

# ESTUDIO DE LA MELATONINA COMO TRATAMIENTO PREVENTIVO PARA EL DESARROLLO DEL SÍNDROME METABÓLICO Y LAS ALTERACIONES PANCREÁTICAS ASOCIADAS

**Study of melatonin as a preventive treatment for the development of the metabolic syndrome and the associated pancreatic alterations**

**Ana Corro<sup>1,2</sup>, Celeste Flores<sup>2,3</sup>, Carmen Meléndez<sup>2</sup>, María Forlano<sup>4</sup>, Carmen Mendoza<sup>2,5</sup> y Nyurky Matheus<sup>2,6\*</sup>**

<sup>1</sup>Anatomía Patológica. <sup>2</sup>Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. Haity Moussatché (UNIHM). Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA). <sup>3</sup>Anatomía Microscópica. <sup>4</sup>Parasitología Veterinaria. Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria. Decanato de Ciencias Veterinarias-UCLA. <sup>5</sup>Biología Celular y Molecular. <sup>6</sup>Fisiología Animal. \*Correspondencias: Dra. Nyurky Matheus. E-mail: nyurkym@ucla.edu.ve Barquisimeto, Estado Lara. Venezuela. Código postal 30023. Telf. 0251-2592422 / 2592724.

## RESUMEN

El Síndrome Metabólico (SM) es una endocrinopatía asociada entre otros trastornos sistémicos a la obesidad abdominal, diabetes *mellitus* y dislipidemia. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto preventivo de la melatonina sobre el desarrollo del SM y las alteraciones pancreáticas asociadas. Se seleccionaron 80 ratas *Sprague-Dawley* machos de 12 semanas de edad, divididos en 4 grupos de 20: Control, Fructosa, Fructosa más Melatonina y Melatonina. La inducción del SM se realizó por adición en el agua de bebida de fructosa al 20% peso/volumen (p/v) durante 28 días (d). Al control se le proporcionó agua pura. La bebida y el alimento fueron suministrados *ad libitum*. La melatonina se administró a una dosis de 3 miligramos (mg)/kilogramos (kg), vía intraperitoneal (i.p) cada 48 horas (h) durante 28d. El SM se monitoreó a través de las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol-HDL, glucosa e insulina, utilizando kits comerciales. La insulinorresistencia y la funcionalidad de las células beta pancreáticas fueron determinadas a través del índice HOMA. En páncreas se realizó el estudio histopatológico y se cuantificó el daño lipoperoxidativo. Los datos fueron analizados a través de un ANOVA y prueba de comparaciones múltiples ( $P \leq 0,05$ ). La administración vía oral de fructosa al 20% durante 28d produjo hiperglicemia, hipertrigliceridemia, disminución de colesterol-HDL, insulinorresistencia y disminución de la funcionalidad de la célula beta pancreática, cuadro clínico compatible con el SM. Igualmente, indujo un aumento significativo de la lipoperoxidación pancreática y una marcada hipertrofia de los islotes pancreáticos. El tratamiento preventivo con melatonina protegió contra el desarrollo del SM, evidenciado por la ausencia de los signos clínicos presentes en los animales que recibieron la sobrecarga de fructosa, además, la melatonina disminuyó la lipoperoxidación y preservó la estructura histológica del tejido pancreático. Estos resultados apuntan al uso de la melatonina como tratamiento preventivo del SM en los pacientes susceptibles.

**Palabras clave:** Síndrome metabólico; melatonina; insulinorresistencia; fructosa

## ABSTRACT

Metabolic Syndrome (MS) is an endocrinopathy associated among other systemic disorders to abdominal obesity, diabetes *mellitus* and dyslipidemia. The objective of this study was to determine the preventive effect of melatonin on the development of MS and the associated pancreatic alterations. Eighty 12-week-old male Sprague-Dawley rats were selected, divided into 4 groups of 20: Control, Fructose, Fructose plus Melatonin and Melatonin. The induction of the MS was carried out by adding 20% weight / volume (w/v) fructose drink water for 28 days (d). The control was provided with pure water. The drink and food were supplied *ad libitum*. Melatonin was administered at a dose of 3 milligrams (mg) / kilograms (kg), intraperitoneal via (i.p) 48 hours (h) for 28 d. The MS was monitored through serum triglyceride, HDL-cholesterol, glucose and insulin concentrations, using commercial kits. The insulin resistance and the functionality of the pancreatic beta cells were determined through the HOMA index. In the pancreas, the histopathological study was performed and oxidative stress was quantified. The data were analyzed through an ANOVA and multiple comparison test ( $P \leq 0.05$ ). The consumption of fructose at 20% for 28 d produces hyperglycemia, hypertriglyceridemia, decreased HDL-cholesterol, insulin resistance and decreased functionality of the pancreatic beta cell, a clinical picture compatible with MS. It also induces a significant increase in pancreatic lipoperoxidation and a marked hypertrophy of the pancreatic islets. The preventive treatment with melatonin prevents the development of MS, evidenced by the absence of the clinical signs present in the animals that received the fructose overload. In addition, melatonin decreases lipoperoxidation and preserves the histological structure of the pancreatic tissue. These results point to the use of melatonin as a preventive treatment of the MS in susceptible patients.

**Key words:** Metabolic syndrome; melatonin; insulin resistance; fructose

## INTRODUCCIÓN

La patogénesis del síndrome metabólico (SM) es compleja, dado que en ella intervienen factores genéticos y ambientales. Los hallazgos sugieren que la obesidad y posteriormente la resistencia a la insulina, participan en este proceso y ambas están estrechamente vinculadas [4, 39]. El aumento del consumo de fructosa, que comúnmente contienen los alimentos procesados y bebidas sin alcohol, es uno de los factores que contribuyen a la creciente prevalencia de esta patología [24].

