

EFECTO DE LA METFORMINA EN LA DEGENERACION DEL TEJIDO ADIPOSO DURANTE LA OBESIDAD

Cesar Elpidio Rodríguez Cervantes (1), Clara Alba Betancourt (2)

1 Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, ce.rodriguez cervantes@ugto.mx

2 Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, cl.albabetancourt@ugto.mx

Resumen

La obesidad se asocia con un estado inflamatorio implicado en el desarrollo de aterosclerosis y resistencia a la insulina. Los macrófagos son claves en la génesis de estos procesos. La obesidad induce la acumulación de macrófagos en el tejido adiposo, estos producen muchas de las moléculas inflamatorias secretadas por el tejido adiposo entre los que se incluyen el TNF- α , diversas interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), además de proteínas de fase aguda como la haptoglobina (Hp), PAI-1 y la proteína C reactiva. La presencia de estas moléculas en situación de obesidad hace relacionar esta patología con una inflamación de diversos grados. Mediante el análisis de cortes histológicos obtenidos a partir de muestras de biopsias de tejido adiposo de conejo y procesados mediante las tinciones de hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica, se observó el efecto de la metformina la cual actúa sobre el metabolismo de la insulina ocasionando la degeneración de este tejido durante el proceso de la obesidad.

El tratamiento con metformina y sus efectos en el metabolismo son tales que disminuye el proceso de inflamación sufrido por el tejido adiposo, que se ve reflejado por cambios morfológicos en la distribución y migración de linfocitos en la estructura histológica.

Abstract

Obesity is associated with an increased inflammation involved in the development of atherosclerosis and insulin resistance. Macrophages are key in the genesis of these processes. Obesity induces macrophage accumulation in adipose tissue, they produce many of the inflammatory molecules secreted by adipose tissue like TNF- α , interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8), as well as acute phase proteins such as haptoglobin (Hp), PAI-1 and C-reactive protein. The presence of these molecules in obesity relates this pathology to various inflammation degrees. The analysis of histological sections obtained from rabbit adipose tissue biopsy samples and processed by the hematoxylin-eosin and immunohistochemistry, showed the effect of metformin, a molecule which acts on the insulin metabolism, by the degeneration of this tissue during obesity. Metformin and its effects on metabolism are such that decreases the inflammation process suffered by adipose tissue, which is reflected by morphological changes in the distribution and migration of cells in the histological structure.

Palabras Clave

Inflamación, corte histológico, monocito, conejo.

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo es sin lugar a dudas el sitio patogénico donde inicia localmente la resistencia a la insulina inducida por la obesidad, antes de volverse sistémica. Su producción endocrina y paracrina de proteínas bioactivas, dado su perfil de expresión genético secretor, refleja un estado inflamatorio generalizado en este tejido. Las proteínas producidas por los adipocitos que podrían iniciar dicho proceso incluyen TNF- α , IL-6, leptina, adiponectina, PAI-1 y angiotensinogeno. Por otro lado, las células inmunes reclutadas (principalmente monocitos y macrófagos) expresan las mismas proteínas vasoactivas y proinflamatorias, con excepción de la leptina y la adiponectina. Ambos tipos celulares, adipocitos y macrófagos reclutados, parecen participar en forma coordinada en la patogénesis de la resistencia a la insulina inducida por la inflamación [1]. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) puede reducir la cantidad de tejido adiposo, debido a su capacidad de inhibir la diferenciación de adipocitos, inhibir lipogénesis, estimular la lipólisis e inducir apoptosis [2]. Ya que prácticamente la totalidad de ácidos grasos son acumulados en los adipocitos, se asume de manera general que el proceso inflamatorio se inicia en los adipocitos y es amplificado por los macrófagos [3].

Una serie de tratamientos que permiten mejorar la sensibilidad a la insulina y las funciones del tejido adiposo para el manejo de HGNA, han sido propuestos en diversos estudios, los cuales incluyen la pérdida de peso, tratamiento con metformina y sensibilización a la insulina por las tiazolidinedionas [4].

La metformina es un fármaco perteneciente al grupo de las biguanidas usado ampliamente como medicamento anti-diabético que posee efectividad disminuyendo los niveles plasmáticos de glucosa por el descenso de la producción hepática de la misma (gluconeogénesis) y mejorando el metabolismo de lípidos, evitando con ello posibles complicaciones como la esteatosis hepática y desarrollo de hígado graso no alcohólico [5].

La metformina mejora la acción de la insulina en la grasa, facilitando la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno. Las biguanidas incrementan la expresión del GLUT4 y su capacidad transportadora al facilitar la actividad tirosinasa del receptor de insulina. Además reduce los niveles circulantes de ácidos grasos libres y su oxidación hasta en un 30%. Así mismo, causa un

descenso de los triglicéridos de las LDL y disminuye la síntesis hepática de VLDL [5].

