



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

Tesis Doctoral

**“INFLUENCIA DE LA DENERVACION AUTONOMICA  
SOBRE LA FUNCION PANCREATICA EN UN MODELO DE  
SINDROME METABOLICO EXPERIMENTAL.  
DESDE EL CONOCIMIENTO FISIOPATOLOGICO  
A LA BIOQUIMICA CLINICA”**

Autor

**Bioquímica Fabiana Norma López Mingorance**

Director

Prof.Dr. Gustavo Alberto Negri

Co Director

Prof.Dr. Osvaldo Manuel Tiscornia

Directora Adjunta

Prof.Dra. Maria Beatriz Di Carlo

**Lugar de trabajo**

Programa de Estudios Pancreáticos – Hospital de Clínicas “José de San Martín”  
Laboratorio: Gastroenterología y Enzimología Clínica -Cátedra: Bioquímica Clínica II  
Departamento de Bioquímica Clínica - INFIBIOC  
Facultad de Farmacia y Bioquímica -Universidad de Buenos Aires

**2015**

*A la memoria de mis abuelos*

## AGRADECIMIENTOS

*A Luis, mi compañero de ruta, que sin su amor, su paciencia, su inmensa colaboración, no hubiera podido terminar este trabajo, gracias por mantener nuestro hogar íntegro.*

*A Caterina por su comprensión, ayuda, cariño y recordarme que todo es posible.*

*A mi madre quien me enseñó el valor del estudio y de forjar una carrera, que siempre me instó a seguir adelante. A mi padre por sus buenos consejos, su perseverancia, por estar cuando lo necesité en los momentos difíciles de la vida.*

*A María Beatriz, por las miles de horas compartidas, guiarme, por estar SIEMPRE y calmar mis ansiedades. Por trabajar hombro a hombro juntas. Por brindarme su amistad.*

*A mis tíos, Fortu y Titi, que supieron ayudarme a enderezar mi camino, Jorge y Lili un ejemplo de vida. A Estelita, que me acompaña desde el cielo. A mis primos Paula, Fer, Vero e Ian por brindarme su apoyo y la calidez de sus mensajes. A Belen por su ayuda y constante aliento.*

*A mis amigas con quienes compartimos, cursadas, exámenes, noches en vela de estudios y de fiestas, vacaciones, y casamientos. Hoy en distintos puntos cardinales, pero no por eso distantes. Fer y Ceci a quienes quiero con el alma. A María que ocupa un lugar muy especial en mi corazón, a quien extraño entrañablemente.*

*Al Dr Negri quien desde que me entregó el título de Bioquímica, ha guiado mis pasos por la docencia, me ha respaldado en momentos difíciles, y generosamente me ha brindado consejos.*

*Al Dr Tiscornia que me abrió las puertas del Programa cuando aún era estudiante, y ha compartido con generosidad todos sus conocimientos, un gran profesor que me ayudó a crecer como profesional y como persona.*

*A Luis, por su calidez, amistad, profesionalidad, consejos, paciencia y ayuda incondicional.*

*A Verónica, quien además de compartir sus conocimientos me brindó su cálida amistad. A todos sus compañeros de la Cátedra de Fisiopatología, en especial asu jefa la Dra Vaccaro, quienes me permitieron trabajar con ellos, con amabilidad y atención constante.*

*A mis compañeros del Programa Aidee, Selene y Luis, pilares imprescindibles del trabajo diario. Por todos los momentos compartidos, toda la ayuda brindada, más allá de lo laboral.*

*A mis compañeros de la sección, Fernando, Fernanda, Viviana, Betty y Sandra, por la desinteresada colaboración en este trabajo de tesis, en especial a Rosy, quien además con una sonrisa diaria me llena de buena onda.*

*A María del Carmen, con quien compartimos la locura de escribir una tesis. Por las discusiones que nos han llevado por muy buenos caminos.*

*A mis amigos Claudio, Euge, Carlos, Hugo, Pablo y Juan, quienes han estado presentes en este camino. A Claudia y Lore, ángeles guardianes. A Lucrecia, por su cariño, su comprensión, sus valiosos consejos.*

*A mis sobrinas del alma, Lucia y Victoria por su cariño incondicional.*

*A Gache, mi hermana de la vida, que partió antes de lo que me hubiera gustado...*

<b>INDICE</b>	<i>Página</i>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>1-INTRODUCCION</b>	<b>9</b>
1.1 - EL PANCREAS	
1.1.1-Generalidades	<b>9</b>
1.1.2 -Alteración del eje Exocrino-Endocrino	<b>10</b>
1.2 - SINDROME METABOLICO	
1.2.1-Generalidades	<b>12</b>
1.2.2-Fisiopatología del SM	<b>13</b>
1.2.3-Patogénesis del SM producido por Fructosa (modelo animal)	<b>14</b>
1.2.4-Insulino-resistencia (IR)	<b>16</b>
1.3 - SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO (SNA)	
1.3.1-Generalidades	<b>23</b>
1.3.2-Regulación Neuroendocrina del Hipotálamo en el SM	<b>24</b>
1.3.3-Regulación Neuroendocrina Pancreática	<b>25</b>
1.3.4- Influencia del SNA en la IR-HISS	<b>27</b>
1.3.5- Demostración de la actividad colinérgica-ChAT	<b>28</b>
<b>2 – HIPÓTESIS</b>	<b>29</b>
<b>3 - OBJETIVOS</b>	
<b>3.1 - Objetivos Generales</b>	<b>30</b>
<b>3.2 - Objetivos Específicos</b>	
1-En individuos controles y con diagnóstico de SM	<b>30</b>
2-En ratas Sprague Dawley sin y con SM(Fructosa)	<b>31</b>
<b>4 – MATERIALES Y MÉTODOS:</b>	
<b>4.1 - En individuos controles y con diagnóstico de SM</b>	<b>32</b>
<b>4.2 - En un modelo experimental animal</b>	<b>38</b>
<b>4.3 - Consideraciones bioéticas</b>	<b>43</b>
<b>4.4 - Análisis estadístico</b>	<b>44</b>

<b>5-RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>5.1- En individuos controles y con diagnóstico de SM</b>	
5.1.1-Mediciones clínicas y bioquímicas	<b>45</b>
5.1.2-Tolerancia a la glucosa, IR, y la función de la célula $\beta$	<b>48</b>
5.1.3-Funcionalidad del páncreas exocrino (PLs)	<b>53</b>
5.1.4-Análisis de los resultados obtenidos en ítems anteriores	<b>55</b>
<b>5.2-En un modelo experimental animal</b>	
<b>A. Animales controles y SM</b>	<b>58</b>
A-5.2.1. Antropometría, bioquímica y estado global del páncreas	
A-5.2.1.a) Los animales SM en relación a los controles	<b>58</b>
A-5.2.1.b) Evaluación global del páncreas	<b>58</b>
A-5.2.2. Tolerancia a la glucosa, IR, y función de la célula $\beta$	
A-5.2.2.a) PTOG a tres tiempos	<b>60</b>
A.5.2.2.b) Índices que evalúan IR y función de la célula $\beta$	<b>63</b>
A.5.2.3 Análisis histológico	<b>64</b>
<b>B. Animales con y sin cirugía</b>	
B-5.2.1. Comparación entre los grupos(C, CF, S, SF, E y EF)	
B-5.2.1.a) Antropometría, bioquímica relacionadas al SM	<b>65</b>
B-5.2.1.b) Evaluación global del páncreas	<b>66</b>
B-5.2.2. Tolerancia a la glucosa, IR, y función de la célula $\beta$	
B-5.2.2. a) PTOG a tres tiempos	<b>67</b>
B-5.2.2. b) Índices que evalúan IR y función de la célula $\beta$	<b>70</b>
B-5.2.3 Análisis histológico e inmunohistoquímico	<b>71</b>
<b>6 - DISCUSION</b>	<b>77</b>
<b>7 – CONCLUSIONES</b>	<b>89</b>
<b>8 - BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>91</b>

## RESUMEN

El páncreas, es una glándula mixta, interviene en el proceso digestivo de los nutrientes, y regula la homeostasis de la glucosa. Es regulado por mediadores humorales y neurales (SNA). Sus componentes exocrino (acino) y endocrino (islote de Langerhans) interactúan y cooperan íntimamente (eje endocrino-exocrino).

Los ganglios intrapancreáticos, integran la información intrapancreática, y modulan la interacción del eje endocrino-exocrino. Generan un tono colinérgico que permite la acción de las hormonas. Reciben información extra pancreática a través de los espláncnicos y vagales e integran los distintos impulsos nerviosos (información intrapancreática). A través de fibras colinérgicas preganglionares la glándula recibe impulsos desde centros vagales altos y está modulada por reflejos duodeno-pancreáticos

El síndrome metabólico (SM) definido por ATPIII, considera cinco factores de riesgo, es la insulino resistencia (IR), el componente patogénico fundamental. El desequilibrio del SNA y su falta de ritmo, a causa de factores ambientales, podría ser el responsable principal del SM.

Se postula que en el SM, la IR afecta, a través del eje endocrino-exocrino, la función exocrina pancreática. El SM se relaciona con un desbalance del SNA, así, una interrupción del circuito vago-central-espláncnico, puede mejorar la IR característica. La esplancnicectomía corta un freno modulador del tono colinérgico hepático y favorece la liberación del HISS (Hepatic Insulin Sensitizing Substance), potencial hormona que tiene un efecto positivo sobre el músculo esquelético, corazón y riñones, aumentando la disponibilidad de glucosa en los tejidos.

Se trabajo con pacientes: controles y con SM, evaluados por ATPIII. Se estudió la evaluación global del páncreas (amilasa, lipasa, glucosa e insulina), prueba de tolerancia a la glucosa ampliada a cuatro tiempos (PTOG), índices de IR y función de la célula $\beta$  (Glu/Ins, HOMA-IR, PG%, IGI<sub>30</sub>, IGI<sub>AUC</sub> e ISI) y función exocrina indirecta (Pancreolauryl-PLs)

Se realizó un modelo experimental de SM (fructosa 10%, 18-20 semanas) en ratas macho Sprague Dawley a los fines de estudiar los efectos producidos por la denervación simpática del complejo esplácnico-solar, (Esplacnicectomía). Los animales se dividieron en controles, sham y esplacnicectomizados. Se realizó la evaluación global del páncreas (amilasa, lipasa, glucosa e insulina), PTOG a tres tiempos, índices de IR y función de la célula  $\beta$ . Luego de la autopsia se separó el páncreas e hígado para el estudio histopatológico e inmunohistoquímico (presencia de Colina Acetiltransferasa-ChAT)

Los pacientes con SM presentaron diferencias significativas en los parámetros propuestos para su evaluación (ATPIII), y en los que evalúan al páncreas exocrino (amilasa, lipasa y PLs), endocrino (glucosa e insulina), y la PTOG ampliada (pancreatograma).

La PTOG evidenció IR hepática (ayunas) y periférica. Se observó relación entre la alteración de la fase tardía de secreción de la insulina, y una IR periférica severa, que conducen a la alteración exocrina del páncreas.

El cálculo de los índices de IR y la funcionalidad de la célula  $\beta$ , fueron significativamente diferentes, ratifica la presencia de IR hepática (ayunas) y periférica, alteración de la célula  $\beta$  en la primera fase de liberación de la insulina.

El PLs en SM fue significativamente menor. Dentro de estos pacientes, el 46% presentaron resultados menores al valor de corte (4,5mg/l), y de ellos el 21% resultados menores al segundo valor de corte (2,5mg/l).

Los animales con SM presentaron diferencias significativas en los parámetros de: evaluación del SM, del páncreas exocrino (amilasa, lipasa) y endocrino (glucosa e insulina), y en la PTOG de comportamiento similar a los humanos. La PTOG evidenció IR severa hepática (ayunas) y periférica. En el análisis histológico del páncreas de los animales con SM, se observó mayor inflamación, infiltración leucocitaria, vasos dilatados, aumento del tejido adiposo en la zona peri-pancreática, evidenciando a nivel tisular los efectos tóxicos del SM.

Los animales esplacnicectomizados, con SM experimental, nos permitieron relacionar SNA-IR-SM. Ellos no presentaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados. Su comportamiento fue similar al de los animales sin SM. Del estudio anatomopatológico e inmunohistoquímico, se observó una leve infiltración leucocitaria, y presencia marcada de la actividad de ChAT.

Conclusiones: para evaluar el estado metabólico del paciente con SM es de utilidad efectuar la PTOG ampliada, analizar la forma y tiempo máximo de glucosa e insulina, calcular índices de IR y evaluar la funcionalidad de la célula  $\beta$ . En su conjunto son una herramienta valiosa para la prevención, diagnóstico y tratamiento.

El PLs, útil para evaluar la insuficiencia exocrina, resulta ventajosa por ser no invasiva y factible en el laboratorio no especializado.

La denervación produce la pérdida de un freno simpático y disminuye el reflejo vago-vagal. Se incrementa el tono colinérgico hepático, que facilita la liberación de una potencial hormona denominada HISS (Hepatic Insulin Sensitizing Substance), que junto a la insulina, estimula al músculo para la captación de la glucosa.

La esplancnicentomía efectuada en los humanos, podría ser una herramienta terapéutica útil, alternativa a la cirugía bariátrica, en pacientes obesos con SM.



# 1-INTRODUCCION

## 1.1 - EL PANCREAS

### 1.1.1 – Generalidades

El páncreas, es una glándula mixta de importancia, tanto en el proceso digestivo de todos los nutrientes, como en la homeostasis de la glucemia. Está compuesto por el pancreón, unidad anátomo-funcional del páncreas exocrino, y el islote de Langerhans, unidad anátomo-funcional del páncreas endocrino. Están anatómica y fisiológicamente relacionados. [Tiscornia OM, 1971; Henderson IR, 1981]

La célula acinar o pancreón, sintetiza los gránulos de zimógeno, es la constituyente del acino pancreático, y representa el 82% de la glándula.

La secreción exocrina pancreática, imprescindible para el proceso de absorción de los nutrientes en el intestino, está formada por un componente hidrelático (agua y electrolitos) estimulado por la hormona secretina y un componente ecbólico (enzimas amilolíticas, proteolíticas y lipolíticas) estimulado principalmente por la hormona CCK (colecistocinina-pancreozimina). Es inervado por el sistema nervioso autónomo (SNA). [Gingras D, 1992].

Dado que las enzimas digestivas se sintetizan en la célula acinar y su lugar de acción es el duodeno, habitualmente en el laboratorio bioquímico clínico se evalúan los cuadros inflamatorios y/o necróticos de la glándula, a través de la determinación de la actividad de las enzimas amilasa y lipasa en suero. [Lankisch PG, 1983]

Para evaluar la funcionalidad pancreática exocrina se utilizan pruebas funcionales directas como el test de secretina (gold standard), o de manera alternativa pruebas indirectas como Pancreolauryl sérico. [Dominguez-Muñoz J, 1998; Sanz de Villalobos E, 2000]

Los islotes de Langerhans aparecen como islas rodeadas de tejido exocrino y representan del 1 al 2 % del parénquima, muy vascularizados, e inervados por el SNA. Están constituidos por diferentes tipos celulares (células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y F) capaces de sintetizar: glucagon, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático. [Henderson IR, 1981; Tiscornia OM, 1971]

La insulina, hormona polipeptídica anabólica, se sintetiza a partir de preproinsulina en las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans. La secreción de insulina es un proceso regulado por la interrelación de nutrientes, hormonas gastrointestinales y pancreáticas y neurotransmisores del SNA, para proporcionar concentraciones estables de glucosa en la sangre tanto en ayunas como post ingesta.

Su secreción es bifásica, la primera fase de la liberación de la insulina, post prandial inmediata, en respuesta al aumento de los niveles de glucemia, alcanza un máximo después de 1 a 2 minutos, y es de corta duración. La segunda fase produce una liberación sostenida y lenta.

Su función principal es favorecer el ingreso de la glucosa en las células blanco, principalmente hepatocitos, miocitos y adipocitos, y así mantener la homeostasis de la glucosa. Inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis en el hígado, regulando la producción de glucosa hepática. Promueve el crecimiento y la diferenciación celular. Estimula la lipogénesis y almacenamiento de lípidos, la síntesis de proteínas y glucógeno en hígado y en músculo, mientras que inhibe la lipólisis, la glucogenólisis y la degradación de proteínas. La resistencia a esta hormona lleva a hiperglucemia e hiperlipidemia. [Davis SN, 2006; Muniyappa R, 2008; Hayashi T, 2013; Gastadelli A, 2004]

### **1.1.2 – Alteración del eje Exocrino-Endocrino**

Los componentes endocrino y exocrino pancreáticos interactúan y cooperan íntimamente (eje endocrino-exocrino) en los procesos digestivos, de absorción y del metabolismo de los nutrientes. [Tiscornia OM, 2013]. Debido a su estructura las hormonas secretadas por los islotes regulan las células ductales y la actividad exocrina de los acinos. [Pieler T, 2006]

La secreción exocrina pancreática esta regulada por interacciones hormonales y neurales (péptidos y neurotransmisores). La insulina liberada en la primera fase estimula la secreción del jugo pancreático; provee un rol permisivo a la acción de la secretina y de la CCK a concentraciones fisiológicas. La somatostatina, el PYY (péptido tirosina-tirosina) y el PP (polipéptido pancreático) inhiben la liberación de las hormonas, el glucagon durante el ayuno deprime la secreción del jugo pancreático (ecbólica e hidrelática). [Chey WY, 2001; Hayden MR, 2008]. Las incretinas: GLP-1(péptido similar al glucagón tipo 1) y GIP

(polipéptido inhibidor gástrico), secretadas por células endocrinas diseminadas por el intestino delgado, estimulan la secreción de insulina.

La pancreatitis crónica, con el tiempo, conduce a una peculiar forma de diabetes (diabetes tipo 3) caracterizada por la destrucción de los islotes por inflamación y fibrosis., no esta limitada como en el caso de la DBT 1 a las células  $\beta$ . Debido a la insuficiencia exocrina hay malabsorción de los nutrientes, que conduce a una alteración de la secreción de las incretinas y disminución de liberación de insulina. En algunos casos son insulino-requiere. [Rickels MR, 2013]

En las pancreatitis agudas se observa una hiperglucemia transitoria en ayunas, y una hipoinsulinemia, que desaparecen aproximadamente a los 20 días [Dominguez-Muñoz J, 1995]

La intolerancia a la glucosa y la Diabetes tipo 2 (DBT 2), son enfermedades metabólicas, relacionadas a la función endocrina del páncreas, caracterizadas por hiperglucemia y resistencia a la insulina (IR). [Ferrandini F, 2003; Maximino Ruiz 2006]

Los pacientes intolerantes a la glucosa, son aquellos cuyos niveles de glucemia no llegan a cumplir los criterios de diabetes, pero tampoco pueden considerarse normales (glucemia en ayunas: 100-126 mg/dl, o Glucemia 2 horas post sobrecarga de 75g de glucosa: 140-199 mg/dl). Se los asocia al síndrome metabólico. Presentan mayor obesidad, mayor IR e hiperinsulinemia. [Abou-Seif M, 2004; ADA 2014]

En la DBT 2 se ha observado aumento de las enzimas amilasa y lipasa, sin dolor abdominal, que se incrementa con el aumento del desequilibrio metabólico (hiperglucemia, deshidratación y cetoacidosis). [Malloy J, 2012].

En el mismo sentido, al evaluar la función pancreática exocrina, a través de la determinación de Elastasa-1 se observó que el 50% de los pacientes con DBT 1 y el 35% de los pacientes con DBT 2 presentaban una función exocrina disminuida. Se comprobó el correlato con las alteraciones anatomohistopatológicas. [Hardt PD, 2011]

Un estudio retrospectivo demostró que los pacientes con DBT 2 presentan un mayor riesgo a sufrir pancreatitis aguda y alteraciones biliares. [Noel RA, 2009]

Está ampliamente demostrada la interacción endocrino-exocrina, donde la alteración de uno de los componentes se refleja en el otro. [Hardt PD, 2011]

## **1.2 – SINDROME METABOLICO**

### **1.2.1 – Generalidades**

El síndrome metabólico (SM) es uno de los principales problemas de la salud pública en el mundo del siglo XXI, asociado al desarrollo de la DBT 2 y la enfermedad cardiovascular (ECV). [Kaur J, 2014]

Las primeras referencias bibliográficas del SM son de los años 20, en que se describió una asociación entre la hipertensión, la hiperglucemia y la gota. [Kylin E, 1923].

En 1947 se publicó que el fenotipo de obesidad con excesiva acumulación de tejido adiposo (tipo androide) se asociaba con alteraciones metabólicas observadas en la DBT2 y en la ECV [Vague J, 1996].

En los años ochenta, Reaven, describió un cuadro al que denominó “Síndrome X” que incluía un conjunto de alteraciones metabólicas cuya característica central era la IR, remarcando la influencia de los factores genéticos y ambientales. Su principal contribución fue la introducción del concepto de resistencia a la insulina. [Reaven G, 1988].

La Organización Mundial de la Salud (WHO) en 1998, definió por primera vez al SM como tal, y estableció como criterio diagnóstico: la presencia de tolerancia a la glucosa alterada, diabetes mellitus o IR, diagnosticados con el “Clamp Euglucémico”, más dos de los siguientes factores: obesidad, hipertrigliceridemia, disminución del colesterol-HDL o hipertensión. [WHO, 1999].

En el 2001 el National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III (ATP III) publicó su definición, más práctica, propuesta para aplicarse en la clínica diaria ya que no requiere la evaluación de la IR. Adoptó un enfoque donde todos los componentes del síndrome son considerados por igual, y se encuentran íntimamente relacionados a la IR. Para la identificación del SM se requiere la presencia de al menos tres de los cinco factores de riesgo, con valores de corte establecidos. Obesidad abdominal (evaluado por el contorno de la cintura), hipertrigliceridemia, disminución del colesterol HDL, hipertensión e hiperglucemia en ayunas. [ATP III, 2001].

Estas definiciones generaban confusión y dificultad para establecer comparaciones entre los datos de prevalencia en las distintas poblaciones; difieren en los componentes y en los valores de corte utilizados. Por ello en el 2005 la International Diabetes Federation (IDF), señaló la necesidad de una definición internacional estandarizada y recomendó efectuar una prueba de tolerancia oral a la glucosa. [Alberti KG, 2005].

Se actualizó la definición del ATP III propuesta por la American Heart Association y por la National Heart, Lung, and Blood Institute. [Lorenzo C, 2007] deben estar presentes tres o más de los siguientes factores de riesgo:

- circunferencia de cintura (CC) (mujeres > 88cm, hombres > 102cm),
- presión arterial sanguínea (PA $\geq$ 130/85 mmHg) o tratamiento con antihipertensivos,
- glucemias en ayunas (Glu $\geq$ 110 mg/dl) o tratamiento hipoglucemiante,
- triglicéridos (TG  $\geq$  150 mg/dl) o tratamiento farmacológico por elevación de TG,
- disminución del colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) (mujeres $\leq$ 50mg/dl, hombres $\leq$ 40mg/dl) o tratamiento farmacológico.

Pueden aparecer de forma simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por la combinación de factores genéticos y ambientales asociados al estilo de vida (sobrealimentación y la ausencia de actividad física) en los que la IR se considera el componente patogénico fundamental. [Grundy SM, 2005; Ribeiro R, 2005; Lorenzo C, 2007, Alberti KG, 2009; Vanni E, 2010]

### **1.2.2 – Fisiopatología del SM:**

La fisiopatología del SM aun no se ha dilucidado, desde hace décadas se investiga [Grundy S, 2005], distintos autores han considerado diferentes mecanismos patogénicos, han considerado qué, una deficiente respuesta biológica a concentraciones normales de insulina, la IR y la consecuente hiperinsulinemia, son la causa de las alteraciones fisiopatológicas. [Reaven G, 2004]. Han propuesto que la obesidad y la desregulación del metabolismo del tejido adiposo serían las causales. [Grundy S, 2004]. Otros autores consideran que el desbalance del SNA, inclinado hacia un aumento de actividad simpática puede ser el causal del SM. [Lambert GW, 2010]

El tejido adiposo, integrado por adipocitos, fibroblastos, preadipocitos, y macrófagos; actúa como un verdadero órgano endocrino, dinámico, que produce sustancias metabolicamente activas, que mantienen el equilibrio energético y regulan el metabolismo glucídico y lipídico. Estas sustancias controlan la ingesta de alimentos, el peso corporal, la angiogénesis, la fibrinólisis y los procesos pro-inflamatorios. De ellas las más importantes son los ácidos grasos libres, y diferentes compuestos proteicos denominados citoquinas del tejido adiposo: adipoquinas. Tienen efecto local y a nivel sistémico.

Entre las adipoquinas proinflamatorias se encuentran IL-6 (interleuquina 6) y TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), inhibidor del activador de plasminógeno, angiotensinógeno. El tejido adiposo, expresa numerosos receptores que le permiten responder a señales

aferentes de distintos órganos endocrinos y del sistema nervioso central. [Bastarrachea R, 2007; Fernandez-Veledo S, 2008; Hall J, 2010]

La insulina, regulador de la célula adiposa, genera el almacenamiento de triglicéridos por inducción de su síntesis y por estímulo del transporte de la glucosa (lipogénesis). Inhibe la lipólisis e interviene en la captación de ácidos grasos derivados de las lipoproteínas circulantes a través de la activación de la lipoproteínlipasa. [Nieto-Vazquez I, 2008]

La hiperinsulinemia presente en condiciones de IR y obesidad, libera a circulación gran cantidad de ácidos grasos libres, los cuales son responsables del hígado graso no alcohólico. [Kahn B, 2004]

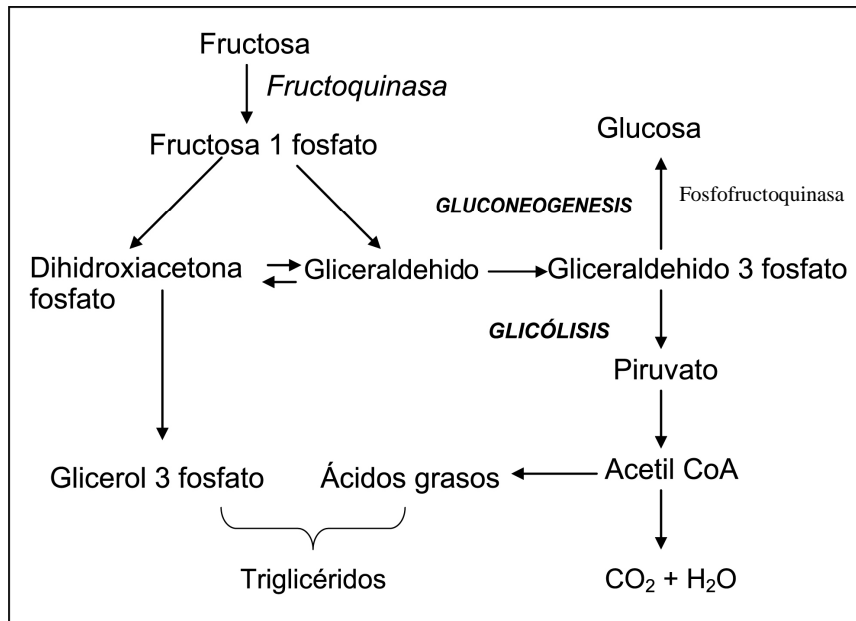
Estudios experimentales, demuestran que factores ambientales (estrés, composición de la dieta y cambios del estilo de vida) pueden generar un desbalance del SNA, el cual sería promotor de la IR. Se ha observado que en el estrés o la administración exógena de catecolaminas incrementan la glucemia, oponiéndose a la acción de la insulina. [Lindmark S, 2005; Lutt W, 2004; Ribeiro R, 2005; Lim J, 2010]

### **1.2.3 – Patogénesis del SM producido por Fructosa (modelo animal)**

La fructosa, está implicada en la patogénesis del SM y del hígado graso no alcohólico. Se considera que la fructosa ocasiona desordenes metabólicos cuando aporta el 25% o más de las calorías ingeridas.

La fructosa libre se absorbe en duodeno y yeyuno por difusión facilitada a través de una proteína transportadora, GLUT-5, en un proceso no dependiente de sodio; por un sistema de transporte activo, más lento que el de glucosa.

Contrariamente a la glucosa, la molécula de fructosa ingresa en la vía glicolítica sin pasar por: la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa (punto de regulación)



**FIGURA 1:** Ruta metabólica de la fructosa.  
(Tomado de: Esquivel, S. Acta Médica Costarricense, 2007)

En la glucólisis, el punto de control, es el de la fosfofructoquinasa, proceso irreversible que fosforila el carbono 1 de la glucosa, con gasto de ATP, esta enzima es inhibida alostéricamente por el citrato, regulando la producción de triglicéridos. La fructosa captada por el hígado es fosforilada a fructosa-1-fosfato, se incorpora al ciclo y por medio de la aldolasa se convierte en gliceraldehído-3-fosfato o dihidroxiacetona-fosfato, que entran en la vía glicolítica. [Nielsen S, 2004. Elliott S. 2002; Esquivel, S. 2007]

El consumo de fructosa se incrementó, desde los años sesenta, como endulzante de bebidas, postres, mermeladas y caramelos. Esto motivó el interés por evaluar el efecto del consumo elevado de fructosa en personas con síndrome metabólico y diabéticos. La ingesta de fructosa comparada con la de otros azúcares, produce a las 2 horas, un mínimo incremento de la glucemia E insulinemia post prandial, tanto en individuos sanos como en diabéticos. [Bantle JP. 2009]. Se demostró que roedores sometidos a dietas con fructosa, disminuyen su sensibilidad tisular a la insulina, aumentando la IR. [Daly M. 2003; Mayer M 2007; Puyó A 2012].

La dieta con un alto contenido en fructosa puede inducir resistencia a la insulina por estimulación repetitiva de las células beta-pancreáticas, lo cual produce un incremento de las concentraciones de insulina en plasma. [Catena C 2003]

#### **1.2.4.- Insulino-resistencia (IR)**

La IR se define como una disminución de la sensibilidad de los tejidos blanco a la acción de la insulina en su mediación para disponer de la glucosa circulante e inhibir la glucosa de producción hepática; en otra palabras, necesita mayor concentración de insulina para causar el mismo efecto, disminuye la capacidad de los tejidos diana de utilizar la glucosa circulante, principalmente músculo esquelético, donde está afectado el transporte de glucosa al interior de la célula y la síntesis de glucógeno. A nivel del tejido adiposo la principal característica de la IR es el incremento de la vía de la lipólisis, disminuyendo la actividad antilipolítica de la insulina. A nivel hepático la IR se evidencia por una mayor producción de glucosa desde glucógeno, porque se encuentra alterada la vía de inhibición de la glucogenolisis. Contribuye a la fisiopatología de la diabetes. [Abdul-Ghani MA, 2007; Accili D, 2004]

Los pacientes con SM conforman un grupo heterogéneo, pueden presentar glucosa elevada en ayunas, o a los 120 minutos o ambas, situaciones consideradas por la American Diabetes Association (ADA) como un estado de pre-diabetes, donde está alterada la secreción de insulina e incrementada la IR.