La sobrecarga experimental de fructosa en animales puede originar resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa y aumento de la presión arterial [18, 19, 42, 44], alteraciones similares con las que cursa el SM en los humanos [4]. Es por ello que el modelo experimental de SM inducido con fructosa en ratas (*Rattus norvegicus*) de diferentes cepas, está siendo ampliamente utilizado [8,43].

Existen resultados que respaldan que el SM es una consecuencia del desequilibrio dietético y de hábitos de vida, más que una enfermedad genéticamente programada. El estrés oxidativo (EO) se ha propuesto como un factor causante del desarrollo de resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y la progresión de la enfermedad metabólica inducida por el consumo de fructosa [44] y juega un rol importante en el desarrollo de las complicaciones que se presentan en el SM y la diabetes mellitus [46].

El tratamiento para este desorden metabólico está enfocado en primera instancia hacia el control de la obesidad central o abdominal, sin embargo, la administración de antioxidantes se ha considerado como uno de los factores que ayudarían a prevenir el aumento del EO desencadenado durante el desarrollo de éste síndrome.

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), es una indolamina secretada en la glándula pineal y en tejidos extrapineales como retina, médula ósea, plaquetas, linfocitos, intestino, testículo, ovario, entre otros [27]. La totalidad de melatonina sintetizada por tejidos extrapineales es mayor que la sintetizada por la glándula pineal y su concentración tisular es superior a la concentración plasmática [36]. Esta indolamina tiene funciones inmunomoduladoras, antiinflamatorias, antioxidantes e incluso, regula la actividad de la proteína transportadora de serotonina (SERT) [27, 34, 35], regulando de esta manera la concentración de serotonina (5HT) circulante. La 5HT entre otras funciones, regula la actividad del centro de la saciedad y con ello regula el apetito, controlando el posible desarrollo de la obesidad central o abdominal en pacientes ansiosos, que como fue mencionado anteriormente, es un síntoma clave en el desarrollo del SM.

Sobre la base de estas premisas, los autores se plantean la hipótesis de que la melatonina puede prevenir el desarrollo del

SM impidiendo el progreso de la obesidad central, la resistencia a la insulina, la inflamación y el estrés oxidativo (EO) asociado a este desorden metabólico y se plantearon como objetivo de estudio, determinar en un modelo experimental de SM inducido con fructosa, el uso de la melatonina como tratamiento preventivo para el desarrollo del SM y las alteraciones pancreáticas asociadas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en la Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales "Dr. Haity Moussatché" del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), siguiendo lo establecido en el Código de Ética para la Vida de la República Bolivariana de Venezuela (2010) en su segunda parte, capítulo 3 y aprobado por el comité de Bioética del Decanato de Ciencias de la Salud de la UCLA.

### Población y muestra

Se seleccionaron 80 ratas Sprague-Dawley machos de 12 semanas de edad y peso promedio de 300 gramos (g). Se dividieron en 4 grupos de 20. Grupo control, Grupo Fructosa, Grupo Fructosa mas Melatonina y Grupo Melatonina. A todos los animales se les garantizaron las mismas condiciones ambientales estables y se les suministró un alimento balanceado para ratas y ratones (*Mus musculus*) (Ratarina Protinal®) ofrecido al igual que la bebida *ad libitum*.

### Inducción del síndrome metabólico y tratamiento con melatonina

El SM fue inducido por adición de fructosa al 20% peso/volumen (p/v) en el agua de bebida, durante 28 días (d). Al grupo control se le proporcionó agua pura. La melatonina (Sigma®) fue diluida en etanol al 1%, preparada al momento de administrar. Se suministró a una dosis de 3 miligramos (mg)/kilogramos (kg), vía intraperitoneal (i.p) cada 48 horas (h) durante 28 d [22]. Se realizó un grupo control etanol como control interno y se evidenció que éste diluyente de la melatonina, no afectó las variables en estudio.

### Determinaciones bioquímicas

El desarrollo del SM se monitoreó cuantificando por duplicado las concentraciones séricas de triglicéridos, colesterol-HDL, glucosa e insulina. Las muestras de sangre fueron extraídas por la mañana, después de 12 h de ayuno, el d 0 (muestra basal) por punción intracardiaca previa eterización y el d 28 tras la eutanasia. La sangre recolectada en tubos sin anticoagulante, se trasvasó a tubos eppendorf, para luego ser centrifugadas a 1.100 xg en una centrifuga eppendorf 5402 (Westbury, N.Y., EUA) durante 20 minutos (min) a 15 °C, con el objetivo de separar el suero para determinar los valores séricos.

La concentración de triglicéridos fue cuantificada utilizando el Kit Qualitest (Qualitest C.A., Caracas, Venezuela) cuyo fundamento se basa en el método de Trinde [32] utilizando un patrón de 200 miligramos (mg) / decilitros (dL) de trioleína. La medida de la cantidad de luz absorbida por el producto coloreado fue realizada a una longitud de onda de 500 nanómetros (nm). La concentración se expresó en mg/dL, con un punto de corte de 100 mg/dL [25]. Las concentraciones de colesterol total y su fracción HDL (col-HDL), se determinaron por un método enzimático [1] utilizando el Kit Colestat de Wiener Lab. (Rosario, Argentina) que incluye un patrón de colesterol de 200 mg/dL. Considerándose alterados los valores superiores a 90 mg/dL [25].

