

Efectos de la administración crónica de alcohol sobre la conducta motora y su relación con el sistema colinérgico muscarínico en ratas Sprague Dawley bajo estrés discontinuos

Chacón Lozán Francisco J¹, Bonfante-Cabarcas Rafael Armando¹, Damelis Daza² y Douglas García²

¹Unidad de Bioquímica, ²Unidad de Salud Pública. Decanato de Ciencias de la Salud. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Lara. Venezuela

*Autor de correspondencia.

Dr. Douglas García.

Unidad de Salud Pública, Decanato de Ciencias de la Salud.

Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado

Avenida Libertador con Andrés Bello,

Barquisimeto, Lara, Venezuela.

Código Postal: 3001.

Teléfonos: 0251-2591854

Email: dmgarcia13@yahoo.com

Este proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto, Venezuela bajo el proyecto número 015-ME-2005

Recibido: 06/07/2009

Aceptado: 28/09/2009

Resumen

El alcohol y el estrés son problemas de salud pública que afectan el Receptor Colinérgico Muscarínico (RCM). En el presente trabajo se estudia el efecto de ambos fenómenos sobre la funcionalidad y densidad del RCM. Métodos: 43 ratas Sprague Dawley se dividieron en 4 grupos: Control (n=12), Estrés (n=11), Alcohol (n=10) y Alcohol-Estrés (n=10). A los grupos alcohol se le administró diariamente etanol al 10 % *ad libitum* y los grupos Estrés se sometieron a nado forzado a 5°C por 5 min tres veces/semana. Resultados: las ratas tratadas con alcohol presentaron adicción e hipermotilidad, siendo el efecto mayor en el grupo alcohol-estrés. Escopolamina incremento la motilidad en todos los grupos. No hubo diferencias significativas entre los grupos en el desempeño en el Rotarod. La densidad de los RCM estuvo disminuida significativamente en Hipocampo en el grupo alcohol. Conclusión: el alcohol induce trastornos del RCM relacionados a hipermotilidad.

Palabras Clave: Alcohol, Estrés, Receptor Muscarínico, Nado Forzado, Motilidad.

Abstract

Alcohol consumption and stress are health problems, which affects the Cholinergic Muscarinic Receptor (CMR) system. Here we studied the effect of both phenomena on CMR functionality and densities. Methods: 43 Sprague Dawley rats were divided in 4 groups: Control (n=11), Stress (n=10), Alcohol (n=10) and Alcohol-Stress (n=9). Alcohol groups received 10% ethanol *ad libitum* in substitution of water every day, stress groups were submitted 3 days at week to 5 min force swimming at 5°C. Results: rats that had alcohol displayed addiction and hypermotility, the effect was higher at alcohol-stress group. Scopolamine significantly increased motility in all groups. No differences were observed at Rotarod performance. CMR density was decreased in hippocampus of rats belonging to alcohol group. Conclusion: alcohol induces motor disturbances related to CMR system.

Key Words: Alcohol, Stress, Muscarinic Receptor, Forced Swimming, Motility.

Introducción

Los receptores Colinérgico Muscarínico (RCMs) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, distribuidos a lo largo del Sistema Nervioso Central (SNC) donde han sido involucrados en memoria y conducta motora. La relación entre alcoholismo y Sistema Colinérgico Muscarínico (SCM) ha sido abordada por diferentes autores. Freund

y Ballinger (1988) encontraron una disminución del 40% en la densidad de los RCM en corteza frontal de autopsias de pacientes con historia de alcoholismo. Brandão y colaboradores (1995, 1999) encontraron una disminución en la expresión de la enzima colinacetiltransferasa en animales con consumo prolongado de etanol, asociado a una disminución

de la inervación colinérgica en hipocampo y destrucción de fibras colinérgicas, que no mejoraron al cesar el consumo de alcohol (Beracochea y colaboradores, 1992).