El estado de prediabetes presenta una fisiopatología y un pronóstico diferente al de DBT. Su prevalencia en adultos jóvenes es del 35% y en mayores de 65 años hasta un 50%.

Es necesaria su identificación para poder instaurar las estrategias necesarias para evitar el desarrollo de DBT2, y/o de ECV. Estos pacientes pueden ser estudiados a través de la respuesta a la Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa.(PTOG) [Fajans S, 1965; ADA, 2010]

La ADA, estableció por primera vez en 1997 los lineamientos para efectuar la PTOG, y se expidió sobre los valores de corte para uso diagnóstico y su estandarización. En años sucesivos, editó modificaciones y actualizaciones [ADA, 1997; Herman W, 2007; ADA 2007, ADA 2010, ADA 2014].



#### **1.2.4.1- Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa**

La PTOG es un método simple, fisiológico e indirecto, para estudiar pacientes con intolerancia a la glucosa y DBT 2; menos complejo que el clamp euglucémico. Este último considerado el método “gold standard” para determinar la presencia de IR

Consiste en la realización de mediciones seriadas de glucemia: basal y 120 minutos post ingesta de una sobrecarga de glucosa. [Muniyappa R, 2008, Dalla Man C, 2005]

Refleja la eficiencia del organismo para disponer de la glucosa luego de alimentarse. Emula o mimetiza la dinámica de la glucosa y de la insulina tras la ingesta, bajo condiciones fisiológicas. Evidencia la tolerancia a la glucosa donde intervienen la acción metabólica de la insulina, la sensibilidad de los tejidos blanco y la función de la célula  $\beta$ . Tiene en cuenta las hormonas intestinales, la motilidad intestinal y el vaciamiento gástrico. Además, está presente la respuesta neuronal a la ingestión de nutrientes; estos factores varían mucho de un individuo a otro. [Grant R, 2015].

Permite entre normoglucemia y diabetes, evidenciar estados de intolerancia a la glucosa (pre-diabéticos): ♦ Glucosa alterada en ayunas:

Glucemia basal: 110-125 mg/dl

♦ Tolerancia a la glucosa alterada post sobrecarga de glucosa:

Glucemia 120 minutos: 140-99 mg/dl

♦ Presencia de ambas situaciones: Glucemia basal y 120 minutos alterados

En estudios epidemiológicos, con realización de PTOG, se evidenció que el 14% de los pacientes, con un valor de glucosa basal (en ayunas)  $<100$ mg/dl, a las 2 horas presentaban valores alterados. [Stumvoll M, 2000; Stumvoll M, 2001].

Se observó que cuando los valores de glucemia 120 minutos son mayores a los basales, la sensibilidad a la insulina periférica esta disminuida, requiriéndose una mayor secreción para mantener la homeostasis de la glucemia. El riesgo de desarrollar DBT2 es menor cuanto menos se demore la glucemia en regresar a niveles similares al basal. [Abdul-Ghani MA, Matsuda M, 2007]

Para incrementar la información que aporta la PTOG se considera la determinación de tiempos intermedios entre el basal y los 120 minutos. Se incorporan en una prueba ampliada el estudio a los 30 y 60 minutos, y la determinación de insulina en cada uno de los cuatro tiempos. [Bartoli E, 2011; Wild S, 2007; Kramer C, 2014]

◆La determinación a los 30 minutos, permite evaluar la primera fase de la secreción de la insulina. Demostró que posee un fuerte valor predictivo para desarrollar DBT2, con un valor de corte mayor o igual a 165 mg/dl, y buena correlación con los índices de función de la célula  $\beta$ . [Kim YA, 2014]

◆La determinación a los 60 minutos, identifica individuos con alto riesgo de desarrollar DBT2. [Unwin N, 2002] Estudios epidemiológicos, han demostrado que el 40% de pacientes que desarrollaban DBT2, presentaban glucemias normales a tiempo basal y 120, con valores elevados a los 60 minutos. Se demostró que, un valor de corte de glucemia mayor o igual a 155mg/dl, evidencia la alteración del metabolismo de glucosa en pacientes con SM [Abdul-Ghani MA, 2007; Abdul-Ghani MA, 2008; Kim JY, 2013].

Es un buen indicador de alteraciones metabólicas, la glucemia disminuye entre los 30 y los 60 minutos, dependiendo de la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina y la función de la célula  $\beta$ . Si esta alterada una o ambas, se refleja en las determinaciones efectuadas en este tiempo. (lo que conducirían a desarrollar DBT 2), [Stumvoll M, 2001]. Se ha demostrado, que presenta una mejor correlación con la IR, tanto hepática, como muscular y con la disfunción de la célula  $\beta$ , que el valor de las 2 hs. [Abdul-Ghani MA, 2009; Abdul-Ghani MA, 2010; Oh TJ, 2015]

◆Concentración de insulina en cada tiempo, se determina en simultáneo con la determinación de la glucosa., completa el análisis metabólico de la glucemia. La insulina modula la manera en que aumenta y disminuye la glucemia, el tiempo en que llega a su máximo y el que demora en retornar al valor basal. [Hayashi T, 2013; Gastadelli A, 2004]

La PTOG ampliada, con las determinaciones de las concentraciones de glucosa e insulina en los tiempos basal, 30, 60 y 120 minutos, fue definida por el Prof. Dr Tiscornia como “Pancreatograma”, que junto a los estudios indirectos de función exocrina, permiten evaluar en forma global al páncreas.

Se considera complementario, el estudio de la forma gráfica que adquiere la PTOG ampliada, el tiempo en el que aparecen los máximos de las concentraciones de glucosa e insulina y los índices de IR y funcionalidad de la célula  $\beta$ .

◆ Forma de las curvas al graficar concentración (glucosa e insulina) en función del tiempo (B, 30, 60 y 120), se generan las curvas de glucemia y de insulinemia. La forma que adoptan dichas curvas, el tiempo al cual alcanzan el pico máximo, y el tiempo que demoran en alcanzar el valor basal aumentan la información que proporciona la PTOG ampliada. Diferentes formas corresponden a diferencias en la secreción y acción de la insulina a nivel periférico. Post sobrecarga de glucosa el incremento inicial de la glucemia está determinado por la IR hepática y la primera fase de secreción insulínica. La velocidad de descenso hacia el valor basal depende principalmente de la fase tardía de la secreción de insulina, y de la sensibilidad de los tejidos a la misma. [Nolfe G, 2011; Kanauchi M, 2005; Sluiter W, 1976; Zhou W, 2006] Las posibles formas de las curvas son: monótonas, cuando el incremento es constante desde el basal hasta las 2 hs; monofásicas, cuando hay un incremento desde el basal, llega a un pico máximo entre los 30 y 60 minutos y luego desciende. [Tschrutter O, 2003]

◆ Tiempo al que se presenta el pico máximo, es un predictor de disglucemia (tolerancia a la glucosa alterada); En personas normoglucémicas el pico máximo de glucemia prevalentemente ocurre en el tiempo de 30 minutos sincronizado con el pico de insulinemia, y la forma, monofásica para ambas determinaciones. En individuos con alteración en el metabolismo de la glucosa el pico máximo ocurre en el tiempo 60 minutos y prevalece la morfología monótona. [Kanauchi M, 2005]. Es menor riesgo de desarrollar DBT2 cuanto menos demore en regresar a valores similares o menores al basal. [Abdul-Ghani MA, 2007; Matsuda M, 2007; Retnakaran R, 2010].

Pacientes con el pico de insulina temprano, disminuyen las probabilidades de DBT2 respecto de los que tienen el pico tardío, sumado a la forma de la curva de insulina son de utilidad para predecir el desarrollo de la DBT2. Cuanto más temprano se detecte la alteración, antes se instaurarán las medidas preventivas y mejor calidad de vida tendrá el paciente. [Hayashi T, 2013; Gastadelli A, 2004; Abul-Ghani MA, 2006]

#### **1.2.4.2- Índices que evalúan la IR y función de la célula $\beta$**

Con la información proporcionada por la PTOG es posible calcular índices para estimar la IR en ayunas y periférica, evaluar la respuesta de la célula  $\beta$  en las dos fases de la secreción de la insulina. [Kraemer C, 2014; Kim YA, 2014; Phillips D, 1994]

El ayuno es un estado basal donde la homeostasis de la glucemia se mantiene dentro de los valores normales ya que la insulina no varía y la glucosa de producción hepática es constante. Valores elevados en ayunas de glucosa e insulina, demuestran la presencia de la IR. Con el desarrollo de diabetes, la insulina en ayunas tiende a disminuir, porque disminuye la función de la célula  $\beta$ . Además la concentración de insulina basal en pacientes diabéticos es el resultado de dos importantes alteraciones, la IR de los tejidos y una disminución de su producción. Esto explica por qué los niveles de insulina en ayunas pueden predecir con precisión la sensibilidad a la insulina en los pacientes normoglicémicos, más que en las personas con intolerancia a la glucosa o DBT 2. [Antuna-Puente B, 2011]

Debido a que inicialmente la RI aparece de forma sub-clínica, se considera necesario cuantificar la sensibilidad a la insulina por métodos sencillos como una herramienta epidemiológica y clínica para identificarla y poder evaluar los tratamientos y las consecuencias. [Bartoli E, 2011]

##### **◆ Índice Glucosa/insulina ayunas**

Provee información de IR para la población no-diabética, según, un valor de corte menor a 4,5, es útil como valor de screening. [Bartoli E, 2011]

##### **◆ Índice HOMA-IR**

Es el más ampliamente utilizado tanto en la clínica diaria como en estudios prospectivos o de investigación para evaluar la IR. Es un modelo útil para predecir en ayunas la interacción dinámica entre la glucemia y la insulinemia dentro de un amplio rango de posibles combinaciones de IR y de función de la célula  $\beta$ . Asume que hay un feed-back entre el hígado y las células  $\beta$ . La glucemia en ayunas está regulada por la producción de glucosa hepática y la insulina secretada por las células  $\beta$  en respuesta a la concentración de glucosa plasmática. Si disminuye la concentración de insulina aumentará la producción de glucemia por el hígado. El índice HOMA-IR describe la homeostasis glucemia-insulina a través de ecuaciones matemáticas, normalmente se utiliza una

aproximación del modelo y se define como el producto de la glucemia y la insulinemia en ayunas dividido un factor normalizador:  $22,5 (4,5(\text{mmol/l}) \times 5(\mu\text{U/ml}))$ . [Matthews DR, 1985]

Para su cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = \text{glucosa}_{\text{Basal}} (\text{mmol/l}) \times \text{insulina}_{\text{Basal}} (\mu\text{U/ml}) / 22,5 (\text{mmol/l})(\mu\text{U/ml})$$

Bajos valores de HOMA-IR indican alta sensibilidad, mientras que valores elevados evidencian una disminución de la sensibilidad. En el trabajo original determinaron en sujetos normales un rango 1,21 y 1,45. En sujetos con IR diabéticos un rango de 2,61 y 2,89. Correlaciona bien con el clamp euglucémico en pacientes normoglucémicos o con DBT 2 moderada. La limitación del HOMA-IR es el hecho de asumir que la sensibilidad a la insulina en el hígado y los tejidos periféricos es equivalente, y se sabe que existe diferencia entre individuos. [Matthews DR, 1985; Matsuda M, 1999]. Según bibliografía consultada El valor establecido como valor de corte es  $>2,5$  y confirmado la población que acude al Hospital de Clínicas. [Levy J, 1998; Garmendia M, 2009]

#### ◆ Porcentaje de incremento de glucosa a las 2 hs (PG%):

Es una herramienta para detectar la eficacia de la célula  $\beta$ . La tolerancia se afecta cuando frente a una disminución de la sensibilidad a la insulina, el aumento de la secreción de la misma no la compensa.

Para su cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{PG\%} = (\text{Glucosa}_{120} - \text{Glucosa}_{\text{Basal}}) \times 100 / \text{Glucosa}_{\text{Basal}}$$

En pacientes normoglucémicos un aumento del PG% de 40-50% muestra menor sensibilidad. Permite detectar diferencias fisiopatológicas entre sujetos con supuesta tolerancia normal y comenzar con el tratamiento preventivo, los autores establecieron un valor de corte del 20% para instaurar una estrategia preventiva. [Carnevale Schianca GP, 2010; Bartoli E, 2011].

#### ◆ Índice Insulinogénico (IGI)

Es un indicador de función de la célula  $\beta$  en la primera fase de liberación de la insulina [Seltzer HS, 1967; Kim YA, 2014].

Para su cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{IGI}_{30} = (\text{Insulina}_{30} - \text{Insulina}_{\text{Basal}}) / (\text{Glucosa}_{30} - \text{Glucosa}_{\text{Basal}})$$

Presenta aceptable correlación con el clamp euglucémico para distintos grados de tolerancia a la glucosa. Su valor es elevado en los normoglucémicos y disminuye, con el

incremento de la intolerancia, hacia los DBT 2. Es un cálculo sencillo que podría utilizarse en la clínica diaria. [Tura A, 2006; Utzschneider KM, 2009]

Este índice calculado con el Área Bajo la Curva (AUC) de ambos parámetros de la PTOG ampliada, informa sobre la función de la célula  $\beta$  a lo largo de las 2hs, integra las dos fases de secreción de la insulina. El área bajo la curva (AUC), se calcula, con la regla trapezoidal. [Lee YB, 2014; Abdul Ghani MA-Williams, 2006; Matthews JNS, 1990]

#### ◆ Índice Matsuda (ISI)

Estima la sensibilidad a la insulina derivada de la PTOG y predice el desarrollo de la DBT2 en estudios epidemiológicos.

Para su cálculo se utiliza la siguiente formula:

$$ISI = 10000 / (Glucosa_{Basal} \times Insulina_{Basal} \times mGlu \times mIns)^{1/2}$$

Donde mGlu y mIns son el promedio de la PTOG de la glucosa y de la insulina respectivamente. Evidencia la IR periférica y la IR hepática. Se basa en el balance entre la utilización de la glucosa periférica y la glucosa hepática. Correlacionan bien con el Clamp Euglucémico. Es un excelente predictor de DBT2 [Gut M, 2000; Matsuda M, 1999]

## 1.3 - SISTEMA NERVIOSO AUTONOMO (SNA)

### 1.3.1 – Generalidades

Para mantener la homeostasis del organismo, el cerebro utiliza dos vías de comunicación, neural y hormonal. Las hormonas llegan por circulación a los tejidos y actúan en sus receptores específicos. Las neuronas conducen, a través de la red neuronal, el impulso directamente al tejido blanco. El SNA se comunica con los órganos a través de dos ramas antagónicas:

-Sistema nervioso simpático (SNS), predomina en el período activo (lucha, miedo, huida), fundamental en el control circulatorio y metabólico.

-Sistema nervioso parasimpático (SNP), regula el período de inactividad (descanso y digestión)

Una excitación aguda del SNS genera: lipólisis, aumento de ácidos grasos en circulación; gluconeogénesis en el hígado para proveer de glucosa al cerebro; modera la liberación de insulina desde el páncreas, para conservar la glucosa y cambiar el metabolismo muscular hacia la oxidación de ácidos grasos.

Si esta activación se mantiene en el tiempo, desarrolla hipertensión e IR. [Lambert E, 2007, Weyer C, 2000].

Existe una asociación entre la obesidad, la actividad simpática muscular y la insulina en ayunas; influenciada por la etnia, el género y la edad. [Tank J, 2008]. En estudios prospectivos se evidenció que el incremento de la actividad del SNS precede y predice el subsecuente aumento de peso y el desarrollo de la IR. [Masuo K, 2003; Flaa A, 2008; Lambert GW, 2010].

Pacientes con cirugía bariátrica, mostraron una remisión de la DBT2, disminución de peso, aumento de la sensibilidad tisular a la insulina y normalización de los niveles de TG y C-HDL. La respuesta de la HTA no fue clara. [Dixon J, 2008]. El mecanismo de estas observaciones es desconocido, algunos estudios evalúan una alteración de los índices vagales luego de la cirugía [Maser R, 2007], pero aun no hay índices valederos para medir la actividad simpática [Ramchandra R, 2009]. En el estudio CARDIA concluyeron que en adultos jóvenes, seguidos por 15 años, la disfunción autonómica, en combinación con la falta de ejercicio físico, se asociaba a una alteración temprana en el metabolismo de la glucosa, e incrementaba de 3 a 4 veces el riesgo de desarrollar DBT. Hay una compleja asociación entre la insulina, la glucemia y la disfunción del SNA. Posiblemente el ejercicio ayude a captar más glucosa, por el estímulo que representa. [Carnethon MR, 2003]

La hiperactividad simpática, incrementa la noradrenalina liberada en los riñones, desencadenando vasoconstricción muscular y reduciendo la circulación, lo cual disminuiría la posibilidad de la glucosa de llegar al músculo, sería la causa de la IR y la consecuente hiperinsulinemia. [Esler M, 2001]

### **1.3.2 – Regulación Neuroendocrina del Hipotálamo en el SM**

El estilo de vida ha cambiado dramáticamente en los últimos 100 años la vida, y esto se ve reflejado a nivel salud de la población. Los factores ambientales, el estilo de vida, han cambiado abruptamente en los países industrializados, la comida es abundante, se come a distintas hora del día sin respetar los tiempos, se han cambiado las costumbres, socialmente se considera a la cena la comida más importante, a diferencia de épocas anteriores donde la comida principal era el desayuno. Simultáneamente la necesidad de esfuerzo físico se redujo, la actividad física y el descanso no siempre coinciden con los ciclos de luz y oscuridad. [Nicklas TA, 2001; Taheri S, 2004].

Por otro lado se acortó el tiempo de sueño, en estos años ha disminuido en aproximadamente 1,5 hs. [Lund J, 2001] Además se modificaron los patrones de sueño y las horas de exposición a la luz artificial, muy desfasada de la natural, inhibiendo la secreción de melatonina. Los cambios en el ritmo de vida producen alteraciones de los ritmos circadianos, que conducen a manifestaciones del SM. Se ha demostrado que la privación del sueño, y largas exposiciones a la luz artificial en la noche incrementan la adiposidad y predisponen al SM [Froy O, 2007; Laposky AD, 2008]. Estudios epidemiológicos muestran en trabajadores nocturnos, hiperglucemia, disminución de C-HDL e incremento de TG, obesidad abdominal y enfermedad cardiovascular. [Lund J, 2001; Taheri S, 2004]

En la sincronización de los ritmos circadianos interviene el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, que organiza los ritmos metabólicos. Recibe información del medio ambiente a través de los sentidos y del medio interno a través de la medula espinal y del cerebro.

Se postula que la secreción pineal nocturna de melatonina y otros metabolitos mediadores regulan el efecto del ritmo circadiano sobre la activación de los nervios simpáticos y parasimpáticos. [Guilding C, 2007]. Según la hipótesis del "gen ahorrador" la evolución nos preparó para un eficiente estado anabólico inducido por el reloj biológico pero debido al estilo de vida sedentario actual, el cerebro no puede detectar la oscilación entre los estados anabólico y catabólico. [Meier AH, 1996]. La tolerancia a la glucosa varía a lo



largo del día, debido a la disminución de la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos [La Fleur SE, 2001].

El sistema nervioso central, a través del SNA, controla el flujo sanguíneo (shunt arterio-venoso) en las diferentes zonas del organismo, priorizando las de mayor demanda, de acuerdo a la hora del día. [Musch T, 1987; Kreier F, 2002]. Un SNA desequilibrado y arrítmico podría ser la causa principal del SM. [Buijs RM, 2001]

En animales alimentados con una dieta para inducir obesidad, se demostró que el tejido afectado fue el hipotálamo (inflamación). [De Souza C, 2005]. A las ocho semanas de comenzar con la dieta, se detectan los primeros marcadores de inflamación en el hipotálamo, y pérdida de la primera fase de secreción de la insulina. La función de la célula beta es controlada parcialmente por el hipotálamo. [Ahrén B, 2000].

Por otro lado, se demostró que la generación de inflamación, por inyección intraventricular del TNF $\alpha$ , conduce a un aumento exacerbado de la secreción de insulina, y activa la expresión de marcadores de apoptosis en el islote de Langerhans, lo cual se revierte al efectuar la denervación simpática pancreática. [Calegari V, 2011]

### **1.3.3 – Regulación Neuroendocrina Pancreática**

La secreción endocrina y exocrina de la glándula pancreática, en respuesta a la ingesta, es el resultado de la compleja interacción de mediadores neurales y humorales, extra e intra pancreáticos.

El páncreas está innervado por el SNA, a través de fibras aferentes y eferentes, de las vías simpáticas y parasimpáticas. [Niebergall-Roth E, 2001; Owyang C, 2004].

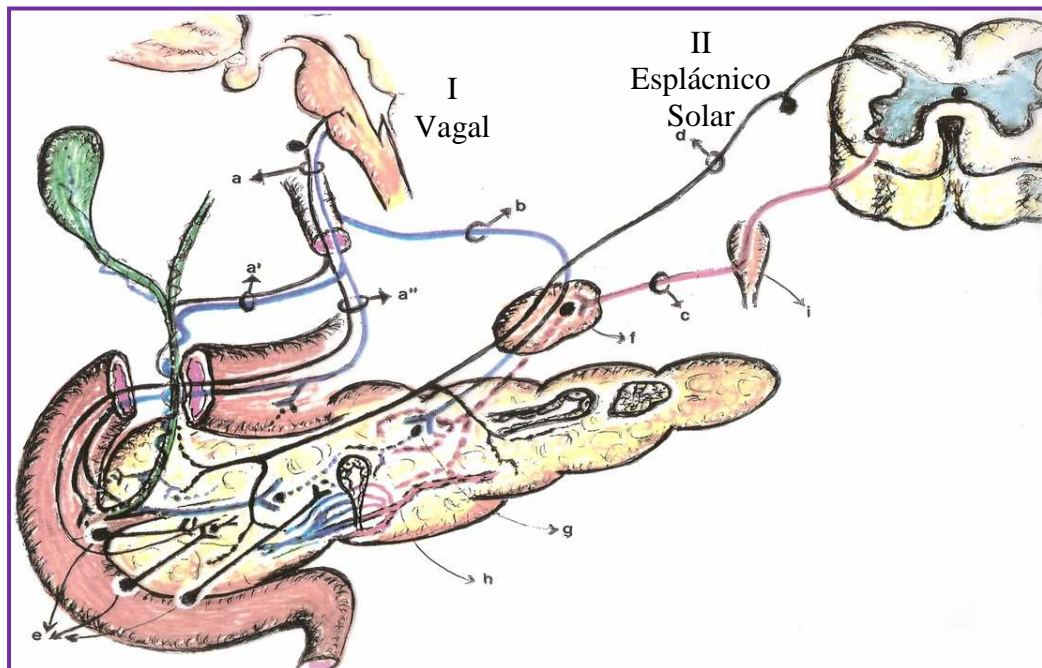
Los ganglios intrapancreáticos, descritos por primera vez por Langerhans en 1869, forman una estructura neural (plexo intrapancreático), en la que interactúan componentes colinérgicos, adrenergicos y peptidérgicos. [Mensah-Brown E, 2000] Constituyen un verdadero “cerebro autónomo periférico”. Integran los distintos impulsos nerviosos (información intrapancreática) de los pancreones y de los islotes de Langerhans. Reciben información extra pancreática a través de los nervios esplácnicos y vagales. La resultante es el llamado tono colinérgico intrapancreático, imprescindible para la acción de las hormonas, tales como la secretina y la CCK. [Singer MV, 2009; Chariot J, 1987]

Las neuronas colinérgicas del ganglio intrapancreático, reciben impulsos cefálicos, desde centros vagales altos (hipotálamo-bulbo, núcleo dorsal del vago y tronco vagal posterior), a través de fibras pre-ganglionares, que liberan acetilcolina.

Las fibras adrenérgicas que rodean al ganglio intrapancreático, liberan catecolaminas modulando la transmisión colinérgica. [Kirchgessner A, 1990; Tiscornia O-Farache S, 1990; De Souza C, 2005].

Tiscornia y col, sostienen que la inervación de la glándula pancreática depende de varios complejos de inervación (FIGURA 2): Vagal (fundamentalmente colinérgico); Esplácnico-Solar o Celíaco (predominantemente simpático); Entero-Pancreático (colinérgico y serotoninérgico); y Sensorial-Aferente, relacionado a la inflamación neurogénica. [Tiscornia OM, 2000; Tiscornia O, 1998; García H, 2002; Niebergall-Roth E, 2001]

La secreción endocrina y exocrina del páncreas está modulada por reflejos duodeno-pancreáticos (RDP) cortos, medianos y largos. Los RDP cortos, conectan las fibras del sistema nervioso entérico del duodeno con el ganglio intrapancreático y/o los pancreones y los islotes. Los RDP medianos, se integran en los ganglios del plexo solar o celíaco y retornan a la glándula pancreática. Los RDP largos, conectan el duodeno con los núcleos hipotalámicos-bulbares. [Tiscornia O-Hamamura S, 1998; Tiscornia O-García H, 2002; Singer MV, 2009]



**FIGURA 2: Complejos Inervatorios Autónomos;** cortesía del Prof Dr Tiscornia

I: Vagal; II: Esplácnico-Solar

*a:* fibra aferente vagal; *b:* rama celíacavagal; *c:* fibra preganglionar simpática; *d:* fibra aferente del simpático; *e:* región peri-vateriana; *f:* ganglio celíaco; *g:* neurona post ganglionar en el ganglio intrapancreático; *h:* shunts arterio-venosos en el árbol vascular intrapancreático; *i:* cadena simpática paravertebral.

Los islotes ricamente inervados, son expuestos a diferentes neurotransmisores liberados por las terminales nerviosas, que actúan como mediadores de la primera fase de secreción de la insulina, en la sincronización de los islotes para funcionar como una unidad, en la secreción pulsátil de la hormona, y en la optimización de la liberación durante el estrés metabólico, la hipoglucemia y la neuroglucopenia. Los nervios autónomos podrían estar implicados en la adaptación de los islotes a la IR con el consecuente desarrollo de intolerancia a la glucosa y la DBT 2. [Ahrén B, 2000] En pruebas realizadas en ratones se observó que la hiperinsulinemia causada por la IR es considerablemente reducida por atropina y por vagotomías. [Edvell A, 1998]

#### **1.3.4 Influencia del SNA en la IR - Hepatic Insulin Sensitizing Substance (HISS).**

Los nervios parasimpáticos hepáticos son reguladores esenciales de la acción normal de la insulina en el metabolismo de la glucosa. [Patarrão RS 2008; Afonso RA 2010] Estudios, realizados por Lutt y col., han demostrado que la regulación de la glucemia post ingesta, es el resultado de la acción directa de la insulina y la acción de una segunda hormona denominada HISS (hepatic insulin sensitizing substance), liberada desde el hígado a circulación. Ambas hormonas actúan en forma sinérgica, estimulan selectivamente al músculo esquelético, corazón y riñones, para que capten la glucosa y la almacenen como glucógeno; no actúa sobre hígado ni sobre tejido adiposo. [Lutt W, 1999; Lutt W, 2004; Wang HH, 2015]

El factor HISS es liberado por el hígado, en respuesta a la insulina postprandial inmediata. Dos señales permisivas son imprescindibles. Una postprandial es transmitida a través de los nervios parasimpáticos hepáticos, actúa a nivel de los receptores muscarínicos activando a la oxido nítrico sintetasa (ONS). La otra es una señal química producida por aumento del glutatión hepático. Deben estar presentes ambas señales; la concentración del factor HISS es máxima a los 90 minutos post ingesta, disminuye con el aumento de las horas de ayuno, siendo nula en el ayuno prolongado (24hs). [Chowdhury KK, 2013; Patarrão RS, 2012]

El bloqueo de la señal parasimpática hepática (denervación quirúrgica, antagonismo con atropina, inhibición de la producción del ONS o ciclooxigenasa hepática, disminución de glutatión hepático), disminuye la respuesta insulínica en aproximadamente el 55%, denominada resistencia a la insulina HISS dependiente (HDIR). [Afonso RA, 2010; Schafer J, 2010]

El mecanismo fisiopatológico que explica la rápida regulación de la glucemia postprandial, es a través de la liberación pulsátil de la insulina, que llega al hígado; activa los nervios parasimpáticos, incrementa el glutatión, regula la liberación pulsátil del HISS; el cual pasa a circulación, y estimula la captación de glucosa, principalmente en músculo esquelético, duplicando el efecto de la insulina.

La ausencia del HISS produce HDIR. En ausencia aguda se observa: hiperglucemia, hiperinsulinemia, hiperlipemia, e incremento de radicales libres. El almacenamiento energético como glucógeno en el músculo es reemplazado por grasa que incrementa la adiposidad. [Afonso RA, 2007; Ming Z, 2009]

En ausencia crónica de HISS, se producen disfunciones metabólicas que conducen al SM, DBT 2 y alteraciones cardiovasculares.

Se observo HDIR en estudios realizados en animales con: dietas altas en sacarosa o grasas; inactividad física; enfermedades hepáticas crónicas, obesos, hipertensos, ancianos, hemorragias agudas, exposición fetal al alcohol. [Chowdhury KK, 2013, Macedo M, 2014]

### **1.3.5 – Demostración de la actividad colinérgica – Colina Acetiltransferasa (ChAT)**

Las fibras colinérgicas del SNP liberan en sus terminales acetilcolina para transmitir su señal. El incremento del neurotransmisor se asocia, a un aumento de la actividad parasimpática. La acetilcolina, es el neurotransmisor específico de la sinapsis post ganglionar.

La enzima Colina Acetiltransferasa (EC 2.3.1.6) cataliza la síntesis de la acetilcolina desde los sustratos: acetil coenzima A (CoA) y colina. [Burt AM 1970] Se sintetiza en el cuerpo de la neurona y luego se transporta a la terminal nerviosa. Su localización a nivel histológico permite evaluar la inervación colinérgica en páncreas e hígado. [Stephen F, 1974; Ceyhan GO, 2009]

La técnica inmunohistoquímica utilizada muestra claramente la localización tisular en páncreas e hígado de la actividad parasimpática.

## **2 - HIPÓTESIS**

El páncreas, glándula endocrina-exocrina, interviene en el proceso digestivo de todos los nutrientes, y regula la homeostasis de la glucosa. Dichas funciones sujetas a una compleja regulación nerviosa y humoral.

El síndrome metabólico, afecta a más del 20% de la población adulta mundial, fue definido según la ATP III por la presencia de al menos tres de cinco factores de riesgo (hipertensión arterial, glucosa en ayunas, triglicéridos, colesterol HDL y circunferencia de cintura), relacionados a la insulino resistencia.