La concentración de glucosa se determinó mediante el Kit Qualitest (Caracas, Venezuela). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 510 nm y su concentración se expresó en mg/dL. Se consideró un punto de corte de 150 mg/dL [25]. Todas las absorbancias en los ensayos fueron registradas utilizando un espectrofotómetro Genesys 5 (Rochester, NY, EUA). La insulina fue cuantificada mediante la técnica de ELISA competitivo (ELISAc), utilizando el Kit comercial DRG Diagnostic (DRG Instrument GmbH, Alemania), que contiene soluciones patrones de 6,25 – 12,5 – 25 – 50 y 100 microunidades internacionales/mililitros ( $\mu\text{UI}/\text{mL}$ ) con los cuales se construyó una curva patrón. Su concentración se expresó en  $\mu\text{UI}/\text{mL}$ . El Coeficiente de variación intraensayo fue de 1,8% e interensayo 2,9%.

#### Modelo de evaluación de la homeostasis (HOMA)

La resistencia a la insulina (RI) y el Porcentaje de células  $\beta$  funcionales (% F.C. $\beta$ ) fueron determinados utilizando el índice HOMA-IR y HOMA-B, respectivamente [28] y las ecuaciones utilizadas fueron las siguientes:

$$\text{RI} = \frac{\text{glucosa (mg/dL)} \times \text{insulina } (\mu\text{U/mL})}{405} \quad \text{FC}\beta (\%) = \frac{\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times 360}{\text{glucosa (mg/dL)} - 63}$$

#### Indicadores de lipoperoxidación pancreática

Luego de la eutanasia a cada animal se le disecó el páncreas, se pesó en una balanza analítica Sauter (Tipo 414, Ebingen, Alemania), se registró su aspecto macroscópico y se dividió en 2 porciones. Una se colocó en formol Bufferado al 10% para el estudio histopatológico y la otra porción se colocó en buffer Tris-Sacarosa 250 milimolar (mM), pH 7,2 a 4°C, diluida 3 veces su peso, para posteriormente ser homogeneizada en un Potter (Modelo NSI-12, Chicago ILL, EUA), mediante 10 pasos del vástago de teflón en el tubo con la muestra. El sobrenadante obtenido fue mantenido en hielo y se utilizó para determinar la concentración de dienos conjugados y malondialdehído.

Concentración de dienos conjugados (DC): Fueron extraídos con isopropanol y cuantificados por el método descrito por Wallin y col. [45]. La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 232 nm. Los resultados se expresaron como moles de Dienos Conjugados/mg de proteína  $\times 10^{-5}$  (moles de DC/mg prot  $\times 10^{-5}$ ).

Concentración de Malondialdehído (MDA): Se determinó por el Test para sustancias reaccionantes con el ácido 2-tio barbitúrico (TBARS) [30]. La absorbancia se midió a 532 nm. Los resultados se expresaron como nanomoles de MDA/mg de proteínas (nmoles de MDA/mg proteínas). Las proteínas totales se cuantificaron utilizando el kit Bio-Rad (Richmond, EUA). Se utilizó como patrón una solución madre de 1,41 miligramos/mililitros (mg/mL) de albúmina sérica bovina.

#### Análisis histopatológico

La porción del páncreas fijada en formol Bufferado al 10% fue procesada mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina [41]. Para su estudio se utilizaron objetivos de 10X y 40X de un microscopio óptico marca Olympus BX 40 (Tokio, Japón).

#### Análisis estadístico

Para analizar los resultados se realizó estadística descriptiva, ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples ( $P \leq 0,05$ ).

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El SM es una endocrinopatía asociada a trastornos sistémicos incluyendo obesidad abdominal, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus, dislipidemia, hipertensión y enfermedad de las arterias coronarias [13, 20]. Se han utilizado diversos modelos experimentales para su estudio. Uno de los más ampliamente utilizados es el modelo de inducción por ingesta o sobrecarga de fructosa en ratas [8, 43].

En la TABLA I se muestra, que los animales que recibieron la sobrecarga oral de fructosa (20 % p/v, durante 28d en el agua de bebida), presentaron un aumento significativo de la glicemia en ayuna ( $206,24 \pm 9,16$  mg/dL, lo que representa el 120 % más que su valor basal y que el grupo control), además hipertrigliceridemia ( $335,52 \pm 29,42$  mg/dL, lo que representa el 59 % más que su valor basal y que el grupo control), disminución de la concentración de col-HDL ( $26,98 \pm 2,28$  mg/dL, lo que representa el 40 % menos que su valor basal y 25 % menos que el grupo control), y no presentaron diferencias significativas en los valores de colesterol total entre los grupos. Es importante mencionar que los valores de glucosa y triglicéridos séricos en los animales que recibieron fructosa fueron superiores a los considerados como puntos de corte para estos parámetros en esta especie [25].

Con respecto a la concentración sérica de insulina en ayuna, los animales que recibieron la sobrecarga de fructosa presentaron un aumento significativo de esta hormona, comparado con su valor basal y el resto de los grupos.

