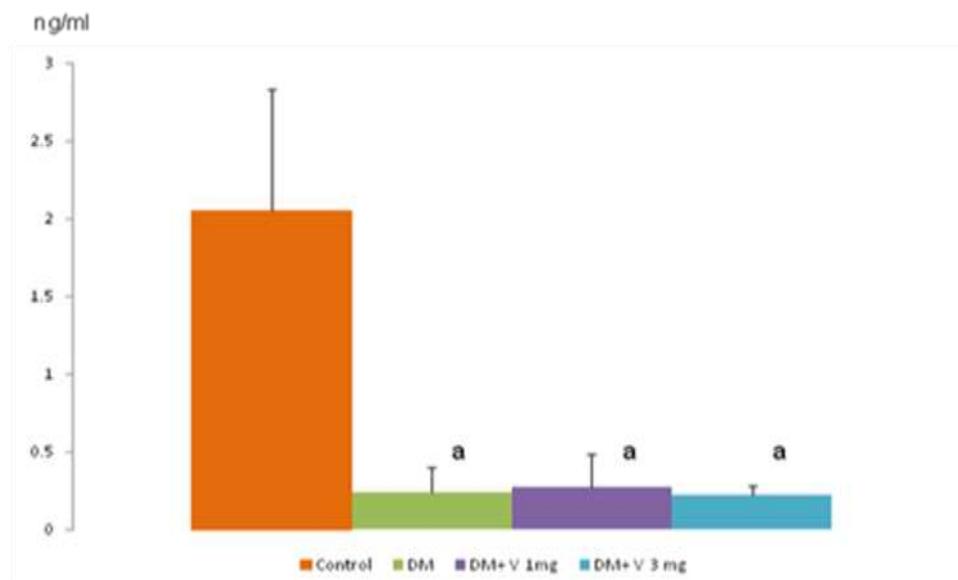
individual), y esta circunstancia se pudo presentar al final del periodo experimental (Sánchez-González et al., 2012a).



*Figura 26. Glucemia en ayunas durante el periodo experimental. Valores Medios y DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). (a) C vs DM; (b) C vs DMV; (c) C vs DMVH; (d) DM vs DMV; (e) DM vs DMVH; (f) DMV vs DMVH;  $P < 0.05$*

La dosis de 3mgV/día mantuvo el peso de las ratas en valores semejantes a las diabéticas, pero disminuye la ingesta de alimento y agua a valores semejante a los controles (Tablas 3 y 4; Figuras 24). Además, normalizó los niveles de glucemia desde la primera semana de tratamiento. En este grupo (DMVH) también se aprecia un descenso de los niveles de hemoglobina glicosida y un incremento de la leptina al final del periodo experimental (día 35), frente a las ratas de los grupos DM y DMV (Tabla 6), lo que confirmaría la tendencia a mejorar el estado metabólico y ayudaría a explicar la aproximación de la ingesta de alimento a los valores de las ratas

control. Pero, como se ha mencionado, la ganancia de peso en este grupo fue similar a la encontrada para los grupos DM y DVM y, por tanto, la masa adiposa de estas ratas (grupo DMVH) era semejante a la de los grupos DM y DVM. Como se ha comentado, la secreción de leptina es proporcional a la masa de tejido adiposo, pero también se conoce que una gran proporción de la variabilidad interindividual de los niveles de leptina es independiente de la grasa corporal (Jéquier, 2002). Se sabe que la secreción de leptina se encuentra incrementada tras la exposición a citocinas inflamatorias como  $TNF\alpha$ , IL-1 y IL-6 (Li et al., 2006). En trabajos anteriores nuestro grupo ha puesto de manifiesto que, el tratamiento con 3mgV/día ocasiona un fuerte incremento de la PCR y la IL-6 (Bermúdez-Peña, 2014) lo que podría haber causado el incremento de la secreción de leptina. Además, el incremento de la secreción de leptina favorecería el efecto hipoglucemiante del vanadio, ya que esta hormona mejora la tolerancia a la glucosa (Jéquier, 2002). Por tanto, podemos afirmar que esta dosis originó cambios significativos que tienden a mejorar el estado metabólico de las ratas diabéticas.



**Figura 28.** Insulina sérica durante el periodo experimental. Valores Medios y DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). (a) diferente del control;  $P < 0.05$

Las ratas diabéticas presentaron un nivel de insulina sérica inferior al observado en el grupo control, debido a la destrucción de las células  $\beta$  causada

por la estreptozotocina, lo que explica que el tratamiento con vanadio no tuviese efecto sobre los niveles circulantes de insulina (Tabla 6; Figura 28).

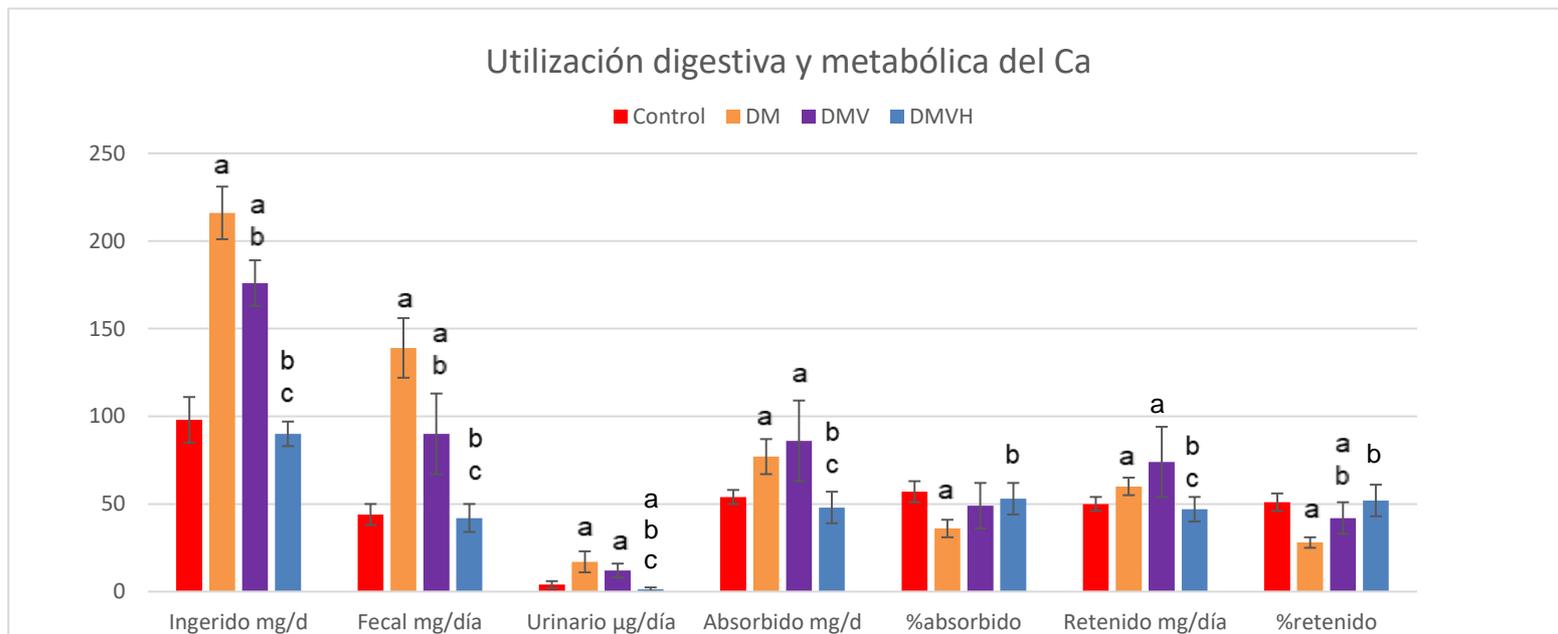
### **5.1.2. Sobre el Ca**

#### **5.1.2.1. Efecto del tratamiento con BMOV(IV) a ratas diabéticas sobre la utilización digestiva y metabólica del Ca (Tabla 8; Figura 29).**

Las ratas control (Grupo C), muestran unos niveles de absorción y retención de calcio ligeramente superiores a los encontrados en publicaciones anteriores de nuestro Departamento (Lisbona et al., 1999; Haro et al., 2000). Posiblemente estas diferencias se deban a la diferente edad de las ratas y a los diferentes modelos experimentales empleados en estos estudios.

Las ratas diabéticas (DM) mostraron un incremento de la ingesta de Ca como consecuencia de la hiperfagia ocasionada por la enfermedad. Esta circunstancia justifica la mayor absorción neta (absorbido, Figura 29) encontrada en este grupo. Sin embargo, cuando la absorción la expresamos como porcentaje del Ca ingerido, se encontró un descenso significativo de este parámetro, cuando se comparan con las ratas control (C). Esto podría deberse a que la diabetes produzca una inhibición parcial en la absorción de Ca o a un proceso adaptativo del aparato digestivo a las mayores ingestas. La mayor absorción neta de Ca va acompañada de unas mayores pérdidas urinarias del catión, debido a que la poliuria, que acompaña a la diabetes, causa un incremento de la filtración glomerular y un descenso de la reabsorción tubular. Estas mayores pérdidas urinarias explican que aunque la retención neta (retenido, Tabla 8) incrementa, cuando se expresa como porcentaje de la ingesta, el valor obtenido es inferior al control. Se ha descrito que la diabetes tipo 1 inhibe la absorción intestinal de Ca (el cual tiende a normalizarse con el tiempo debido a mecanismos adaptativos) y ocasiona incrementos de la excreción urinaria por diuresis osmótica, la cual puede conducir a un hiperparatiroidismo secundario (Rivoira et al., 2015). Las pérdidas urinarias de Ca justificarían los menores niveles séricos del elemento en este grupo (DM) cuando se comparan con los controles (C) (Tabla 7). El hiperparatiroidismo secundario podría dar lugar a un descenso de la expresión del factor de

crecimiento semejante a la insulina -1 (IGF-1), que podría causar una caída del reclutamiento de osteoblastos durante la formación del hueso (El-Maraghy y Mehana, 2015)..



**Figura 29 .Valores Medios  $\pm$  DS; DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente de C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV.  $P < 0.05$ .**

El tratamiento con 1mgV/día (grupo DMV), causa un descenso significativo de la ingesta de alimento, y en consecuencia de calcio, pero no modifica substancialmente la absorción y la retención neta de ión cuando se compara con las ratas diabéticas (DM). Sin embargo, el tratamiento produjo un incremento (no significativo) del porcentaje de absorción, aproximándolo a los valores controles, y un incremento significativo del porcentaje de calcio retenido frente al grupo DM. Estos resultados pueden estar ocasionados por el descenso de la excreción fecal del catión causada por el vanadio.

El tratamiento con 3mgV/día (grupo DMVH), disminuye significativamente la ingesta de alimento, y por tanto de calcio, así como las pérdidas fecales cuando se compara con los grupos DM y DVM, alcanzando valores próximos a los controles, Además, las pérdidas urinarias en este grupo,

fueron significativamente menores que las encontradas en el resto de grupos estudiados (C, DM y DMV). El resultado final de los efectos descritos, fue un descenso del calcio absorbido y retenido, acercándose a los valores control. La drástica reducción de la ingesta, probablemente fue la causa principal de la caída en la absorción del ión, ya que no se apreciaron interacciones Ca-V a nivel digestivo. Sin embargo, la fuerte reducción de las pérdidas urinarias producidas por el tratamiento pudo ser la causa del incremento del porcentaje de retención, comparado con las ratas diabéticas no tratadas (DM). Estos resultados ponen de manifiesto que el vanadio causa un incremento en la reabsorción renal de calcio. Esta hipótesis se encuentra apoyada por la correlación lineal negativa entre la ingesta de vanadio y la excreción urinaria de calcio ( $r = - ,370$ ;  $P < 0,05$ ).

**5.1.2.2. Efecto del tratamiento con BMOV(IV) a ratas diabéticas sobre el contenido de Ca en tejidos (Tabla 10; Figura 30).**

Iniciaremos este apartado comentando brevemente los cambios observados en la distribución de vanadio. Nuestros resultados muestran que los niveles de V en suero (Tabla 7) y tejidos de las ratas diabéticas no tratadas (DM) fueron superiores a lo de las ratas control (C), este hecho fue debido al mayor consumo de alimento del grupo DM. Esta situación condujo a un incremento de la absorción neta de V (C,  $0,23 \pm 0,11$   $\mu\text{g V/día}$  vs DM,  $0,64 \pm 0,26$   $\mu\text{g V/día}$ ;  $P < 0,01$ ) y retenido (C,  $0,06 \pm 0,14$   $\mu\text{g V/día}$  vs DM  $0,36 \pm 0,21$   $\mu\text{g V/día}$ ;  $P < 0,01$ ) (datos no publicados). El incremento de la retención, se asume que es la responsable del incremento de los niveles séricos y el contenido tisular de V encontrado en este grupo (DM). Por tanto, podemos considerar que la diabetes por si misma no altera la homeostasis del V y que los cambios apreciados se explican por los cambios en la ingesta de alimento.