La insulino resistencia, involucra directamente al componente endocrino pancreático y a través de la interacción del eje endocrino-exocrino afecta el componente exocrino de la glándula, en pacientes con síndrome metabólico.

El síndrome metabólico se relaciona a un desbalance del Sistema Nervioso Autónomo, principalmente afectado por factores ambientales y cambios del estilo de vida. Las denervaciones autonómicas, con interrupción del circuito vago-central-esplácnico pueden mejorar la insulino resistencia característica.

La interrupción esplácnica, corta un freno modulador del tono colinérgico hepático. Esta cirugía incrementa y favorece la liberación del Hepatic Insulin Sensitizing Substance (HISS), hormona putativa que tiene un efecto positivo sobre el músculo esquelético, corazón y riñones, aumentando la disponibilidad de glucosa en el tejido.

Esta desconexión neural modula la liberación de la insulina y mejora la respuesta fisiopatológica del páncreas endocrino y exocrino. Puede llegar a ser una herramienta terapéutica útil para el tratamiento de estas patologías en humanos.

### **3 – OBJETIVOS**

Se plantea la evaluación de la función pancreática en el síndrome metabólico (SM) en humanos y en un modelo experimental en rata.

#### **3.1-Objetivos Generales:**

- Determinar en pacientes y en un modelo experimental animal, los parámetros bioquímicos relacionados al SM, a la insulino resistencia y de evaluación pancreática.
- Relacionar las determinaciones bioquímicas efectuadas con la severidad de la respuesta pancreática al SM.
- Aportar conocimientos fisiopatológicos que contribuyan con la clínica, para el manejo terapéutico adecuado.

#### **3.2-Objetivos Específicos:**

##### **1 - En individuos controles y con diagnóstico de síndrome metabólico:**

Se analizó prospectivamente pacientes controles y, con diagnóstico de síndrome metabólico clasificado por los criterios del ATP III, para:

##### **1.1 - Evaluar el síndrome metabólico y el estado del páncreas:**

1.1.1- Obtener de cada paciente las medidas de: circunferencia de cintura, presión arterial.

1.1.2- Determinar los parámetros bioquímicos sericos de:

-perfil lipídico: triglicéridos y colesterol-HDL.

-evaluación global del páncreas: amilasa, lipasa, glucosa e insulina.

1.1.3- Calcular el índice de masa corporal (IMC) a través de la medida del peso y la altura.

##### **1.2- Evaluar la tolerancia a la glucosa, la presencia de insulino resistencia, y la sensibilidad de la célula $\beta$ :**

1.2.1 - Realizar la Prueba de Tolerancia oral a la Glucosa ampliada (PTOG) a cuatro tiempos: basal, 30, 60 y 120 minutos de extracción de sangre post estímulo.

1.2.2 - Determinar en los cuatro tiempos las determinaciones sericas de glucosa e insulina.

1.2.3 - Analizar la forma de la curva de la PTOG para glucosa e insulina.

1.2.4 - Calcular los índices: a) Glucosa/Insulina (Glu/Ins), b) HOMA-IR, c) del Porcentaje de incremento de glucosa (PG%), d) Insulinogénico (IGI) 30 minutos y área bajo la curva, e) Matsuda (ISI)

**1.3** - Estudiar funcionalidad del páncreas exocrino:

1.3.1 - Poner a punto la metodología de la Prueba del Pancreolauryl sérico (PLs)

1.3.2 – Determinar en suero de pacientes controles y con SM, el PLs.

**1.4** - Relacionar los resultados obtenidos de las determinaciones bioquímicas:

1.4.1- entre si.

1.4.2- con la severidad del cuadro clínico.

**2 - En ratas Sprague Dawley sin y con síndrome metabólico (Fructosa):**

**2.1**- Efectuar la denervación simpática (esplancnicectomía).

**2.2** - Generar el SM, con fructosa 10% en el agua de bebida.

**2.3** - Determinar los parámetros bioquímicos sericos de:

2.3.1 - evaluación global del páncreas: amilasa, lipasa, glucosa e insulina.

2.3.2 - del perfil lipídico: triglicéridos y colesterol-HDL.

**2.4** - Evaluar la tolerancia a la glucosa, la presencia de insulino resistencia (IR), y la sensibilidad de la célula  $\beta$ :

2.4.1 - Realizar la Prueba de Tolerancia oral a la Glucosa ampliada (PTOG) a tres tiempos: basal, 30 y 60 minutos de extracción de sangre post estímulo.

2.4.2 - Determinar en cada uno de los tres tiempos las determinaciones sericas de Glu e Ins

2.4.3 - Analizar el área bajo la curva de la PTOG para Glu e Ins

2.4.4 - Calcular los índices: a) Glucosa/Insulina (Glu/Ins), b) HOMA-IR, c) Insulinogénico (IGI) 30 minutos y área bajo la curva, d) Matsuda(ISI)

**2.5** - Estudiar en biopsias de páncreas e hígado

2.5.1- anatomía patológica por hematoxilina-eosina

2.5.2 - inmunohistoquímica, presencia de Colina Acetiltransferasa

**2.6** - Relacionar los resultados obtenidos de las determinaciones realizadas entre si.

## 4 – MATERIALES Y MÉTODOS:

### 4.1 - En individuos controles y con diagnóstico de síndrome metabólico (SM)

#### 4.1.1 – Pacientes

Se incluyeron en este estudio 71 pacientes adultos ambulatorios, admitidos en el Programa de Estudios Pancreáticos del Hospital de Clínicas “José de San Martín” (HCJSM) de la Universidad de Buenos Aires (UBA), durante el período 2007-2012.

Como criterios de exclusión se consideraron a pacientes que presentaran: alcoholismo, diagnóstico de pancreatopatía crónica, de diabetes tipo 1, enfermedad aguda reciente, embarazadas, inmunosuprimidos, transplantados, infección por hepatitis B, C o HIV y enfermedades malignas.

De todos ellos se registró: fecha de nacimiento (edad, años), sexo (masculino/femenino), peso, talla, contorno de cintura, presión arterial y tratamiento farmacológico.

Se agruparon a los pacientes en dos grupos:

◆**SM:** Se analizaron 41 pacientes, con edades comprendidas entre (39-73) años, de ambos sexos, (masculino/femenino; 21/20) con diagnóstico de síndrome metabólico según los criterios actualizados de la ATP-III (National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III) Se consideró SM cuando se cumplieron tres de los siguientes parámetros: (Lorenzo C, 2007].

- Circunferencia de cintura mayor a 88 cm en las mujeres y 102 cm en el hombre
- Triglicéridos, concentración mayor a 150 mg/dl en ambos sexos.
- C-HDLolesterol, menor 50 mg/dl en las mujeres y menor 40 mg/dl en los hombres
- Presión arterial mayor o igual a 130 mmHg la sistólica y/o 85 mmHg la diastólica
- Glucosa en ayunas mayor o igual a 100 mg/dl

◆**Control:** Se estudiaron 30 individuos, con edades comprendidas entre (33-72) años, de ambos sexos, (masculino/femenino; 16/14), clasificados de acuerdo a criterio medico como sanos, que no presentaban: los criterios de SM, obesidad ni sobrepeso, con PTOG por debajo de los valores de corte en los cuatro tiempos



#### **4.1.2 - Medidas antropométricas**

Se realizaron las medidas de: peso, altura, circunferencia de cintura, presión arterial, y cálculo de índice de masa corporal.

La medida del peso en kilogramos (kg), se realizó en una balanza de uso clínico, con sensibilidad de 0-150 kg. Se registró el peso del paciente, en ayunas, con ropa ligera y sin zapatos. El paciente permaneció de pie inmóvil en el centro de la plataforma con el peso del cuerpo distribuido entre ambos pies.

La altura, en metros (m), se midió con un estadímetro de precisión, cinta métrica pegada en la pared con un cursor deslizante, se registró la altura del paciente de pie erguido, los brazos a los costados del cuerpo, con los talones juntos y vista al frente.

Con los datos de peso y altura se calculó el índice de masa corporal (IMC) con la fórmula estándar de peso (kg) dividido por el cuadrado de la estatura (m).

La circunferencia de cintura (CC), se midió de pie colocando la cinta métrica no elástica flexible alrededor del abdomen sin apretar y paralelo con al piso al final de una espiración suave; las determinaciones se realizaron a mitad de la distancia entre el reborde costal inferior y la cresta iliaca.

La medida clínica de la Presión arterial (PA, mmHg) se obtuvo con un esfigmomanómetro de mercurio. Se promediaron dos tomas de PA sistólica y diastólica, tras permanecer el paciente 5 minutos en reposo.

#### **4.1.3 - Muestras**

Se tomaron las muestras de sangre de controles y pacientes, por punción venosa, luego de un período de ayuno de 10 - 12 horas. Para ello se les colocó un catéter corto de teflón, que se mantuvo durante el periodo de tiempo requerido para el estudio. Los pacientes se mantuvieron en reposo, en posición decúbito dorsal.

La sangre se colocó en tubos secos, se dejó reposar, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, y se separó el suero límpido y libre de hemólisis dentro de las dos horas posteriores a la extracción. Se realizaron de inmediato (dentro de las tres horas) las determinaciones bioquímicas de rutina (TG, C-HDL, amilasa total y pancreática, lipasa, glucosa), y se dividió en diferentes alícuotas en tubos de poliestireno, conservándose a -20°C para la determinación de insulina.

Para la Prueba del Pancreolauryl, el suero se conservó en heladera (4-8°C), para su procesamiento al día siguiente.

#### **4.1.4 - Determinaciones bioquímicas**

##### **4.1.4.1: en autoanalizador COBAS 6000-C501-Roche–Germany:**

En el suero de los pacientes se determino: Amilasa total y pancreática (AmiT y AmiP), lipasa (Lip), glucosa (Glu), triglicéridos (TG), colesterol-HDL (C-HDL)

-Por la siguiente metodología se midieron las actividades en UI/L de:

-AmiT: cinético IFCC, con sustrato protegido con etilideno, a 405 nm. [Lorentz K, 1998, Junge W, 2001]

-AmiP: previa inhibición selectiva de la isoenzima salival, mediante dos anticuerpos monoclonales diferentes. Se mide en el sobrenadante por el método empleado para AmiT. [Gerber M, 1987; Tietz N, 1988]

-Lip: cinético colorimétrico con sustrato 1,2-O-dilauril-rac-glicero-3-‘acido glutárico-(6-metilresorufina)-570nm [Neumann U 1987; Leybold A;1986; Tietz N. 1995]

-Por la siguiente metodología se midieron las concentraciones en mg/dl de:

-Glu: enzimático de Glucosa Oxidasa-Peroxidasa, Trinder, a 505nm [Trinder P, 1969]

-TG: enzimático colorimétrico desarrollado, Fossati, a 505nm. [Fossati P, 1982]

-C-HDL: desarrollado por Assman y col. Se mide en el sobrenadante previa precipitación selectiva de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad, por el agregado de ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio.[Assmann G 1983]

Se utilizaron calibradores, estándares, controles comerciales (normales y patológicos), y controles de calidad interno y externo. El control de calidad externo se realizó a través del Programa PEEC, del Laboratorio de Referencia y Estandarización en Bioquímica Clínica, Fundación Bioquímica Clínica, y el del Programa RIQAS para Química Clínica, trazabilidad con el CDC.

#### **4.1.4.2: en autoanalizador ARCHITECT-Abbott-USA:**

La concentración de Insulina (Ins) en microUI/ml fue determinada en suero por CMIA El método CMIA es un inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas, utiliza anticuerpos monoclonales anti insulina humana. [Muniyappa R, 2008]

#### **4.1.4.3: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG) ampliada (Pancreatograma):**

La PTOG se realizó siguiendo los lineamientos establecidos por la Asociación Americana de Diabetes(ADA) y las actualizaciones [ADA1997, 2007, 2010, 2014].

Se tomaron muestras de sangre basal (B) y a tiempos 30, 60 y 120 minutos, posteriores a una sobrecarga de glucosa anhidra de 75gr en 375 ml de agua, acidulada con jugo de limón. En todos los tiempos se determinaron las concentraciones de Glu e Ins.

La ADA de acuerdo a los resultados obtenidos de la PTOG define glucosa normal (en ayunas y a los 120 minutos), dos estados pre-diabéticos y el diagnóstico de DBT 2, como a continuación se detalla: [Grant R, 2015]

- Glucosa normal:  $Glu_B < 110\text{mg/dl}$  y  $Glu_{120} < 140\text{ mg/dl}$
- Glucosa alterada en ayunas:  $110 \leq Glu_B \leq 125\text{ mg/dl}$ .
- Intolerancia o Tolerancia alterada post-sobrecarga de Glu:  $140 \leq Glu_{120} \leq 199\text{mg/dl}$ .
- Diabetes tipo 2:  $Glu_B \geq 126\text{mg/dl}$  y/o  $Glu_{120} \geq 200\text{ mg/dl}$

De acuerdo a la experiencia del grupo y a la bibliografía consultada se evaluó una curva de PTOG de cuatro tiempos. Se suma a los tradicionales basal y 120 minutos, dos puntos intermedios: 30 y 60 minutos. Se considera para nuestra población, dentro de los valores de referencia normal resultados de:  $Glu_{30} \leq 160\text{mg/dl}$  y  $Glu_{60} \leq 160\text{ mg/dl}$  [DiCarlo MB, 2010; Tiscornia OM, 2011; Abdul-Ghani MA, 2008; Kim JY, 2013; Hayashi T, 2013]

#### 4.1.4.4: Índices de resistencia a la Insulina (IR) y función de la célula beta pancreática

##### a) *Índice Glucosa/Insulina(IG/I)*

$$G/I = \text{Glu}_B / \text{Ins}_B \text{ [Bartoli E, 2011]}$$

Se considera presencia de IR cuando es menor a 4,5.

##### b) *Índice del Porcentaje de incremento PG%*

$$\text{PG}\% = (\text{Glu}_{120} - \text{Glu}_B) / \text{Glu}_B \times 100. \text{ [Stumvoll M, 2001; Carnevale Schianca GP, 2010]}$$

Resultados mayores al 20% indican disminución de la sensibilidad de la célula  $\beta$

##### c) *Índice HOMA-IR* (Homeostasis model assessment for insulin resistance index)

Se calculó con la siguiente fórmula matemática:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Glu}_B (\text{mmol/l}) \times \text{Ins}_B (\mu\text{mol/ml}) / 22,5 \text{ [Matthews DR, 1985]}$$

Un resultado mayor a 2,5 evidencia una alteración.

##### d) *Índice Insulinogénico (IGI)*

Se calcularon los IGI 30 minutos ( $\text{IGI}_{30}$ ) y el IGI que utiliza el cálculo del área bajo la curva ( $\text{IGI}_{\text{AUC}}$ ). El área bajo la curva (AUC), se calculó con la regla trapezoidal. [Matthews JNS, 1990]. Considera las determinaciones de Glu e Ins, y se calculan a través de las siguientes fórmulas matemáticas:

$$\text{IGI}_{30} = (\text{Ins}_{30} - \text{Ins}_B) / (\text{Glu}_{30} - \text{Glu}_B) \text{ [Seltzer HS, 1967; Kim YA, 2014].}$$

$$\text{IGI}_{\text{AUC}} = \text{AUC}_{\text{Ins}} / \text{AUC}_{\text{Glu}} \text{ [Tura A, 2006]}$$

##### e) *Índice Matsuda, índice compuesto o ISI*

En el cálculo se considera a la Glu basal ( $\text{Glu}_B$ ), concentración media Glu de la PTOG ( $\text{Glu}_m$ ); Ins basal ( $\text{Ins}_B$ ), y concentración media de Ins de la PTOG ( $\text{Ins}_m$ ):

$$\text{ISI} = 10.000 / (\text{Glu}_B \times \text{Ins}_B \times \text{Glu}_m \times \text{Ins}_m)^{1/2} \text{ [Gut E, 2000; Matsuda M, 1999].}$$

#### **4.1.4.5: Prueba del Pancreolauryl sérico (PLs)**

##### *-Puesta a punto de la metodología:*

Se determinó el factor de conversión de valores de absorbancia de fluoresceína a unidades de concentración/litro de fluido biológico. (mg/L).

Se realizó una curva de calibración con diluciones de una solución madre de fluoresceína di-sódica (Sigma) de 10 mg/l en un pool de sueros (n=40), provenientes del Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. Se calculó, por regresión lineal el factor que permitió la conversión de los valores de absorbancia obtenidos a unidades de concentración/litro de fluido biológico. (mg/L). Se siguieron los lineamientos generales de la bibliografía consultada [Domínguez-Muñoz J, 1998]

##### *-Realización del PLs a los pacientes:*

Se administró, junto con un desayuno rico en grasas, estandarizado en 40 gr. de pan, 20 gr. de manteca y 200 ml de té, 0.5 mmoles de dilaurato de fluoresceína (DLF-éster sintético insoluble en agua) provisto por la Farmacia del Hospital.

De cada paciente se obtuvieron muestras séricas a diferentes tiempos: Basal con un ayuno previo de 10-12 horas y post desayuno a: 60, 120, 150,180, 210 y 240 minutos.

Se trabajo con 500 micro-litros de suero de cada una de las siete muestras, a los que se adicionó 500 micro-litros de KOH etanólico 0,5N. Se incubó por 1 hora a 70 °C. Una vez frío se agregó 1 ml de SO<sub>4</sub>Mg 0,15M, se homogeneizo y centrifugó a 4000 rpm por 10 minutos. En el sobrenadante, se leyó, a 492 nm, en espectrofotómetro UV-1601-Shimadzu, la absorbancia debida a la fluoresceína que se libero en forma proporcional a la acción de las colesterol esterasas pancreáticas. Esta lectura se multiplicó por el factor de conversión obtenido previamente.

Las determinaciones se realizaron por duplicado. Se grafico concentración de fluoresceína liberada en función del tiempo de extracción. El punto máximo de la curva fue considerado el resultado de la prueba, expresado en mg/l de fluoresceína libre. [Domínguez-Muñoz J, 1993].

Los resultados inferiores al valor de corte de 4,5 mg/l, se consideraron patológicos.

## **4.2 - En un modelo experimental animal**

### **4.2.1 – Modelo experimental animal: Ratas**

#### **4.2.1.1 – Experiencia síndrome metabólico (SM).**

Se trabajó con una población de 20 ratas macho endocriadas Sprague Dawley, libre de gérmenes patógenos, con un peso inicial de (100-150) gramos (gr) alimentadas con Purina y agua ad-libitum, bajo condiciones ambientales controladas a temperatura regulada (20-25) °C, con un ciclo luz-oscuridad alternado de 12 horas.

Se dividieron al azar en dos grupos equivalentes de 10 animales cada uno: grupo control (C), grupo síndrome metabólico (SM).

Al grupo C se los siguió alimentando con Purina y agua ad-libitum.

Al grupo SM se les desarrolló SM o IR. Se los alimentó con Purina y se les administró fructosa en el agua de bebida 10% P/V, durante 18-20 semanas.

#### **4.2.1.2 – Experiencia síndrome metabólico – esplancnicectomía (SM-E)**

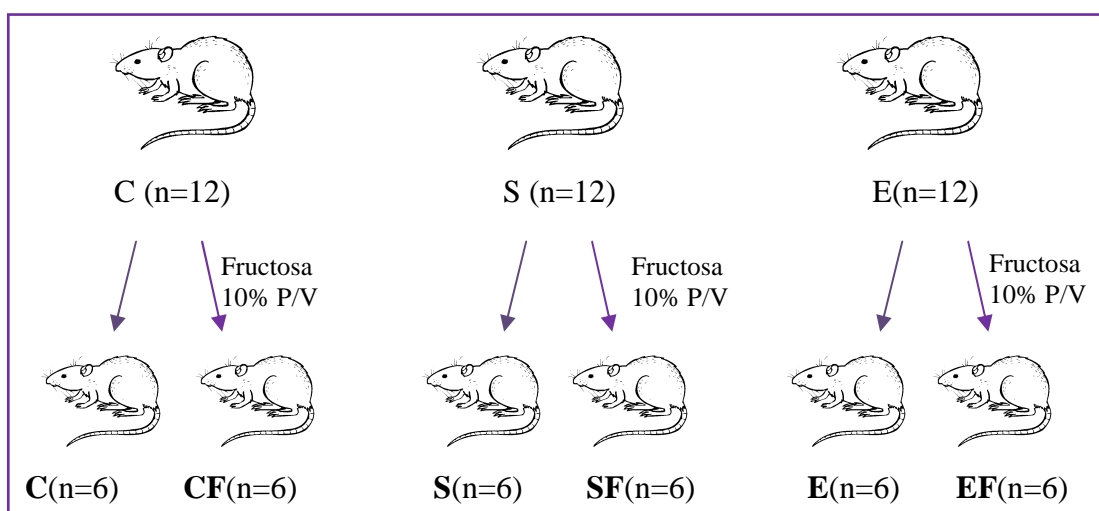
Se trabajó con una población de 36 ratas macho endocriadas Sprague Dawley, libre de gérmenes patógenos, con un peso inicial de (100-150) gramos (gr) alimentadas con Purina y agua ad-libitum, bajo condiciones ambientales controladas a temperatura regulada (20-25) °C, con un ciclo luz-oscuridad alternado de 12 horas.

Se dividieron al azar en tres grupos equivalentes de 12 animales cada uno: grupo control (C), grupo sham (S) y grupo esplancnicectomía (E).

A su vez cada grupo se subdividió en dos subgrupos equivalentes de 6 animales cada uno. Se conformaron seis subgrupos denominados: **C y CF, S y SF, E y EF. (FIGURA 3)**

A los subgrupos **C, S y E** se los siguió alimentando con Purina y agua ad-libitum.

A los otros subgrupos **CF, SF, EF** se les desarrolló SM o IR. Se los alimentó con Purina y se les administró fructosa en el agua de bebida 10% P/V, durante 18-20 semanas.



**FIGURA 3:** esquema de los grupos de animales utilizados en la experiencia SM+E

**C:** control

**CF:** control fructosa, control de SM [Lim JS, 2010; Catena C, 2003; Puyó AM, 2012]

**S:** sham, control de maniobras quirúrgicas. Con ayuno previo de 6 hs, y anestesia ip con Tiopental 5mg/100gr se les realizó una laparotomía mediana (3 cm), se manipularon las vísceras, y desplazaron, simulando la práctica de la esplancnectomía.

**SF:** sham fructosa, de iguales características al subgrupo S, más la generación del SM. La administración de fructosa 10% P/V se inicia una semana post cirugía

**E:** esplancnectomía, con ayuno previo de 6 hs, y anestesia ip con Tiopental 5mg/100gr.

Se les realizó una laparotomía mediana (3 cm). Se procedió al desplazamiento de las asas intestinales para localizar los nervios espláncnicos próximos a la entrada en el plexo solar se efectuó la sección de ambos nervios espláncnicos. De esta manera se interrumpe la inervación autonómica, simpática, dependiente del complejo espláncnico-solar, inhibiendo los arcos reflejos autonómicos del simpático-isquémico. Se procedió luego al cierre de la laparotomía. Se colocó al animal en jaula individual, se le ofreció líquido ad libitum pero no alimentación sólida. [Tiscornia OM, 1998; Tiscornia OM, 2000; García H, 2002]

**EF:** esplancnectomía fructosa, de iguales características que el subgrupo E, más la generación del SM. La administración de fructosa 10% P/V se inicia una semana post cirugía.

#### **4.2.2 - Medidas ponderales del animal**

Al inicio y al final de los tratamientos se registró el peso de cada animal en balanza granataria (Mettler P1210), con una precisión de  $\pm 1$ gr. Se calculo el incremento del peso del animal en forma diaria como: (Peso final – Peso inicial) /número de días de tratamiento.

#### **4.2.3 - Muestras**

##### **-Suero:**

Todos los animales a las 18-20 semanas de comenzado el protocolo y con 5-6 horas de ayuno, bajo anestesia con 5mg Tiopental sódico/100gr peso de animal intraperitoneal se les colocó un catéter en la vena yugular, que permitió extraer sangre, se mantuvo permeable durante toda la experiencia, y se extrajo sangre yugular. [Tiscornia OM, 2002]

La sangre se colocó en tubos secos, se dejó reposar, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, y se separo el suero límpido y libre de hemólisis dentro de las dos horas posteriores a la extracción.

Se realizaron de inmediato (dentro de las tres horas) las determinaciones bioquímicas de rutina (Ami, lipasa, glucosa, TG y C-HDL), y se dividió en diferentes alícuotas en tubos de poliestireno, conservándose a  $-20^{\circ}$  C para la determinación de insulina.

##### **-Material de biopsia:**

Luego de efectuar la PTOG, se procedió a la autopsia del animal y a la extracción del páncreas y del hígado. La glándula pancreática despojada de los tejidos linfático y adiposo y el hígado fueron seccionados en varias partes para la evaluación anatómo-patológica e inmunohistoquímica. Los segmentos fueron conservados en buffer formol 10%, fijados en parafina, luego se realizaron cortes que se montaron en vidrios comunes para posterior tinción con hematoxilina-eosina; y vidrios positivados para la inmunohistoquímica.



#### **4.2.4 - Determinaciones bioquímicas**

En el suero de los animales se determinó:

**4.2.4.1:** Las actividades de Amilasa total (AmiT) y lipasa (Lip); y las concentraciones de glucosa (Glu), triglicéridos (TG) y colesterol-HDL (C-HDL), en autoanalizador COBAS 6000-C501-Roche–Germany, en las mismas condiciones que en el apartado **4.1.4.1**

**4.2.4.2:** La concentración de Insulina (Ins, ng/ml), mediante el método de ELISA (ALPCO® ultrasensitive ELISA-USA). Es un enzimoimmunoensayo en placa, doble sándwich, que utiliza anticuerpos monoclonales anti insulina de rata. Se utilizaron los estándares y los controles comerciales específicos para rata. [Finlay JWA, 2007, D'Angelo G,] Los resultados se expresan en  $\mu\text{UI/ml}$  [Brunton L, 2006; Tran TT, 2003]

#### **4.2.4.3: Prueba de Tolerancia Oral a la Glucosa (PTOG) a tres tiempos:**

Se realizó con una sobrecarga de glucosa. Con el animal anestesiado, se colocó un catéter en la vena yugular, que permitió extraer sangre, se mantuvo permeable durante toda la experiencia. Luego se colocó una sonda desde la boca hasta el estómago del animal, a través de la cual se instiló una solución glucosada, que corresponde a 0,5gr de glucosa/100gr peso de animal.

Se tomaron muestra de sangre venosa yugular a tres tiempos: basal (B) previo a ingreso de la sonda, 30 y 60 minutos de iniciada la instilación.

Se procedió a continuación a la separación del suero, por centrifugado. En todos los tiempos se determinaron las concentraciones de Glu e Ins.

#### **4.2.4.4: Índices de resistencia a la Insulina y función de la célula beta pancreática**

Se calcularon los índices: a) Glucosa/Insulina (G/I), b) HOMA-IR, c) Insulinogénico 30 minutos ( $\text{IGI}_{30}$ ) d) Insulinogénico calculado con el área bajo la curva ( $\text{IGI}_{\text{AUC}}$ ), e) Matsuda (ISI) en las mismas condiciones que en el apartado **4.1.4.4**.

#### **4.2.4.5 - Anatomía patológica**

##### **a) Anatomohistopatología:** [García del Morral,1993]

Mediante tinción con hematoxilina-eosina de las preparaciones microscópicas se procedió a justipreciar las siguientes características (lesiones): inflamación (infiltrado leucocitario), presencia de tejido adiposo, dilatación de vasos con o sin extravasación. Se realizó la observación microscópica panorámica, 100x y 400x .

##### **b) Inmunohistoquímica:**

.En esta técnica se utiliza una enzima como trazadora de marcación. Por ello el lugar de la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima, más una sustancia denominada cromógeno. El producto originado interacciona con el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado.

La técnica peroxidada anti-peroxidasa (PAP): desarrollado por Stenberger y col utiliza como trazador inmunocomplejos formados por la enzima peroxidasa y anticuerpos específicos frente a ella, en lugar de anticuerpos marcados. [Stenberger LA 1970]. La peroxidasa obtenida del rábano picante, se inocula a un animal para obtener los anticuerpos dirigidos hacia ella. De este modo al poner en contacto “in vitro” los anticuerpos con la peroxidasa de forma el complejo PAP. Se utilizan sucesivamente tres anticuerpos diferentes; un anticuerpo primario policlonal de cabra anti-ChAT de rata, un anticuerpo monoclonal secundario, IgG, desarrollado en conejo anti-cabra, que actúa de puente entre el anticuerpo primario y el complejo PAP, aplicado en exceso y el complejo PAP desarrollado en el mismo animal que el primario, que actúa como trazador de la reacción inmune. Luego se revela con peróxido de hidrógeno y diaminobencidina (Fast DAB) Este procedimiento es más eficaz y más sensible que los métodos indirectos. [García del Moral 1993]

Los tejidos parafinados, fijados en los vidrios positivados, fueron desparafinados, hidratados, lavados, y tratados para develar la presencia de la enzima Colina Acetiltransferasa (ChAT) se realizó la técnica inmunohistoquímica de Peroxidasa-Anti Peroxidasa (PAP), proceso desarrollado por Sternberger y cols., que utiliza como trazador inmunocomplejos formados por la enzima peroxidasa y anticuerpos específicos frente a ella, en lugar de anticuerpos marcados.

Para este procedimiento se utilizaron sucesivamente tres reactivos inmunes diferentes:

- 1- Anticuerpo primario, IgG, de cabra anti Colina Acetiltransferasa (Anti-ChAT) (Chemicom AB144P).
- 2- Anticuerpo puente o secundario, anti IgG cabra desarrollado en conejo, (anti-Gt IgG, Chemicom AP106) que unió al anticuerpo primario y al complejo PAP, aplicado en exceso, para que uno de los dos lugares posibles de unión, se asocie al Anti-ChAT y el otro quede libre se fije luego al complejo PAP.
- 3- Complejo PAP, ((Gt PAP, Chemicon PAP 10), desarrollado en cabra, que contiene la enzima que actuará como trazador de la reacción inmune.

Para visualizar los lugares de reacción antígeno-anticuerpo, se revela la peroxidasa con su sustrato, más un cromógeno 3,3'-Diaminobencidina tetrahydrochloride (Sigma Fast DAB with Metal Enhancer Tablet Sets, D0426 5Set) [Sternberger L A, 1970; Anglade P, 1987; Chariot J. 1987]

#### **4.3- Consideraciones bioéticas:**

El estudio fue avalado por el comité de ética del Hospital de Clínicas “José de San Martín”, en el marco del Programa de Estudios Pancreáticos, dirigido por el Dr.O.Tiscornia. Se obtuvo el consentimiento informado de cada sujeto para su participación.