Al relacionar la glicemia con la concentración de insulina a través del índice HOMA-IR se evidenció que los animales que recibieron la sobrecarga oral de fructosa por 28d presentaron un aumento significativo de éste índice. Asimismo, presentaron

TABLA I

CONCENTRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS, COLESTEROL TOTAL, COLESTEROL-HDL, GLUCOSA, INSULINA E INDICE HOMA-IR

Parámetro	Día	Grupo de estudio			
		Control	Fructosa	Fructosa + Melatonina	Melatonina
Triglicérido (mg/dL)	Día 0	170,19±18,78 <sup>a</sup>	174,41±13,54 <sup>a</sup>	158,87±31,93 <sup>a</sup>	163,72±23,15 <sup>a</sup>
	Día 28	165,59±19,39 <sup>a</sup>	335,52±29,42 <sup>b</sup>	149,27±42,4 <sup>a</sup>	157,78±31,9 <sup>a</sup>
Colesterol g/dL)	Día 0	75,63±4,33 <sup>a</sup>	77,07±4,33 <sup>a</sup>	68,11±4,67 <sup>a</sup>	74,67±3,81 <sup>a</sup>
	Día 28	70,91±4,26 <sup>a</sup>	69,17±5,97 <sup>a</sup>	67,19±5,24 <sup>a</sup>	71,83±4,24 <sup>a</sup>
Col-HDL (mg/dL)	Día 0	40,58±9,95 <sup>a</sup>	44,19±8,10 <sup>a</sup>	46,21±6,18 <sup>a</sup>	47,50±6,38 <sup>a</sup>
	Día 28	36,78±2,14 <sup>a</sup>	26,98±2,28 <sup>b</sup>	39,35±9,37 <sup>a</sup>	43,81±5,94 <sup>a</sup>
Glucosa (mg/dL)	Día 0	104,02±2,38 <sup>a</sup>	102,89±5,98 <sup>a</sup>	108,22±4,81 <sup>a</sup>	102,61±11,69 <sup>a</sup>
	Día 28	96,27±7,43 <sup>a</sup>	206,24±9,16 <sup>b</sup>	97,25±5,26 <sup>c</sup>	101,67±9,10 <sup>a</sup>
Insulina (µUI /mL)	Día 0	10,97±0,98 <sup>a</sup>	9,95±1,42 <sup>a</sup>	10,06±1,65 <sup>a</sup>	10,69±1,67 <sup>a</sup>
	Día 28	10,82±1,02 <sup>a</sup>	14,26±1,27 <sup>b</sup>	10,50±1,19 <sup>a</sup>	10,14±1,51 <sup>a</sup>
HOMA-IR	Día 0	2,55±0,44 <sup>a</sup>	2,31±0,36 <sup>a</sup>	2,28±0,35 <sup>a</sup>	2,49±0,13 <sup>a</sup>
	Día 28	2,22±0,91 <sup>a</sup>	6,53±1,04 <sup>b</sup>	2,13±0,20 <sup>a</sup>	2,36±0,28 <sup>a</sup>

Media ± EE de los indicadores sanguíneos de síndrome metabólico y cálculo de la resistencia a la Insulina según el índice de HOMA-IR. En cada parámetro, los valores que presentan letras distintas <sup>a, b, c</sup>, difieren estadísticamente. (P≤0,05).

una disminución significativa en la funcionalidad de la célula β pancreática determinada a través del índice HOMA-B (FIG. 1).

El aumento de la concentración de insulina sérica junto con el aumento de HOMA-B y de HOMA-IR, sugieren la existencia en estos animales de una condición de resistencia a la insulina, además de la hiperglicemia, hipertrigliceridemia y disminución de la col-HDL, perfil que es compatible con un estado metabólico asociado a un SM, de acuerdo con lo establecido por la IDF (International Diabetes Federation), la NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III) [16] y la AACE (American Association of Clinical Endocrinologists) [12].

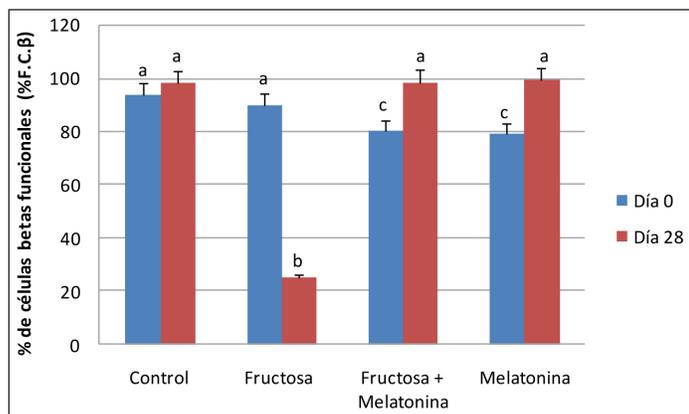


FIGURA 1. CÉLULAS B PANCREÁTICAS FUNCIONALES EN RATAS CON UNA SOBRECARGA DE FRUCTOSA AL 20% POR 28 DÍAS Y MELATONINA.

Los resultados se expresan como la media ± la desviación estándar del porcentaje de células betas funcionales (% FCβ). Los valores que presentan letras distintas <sup>a, b, c</sup>, difieren estadísticamente. (P≤0,01).

Por otra parte, los animales que recibieron melatonina más la sobrecarga de fructosa en el agua de bebida, no presentaron diferencias en la concentración sérica de glucosa, colesterol total, col-HDL, triglicéridos, insulina y los valores de HOMA-IR y HOMA-B con respecto a su valor basal y al grupo control, lo que sugiere que la melatonina protegió contra el desarrollo del cuadro clínico compatible con el SM por sobrecarga oral de fructosa (TABLA I, FIG. 1).