La diabetes ocasiona una redistribución del Ca en los tejidos. Nuestros resultados muestran un incremento del contenido de calcio en el músculo esquelético y bazo, cuando se compara con el grupo control. Es conocido que la hipoinsulinemia causa un incremento de la glucogenolisis en el músculo esquelético, proceso en el que se encuentra involucrado el Ca, ya que promueve la conversión de fosforilasa(b) a la forma más activa fosforilasa(a), la

cual causa la degradación del glucógeno almacenado en glucosa. Este hecho podría contribuir a explicar los mayores niveles de Ca encontrados en el músculo esquelético.

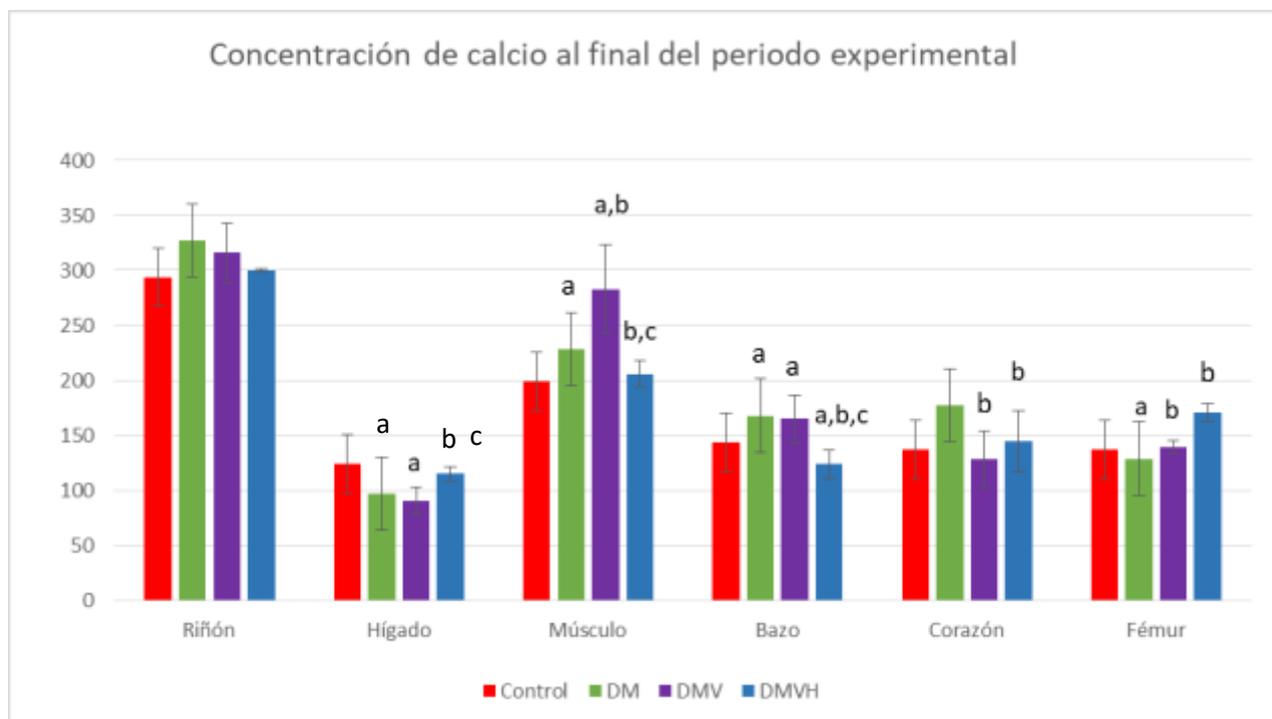


Figura 30. Valores Medios  $\pm$  DS; DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente de C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV.  $P < 0.05$ .

Por otro lado, se ha observado un descenso del calcio en suero (Tabla 7), hígado y hueso (Tabla 10) en las ratas diabéticas (DM) en relación al grupo control (C). Estudios previos han sugerido que en ratas en la que se ha inducido la diabetes con STZ, se produce un incremento de las pérdidas óseas relacionadas con una mayor osteoclastogénesis junto a un descenso en la osteoblastogénesis (Hie y Tsukamoto, 2010). Estos efectos podrían estar relacionados con el fuerte incremento que experimenta la expresión genética de la osteopontina (OPN) en la diabetes (Tabla 12, Figura 31). Durante la mineralización del hueso, la OPN inhibe la formación de hidroxiapatita. La asociación entre la expresión de OPN y la formación de cristales sugieren la participación de esta, en el proceso de mineralización inhibiendo la nuclearización y crecimiento del cristal (Sodek et al., 2000). Se ha puesto de manifiesto que la OPN incrementa la resorción ósea (Tanabe et al., 2011). En

nuestro caso, el descenso de los niveles circulantes de Ca podría haber sido la causa primaria del incremento de la secreción de la OPN. La hipocalcemia es un factor estimulante de la expresión de la OPN y resorción ósea (Kasugai et al., 1991).

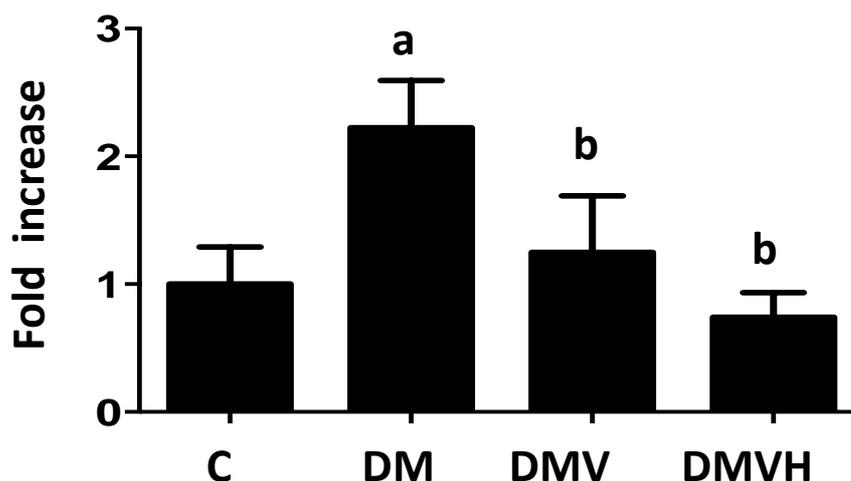


Figura 31. Expresión del RNAm de la osteopontina Valores Medios y DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). (a) diferente del control (C); (b) diferente de diabéticas no tratadas (DM);  $P < 0.05$

El aumento del contenido de calcio en diversos tejidos (músculo esquelético, riñones e hígado) también ha sido observado en ratas diabéticas tipo 2 (Takita et al., 2004). Las diferencias encontradas entre la mencionada publicación y nuestros resultados podría ser una consecuencia de los diferentes modelos animales utilizados y/o diferente tipo de diabetes.

El tratamiento a las ratas diabéticas con 1mgV/día (DMV) incrementa el contenido de Ca en el músculo esquelético y fémur y lo disminuye en el corazón (Figura 30), sin cambios significativos en los otros tejidos estudiados, cuando se comparan con las ratas diabéticas no tratadas. Se conoce que los compuestos de vanadio presentan diversos e interesantes efectos osteogénicos debido a sus acciones sobre la diferenciación y mineralización de

componentes de la matriz en la células óseas y formación del colágeno. Diversos estudios han puesto de manifiesto como los diferentes compuestos de vanadio pueden mejorar las alteraciones óseas producidas por la diabetes, además de mejorar la evolución de la enfermedad (Facchini et al., 2006; Etcheverry et al., 2012).

Los niveles de Ca sérico en este grupo (DMV) incrementan ligeramente alcanzando valores semejantes a los del grupo control (Tabla 7). En nuestra opinión, el incremento del Ca circulante sería el causante del descenso en la expresión de la OPN observada en este grupo (Tabla 12; Figura 31), que como el Ca sérico se aproxima a los valores control. Esta circunstancia facilitaría la deposición de calcio en los tejidos mencionados (músculo y hueso). Por tanto, podemos decir que el tratamiento mejoró ligeramente las alteraciones en la homeostasis del Ca causadas por la diabetes.

El tratamiento con 3mgV/día, (grupo DMVH) incrementa los niveles séricos de Ca (Tripathi et al., 2019), alcanzando los del grupo control (Tabla 7) y superiores a los de grupo diabético no tratado (DM). Como se ha indicado en el apartado anterior (5.2.), el vanadio disminuye fuertemente las pérdidas de Ca en orina, lo que justificaría los incremento séricos. La correlación lineal positiva entre los niveles circulantes de V y Ca (Tabla 11) apoyan estos comentarios. Además, esta correlación sugiere la existencia de una relación dosis-efecto.

Krosniniak et al. (2013a) observaron que el tratamiento con diferentes compuestos de vanadio a ratas diabéticas mantenía el contenido de calcio en el riñón en valores semejantes a los encontrados en las ratas diabéticas no tratadas. Sin embargo, en otro estudio observaron que los compuestos ensayados incrementaban el contenido de Ca en el bazo (Krośniak et al., 2013b). En nuestro estudio este grupo (DMVH) no solo se produce una normalización de la de la glucemia (Sánchez-González et al., 2012a), también se produce un retorno del contenido de Ca en los tejidos a valores próximos a los controles (C), excepto en el bazo que se mantiene en valores superiores.

La exposición a estos niveles de vanadio conduce a un mayor descenso de los niveles de OPN (Tabla 12; Figura 31), aunque dicha caída no presenta

diferencias significativas con la que se produce en el grupo DMV. Sin embargo, este hecho también apoya la existencia de una relación dosis-efecto, como se discutió anteriormente. La relación inversa entre vanadio ingerido y vanadio sérico con la expresión de OPN ( $r = - ,413$  y  $r = - ,448$  respectivamente;  $P < 0,05$  en ambos casos) avala nuestra hipótesis. La inhibición de la secreción de OPN tras el tratamiento con vanadio puede ser un importante factor regulador de las alteraciones del metabolismo del Ca producida por la diabetes. Actualmente se ha sugerido que los implantes ortopédicos que contienen vanadio pueden mejorar la formación del hueso (Srivastava et al., 2014).

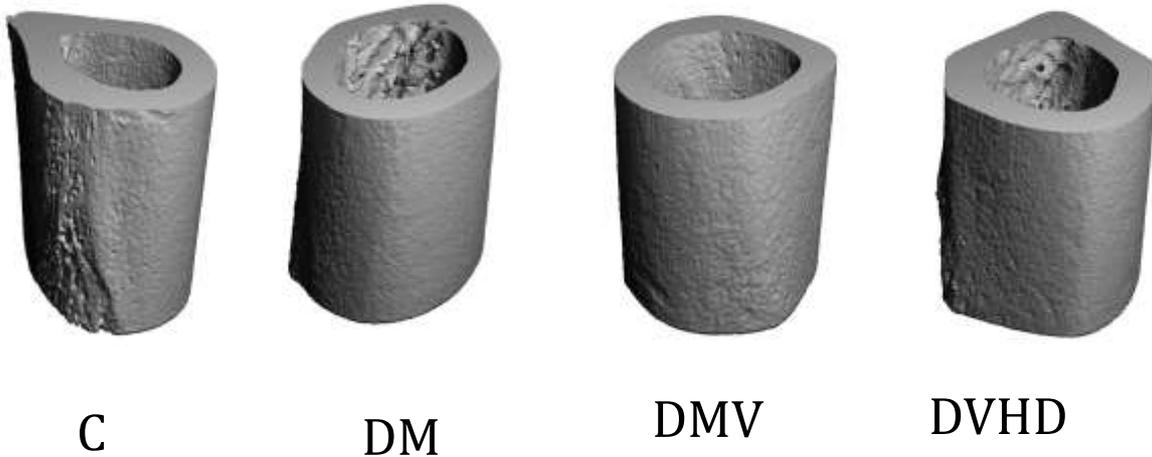
Además de los resultados descritos en el presente trabajo, en publicaciones previas, nuestro grupo, ha observado que la diabetes causa un incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y que el tratamiento con 3mgV/día normalizaba dichos valores (Bermúdez-Peña et al., 2013). El descenso en la actividad de dicha enzima favorece la formación del hueso. Cortizo et al., (2006) encontró que el complejo vanadil(IV)-ascorbato estimula la producción de colágeno en los osteoblastos e inhibe la actividad de la fosfatasa alcalina en cultivos celulares.

Por otro lado, también hemos observado incrementos en los niveles circulantes de triglicéridos en ratas diabéticas, los cuales retornan a los valores control tras el tratamiento con 3mgV/día (Bermúdez-Peña et al., 2013). Se ha descrito una marcada correlación entre los niveles de triglicéridos y los de OPN (Kiefer et al., 2011).