Desde el punto de vista conductual se ha observado que el consumo crónico de alcohol produce alteraciones en el SNC. En éste sentido, Nagahara y Handa (1999) observaron que los agonistas colinérgicos fueron incapaces de incrementar la memoria en ratas expuestas al alcohol durante el período fetal, mientras que los antagonistas producían un severo déficit de memoria. Beracochea y colaboradores (1992) demostraron que el consumo crónico de alcohol produce en animales un acelerado déficit para la resolución de un laberinto en T, cuando los intervalos entre los ensayos eran aumentados, efecto que fue revertido por agonistas colinérgicos administrados antes del ensayo. Hodges y colaboradores (1991) observaron que la ingesta de alcohol al 20% disminuía el desempeño de las ratas en el laberinto radial y en los test asociativos, el déficit cognitivo estuvo asociado al nivel de alcohol en sangre. Los animales tratados con alcohol mostraban mejoría al ser tratados con drogas colinérgicas y empeoraban con el uso de antagonistas.

Entre los motivos más frecuentes para el consumo de bebidas alcohólicas se reportan: la ansiedad, los conflictos personales, el estrés y el estilo de vida. En ratas el estrés induce hipersensibilidad del SCM expresada en hipomotilidad horizontal y vertical (Carrizo y colaboradores., 1997), en inmovilidad durante el test de nado forzado o después de un estímulo eléctrico plantar, lo cual es potenciado si se produce una supersensibilidad colinérgica previa (Overstreet y colaboradores., 1986). Srikman y colaboradores (2006) relacionaron al SCM con la reversión del déficit de memoria producido por el estrés crónico. Además de existir cambios a nivel de las características cinéticas del RCM, el estrés agudo induce cambios en los marcadores colinérgicos pre-sinápticos (Fatranska y colaboradores, 1987) y post-sinápticos (Estévez y colaboradores, 1984).

En el presente trabajo se evalúa funcionalmente y molecularmente el RCM en ratas albinas sometidas simultáneamente a estrés y a consumo de alcohol.

Materiales y Métodos

Muestra. Se utilizaron 43 ratas Sprague Dawley con edades entre 1 y 2 meses, obtenidos del Bioterio Central de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), divididas en 4 grupos: Control (6 hembras y 6 machos), Alcohol (5 hembras y 5 machos), Estrés (6 hembras y 5 machos) y Alcohol Estrés, (6 hembras y 4 machos). Los grupos Alcohol y Alcohol-estrés consumieron etanol al 10% en sustitución de agua a libre demanda y los grupos Estrés y Alcohol-Estrés se sometieron a nado forzado. Los individuos fueron mantenidos en un bioterio con una temperatura promedio de 25°C centígrados, con ciclos diurnos y nocturnos de 12 horas, en jaulas de metal no oxidable de 41x51x15cm. El alimento basado en comprimidos de Ratarina fué suministrado *ad libitum*.

Inducción de estrés. Consistió en colocar por 5min a cada individuo, en un recipiente de plástico de 1m de altura y

50 cm de diámetro, llenado hasta 30cm con agua a 5°C. El estrés fue realizado 3 veces/semana (lunes miércoles y viernes) entre 12 y 2 pm.

Actividad locomotora. Fue medida individualmente en una caja de motilidad de 48x48x40cm, dividida en 4 cuadrantes, por un periodo de 10min, precedido de 5min de adaptación no cuantificable. El desplazamiento horizontal fue cuantificado como el número de veces que la rata se trasladaba de un cuadrante a otro. El desplazamiento vertical se cuantificó observando el número de veces que la rata levantaba sobre sus patas posteriores.

Movimientos estereotipados. Se realizó en un recipiente de vidrio transparente de 31 cm de diámetro y 31cm de altura en un cuarto aislado de ruido; después de 5 min de adaptación, se cuantificó la exploración vertical, el olfateo, el rascado con las patas posteriores, la actitud de limpieza de la nariz y de la cabeza con las patas anteriores, y el mordisqueo.