La fisiopatología por la cual la fructosa induce SM es diversa e incluye varios mecanismos como la estimulación de vías glicolíticas y lipogénicas hepáticas. En el hígado, la fructosa es fosforilada por la enzima fructoquinasa a fructosa 1-fosfato, que se convierte en gliceraldehido 3-fosfato o dihidroxiacetona fosfato. Estas triosas fosfato pueden ingresar vía glicolítica hasta formar piruvato y oxidarse posteriormente a Acetil CoA, que proporciona carbonos para la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol. El gliceraldehido 3 fosfato por vía gluconeogénica da lugar a la formación de glucosa [11]. A diferencia de la glucosa, la molécula de fructosa entra a la vía glicolítica sin ser regulada la actividad catalítica de la fructoquinasa [10]. Es este metabolismo de la fructosa, uno de los mecanismos por el cual éste sacárido produce hiperglicemia y dislipidemia.

Como se mencionó anteriormente en este estudio, los animales

que consumieron fructosa presentaron una condición de hiperinsulinemia comparado con el grupo control. Este síntoma clásico del SM puede ser producto de un aumento en la síntesis y secreción de insulina o de una disminución en su metabolización [3]. El cuadro de hiperglicemia inducido por el consumo elevado de fructosa estimula una mayor captación y metabolización de la glucosa por las células  $\beta$  pancreáticas con un aumento en la producción de ATP, con la resultante inhibición de los canales de  $K^+_{ATP}$  y aumento del flujo de  $Ca^{2+}$  que promueve la exocitosis de los gránulos de insulina y por lo tanto, de la hiperinsulinemia compensatoria [47]. Por otra parte, la hipertrigliceridemia reportada en los animales que consumieron fructosa puede promover un aumento de diacilglicerol en las células  $\beta$  en respuesta a la glucosa, el cual no solo activa a la proteína quinasa C que está implicada en la secreción de insulina, sino que también se une al dominio C1 de la proteína Munc13-1, que se ha demostrado está implicada en la secreción de insulina [23] lo que potencia el aumento de la secreción de insulina estimulada por la glucosa.

La disminución de la respuesta y/o sensibilidad a las acciones metabólicas de la insulina es definida como resistencia a la insulina y es una característica fundamental de la diabetes, obesidad y dislipidemia [29]. En este estudio, el índice HOMA-IR indicativo de la relación insulina/glucosa y por tanto de la resistencia a la insulina, mostró un aumento significativo en los animales que recibieron la sobrecarga de fructosa, indicando el desarrollo de resistencia a la insulina. Estudios previos han mostrado en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa, etanol y fructosa, valores similares a los reportados en este estudio [2] y superiores a los reportados para ratas Wistar tratadas con glutamato monosódico [33].

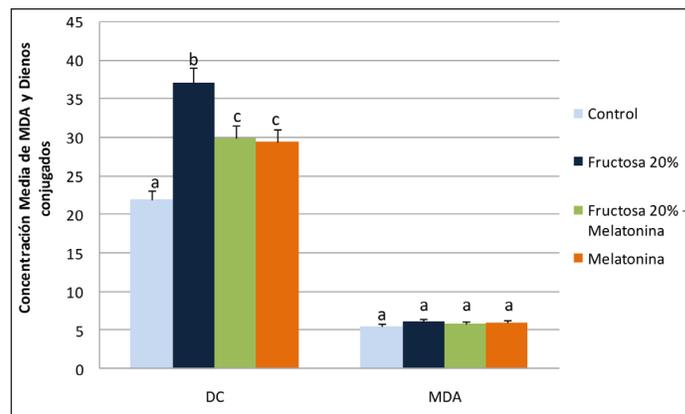
Además de las alteraciones bioquímicas sanguíneas presentes en la patogénesis del SM, el aumento del EO y la activación de citocinas proinflamatorias han sido reportadas [20, 37]. El uso de la fructosa como inductor experimental del SM está asociado a un aumento excesivo de las especies reactivas del oxígeno. Este hecho es de particular relevancia porque se conoce que, uno de los factores responsables del deterioro vascular en la diabetes *mellitus* y el SM, es el aumento del EO [7, 31].

El EO puede medirse de manera indirecta a través del daño causado por los radicales libres en las biomoléculas como los lípidos poliinsaturados. Dentro de estas técnicas están la cuantificación de los niveles de dienos conjugados (DC) y malondialdehído (MDA), mediante las cuales se evalúa la peroxidación lipídica o lipoperoxidación [9]. Este proceso produce daño en los lípidos de la membrana celular con la producción de lipoperoxidos y sus productos derivados. Los DC son uno de los productos iniciales de la reacción en cadena que proceden de la ruptura de los ácidos grasos poli-insaturados de las membranas celulares, mientras que el MDA es uno de los productos finales.

En este estudio se cuantificaron los niveles de DC y de MDA

como indicadores de la lipoperoxidación pancreática. Los resultados muestran que durante el desarrollo del SM inducido por una sobrecarga de fructosa, hay un incremento de la oxidación lipídica pancreática evidenciada por un aumento en la concentración de DC (68 % mayor en el grupo que ingirió fructosa con respecto al grupo control). Es importante mencionar que los niveles de MDA no presentaron diferencias significativas entre los animales que se les indujo el SM y los animales controles (FIG. 2). Lo que sugiere que el proceso lipoperoxidativo que ocurre en forma de cascada se inicia pero posiblemente mecanismos compensatorios celulares impiden que la reacción del daño oxidativo finalice.