Durante el desarrollo de este protocolo se considerarán los lineamientos generales de la ética de la investigación en concordancia con el documento de la Asociación Médica Mundial (Declaración de Helsinki) Como postula la declaración, se establece el concepto, las características y las condiciones de la investigación médica con cuidado profesional a considerarse en toda investigación realizada en seres humanos: respeto a las personas, a la búsqueda del bien y a la justicia.[Declaración de Helsinki de la AMM,2013]

En cuanto al uso de animales de investigación: Los procedimientos experimentales descriptos en este estudio fueron realizados de acuerdo a las normas establecidas por Guide for care and use of laboratory animals [NHI publicación N° 85-23, revisión 1996]

#### 4.4 - Análisis estadístico:

Se utilizaron métodos de comparación paramétricos (de Student) cuando se cumplió la suposición de normalidad de las variables; y test no paramétricos (de Mann Whitney) cuando las varianzas no fueron homogéneas.

Se realizó el Análisis de la varianza (ANOVA) paramétrico cuando se cumplió la suposición de normalidad de las variables y las varianzas fueron homogéneas. La homogeneidad de varianzas se testeó mediante el test de Levene. Si no se pudo probar la homogeneidad, se efectuó una transformación logarítmica de las variables que homogeneizó las varianzas; no obstante, en el caso en que no se logró, se utilizó el correspondiente test no paramétrico.

Si se rechazó la hipótesis de igualdad entre más de dos medias, se analizó cuáles fueron los pares de medias que resultaron significativamente diferentes, mediante tests *a posteriori*: Student-Newman-Keuls y Test de Tukey o de la Mínima diferencia significativa y en el correspondiente no paramétrico, el de Kruskal-Wallis, o el de Dunn..

Para estudiar la asociación entre variables métricas se calcularon los coeficientes de correlación por rangos de Spearman (correlaciones no paramétricas); y el de Pearson (correlaciones paramétricas), que evalúa el grado de asociación lineal entre las variables. Los valores de p que se informan son las probabilidades de error cometidas al afirmar que el coeficiente de correlación es significativamente diferente de cero.

En todos los casos se consideró significativa una probabilidad menor que el 5%. Los programas estadísticos utilizados fueron: SPSS 17.0 (Chicago, Illinois) y el InfoStat® (v 2013, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## 5 – RESULTADOS

### **5.1- En individuos controles y con diagnostico de síndrome metabólico**

#### **5.1.1. Resultados obtenidos de las mediciones clínicas y bioquímicas realizadas para la evaluación del síndrome metabólico y del estado global del páncreas.**

**5.1.1.a)** Los pacientes con SM en relación a los controles presentaron: **TABLA 1**

-aumento significativo de la edad ( $p=0,02$ ) y el índice de masa corporal ( $p<0,001$ ), y de los parámetros que conforman los criterios ATP-III: la circunferencia de cintura, presión arterial sistólica y diastólica ( $p<0,0001$ ), glucosa y de la concentración de triglicéridos ( $p=0,02119$ ).

-disminución significativa del colesterol HDL ( $p=0,0074$ ).

	<b>Control</b> (n=30)	<b>SM</b> (n=41)	<b>P</b>
<b>Edad (años)</b>	50±13	57±9	0,02
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,2±1,6	29,6±5,5	<0,001
<b>CC (cm)</b>	78,4±9,1	104,2±12,1	< 0.0001
<b>PAS (mmHg)</b>	109±10	131±13	<0,0001
<b>PAD (mmHg)</b>	65±8	78±8	<0,0001
<b>Glu (mg/dl)</b>	84±10	110±11	<0,0001
<b>TG (mg/dl)</b>	98±29	183±31	0,0211
<b>C-HDL (mg/dl)</b>	54±10	47±8	0.0074

**TABLA1: Características clínicas y bioquímicas de los pacientes Controles y con SM.**

*Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard.*

*IMC: índice de masa corporal, CC: circunferencia de cintura, TG: triglicéridos, C-HDL: colesterol HDL, Glu: glucosa, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica*

**5.1.1.b)** En los pacientes con SM diferenciados por el sexo, observamos que las mujeres respecto de los hombres, presentan diferencias estadísticamente significativas en: circunferencia de cintura ( $p=0,0103$ ), triglicéridos ( $p=0,0063$ ), presión arterial sistólica ( $p=0,0434$ ) y la presión arterial diastólica ( $p=0,0399$ ). **TABLA 2**

Sexo	SM (n=41)		P
	Masculino	Femenino	
n	21	20	
Edad (años)	56±11(39-72)	58±7(47-73)	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29,9±6	29,7±6	ns
CC (cm)	109,9±11,5	99,4±12,5	0,0103
PAS (mmHg)	135±11	127±14	0,0434
PAD (mmHg)	81±7	78±8	0,0399
Glu (mg/dl)	109±21	111±21	ns
TG (mg/dl)	164±52	120±44	0,0063
C-HDL (mg/dl)	46±9	47±7	ns

**TABLA 2: Pacientes con SM diferenciados por el sexo**

*Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard.*

*IMC: índice de masa corporal, CC: circunferencia de cintura, TG: triglicéridos, C-HDL: colesterol HDL, Glu: glucosa, PAS: presión arterial sistólica, PAD: presión arterial diastólica.*

**5.1.1.c)** Se detallan los resultados obtenidos de la evaluación global del páncreas:

**c1-** Del estudio del páncreas exocrino a través de: amilasa y lipasa séricas, se observó:

-en ambos grupos las actividades de ambas enzimas se encontraban dentro de los límites de referencia.

-en sujetos con SM respecto de los controles, un aumento significativo ( $p<0,0001$ ) de las actividades de amilasa y su isoenzima pancreática. La lipasa no presentó diferencias significativas entre los grupos. **TABLA 3**

	Control (n=30)	SM (n=41)	P
Ami (UI/L)	73 ± 26	81 ± 36	< 0.0001
Ami-P (UI/L)	26 ± 8	46 ± 18	< 0.0001
Lipasa (UI/L)	67±42	60 ± 35	ns

**TABLA 3: Parámetros de páncreas exocrino en controles y con SM.**

*Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard*

*Ami: amilasa total, Ami-P: amilasa pancreática, Lip: lipasa.*

**c2-** Del estudio del páncreas endocrino se apreció en los pacientes con SM, en relación con los controles un incremento significativo de la concentración de glucosa ( $p < 0.0001$ ) y de la secreción de insulina ( $p = 0.0003$ ). **TABLA 4**

	<b>Control</b> (n=30)	<b>SM</b> (n=41)	<b>P</b>
<b>Glu (mg/dl)</b>	85±10	110±21	< 0.0001
<b>Ins (µUI/ml)</b>	6,6±2,6	14,5±11,2	0.0003

**TABLA 4: Parámetros de páncreas endocrino en controles y con SM.**

*Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard.*

*Glu: glucosa, Ins: insulina*

5.1.2 - Resultados obtenidos de la evaluación de la tolerancia a la glucosa, la presencia de insulino resistencia, y la función de la célulaβ:

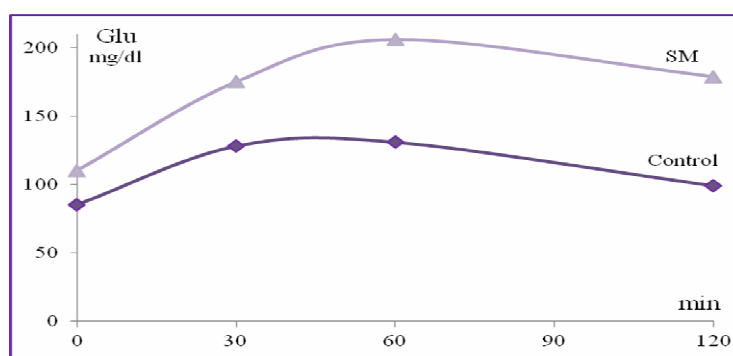
5.1.2.a) De la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) ampliada, a cuatro tiempos con la determinación de las concentraciones de glucosa e insulina en cada punto.

a1-En los pacientes con SM en relación a los controles se observaron aumentos significativos ( $p < 0,0001$ ) de la concentración de la glucosa, en cada uno de los cuatro tiempos. **TABLA 5**

tiempo (minutos)	Control (n=30)	SM (n=41)	P
<b>Glu<sub>Basal</sub></b>	85±10	110±21	<0,0001
<b>Glu<sub>30</sub></b>	124±18	175±29	<0,0001
<b>Glu<sub>60</sub></b>	131±26	206±30	<0,0001
<b>Glu<sub>120</sub></b>	99±15	179±41	<0,0001

**TABLA 5:** Concentración de Glucosa (mg/dl) de PTOG de cuatro tiempos (basal, 30, 60 y 120 minutos) post estímulo de controles y pacientes con diagnóstico de SM. Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard.

La representación de la curva de la PTOG en función tiempo (basal, 30, 60 y 120 minutos) post estímulo, para la determinación de glucosa se observa en **FIGURA 4**



**FIGURA 4:** Representación de la PTOG en cuatro tiempos (basal, 30, 60 y 120 minutos) para la concentración de glucosa de controles y pacientes con SM. Se expresa como media de la concentración de glucosa en función del tiempo.

Observamos que la concentración de glucosa:

- ◆ Máxima se obtuvo tanto en los controles como en los pacientes con SM a los 60 minutos; superando en los pacientes con SM los 200mg/dl
- ◆ A los 120 minutos, en los controles desciende a un valor similar al basal, mientras que en los pacientes con SM, desciende a un valor similar al de los 30 minutos (menor descenso).

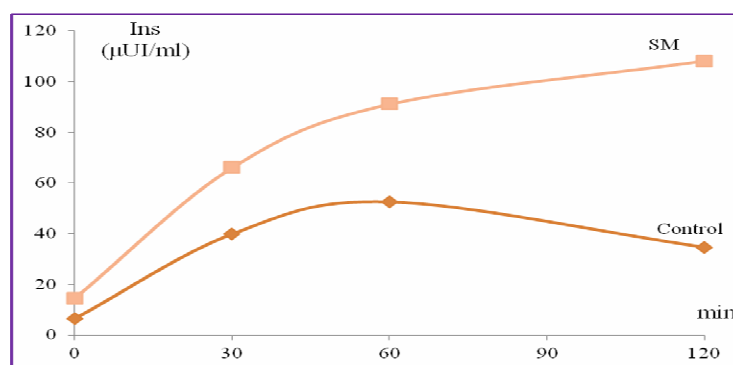


a2-En los pacientes con SM en relación a los controles se observaron aumentos significativos de la concentración de insulina en cada uno de los cuatro tiempos. **TABLA 6**

tiempo (minutos)	Control (n=30)	SM (n=41)	P
<b>Ins<sub>Basal</sub></b>	6,6±2,6	14,5±11,2	0,0003
<b>Ins<sub>30</sub></b>	39,9±17,1	66,1±62,7	0,0292
<b>Ins<sub>60</sub></b>	52,6 ±25,3	91,2±63,0	0,0023
<b>Ins<sub>120</sub></b>	34,7±20,9	108,3±70,3	<0,0001

**TABLA 6:** Concentración de Insulina ( $\mu\text{UI/ml}$ ) de PTOG de cuatro tiempos, (basal, 30, 60 y 120 minutos) post estímulo de controles y pacientes con diagnóstico de SM. Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard

La representación de la curva de la PTOG en función tiempo (basal, 30, 60 y 120 minutos) post estímulo, para la determinación de Insulina se observa en **FIGURA 5**



**FIGURA 5:** PTOG en cuatro tiempos para la media de la concentración de insulina de controles y pacientes con SM.

*Se expresa como media de la concentración de insulina en función del tiempo*

Observamos también que la concentración de insulina:

- ◆ en los controles es máxima a los 60 minutos y luego desciende;
- ◆ en los pacientes con SM es máxima a los 120 minutos observándose valores que triplican a los valores de los controles ( $p < 0,0001$ ).

**a3** - Del análisis de la forma de la curva PTOG en su clasificación en monofásica y monótona, para la curva de glucosa y para la curva de insulina, se observó:

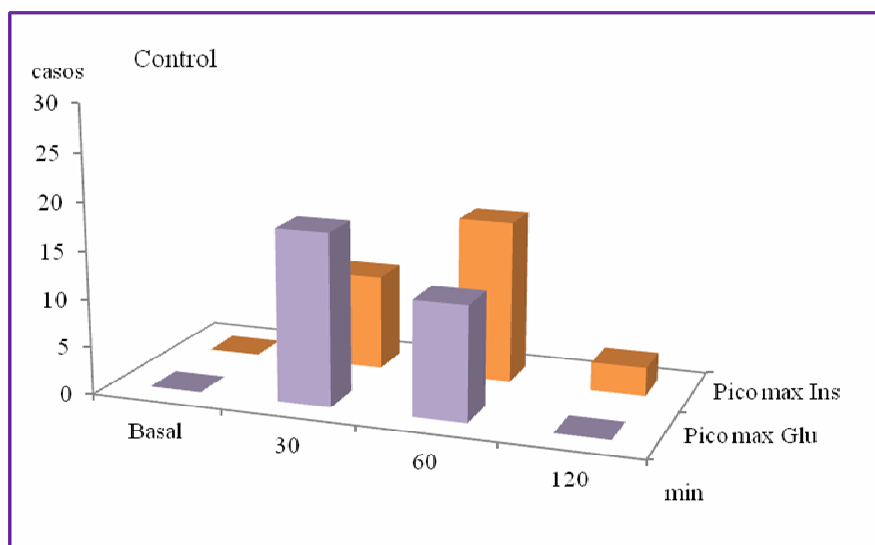
◆Controles:

- curva de glucosa: forma monofásica 100%
- curva de insulina: forma monofásica 90 % y forma monótona 10%.
- sincronía entre la curva de glucosa y la curva de insulina: el 65%.

◆Pacientes con SM:

- curva de glucosa: forma monofásica 73% y forma monótona el 27%;
- curva de insulina: forma monofásica 32% y forma monótona 68%
- sincronía entre la curva de glucosa y la curva de insulina: el 34%

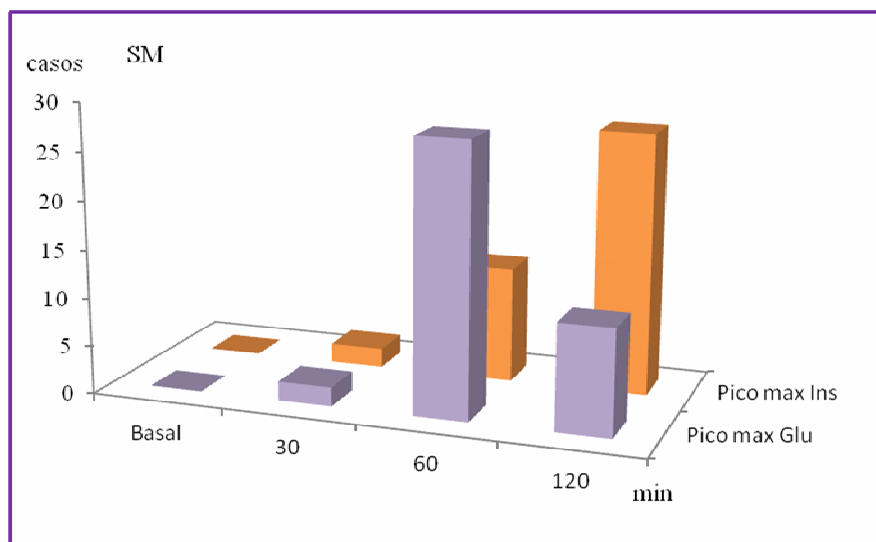
**a4** – Análisis comparativo de los tiempos de aparición del pico máximo de concentración de glucosa y de insulina en la PTOG, (**FIGURAS 6 y 7**).



**FIGURA 6: Representación del máximo de la concentración de glucosa e insulina en la PTOG en controles.** Se expresa como el número de pacientes que tuvieron el máximo de concentración en función del tiempo

◆Controles:

- máximo de glucosa: a los 30 minutos 60% y a los 60 minutos 40%.
- máximo de insulina: a los 30 minutos 33,3%, a los 60 minutos 56,7% y a los 120 minutos 10%.



**FIGURA 7: Representación del máximo de la concentración de glucosa e insulina en la PTOG en pacientes con SM. Se expresa como el número de pacientes que tuvieron el máximo de concentración en función del tiempo.**

◆ Pacientes con SM:

-máximo de glucosa a los 30 minutos 5%, a los 60 minutos 68% y a los 120 minutos 27%.

-máximo de insulina: a los 30 minutos 5%, a los 60 minutos 29% y a los 120 minutos 66%.

**5.1.2.b) Análisis de los índices de insulino-resistencia (IR) y de evaluación de la función de la célula  $\beta$  pancreática:**

En los pacientes con SM en relación a los controles se observaron (**TABLA 7**):

- aumentos significativos del índice HOMA-IR, del porcentaje de incremento de glucosa (PG%), del área bajo la curva para glucosa y para insulina ( $p < 0,0001$ )
- disminución significativa de la relación Glucosa/Insulina ( $p = 0,0044$ ), del índice Matsuda (ISI) ( $p < 0,0001$ ) y del el índice insulinogénico  $IGI_{30}$
- sin diferencias significativas para el índice insulinogénico ( $IGI_{AUC}$ ).

	<b>Control</b> (n=30)	<b>SM</b> (n=41)	<b>P</b>
<b>Glu/Ins</b>	15 $\pm$ 7	10 $\pm$ 6	0,0044
<b>HOMA-IR</b>	1,41 $\pm$ 0,61	4,01 $\pm$ 2,97	< 0,0001
<b>PG%</b>	18 $\pm$ 19	66 $\pm$ 43	< 0,0001
<b>IGI<sub>30</sub></b>	17 $\pm$ 13	12 $\pm$ 9	0,0275
<b>IGI<sub>AUC</sub></b>	6,0 $\pm$ 2,0	7,4 $\pm$ 4,3	ns
<b>ISI</b>	146 $\pm$ 58,2	59,9 $\pm$ 39,5	< 0,0001
<b>AUC<sub>glucosa</sub></b>	233 $\pm$ 29	359 $\pm$ 49	< 0,0001
<b>AUC<sub>insulina</sub></b>	78 $\pm$ 29	159 $\pm$ 105	< 0,0001

**TABLA 7: Índices de IR y función de la célula  $\beta$  en controles y con SM.**

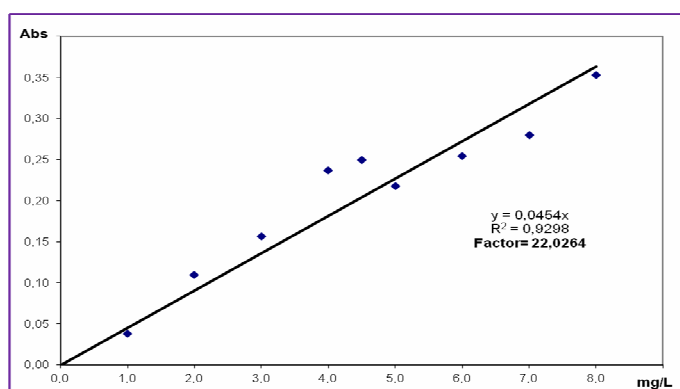
*Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard*

*Glu/Ins: cociente glucosa-insulina, HOMA-IR, homeostasis de insulino-resistencia, PG%: porcentaje de incremento de glucosa a los 120 minutos,  $IGI_{30}$ : índice insulinogénico calculado a los 30 minutos,  $IGI_{AUC}$ : índice insulinogénico calculado con las áreas bajo la curva. ID: Disposition Index, ISI (insulin sensitivity index)Matsuda.. AUC: área bajo la curva*

5.1.3 - Estudio de la funcionalidad del páncreas exocrino, a través de la Prueba del Pancreolauryl sérico (PLs).

**5.1.3.a)** Puesta a punto de la metodología de la PLs:

**a1-** De la curva de calibración efectuada, se obtuvo el factor de conversión de absorbancia a concentración de fluoresceína. El valor obtenido fue = 22. **FIGURA 8**



**FIGURA 8:** Curva de Calibración Prueba del Pancreolauryl sérico

**a2-** Para indicar la presencia de pancreatitis crónica severa o moderada, se utilizó el valor de corte obtenido de  $\leq 4,5\text{mg/l}$ .

Se ha obtenido un segundo valor de corte que nos permitió identificar a las pancreatitis crónicas severas, cuando el resultado del PLs fue  $\leq 2,5\text{mg/l}$ .

**5.1.3.b)** De los resultados obtenidos de la realización del PLs se observa que

**b1-** Los pacientes con SM en relación a los controles presentan una disminución significativa ( $p=0,0066$ ) de la concentración de fluoresceína.

Se observó de manera significativa ( $p<0,01$ ) que 19 pacientes con SM presentaron  $\text{PLs} \leq 4,5\text{mg/l}$ . Dentro de ellos encontramos 4 pacientes con  $\text{PLs} \leq 2,5\text{mg/l}$ . **TABLA 8**

	<b>Control</b> (n=30)	<b>SM</b> (n=41)	<b>P</b>
<b>PLs (mg/l)</b>	$7,2 \pm 1,8$	$5,5 \pm 2,4$	$p=0,0066$
<b>PLs &lt; 4,5 mg/l</b>	0	19	

**TABLA 8:** Pls en controles y pacientes con SM.

Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard-  
PLs: Prueba del Pancreolauryl sérico

**b2-** En la diferenciación por sexo de los pacientes con SM, observamos que: **TABLA 9**

◆ los hombres en relación a las mujeres presentaron una disminución significativa de PLs ( $p= 0.0452$ ).

◆ de los 19 pacientes con  $PLs \leq 4,5 \text{mg/l}$ , 12 (63%) fueron hombres.

◆ el número de pacientes con  $PLs \leq 2,5 \text{mg/l}$  fue igual en ambos sexos.

Sexo	SM (n=41)		P
	Masculino	Femenino	
n	21	20	
PLs (mg/l)	4,7±1,9	6,2±2,7	0,0452
PLs < 4,5mg/l	12	7	

**TABLA 9: PLs en los pacientes con SM.**

*Los resultados de PLs se expresan como Media ± Desvío Standard*

**5.1.4 - Del análisis de los resultados obtenidos en 5.1.1, 5.1.2 y 5.1.3, de los pacientes con diagnóstico de SM que presentaron  $PLs \leq 4,5 \text{ mg/l}$  ( $n=19$ ) y  $PLs > 4,5 \text{ mg/l}$  ( $n=22$ )**

**5.1.4.a) - En los pacientes con  $PLs \leq 4,5 \text{ mg/l}$  en relación a los  $PLs > 4,5 \text{ mg/l}$ , se observó:**

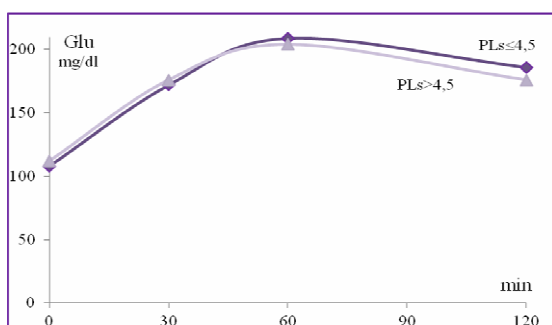
**a1-**de la evaluación global del páncreas una disminución no significativa de la actividad de amilasa, amilasa pancreática y lipasa, y de las concentraciones de glucosa e insulina basales. ( $p > 0,05$ )

**a2-**de la evaluación de la tolerancia a la glucosa, la presencia de insulino resistencia y la funcionalidad de la célula  $\beta$ :

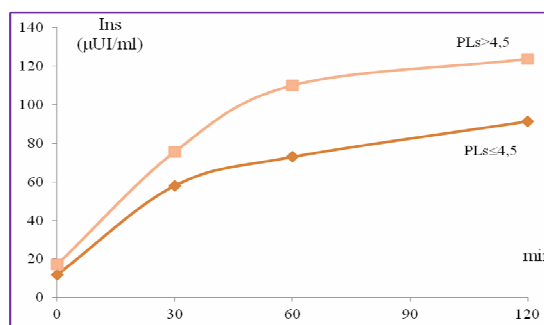
-De la evaluación de la tolerancia a la glucosa (PTOG), se observó un aumento no significativo ( $p > 0,05$ ) de las concentraciones de glucosa a los 120 minutos y una disminución no significativa ( $p > 0,05$ ) de las de insulina en todos los tiempos.

**FIGURA 9(AyB)**

**(A)**



**(B)**



**FIGURA 9: PTOG en cuatro tiempos para las concentraciones de glucosa (A) e insulina (B) de pacientes con SM,  $PLs \leq 4,5 \text{ mg/l}$  y  $PLs > 4,5 \text{ mg/l}$**

*Se expresa como media de la concentración en función del tiempo*

-De la evaluación de la IR, y la función de la célula  $\beta$ , se observó una disminución significativa de los índices: HOMA-IR ( $p=0,0425$ ),  $IGI_{30}$  ( $p=0,0342$ ),  $IGI_{AUC}$  ( $p=0,0179$ ) y del  $AUC_{insulina}$  ( $p=0,0233$ ), y un aumento no significativo de los índices Glu/Ins, PG%, ISI y del  $AUC_{glucosa}$  ( $p > 0,05$ ). **TABLA 10**

PLs vs	SM con PLs>4,5 n=22	SM con PLs ≤4,5 n=19	P
<b>Glu/Ins</b>	9,8±5,4	11,5±7,3	0,2135
<b>HOMA-IR</b>	5,2±3,9	3,2±1,6	<b>0,0425</b>
<b>PG%</b>	62,3±35,7	86,7±42,1	0,0654
<b>IGI<sub>30</sub></b>	14,9±10,0	9,0±5,0	<b>0,0342</b>
<b>IGI<sub>AUC</sub></b>	9,1±4,9	5,7±3,2	<b>0,0179</b>
<b>ISI</b>	51,5±33,0	69,0±44,7	0,1616
<b>AUC<sub>glucosa</sub></b>	357±54	363±45	0,6907
<b>AUC<sub>insulina</sub></b>	193,8±116,8	119,8±66,1	<b>0,0233</b>

**TABLA 10: Índices de RI y función de célula β de pacientes con SM, PLs≤4,5 mg/l. y PLS>4,5mg/l.** Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard  
*Glu/Ins: cociente glucosa-insulina, HOMA-IR, homeostasis de insulino-resistencia, PG%: porcentaje de incremento de glucosa a los 120 minutos, IGI<sub>30</sub>: índice insulinogénico calculado a los 30 minutos, IGI<sub>AUC</sub>: índice insulinogénico calculado con las áreas bajo la curva. ISI (insulin sensitivity index) Matsuda, AUC: área bajo la curva*

**a3-** de los estudios de la asociación de los resultados obtenidos de la PLs con los resultados obtenidos de los otros parámetros bioquímicos se observó:

-correlación positiva con:

- insulina 120 minutos (r=0.3328, IC: 0.01419-0.5901, p=0.0359).
- índice IGI<sub>AUC</sub> (r= 0.3574, IC: 0.04206-0.6080, p=0.0236).
- AUC<sub>insulina</sub> (r=0.3380, IC: 0.01998-0.5939, p=0.0329).



**5.1.4.b)** Del análisis de pacientes con  $PLs \leq 4,5 \text{mg/l}$  se observó:

**b1-** en relación a la forma de la curva de la PTOG, en su clasificación en monofásica y monótona para la curva de glucosa y para la curva de insulina:

-curva de Glucosa: forma monofásica 68% y forma monótona 32%.

-curva de insulina: forma monofásica 32% y forma monótona 68%.

-sincronía entre la curva de glucosa y la curva de insulina: 37%

**b2-** en relación al análisis comparativo de los tiempos de aparición del pico máximo de concentración de glucosa y de insulina en la PTOG

-máximo de glucosa: a los 30 minutos 10%, a los 60 minutos 63% y a los 120 minutos 27%.

-máximo de insulina: a los 30 minutos 5%, a los 60 minutos 26% y a los 120 minutos 69%

**b3)** de los estudios de asociación del PLs con los otros parámetros bioquímicos obtenidos, se observó:

-correlación positiva con:

-insulina 60minutos de PTOG ( $r=0.482$ , IC: 0.0209-0.7740,  $p=0.0367$ ).

-insulina 120minutos de PTOG, ( $r=0.578$  IC: 0.168-0.8176,  $p=0.0095$ ).

-índice  $IGI_{30}$ , ( $r=0.4652$ , IC: 0.014-0.759,  $p=0.0448$ ).

-índice  $IGI_{AUC}$ , ( $r=0.571$ , IC: 0.144-0.812,  $p=0.0105$ ).

- $AUC_{insulina}$ , ( $r=0.580$ , IC: 0.156-0.823,  $p=0.0093$ ).

-correlación negativa con:

-índice ISI,  $r=-0,488$ , IC: -0,777 - (-0,029),  $p=0,034$ ).

## 5.2- De la experiencia en modelo animal

### A. En animales controles (C) y con síndrome metabólico (SM), generado por fructosa 10% P/V en el agua de bebida

A-5.2.1. Se detallan los resultados obtenidos de las mediciones antropométricas y bioquímicas realizadas para la evaluación del síndrome metabólico y del estado global del páncreas.

**A-5.2.1.a)** Los animales con SM en relación a los controles presentaron:

- incremento significativo del peso ganado en el período transcurrido, expresado como: Índice de aumento de peso diario ( $p=0,0013$ )
- cambios significativos de los parámetros de SM: aumento de los triglicéridos ( $p=0,0489$ ), y disminución del colesterol HDL ( $p=0,0074$ ), **TABLA 11**

	<b>C</b> (n=10)	<b>SM</b> (n=10)	<b>P</b>
<b>Índice de peso</b> (gr/día)	1,8± 0,2	2,2±0,2	0,0013
<b>TG</b> (mg/dl)	52±17	69±18	0,0489
<b>C-HDL</b> (mg/dl)	57±12	43±13	0,0224

**TABLA 11: Características antropométricas y bioquímicas de animales controles y con SM.** Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard. Índice de peso: incremento de peso diario TG: triglicéridos, C-HDL: colesterol HDL

**A-5.2.1. b)** Se detallan los resultados obtenidos de la evaluación global del páncreas:

**b1-** Del estudio del páncreas exocrino a través de la amilasa y lipasa sérica, se observó en los animales con SM respecto de los controles: un aumento significativo de la actividad de amilasa ( $p=0,0356$ ); y que la lipasa no presentó diferencias significativas entre los grupos.