La actividad locomotora y los movimientos estereotipados fueron medidos bajo tratamiento farmacológico con NaCl 0.9% o con escopolamina a dosis de 1 ml/Kg y 1mg/Kg, respectivamente, vía intraperitoneal. Las drogas fueron administradas posterior a una experiencia basal cuantificada, se espero 30min para proceder a iniciar la experiencia bajo el efecto de la droga.

Memoria motora. Fue utilizado un Rotarod UGO47600 Ugo Basile Biological research apparatus. Inc). Los individuos fueron sometidos a 1 sesión diaria de 5min, por 3 días. Las rotaciones del Rotarod fueron mantenidas constantes en cada sesión e incrementadas cada día 5 rpm, iniciando el primer en 5rpm y terminan en 15rpm. En ésta prueba se midió el tiempo que permaneció cada individuo en el eje sin caer.

Adicción al alcohol. Previo a la realización de ésta prueba los individuos fueron sometidos a ayuno total durante 24 horas. Cada individuo por separado fue colocado en jaulas metálicas de 29x26x26 cm, donde tuvieron acceso simultáneo en dispensadores diferentes a 100ml de agua y a 100 ml de etanol 10%. Se cuantificó diariamente el volumen de agua y alcohol consumido.

Unión de Radioligandos. La densidad de Receptores Colinérgico Muscarínicos fue determinada a partir de homogeneizados de Corteza Frontal, Hipocampo, Tronco Encefálico y Corazón, utilizando [³H]-QNB como marcador a concentraciones saturantes (1000pM) y atropina 2 μM como ligando frío para cuantificar la unión inespecífica, de acuerdo a metodología descrita por Bonfante-Cabarcas y colaboradores (2002).

Análisis de los datos. Los resultados fueron expresados en promedio ± el error estándar. La significancia estadística de la diferencia observada para determinada variable entre los grupos fue establecida mediante el test ANOVA seguido del post-test de Bonferroni, aceptándose como significativo un valor de p < 0.05.

Resultados

Ensayo de Adicción. El grupo Control presentó mayor consumo de agua durante el primer día el cual disminuyó hasta ser similar al consumo de alcohol. En el grupo Estrés el consumo de agua fue mayor al de alcohol. En el grupo Alcohol el consumo de alcohol fue mayor que el de agua los días 2 y 3. En el grupo Alcohol-Estrés el consumo de alcohol fue significativamente mayor al tercer día (figura 1).

Actividad Locomotora. El grupo Alcohol y Alcohol-Estrés presentaron un mayor número de desplazamientos horizontales y verticales respectivamente al ser comparados con los grupos Control y Estrés, siendo la diferencia significativa. Escopolamina indujo un incremento significativo en la motilidad en ambas conductas en todos los grupos, habiendo una tendencia a igualarse las motilidades del grupo Control con respecto a los grupos Alcohol y Alcohol-Estrés, siendo la motilidad del grupo Estrés la menor, sin embargo, no se constató que estas diferencias fueran estadísticamente significativas (Tabla I).

Movimientos Estereotipados. En la exploración vertical los grupos Estrés y Alcohol-Estrés presentaron un mayor

número de movimientos, los cuales fueron estadísticamente significativos al ser comparados con el grupo Control (Tabla II). En los grupos Alcohol, Estrés y Alcohol-Estrés se observó un mayor número de olfateos, los cuales fueron estadísticamente significativos respecto al grupo Control (Tabla II). Para los movimientos de rascado, limpieza de cabeza y mordisqueo no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p > 0.05$) (Tabla II). La escopolamina incrementó significativamente la exploración vertical y olfateo en todos los grupos, no observándose bajo efecto de la droga diferencias significativas entre los grupos.

Memoria Motora. En la Figura 2 se muestra el promedio global del tiempo de permanencia en el eje para los tres días, no observándose diferencias significativas.

Ensayo de Radioligandos. El hipocampo de ratas sometidas a tratamiento con alcohol mostró una disminución significativa en la densidad de RCM, al ser comparados con los restantes grupos experimentales. En corteza frontal, tronco encefálico y corazón no se observaron diferencias (Figura 3).