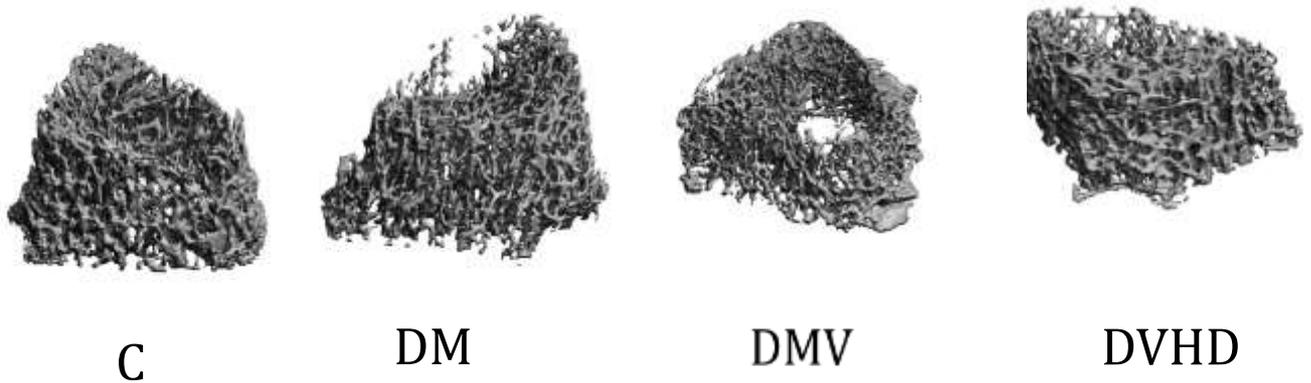
### ***5.1.2.3. Efecto del tratamiento con BMOV(IV) a ratas diabéticas sobre la microestructura del hueso (Tabla 13; Figura 32).***

El análisis de tomografía computarizada (micro CT), permite la reconstrucción del hueso trabecular y cortical en tres dimensiones y proporciona información sobre la formación del hueso y mineralización. Se ha sugerido que la fuerza del hueso correlaciona con la densidad del volumen óseo (BV/TV), además, la correlación incrementa considerablemente cuando BV/TV es ajustada por otros índices como el número de trabéculas (Tb.N) y el espesor trabecular (Tb.Th) (Ulrich et al., 1999).

## Diaphysis



## Metaphysis



*Figura 31. Cambios en la microarquitectura del hueso (diáfisis y metáfisis), C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). (Tomado de Sánchez-González et al., 2017).*

La diabetes tipo 1 se ha asociado con un descenso de la densidad mineral del hueso en muchos estudios, aunque no en todos (Zhang et al., 2007).

A nivel del hueso trabecular (metáfisis), la diabetes induce una significativa reducción en BT/TV, Tb.Th y la densidad media de TV. El

tratamiento con la dosis más baja de vanadio (grupo DMV), no da lugar a cambios significativos cuando se compara con el grupo de ratas diabéticas no tratadas. Sin embargo, el tratamiento con la mayor dosis (DMVH) produce una gran mejora de la densidad del volumen total (TV) a nivel de la metáfisis. Wang et al., (2012), encontró que el vanadio absorbido por *Coprinus comatus* en ratas diabéticas mejoraba la microestructura trabecular.

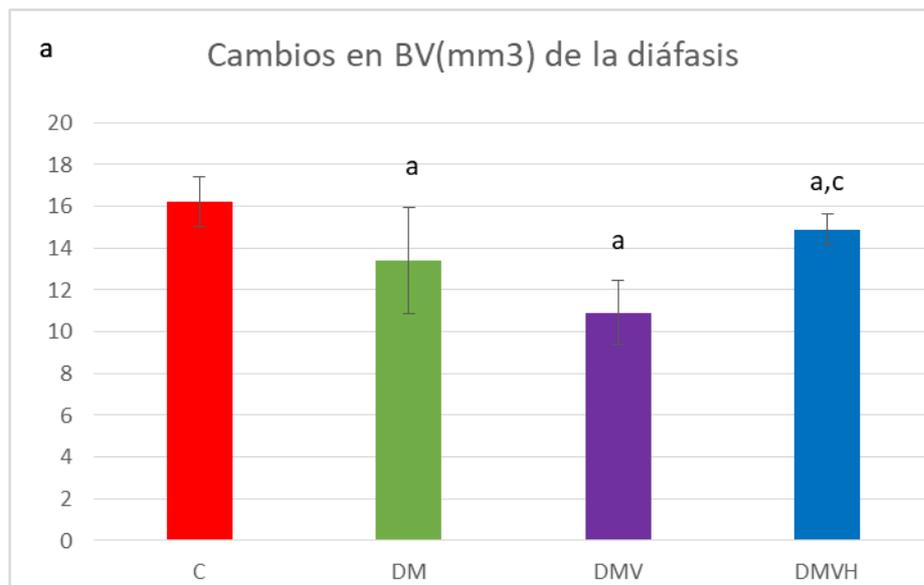


Figura 32. Volumen óseo (BV) Valores Medios  $\pm$  DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente de C; c- Diferente de DMVH.  $P < 0.05$

A nivel del hueso cortical (diáfisis), la menor dosis se comporta de un modo semejante al descrito para el del hueso trabecular, mientras que la dosis más alta, en términos generales, ocasionó una aproximación de los parámetros estudiados a los valores control, destacando la recuperación observada en el volumen óseo (BV).

Estos resultados sugieren que el vanadio, como agente terapéutico puede mejorar la microestructura del hueso al restaurar los desórdenes ocasionados por la diabetes (Srivastawa et al., 2014), especialmente a nivel de la microarquitectura cortical.

Modelos animales y celulares han permitido conocer una compleja red de interacciones entre el hueso, tejido adiposo e hígado, modulada a través de

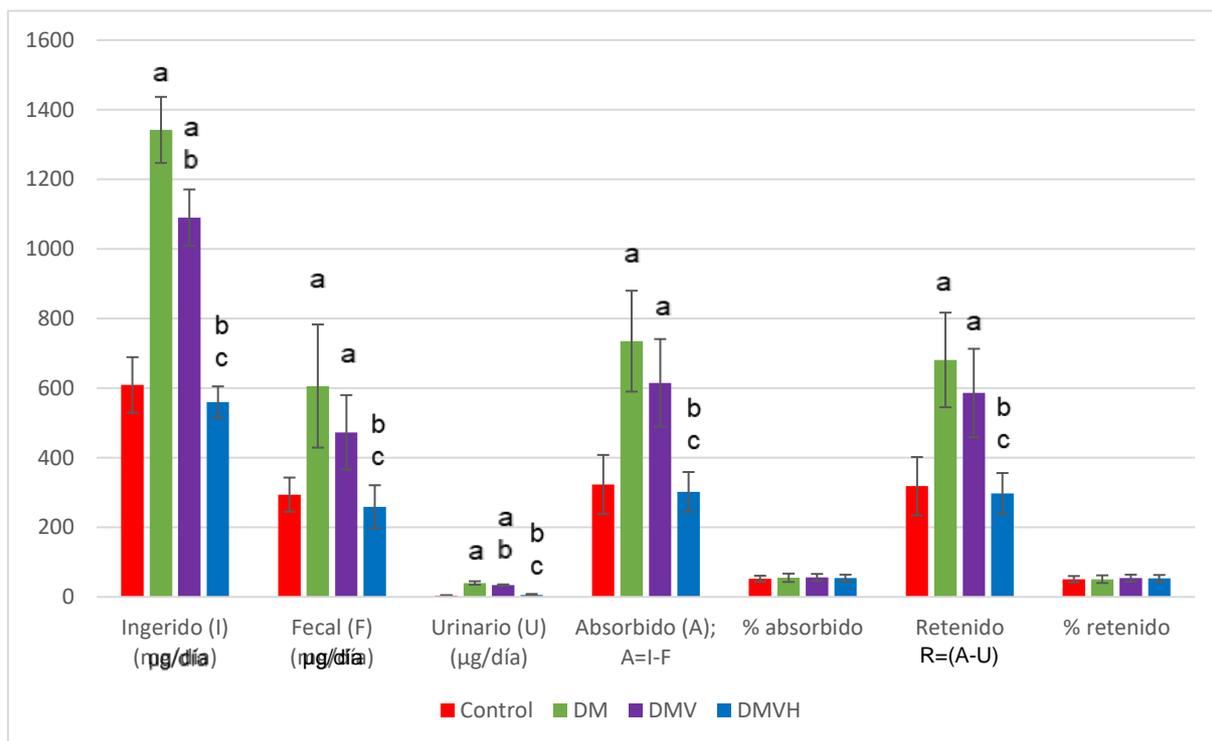
la secreción de citokinas pro/anti-inflamatorias y hormonas (Musso et al., 2013). A nivel del hueso la OPN incrementa la resorción ósea al estimular la expresión de los osteoclastos directamente mediante el reclutamiento de estas células desde la matriz extracelular del hueso. La activación de los osteoclastos incrementa la resorción ósea, lo cual da lugar a un incremento de la liberación de OPN desde la matriz extracelular hacia el hueso circundante y hacia la circulación, perpetuando de este modo las acciones locales y sistémicas de la OPN (Confavreux, 2011). En el hueso la OPN se encuentra asociada con los procesos de mineralización, tiene la capacidad de unirse directamente a la hidroxiapatita siendo un potente inhibidor del crecimiento del cristal (Murali et al., 2016), lo que produce el bloqueo su deposición sobre el colágeno I (Hunter et al., 2013). Por tanto, parece que la OPN es uno de los grupos de proteínas que previenen la formación de cristales en los tejidos.

De acuerdo con el papel inhibitorio de la OPN en el proceso de mineralización, y la asociación entre su incremento a nivel sérico con un empeoramiento de la mineralización ósea (Yuan et al., 2014), sugerimos que, en nuestro estudio, existe una falta de mineralización del hueso en las ratas diabéticas que es mejorado y restaurado tras el tratamiento con vanadio.

### **5.1.3. Sobre el Zn.**

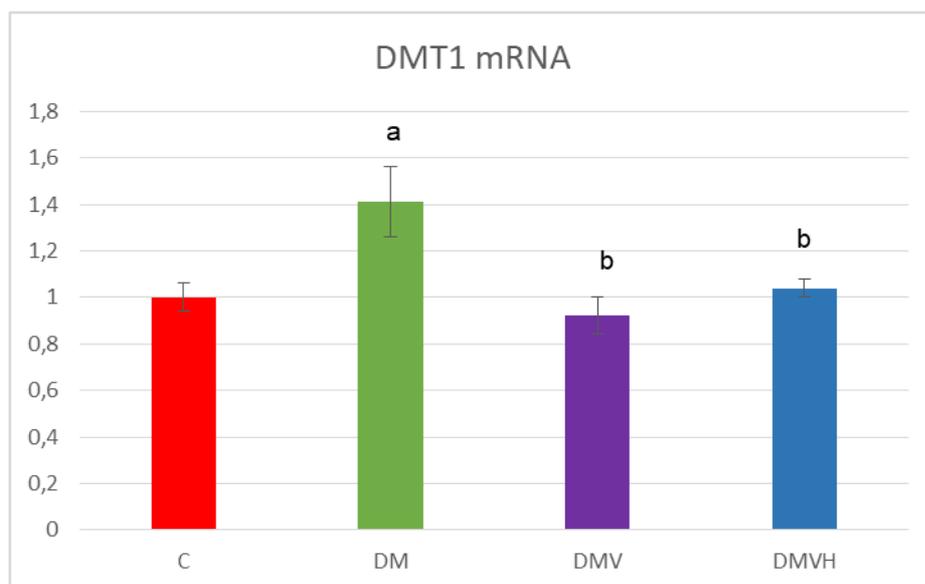
#### **5.1.3.1. Efecto del tratamiento con BMOV(IV) a ratas diabéticas sobre la utilización digestiva y metabólica del Zn (Tabla 9; Figura 34).**

Nuestros resultados muestran que las ratas control (grupo C) presentaron una utilización digestiva y metabólica semejante a la observada en publicaciones anteriores en ratas (Planells et al., 1994; Rodríguez-Matas et al., 1997). El porcentaje de absorción encontrado en nuestros ensayos se encuentra dentro del descrito en estudios realizados en humanos (Ribeiro et al., 2012; Wegmuller et al., 2014) y a los descritos para una población de edad avanzada a la que se suministra una dieta tradicional china (Li et al., 2017).



**Figura 34. Utilización digestiva y metabólica del cinc.** Valores Medios  $\pm$  DS; DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente de C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV.  $P < 0.05$ .

Las ratas diabéticas (DM), como ocurre con el Ca, mostraron un incremento de la ingesta de Zn derivada de la hiperfagia ocasionada por la diabetes, lo que justifica el incremento de la absorción neta (absorbido, Figura 34) encontrada en este grupo. Sin embargo, cuando la absorción la expresamos como porcentaje del Zn ingerido, no se aprecian cambios significativos al comparar con las ratas control (C), aunque si se aprecia una tendencia a incrementar. Este hecho pone de manifiesto que los cambios observados en la absorción de Zn en este grupo (DM), se deben únicamente al incremento de la ingesta y que la diabetes no ha afectado la absorción intestinal de Zn.