Acorde a los mecanismos descritos con el uso de la metformina se tiene que esta protege contra la enfermedad de hígado graso no alcohólico actuando directamente sobre el metabolismo hepático y teniendo efectos indirectos en la respuesta inflamatoria y mejoramiento del fenotipo del tejido adiposo suprimiendo la acción de monocitos y macrófagos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies animales

Conejos hembra Nueva Zelanda proporcionados por el bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato.

Inducción de obesidad en conejos

Durante un periodo de nueve semanas se alimentó a los conejos con una dieta alta en grasas (DAG) que contenía:

- 12.6% manteca vegetal
- 11.2% mantequilla comercial sin sal
- 4.2% manteca de cerdo
- 2.1% azúcar

Anestesia previa a la toma de biopsia

Una vez fuera del bioterio los animales de experimentación se sometían a diferentes dosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal para provocar en ellos un estado anestésico y proceder con la obtención de tejido adiposo.

Tabla 1. Relación peso/dosis administrada a cada uno de los conejos empleados en la experimentación.

La dosis empleada en los conejos sometidos a DAG fue modificada debido a que el pentobarbital sódico es liposoluble y sufre un proceso de redistribución entre el tejido adiposo y el sistema nervioso central.

Conejo	Peso	Dosis pentobarbital sódico	mL pentobarbital sódico administrados
(Dieta alta en grasa)	4.150 kg	0.6 mL/kg	2.5 mL
(Dieta alta en grasa, tratamiento posterior con metformina)	4.00 kg	0.63 mL/kg	2.5 mL

Obtención de biopsias de tejido adiposo

Mediante punción en la parte media del lomo del conejo se obtuvieron varias muestras de tejido adiposo del encontrado por encima de la glándula suprarrenal, ya que es ahí donde se acumula mayor cantidad de dicho tejido. El procedimiento fue llevado a cabo utilizando una aguja Illinois para aspiración con mango en "T" esternal/cresta iliaca, 15 G x 76 mm, esterilizada previamente y en un ambiente alejado de corrientes de aire para evitar posibles contaminaciones o infecciones posteriores en los animales de experimentación. El procedimiento anterior se realizó en un conejo sometido a DAG durante nueve semanas y uno más bajo esta misma dieta pero con un tratamiento posterior de metformina a una dosis de 25mg/kg de peso.

Fijación y preparación de las biopsias

Las biopsias obtenidas de tejido graso fueron depositadas dentro de un casete para ser sometidos al siguiente tratamiento:

Tabla no.2 Tratamiento de fijación de biopsias de tejido graso		
Deshidratación		
Número	Proceso	Tiempo
1	Inmersión en formalina al 10% (x2)	2 hrs.
2	Inmersión en formol-alcohol (1:1)	1 hr.
3	Inmersión en alcohol de 96° durante una hora. (x3)	3 hrs.
4	Inmersión en alcohol absoluto durante una hora (x2)	2 hrs.
Aclaración		
5	Inmersión en xilol durante una hora. (x2)	2 hrs.
Impregnación de parafina		
6	Inmersión en parafina (liquida) durante una hora.(x2)	2 hrs.

La solidificación de la parafina se llevó a cabo 20 minutos a temperatura ambiente y posteriormente al congelador.

Corte histológico

Se elaboraron en el micrótopo de parafina, de 4 a 6 micrómetros de grosor. Se depositaron posteriormente en un baño de flotación que

contenía solución acuosa de 2 g. de gretetina en 2.5 L de agua, a 42 °C.

Rehidratación y tinción.

Los cortes fueron sometidos al proceso de rehidratación que consistió en:

Tabla no.3 Secuencia de pasos para la obtención y tinción de corte histológico de biopsia de tejido adiposo.		
Número	Proceso	Tiempo
1	Inmersión en Citrisolv (x 2)	10 minutos
2	Inmersión en alcohol absoluto	7 veces
3	Inmersión en alcohol de 96°	7 veces
4	Inmersión en alcohol de 80°	7 veces
5	Inmersión en alcohol de 70°	7 veces
6	Inmersión en alcohol de 50°	7 veces
7	Inmersión en agua corriente	7 veces
TINCIÓN		
8	Inmersión en hematoxilina de Harris activada con ácido acético	5 minutos
9	Inmersión en agua corriente	7 veces
	Inmersión en solución de ácido clorhídrico 1%	7 veces
10	Inmersión en agua corriente	7 veces
11	Inmersión en solución de carbonato de litio saturada	7 veces
12	Inmersión en agua corriente	7 veces
13	Inmersión en eosina	5 minutos
14	Inmersión en alcohol de 96°	7 veces
15	Inmersión en alcohol de 96°	7 veces
16	Inmersión e en alcohol absoluto	10 minutos
17	Inmersión en alcohol absoluto	10 minutos
18	Inmersión en xilol	10 minutos
19	Inmersión en xilol	10 minutos
Montaje		
Depositar una gota de resina sintética sobre el tejido, y sobre la gota un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Observar al microscopio de luz.		