Figura 1

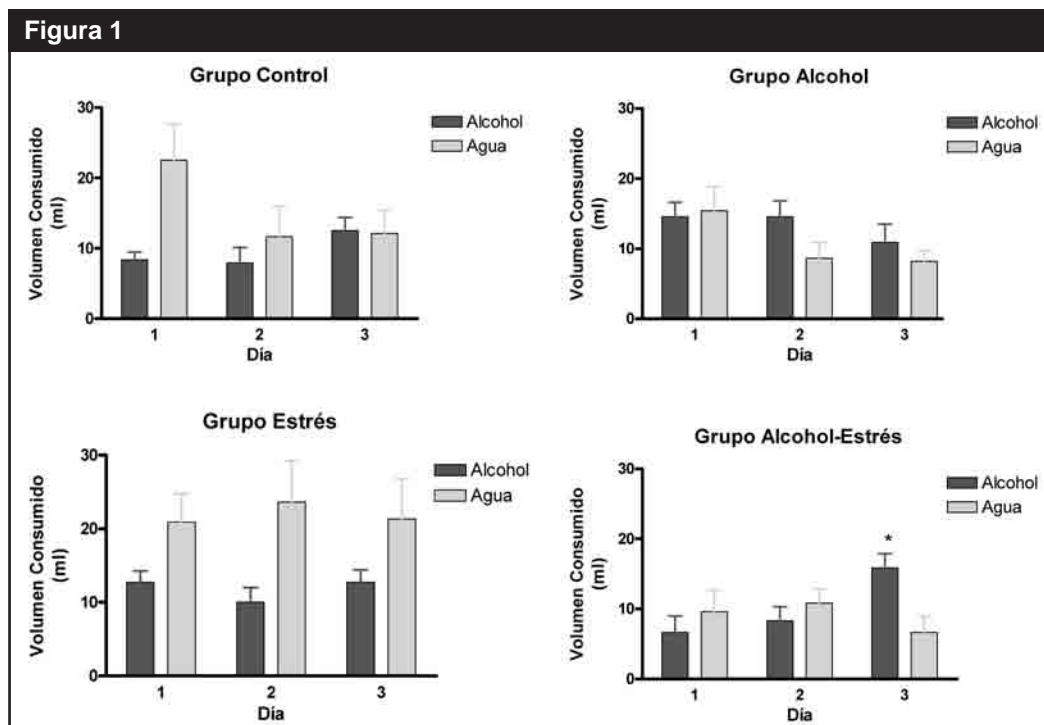


Figura 1. Ensayo de adicción. Posterior a 45 de administración etanol en sustitución de agua, a los individuos de cada grupo se les ofreció simultáneamente agua y alcohol en dispensadores separados, durante 3 días consecutivos, cuantificándose el volumen consumido para cada líquido por día. Observamos que el grupo Alcohol-Estrés tendió a tomar menos líquidos, sin embargo, al tercer día el consumo de alcohol fue significativamente mayor, indicando una habituación al consumo de este líquido. *significa $p < 0.05$ al comparar respecto al consumo de alcohol el primer día.

Tabla I. Efectos del consumo de alcohol y el estrés sobre la motilidad espontánea en ratas albinas con y sin escopolamina

| Grupo | Horizontales | | Verticales | |
|----------------|--------------------------|---------------|---------------------------|---------------|
| | Salina | Escopolamina | Salina | Escopolamina |
| Control | 7,25 ± 2.27 | 24,58 ± 6.43* | 7,75 ± 2.73 | 22,75 ± 4.17* |
| Alcohol | 11,18 ± 2.16 | 22,64 ± 4.60* | 18,45 ± 2.67 ^A | 29,45 ± 4.48* |
| Estrés | 6,4 ± 1.29 | 13,9 ± 4.64* | 7,9 ± 1.37 | 16,1 ± 2.97* |
| Alcohol-Estrés | 14,2 ± 1.61 ^A | 30 ± 5.21* | 19 ± 4.05 | 25,50 ± 4.62 |