	<b>C</b> (n=10)	<b>SM</b> (n=10)	<b>P</b>
<b>Ami</b> (UI/L)	1377±254	1618±248	0,0356
<b>Lip</b> (UI/L)	5,8±1,3	5,1±0,6	0,1303

**TABLA 12: Parámetros de páncreas exocrino en animales controles y con SM.** Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard. Ami; amilasa; Lip: lipasa

**b2-** Del estudio del páncreas endocrino se apreció en los animales con SM, en relación con los controles un incremento significativo de la concentración de glucosa ( $p=0,0276$ ) y de la concentración de insulina ( $p<0,0001$ ). **TABLA 13**

	<b>C</b> (n=10)	<b>SM</b> (n=10)	<b>P</b>
<b>Glu</b> (mg/dl)	109±8	119±11	0,0276
<b>Ins</b> (μUI/ml)	8,3±0,5	13,2±1,4	<0,0001

**TABLA 13: Parámetros de páncreas endocrino en animales controles y con SM.** Los resultados se expresan como *Media ± Desvío Standard*. Glu: glucosa, Ins: insulina

A-5.2.2. Resultados obtenidos de la evaluación de la tolerancia a la glucosa, la presencia de insulino-resistencia, y función de la célula  $\beta$ :

A-5.2.2.a) De la prueba de tolerancia oral a la Glucosa ampliada (PTOG) a tres tiempos en animales con la determinación de glucosa e insulina en cada tiempo.

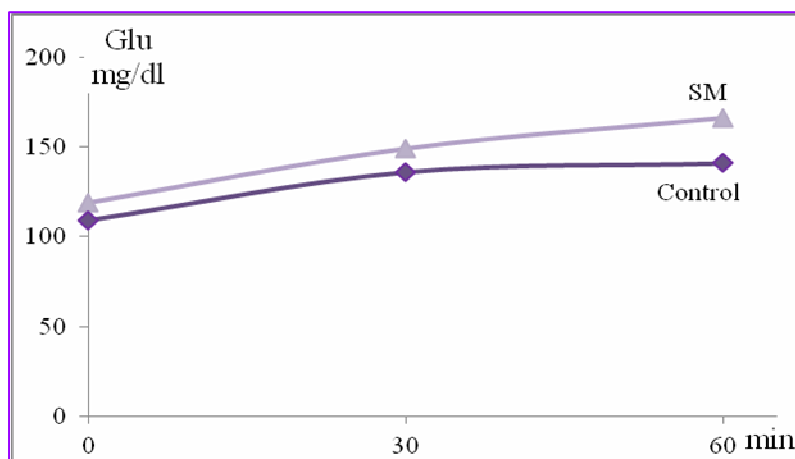
a1-En los animales con SM en relación a los controles se observaron aumentos significativos de la concentración de glucosa en los tres puntos. Debemos destacar que al aumentar tiempo post estímulo la diferencia entre los grupos se incrementa. **TABLA 14**

tiempo (minutos)	C (n=10)	SM (n=10)	P
<b>Glu<sub>Basal</sub></b> (mg/dl)	109±8	119±11	0,0276
<b>Glu<sub>30</sub></b> (mg/dl)	136±8	149±10	0,036
<b>Glu<sub>60</sub></b> (mg/dl)	141±8	166±14	<0,0001

**TABLA 14:** Concentración de Glucosa (mg/dl) de PTOG de tres tiempos (basal, 30 y 60 minutos) post estímulo de controles y animales con SM.

*Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard.*

La representación de la curva de la PTOG en función tiempo (basal, 30 y 60 minutos), para la determinación de concentración de Glucosa, se observa en **FIGURA 10**



**FIGURA 10:** Representación de la PTOG a tres tiempos (basal, 30 y 60 minutos) para la concentración de glucosa (mg/dl) de animales controles y con SM.

Se expresa como media de la concentración de glucosa en función del tiempo.

Observamos que la concentración máxima de glucosa se obtuvo tanto en los controles como en los animales con SM a los 60 minutos. En este tiempo aumenta la diferencia entre los dos grupos ( $p < 0,0001$ ).

a2-En los animales con SM en relación a los controles se observaron aumentos significativos ( $p < 0,0001$ ) de la concentración de insulina en cada uno de los tres tiempos.

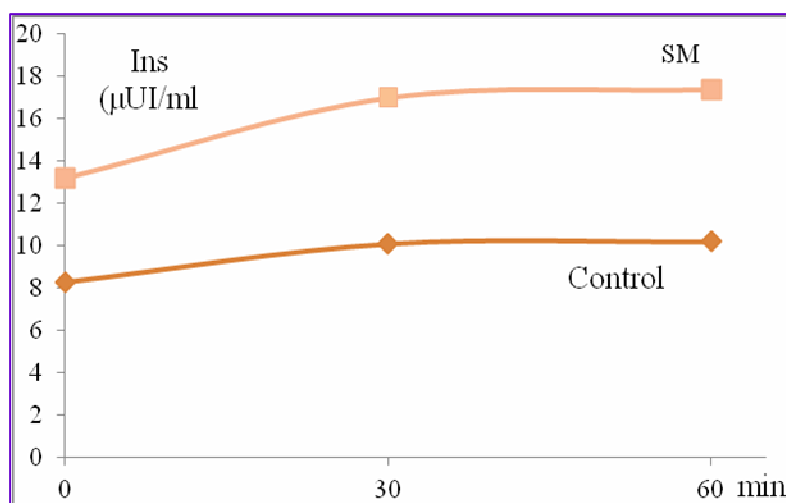
**TABLA 15**

<b>tiempo</b> (minutos)	<b>C</b> (n=10)	<b>SM</b> (n=10)	<b>P</b>
<b>Ins<sub>Basal</sub></b> ( $\mu\text{UI/ml}$ )	8,3 $\pm$ 0,5	13,2 $\pm$ 1,4	<0,0001
<b>Ins<sub>30</sub></b> ( $\mu\text{UI/ml}$ )	10,1 $\pm$ 0,8	17,0 $\pm$ 2,4	<0,0001
<b>Ins<sub>60</sub></b> ( $\mu\text{UI/ml}$ )	10,2 $\pm$ 0,7	17,4 $\pm$ 3,4	<0,0001

**TABLA 15:** Concentración de Insulina ( $\mu\text{UI/ml}$ ) de PTOG de tres tiempos, (basal, 30 y 60 minutos) post estímulo de controles y animales con SM.

*Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard*

La representación de la curva de la PTOG en función tiempo (basal, 30 y 60 minutos) post estímulo, para la determinación de Insulina, se observa en **FIGURA 11**.



**FIGURA 11:** Representación de la PTOG en tres tiempos para la concentración de insulina ( $\mu\text{UI/ml}$ ) de animales controles y con SM.

*Se expresa como media de la concentración de insulina en función del tiempo*

Observamos que la curva que representa la concentración de insulina de los animales con SM se encuentra desplazada hacia valores superiores a los mostrados por los controles.

**a3** - Del análisis de la forma de la curva PTOG en su clasificación en monofásica y monótona, para la glucosa (curva de glucosa) FIGURA 10 y para la insulina (curva de insulina), FIGURA 11 se observo:

◆ Controles:

-curva de glucosa: forma monofásica 30%, y forma monótona 70 %

-curva de insulina: forma monofásica 60 % y forma monótona40%.

-sincronía entre la curva de glucosa y la curva de insulina: el 50%.

◆ Animales con SM:

-curva de glucosa: forma monótona 100%

-curva de insulina: forma monofásica 40% y forma monótona 60%

-sincronía entre la curva de glucosa y la curva de insulina: el 60%

**a4** - Análisis comparativo de los tiempos de aparición del pico máximo de concentración de glucosa y de insulina en la PTOG

◆ Controles :

-máximo de glucosa: a los 30 minutos 40%, y a los 60 minutos 60%.

-máximo de insulina: a los 30 minutos 60% y a los 60 minutos 40%.

◆ Animales con SM:

-máximo de glucosa: a los 60 minutos 100%.

-máximo de insulina: a los 30 minutos 40%, a los 60 minutos 60%.

**A.5.2.2. b)** Análisis de los índices de insulino-resistencia (IR) y de evaluación de la función de la célula  $\beta$  pancreática:

En los animales con SM en relación a los controles se observaron (**TABLA 16**):

-aumentos significativos de los índices HOMA-IR, IGI<sub>AUC</sub>, del AUC<sub>glucosa</sub> y del AUC<sub>insulina</sub> (p<0,0001). Observándose valores que duplican el AUC<sub>insulina</sub> de los controles.

-disminución significativa de los índices IGI<sub>30</sub>, ISI y del la relación Glu/Ins.

	<b>C</b> (n=10)	<b>SM</b> (n=10)	<b>P</b>
<b>Glu/Ins</b>	11,6±1,3	9,2±1,3	0,0005
<b>HOMA-IR</b>	2,25±0,77	3,87±0,57	< 0,0001
<b>IGI<sub>30</sub></b>	2,75±1,99	0,49±0,52	0,004
<b>IGI<sub>AUC</sub></b>	1,37±0,11	1,99±0,17	< 0,0001
<b>ISI</b>	161±10	96±11	< 0,0001
<b>AUC<sub>glucosa</sub></b>	130±5	146±8	< 0,0001
<b>AUC<sub>insulina</sub></b>	9,9±0,6	16,1±1,3	< 0,0001

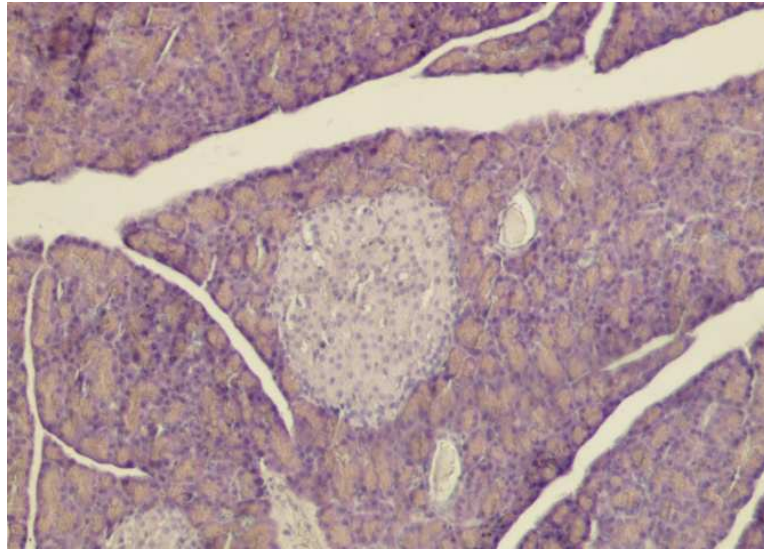
**TABLA 16: Índices de IR y función de la célula  $\beta$  en controles y con SM.**

*Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard*

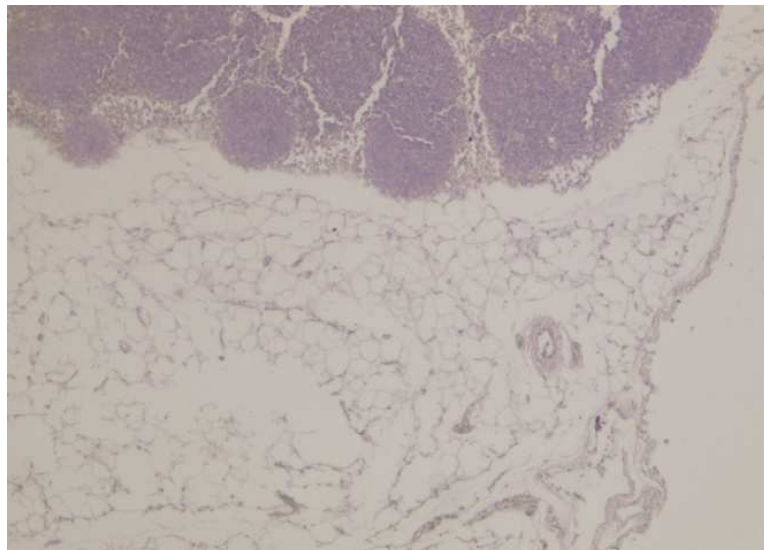
*Glu/Ins: cociente glucosa-insulina, HOMA-IR, homeostasis de insulino-resistencia, IGI<sub>30</sub>: índice insulinogénico calculado a los 30 minutos, IGI<sub>AUC</sub>: índice insulinogénico calculado con las áreas bajo la curva. ISI (insulin sensitivity index) Matsuda. AUC: área bajo la curva*

### A-5.2.3. Resultados obtenidos del Análisis histológico de tejido pancreático

Del análisis microscópico efectuado en los cortes del páncreas de las ratas controles y a la que se les indujo el SM, se obtuvieron las siguientes fotos donde se enumeran las diferencia entre los grupos.



**FIGURA 12 Histología del parénquima pancreático (400x) H&E, A= control.**  
En el grupo control se apreció ausencia de lesiones epiteliales en el conducto bilio-pancreático, vasos sanguíneos de aspecto normal, sin infiltración leucocitaria



**FIGURA 13 Histología del parénquima pancreático (100x) H&E, B= SM,**  
En el grupo alimentado con fructosa, apreció extensa infiltración leucocitaria entre los acinos pancreáticos y abundante tejido adiposo peripaneático, con pequeñas zonas que evidencian fibrosis. En algunas zonas se observaron vasos dilatados



**B-En animales con y sin cirugía clasificados en:**

**control(C), control+fructosa(CF), sham(S), sham+fructosa(SF), esplacnicetomizados (E), y esplacnicetomizados+fructosa(EF).**

**B-5.2.1. Resultados obtenidos de la comparación entre los grupos: C, CF, S, SF, E y EF:**

**B-5.2.1.a)** De las mediciones antropométricas y bioquímicas relacionadas al SM, se observó en relación a: **(TABLA 17)**

- el Índice de peso diario, un aumento significativo en los pares:

CF vs C, SF vs C, SF vs E y SF vs S ( $p < 0,001$ ),

CF vs S, CF vs E, CF vs EF y SF vs EF ( $p < 0,01$ );

no se observaron diferencias entre:

S vs C, C vs E, C vs EF, S vs E, S vs EF, CF vs SF y E vs EF ( $p > 0,05$ )

- la concentración de triglicéridos, un aumento significativo en:

SF vs E ( $p < 0,05$ ) y SF vs C ( $p < 0,01$ ).

no se observaron diferencias entre:

CF vs C, SF vs S, S vs C, CF vs S, CF vs E, CF vs EF y SF vs EF, C vs E, C vs EF, S vs E, S vs EF, CF vs SF y E vs EF ( $p > 0,05$ )

- no hubo diferencias significativas en la concentración de colesterol C-HDL.

	<b>C</b> (n=6)	<b>CF</b> (n=6)	<b>S</b> (n=6)	<b>SF</b> (n=6)	<b>E</b> (n=6)	<b>EF</b> (n=6)	<b>P</b>
<b>Índice de peso</b> (gr/día)	1,68±0,23	2,23±0,20	1,77±0,16	2,30±0,14	1,80±0,11	1,9±0,22	<0,0001
<b>TG</b> (mg/dl)	44±12	65±15	57±19	82±18	53±17	64±9	0,0105
<b>C-HDL</b> (mg/dl)	56±8	51±8	48±8	46±6	48±3	43±7	ns

**TABLA 17: Características antropométricas y bioquímicas de los grupos estudiados:** C:control, CF:control+fructosa, S:sham, SF: sham+fructosa, E:esplacnicetomía, EF:esplacnicetomía+fructosa. *Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard. Índice de peso: incremento de peso diario TG: triglicéridos, C-HDL: colesterol HDL*

**B-5.2.1. b)** De la evaluación global del páncreas:

**b1-** Del estudio del páncreas exocrino a través de la actividad de Amilasa y Lipasa sérica, se observó: **TABLA 18**,

- Un aumento significativo de la actividad de amilasa en los pares:

CF vs S ( $p < 0,01$ ).

CF vs C, CFvsE, y CFvsEF ( $p < 0,05$ )

no presentaron diferencias los pares: SFvsC, SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF, SFvsE, SFvsEF, SFvsS y EFvsE.

- que la lipasa resultó no significativa.

	<b>C</b> (n=6)	<b>CF</b> (n=6)	<b>S</b> (n=6)	<b>SF</b> (n=6)	<b>E</b> (n=6)	<b>EF</b> (n=6)	<b>P</b>
<b>Ami</b> (UI/L)	1378±184	1852±300	1325±231	1682±258	1441±121	1409±209	0,0177
<b>Lip</b> (UI/L)	5,2±0,8	5,4±0,5	5,2±0,4	5,4±1,1	5,2±0,7	5,6±1,1	ns

**TABLA 18: Parámetros de páncreas exocrino en los grupos estudiados:**

C: control, CF: control+fructosa, S: sham, SF: sham+fructosa, E: esplennectomía, EF: esplennectomía+fructosa.

Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard. Ami: amilasa; Lip: lipasa

**b2-** Del estudio del páncreas endocrino a través de la concentraciones de glucosa e insulina **TABLA 19**, se observó:

- que la glucosa resultó no significativa

- Un aumento significativo de insulina en los pares:

CFvsC, SFvsC, CFvsS, CFvsE, CFvsEF, SFvsS, SFvsE y SFvsEF ( $p < 0,001$ ).

- no presentaron diferencias: SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF y EFvsE.

	<b>C</b> (n=6)	<b>CF</b> (n=6)	<b>S</b> (n=6)	<b>SF</b> (n=6)	<b>E</b> (n=6)	<b>EF</b> (n=6)	<b>P</b>
<b>Glu</b> (mg/dl)	107±10	118±15	109±7	121±7	110±11	116±10	ns
<b>Ins</b> (μUI/ml)	9,2±0,7	13,1±1,2	9,4±0,3	13,2±1,8	9,2±0,6	9,8±0,5	<0,0001

**TABLA 19: Parámetros de páncreas endocrino en los grupos estudiados:**

C: control, CF: control+fructosa, S: sham, SF: sham+fructosa, E: esplennectomía, EF: esplennectomía+fructosa.

Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard. Glu: glucosa, Ins: insulina

**B-5.2.2. Resultados obtenidos de la evaluación de la tolerancia a la glucosa, la presencia de insulino-resistencia, y función de la célula  $\beta$ :**

**B-5.2.2. a)** De la prueba de tolerancia oral a la Glucosa (PTOG) a tres tiempos en todos los grupos, con la determinación de las concentraciones de glucosa e insulina en cada punto.

**a1-** Del análisis de la concentración de glucosa en cada uno de los tres puntos para los seis grupos estudiados, **TABLA 20**, se observó que:

- en ayunas, la concentración de glucosa no muestra diferencias significativas.
- para el tiempo 30 minutos de la PTOG, presentaron un aumento significativo de la glucosa los pares:
  - CF vs C, CF vs S y SF vs S ( $p < 0,05$ );
  - SF vs C, CF vs EF y SF vs EF ( $p < 0,01$ );
  - CF vs E y SF vs E ( $p < 0,001$ ).
 no presentaron diferencias: S vs C, C vs E, EF vs C, S vs E, EF vs S, CF vs SF y EF vs E.
- para el tiempo 60 minutos de la PTOG, presentaron un aumento significativo de la glucosa los pares:
  - CF vs C, SF vs C, CF vs S, CF vs E, SF vs E y SF vs S  $p < 0,01$ ;
  - CF vs EF y SF vs EF,  $p < 0,001$ .
 no presentaron diferencias: S vs C, C vs E, EF vs C, S vs E, EF vs S, CF vs SF y EF vs E.

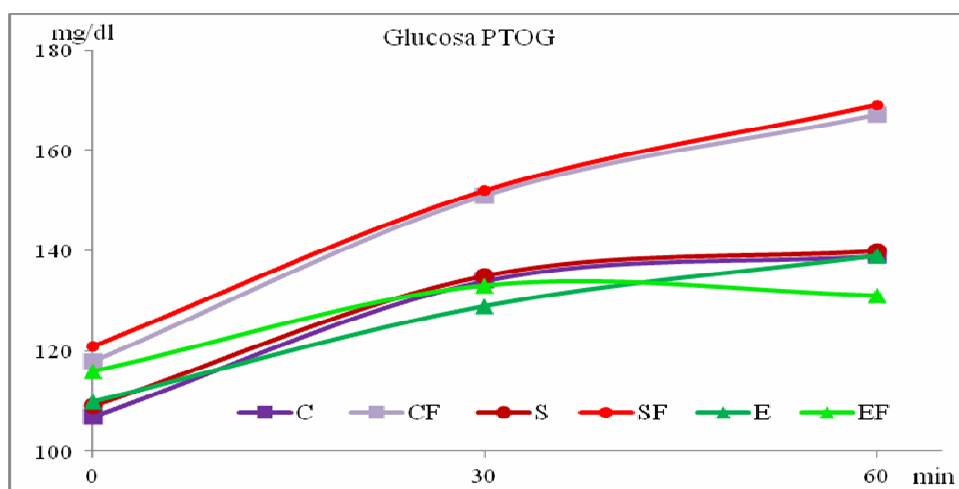
<b>Tiempo</b> (minutos)	<b>C</b> (n=6)	<b>CF</b> (n=6)	<b>S</b> (n=6)	<b>SF</b> (n=6)	<b>E</b> (n=6)	<b>EF</b> (n=6)	<b>P</b>
<b>Glu<sub>Basal</sub></b> (mg/dl)	107±10	118±15	109±7	121±7	110±11	116±10	ns
<b>Glu<sub>30</sub></b> (mg/dl)	134±8	151±11	135±2	152±4	129±11	133±5	<0,0001
<b>Glu<sub>60</sub></b> (mg/dl)	139±5	167±16	140±7	169±10	139±12	131±12	<0,0001

**TABLA 20: Concentración de Glucosa (mg/dl) de PTOG de tres tiempos (basal, 30 y 60 minutos) post estímulo de los grupos estudiados:**

C: control, CF: control+fructosa, S: sham, SF: sham+fructosa, E: esplennectomía, EF: esplennectomía+fructosa.

*Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard.*

La representación de la curva de la PTOG en función tiempo (basal, 30 y 60 minutos), para la determinación de concentración de Glucosa, se observa en **FIGURA 14**.



**FIGURA 14: Representación de la PTOG a tres tiempos (basal, 30 y 60 minutos) para la concentración de glucosa (mg/dl) de los grupos estudiados:**

C: control, CF: control+fructosa, S: sham, SF: sham+fructosa, E: esplennectomía, EF: esplennectomía+fructosa.

*Se expresa como media de la concentración de glucosa en función del tiempo.*

- Observamos que:

C y S curvas similares entre sí,

CF y SF curvas similares entre sí,

E y EF curvas similares a las C y S.

**a2-** Del análisis de la concentración de insulina en cada uno de los tres puntos para los seis grupos estudiados, se observó: **TABLA 21**

- **a tiempo basal y 30 minutos**, un aumento significativo:

CF vs C, CF vs S, SFvsS, SF vs C, CF vs EF, SF vs EF, CF vs E y SF vs E ( $p < 0,001$ )

No presentaron diferencias: SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF y EFvsE.

- **a tiempo 60 minutos** un aumento significativo:

SF vs EF, SF vs C, CF vs E, SF vs E y SF vs S  $p < 0,001$ ;

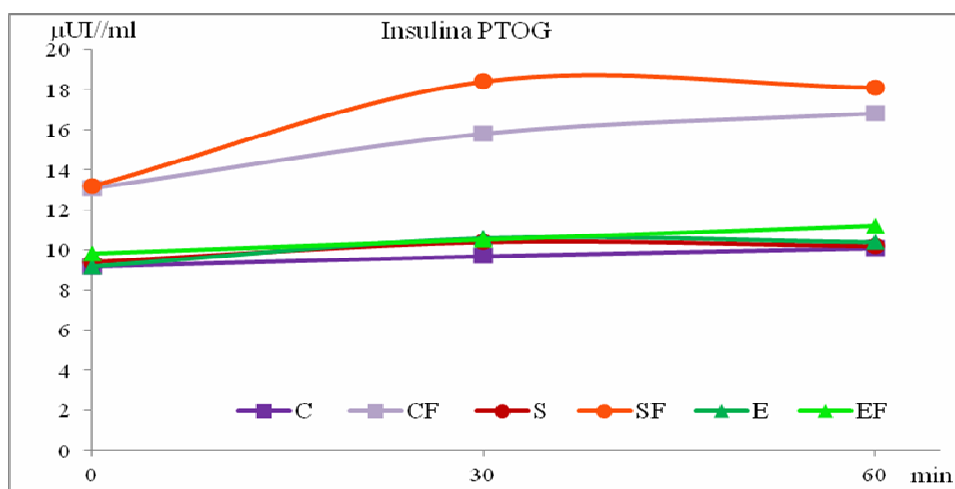
CF vs C, CF vs S y CF vs EF  $p < 0,01$ .

No presentaron diferencias: SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF y EFvsE.

-Tiempo (minutos)	C (n=6)	CF (n=6)	S (n=6)	SF (n=6)	E (n=6)	EF (n=6)	P
<b>Ins<sub>Basal</sub></b> (μUI/ml)	9,2±0,7	13,1±1,2	9,4±0,3	13,2±1,8	9,2±0,6	9,8±0,5	<0,0001
<b>Ins<sub>30</sub></b> (μUI/ml)	9,7±0,3	15,8±1,9	10,4±1,1	18,4±2,3	10,6±2,0	10,5±1,3	<0,0001
<b>Ins<sub>60</sub></b> (μUI/ml)	10,1±0,9	16,8±1,6	10,2±0,7	18,1±4,9	10,4±1,3	11,2±2,5	<0,0001

**TABLA 21:** Concentración de Insulina (μUI/ml) de PTOG de tres tiempos, (basal, 30 y 60 minutos) post estímulo de los grupos estudiados: C: control, CF: control+fructosa, S: sham, SF: sham+fructosa, E: esplennectomía, EF: esplennectomía+fructosa.  
 Los resultados se expresan como Media ± Desvío Standard.

La representación de la curva de la PTOG en función tiempo (basal, 30 y 60 minutos) post estímulo, para la determinación de Insulina, se observa en **FIGURA 15**.



**FIGURA 15:** Representación de la PTOG a tres tiempos (basal, 30 y 60 minutos) para la concentración de insulina (μUI/ml) de los grupos estudiados: C: control, CF: control+fructosa, S: sham, SF: sham+fructosa, E: esplennectomía, EF: esplennectomía+fructosa.  
 Se expresa como media de la concentración de glucosa en función del tiempo.

- Observamos que la curva del grupo EF disminuye significativamente de las curvas de los grupos CF y SF.

**B-5.2.2. b)** Análisis de los índices de insulino-resistencia (IR) y de evaluación de la función de la célula  $\beta$  pancreática:

**b1-** Del análisis de los resultados de los índices se observó: **TABLA 22**

**- Índice Glu/Ins:**

disminución significativa:

CFvsC, CFvsE, CFvsEF, SFvsS, SFvsE y SFvsEF ( $p < 0,05$ ).

no presentaron diferencias:

SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsS, CFvsSF, SFvsC y EFvsE.

**- Índice HOMA-IR:**

aumento significativo:

CFvsC, SFvsC, CFvsS, CFvsE, CFvsEF, SFvsS, SFvsE y SFvsEF ( $p < 0,05$ ).

no presentaron diferencias:

SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF, y EFvsE.

**- Índice IGI<sub>30</sub>:**

disminución significativa:

CFvsS y SFvsS ( $p = 0,01$ )

no presentaron diferencias:

SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF, SFvsE, SFvsEF, EFvsE, CFvsC, SFvsC, CFvsE y CFvsEF

**- Índice IGI<sub>AUC</sub>:**

aumento significativo:

CFvsC, SFvsC, CFvsS, CFvsE, CFvsEF, SFvsS, SFvsE y SFvsEF ( $p < 0,001$ ).

no presentaron diferencias:

SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF, y EFvsE.

**- Índice ISI,**

disminución significativa:

CFvsC, SFvsC, CFvsS, CFvsE, CFvsEF, SFvsS, SFvsE y SFvsEF ( $p < 0,001$ ).

no presentaron diferencias:

SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF, y EFvsE.

**- AUC<sub>glucosa</sub>:**

aumento significativo:

CFvsC, SFvsC, CFvsS, CFvsEF y SFvsS ( $p < 0,01$ ), y CFvsE, SFvsE y SFvsEF ( $p < 0,001$ ).

no presentaron diferencias:

SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF, y EFvsE.

**- AUC<sub>insulina</sub>:**

aumento significativo:

CFvsC, SFvsC, CFvsS, CFvsE, CFvsEF SFvsS, SFvsE y SFvsEF ( $p < 0,001$ ).

no presentaron diferencias:

SvsC, CvsE, EFvsC, SvsE, EFvsS, CFvsSF, y EFvsE.

	<b>C</b> <b>(n=6)</b>	<b>CF</b> <b>(n=6)</b>	<b>S</b> <b>(n=6)</b>	<b>SF</b> <b>(n=6)</b>	<b>E</b> <b>(n=6)</b>	<b>EF</b> <b>(n=6)</b>	<b>P</b>
<b>Glu/Ins</b>	11,8±1,8	9,1±1,1	11,4±0,7	9,3±1,7	12,1±1,8	12,1±0,9	0,0013
<b>HOMA-IR</b>	2,42±0,22	3,83±0,68	2,52±0,23	3,92±0,47	2,48±0,20	2,73±0,29	<0,0001
<b>IGI<sub>30</sub></b>	1,67±1,25	0,42±0,49	3,09±0,88	0,58±0,057	1,38±0,87	1,54±1,20	0,0020
<b>IGI<sub>AUC</sub></b>	1,36±0,08	1,89±0,13	1,41±0,12	2,06±0,11	1,45±0,20	1,47±0,19	0,0002
<b>ISI</b>	165±11	99±13	158±7	92±8	161±12	150±16	<0,0001
<b>AUC<sub>glucosa</sub></b>	128±5	146±11	130±3	149±3	127±9	128±6	<0,0001
<b>AUC<sub>insulina</sub></b>	9,6±0,5	15,4±1,1	10,1±0,7	17,0±1	10,2±1,3	10,5±1,3	<0,0001

**TABLA 22: Índices de IR y función de la célula  $\beta$  de los grupos estudiados:**

C: control, CF: control+fructosa, S: sham, SF: sham+fructosa, E: esplennectomía, EF: esplennectomía+fructosa.