*Figura 35. Cambios en la expresión genética del transportador de metales divalentes (DMT1) en riñón (%) Valores Medios  $\pm$  DS; C (ratas control); DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente de C; b- Diferente de DM.  $P < 0.05$ .*

Como en el caso del Ca la mayor absorción neta de Zn estuvo acompañada de unas mayores pérdidas urinarias del catión, debido al incremento de la filtración glomerular que causa la poliuria que acompaña a la diabetes, a pesar de que la enfermedad ocasiona un incremento en la expresión del transportador de metales divalentes (DMT1) presente en el asa de Henle y túbulos colectores del riñón (Davenport, 2015) (Tabla 14, Figura 35). El incremento en la expresión del DMT1, en nuestra opinión, tendería a minimizar las pérdidas renales del catión asociadas a la poliuria y ayudaría a evitar la depleción corporal de este elemento que ocurre con otros minerales. Este hecho queda reflejado en que cuando el Zn retenido lo expresamos como porcentaje de la ingesta, el valor obtenido, a diferencia del Ca que disminuía (Tabla 8; Figura 30), es ligeramente superior al control, aunque dichas diferencias no son significativas. Estos cambios en la retención del elemento pueden explicar que los niveles séricos del elemento incrementen (Tabla 7).

El tratamiento con 1mgV/día (grupo DMV), causa un descenso significativo de la ingesta de alimento, y en consecuencia de cinc cuando se compara con las ratas diabéticas (DM), pero, aunque también tiende a incrementar no modifica significativamente el porcentaje de absorción, lo que nos indicaría que, como en el caso de las ratas diabéticas, los cambios en la absorción neta, comparados con los del control (grupo C), se deben exclusivamente a cambios en la ingesta del ión. En este grupo de ratas encontramos que el tratamiento ocasiona un descenso en la expresión del DMT1 renal vs a las ratas diabéticas (DM), acercándose a los valores control (C) (Figura 35). Esta caída explicaría que este grupo (DMV) presente un porcentaje de excreción urinaria de cinc en relación al Zn ingerido, ligeramente superior al de las ratas diabéticas (6% vs 7%). Estos pequeños cambios en la retención del elemento, en nuestra opinión, pueden justificar que los niveles séricos del elemento incrementen en comparación con el grupo control y se mantengan en valores semejantes a los de las ratas diabéticas (Tabla 7). La correlación lineal positiva entre el Zn retenido y el Zn sérico apoyan la hipótesis comentada ( $r = ,896$ ;  $P < 0,01$ ).

Por otro lado, se ha descrito que el tratamiento con metavanadato sódico disminuye la expresión del DMT1 a nivel renal, pero no en el hígado ni en los hemisferios cerebrales (Scibior et al., 2014). Este transportador se encuentra también presente en los enterocitos del intestino delgado (Gunshin et al., 1997; Ghio et al., 2005), sin embargo, no hemos observado cambios en la absorción, lo que nos hace pensar que la expresión del transportador en el intestino no ha sido alterada por la exposición a vanadio. En una publicación anterior no encontramos cambios en la absorción de Mn (catión que también es transportado por DMT1), en ratas sometidas al mismo tratamiento (1mgV/día) (Sánchez-González et al., 2014b). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el vanadio no modifica la expresión intestinal de DMT1.

El tratamiento con 3mgV/día (grupo DMVH), disminuye significativamente la ingesta de alimento, y por tanto la de cinc, así como las pérdidas fecales cuando se compara con los grupos DM y DVM, alcanzando valores semejantes a los controles, Además, las pérdidas urinarias en este grupo, fueron significativamente menores que las encontradas en los

mencionados grupos (DM y DMV). El resultado final de los efectos descritos, fue un descenso del cinc absorbido y retenido, aproximándose a los valores controles. La drástica reducción de la ingesta, probablemente fue la causa principal de la caída en la absorción neta del ión, ya que no se apreciaron cambios significativos en el porcentaje de absorción del catión. Sin embargo, el porcentaje de pérdidas urinarias de cinc en relación a su ingesta, en este grupo (DMVH), sea ligeramente superior al de las ratas controles (1% vs 2%, respectivamente). Estos cambios en la excreción urinaria podrían haber participado en el descenso de los niveles séricos encontrados en este grupo y el ligero incremento del porcentaje de retención (2%) (Tablas 9).

No obstante, las altas correlaciones lineales positivas entre el alimento ingerido y niveles séricos de cinc, Zn absorbido y retenido ( $r = ,731$ ;  $r = ,793$  y  $r = ,774$  respectivamente;  $p < 0,01$  en todos los casos) indican que la utilización digestiva y metabólica de este elemento parece encontrarse asociados fundamentalmente a la ingesta del catión. En una publicación anterior de nuestro grupo también observamos cambios en los niveles plasmáticos de Zn asociados a los cambios en la ingesta (Planells et al., 1994).

#### ***5.1.3.2. Efecto del tratamiento con BMOV(IV) a ratas diabéticas sobre el contenido de Zn en tejidos (Tabla 11).***

La diabetes ocasiona un incremento del contenido de Zn en todos los tejidos estudiados excepto en el corazón. Como se ha comentado en el apartado anterior, en las ratas diabéticas se aprecia un aumento del cinc sérico directamente asociado al alimento ingerido y por tanto, a la mayor ingesta del catión. Pensamos que este aumento es el responsable del aumento de la concentración de Zn en los tejidos en este grupo experimental (DM). Las correlaciones positivas entre la ingesta de alimento y contenido de Zn en riñón, hígado, músculo y fémur, avalan estos comentarios (Tabla 12). Oster et al., (1993) también encuentran en ratas diabéticas incrementos tisulares de Zn, mientras que Gómez et al., (2017) no aprecian cambios significativos en hígado y riñón. Recientemente (Karganov et al., 2020) ha puesto de manifiesto en ratas diabéticas, incrementos del contenido renal de Zn y tendencias a

aumentar en hígado y plasma, mientras que en el corazón tendía a disminuir, resultados que se asemejan a los encontrados en nuestro trabajo.

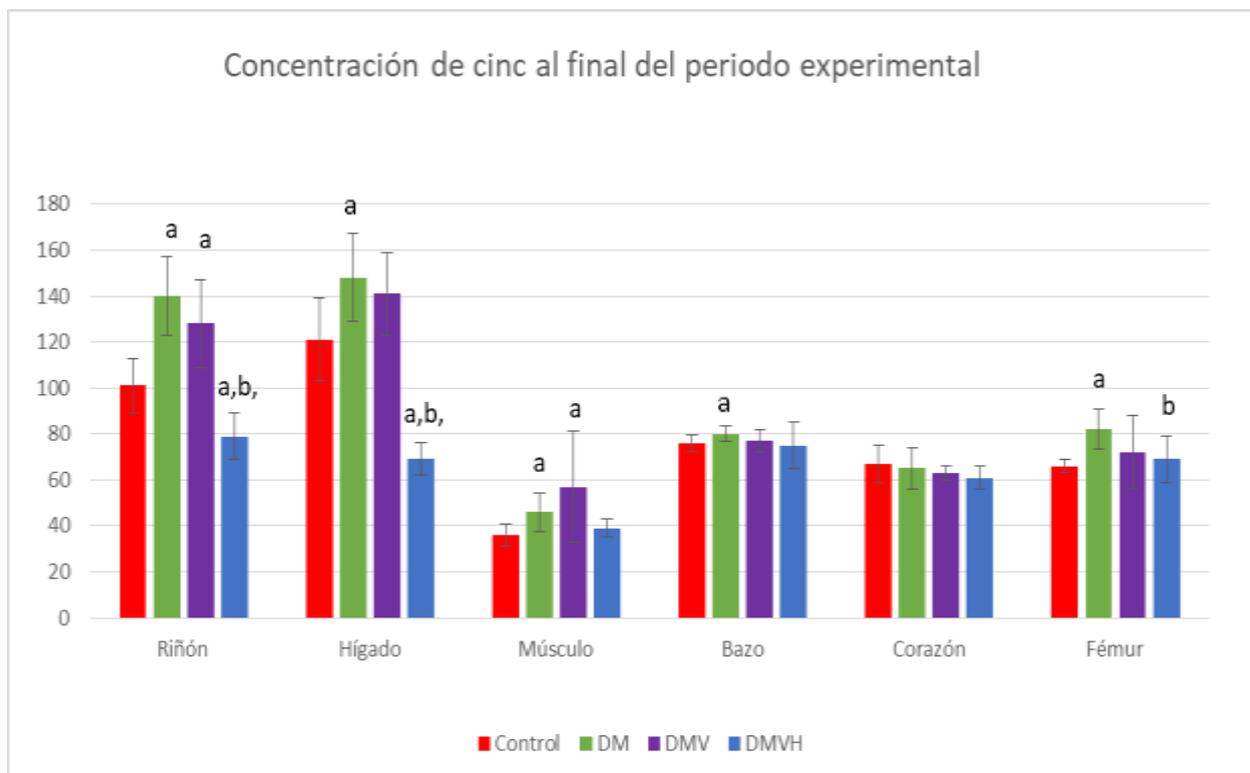


Figura 36. Valores Medios  $\pm$  DS; DM (ratas diabéticas STZ); DMV (ratas diabéticas tratadas con 1mg V/día); DMVH (ratas diabéticas tratadas con 3mg V/día). Valores expresados como media  $\pm$  desviación típica. a - Diferente de C; b- Diferente de DM; c- Diferente de DMV.  $P < 0.05$ .

Nuestro grupo ha encontrado incrementos de los contenidos tisulares de elementos traza en ratas diabéticas, asociados a la ingesta del elemento en el caso del Se (Sánchez-González et al., 2012a) y del Fe (Sánchez-González et al., 2014a). Sin embargo en el caso del Mg, en las ratas diabéticas no se aprecia dicha asociación, permaneciendo los contenidos tisulares del catión en valores próximos a los controles o tendiendo a disminuir (Bermúdez-Peña et al., 2013).

El incremento de los niveles circulantes de Zn cuando las ratas se exponen a la menor dosis de vanadio (grupo DMV), no dan lugar a un incremento significativo de su depósito en todos los tejidos, como ocurría con en las ratas diabéticas (DM). En este grupo solo apreciamos incrementos significativos en el riñón y músculo. Scibior et al., (2014), en ratas sanas

tratadas con metavanadato sódico observan un descenso del contenido de Zn en el hígado y no encuentra cambios significativos en el riñón, bazo y hemisferios cerebrales. Aunque esta publicación muestra diferencias con nuestros resultados, este hecho posiblemente se deba a los diferentes diseños experimentales, compuesto de vanadio y dosis utilizadas.

En principio podemos pensar que estos resultados se contradicen con que en este grupo la retención del catión es un 3% superior al de las ratas control y un 2% al de las diabéticas no tratadas. Pero no debemos olvidar que los resultados son parciales, ya que no se han analizado todos los tejidos corporales y el tratamiento podría haber producido una redistribución por los diversos tejidos.

Esta dosis aunque, como se ha comentado, no presenta efectos metabólicos sobre la glucemia tiende a restaurar las alteraciones en la homeostasis del cinc ocasionada por la diabetes.

En trabajos anteriores se ha descrito que la exposición de ratas diabéticas a diversos compuestos de vanadio afecta el contenido tisular de diversos elementos, concretamente encuentran un descenso de los niveles de Zn en el riñón (Oster et al., 1993; Krosniak et al., 2013a) y un incremento en el bazo (Krosniak et al., 2013b), cuando se comparan con las ratas diabéticas no tratadas. Estos resultados coinciden con los encontrados en nuestro estudio para el riñón, pero no en el caso del bazo que en nuestro caso no presenta cambios significativos cuando se compara con las diabéticas no tratadas (DM). En general se percibe que el vanadio tiende a disminuir el contenido tisular de Zn.

La ingesta de 3mgV/día conduce a un descenso de los niveles séricos (Tabla 7). Sin embargo, en una reciente publicación no observan cambios en los niveles plasmáticos de Zn en terneras tratadas con vanadio (Pal et al., 2018). Estas diferencias se pueden deber a los diferentes especies empleadas en los estudios.

Los descensos en el Zn sérico que pueden explicar el descenso del contenido de Zn en riñón e hígado y que no se encuentren variaciones

significativas en el resto de tejidos estudiados cuando se comparan con las ratas control. En términos generales encontramos que los depósitos de Zn en los tejidos se encuentran positivamente correlacionados con los niveles séricos de este elemento (Tabla 11).

Los resultados expuestos nos indican que la mayor dosis, además de devolver la glucemia a los valores control, también permite una casi completa restauración de los cambios provocados por la diabetes en la utilización digestiva y metabólica del Zn.

## **5.2. ESTUDIOS “IN VITRO”.**

En estudios anteriores (Rivas-García et al., 2020) ensayamos la solubilidad y la estabilidad del compuesto empleado en nuestros estudios (BMOV) en el medio de cultivo. Los resultados de la resonancia magnética nuclear (NMR) mostraron que el compuesto es estable durante varios días sin mostrar signos de descomposición ya que cuando el compuesto se disolvió en el medio de cultivo, no se observaron las señales correspondientes al ligando (maltol). También se estudiaron las interacciones “ex vivo” entre el BMOV y la transferrina, observándose la capacidad del compuesto para interactuar con ligandos biológicos y penetrar en el medio interno. En este mismo estudio también abordamos la viabilidad de células HepG2 a cuatro concentraciones de vanadio (350, 750, 1500 y 3000 µg/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 el tiempo de exposición (32 h) se determinó la viabilidad celular usando el método MTT.