* $p < 0.05$ al analizar el efecto de escopolamina en cada grupo para cada movimiento; ^A $p < 0.05$ al realizar análisis inter-grupo por ANOVA

Tabla II. Efectos del consumo de alcohol y el estrés sobre los movimientos estereotipados en ratas albinas. Efecto de la escopolamina

| Grupo | Exploración Vertical | | Olfatear | | Mordisquear | | Limpiar Hocico | |
|----------------|--------------------------|---------------|---------------------------|---------------|-------------|-------------|----------------|-------------|
| | Salina | Droga | Salina | Droga | Salina | Droga | Salina | Droga |
| Control | 11,17 ± 1.47 | 29,17 ± 3.79* | 14.75 ± 1.5 | 28,83 ± 3.46* | 3,25 ± 1.23 | 3,67 ± 0.92 | 5 ± 0.84 | 5,33 ± 1.3 |
| Alcohol | 16.1 ± 2.54 | 36.3 ± 4.68* | 21.6 ± 1.61 [^] | 32.4 ± 2.03* | 3.2 ± 1.59 | 3.5 ± 1.59 | 4.9 ± 0.88 | 5.6 ± 1.45 |
| Estrés | 21.3 ± 3.41 [^] | 35.1 ± 5.03* | 23.8 ± 1.22 [^] | 32.7 ± 4.21* | 3.7 ± 1.13 | 3.5 ± 0.99 | 5.6 ± 1 | 6 ± 1.34 |
| Alcohol Estrés | 21 ± 2.47 [^] | 43.44 ± 4.5* | 23.11 ± 2.18 [^] | 40.89 ± 2.95* | 3.11 ± 1.4 | 2 ± 0.82 | 4.22 ± 1.1 | 5.22 ± 1.34 |

*p < 0.05 al analizar el efecto de escopolamina en cada grupo para cada movimiento; [^]p < 0.05 al realizar análisis inter-grupo por ANOVA

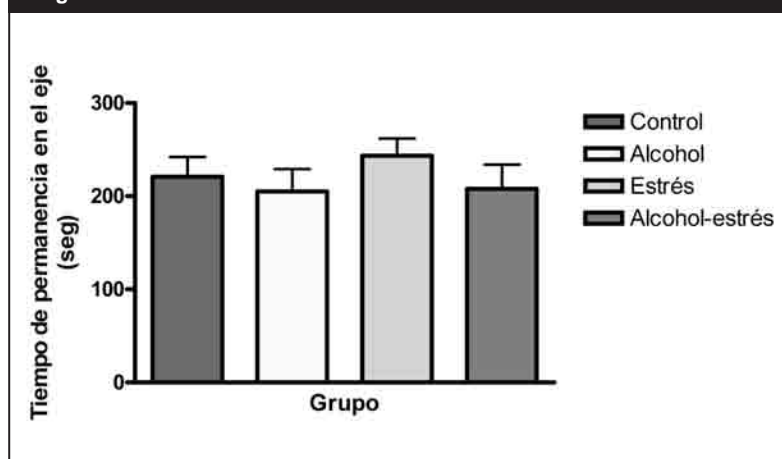
Figura 2

Figura 2. Efectos del alcohol y el estrés sobre la memoria motora en ratas albinas. En ésta prueba los individuos fueron sometidos a 1 sesión diaria de 5 minutos, por 3 días en un rotarod. Las rotaciones fueron mantenidas constantes en cada sesión e incrementadas cada día 5 rpm, iniciando el primer en 5 rpm y terminando en 25 rpm; se midió el tiempo de permanencia sobre el eje del Rotarod. En la figura se muestra el promedio global del tiempo de permanencia en el eje, no observándose diferencia significativa entre los grupos.