Inmunohistoquímica

El tejido se incluye en parafina, se realizan los cortes y en la rehidratación es detenida hasta la inmersión en etanol al 50%, después se lavan con agua destilada por 5 minutos, se colocan en una cámara húmeda, de tal suerte que la preparación histológica quede suspendida y sus bordes libres del contacto con alguna superficie para evitar el derramamiento de líquidos.

La preparación histológica se bloquea con leche libre de grasa al 5% en buffer TBS [tris(hidroximetil)aminometano] al menos durante una hora, después de lo cual se descarta y se realizan tres lavados de 10 minutos con TBS y otros tres lavados con TTBS (mismo buffer pero ahora con tritón X-100). El anticuerpo se preparó en dilución 1:1000 [anticuerpo monoclonal hecho en rata contra la clona Cd11b de macrófagos reclutados en tejido adiposo]. Este anticuerpo está acoplado a FITC (fluoresceína, color verde, que emite a 520nm y se excita a 494nm). Se debe dejar en la cámara húmeda, en oscuridad, al menos dos horas, en este caso se dejó toda la noche. Posteriormente, se recupera el anticuerpo y se realizan 3 lavados con TTBS y 3 lavados con TBS, se debe montar la preparación con un medio de montaje acuoso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tejido adiposo sin tratamiento con metformina

A partir de la observación de los cortes histológicos se pudo observar la infiltración de monocitos (los cuales en tejido conectivo son conocidos como histiocitos) dentro del espacio intercelular de los adipocitos, mismos que pueden ser identificados por la presencia de un halo sin teñir dada la poca cantidad de DNA que estos poseen y por lo tanto no puedan ser coloreados fuertemente con hematoxilina. Esto concuerda con la hipótesis de que el tejido adiposo durante la obesidad genera diversas interleucinas y moléculas inflamatorias las cuales atraen a linfocitos tratando de inhibir la diferenciación de adipocitos y así mismo disminuir gradualmente la

inflamación y el desarrollo del proceso de obesidad.

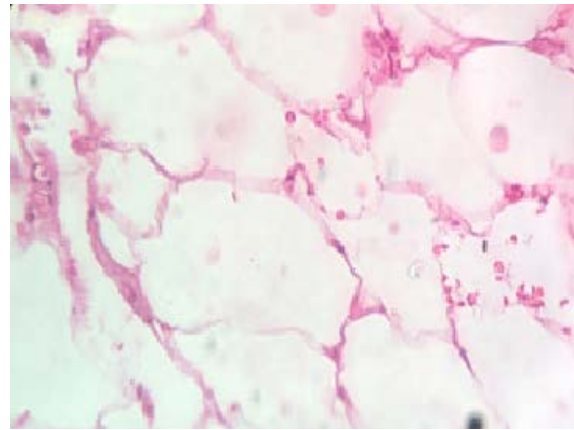


Imagen. 1 Tejido adiposo obtenido de conejo con nueve semanas de alimentación alta en grasa sin tratamiento de metformina. (H.E. 40X)

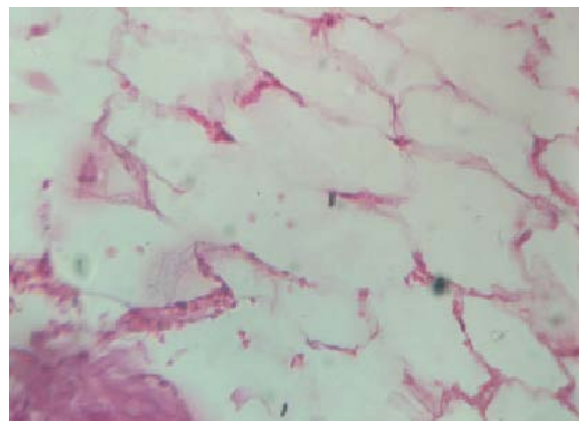


Imagen. 1 Tejido adiposo obtenido de conejo con nueve semanas de alimentación alta en grasa sin tratamiento de metformina. (H.E. 40X)

La presencia de los monocitos en el tejido adiposo fue comprobada mediante técnicas inmunohistoquímicas, en las cuales se observó la presencia de este tipo de células en el espacio comprendido entre los adipocitos, mismo que puede apreciarse en la Fig. 3.