Los resultados obtenidos en los ensayos de exposición a BMOV durante 32h muestran una caída significativa de la viabilidad celular respecto a los controles a partir de la dosis de 750 µgV/L (Figura 37). Estos resultados, indican que el tratamiento con las tres dosis superiores presenta efectos tóxicos sobre las células hepáticas, lo que 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., 2014<sup>a</sup>).

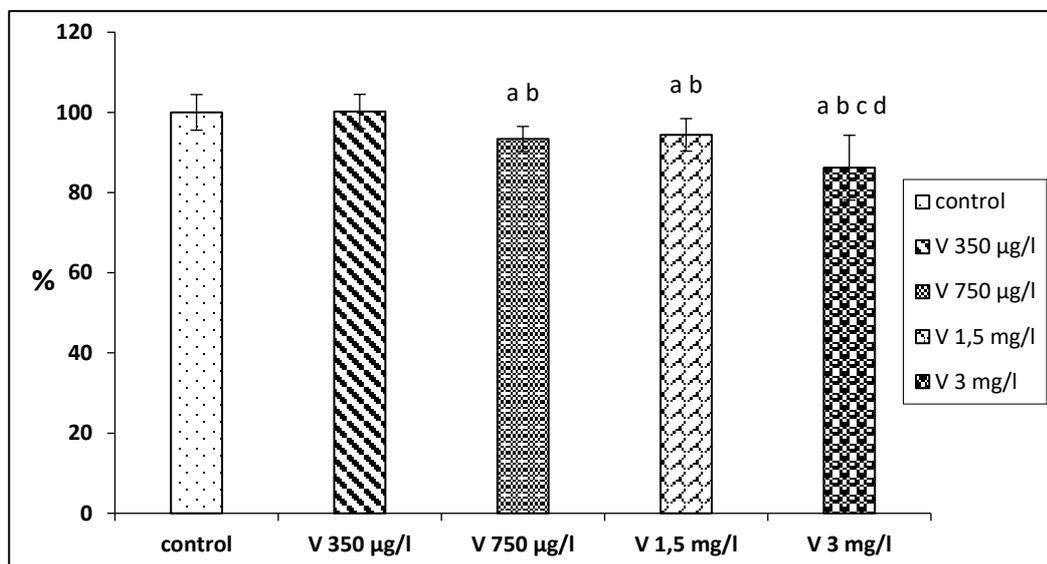


Figura 37. Viabilidad celular de la línea HepG2 según el ensayo MTT tras someterlas a diferentes concentraciones de V durante 32 h (Tomado de Rivas-García et al., 2020).

(a) Control vs concentración 750 µg V/Lo concentración 1,5 mg V/Lo concentración 3 mg V/L; (b) Concentración 350 µg V/L vs concentración 750 µg V/L o concentración 1,5 mg V/Lo 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 (Tomado de Rivas-García et al., 2020)

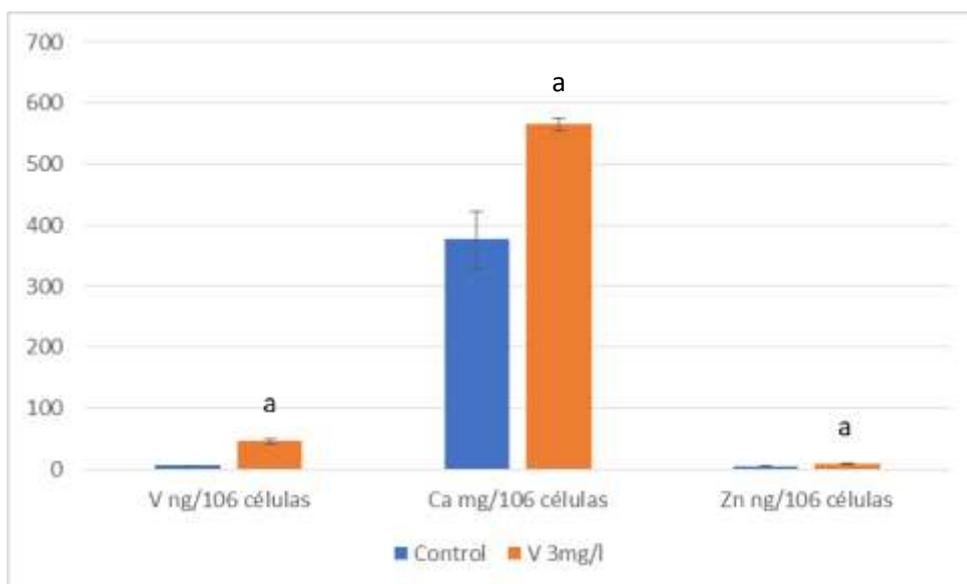
### 5.2.1. Sobre la captación de Ca y Zn por células HepG2 tras 32 horas de exposición a BMOV(IV) (T1tabla 6).

Es conocido que el calcio y el cinc se transportan a través de la membrana celular por distintos sistemas de transportadores (ver introducción apartados 2.3.2. y 2.4.3.). Sin embargo, existe poca información sobre la capacidad del vanadio para modificar la captación de ambos elementos. Del mismo modo se desconoce si la sobreexposición a vanadio puede alterar la funcionalidad de los transportadores.

En la revisión realizada en el presente estudio, no se ha encontrado información relativa sobre posibles alteraciones en el comportamiento y/o

cambios en la expresión de transportadores para calcio y en el caso del cinc se ha descrito muy poca información (Scibior et al., 2014; Ghio et al., 2015)

Para la realización de este estudio empleamos la dosis más alta utilizada en los experimentos de viabilidad celular (3mgV/L), la cual ocasionaba un claro descenso de la viabilidad celular.



*Figura 38. Contenido de V, Ca y Zn en el medio de cultivo y células HepG2 expuestas a 3 mg/L de V durante 32 h. Valores medios  $\pm$  DS. a-diferente de C.  $P < 0,05$ .*

Los resultados encontrados muestran que la incorporación del BMOV al medio de cultivo produce un incremento significativo del contenido celular de los dos elementos estudiados. Un 830 % para el V, un 49% para el Ca y un 60% en el caso del Zn (Tabla 15; Figura 38).

Se conoce que el DMT1 también transporta V (como  $V^3$  o  $VO^{2+}$ ) (Mackenzie et al., 2007; Ngwa et al., 2009). Sin embargo, es poco conocida la capacidad del V para bloquear o modificar la expresión del transportador. Como se ha comentado, Scibior et al., (2014) en ratas tratadas con metavanadato sódico. aprecian un descenso de la expresión del transportador en riñón pero no en hígado y cerebro. Sin embargo Ghio et al., (2015) han

encontrado un incremento de la expresión de DMT1 en el epitelio bronquial humano tras la exposición a VOSO<sub>4</sub>.

Los resultados sobre la expresión del transportador DMT1, muestran que a nivel renal el tratamiento con 3mgV/día no la modifica (Tabla 14), lo que nos permite pensar que tampoco lo hizo a nivel hepático, lo que indicaría que la captación de V posiblemente se ha realizado mediante difusión pasiva, siguiendo el diferente gradiente de concentración entre ambos lados de la membrana.

En el caso del calcio estos resultados no coinciden completamente con los encontrados en el estudio de la utilización digestiva y metabólica, donde observamos que el tratamiento con 3mgV/día no incremento la absorción intestinal del catión ni el contenido en los tejidos a excepción del músculo esquelético, cuando los comparamos con las ratas control (Tablas 8 y 11). Los diferentes resultados encontrados podrían deberse a las diferentes circunstancias experimentales. No obstante, hay que indicar que el estudio “in vitro” se realizó en células hepáticas (HepG2) y si nos centramos en el hígado de las ratas del grupo DMVH, comprobaremos que aunque el contenido de calcio en este órgano no difiere significativamente del encontrado en las ratas control, si se aprecia un incremento significativo cuando lo comparamos con las ratas diabéticas no tratadas. Este hecho indicaría que a esta dosis el vanadio ha facilitado la entrada del calcio en el hepatocito, lo que coincide con los resultados obtenidos “in vitro”. Lo que nos permite pensar que la exposición a vanadio ha modificado el estatus de los sistemas de transporte de calcio.

Con respecto al cinc, se conoce que el transportador de metales divalentes-1 (DMT1) es un transportador importante para la captación celular de este elemento (Gunshin et al, 1997).

El incremento del contenido en Zn, tras la exposición a V podría deberse a la participación conjunta de varios procesos. Por un lado, un incremento en la expresión de otros transportadores de membrana no DMT1 (ZIP y/o ZnT) lo que favorecería la captación del elemento. Por otro lado, se ha descrito en estudios realizados “in vitro” que la hepcidina reduce la salida del Zn de la célula, al disminuir la expresión del transportador ZnT1 pudiendo favorecer los

procesos inflamatorios (Hennigar y McClung, 2016). La hepcidina es un péptido sintetizado principalmente en los hepatocitos que inhibe el eflujo de hierro dependiente de ferroportina, la unión de la hepcidina a la ferroportina provoca su internalización y degradación de la ferroportina (Ganz and Nemeth, 2006, 2011). Nuestro grupo ha encontrado que el V incrementa la expresión de la hepcidina en las células hepáticas de ratas no diabéticas y que dicho proceso va acompañado de un incremento del estrés oxidativo e inflamatorio, (Sánchez-González et al., 2012b; Sánchez-González et al. 2014a), circunstancia que dificultaría la salida de Zn, facilitando el depósito del metal en las células,. El incremento de la expresión de la hepcidina hepática no se ha observado en las ratas diabéticas tratadas con vanadio (datos no publicados). Posiblemente este hecho explique que en las ratas diabéticas tratadas con 3mgV/día (grupo DMVH) no se aprecien incrementos del contenido de Zn en los tejidos estudiados (Tabla 11).



## 6. CONCLUSIONES

## **Sobre los estudios “In vivo”**

### **Sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del calcio**

**1<sup>a</sup>.**- El tratamiento a ratas diabéticas con 6,22 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día (1 mg V / día), no ejerció ningún efecto antidiabético pero corrigió, en parte, las alteraciones en la absorción y retención del calcio ocasionadas por la diabetes, lo que permitió recuperar el contenido de calcio de algunos de los tejidos estudiados.

**2<sup>a</sup>.**- La exposición a 18,66 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día (3 mg V / día) ejerce un claro efecto antidiabético, normalizando la glucemia en ayunas y la ingesta de alimento y restablece los cambios en la absorción, retención y contenido tisular del calcio producidos por la diabetes.

**3<sup>a</sup>.**- Los estudios de microarquitectura ósea permiten concluir que la diabetes inducida por estreptozotocina, produjo un empeoramiento del proceso de mineralización del hueso que fue mejorado y restaurado tras el tratamiento con 18,66 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día, proceso que se encontró favorecido por el efecto inhibitor del vanadio sobre la expresión de la osteopontina.

### **Sobre el efecto del tratamiento con vanadio sobre la homeostasis del cinc**

**4<sup>a</sup>.**- El tratamiento a ratas diabéticas con 6,22 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día no corrigió las alteraciones en la utilización digestiva y metabólica del cinc ocasionadas por la enfermedad. Mientras que el tratamiento con 18,66 mg de bis(maltolato)oxovanadio (IV) / día normalizó las alteraciones en la absorción y retención del catión presentes en las ratas diabéticas no tratadas.

**5<sup>a</sup>.**- La normalización en la utilización digestiva y metabólica ocasionada en respuesta al tratamiento con la dosis más alta ensayada (3mgV/día), permitió restablecer completamente los contenidos tisulares de cinc alterados por la diabetes

### **Sobre los estudios “In vitro”**

**6ª.-** La exposición de células de la línea HepG2 a 3 mg V / L durante 32 horas, ocasionó un incremento del contenido celular de calcio y cinc mediante mecanismos que actualmente desconocemos, por lo que proponemos la realización de futuros estudios que permitan saber si los cambios descritos se deben a alteraciones en el proceso de captación o de extrusión celular de ambos elementos.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFIA

- Abou-Seif MA, Youssef A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004, 346: 161-170.
- Almanza-Perez JC, Blancas-Flores G, Garcia-Macedo R, Alarcon-Aguilarb FJ, Cruz M. Leptina y su relacion con la obesidad y la diabetes mellitas tipo 2. *Gac Med Mex* 2008,144: 535–542.
- American Association of Diabetes. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care*. 2011. 34: 562-569.
- Assem FL, Oskarsson A. Vanadium. *Handbook on toxicology of metals (II)*. Elsevier. London. 2015, pp 1347-1367.
- Aureliano M, Tiago T, Gândara MC, Sousa A, Moderno A, Kaliva M, Salifoglou A, Duarte RO, Moura JJG. Interactions of vanadium(V)–citrate complexes with the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J Inorg Biochem*. 2005, 99: 2355–2361.
- Aureliano M, Ohlin CA. Decavanadate in vitro and in vivo effects: facts and opinions. *J. Inorg. Biochem*. 2014 <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.05.002>.
- Barceloux DG. Vanadium. *Clin. Toxicol*. 1999, 37: 265–278.
- Beaugé LA, Glynn IM. Commercial ATP containing traces of vanadate alters the response of (Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>) ATPase to external potassium. *Nature*. 1978, 272: 551-552.
- Beletate V, El Dip R, Atallah AN. Zinc supplementation for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Syst Rev* 2007, Issue I, article CD005525.
- Bermudez-Peña MC. Efecto del tratamiento con vanadio(IV) sobre la biodisponibilidad y distribución tisular del selenio y magnesio en ratas diabéticas: Influencia sobre el estado antioxidante. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2014.
- Bermudez-Peña MC, Lopez-Chaves C, Llopis J, Guerrero-Romero F, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A Sanchez-Gonzalez C. Aggravation by vanadium of magnesium deficiency in STZ-induced diabetic rats, *Magnesium. Res*. 2013, 26: 74–82.