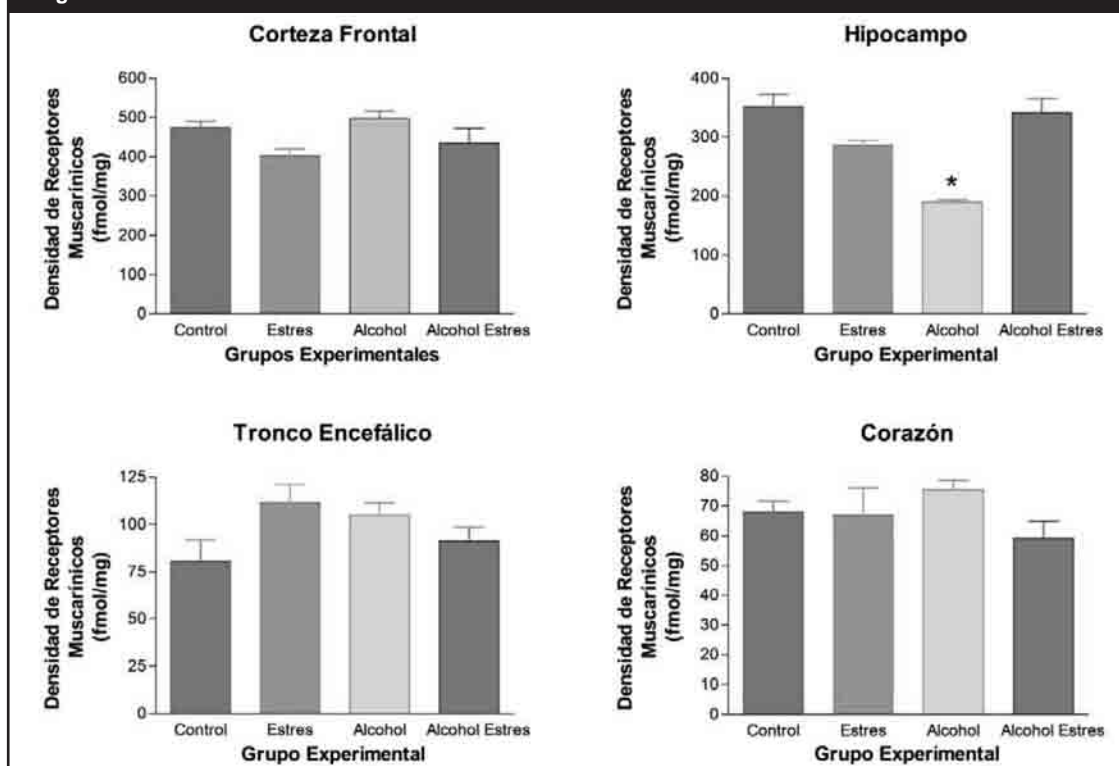
Figura 3

Figura 3. Ensayo de Radioligando. La densidad de Receptores Colinérgico Muscarínicos fue determinada a partir de homogeneizados de Corteza Frontal, Hipocampo, Tronco Encefálico y Corazón, utilizando [³H]-QNB como marcador a concentraciones saturantes (1000 pM) y atropina 2 μM como ligando frío. Se observa que en el hipocampo de ratas sometidas a tratamiento con alcohol hubo una disminución significativa en la densidad de Receptores Colinérgico Muscarínicos al ser comparados con los restantes grupos experimentales. * significa p < 0.05.

Discusión

En este trabajo observamos que el alcohol indujo un aumento de la motilidad en ratas Sprague Dawley, lo cual fue potenciado por estrés. En este sentido, Phillips y Shen (1996) demostraron que el alcohol administrado crónicamente produce un incremento de la motilidad en roedores. De la misma manera, Scibelli y Phillips (2009) demostraron que la administración aguda de etanol incrementa la actividad locomotora en ratones, efecto potenciado por escopolamina, indicando que ambas drogas actúan sinérgicamente regulando la motilidad. Dicho incremento podría estar relacionado con disfuncionalidad del SCM reflejo de la pérdida de fibras colinérgicas, tal como ha sido demostrado en el SNC (Costa y Guizzetti, 1999), en la corteza somatosensorial (Miller y Rieck, 1993) y en el hipocampo (Beracochea y colaboradores, 1992). La demostración de que los niveles de la enzima colinacetiltransferasa y el transportador de colina de alta afinidad se encontraran bajos en individuos que han consumido alcohol, confirman la idea de la degeneración de neuronas colinérgicas causadas por el alcohol, ya que, ambas proteínas son marcadores presinápticos colinérgicos (Beracochea y colaboradores, 1992 y 1995).