Tejido adiposo en tratamiento con metformina

En el análisis histológico de las biopsias del tejido adiposo obtenido de los conejos sometidos a una dieta alta en grasa y un tratamiento posterior a

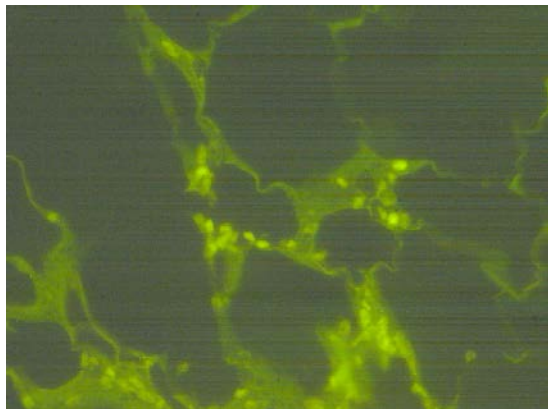


Fig. 3 Comprobación de la presencia de monocitos en el tejido adiposo durante la obesidad (Inmunofluorescencia, 40X).

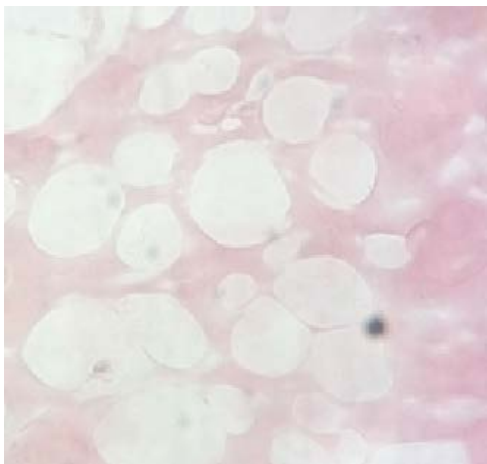


Imagen. 4 Tejido adiposo obtenido de conejo con nueve semanas de alimentación alta en grasa con posterior tratamiento de metformina. (H.E. 40X).

metformina es notable el aumento de tamaño del espacio comprendido entre los adipocitos lo cual a su vez también es congruente con lo reportado acerca de la degeneración de este tejido cuando un organismo es sometido bajo tratamiento con este fármaco. También es observable la ausencia de monocitos dentro de los espacios comprendidos entre los adipocitos.

CONCLUSIONES

Mediante la inducción de obesidad en conejos y el posterior tratamiento con metformina en uno de ellos ha sido posible la observación de la presencia de monocitos en el tejido adiposo, así

como la reducción del tamaño de los adipocitos y la ausencia de monocitos al menos en estudios de tipo histológico lo cual es congruente con los efectos reportados con el uso de la metformina dentro del tejido graso. Este tipo de estudios pueden ser de gran importancia para el posterior estudio de la reacción inflamatoria a niveles moleculares y ofrecer nuevos y mejores tratamiento en padecimientos que aquejan a gran cantidad de personas como lo es la obesidad y sus complicaciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración de Juan Pedro Galván Chía, auxiliar del bioterio, Ma. de los Ángeles Rodríguez Salazar, técnico académico, Dra. Martha Alicia Deveze Álvarez, Dra. Claudia Leticia Mendoza Macías, Dr. Eduardo Durán Castro/PhD in Pharmacy, Dr. Juan Ramón Zapata Morales, profesores de tiempo completo del Departamento de Farmacia de la División de Ciencias Naturales y Exactas.

REFERENCIAS

- [1] S. Greenberg, A., S. Obin, M. (2006), Obesity An The Role Of Adipose Tissue In Inflammation Metabolism, Am J Clin Nutr, Vol. 83, pp.461s-463s
- [2] Lung Woo, S., Xu, H., Li, H., Zhao, Y., Hu, X., Zhao, J., Guo, X., Guo, T., Botchlett, R., Qi, T., Pei, Y., Zheng, J., Xu, Y., An, X., Li, Q., Xiao, X., Huo, Y., Wu, Ch. (2014), Metformin Ameliorates Hepatic Steatosis Inflammation Without Altering Adipose Phenotype In Diet-Induced Obesity, PLOS ONE, Vol. 9, No.3, pp. 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0091111
- [3] A. Bastarrachea, R., Lopez-Alvarraga, J. C., Bolado-G., V. E., Tellez Mendoza, J., Laviada Molina, H., G. Comuzzie, A. (2007), Macrofagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina, Gaceta Médica Mexicana, Vol. 143, No. 6, pp. 506-509.
- [4] Tilg, H. & Kaser A. (2005). Treatment strategies in nonalcoholic fatty liver disease. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology, 2(3), pp. 148–155. doi: 10.1038/ncpgasthep01
- [5] Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A., Portoles, A. (2008), Sistema Endocrino. En García Barrado, M. J., Iglesias, M. C., Moratinos, J. (18ª Edición), Velázquez Farmacología Básica y Clínica, (pp.621-629:636-637), Buenos Aires, Argentina, Editorial Medica Panamericana.