*Los resultados se expresan como Media  $\pm$  Desvío Standard.*

*Glu/Ins: cociente glucosa-insulina, HOMA-IR, homeostasis de insulino-resistencia, IGI<sub>30</sub>: índice insulinogénico calculado a los 30 minutos, IGI<sub>AUC</sub>: índice insulinogénico calculado con las áreas bajo la curva. ISI (insulin sensitivity index) Matsuda AUC: área bajo la curva*

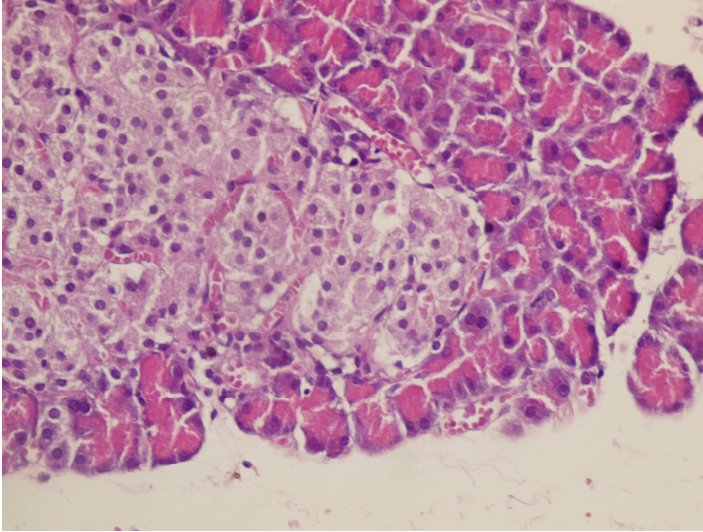
**b2-** Observamos una asociación positiva de los 6 grupos entre AUC<sub>Glucosa</sub> y el AUC<sub>Insulina</sub> (r=0.8025, IC: 0.6337-0.8983, p<0,0001)

### **B-5.2.3 Análisis histológico e inmunohistoquímico de tejido pancreático y hepático**

Del análisis microscópico efectuado en los cortes del páncreas de las ratas control(C), control+fructosa (CF), sham(S), sham+fructosa (SF), esplennectomizados (E), y esplennectomizados+fructosa (EF) se desprenden las siguientes figuras donde se muestra la clara diferencia entre los grupos.

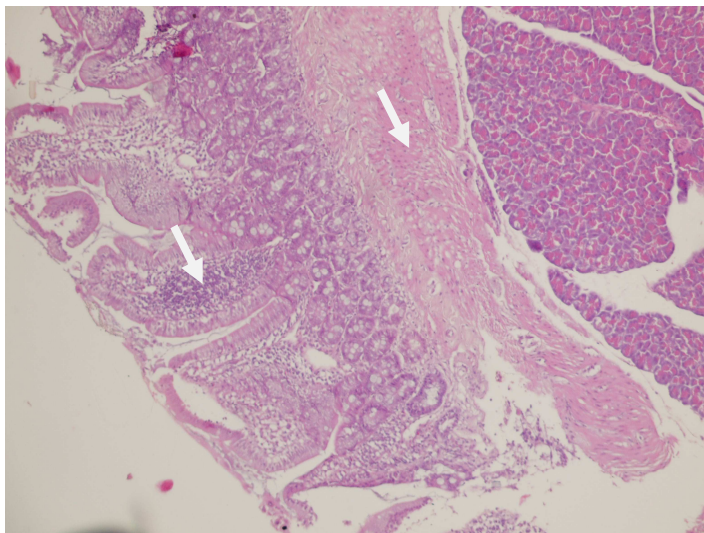


c1-de la anatomía patológica se observo:



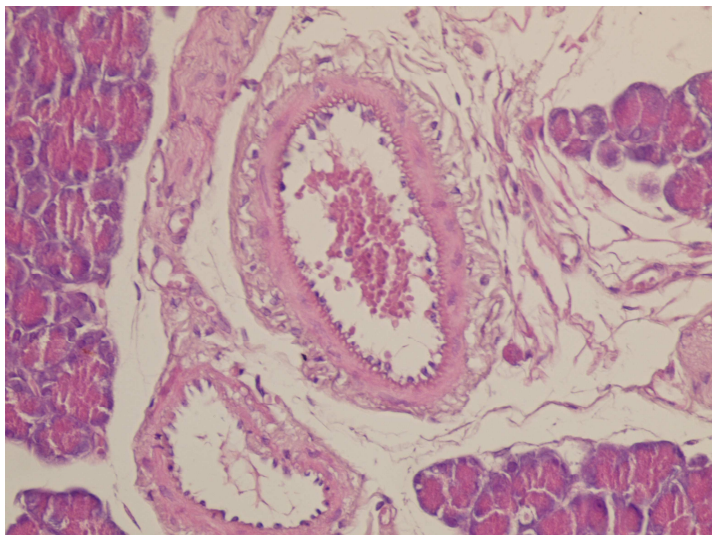
**FIGURA 17 Histología del parénquima pancreático (400x) H&E, C.**

En el grupo C: control se apreció ausencia de lesiones epiteliales en el conducto bilio-pancreático, acinos e islotes. Los vasos sanguíneos presentaron aspecto normal y sin infiltración leucocitaria



**FIGURA 18 Histología del parénquima pancreático (100x) H&E, CF.**

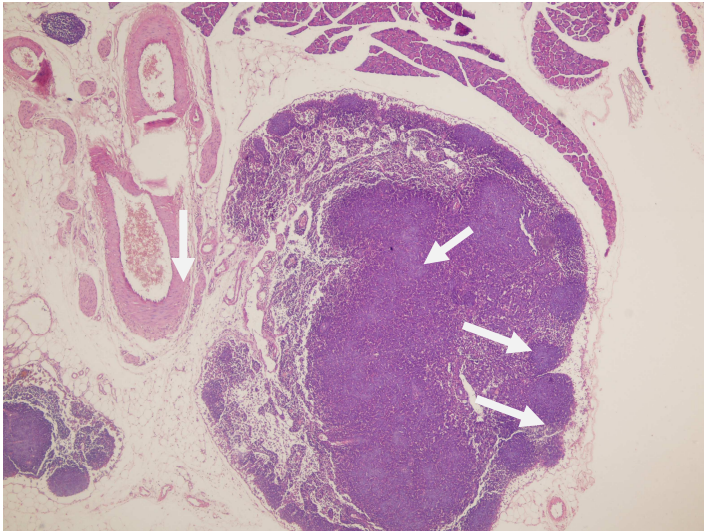
En el grupo CF: control+fructosa se apreció infiltración leucocitaria entre los acinos pancreáticos y en los canaliculos pancreáticos, tejido adiposo próximo a los mismos con zonas aisladas que evidencian fibrosis. En algunos animales se observó además la presencia de vasos dilatados.



**FIGURA 19 Histología del parénquima pancreático (400x) H&E, S.**

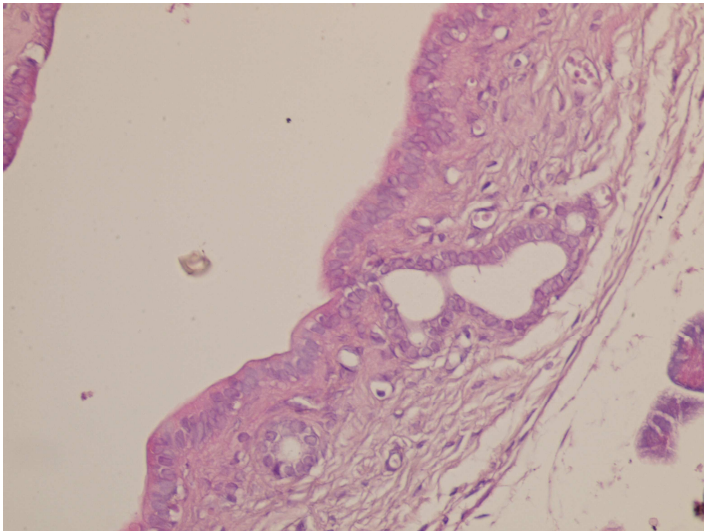
En el grupo S:sham, se apreció ausencia de lesiones epiteliales, vasos sanguíneos de aspecto normal, ligera infiltración leucocitaria.





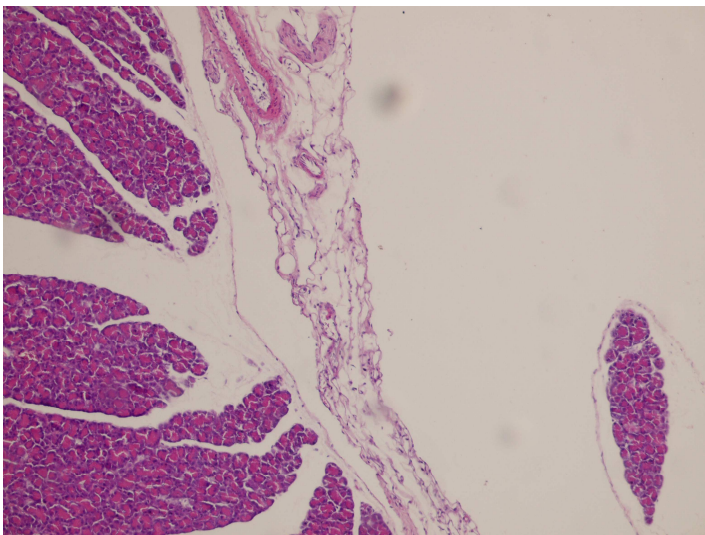
**FIGURA 20 Histología del parénquima pancreático (20x) H&E, SF.**

En el grupo SF:sham+fructosa, se apreció, vasos sanguíneos muy dilatados, con bordes festoneados y sangre extravasada, gran infiltración leucocitaria. Abundante tejido adiposo, y zonas con evidencia de fibrosis



**FIGURA 21 Histología del parénquima pancreático (100x) H&E, E.**

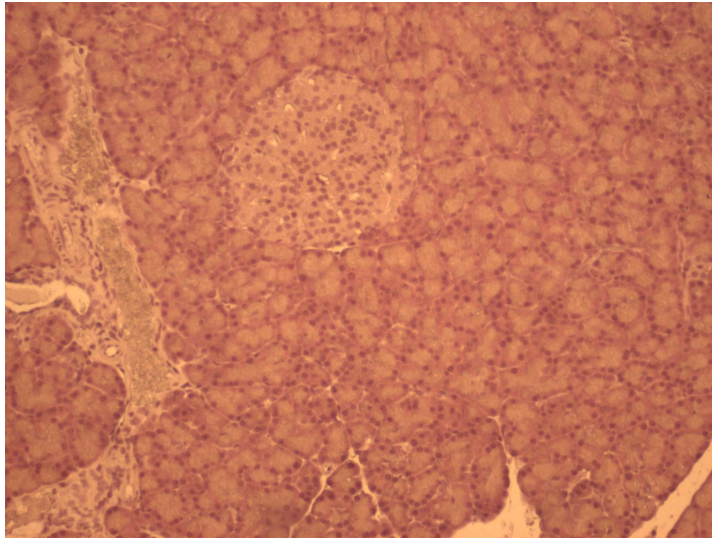
En el grupo E:esplancnectomía, no se observaron lesiones epiteliales ni tejido adiposo, los vasos sanguíneos presentaron aspecto normal, se apreció una ligera infiltración leucocitaria.



**FIGURA 22 Histología del parénquima pancreático (100x) H&E, EF.**

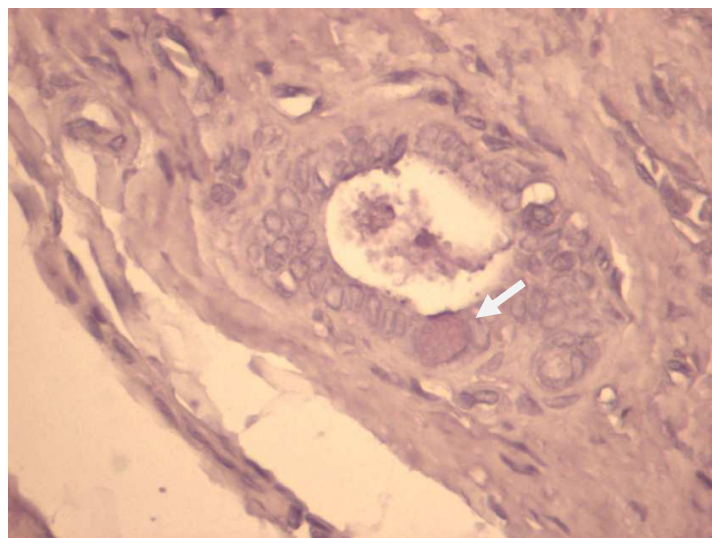
En el grupo EF: esplancnectomía+fructosa, no se observaron lesiones epiteliales, los vasos sanguíneos presentaron aspecto normal, cuatro animales presentaron una ligera infiltración leucocitaria.y tres animales una zona con tejido adiposo peripancreático.

c2-del estudio inmunohistoquímico se observo:



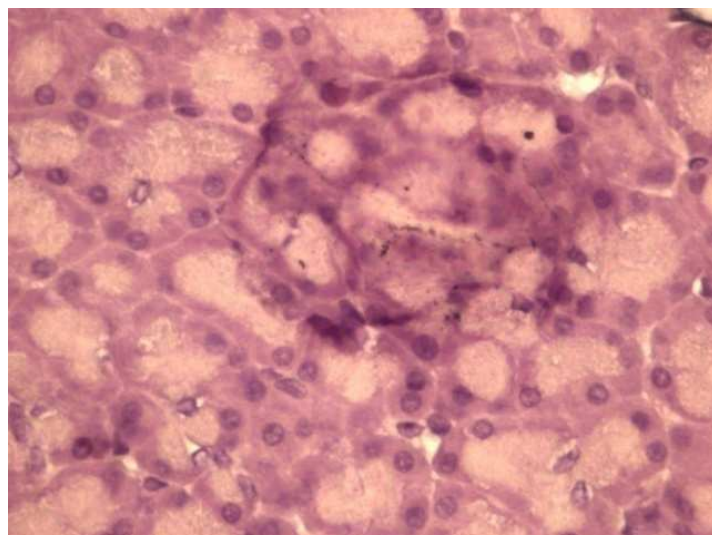
**FIGURA 23 Inmunohistoquímica del parénquima pancreático (100x) H&E, C.**

En el grupo C: control, ausencia de actividad de ChAT



**FIGURA 24 Inmunohistoquímica del parénquima pancreático (400x) H&E, CF.**

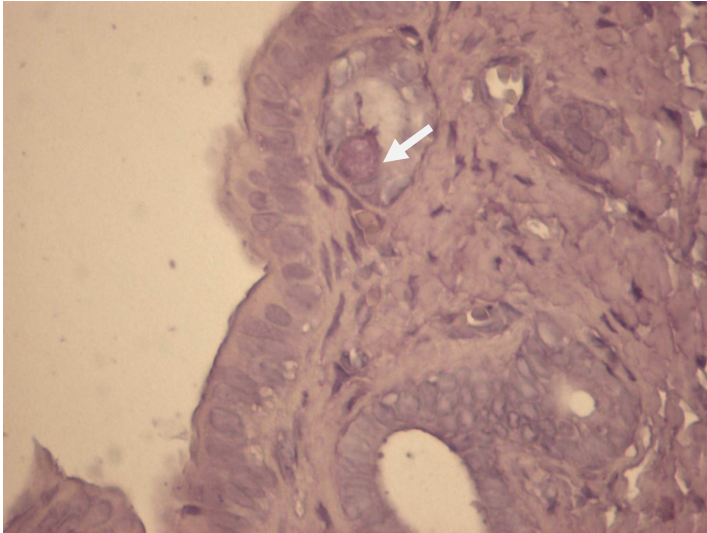
En el grupo CF: control+fructosa, baja actividad de ChAT



**FIGURA 25 Inmunohistoquímica del parénquima pancreático (400x) H&E, S.**

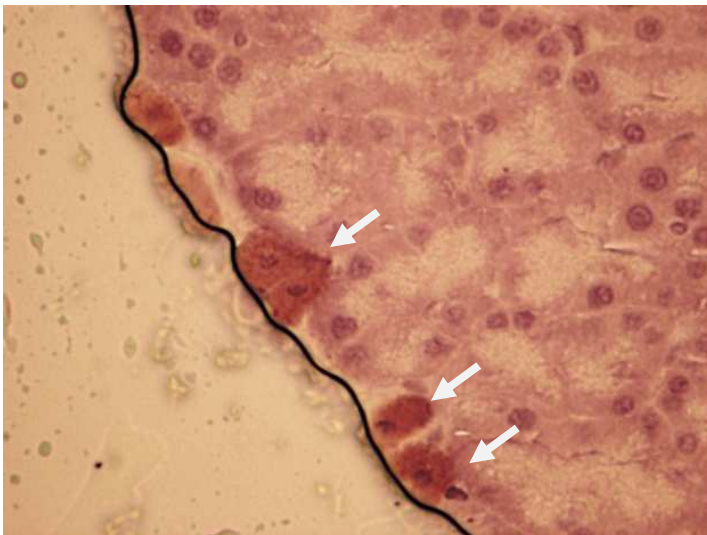
En el grupo S: sham, ausencia de actividad de ChAT





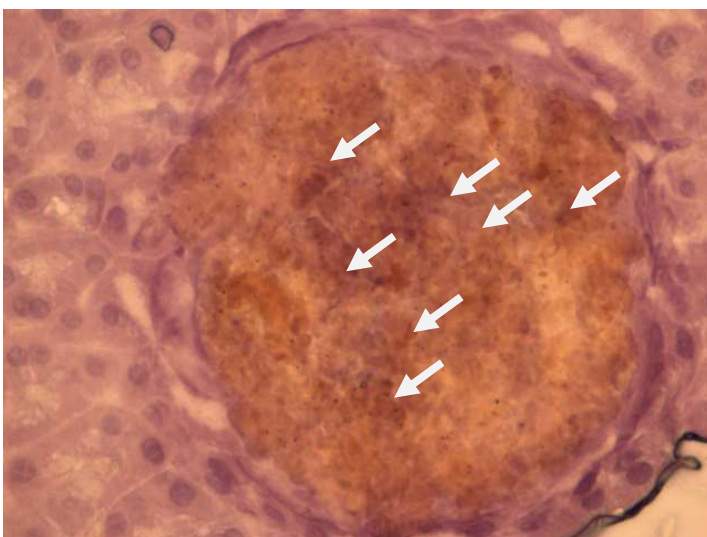
**FIGURA 26** Inmunohistoquímica del parénquima pancreático (400x) H&E, SF.

En el grupo SF: sham+fructosa, baja actividad de ChAT



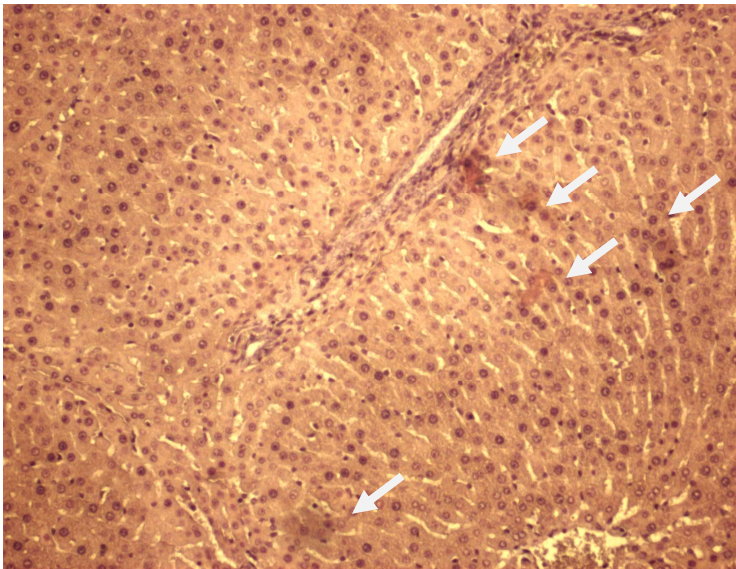
**FIGURA 27** Inmunohistoquímica del parénquima pancreático (400x) H&E, E.

En el grupo E: esplenectomía, 40% moderada actividad de ChAT



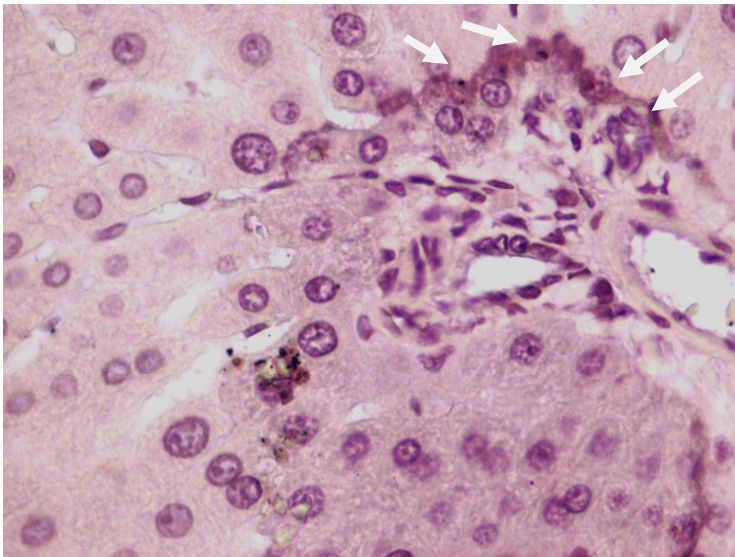
**FIGURA 28** Inmunohistoquímica del parénquima pancreático (400x) H&E, EF.

En el grupo EF: esplenectomía+fructosa alta actividad de ChAT.



**FIGURA 29 Histología del parénquima hepático (100x), H&E, E**

En el grupo E: esplennectomía, baja-moderada actividad de ChAT



**FIGURA 30 Histología del parénquima hepático (400x), H&E, EF**

En el grupo EF:  
esplennectomía+fructosa,  
moderada actividad de ChAT  
Se evidencia el recorrido del axón

## 6 – DISCUSION

Desde hace varias décadas en el Programa de Estudios Pancreáticos (PEP) del Hospital de Clínicas “José de San Martín” se estudian patologías relacionadas a la glándula pancreática. En él se presta un servicio asistencial en lo referente a la atención de pacientes ambulatorios; y de investigación tanto en humanos como en animales de experimentación. Asisten pacientes derivados por médicos de diferentes subespecialidades de la gastroenterología, para la realización de estudios funcionales tanto exocrinos como endocrinos del páncreas. En lo relativo a investigación básica, se trabaja con modelos de pancreatitis aguda, pancreatitis crónica y modelos de denervaciones autonómicas, desarrollados por el equipo de trabajo y que han generado múltiples publicaciones.

Hemos observado que en las últimas dos décadas, el incremento en el número de pacientes que acudían con diagnóstico de síndrome metabólico (SM), reflejándose lo que a nivel mundial sucede. Esta situación nacional, generó uno de los objetivos de este trabajo de tesis: evaluar el estado del páncreas endocrino-exocrino en los pacientes con diagnóstico de SM, analizar el estado de insulino resistencia (IR), la función de las células beta; y observar si los problemas digestivos que presentan podrían estar relacionados con el componente exocrino del páncreas.

Los pacientes estudiados en este trabajo pertenecen al PEP, clasificados por el médico tratante en SM de acuerdo a los criterios del ATP III. [ATP III, 2001]

En el estudio del SM, los cinco parámetros con los que se define se consideran equivalentes, [Alberti KG, 2009] y se lo diagnostica por la presencia de por lo menos tres de ellos. Al analizar las características clínicas y bioquímicas de cada individuo observamos que la muestra de pacientes, estudiados, si bien es representativa, quizás no sea lo suficientemente homogénea, al observar los desvíos estándares obtenidos de los parámetros determinados. Los criterios que presentaron alterados la mayoría de los pacientes evaluados fueron: la circunferencia de cintura y la alteración de la glucosa, mientras que los menos afectados fueron triglicéridos (TG) y C-HDL.

El SM, es una asociación de anomalías metabólicas y de factores de riesgo cardiovasculares que pueden aparecer de forma simultánea o secuencial, causados por la combinación de factores genéticos y ambientales, asociados al estilo de vida, en los que la IR se considera el componente patogénico fundamental. [Masana Marín L, 1998; Kajur JA, 2014].

La IR genera hiperinsulinemia para mantener la homeostasis de la glucosa, produciendo un incremento de la lipólisis del tejido adiposo, que a nivel hepático se traduce como una mayor oferta de ácidos grasos libres (AGL). Una mínima cantidad de

AGL se almacena en el hígado, mientras que la mayor parte pasa a la circulación en forma de TG, con aumento de su concentración sanguínea, disminución de colesterol HDL e incremento del colesterol LDL, [Lara-Castro C, 2004]. Todas estas variaciones son concordantes con los resultados obtenidos en los pacientes con SM.

La edad y los antecedentes de las mujeres estudiadas con SM, indican que se encuentran en la etapa menopáusica o peri-menopáusica, con la probable desprotección estrogénica, con un incremento en la posibilidad de desarrollar una pancreatopatía [Tiscornia OM, may-1986; Tiscornia OM, jun-1986; Morin-Papunen LC, 2004] En los hombres con SM en relación a las mujeres, se observó una mayor circunferencia de cintura, relacionada en forma directa, a su mayor contextura física. Se observó también una mayor concentración de TG, que podría relacionarse con una diferente distribución de la grasa (androide). [Vague J, 1996]

Respecto de la evaluación global del páncreas (**5.1.1.c**), de los pacientes con SM, a través de los parámetros exocrinos (actividad de amilasa y lipasa), los resultados obtenidos están dentro de los valores de referencia observándose en SM respecto de los controles valores de amilasa total y su isoenzima pancreática superiores, lo que se interpreta como un indicio de la acción de la insulina a nivel del páncreas. La hiperinsulinemia característica del SM, estimularía la secreción de amilasa, e inhibiría parcialmente la secreción de lipasa. [Tiscornia OM, 2011]

El estudio de los parámetros relacionados a la función endocrina (Insulina y glucosa), observamos un aumento significativo de sus concentraciones. La resistencia de los tejidos a la acción de la insulina, serían la causante de la hiperglucemia observada.

Para mantener la homeostasis de la glucosa, la célula  $\beta$  debe secretar mayor cantidad de insulina; cuando la célula falla y no es capaz de secretar la insulina necesaria para disminuir los niveles de glucosa, se desencadena la diabetes tipo 2 (DBT2). La presencia de glucemia elevada acompañada de insulinemia elevada pone de manifiesto la resistencia a la insulina en ayunas, principalmente de origen hepático. Se encuentra alterada la vía de inhibición de la glucogenólisis, la insulina no está inhibiendo la producción hepática de glucosa. [Abdul-Ghani MA, 2007].

Para visualizar el funcionamiento global del páncreas, y profundizar sobre su estado metabólico se les realizó la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG), a cuatro tiempos que incluye además la determinación de insulina (Pancreatograma) y a continuación después de una semana, la prueba del Pancreolauryl (PLs)

La PTOG refleja la eficiencia del organismo para disponer de la glucosa post prandial. Emula la dinámica de la glucosa y la insulina tras la ingesta, bajo condiciones fisiológicas.

Los resultados obtenidos (5.1.2.); presentados en la TABLA 5 y la FIGURA 4 para la glucosa; y en la TABLA 6 y la FIGURA 5 para la insulina, revelan la alteración metabólica presente en los pacientes con diagnóstico de SM.

El incremento de la concentración de glucosa e insulina en ayunas observado, reveló la presencia de la IR hepática: la sensibilidad hepática a la insulina está disminuida, por lo tanto no está inhibida la glucogenólisis, se libera glucosa desde el glucógeno hepático, la célula  $\beta$  responde a la hiperglucemia aumentando la secreción de insulina para mantener la homeostasis [Zhou W, 2006].

A los 30 minutos, post sobrecarga de glucosa, se incrementó la glucemia, la célula  $\beta$  respondió secretando insulina (primera fase de la secreción de la insulina). Se observa, en SM, como consecuencia del aumento de las concentraciones de glucosa e insulina, un desplazamiento de las curvas hacia valores superiores, se amplía la brecha entre controles y pacientes con SM.

En el SM, debido a la IR de los tejidos periféricos, la célula  $\beta$  debe secretar aun más insulina para compensar el incremento de glucosa y mantener la homeostasis. [Nolfe G, 2011]

A los 60 minutos, en el SM, se alcanza el valor máximo de la concentración de glucosa, supera los 200mg/dl, evidenciando una disminuida sensibilidad de los tejidos a la insulina. Se considera un valor de corte de 165 mg/dl, para la presencia de IR. [Kim JY, 2013]. La concentración de insulina fue elevada, y se observó que sigue incrementando su concentración a medida que transcurre el tiempo. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores. Ellos observaron que cuando la glucosa encuentra dificultad para ingresar al músculo y almacenarse como glucógeno, aumenta su concentración en circulación, y la célula  $\beta$  responde incrementando la secreción de insulina, en su fase tardía de liberación [Kanauchi M, 2005].

Los controles presentaron su máxima concentración de glucosa e insulina, para luego descender a las dos horas. La justificación a este evento es la ausencia de la IR. Los tejidos captan correctamente la glucosa de la circulación. [Hayashi T, 2013]

Entre los 30 y 60 minutos el comportamiento de la glucosa depende de la sensibilidad del musculo esquelético a la insulina y de la función de la célula  $\beta$ , que si están alteradas se refleja en este punto. [Stumvoll M, 2001; Abdul-Ghani MA, 2010].

Algunos autores consideran que la identificación de individuos con alto riesgo de desarrollar DBT 2, se realiza con la determinación de la glucosa en ayunas y/o a los 120 minutos. [Kramer CK, 2014], mientras que otros consideran que brinda mejor poder

predictivo, la determinación de glucosa a los 60 minutos [Unwin N, 2002]. Concordando con nuestros resultados.

A los 120 minutos el valor de la concentración de glucosa desciende en ambos grupos, pero mientras en el grupo control, el valor es similar al basal; en el grupo con SM desciende a un valor similar al de los 30 minutos. Cuando el valor de glucosa se encuentra entre 140 y 199 mg/dl, en este punto, evidencia la tolerancia a la glucosa post sobrecarga alterada (Intolerancia a la glucosa), definido como estado pre diabético [ADA, 2015]. La tolerancia se afecta cuando frente a una disminución en la sensibilidad a la insulina, el aumento de su secreción no la compensa [Carnevale Schianca GP, 2003].

Cuanto menor sea la diferencia entre los resultados obtenidos del basal y los 120 minutos menor será la probabilidad de desarrollar una alteración metabólica. [Matsuda M, 1999; Abdul-Ghani MA, 2010; Bartoli E, 2011]

La insulina, en el grupo con SM triplicó los valores del grupo control. Estos resultados fueron concordantes con el estado de IR. Mientras en el grupo control disminuye, en el grupo con SM, la célula  $\beta$ , incrementa la secreción de insulina para vencer la resistencia periférica, para mantener la homeostasis de la glucosa.