- Boudjadi S, Bernatchez G, Beaulieu JF, Carrier JC, Control of the human osteopontin promoter by ERRA in colorectal cancer, *Am. J. Pathol.* 2013, 183: 265–276.
- Bowen HJM. *Trace Elements in Biochemistry* (2nd edition). Academic Press, New York, 1976.
- Cai L, Chen S, Evans T, Cherian MG, Chakrabarti S. Endothelial-1-mediated alteration of metallothionein and trace metals in the liver and kidneys of chronically diabetic rats. *International J Experimen Diabetes Res.* 2002, 3: 193–198, 2002.
- Calderón Salinas JV, Muñoz Reyes EG, Quintanar Escorza MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB.* 2013, 32: 53-66.
- Capdor J, Foster M, Petocz P, Samman S. Zinc and glycemic control: a meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. *J Trace Elem Med Biol.* 2013, 27: 137-142.
- Caravan P, Gelmini L, Glover N, Herring F.G, Li H, McNeill JH, Rettig SJ, Setyawati IA, Shuter E, Sun Y, Tracey AS, Yuen VG, Orvig C. Reaction Chemistry of BMOV, Bis(maltolato)oxovanadium(IV) - A Potent Insulin Mimetic Agent *J. Am. Chem. Soc* 1995,117:12759–12770.
- Chabosseau P, Rutter GA. Zinc and diabetes. *Archiv Biochem Biophys.* 2016, 611: 79-85.
- Chesters JK. Zinc. En O'Dell BL, Sunde RA (ed). *Handbook of nutritionally essential mineral elements.* Marcel Dekker, New York, 1997, 185-230.
- Chen MD, Yang VC, Alexander PS, Lin PY, Song YM, Effects of selected minerals on leptin secretion in streptozotocin-induced hyperglycemic mice, *Exp. Biol. Med.* 2001, 226: 836-840.
- Cheung CHC. Acquired copper imbalance in diabetes-induced cardiac disease: molecular mechanisms and reversibility. Masters Thesis. University of Auckland. 2013, pp37-38
- Chimienti F, Rutter GA, Wheeler MB. Zinc and diabetes. In: Rink L (ed) *Zinc in human health.* IOS Press, Amsterdam, 2011, pp 493–513.
- CIBERDEM, Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas. Estudio Di@bet.es, Instituto de Salud

Carlos III, Sociedad Española de Diabetes, Federación Española de Diabetes (2011). Disponible en: <https://www.ciberdem.org/>. Consultada Junio 2020.

- Confavreux CB, Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism, *Kidney Int. Suppl.*, 2011, 121: S14–S19.
- Conget I. Diabetes y enfermedades cardiovasculares (I) Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus, *Rev Esp Cardiol.* 2005, 55: 528-35
- Cortizo AM, Molinuevo MS, Barrio DA, Bruzzone L. Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanism of action, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2006, 38: 1171–1180.
- Crans D. Chemistry and insulin-like properties of vanadium ( IV ) and vanadium ( V ) compounds 1. *J Inorg Biochem.* 2000. 80: 123-131.
- Crans DC, Smee JJ, Gaidamauskas E, Yang L. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds, *Chem. Rev* 2004, 104: 849-902.
- Crans DC, Henry L, Cardiff G, P. B. Developing Vanadium as an Antidiabetic or Anticancer Drug: A Clinical and Historical Perspective. *Life Sci.* 2019, 14: 19. <https://doi.org/10.1515/9783110527872-014>
- Davenport A. Trace elements in patients with chronic kidney disease. In : *Chronic Renal Disease.* Kimmel PL and Rosemberg ME (eds.). Elsevier. Amsterdam 2015: pp 429-433.
- Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001, 41: 723–749.
- De Cremer K, Van Hulle M, Chéry C, Cornelis R, Strijckmans K, Dams R, Lameire N, Vanholder R. Fractionation of vanadium complexes in serum, packed cells and tissues of Wistar rats by means of gel filtration and anion-exchange chromatography, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2002, 7: 884-890. doi: 10.1007/s00775-002-0376-9.
- Díaz-Casasola L, Luna-Pichardo D. Advanced glycation end products in cardiovascular disease as a complication of diabetes. *Medicina e Investigación.* 2016, 4: 52-57.

- Djoussé L, Driver JA, Gaziano JM, Buring JE, Lee IM. Association between modifiable lifestyle factors and residual lifetime risk of diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23:17-22. doi:10.1016/j.numecd.2011.08.002
- Domingo JL, Gomez M, Sanchez DJ, Llobet JM, Keen CL. Toxicology of vanadium compounds in diabetic rats: The action of chelating agents of vanadium accumulation. *Mol Cell Biochem.* 1995. 153: 233-240.
- Domingo. Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Carcinogenesis.Mol Cel Biochem.* 2000, 203: 185-187.
- D´Orazio M, Battistoni A. Zinc superoxide dismutase. En: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (Ed); *Encyclopedia of Metalloproteins.* New York, Springer, 2013, pp. 2444-2448.
- EFSA Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of vanadium (request no. EFSA-Q-2003-018). *EFSA .* 2004, J 33, 1–22. <http://www.efsa.eu.int/>
- Ekmekcioglu CP, Pomazal K, Steffan I, Schernthaner G, Marktl W. Concentrations of seven trace elements in different hematological matrices in patients with type 2 Diabetes as compared to healthy controls. *Biol Trace Elem Res.* 2001, 79: 205-19.
- El-Maraghy SA, Mehana NA, Modulatory effects of L-arginine and soy enriched diet on bone homeostasis abnormalities in streptozotocin-induced diabetic rats, *Chem.-Biol. Interact.* 2015, 229, 9–16.
- Ermak G, Davies KJA. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol.* 2001, 38: 713–721.
- Espinoza A, Le Blanc S, Olivares M, Pizarro F, Ruz M, Arredondo M. Iron, copper, and zinc transport: inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol Trace Elem Res.* 2012, 146: 281-286.
- Etcheverry SB, Di Virgilio AL, Barrio DA. Vanadium effects on bone metabolism, in *Vanadium. Biochemical and molecular biological approaches: Part IV Medicinal functions of vanadium*, ed. H. Michibata, London-New York, Springer, 2012, pp. 145–162.

- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2004, 27: S5–S10.
- Facchini DM, Yuen VG, Batell ML, McNelli JH, Grynbas MD. The effects of vanadium treatment on bone in diabetic and non-diabetic rats. *Bone*. 2006. 38: 368-377.
- Fedorova EV, Buriakina AV, Vorob'eva NM, (2014). The vanadium compounds: chemistry, synthesis, insulinomimetic properties. *Biomed Khim*, 2014, 60: 416–429.
- Feno S, Butera G, Reane DV, Rizzuto R, Raffaello A. Crosstalk between Calcium and ROS in Pathophysiological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2019, Article ID 9324018, <https://doi.org/10.1155/2019/9324018>
- Fernández-Cao JC, Warthon-Medina M, Moran VH, Arija V, Doepkinga C, Lowed NM. Dietary zinc intake and whole blood zinc concentration in subjects with type 2 diabetes versus healthy subjects: A systematic review, meta-analysis and meta-regression *J Trace Elem Medicine Biol*. 2018, 49: 241–251.
- Fraqueza G, Fuentes J, Krivosudský L, Dutta S, Mal, SS, Roller A, Giester G, Rompel A, Aureliano M. Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - and Ca<sup>2+</sup> -ATPase activities by phosphotetradecavanadate. *J. Inorg. Biochem*. 2019, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110700>.
- Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *Am. J. Physiol*. 2006, 290, G199–G203.
- Ganz T, Nemeth E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annu. Rev. Med*. 2011, 62: 347–360.
- García J. Bases moleculares de la patología ósea. En.: Díaz M, Gil A, Mataix J (eds). *Nutrición y Salud Ósea*. Puleva Food. Granada. 2004, 38-54.
- Gerich JE. Contributions of insulin-resistance and insulin secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes. *Mayo Clinic Proceedings*. 2003, 78: 447-456.
- Gernuth S, Alberti KG, Bennett P. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003, 26: 3160–3167

- Ghio AJ, Piantadosi CA, Wang X, Dailey LA, Stonehuerner JD, Madden MC, Yang F, Dolan KG, Garrick MD, Garrick LM. Divalent metal transporter-1 decreases metal-related injury in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005, 289: L460–L467.
- Goldwasser I, Gefel D, Gershonov E, Fridkin M, Shechter Y. Insulin-like effects of vanadium: basic and clinical implications. *J Inorg Biochem.* 2000. 80: 21-25.
- Gómez T, Bequer L, Mollineda A. Concentration of Zinc, Copper, Iron, Calcium, and Magnesium in the Serum, Tissues, and Urine of Streptozotocin-Induced Mild Diabetic Rat Model. *Biol Trace Elem Res.* 2017;179(2):237–246. doi:10.1007/s12011-017-0962-x
- Görlach A, Bertram K, Hudecova K, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *RedoxBiology.* 2015, 6: 260–271.
- Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*, 2004, 53: S110-8.
- Gruzewska K, Michno A, Pawelczyk T, Bielarczyk H. Essentiality and toxicity of vanadium supplements in health and pathology. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2014, 65, 603–611.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997, 338, 482–488.
- Haase H, Maret W. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals* 2005,18: 333-8.
- Haase H, Overbeck S, Rink L. Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: current status and future perspectives. *Exp Gerontol* 2008, 43: 394–408.
- Haase H y Rink L. Zinc and immune defense.. En: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (Ed); *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York, Springer, 2013, 2375-2379.
- Haro A, López-Aliaga I, Lisbona F, Barrionuevo M, Alférez MJ, Campos MS. Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *J Agric Food Chem.* 2000, 48: 5715–5722. doi:10.1021/jf000635h

- Hennigar SR, McClung JP. Hepcidin Attenuates Zinc Efflux in Caco-2 Cells. *J Nutr.* 2016,146: 2167-2173. doi:10.3945/jn.116.237081
- Hie M, Tsukamoto I. Increased expression of the receptor for activation of NF- $\kappa$ B and decreased runt-related transcription factor 2 expression in bone of rats with streptozotocin-induced diabetes, *Int. J. Mol. Med.* 2010, 26: 611–618.
- Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins, *Biochem. J.* 1996, 317: 59–64.
- Hunter GK, Role of osteopontin in modulation of hydroxyapatite formation, *Calcif. Tissue Int.* 2013, 93: 348–354.
- Iglesias-González T, Sánchez-González C, Montes-Bayón M, Llopis-González J, Sanz-Medel A. Absorption, transport, and insulinmimetic properties of bis(maltolato)oxovanadium (IV) in streptozotocin induced hyperglycemic rats by integrated mass spectrometric techniques. *Anal Bioanal Chem.* 2012. 402: 277-85.
- Institute of Medicine (IOM). Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press; 2001.
- Institute of Medicine; Vanadium. Food and Nutrition Board Institute of Medicine; Dietary Reference Intakes; Washintong USA; National Academy Press. 2001, pp. 532-553.
- Jafarnejad S, Mahboobi S, McFarland LV, Taghizadeh M, Rahimi F. Meta-Analysis: Effects of Zinc Supplementation Alone or with Multi-Nutrients, on Glucose Control and Lipid Levels in Patients with Type 2 Diabetes *Prev. Nutr. Food Sci.* 2019: 24: 8-23.
- Jakusch T, Hollender D, Enyedy EA, Sánchez González C, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Costa Pessoa J, Tomazc I, Kiss T. Biospeciation of various antidiabetic V<sup>IV</sup>O compounds in serum. *Dalton Trans.* 2009, 13, 1–10.
- Jansen J, Karges W, Rinka L. Zinc and diabetes — clinical links and molecular mechanisms. *J Nutrl Biochem.* 2009, 20: 399–441.
- Jayawardena R, Ranasinghe P, Galappatthy P, Malkanthi RLDK, Constantine GR, Katulanda P. Effects of zinc supplementation on diabetes mellitus: a

systematic review and meta-analysis. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2012, 4: 2-11.