Una hipótesis de estos mecanismos compensatorios podrían ser los propios radicales libres, los cuales son capaces de estimular respuestas protectoras contra el daño oxidativo mediante el aumento en la expresión de proteínas y agentes antioxidantes como la quinasa Jun-N-terminal (proteína JNK) que promueve la translocación nuclear de la proteína FOXO para la expresión de algunos genes dianas que estimulan la resistencia al EO [5, 14, 21]. Otra hipótesis, podría ser el hecho de que existen diferentes conformaciones químicas de los DC, siendo algunas de estas más reactivas, por lo tanto, es probable que en la cuantificación de la totalidad de los DC producidos durante la reacción lipoperoxidativa inducida por la hiperglicemia en su mayoría sean productos menos reactivos, de manera tal que la reacción en cascada que conlleva a la formación de MDA, como uno de los productos finales de la reacción, esté en menor cuantía.



**FIGURA 2. CONCENTRACIÓN MEDIA DE LOS INDICADORES DE LIPOPEROXIDACIÓN PANCREÁTICOS, DC (DIENOS CONJUGADOS) Y MDA (MALONDIALDEHIDO) AL DÍA 28.**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la concentración de DC (Moles DC /mg de Proteínas  $\times 10^{-5}$ ) y MDA (nMoles de MDA/mg de Proteínas) de 48 animales. En cada parámetro, los valores que presentan letras distintas <sup>a, b, c</sup>, difieren estadísticamente. ( $P \leq 0,01$ ).

El EO reportado en los animales que consumieron fructosa puede ocurrir por mecanismos estimulados por la hiperglicemia.

Estos mecanismos involucran un incremento en los niveles de productos avanzados de la glucosilación (AGEs) [38], en la expresión de receptores para AGE (RAGE), en la expresión de proteína quinasa C y en el flujo de sustratos hacia la vía del Polioliol [7]. La activación de algunas de estas vías resulta en la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) [17].

Igualmente, la hiperglicemia favorece el incremento de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (ONSi), la cual aumenta la producción de óxido nítrico (ON) que al combinarse con el  $O_2^-$  forma peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>), especie aún más reactiva y que pertenece al grupo de especies reactivas del nitrógeno (RNS), clave de la patogénesis de las complicaciones cardiovasculares en el SM y la diabetes *mellitus* [14].

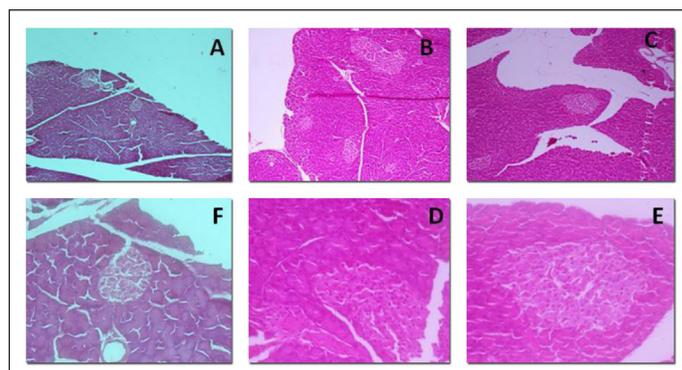
A nivel pancreático, la hiperglicemia crónica parece ser una causa importante de daño en las células  $\beta$  debido a que las mitocondrias de estas células forman radicales libres responsables de los procesos oxidativos y resultan ser un blanco fácil de éstas moléculas altamente reactivas, por lo tanto, las ROS y RNS pueden causar daño mitocondrial y posteriormente atenuar la secreción de insulina [15].

Por las razones antes mencionadas, la información reciente sugiere la potencial utilidad del uso de los antioxidantes en la prevención de la disfunción pancreática durante el desarrollo del SM. En este estudio se utilizó como tratamiento preventivo para el desarrollo del SM el antioxidante melatonina, administrado por vía intraperitoneal cada 48h. Los resultados indican que los animales que recibieron tratamiento con melatonina y una sobrecarga de fructosa en el agua de bebida, no presentaron hiperglicemia, hipertrigliceridemia, disminución en la concentración de col-HDL ni resistencia a la insulina, con respecto al grupo control (TABLA I), lo que indica que la melatonina protegió contra el desarrollo del cuadro metabólico compatible con el SM.

Por otra parte, el tratamiento con esta indolamina disminuyó en un 35 % uno de los parámetros indicadores de EO pancreático con respecto al grupo que se le indujo el SM por sobrecarga de fructosa (FIG. 2). La melatonina puede depurar RL de manera directa o indirecta. Su acción antioxidante directa se debe a que esta indolamina y algunos de sus metabolitos poseen la capacidad de depurar por sí mismas algunas especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, mientras que su acción indirecta se debe a que es capaz de estimular la actividad y expresión de otros sistemas antioxidantes [27, 34, 35].

Los hallazgos reportados en la química sanguínea y en la cuantificación de la lipoperoxidación pancreática fueron corroborados con el estudio histopatológico, el cual reveló que las ratas que recibieron una sobrecarga de fructosa en el agua de bebida, presentaron una marcada hipertrofia de los islotes pancreáticos (FIG. 3). De igual manera se pudo observar que, el páncreas de los animales que recibieron tratamiento con

melatonina más la sobrecarga de fructosa, conservaban la arquitectura histológica del tejido pancreático, al igual que el grupo control. No se evidenciaron signos de inflamación en el páncreas de ninguno de los grupos. Con respecto a la funcionalidad de la célula  $\beta$  pancreática determinada a través del índice HOMA-B se comprobó que, los animales que recibieron fructosa en el agua de bebida presentaron una disminución en la funcionalidad de estas células, mientras que el grupo que recibió fructosa más melatonina, no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control y a su valor basal. Estos resultados indican que la melatonina efectivamente protege al páncreas durante el desarrollo del SM inducido por una sobrecarga oral de fructosa.