Del análisis del perfil de las curvas individuales de los pacientes controles, FIGURA 6, observamos que el 100% presentaron un perfil monofásico, para la glucosa y el 90% presentaron una curva monofásica para la insulina, observándose el máximo de glucosa entre los 30 y los 60 minutos acorde a la forma monofásica, concordantes con una sensibilidad hepática y periférica adecuada. [Tschritter O, 2003]

El perfil de la insulina se relaciona a una primera fase de secreción eficiente, la célula  $\beta$  responde al aumento de glucosa en tiempo, y, a nivel periférico los tejidos responden captando la glucosa. A los 60 minutos, cuando la mayoría presenta la máxima concentración de insulina, entra en juego la fase tardía de la secreción de insulina, y la concentración de glucosa comienza a disminuir. [Hayashi T, 2013; Gastadelli A, 2004]. A los 120 minutos, la glucosa retorna a valores cercanos al valor basal, evidenciando una adecuada sensibilidad periférica. El tiempo que necesita un individuo para retornar al valor basal depende de la respuesta a la insulina luego de la sobrecarga de glucosa. [Nolfe G, 2011; Kanauchi M, 2005].

La sincronía entre la glucosa y la insulina, ratifica una adecuada sensibilidad de los tejidos periféricos a la insulina, la célula  $\beta$  no necesita secretar más insulina. [Tschritter O, 2003]

Al analizar el perfil de las curvas individuales de los pacientes con SM, FIGURA 7 observamos que dos tercios (73%) de los pacientes, presentó un perfil monofásico, para la glucosa, y un perfil monofásico o monótono para la insulina evidencia la disminución



moderada de la sensibilidad tisular ya que responde al incremento de insulina, captando la glucosa y disminuyendo su concentración a las dos horas. Mientras que un tercio (27%) presentó un perfil monótono para glucosa e insulina, concordante con una intolerancia a la glucosa post sobrecarga que demuestra una severa disminución de la sensibilidad periférica a la insulina, ya que su incremento no compensa la resistencia tisular [Carnevale Schianca GP, 2005].

En este grupo la sincronía representa la IR ya que responde al incremento de las concentraciones a los 60 y 120 minutos.

En pacientes con SM se observó en relación a los controles, un desplazamiento del tiempo en que se presentan los máximos de concentración para glucosa e insulina. El tiempo en el que se presenta el máximo de la concentración de glucosa fue a los 60 minutos y el de insulina a los 120 minutos. Esto es una evidencia clara, de que la primera fase de liberación de la insulina no compensa la IR, por lo que la concentración de la glucosa sigue aumentando. Cuando tiene lugar la segunda fase de liberación de insulina, esta se incrementa facilitando que los tejidos periféricos capten la glucosa, y disminuya su concentración en circulación, venciendo la IR. [Retnakaran R, 2010].

Del estudio realizado sobre el cálculo de los índices de IR y la funcionalidad de la célula  $\beta$  (TABLA 7) observamos en los pacientes con SM que:

- ◆ El índice Glu/Ins, permitió discriminarlos significativamente ya que disminuye respecto de los controles. Este índice fue propuesto como un primer elemento de análisis de los pacientes no diabéticos, utiliza al igual que el índice HOMA-IR el valor de insulina en ayunas que depende de la secreción, distribución y degradación de la misma. [Bartoli E, 2011].

- ◆ El aumento observado del índice HOMA-IR [Matthews DR, 1985], ratifica la presencia de IR. El 71% de los pacientes presentaron distintos grados de IR hepática en ayunas.

- ◆ En relación al porcentaje de incremento de glucosa, luego de una sobrecarga de glucosa el cálculo del PG% a las dos horas evidencia una disminución de la sensibilidad a la insulina. En los controles se observa una sensibilidad adecuada, 29 pacientes controles presentaron un PG% mayor o igual a 40%). [Bartoli E, 2011]

Así, los resultados obtenidos de estos índices, manifiestan la IR presente en ayunas, una disminución de la sensibilidad periférica, y son concordantes con la forma de la curva de glucosa e insulina observada en los pacientes con SM

◆ La disminución del índice insulinogénico ( $IGI_{30}$ ) puso de manifiesto la alteración de la función de la célula  $\beta$ , durante la primera fase de la secreción de la insulina [Kim YA, 2014].

El IGI con el área bajo la curva ( $IGI_{AUC}$ ), aunque se encontró alterado en 27 sujetos, no permitió diferenciar a los grupos. Se interpretó que puede deberse a la gran dispersión que presenta la insulina. [Tura A, 2006]

◆ Se observó una disminución en el índice de Matsuda (ISI), que reveló la ausencia de la sensibilidad integral a la insulina. [Matsuda M, 1999; Gut M, 2000]

El estudio de la funcionalidad del páncreas exocrino en los pacientes con SM, se realizó a través de una prueba indirecta de la función pancreática, el test del Pancreolauryl sérico (PLs). (5.1.3)

Se puso a punto la técnica del PLs, de acuerdo con los lineamientos de la bibliografía consultada de referencia, calculamos el factor de conversión, y ratificamos los valores de corte. En un trabajo previo al trabajo de tesis determinamos el PLs en pacientes con pancreatitis crónica diagnosticadas por el test de Secretina (“Gold Estándar”), [López Mingorance F, 2011].

Los resultados obtenidos de PLs en los pacientes con SM fueron menores que los obtenidos en los controles. (TABLA 8). Dentro de estos pacientes, el 46% (19) presentaron resultados menores al valor de corte (4,5mg/l), y de ellos el 21% resultados menores al segundo valor de corte (2,5mg/l). Concordantes con los obtenidos por otros autores que hallaron en pacientes con DBT2 alteración exocrina de la glándula [Hardt PD, 2003; Hardt PD, 2011]

Es nuestra interpretación que estos resultados demuestran una alteración de la glándula a nivel exocrino, en un síndrome donde la base es una alteración del metabolismo endocrino. Al analizar por género, observamos un predominio de hombres y de mujeres posmenopáusicas con PLs alterados. Se evidencia la protección que le confieren los estrógenos al páncreas, [Tiscornia OM, jun-1986; Morin-Papunen LC, 2004]].

En los pacientes con SM diferenciados por el PLs normal y PLs alterado ( $\leq 4,5$ mg/l):

TABLA 10

-no se observaron diferencias en las curvas de glucosa e insulina (pancreatograma) Estos resultados son concordantes con los obtenidos en estudios previos por el grupo y la bibliografía consultada, en pacientes diabéticos, donde se observó la presencia de una alteración del eje endocrino-exocrino [Tiscornia OM, 2011; Hardt PD, 2012; Malloy J, 2012; Piciucchi M, 2015]

En los pacientes con SM y PLs alterado ( $\leq 4,5$ mg/l) observamos que:

-el HOMA-IR fue menor, creemos que la alteración exocrina no está relacionada con la IR en ayunas, donde no interviene la función de la célula  $\beta$ , sino que representa la sensibilidad a la insulina en ayunas, donde el estado metabólico es diferente [Lautt W, 2011].

-los índices  $IGI_{30}$  e  $IGI_{AUC}$  fueron menores, indicando una alteración de la funcionalidad de la célula  $\beta$  en la primera fase de secreción de insulina, y una alteración en la segunda fase, respectivamente. En conjunto demuestran una célula  $\beta$  sobre exigida.

-el  $AUC_{insulina}$  fue menor, indicando una disminución en la secreción de insulina.

-la mayoría de los pacientes presentaron una curva monofásica para la glucosa y una monótona para la insulina. Los máximos a los 60 y 120 minutos respectivamente, concordante con una alteración en la secreción insulínica.

- una asociación positiva entre el PLs, y la concentración de insulina 60 y 120 minutos, los índices  $IGI_{30}$ ,  $IGI_{AUC}$ , y  $AUC_{insulina}$ ; y una asociación negativa con el ISI.

Se demuestran por estas vías, las diferentes formas de evaluar la alteración en la secreción de la insulina. Se evidencio la relación entre la alteración de la fase tardía de secreción de la insulina, y una IR periférica severa; que conducen a la alteración exocrina del páncreas. Creemos que la alteración endocrina presente en el SM afecta el componente exocrino, (relación del eje endocrino-exocrino).

El análisis de los resultados obtenidos en humanos sugieren claramente que existe una íntima relación anátomo-funcional entre el páncreas endocrino y exocrino. [Hardt PD, 2011; Piciucchi M, 2015]

La secreción endocrina y exocrina es el resultado de interacciones complejas entre mediadores humorales y neurales. El sistema nervioso autónomo (SNA) es fundamental para el control metabólico y circulatorio, y que una hiperactividad simpática se relaciona con la IR, y consecuente SM. [Weyer C, 2000 Lambert E, 2007]

Se planteó utilizar un modelo animal de SM donde a través de la esplancnicectomía nos permita relacionar. (SNA-IR-SM). [Tiscornia OM, 1990; Tiscornia OM, 2000; García H, 2002; Tiscornia OM, 2002)

En los animales con SM, se observan cambios significativos: (TABLA 11 y 13) Para confirmar la presencia del SM: aumento del peso diario; aumento de las concentraciones de glucosa y triglicéridos; y disminución de la concentración de C-HDL. [Puyó AM, 2012; Rosa F, 2007]

De la evaluación global de páncreas se observó un aumento en la actividad de amilasa; y las concentraciones de insulina y de glucosa, sin cambios en la actividad de

lipasa. (TABLAS 12 y 13) Los cambios producidos fueron similares a los resultados obtenidos en los humanos con SM. Los aumentos de la actividad de amilasa, se explicarían por la estimulación ejercida por la insulina para su liberación, [Tiscornia OM- Negri GA, 2007; Tiscornia, OM; Hamamura, S 2007]. La concentración de la insulina se encuentra aumentada más del 50% en relación a los controles, mecanismo necesario para mantener la homeostasis de la glucosa, que también se encuentra significativamente elevada.

La realización de la PTOG a tres tiempos, (TABLAS 14 y 15), evidenció un moderado incremento en la concentración de glucosa en todos los tiempos, siendo más significativo a los 60 minutos, se observó que a medida que pasa el tiempo post estímulo se acentúa la diferencia de respuesta entre los grupos SM y control, manifestando: una menor eficiencia para mantener la homeostasis de la glucosa, y la tolerancia a la glucosa alterada. La insulina se encuentra elevada en todos los tiempos, y no es suficiente para evitar la hiperglucemia debido a la IR.

Se observó un aumento significativo de las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas, se evidenció así que la sensibilidad hepática a la insulina está disminuida, no está inhibida la glucogenólisis y aumenta la producción de glucosa hepática. La célula  $\beta$  responde aumentando la secreción de insulina para mantener la homeostasis [Zhou W, 2006].

A los 30 minutos, se observó un aumento moderado de la glucosa y un marcado aumento de insulina; primera fase de la secreción de la insulina, la célula  $\beta$  responde a la sobrecarga de glucosa y compensa en gran parte la IR periférica. [Nolfe G, 2011; Retnakaran R, 2010]

A los 60 minutos se observó un aumento significativo de las concentraciones de glucosa e insulina. En el grupo SM se observa que la glucosa continúa aumentando mientras que para los valores de la insulina a los 30 y 60 minutos resultaron similares, en la FIGURA 11 se observa un “plateau”, la IR dificulta el ingreso de la glucosa al músculo y su almacenamiento como glucógeno, por lo que aumenta su concentración en circulación. FIGURA 10 [Kanauchi M, 2005].

En los animales con SM, se observó un comportamiento diferente a los humanos con SM. La glucosa sigue aumentando, nos inclinamos a considerar la posibilidad de una falla de la célula  $\beta$  en la fase tardía de la secreción de insulina. La concentración de insulina no aumenta en la fase tardía de liberación, hace evidente que la sensibilidad de los tejidos está alterada. Según los autores, el comportamiento de la glucosa depende de la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina y de la función de la célula  $\beta$ , que si están alteradas se refleja en este punto. [Stumvoll M, 2001; Abdul-Ghani MA, 2010].

En el análisis del perfil de la curva, observamos que las curvas de glucosa e insulina son de tipo monótona en el 100% y 60% de los animales con SM respectivamente. Al tomarse por razones de mortalidad animal, solo tres tiempos para la construcción de la curva, no es posible discriminar si esta descende o sigue aumentando luego de los 60 minutos.

Se evidenció una tolerancia a la glucosa alterada, que combinada con una curva de insulina de forma monótona, se relacionó con una severa IR, con alta probabilidad de desarrollar DBT 2. El 40% de los animales con SM que no presentaron una curva para la insulina de tipo monótona, la representación fue en forma de plateau entre los 30 y 60 minutos, que podría relacionarse con una función alterada de la célula  $\beta$ .

Al efectuar el análisis del perfil de las curvas individuales, observamos un comportamiento similar en cada uno de los animales, atribuimos esto a la homogeneidad de estímulos al que fueron expuestos, iguales condiciones ambientales. Los pacientes con SM estuvieron expuestos a más de un estímulo y en condiciones ambientales-sociales muy diversas.

Las observaciones significativa sobre la disminución del índice Glu/Ins, y el aumento del índice HOMA-IR ratifican la presencia de IR en ayunas en los animales con SM, principalmente hepática. [Bartoli E, 2011; Matthews DR, 1985].

En ellos, a través de la disminución del  $IGI_{30}$  y el aumento del  $IGI_{AUC}$ , se manifestó la alteración de la función de la célula  $\beta$ .

La disminución del ISI puso en evidencia la IR hepática y la IR periférica, seguramente debida a una ausencia de sensibilidad integral a la insulina.

El  $AUC_{insulina}$  de los animales con SM duplica el valor de los controles, evidenciando una mayor necesidad de insulina para mantener la homeostasis.

Del análisis histológico de la glándula pancreática observamos que en los animales alimentados con fructosa manifestaron mayor inflamación por la presencia de infiltración leucocitaria y por la presencia de vasos dilatados, aumento del tejido adiposo en la zona peri-pancreática, evidenciando a nivel tisular los efectos tóxicos del SM.

En modelo animal de pancreatitis aguda (PA), con esplenectomía bilateral previa [Tiscornia OM-García H, 2002], se demostró los efectos benéficos de la denervación simpática. En ellos se observó que las concentraciones de glucosa no se elevaban, y se atenúa el cuadro inflamatorio, demostrado por la histología del páncreas.

Planteamos así la posibilidad que la IR característica del SM, podría ser compensada a través de la esplenectomía, e incluso revertirse. Para ello se trabajó con tres grupos: controles, sham y esplenectomía, a los que subdividió en dos, a un subgrupo de cada uno de los grupos se les generó el SM. Quedan así conformados seis

grupos, tres controles: C (Control), S (Sham) y E (Esplacnicectomia) y tres con SM: CF (control+fructosa), SF (sham+ fructosa) y EF (esplacnicectomia+fructosa).

En los grupos S y SF, ambos controles de la cirugía en estudio (esplacnicectomia), se realizó una incisión abdominal con manipulación de las vísceras, emulando el desplazamiento necesario para la localización de los nervios esplácnicos. Se comprobó que esta práctica no produjo modificaciones en los resultados per se.

Entre los grupos C y S, CF y SF y E y EF, no observamos diferencias entre sí en relación a los parámetros estudiados de SM, el análisis global del páncreas, y la evaluación de la PTOG ampliada, IR y función de célula $\beta$ , (TABLAS 17-22)

Del análisis de los grupos entre si, observamos:

◆ índice de peso (gr/día): aumentos no significativos en E y EF en relación a C y S; aumentos significativos en CF y SF en relación a C, S, E y EF.

De esta manera se comprobó que la cirugía en el grupo EF compensa el efecto de la fructosa.

◆ del estudio global del páncreas: la actividad de la amilasa aumento significativamente en CF en relación a C, S, E y EF.

Se pudo observar que a pesar de exponerse a un estímulo crónico con fructosa, la cirugía permite compensar su efecto indeseable.

◆ la concentración de insulina en ayunas: aumentó significativamente en CF y SF, en relación a C, S, E y EF. Así, aunque la concentración de glucosa en ayunas no varió significativamente entre los grupos, los aumentos en la insulina. Fueron significativos.

En E y EF los resultados obtenidos de las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas nos indicó una adecuada sensibilidad de los tejidos, y una tolerancia a la glucosa normal. Esta situación bioquímica nos demostró que la interrupción nerviosa revierte la IR.

◆ las concentraciones de glucosa e insulina a los 30 y 60 minutos: aumentaron significativamente en CF y SF en relación C, S, E y EF.

◆ en la representación grafica de la PTOG ampliada las curvas de glucosa e insulina (FIGURAS 14 y 15) de E, EF, S y C, se mostraron superpuestas, y las de CF y SF desplazadas significativamente en forma positiva.

Se evidenció que la esplacnicectomía, elimina el freno simpático y favorece, a nivel hepático, que se incremente el tono parasimpático y se libere el factor HISS (Hepatic Insulin Sensitizing Substance), que actúa junto a la insulina y favorece la captación de glucosa desde el músculo esquelético, disminuyendo la glucemia. [Lautt WW, 2011; Wang HH, 2015]

◆ en relación a los índices propuestos de evaluación de IR y función de la célula $\beta$ , se observó en CF y SF en relación a C, S, E y EF.

-el aumento significativo del HOMA-IR, y la disminución significativa de Glu/Ins, lo cual nos permitió comprobar la presencia de IR en los grupos en los que se generó el SM, y no se les practicó la esplennectomía.

-la disminución significativa del IGI<sub>30</sub> y el aumento significativo del IGI<sub>AUC</sub>, nos indicó una célula  $\beta$  con funcionalidad adecuada, activamente secretora.

-la disminución significativa del ISI, demostró una adecuada sensibilidad periférica, e indicó que la esplennectomía compensa los efectos de la fructosa, confirmando que favorece la liberación del factor HISS, de manera sinérgica con la insulina facilita la captación periférica de la glucosa.

- el aumento significativo del AUC<sub>glucosa</sub> y del AUC<sub>insulina</sub> mostró que frente a mayores concentraciones de glucosa, los animales con SM, respondieron incrementando la concentración de insulina, que debido a la IR no metaboliza la glucosa.

El HOMA-IR y el ISI de los animales EF no presentaron diferencia respecto de los grupos C y S lo cual indica que no desarrollaron IR en ayunas ni post ingesta.

Se realizó el estudio anatomopatológico, se evaluó la presencia de: inflamación (infiltración leucocitaria), grasa (tejido adiposo), fibrosis (infiltración de tejido conectivo), y edema (dilatación de los conductos y vasos sanguíneos). Estas características anatomopatológicas se hallaron incrementadas en CF y SF. FIGURAS 18 y 20

En S, E y EF, se observó una leve infiltración leucocitaria, como respuesta del organismo a las cirugías efectuadas. (B-5.2.2. c1) FIGURAS 19, 21 y 22

Para demostrar el aumento del tono parasimpático (colinérgico) producido por la esplennectomía se realizaron estudios inmunohistoquímicos, tendientes a demostrar un aumento de la enzima Colina Acetiltransferasa (ChAT-EC 2.3.1.6) en cortes de tejido pancreático y hepático.

En E y EF, FIGURAS 27 y 28, se observó mayor presencia de marca inmunohistoquímica, correspondiente a una mayor actividad de la ChAT, lo que nos indicó el aumento del tono colinérgico, relacionado a la interrupción simpática, dada por la esplennectomía. Se observó mayor presencia de ChAT en EF, relacionado a la presencia del estímulo de la fructosa.

Así quedó demostrado que la esplennectomía contrarrestó los efectos que debería haber generado la fructosa.

La denervación simpática desencadenó la pérdida de un freno simpático, del reflejo vago-vagal, que da lugar a descargas parasimpáticas incrementadas por parte de los núcleos vagales y, consecuentemente, el incremento del tono colinérgico intrahepático.

Se postula que la esplenicectomía equilibraría la hiperactividad simpática presente en el SM y permitiría un aumento del tono colinérgico intrapancreático e intrahepático. De acuerdo a los hallazgos de Lutt y col, luego de una ingesta, la insulina que secreta el páncreas, estimularía la liberación hepática de una potencial hormona denominada HISS. Para que la insulina pueda desencadenar dicha liberación es necesaria la acción permisiva parasimpática post prandial inmediata. El HISS liberado a circulación estimularía al músculo esquelético para que capte la glucosa y la almacene como glucógeno. Si la función parasimpática está alterada, el HISS no se libera y disminuye la capacidad del músculo de captar la glucosa y como consecuencia hay hiperinsulinemia, hiperglucemia y depósito de grasas.



## 7 – CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye:

- En pacientes con SM es necesario efectuar la PTOG ampliada (determinación de glucosa e insulina basal, 30, 60 y 120 minutos), para evaluar correctamente su estado metabólico ante la ingesta.
- A través del cálculo de índices clasificar la IR y evaluar el grado de funcionalidad de la célula  $\beta$ , que permitirán al médico tratante instaurar las medidas preventivas para evitar que el paciente desarrolle DBT2.
- La forma que adoptan las curvas obtenidas de glucosa e insulina y el tiempo en que alcanzan el pico máximo, aportan información importante para la evaluación metabólica del paciente. Son factibles en el laboratorio bioquímico no especializado, tienen utilidad en el seguimiento del tratamiento.
- La determinación de glucosa a los 60 minutos es fundamental para el diagnóstico de diabetes tipo 2. Se observan valores mayores de 200 mg/dl que luego descienden, por lo cual serían mal diagnosticados como SM.
- La insuficiencia exocrina observada en los pacientes con SM, es debida a la alteración funcional de la célula  $\beta$ , componente endocrino del páncreas, la cual afecta la interrelación del eje endocrino-exocrino.
- La prueba del PLs es una herramienta útil para evaluar en pacientes con SM la función del páncreas exocrino, en conjunto con la PTOG ampliada (Pancreatograma), dan una visión global del estado de la glándula pancreática. Cumpliendo el objetivo de aportar desde el laboratorio, herramientas que permitan al médico tratante, arribar al diagnóstico certero y determinar el tratamiento o estrategia a seguir.
- El modelo experimental de SM en ratas a través de fructosa fue exitoso. Se generó IR, los parámetros bioquímicos e histología mostraron una clara alteración del eje endocrino-exocrino.

- La denervación simpática (esplancnicectomía) moduló la IR, conservó la concentración de insulina del grupo expuesto a la fructosa en forma similar al grupo control, facilitó un hipertono colinérgico hepático que incrementó la liberación del factor HISS y favoreció la sensibilidad tisular a la insulina.
- La cirugía efectuada en los humanos, podría ser una herramienta terapéutica útil, alternativa a la cirugía bariátrica, en pacientes obesos con SM.

## 8-BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Ghani MA, Jenkinson CP, Richardson DK, Tripathy D, DeFronzo RA Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study. *Diabetes* 2006;55:1430–1435.
- Abdul-Ghani MA, Williams K, DeFronzo R, Stern M. Risk of progression to type 2 diabetes based on relationship between postload plasma glucose and fasting plasma glucose. *Diabetes Care*. 2006; 29(7):1613-8.
- Abdul-Ghani MA, Williams K, DeFronzo RA, Stern M: What is the best predictor of future type 2 diabetes? *Diabetes Care* 2007; 30:1544–1548.
- Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diab.Care* 2007 30 89–94.
- Abdul-Ghani MA, Abdul-Ghani T, Ali N, DeFronzo RA. One-hour plasma glucose concentration and the metabolic syndrome identify subjects at high risk for future type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31:1650–1655.
- Abdul-Ghani MA, Lyssenko V, Tuomi T, DeFronzo RA, Groop L. Fasting versus post load plasma glucose concentration and the risk for future type 2 diabetes: results from the Botnia Study. *Diabetes Care* 2009; 32:281–286.
- Abdul-Ghani MA, Stern MP, Lyssenko V, Tuomi T, Groop L, DeFronzo RA. Minimal contribution of fasting hyperglycemia to the incidence of type 2 diabetes in subjects with normal 2-h plasma glucose. *Diabetes Care* 2010; 33:557–561.
- Abell L L, Levy B B, Brodie B B & Kendall F E, 1952. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* 195:357-366.
- Abou-Seif, M.; Youssef, A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin.Chim.Acta*, 2004; 346:161-170
- Accili D. Lilly lecture 2003: the struggle for mastery in insulin action: from triumvirate to republic. *Diabetes* 53: 1633–1642, 2004.
- ADA- American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diab Care* 1997; 20:1183–97.
- ADA-American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2010. *Diabetes Care* 2010; 33(Suppl 1): S11–61.
- ADA- American Diabetes Association et al Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*. 2014; 37 (Suppl 1): S14-S80
- Afonso RA, Lutt WW, Ribeiro RT, Legare DJ, Macedo MP. Insulin resistance in two animal models of obesity: A comparison of HISS-dependent and HISS-independent insulin action in high-fat diet-fed and Zucker rats. *Proc West Pharmacol Soc.* 2007; 50:110-114.
- Afonso RA, Lutt WW, Schafer J, Legare DJ, Oliveira AG, Macedo MP. High-fat diet results in postprandial insulin resistance that involves parasympathetic dysfunction. *Br J Nutr.* 2010; 104(10):1450-1459.
- Ahren, B. Review: Autonomic regulation of islet hormone secretion-Implications for health and disease. *Diabetologia* 2000; 43: 393–410
- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, the IDF Epidemiology Task Force Consensus Group: The metabolic syndrome: a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366:1059–1062.

- Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009; 20; 120(16):1640-1645
- Anglade P, Michel C, Rozé C. Intrinsic nerves of the pancreas after celiac and superior mesenteric ganglionectomy in rats: a morphologic study of acetylcholinesterase activity and catecholamine histofluorescence. *Pancreas*. 1987; 2(5):568-77.
- Antuna-Puente B, Disse E, Rabasa-Lhoret R, Laville M, Capeau J, Bastard JP. How can we measure insulin sensitivity / resistance? Review. *Diabetes Metab*. 2011; 37(3):179-188.
- Assman, G., Schriewer, H., Schmitz, G., Hagele, E.O. Quantification of high density lipoprotein cholesterol by precipitation with phospho-tungstic acid/MgCl<sub>2</sub>. *Clinical Chemistry*, 1983; 29, 2026-2030.
- ATP III; 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; 285: 2486-2497.
- Bantle JP, Swanson JE, Thomas W, Laine DC. Metabolic effects of dietary fructose in diabetic subjects. *Diabetes Care*. 1992; 15:1468–1476
- Bantle JP. Dietary Fructose, Metabolic Syndrome and Diabetes. *J.Nutr.* 2009. 139:1263S-1268S
- Bartoli E, Fra GP, Carnevale Schianca GP. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur J Intern Med*. 2011; 22(1):8-12
- Bastarrachea, R; López-Alvarenga, JC; Bolado-García, VE; Téllez-Mendoza, J; Laviada-Molina, H.; Comuzzie A. Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gac Méd Méx* 2007; 143 (6): 505-512
- Buijs RM, Kalsbeek A: Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat Rev Neurosci* 2:521–526, 2001
- Burt AM. A histochemical procedure for the localization of choline acetyltransferase activity. *J Histochem Cytochem*. 1970; 18(6):408-415
- Burton L; Lazo J; Parker K. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 11 edición, Publicado por Goodman y Gilman, ISBN 970-10-5739 -2006; 1613-1646.
- Calegari V, Torsoni A, Vanzela E, Araújo E, Morari J, Zoppi C, Sbragia L, Boschero A, Velloso L. Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. *J Biol Chem*. 2011; 286(15):12870-12880.
- Carnevale Schianca GP, Rossi A, Sainaghi PP, Maduli E, Bartoli E. The significance of impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance. Importance of insulin secretion and resistance. *Diab Care* 2003; 26:1333–1337
- Carnevale Schianca GP, Colli E, Onolfo S, Pedrazzoli R, Fra GP, Bartoli E. Individuation of different metabolic phenotypes in normal glucose tolerance test. *Acta Diabetol* 2010; 47(2):167–172

- Carnethon MR, Jacobs DR Jr, Sidney S, Liu K Influence of autonomic nervous system dysfunction on the development of type 2 diabetes: the CARDIA study. *Diabetes Care*, 2003; 26(11):3035-41
- Ceyhan GO, Demir IE, Rauch U, Bergmann F, Müller MW, Büchler MW, Friess H, Schäfer KH. Pancreatic neuropathy results in "neural remodeling" and altered pancreatic innervation in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104(10):2555-65.
- Catena C., Giacchetti G, Novello M, Colussi G, Cavarape A, Sechi L. Cellular mechanisms of insulin resistance rats with Fructose-Induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2003;16: 973-978
- Chakraborty PP, Chowdhury S A Look Inside the Pancreas: The "Endocrine-Exocrine Cross-talk". *Endocrinol Metab Synd* 2015; 4: 160. 1-4
- Chariot J., de la Tour J, Anglade P. and Roze C. Cholinergic mechanisms in the pancreas after extrinsic denervation rat *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1987;252:(6):G755-G761
- Chey WY, Chang T. Neural hormonal regulation of exocrine pancreatic secretion. *Pancreatol*. 2001; 1(4):320-35.
- Chowdhury KK, Legare DJ, Lutt WW. Lifestyle impact on meal-induced insulin sensitization in health and prediabetes: a focus on diet, antioxidants, and exercise interventions. Review.. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91(2):91-100.
- Dalla Man C, Campioni M, Polonsky KS, Basu R, Rizza RA, Toffolo G, Cobelli C. Two-hour seven-sample oral glucose tolerance test and meal protocol: minimal model assessment of beta-cell responsiveness and insulin sensitivity in nondiabetic. *Diabetes* 54:3265–3273, 2005.
- D'Angelo G, Mintz J, Tidwell JE., Schreihöfer AM. Exaggerated Cardiovascular Stress Responses and Impaired-Adrenergic-Mediated Pressor Recovery in Obese Zucker Rats. *Hypertension*; 2006; 48:1109-1115.
- Daly M. 2003. Sugars, insulin sensitivity, and the postprandial state. *Am J Clin Nutr*; 78 (suppl): 865S-72S.
- Davis S.N. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* Editor Louis Stanford Goodman, Alfred G. Gilman, 2006, ISBN 970-10-5739-2, Cap 60; 1613-1646
- Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013
- Definición mundial de consenso para el síndrome metabólico, *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 18(6), 451-454), 2005
- DeSouza C, Araujo E, Bordin S, Ashimine R, Zollner R, Boschero A, Saad M, Velloso L. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005; 146(10):4192-4199.
- Di Carlo, MB, Hamamura, S., López Mingorance, FN, Otero G, Maselli MC, Tiscornia OM, Negri, GA. Evaluación Bioquímica de la Función Pancreática: Pruebas del Pancreolauryl y de la Tolerancia a la Glucosa Oral. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2010; 40:128-133
- Dixon, J. B., O'Brien, P. E., et al. Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Jama*, 2008; 299(3), 316–323.
- Domínguez-Muñoz JE, Pieramico O, Büchler M, Malfertheiner P. Clinical utility of the serum pancreolauryl test in diagnosis and staging of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1993; 88 (8): 1237-41.
- Domínguez-Muñoz J, Viedma J, Perez Mateo M, et al. La respuesta inflamatoria de la fase inicial de la pancreatitis aguda: relación con el comienzo y la gravedad de la enfermedad. *Rev Esp Enf Digest* 1995; 87: 236-246.