- Jequier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann. NY Acad. Sci.* 2002, 967: 379–388.
- Karganov MY, Alchinova IB, Tinkov AA, et al. Streptozotocin (STZ)-Induced Diabetes Affects Tissue Trace Element Content in Rats in a Dose-Dependent Manner [published online ahead of print, 2020 Mar 6]. *Biol Trace Elem Res.* 2020;10.1007/s12011-020-02090-2. doi:10.1007/s12011-020-02090-2
- Karmarkar MG. Antidiabetic Activity of the Orally Effective Vanadyl-Poly ( $\gamma$ -Glutamic Acid) Complex in Streptozotocin (STZ)-induced Type 1 Diabetic Mice. *J Biomat Applia.* 2008. 22: 449-464.
- Kasugai S, Zhang Q, Overall CM, Wrana JL, Butler WT, Sodek J. Differential regulation of the 55 kDa and rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Min. Res.*, 1991, 13: 235–250.
- Kawabe K, Yoshikawa Y, Adichi Y, Sakurai H. Possible mode of action for insulinomimetic activity of vanadyl(IV) compounds in adipocytes. *Life Sci.* 2006, 78: 2860-2866.
- Kazi TG, Afridi HI, Kazi N, Jamali MK, Arain MB, Jalbani N, Kandhro GA. Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol Trace Elem Res.* 2008. 122:1–18.
- Khales F, Findelsen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads on inflammation, obesity and diabetes, *Mol. Metab.* 2014, 3: 384–393.
- Kiefer FW, Neschen S, Pfau B, et al. Osteopontin deficiency protects against obesity-induced hepatic steatosis and attenuates glucose production in mice. *Diabetologia.* 2011, 54: 2132-2142. doi:10.1007/s00125-011-2170-0
- Kiss T, Kiss E, Garribba E, Sakurai H. Speciation of insulin-mimetic VO(IV)-containing drugs in blood serum. *J Inorg Biochem.* 2000, 80: 65-73.
- Kiss T, Jakusch T, Hollender D, Enyedy EA, Horváth L. Comparative studies on the biospeciation of antidiabetic VO(IV) and Zn(II) complexes *J Inorg Biochem.* 2009, 103: 527–535.

- Korbecki J, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Chlubek D. Insulino-mimetyczne właściwości związków wanadu [Insulin-mimetic property of vanadium compounds]. *Postepy Biochem.* 2016, 62: 60-65.
- Krośniak M, Kowalska J, Francik R, Gryboś R, Blusz M, Kwiatek WM. Influence of vanadium-organic ligands treatment on selected metal levels in kidneys of STZ rats. *Biol Trace Elem Res.* 2013, 153: 319–328 a. doi:10.1007/s12011-013-9688-6.
- Krośniak M, Francik R, Kowalska J, Gryboś R, Blusz M, Kwiatek WM. Effects of vanadium complexes supplementation on V, Cu, Mn, K, Fe, Zn, and Ca concentration in STZ diabetic rat's spleen. *Acta Pol Pharm.* 2013,1: 71-77b.
- Krośniak M, Kowalska J, Francik R, Gryboś R, Kwiatek WM. Effects of vanadium complexes supplementation on V, Cu, Mn, K, Fe, Zn, and Ca concentration in STZ diabetic rats pancreas. *Acta Pol Pharm.* 2014, 583-592.
- Li J, Li F, Zhao A. Inflammation and leptin. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 2006, 3: 387-393.
- Li X, Cai L, Feng W. Diabetes and metallothionein. *Mini-Rev Med Chem* 2007, 7: 761–768
- Li NY, Weber CE, Mi Z, Wai PY, Cuevas BD, Kuo PC. Osteopontin up-regulated critical epithelial-mesenchymal transition transcription factors to induce an aggressive breast cancer phenotype. *J Am Coll Surg.* 2013; 217: 17-26.
- Li YJ, Li M, Liu XB, Ren TX, Li WD, Yang C, Wu M, Yang LL, Ma YX, Wang J, Piao JH, Yang LC, Yang XG. Zinc absorption from representative diet in a chinese elderly population using stable isotope technique. *Biomed Environ Sci.* 2017, 30: 391-397.
- Lisbona F, Reyes-Andrada MD, López-Aliaga I, Barrionuevo M, Alférez MJ, Campos MS. The importance of the proportion of heme/nonheme iron in the diet to minimize the interference with calcium, phosphorus, and magnesium metabolism on recovery from nutritional ferropenic anemia. *J Agric Food Chem.* 1999, 47: 2026–2032. doi:10.1021/jf9807622
- Liu Y, Jing H, Wang J, Zhang R, Zhang Y, Zhang Y, Xu Q, Yu X, Xue C. Micronutrients decrease incidence of common infections in type 2 diabetic outpatients. *Asia Pac J Clin Nutr.* 201, 20: 375- 82.

- López-Viseras ME, Fernández B, Hilfikerb S, Sánchez González C, Llopis J, Calahorra AJ, Colacio E, Rodríguez-Diéguez A. In Vivo Potential Antidiabetic Activity of a Novel Zinc Coordination Compound Based on 3-Carboxy-Pyrazole. *J Inorg Biochem.* 2014, 131: 64-67.
- Lowe J, Taveira-da-Silva R, Hilario-Souza E. Dissecting copper homeostasis in diabetes mellitus. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 69; 255-262.
- Mackenzie B, Takanaga H, Hubert N, Rolfs A, Hediger MA. Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT 1). *Biochem. J.* 2007, 403: 59–69.
- Maret W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Exp Gerontol* 2008, 43: 363–369.
- Maret W. Zinc cellular homeostasis. En: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (Ed); *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York, Springer 2013, pp. 2407-2411.
- Maret W. Zinc and diabetes. En: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov EA (Ed); *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York, Springer 2013, pp. 2371-2374.
- Masharani U, Karam JH, German MS. Pancreatic hormones and diabetes. In Greenspan ES, Garden DG, . *Basic and clinical endocrinology Lange medical Books/McGraw-Hill*. New York, 2004, pp 658-746.
- Mataix J, Llopis J; Capítulo 9: Minerales. En Mataix J (Ed); *Nutrición y alimentación humana*; 3ª. Edición, Madrid; Ergon, 2015/ 265-300
- Meigs JB, Avruch J. The metabolic syndrome. *Endocrinology rounds*, 2003, 5: 1-6. (On line). Available [www. Endocrinologyrounds.org](http://www.Endocrinologyrounds.org).
- Metzger BE, Gabbe SG, Persson B. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010, 33: 676–682
- Meyerovitch J, Rothenberg P, Shechter Y, Bonner-Weir S, Kahn CR. Vanadate normalizes hyperglycaemia in two mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1991, 87:1286-1294.
- Murali SK, Roschger P, Zeitz U, Klaushofer K, Andrukhova O, Erben RG. FGF23 Regulates Bone Mineralization in a 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> and Klotho-Independent Manner. *J. Bone Miner. Res.*, 2016, 31: 129–142.

- Musso G, Paschetta E, Gambino R, Cassader M, Molinaro F. Interactions among bone, liver, and adipose tissue predisposing to diabetes and fatty liver, *Trends Mol. Med.*, 2013, 19, 522–535.
- Napoli N, Strollo R, Paladini A, Briganti SI, Pozzilli P, Epstein S. Corrigendum to “The Alliance of Mesenchymal Stem Cells, Bone, and Diabetes”. *Int J Endocrinol.* 2017, 2017: 5924671. doi:10.1155/2017/5924671
- Nishito Y, Kambe T. Absorption mechanism of iron, copper, and zinc: An Overview. *J Nutr Sci vitaminol.* 2018, 64, 1-7.
- Nechay BR, Saunders JP. Inhibition by vanadium of sodium and potassium dependent adenosinetriphosphatase derived from animal and human tissues. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 1987, 2: 247–262.
- Ngwa HA, Ay M, Jin H, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy AG. Neurotoxicity of Vanadium. *Adv Neurobiol.* 2017;18:287-301. doi:10.1007/978-3-319-60189-2\_14.
- Nielsen FH. Other trace elements. Vanadium. In Ziegler EE, Filder LJ (eds): Present knowledge in Nutrition. Washintong, DC: ILSI Press, 1996, pp 364-370.
- Nielsen FH/ chapter 16 ultratrace minerals/editors: Shils, Olson et al; Modern nutrition in health and disease; 9<sup>th</sup> edition, Pennsylvania USA; Lippincott Williams & Wilkins. 1999, pp. 297-299.
- Olivares Grohnert M, Castillo Durán C, Arredondo Olguín M, Uauy Dagach-Imbararack R. Cobre y Cinc en nutrición humana. En Gil A (Ed). Tratado de Nutrición. Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición (Tomo 1). Acción Médica. 2005, pp. 901-1035.
- Opara A. Oxidative stress, micronutrients , diabetes mellitus and its complications. *The Journal of the Royal Society for the promotion of health Society.* 2002. 122: 28-34.
- Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the tolerable upper intake level of vanadium (Request n° EFSA-Q-2003-018). *The EFSA Journal.* 2004. 33: 1-22.
- Orhan N, Berkkan A, Orhan DD, Aslan M, Ergun F. Effects of *Juniperus oxycedrus ssp. oxycedrus* on tissue lipid peroxidation, trace elements (Cu, Zn, Fe) and blood glucose levels in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2011, 133: 759-64

- Oster MH, Llobet JM, Domingo LJ, German JB, Keen CL. Vanadium treatment of diabetic Sprague-Dawley rats results in tissue vanadium accumulation and pro-oxidant effects. *Toxicology*. 1993. 83:115-130.
- Pal RP, Mani V, Tripathi D, Datt C. Inorganic Vanadium Supplementation in Crossbred Calves: Effects on Antioxidant Status, Immune Response and Haemato-Biochemical Attributes. *Biol Trace Elem Res*. 2018;186(1):154-161. doi:10.1007/s12011-018-1295-0
- Planells E, Aranda P, Lerma A, Llopis J. Changes in bioavailability and tissue distribution of zinc by magnesium deficiency in rats. *Brith J Nutr*. 1994, 72, 315-325.
- Quiles JL, Sanchez-Gonzalez C, Vera-Ramírez L, Giampieri F, Navarro-Hortal MD, Xiao J, Llopis J, Battino M, Varela-López A. Reductive Stress, Bioactive Compounds, Redox-Active Metals, and Dormant Tumor Cell Biology to Develop Redox-Based Tools for the Treatment of Cancer. *ARS*, 2020, DOI: 10.1089/ars.2020.8051.
- Ramaiah SK, Rittling S, Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cáncer. *Toxicol. Sci*. 2007, 103: 4–13.
- Ranasinghe P, Wathurapatha WS, Ishara WH, Jayawardana R, Galappatthy P, Katulanda P, Constantine GR. Effects of Zinc supplementation on serum lipids: a systematic review and meta-analysis *Nutrition & Metabolism*, 2015, 26: 1-16.
- Rehder R, The future of/for vanadium, *Dalton Trans*. 2013, 42: 11749-11761. doi:10.1039/c3dt50457c.
- Rehder D, The role of vanadium in biology, *Metallomics*. 2015, 7: 730-742. doi: 10.1039/c4mt00304g.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. *J Nutr*. 2010, 123: 1939-1951.
- Ribeiro M.A., Cominetti C., Kakazu M.H., Sarkis J.E.S., Dainty J., Fox T.E. Cozzolino S.M.F. Zinc absorption in Brazilian subjects fed a healthy meal. *J Hum Nutr Diet*. 2014, 27 (Suppl. 2), 313–320 doi:10.1111/jhn.12119.
- Rink L (ed) Zinc in human health. IOS Press, Amsterdam. 2011

- Rivas-García L. Estudio *in vitro* e *in vivo* del efecto del bis(maltolato)oxovanadium (IV) sobre el metabolismo de algunos elementos traza. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 2018.
- Rivas-García L, Quiles JL, Varela LA, Arredondo M, Lopez P, Dieguez AR, Montes-Bayón M, Aranda P, Llopis J, Sánchez-González C. In vitro study of the protective effect of manganese against vanadium-mediated nuclear and mitochondrial DNA damage. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, 135: 110900. doi:10.1016/j.fct.2019.110900.
- Rivoira M, Rodriguez V, Peralta-Lopez M, Tolosa de Talmoni N. Time dependent changes in the intestinal Ca<sup>2+</sup> Metalomics Paper absorption in rats with type I diabetes mellitus are associated with alterations in the intestinal redox state, *Biochim. Biophys. Acta*, 2015, 1852: 386–394.
- Rodríguez Flores C, Preciado Puga M, Wrobel K, Garay Sevilla ME, Wrobel K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2011, 91: 333– 341.
- Rodríguez-Matas MC, Lisbona F, Gomez-Ayala AE, Lopez-Aliaga I, Campos MS. Influence of nutritional iron deficiency development on some aspects of iron, copper and zinc metabolism. *Laboratory Animals*. 1998, 32: 298-306
- Rossetti L, Giaccari A, Klein-Robbenhaar E, Vogel LR. Insulinomimetic properties of trace elements and characterization of their *in vivo* mode of action. *Diabetes* 1990, 39:1243-50.
- Rutter GA (2010) Think zinc. New roles for zinc in the control of insulin secretion. *Islets* 2010, 2:1–2.
- Ruz M, Carrasco F, Rojas P, Codoceo J, Inostroza J, Basfi-fer K, Valencia A, Vasquez K, Galgani J, Perez A, Lopez G, Arredondo M, Perez-Bravo F. Zinc as a potential coadjuvant in therapy for type 2 diabetes. *Food and Nutrition Bulletin*, 2013, 34: 215-221. doi:10.1177/156482651303400210
- Sakurai H, Adachi Y. The pharmacology of the insulinomimetic effect of zinc complexes. *BioMetals*. 2005, 18: 319–323.
- Salido G. Oxidative Stress, Intracellular Calcium Signals and Apoptotic Processes. In: Salido G.M., Rosado J.A. (eds) *Apoptosis: Involvement of*

Oxidative Stress and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasi. Springer, Dordrecht. 2009, pp 1-16.