**FIGURA 3. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO PANCREÁTICO.**

Control: (A: 10X y F: 40X). Experimentales: (B: Fructosa 10X, C: Fructosa mas Melatonina 10X, D: Fructosa 40X, y E: Fructosa mas Melatonina 40X).

Es de hacer notar que, resultados de estudios realizados con melatonina no solo indican su potente efecto antioxidante [40], sino que puede inhibir la actividad de proteínas transportadoras, como es el caso de la proteína transportadora de serotonina (SERT) [26]. La inhibición de SERT aumenta la concentración sérica de serotonina. Esta amina tiene dentro de sus efectos fisiológicos, regular el apetito, disminuyendo los estados de ansiedad, esto demuestra, que la melatonina utilizada en el tratamiento del SM puede ayudar por un lado disminuyendo el daño oxidativo pancreático (acción antioxidante) y por otro lado, controlando el apetito y con él la obesidad abdominal, situación ésta que representa la primera línea en el tratamiento de éste desorden metabólico.

Es importante hacer mención que los estudios sobre eficacia terapéutica para el SM son reducidos si se comparan con estudios de otras patologías metabólicas como la diabetes *mellitus*. Los ensayos terapéuticos sobre las modificaciones del estilo de vida (dieta y actividad física) son las de mayor importancia para impactar la multifactorialidad del síndrome [6], por lo tanto, los resultados de éste estudio apuntan a la melatonina como una importante molécula a tomar en cuenta en la terapéutica de éste síndrome.

## CONCLUSIONES

El tratamiento con melatonina protege contra el desarrollo del síndrome metabólico y su efecto sobre el páncreas, evidenciado por la ausencia de los signos clínicos característicos de este síndrome, disminución de la lipoperoxidación pancreática y la conservación histológica del tejido pancreático.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, a través del Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (C.D.C.H.T.) por el financiamiento al proyecto 013-VE-2012, necesario para el desarrollo del estudio.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clin. Chem.** 20: 470-475.1974.
- [2] ALWAHSH, S.M.; DWYER, B.J.; FORBES, S.; THIEL, D.H.; LEWIS, P.J.; RAMADORI, G. Insulin Production and Resistance in Different Models of Diet-Induced Obesity and Metabolic Syndrome. **Int. J. Mol. Sci.** 18(285): 1-18. 2017.
- [3] ARSLANIAN, S.A.; SAAD, R.; LEWY, V.; DANADIAN, K.; JANOSKY, J. Hyperinsulinemia in african-american children: decreased insulin clearance and increased insulin secretion and its relationship to insulin sensitivity. **Diabetes.** 51:3014–3019. 2002.
- [4] BAUDUCEAU, B.; VACHEY, E.; MAYAUDON, H.; BURNAT, P.; DUPUY, O.; GARCIA, C. Should we have more definitions of metabolic syndrome or simply take waist measurement? **Diabetes Metab.** 33:333-339.2007.
- [5] BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxid. Redox Signal.** 7(11-12):1553-1567. 2005.
- [6] CARDONA, V.S.; GUZMÁN, V.L.; CARDONA-ARIAS, J.A. Systematization of clinical trials related to treatment of metabolic syndrome, 1980-2015. **Endocrinol. Diabetes Nutr.** 64:82-91.2017.
- [7] CERIELLO, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. **Diabetes Care.** 26: 1589-1596.2003.
- [8] CHOU, C.L.; LAI, Y.H.; LIN, T.Y.; LEE, T.J.; FANG, T.C. Aliskiren prevents and ameliorates metabolic syndrome in fructose-fed rats. **Arch. Med. Sci.** 7(5): 882–888. 2011.
- [9] CINAR, M.; ULKER, S.; ALPER, G.; EVINC, A. Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacol.** 62: 56-64.2001.
- [10] CUI, X.L.; SCHLESIER, A.M.; FISHER, E.L.; CEQUEIRA, C.; FERRARIS, R.P. Fructose- induced increases in neonatal rat intestinal fructose transport involve the PI3-kinase/ Akt signalling pathway. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol** 288:G1310-G1320. 2005.
- [11] DIRLEWANGER, M.; SCHINEITER, P.; JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Effects of fructose on hepatic glucose metabolism in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 279:E907-E911.2000.
- [12] EINHORN, D.; REAVEN, G.M.; COBIN, R.H.; FORD, E.; GANDA, O.P.; HANDELSMAN, Y.; HELLMAN, R.; JELLINGER, P.S.; KENDALL, D.; KRAUSS, R.M.; NEUFELD, N.D.; PETAK, S.M.; RODBARD, H.W.; SEIBEL, J.A.; SMITH, D.A.; WILSON, P.W. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. **Endocr. Pract.** 9:237–252.2003.
- [13] ELKS, C.M.; FRANCIS, J. Central adiposity, systemic inflammation, and the metabolic syndrome. **Curr. Hypertens. Rep.** 12: 99-104.2010.
- [14] EROL, A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. **Bioessays.** 29(8):811-818.2007.
- [15] EVANS, J.L.; GOLFINE, I.D.; MADDUX, B.A.; GRODSKY, G.M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? **Diabetes.** 52:1-8. 2003.
- [16] EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA.** 2001 May 16;285(19):2486-97.
- [17] GUZIK, T.; MUSSA, S.; GASTALDI, D.; SADOWSKI, J.; RATNATUNGA, C.; PILLAI, R. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NADPH oxidase and endothelial nitric oxide synthase. **Circulat.** 105: 1656-1662.2002.
- [18] HULMAN, S.; FALKNER, B. The effect of excess dietary sucrose on growth, blood pressure, and metabolism in

developing Sprague-Dawley rats. **Pediatr. Res.** 36: 95–101.1994.