- Domínguez-Muñoz JE, Malfertheiner P. Optimized serum pancreolauryl test for differentiating patients with and without chronic pancreatitis. *Clin Chem* 1998; 44(4):869-875.
- Edvell A, Lindström P. Vagotomy in young obese hyperglycemic mice: effects on syndrome development and islet proliferation. *Am J Physiol* 1998; 274:E1034-E1039
- Elliott S, Kein N, Stern J, Teff K, Havel P. 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *AM J Clin Nutr.* 2002; 76:911-22
- Esler M, Rumantir M, Wiesner G, Kaye D, Hastings J, Lambert G. Sympathetic nervous system and insulin resistance: from obesity to diabetes. *Am J Hypertens.* 2001; 14(11 Pt 2):304S-309S.
- Esquivel, S. & Gómez, S. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarricense*, 2007; 49(4), 198-202
- Fajans SS, Conn JW. Prediabetes, subclinical diabetes, and latent clinical diabetes: interpretation, diagnosis and treatment. In: Leibel BS, Wrenshall GA, editors. *On the nature and treatment of diabetes.* 1965; 641–656.
- Fernández-Veledo S, Nieto-Vazquez I, de Castro J, Ramos MP, Brüderlein S, Möller P, Lorenzo M. Hyperinsulinemia induces insulin resistance on glucose and lipid metabolism in a human adipocytic cell line: paracrine interaction with myocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 93(7):2866-2876.
- Ferrandini,F; Gastaldelli,A; Miyazaki, Y; Matsuda, M; Pettiti, M; Natali, A; Mari,A; DeFronzo,RA. Predominant role of reduced beta-cell sensitivity to glucose over insulin resistance in impaired glucose tolerance. *Diab.* 2003; 46:1211-1219
- Finlay JWA, Dillard RF. Appropriate Calibration Curve Fitting in Ligand Binding Assays *AAPS Journal.* 2007; 9(2): E260-E267.
- Flaa, A., Aksnes, T. A., et al. Increased sympathetic reactivity may predict insulin resistance: an 18-year follow-up study. *Metabolism*,2008; 57(10), 1422–1427.
- Froy O. The relationship between nutrition and circadian rhythms in mammals. *Front Neuroendocrinol.* 2007; 28(2-3):61-71.
- Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982; 28 (10):2077-2080.
- García H; Iodice O; García W; Otero G.; Uchiumi L; Affani J; Tiscornia O; Eufemio G; Sutura S; Sapin F; Cap P; Llaya Candiotti J; Maschietto A. Pancreatitis Experimental en el Opossum. Rol de la esplanicectomía previa en la respuesta inflamatoria. *Acta Gastro Enterol. Latino Amer.* 2002; 32(2):71-77.
- García del Moral et al Laboratorio de Anatomía Patológica, Editado por: Rodriguez Martinez, quesada Vazquez; O´Valle Ravassa y Gracia del Moral Garrido Editorial: McGraw-Hill – Interamericana de España, 1993; pag 321-368
- Garmendia ML, Lera L, Sánchez H, Uauy R, Albala C. Homeostasis model assessment (HOMA) values in Chilean elderly subjects. *Rev Med Chil.* 2009;137(11):1409-16
- Gastadelli A, Ferrannini E, Miyazaki Y, Matsuda M, Defronzo RA. Beta-cell dysfunction and glucose intolerance: results from the San Antonio Metabolism (SAM) study. *Diabetologia* 2004; 47:31–39
- Gerber M, Naujoks K, Lenz H, Wulff K. A monoclonal antibody that specifically inhibits human salivary alfa-amylase. *Clin Chern* 1987; 33: 1158-62.
- Gingras D., Bendayan M. Differences in secretory granule content in pancreatic acinar cells from peri-insular and tele-insular regions. *Páncreas*, 1992; 7:477-485

- Goncharuk VD, van Heerikhuize J, Dai JP, Swaab DF, Buijs RM: Neuropeptide changes in the suprachiasmatic nucleus in primary hypertension indicate functional impairment of the biological clock. *J Comp Neurol*, 2001; 431:320–330.
- Gramática L (h), Sancrez M, Ternengo D, Moreno W, Bepre E, Granero H, Garelli A y Gramática L. Esplancnicectomía química operatoria. Manejo del dolor en el cáncer de páncreas. *Rev Argent Cirug* 2007; 93(1-2): 33-38.
- Grant RW, Kirkman MS. Trends in the evidence level for the American Diabetes Association's "Standards of Medical Care in Diabetes" from 2005 to 2014. *Diabetes Care*. 2015;38(1):6-8
- Grassi, G., Dell'Oro, R., et al. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens*, 2004;22(12),2363–9.
- Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2595–2600
- Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F: Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation* 112:2735–2752, 2005
- Guilding C, Piggins HD. Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *Eur J Neurosci*. 2007; 25(11):3195-216.
- Guy E. Alvarez, MS; Stacy D. Beske, PhD; Tasha P. Ballard, MS; Kevin P. Davy, PhD. Sympathetic Neural Activation in Visceral Obesity. *Circulation* 2002; 106:2533-2536
- Hall J. E., da Silva A. A., do Carmo J. M., Dubinion J., Hamza S., Munusamy S., Smith G., and Stec D. E. Obesity-induced Hypertension: Role of Sympathetic Nervous System, Leptin, and Melanocortins. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(23):17271–17276
- Hardt PD, Hauenschield A, Nalop J. “High prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus. A multicenter study screening fecal elastase 1 concentrations in 1,021 diabetic patients,” *Pancreatology*. 2003; 3 (5): 395–402,
- Hardt PD, Ewald N. Exocrine Pancreatic Insufficiency in Diabetes Mellitus: A Complication of Diabetic Neuropathy or a Different Type of Diabetes? *Experimental Diabetes Research*. 2011; 2011:761950. 1-7
- Hayden, MR, Patel, K, Habibi, J, Gupta, D, Tekwani, S, Whaley-Connell, A, Sowers, J. Attenuation of Endocrine-Exocrine Pancreatic Communication in Type 2 Diabetes: Pancreatic Extracellular Matrix Ultrastructural Abnormalities. *Journal of the CardioMetabolic Syndrome*. 2008; 3: 234–243
- Havel P. Dietary fructose: Implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutrition Review*. 2005; 63: 133-157
- Hayashi T, Boyko EJ, Sato KK, McNeely MJ, Leonetti DL, Kahn SE, et al. Patterns of insulin concentration during the OGTT predict the risk of type 2 diabetes in Japanese Americans. *Diabetes Care* 2013; 36:1229–1235.
- Hayden MR, Patel K, Habibi J, et al. Attenuation of Endocrine-Exocrine Pancreatic Communication in Type 2 Diabetes: Pancreatic Extracellular Matrix Ultrastructural Abnormalities. *Journal of the cardiometabolic syndrome*. 2008;3(4):234-243.
- Henderson I.R. Daniel P.M. Fraser PA. The pancreas as a single organ: the influence of the endocrine upon the exocrine part of the gland. *Gut.*; 22:158-167, 1981

- Herman WH. Diabetes epidemiology: guiding clinical and public health practice. The Kelly West Award Lecture, 2006. *Diab Care* 2007; 30:1912–9.
- Junge W, Werner W, Wilke B et al. Development and evaluation of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37 °C according to the principle recommended by the IFCC. *Clin Biochem* 2001;34:607-615
- Kahn B B, Flier J S. Obesity and insulin resistance *J Clin Invest.* 2000; 106(4): 473-481
- Kanauchi M, Kimura K, Kanauchi K & Saito Y. Beta-cell function and insulin sensitivity contribute to the shape of plasma glucose curve during an oral glucose tolerance test in non-diabetic individuals. *Int J of Clin Prac* 2005; 59:427–432.
- Kaur JA. Comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract.* 2014; 62:1-21.
- Kim JY, Goran MI, Toledo-Corral CM, Weigensberg MJ, Choi M, Shaibi GQ. One-hour glucose during an oral glucose challenge prospectively predicts beta-cell deterioration and prediabetes in obese Hispanic youth. *Diabetes Care* 2013; 36:1681–1686.
- Kim YA, Ku EJ, Khang AR, Hong ES, Kim KM, Moon JH, Choi SH, Park KS, Jang HC, Lim S. Role of various indices derived from an oral glucose tolerance test in the prediction of conversion from prediabetes to type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 106(2):351-359.
- Kirchgessner A, Gershon M, Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J. Neurosci.* 1990; 10: 1626-1642.
- Kramer CK, Vuksan V, Choi H, Zinman B, Retnakaran R. Emerging parameters of the insulin and glucose response on the oral glucose tolerance test: reproducibility and implications for glucose homeostasis in individuals with and without diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014; 105(1):88-95. doi: 10.1016
- Kreier F, Fliers E, Voshol PJ, Van Eden CG, Havekes LM, Kalsbeek A, Van Heijningen CL, Sluiter AA, Mettenleiter TC, Romijn JA, Sauerwein HP, Buijs RM: Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat: functional implications. *J Clin Invest* 2002; 110:1243–1250.
- Kreier F, Yilmaz A, Kalsbeek A, Romijn JA, Sauerwein HP, Fliers E, Buijs RM. Hypothesis: Shifting The Equilibrium From Activity To Food Leads To Autonomic Unbalance And The Metabolic Syndrome. *Diabetes.* 2003; 52(11):2652-6.
- Kuo, L. E., Abe, K., et al. Stress, NPY and vascular remodeling: implications for stress-related diseases. *Peptides*,2007; 28(2), 435–440.
- Kylin E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyka «mie-Hyperurika» miesyndrom. *Zentralblatt fuer Innere Medizin.* 1923;44:105-27.
- La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. A daily rhythm in glucose tolerance. *Diabetes.* 2001;50:1237-43.
- Lambert, E., Straznicky, N., et al. Differing pattern of sympathoexcitation in normal-weight and obesity-related hypertension. *Hypertension*, 2007; 50(5), 862–868
- Lambert GW, Straznicky NE, Lambert EA, Dixon JB, Schlaich MP Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome--causes, consequences and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 2010 May;126(2):159-72.
- Lankisch PG, Schreiber A, Otto J. Pancreolauryl Test. Evaluation of a tubeless pancreatic function test in comparison with other indirect and direct test for exocrine pancreatic function. *Dig Dis Sci* 1983; 28(6): 490-3.
- Laposky AD, Bass J, Kohsaka A, Turek FW. Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett* 2008; 9:582(1):142-151



- Lara-Castro, C., Garvey W. Diet, Insulin Resistance, and Obesity: Zoning in on Datafor Atkins Dieters Living in South Beach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89(9):4197–4205
- Lutt WW. The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.* 1999; 77(8): 553-562.
- Lutt, W. A new paradigm for Diabetes and Obesity: The hepatic Insulin sensitizing substance (HISS) Hypothesis. *J. Pharmacol Sci* ; 95: 9-17, 2004
- Lutt WW, Ming Z, Macedo MP, Legare DJ. HISS-dependent insulin resistance (HIR) in aged rats is associated with adiposity, progresses to syndrome X, and is attenuated by a unique antioxidant cocktail. *Exp Gerontol.* 2008;43(8):790-800.
- Lutt WW1, Ming Z, Legare DJ. Attenuation of age- and sucrose-induced insulin resistance and syndrome X by a synergistic antioxidant cocktail: the AMIS syndrome and HISS hypothesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010; 88(3):313-323.
- Lutt WW, Schafer J, Macedo MP, Legare DJ. Bethanechol and N-acetylcysteine mimic feeding signals and reverse insulin resistance in fasted and sucrose-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2011 ;89(2):135-142.
- Lee YB, Lee JH, Park ES, Kim GY, Leem CH. Personalized metabolic profile estimations using oral glucose tolerance tests. *Prog Biophys Mol Biol.* 2014; 116(1):25-32.
- Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998; 21: 2191–2192.
- Leybold A, Junge W, Importance of colipase for the measurement of serum lipase activity. *Adv Clin Enzymol* 1986; 4: 60-67.
- Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM, Lustig RH. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(5):251-64.
- Lindmark S, Wiklund U, Bjerle P, Eriksson JW. Does the autonomic nervous system play a role in the development of insulin resistance? A study on heart rate variability in firstdegree relatives of type 2 diabetes patients and control subjects. *Diabet Med.* 2003; 20:399–405.
- Lindmark S, Lönn L, Wiklund U, Tufvesson M, Olsson T, Eriksson JW. Dysregulation of the Autonomic Nervous System Can Be a Link between Visceral Adiposity and Insulin Resistance. *Obes Res.* 2005; 13(4):717-28
- López Mingorance F, Tiscornia O. M, Negri G, Di Carlo M B. Pancreolauryl sérico: prueba bioquímica no invasiva para evaluar función pancreática exocrina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; 2011; 45 (4): 721-725
- Lorentz K. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of calytic concentration of enzymes part 9. IFCC method for  $\alpha$ -amylase (1,4- $\alpha$ -D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1). *Clin Chem Lab Med* 1998;36:185-203.
- Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care.* 2007; 30(1):8-13.
- Lund J, Arendt J, Hampton SM, English J, Morgan LM. Postprandial hormone and metabolic responses amongst shift workers in Antarctica. *J Endocrinol.* 2001; 171:557-564.
- Macedo MP, Lima IS, Gaspar JM, Afonso RA, Patarrão RS, Kim YB, Ribeiro RT. Review Risk of postprandial insulin resistance: the liver/vagus rapport. *Rev Endocr Metab. Disord.* 2014;15(1):67-77.

- Malloy J, Gurney K, Shan K, Yan P, Chen S. Increased variability and abnormalities in pancreatic enzyme concentrations in otherwise asymptomatic subjects with type 2 diabetes. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2012; 5: 419-424.
- Masana Marín L, Rubiés Prat J. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas. En: Farreras Valentí P, Rozman C. *Medicina Interna*. 13ª Edición. Madrid, España: Harcourt Brace; 1998 vol (3): 1899-1932.
- Maser, R. E., Lenhard, M. J., et al. Impact of surgically induced weight loss on cardiovascular autonomic function: one-year follow-up. *Obesity (Silver Spring)*, 2007; 15(2), 364–369.
- Masuo, K., Kawaguchi, H., et al. Serum uric acid and plasma norepinephrine concentrations predict subsequent weight gain and pressure elevation. *Hypertension*, 2003; 42(4), 474–480.
- Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22:1462-1470
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28:412-419.
- Matthews JNS, Altman D, Campbell MJ, Royston P. Analysis of serial measurements in medical research. *BMJ* 1990; 300:230-235.
- Maximino Ruiz. *Diabetes Mellitus–3ra.Ed.-Ed Akadia -Cap.12:Lab en diabetes*; 206-217; 2006
- Mayer M A., Höcht A., Carranza A, Opezzo J., Peredo H, Taira C., Fernández B, Puyó, A.M. Participación del hipotálamo en la regulación de la presión arterial en un modelo de hipertensión e insulinoresistencia. *Rev Argent Cardiol* 2007;75:117-123
- Meier AH, Cincotta AH: Circadian rhythms regulate the expression of the thrifty genotype/phenotype. *Diabet Rev*, 1996; 4:464–487
- Mensah-Brown E.P.K, Pallot D.J. The potential roles of these peptidergic and aminergic neurotransmitters in the neurohormonal control of pancreatic secretion are discussed.. *J. Morphol.* 2000; 244:23–29.
- Ming Z, Legare DJ, Lutt WW. Obesity, syndrome X, and diabetes: the role of HISS-dependent insulin resistance altered by sucrose, an antioxidant cocktail, and age. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009; 87(10):873-82.
- Morin-Papunen LC, Vauhkonen I, Ruokonen A, Tapanainen JS, Raudaskoski T. Effects of tibolone and cyclic hormone replacement therapy on glucose metabolism in non-diabetic obese postmenopausal women: a randomized study. *Eur J Endocrinol.* 2004; 150(5):705-714.
- Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(1):E15-26.
- Musch TI, Friedman DB, Pitetti KH, Haidet GC, Stray-Gundersen J, Mitchell JH, Ordway GA: Regional distribution of blood flow of dogs during graded dynamic exercise. *J Appl Physiol* 63:2269–2277, 1987
- Neumann U, Junios M, Batz HG, et al. New substrates for the optical determination of Lipase, EP 207252 1987.
- NHI-National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011.
- Nicklas TA, Baranowski T, Cullen KW, Berenson G: Eating patterns, dietary quality and obesity. *J Am Coll Nutr*, 2001; 20:599–608

- Niebergall-Roth E, Singer MV. Central and peripheral neural control of pancreatic exocrine secretion. *J Physiol Pharmacol*, 2001; 52 (4 Pt 1):523-38.
- Nielsen S, Popkin B. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play the role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79:537-43
- Nieto-Vazquez I Fernández-Veledo S, García-Guerra, L, Vila-Bedmar, Lorenzo M. Revisión. Resistencia a insulina en el músculo esquelético: conexión con la obesidad. *An. R. Acad. Nac. Farm.*, 2008, 74 (4): 1-33
- Noel RA, Braun DK, Patterson RE, Bloomgren GL. Increased Risk of Acute Pancreatitis and Biliary Disease Observed in Patients With Type 2 Diabetes: A retrospective cohort study. *Diabetes Care*. 2009;32(5):834-838.
- Nolfi G, Spreghini Mr, Sforza Rw, Morino G, Manco M. Beyond The Morphology Of The Glucose Curve Following An Oral Glucose Tolerance Test In Obese Youth. *Eur J Endocrinol*. 2012; 166(1):107-114. Doi: 10.1530/Eje-11-0827.
- Oh TJ, Min SH, Ahn CH, Kim EK, Kwak SH, Jung HS, Park KS, Cho YM. Response: Normal Glucose Tolerance with a High 1-Hour Postload Plasma Glucose Level Exhibits Decreased  $\beta$ -Cell Function Similar to Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Metab J*.2015;39(3):270-271.
- Owyang C, Logsdon CD. New insights into neurohormonal regulation of pancreatic secretion. *Gastroenterology*. 2004 ;127(3):957-969.
- Patarrão RS, Lutt WW, Afonso RA, Ribeiro RT, Guarino MP, Fernandes AB, Boavida JM, Macedo MP. Meal-induced insulin sensitization and its parasympathetic regulation in humans. *Can J Physiol Pharmacol*. 2008;86(12):880-888
- Patarrão RS, Lutt WW, Afonso RA, Ribeiro RT, Fernandes AB, Boavida JM, Macedo MP. Postprandial but not fasting insulin resistance is an early identifier of dysmetabolism in overweight subjects. *Can J Physiol Pharmacol*. 2012 ;90(7):923-931.
- Phillips DI, Clark PM, Hales CN, Osmond C. Understanding oral glucose tolerance: comparison of glucose or insulin measurements during the oral glucose tolerance test with specific measurements of insulin resistance and insulin secretion. *Diabet Med*. 1994; 11(3):286-292
- Piciocchi M, Capurso G, Archibugi L, Delle Fave M, Capasso M, Delle Fave G, “Exocrine Pancreatic Insufficiency in Diabetic Patients: Prevalence, Mechanisms, and Treatment,” *Int. J Endo*, vol. 2015, Article ID 595649, 7 pages, 2015
- Pieler T., Chen Y. Forgotten and novel aspects in pancreas development, *Biology of the Cell*. 2006; 98 (2): 79–88.
- Puyó AM, Borroni JS, Boudou S, Santander Y, Carranza A, Donoso AS, Peredo HA. Metformin reduces vascular production of vasoconstrictor prostanoids in fructose overloaded rats. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2012 Apr; 32(1 Pt 2):9-14.
- Ramchandra, R., Hood, S. G., et al. Basis for the preferential activation of cardiac sympathetic nerve activity in heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009; 106(3), 924–928.
- Reaven G. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 37:1595-607.
- Reaven G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33:283–303.
- Retnakaran R, Qi Y, Connelly PW, Sermer M, Hanley AJ, Zinman B. Risk of early progression to prediabetes or diabetes in women with recent gestational dysglycaemia but normal glucose tolerance at 3-month postpartum. *Clin Endocrinol* 2010; 73:476–83.

- Ribeiro RT, Lutt WW, Legare DJ, Macedo MP. Insulin resistance induced by sucrose feeding in rats is due to an impairment of the hepatic parasympathetic nerves. *Diabetologia*. 2005;48(5):976-83
- Rickels MR, Bellin M, Toledo FG, Robertson RP, Andersen DK, Chari ST, Brand R, Frulloni L, Anderson MA, Whitcomb DC Detection, evaluation and treatment of diabetes mellitus in chronic pancreatitis: recommendations from PancreasFest 2012. *Pancreatology*. 2013 Jul-Aug;13(4):336-42
- Rosa F, Romero-Vecchione E, Vasquez J, Antequera R, Strauss M. Cardiovascular responses to hypertonic NaCl injection into the anteroventral third ventricle region in rats with fructose-induced hypertension and insulin resistance. *Rev Esp Cardiol*. 2007; 60(9):952-958
- Sanz de Villalobos E; Carballo Alvarez F. Pruebas de función pancreática exocrina. *Rev Gastroenterol* 2000; 4: 167-176.
- Schafer J, Legare DJ, Lutt WW. Acetylcholinesterase antagonist potentiated insulin action in fed but not fasted state. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(2):621-628.
- Seltzer HS, Allen EW, Herron AL Jr, Brennan MT. Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1967; 46(3):323-35
- Singer MV, Niebergall-Roth E. Secretion from acinar cells of the exocrine pancreas: role of enteropancreatic reflexes and cholecystokinin. *Cell Biol Int*. 2009; 33(1):1-9.
- Sluiter WJ, Erkelens DW, Terpstra P, Reitsma WD & Doorenbos H. Glucose tolerance and insulin release, a mathematical approach. II. Approximation of the peripheral insulin resistance after oral glucose loading. *Diabetes* 1976; 25: 245–249.
- Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes Res*. 2004;12:180–186
- Stephen F. Currier and Henry G. Mautner. On the Mechanism of Action of Choline Acetyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; 71(9): 3355–3358.
- Sternberger L A, Hardy P H, Jr., Cuculis J J & Meyer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1970;18:315-333
- Straznicky, N. E., Lambert, E. A., et al. Effects of dietary weight loss on sympathetic activity and cardiac risk factors associated with the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90(11), 5998–6005
- Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Järvinen H, Van Haeften T, Renn W, Gerich J. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23(3):295-301.
- Stumvoll M, Fritsche A, Haring H. The OGTT as test for beta cell function? *Eur J Clin Invest* 2001;31:380–381
- Taheri S, Lin L, Austin D, Young T, Mignot E. Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med*. 2004; 1:e62.
- Takayama S, Sakura H, Katsumori K, Wasada T, Iwamoto Y. A possible involvement of parasympathetic neuropathy on insulin resistance in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 968-969
- Tank, J., Heusser, K., et al. Influences of gender on the interaction between sympathetic nerve traffic and central adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* ,2008; 93(12), 4974–4978.

- Tentolouris N, Argyrakopoulou G, Katsilambros N. Perturbed autonomic nervous system function in metabolic syndrome. *Neuromolecular Med.* 2008; 10(3):169-78. doi: 10.1007.
- Tietz N, Burlina A, Gerhardt W, Junge W, Malfertheiner P., Murai T y cols. Multicenter evaluation of a specific pancreatic isoamylase assay on a double monoclonal antibody technique. *Clin Chem* 1988; 34: 20%-102.
- Tietz NW ed. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed Philadelphia PA: WB Saunders Company 1995;865
- Tiscornia, O.M. Concepto de "Pancreón" - En "Gastroenterología" - Editado por: V. Pérez, L de Larrechea., Arabehehy and O M Tiscornia - Editorial El Ateneo. Bs.As. 1971: 470-484
- Tiscornia O, Dreiling D, Yacomotti J, Kurtzbart R, DelaTorre A, Farache S. Neural control of the exocrine pancreas: An analysis cholinergic, adrenergic and Peptidergic pathways and their positive and negative component. Part1-Neural Mechanisms.Mt. Sinai J Med.1987;54:366-383.
- Tiscornia O, Dreiling D, Yacomotti J, Kurtzbart R, DelaTorre A, Farache S. Neural control of the exocrine pancreas: An analysis of the cholinergic, adrenergic and peptidergic pathways and their positive and negative components. Part 2-Neuro-Endocrine Integration. Mt. Sinai J. of Med. 1988; 55:126-31.
- Tiscornia, O.; Farache, S.; Yacomotti, J.; Cresta, M.; Vaccaro, M.; Negri, G.; Celener, D.; Hamamura, S., Bustos Fernández, L. Inervación macroscópica duodeno-pancreática en la rata. Clave de los cambios secretorios del "pancreón" inducidos por la solarectomía, vaguectomía y doble duodenotomía peri-Vateriana. *Acta Gastro Enterol. Latino Amer.*, 1990; 20(4):236.
- Tiscornia, O.; Hamamura, S.; Lehmann, E.; González, E.; Vaccaro, M.; Otero, G.; Cerini, C., Waisman, H. Una visión de la inervación gastro-entero-bilio-pancreática. El concepto de "Pista Plexual Entérica". *Pren. Méd. Argent.*, 1998; 85:493-503.
- Tiscornia, O. M.; García, H.; Hamamura, S.; Lehmann, E.S. de.; González, E.; Vaccaro, M. I.; Cerini, C. & Waisman, H. Pancreatitis aguda biliar: Rol pivote del sistema nervioso autónomo y de la disrupción del "feedback" entero-pancreático. (Influencia del alcoholismo. Simil experimental con el método de Pfeffer. Valor preventivo y terapéutico de los anestésicos locales). *Pren. Méd. Argent.*, 1998; 85:494-503.
- Tiscornia, O.; Lehmann, E.; Hamamura, S.; Negri, G.; Otero, G.; Waisman, H. Sistema nervioso autónomo y páncreas. (Análisis de la influencia de diversos tipos de denervación autonómica en los fenómenos de regeneración glandular y en las interacciones del eje endocrino-exocrino). *Acta Gastroenterol. Latino Amer.*, 2000; 30 (4):253-65.
- Tiscornia, O M; Otero ,G; Lehmann, E; Hamamura, S; Negri, G A Di Carlo, M B; López Mingorance, F; Lucentini, A; Waissman, H;Gomez Fuentealba, V; Bank, S; Tiscornia-Wasserman, P. "Lipasa: Una enzima singular por sus interacciones neuro-hormonales. (revisión y análisis experimental y clínico)" *Prensa Med Argent*, 2006, 93:119-135
- Tiscornia, OM; Hamamura, S; Azzato, F; Otero, G; Lopez-Mingorance, F; Waissman,H; Maselli, MC; DiCarlo, MB; Negri,G; Diabetes: Aspectos Insospechados de la Funcionalidad Pancreática (Análisis de 21 Casos de Diabetes Tipo 1 y Revisión de la Literatura). *Prensa Med Argent*, 2007; 94:180-189
- Tiscornia,OM; Negri,GA; Hamamura,S; DiCarlo,MB; López-Mingorance,F; Otero,G; GomezFuentealba,V; Waissman,H;Tiscornia-Wasserman,P; Bank,S. Fisiopatogenia de la Pancreatitis Alcohólica, Aguda y Crónica. Valor Terapéutico de las Enzimas Pancreáticas. *Prensa Med Argent*, 2007; 94:238-249.
- Tiscornia OM , Yacomotti J, Losardo R.J. Investigación y revisión conceptual de la inervación gastro-duodeno-pancreática en la rata. *Rev Chil Anat* 2002;20: 37-48.

- Tiscornia OM, Hamamura S, Otero G, López Mingorance F, Negri G. Pancreatitis y Pancreatopatía Crónica. Evaluación Fisiopatogénica, Clínica y Funcional (Basada en 1300 casos de tres décadas en el Hospital Clínicas de Bs.As.) Prensa Med Argent; 2011; 98: 140-164
- Tiscornia OM, Hamamura S, Otero G, López Mingorance F, Negri G Fisiopatogenia de la Pancreatitis Alcohólica, Aguda y Crónica (Valor terapéutico de las enzimas pancreáticas). Prensa Med Argent; 2011; 98: 119-130
- Tiscornia OM; Rodriguez RR; Sussemil C; Otero G; Negri GA ;Waisman H ; López Mingorance FN.,Tiscornia Wasserman P. Streptozotocin – Induced Diabetes, Bile-Pancreatic Secretion and Insulo-Pancreon-Axis Interaction ActaGastroenterol Latinoam 2013;43:294-300
- Tran TT, Gupta N, Goh T, Naigamwalla D, Chia MC, Koohestani N, Mehrotra S, McKeown-Eyssen G, Giacca A, Bruce WR. Direct measure of insulin sensitivity with the hyperinsulinemic-euglycemic clamp and surrogate measures of insulin sensitivity with the oral glucose tolerance test: correlations with aberrant crypt foci promotion in rats. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003 Jan;12(1):47-56.
- Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem 1969;6:24-27.
- Tschritter O, Fritsche A, Shirkavand F, Machicao F, Häring H, Stumvoll M. Assessing the shape of the glucose curve during an oral glucose tolerance test. Diabetes Care 2003; 26(4):1026-1033. Erratum in: Diabetes Care. 2004 Jul; 27(7):1855
- Tura A, Kautzky-Willer A, Pacini G. Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: Comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT. Diabetes Res Clin Pract. 2006; 72(3):298-301.
- Utzschneider KM, Prigeon RL, Faulenbach MV, Tong J, Carr DB, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Fujimoto WY, Kahn SE. Oral disposition index predicts the development of future diabetes above and beyond fasting and 2-h glucose levels. Diabetes Care. 2009; 32(2):335-341. doi: 10.2337
- Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti K Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycemia the current status on definition and intervention. Diabet Med 2002; 19:708 –723,
- Vague J. Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity. 1947. Obes Res. 1996; 4(2):201-3.
- Vanni E, Bugianesi E, Kotronen A, De Minicis S, Yki-Järvinen H, Svegliati-Baroni G Review. From the metabolic syndrome to NAFLD or vice versa? Dig Liver Dis.; 42(5):320-30. 2010
- Vicennati, V., Pasqui, F., et al. Stress-related development of obesity and cortisol in women. Obesity (Silver Spring), 2009; 17(9), 1678–1683.
- Wang HH, Chowdhury KK, Lutt WW. A synergistic, balanced antioxidant cocktail, protects aging rats from insulin resistance and absence of meal-induced insulin sensitization (AMIS) syndrome. Molecules. 2015; 20(1):669-682.
- Weyer, C., Pratley, R. E., et al. Ethnic differences in insulinemia and sympathetic tone as links between obesity and blood pressure. Hypertension, 2000; 36 (4), 531–537.
- WHO-World Health Organization: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consul. Geneva, World Health Org., 1999
- Wild S, Roglic G, Geen A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care 2007; 27:1047–1053.
- Zhou W, Gu Y, Li H & Luo M. Assessing 1-h plasma glucose and shape of the glucose curve during oral glucose tolerance test. Eur J Endocrinol. 2006; 155:191–197