- Sánchez C, Torres M, Bermúdez-Peña MC, Aranda P, Montes-Bayón M, Sanz-Medel A, Llopis J. Bioavailability, tissue distribution and hypoglycaemic effect of vanadium in magnesium-deficient rats, *Magnes. Res.* 2011, 24: 196-208. doi: 10.1684/mrh.2011.0293.
- Sanchez-Gonzalez C, Bermudez-Peña C, Guerrero-Romero F, Trenzado CE, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Effect of bis(maltolato)oxovanadium (IV) (BMOV) on selenium nutritional status in diabetic streptozotocin rats. *Br J Nutr.* 2012, 16: 1-7a.
- Sánchez-Gonzalez C, Bermudez-Peña C, Trenzado C, Goenaga-Infante H, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Changes in the antioxidant defence and in selenium concentration in tissues of vanadium exposed rats. *Metallomics.* 2012, 4, 814-819b.
- Sanchez-Gonzalez C, Lopez-Chaves C, Trenzado CE, Aranda P, López-Jurado M, Gomez-Aracena J, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A and Llopis J. Changes in iron metabolism and oxidative status in STZ-induced diabetic rats treated with Bis(maltolato)oxovanadium(IV) as an antidiabetic agent, *Sci. World J.*, 2014, 706074, DOI: 10.1155/2014/706074a.
- Sánchez-González C, Rivas-García L, López-Chaves C, Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Gálvez J, Gómez-Aracena J, Vera-Ramírez L, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A, Llopis J. Exposure to bis(maltolato)oxovanadium(IV) increases levels of hepcidin mRNA and impairs the homeostasis of iron but not that of manganese. *Food and Chemical Toxicology.* 2014, 73, 113-118. 2020:110900. DOI: 10.1016/j. fct.2019.110900b.
- Sanchez-Gonzalez C, Moreno L, Lopez-Chaves C, Nebot E, Pietschmann P, Rodriguez-Nogales A, Galvez J, Montes-Bayon M, Sanz-Medeld A Llopis J. Effect of vanadium on calcium homeostasis, osteopontin mRNA expression, and bone microarchitecture in diabetic rats. *Metallomics*, 2017, 9: 258-265.
- Sánchez Rodríguez A. La diabetes como enfermedad sistémica. Papel del internista en la diabetes mellitus tipo 2. En: Sánchez Rodríguez A, *Protocolos Diabetes mellitus.* Sociedad Española de Medicina Interna, 2010, pp 1-16.

- Sanna D, Serra M, Micera G, Garribba E. Uptake of potential anti-diabetic VIVO compounds of picolinate ligands by red blood cells, *Inorg. Chim Acta*. 2014, 140: 75-84.
- Ścibior A, Zaporowska H, Ostrowski J. Selected Haematological and Biochemical Parameters of Blood in Rats After Subchronic Administration of Vanadium and/or Magnesium in Drinking Water. *Archi Environ Contami Toxicol*. 2006, 51: 287-295.
- Ścibior A, Zaporowska H, Niedźwiecka I. Lipid peroxidation in the liver of rats treated with V and/or Mg in drinking water. *J Applied Toxicol*. 2009, 29: 619-628.
- Ścibior A, Zaporowska H, Niedźwiecka I. Lipid peroxidation in the kidney of rats treated with V and/or Mg in drinking water. *J Applied Toxicol*. 2010, 30: 487-496a.
- Ścibior A, Zaporowska H, Wolińska A, Ostrowski J. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in the blood of rats co-treated with vanadium ( $V^{+5}$ ) and chromium ( $Cr^{+3}$ ). *Cell Biol Toxicol*. 2010, 26: 509–52b.
- Ścibior A, Adamczyk A, Mroczka R, Niedźwiecka I, Gołębiowska D, Fornal E. Effects of vanadium (V) and magnesium (Mg) on rat bone tissue: mineral status and micromorphology. Consequences of V–Mg interactions. *Metallomics*. 2014, 6: 2260-2278.
- Ścibior A, Gołębiowska D, Adamczyk A, Kurus J, Staniszevska M, Sadok I. Evaluation of lipid peroxidation and antioxidant defense mechanisms in the bone of rats in conditions of separate and combined administration of vanadium (V) and magnesium (Mg). *Chem Biol Interac*, 2018, 284: 112-125.
- Ścibior A, Kurus J. vanadium and oxidative stressmarkers-In vivo model:A review. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26: 1-43.
- Ścibior A, Pietrzyk Ł, Plewa Z, Skiba A. Vanadium: Risks and possible benefits in the light of a comprehensive overview of its pharmacotoxicological mechanisms and multi-applications with a summary of further research trends. *J Trace Elem Med Biol*. 2020, 61:126508. doi:10.1016/j.jtemb.2020.126508.
- Seaborn CD, Mitchell ED, Stoecker BJ. Vanadium and ascorbate effects on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, cholesterol and tissue minerals in guinea pigs fed low-chromium diets. *Magnes Trace Elem*. 1991,10: 327-338.
- Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer, *Matrix Biol.*, 2014, 37: 131–141.

- Skalnayaa MG, Skalnaya AV, Serebryanskye EP, Yurasove VV, Skalnayaf AA, Tinkova AA. ICP-DRC-MS analysis of serum essential and toxic element levels in postmenopausal prediabetic women in relation to glycemic control markers *Jal of Trace Elem Med Biol.* 2018, 50: 430–434.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD, Osteopontin, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 2000, 11: 279–303.
- Sosa M, Gómez de Tejada M. El hueso, estructura y fisiología. En.: Díaz M, Gil A, Mataix J (eds). *Nutrición y Salud Ósea.* Puleva Food. Granada. 2004, pp.9-23
- Srivastava S, Kumar N, Roy P, Role of ERK/NFκB in vanadium(IV) oxide mediated osteoblast differentiation in C3H10t1/2 cells, *Biochimie.* 2014, 101: 132–144.
- Stipanuk MH. *Biochemical, physiological, Molecular aspects of human nutrition.* Saunders Elsevier. New York. 2006, pp. 887-1163.
- Sudhir PS, Ganu JV, Nagane N. Osteopontin: A novel protein molecule, *Indian Med. Gaz.* 2012, 62–66.
- Sun Q, Sekar N, Goldwasser I, Gershonov E, Fridkin M, Shechter Y. Vanadate restores glucose 6-phosphate in diabetic rats : a mechanism to enhance glucose metabolism Vanadate restores glucose 6-phosphate in diabetic rats : a mechanism to enhance glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000, 279: E403-410.
- Sun Q, van Dam RM, Willet CW, Hu FB. Prospective study of zinc intake and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, 2009, 32: 629-634.
- Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, Shimizu T, Mita T, Kanazawa A, Imaizumi MO, Abe M, Kiyonari H, Hojyo S, Fukada T, Kawauchi T, Nagamatsu S, Hirano T, Kawamori R, Watada H. The diabetes-susceptible gene *SLC30A8/ZnT8* regulates hepatic insulin clearance *J Clin Invest.* 2013, 123: 4513–4524.
- Takita S, Wakamoto Y, Kunitsugu I, Sugiyama S, Okuda M, Houbara T. Altered tissue concentration of mineral in spontaneous diabetic rats (Goto-Kakizaki rats). *J Toxicol Sci.* 2004. 29:195-199.
- Tanabe N, Wheal BD, Kwon J, Chen HH, Shugg RPP, Sims SM, Goldberg HA, Dixon J, Osteopontin signals through and nuclear factor of activated T cells (NFAT) in osteoclast, *J. Biol. Chem.* 2011, 286: 39871–39881.

- Thompson KH, Tsukada Y, Xu Z, Battell M, Mcneill HH, Orvig C. Influence of chelation and oxidation state on vanadium bioavailability, and their effects on tissue concentrations of zinc, copper, and iron. *Biol Trace Elem Res.* 2002, 86: 31-44.
- Thompson KH, Orvig C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I. *J Inorg Biochem.* 2006, 100: 1925-1935a.
- Thompson KH, Orvig C. Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design. *Dalton Trans.* 2006,10: 761-764b.
- Tortora GJ, Derrickson BH. *Principles of anatomy and physiology (15<sup>th</sup> edition).* London. Wiley, 2016.
- Treviño S, Díaz A, Sánchez-Lara E, Sanchez-Gaytan BL, Perez-Aguilar JM, González-Vergara E, Vanadium in biological action: chemical, pharmacological aspects, and metabolic implications in diabetic mellitus, *Biol. Trace Elem. Res.* 2019, 188: 68-98.
- Tripathi D, Mani V, Pal RP. Effects of vanadium supplementation on production performance, nutrient utilization, plasma mineral concentration, and mineral balance in lactating goats. *Biol Trace Elem Res.* 2019, 188: 412–418.
- Tsavea O, Yavropouloub MP, Kafantaria M, Gabriela C, Yovosb JG, Salifogloua A. Comparative assessment of metal-specific adipogenic activity in zinc and vanadium-citrates through associated gene expression. *J Inorg Biochem.* 2018, 186: 217–227.
- Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Ruegsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone, *Bone,* 1999, 25: 55–60.
- Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Med Chem.* 2005. 12: 1161-1208.
- Wang G, He M, Yi P, Wang J, Li B, Li J, Fu Y, Bai L, Fu Q. Comparison of effects of vanadium absorbed by *Coprinus comatus* with those of inorganic vanadium on bone in streptozotocin-diabetic rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 2012, 149: 391–398.
- Wachnik A, Biró G, Biró L, Gergely A, Antal M. Hepatic lipid peroxidation and trace elements--nutritional status in streptozotocin-induced diabetic rats. *Z Ernährungswiss.* 1992, 31: 103-9.

- Ward DT, Hamilton K, Burnand R, Smith CP, Tomlinson DR, Riccardi R, Altered expression of iron transport proteins in streptozotocin-induced diabetic rat kidney, *Bioch Biophys Acta*, 2005, 1740: 79–84.
- Wegmuller R, Tay F, Zeder C, Brnic M, Hurrell RF. Zinc absorption by young adults from supplemental zinc citrate is comparable with that from zinc gluconate and higher than from zinc oxide. *J. Nutr.* 2014, 144: 132–136.
- Welt CK. Insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology rounds*, 2003, 7, 1-6. (On line). Available [www. Endocrinologyrounds.org](http://www.Endocrinologyrounds.org).
- West IC. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med.* 2000, 17: 171-180.
- Wilsey J, Manthey MK, Scarpace PJ. Oral vanadium enhances the catabolic effects of central leptin in young adult rats. *Endocrinol*; 147:493-50, 2006.
- Willsky GR, Chi LH, Liang Y, Gaile DP, Hu Z, Crans DC. Diabetes-altered gene expression in rat skeletal muscle corrected by oral administration of vanadyl sulfate Diabetes-altered gene expression in rat skeletal muscle corrected by oral administration of vanadyl sulfate. *Physiol Genomics*, 2006: 192-201.
- Wongdee K, Rodrat M, Teerapornpuntakit J, Krishnamra N, Charoenphandhu N. Factors inhibiting intestinal calcium absorption: hormones and luminal factors that prevent excessive calcium uptake. *J Physiol Sci.* 2019, 69: 683-696. doi:10.1007/s12576-019-00688-3.
- Yan W, Li X. Impact of diabetes and its treatments on skeletal diseases. *Front Med.* 2013, 7: 81-90. doi:10.1007/s11684-013-0243-9
- Yuan Q, Jiang Y, Zhao X, Sato T, Densmore M, Schuler C, Erben RG, McKee MK, Lanske B. Increased osteopontin contributes to inhibition of bone mineralization in FGF23-deficient mice, *J. Bone Miner. Res.*, 2014, 29: 693–704.
- Yuen VG, Orvig C, McNeill JH. Comparison of the glucose lowering properties of vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium (IV) following acute and chronic administration *Can. J. Physiol. Pharmacol* 1995, 73: 55–64.
- Zhang SQ, Chen GH, Lu WL, Zhang Q. Effects on the bones of vanadyl acetylacetonate by oral administration: a comparison study in diabetic rats, *J. Bone Miner. Metab.* 2007, 25: 293–301.

- Zhang SQ, Zhong XY, Chen GH, Lu WL, Zhang Q. The anti-diabetic effects and pharmacokinetic profiles of bis (maltolato) oxovanadium in non-diabetic and diabetic rats. *J Pharmacy Pharmacol.* 2008. 60: 99-105,
- Zwolak I, Zaporowska H. Preliminary studies on the effect of zinc and selenium on vanadium-induced cytotoxicity in vitro. *Acta Biologica Hungarica.* 2009, 60: 55–67 doi: 10.1556/abiol.60.2009.1.6.