- [19] HWANG, I.S.; HO, H.; HOFFMAN, B.B.; REAVEN, G.M. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hyperten.**10: 512–516.1987.
- [20] KASSI, E.; PERVANIDOU, P.; KALTSAS, G.; CHROUSOS, G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. **BMC Med.** 5: 9-48.2011.
- [21] KAWAMORI, D.; KANETO, H.; NAKATANI, Y.; MATSUOAKA, T.A.; MATSUHISA, M. The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation. **J. Biol. Chem.** 281:1091–1098.2006.
- [22] KITAGAWA, A.; OHTA, Y.; OHASHI, K. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. **J. Pineal Res.** 52:403–413.2012.
- [23] KWAN, E.P.; XIE, L.; SHEU, L.; NOLAN, C.J.; PRENTKI, M.; BETZ, A. Munc13–1 deficiency reduces insulin secretion and causes abnormal glucose tolerance. **Diabetes.** 55:1421–1429.2006.
- [24] LAVILLE, M.; NAZARE, J.A. Diabetes, insulin resistance and sugars. **Obes. Rev.** 10 (Suppl.1): 24–33.2009.
- [25] LEÓN, A.; BLANCO, D.; PEÑA, A.; RONDA, M.; GONZÁLEZ, B.; ARTEAGA, M. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cerp: SPRD. **REDVET.** 12(11): 1-10.2011.
- [26] MATHEUS, N.; MENDOZA, C.; ICETA, R.; MESONERO, J.; ALCALDE, A. Melatonin inhibits serotonin transporter activity in intestinal epithelial cells. **J. Pineal Res.** 48(4): 332-39.2010.
- [27] MATHEUS, N.; MENDOZA, C.; MESONERO, J.E.; ALCALDE, A.I. La melatonina un potente inmunomodulador. **Rev. Col. Méd. Vet. Edo Lara.** 2(1): 45-51.2012.
- [28] MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A. S. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetol.** 28(7):412-419. 1985.
- [29] MUNIYAPPA, R.; MONTAGNANI, M.; KOH, K.K.; QUON, M.J. Cardiovascular actions of insulin. **Endocr. Rev.** 28(5):463-491.2007.
- [30] OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Bioche.** 95: 351-358.1979.
- [31] PACHER, P.; SZABÓ, C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. **Curr. Opin. Pharmacol.** 6: 136-141.2006.
- [32] PATTON, J.G.; DINH, D.M.; MAO, S.J. Phospholipid enhances triglyceride quantitation using an enzyme kit methods. **Clin. Chim. Acta.** 118(1): 125-128.1982.
- [33] RANJITH, V.; RADIKA, M.K.; ANURADHA, C.V. Effect of Troxerutin on Insulin Resistance Induced by Post-Natal Administration of Monosodium Glutamate: A Comparative Study with Rosiglitazone. **J. Clin. Lab. Investig. Updates.** 1:36-47.2013.
- [34] REITER, R. Functional pleiotropy of the neurohormone Melatonin: Antioxidant protection and neuroendocrine regulation. **Front Neuroendocrinol.** 6(4):383-415. 1995.
- [35] REITER, R.J.; CALVO, J.R.; KARBOWNIK, M.; QI, W.; TAN, D.X. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. **Ann. NY. Acad Sci.** 917:376-86.2000.
- [36] REITER, R.J.; TAN, D.X. What constitutes a physiological concentration of melatonin? **J. Pineal Res.** 34:79-80.2003.
- [37] ROBERTS, C.K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci.** 84: 705-712.2009.
- [38] SCHALKWIJK, C.; STEHOUWER, C.; VANINSBERGH, V. Fructose mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. **Diabetes Metab. Res. Rev.** 20: 369-382.2004.
- [39] SIMMONS, R.; ALBERTI, K.; GALE, E.; COLAGIURI, S.; TUOMILEHTO, J.; QIAO, Q. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert. Consult. **Diabetol.** 53:600-605.2010.
- [40] TAN, D.X.; HARDELAND, R.; MANCHESTER, L.C.; PAREDES, S.D.; KORKMAZ, A.; SAINZ, R.M. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** 85(3):607-623.2010.
- [41] THOMAS, P. Coloración Hematoxilina–Eosina (H&E). Métodos Histotecnológicos. Registros de Patología de los Estados Unidos de América (ARP) y por el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Pp 18-20. 1995.
- [42] TOBEY, T.A.; MONDON, C.E.; ZAVARONI, I.; REAVEN, G.M. Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. **Metabol.** 31(6): 608–612.1982.
- [43] TOOP, C.R.; GENTILI, S. Sheridan Fructose Beverage

Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutr.** 8(9): 1-15.2016.

[44] TRAN, L.T.; YUEN, V.G.; MCNEILL, J.H. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. **Mol. Cell Biochem.** 332(1-2): 145–159.2009.

[45] WALLIN, B.; ROSENGREN, B.; SHERTZER, H.; CAMEJO,

G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. **Anal. Biochem.** 208: 10-15.1993.

[46] WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hyperten.** 44: 381-386. 2004.

[47] ZOU, C.; GON, G.Y.; LIANG, J. Metabolic signaling of insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cell and its derangement in type 2 diabetes. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.** 18: 2215-2227. 2014.