A nivel molecular observamos una disminución de los RCMs en hipocampo de ratas con administración crónica de alcohol. Similarmente, Freund y Ballinger (1991) encontraron en autopsias de pacientes con historia de alcoholismo una disminución del 30% en la densidad de los RCM en hipocampo, sin embargo, también observaron una subsensibilidad del 40% en la corteza frontal, en la corteza temporal y en el putamen. La subsensibilidad de los RCM, especialmente en hipocampo, podría estar relacionados con los déficits cognoscitivos (Beracochea y colaboradores, 1992) y al desarrollo de demencia tipo Alzheimer observados en individuos alcohólicos (Freund y Ballinger, 1992).

En este trabajo los efectos del alcohol sobre la conducta motora fueron consistentemente observados en ratas sometidas a estrés (ver tablas I y II, grupo alcohol-estrés). El hecho de que las ratas sometidas a estrés presenten hiper-motilidad, sustenta la noción de que el alcohol induce neurodegeneración colinérgica muscarínica que supera las acciones tróficas del estrés. Dicho esto podemos sugerir que los aumentos de la motilidad espontánea y estereotipada observados en el presente trabajo son reflejo de una destrucción de las células colinérgicas en el SNC por consumo crónico de alcohol.

Referencias

1. Freund G, Ballinger WE. Loss muscarinic cholinergic in the frontal cortex of alcohol abusers. *Alcohol Clin Exp Res.* 1988 oct; 12(5) 630-8
2. Brandão F, Ribeiro da Silva A, Cadete Leite A. GM1 and piracetam do not revert the alcohol induced depletion of cholinergic innervation of rat hippocampal formation as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry. *Neuroscience* 1995 jan; 64(2) 357-74
3. Brandão F; Ribeiro-Da-Silva A.; Cadete-Leite A. GM1 and piracetam do not revert the alcohol-induced depletion of cholinergic fibers in the hippocampal formation of the rat. *Alcohol*, Volume 19, Number 1, August 1999, pp. 65-74(10)
4. Beracochea D, Micheau J, Jaffard R. Memory deficit following chronic alcohol consumption in mice: Relationship with hippocampal and cortical cholinergic activities. *Pharmacol Biochem Beba.* 1992 aug; 42(4) 749-53
5. Nagahara AH, Handa RJ. Fetal alcohol exposed rats exhibit differential response to cholinergic drugs on a delay dependent memory task. *Neurobiol Learn Mem.* 1999 nov; 72(3): 230-43
6. Hodges H, Allen Y, Siden J, and Collaborators. The effects of cholinergic drugs and cholinergic rich foetal neural transplants on alcohol induced deficits in radial maze performance in rats. *Behav Brain Res.* 1991 apr; 43(1) 7-28
7. Carrizo E, Cano G, Suarez Roca H. Motor activity and qualitative autoradiographic analysis of muscarinic receptors in the brain of rat subjected to the forced swimming test. *Brain Res Bull.* 1997; 42(2):133-9.
8. Overstreet DH, Janowsky DS, Gillin JC. Stress induced immobility in rats with cholinergic supersensitivity. *Biol Psychiatry.* 1986 jun; 21(7): 657-64
9. Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. The involvement of cholinergic and noradrenergic systems in behavioral recovery following oxotremorine treatment to chronically stressed rats. *Neuroscience.* 2006 Dec;143(3):679-88. Epub 2006 Sep 27.
10. Fatranska MM, Budai D, Oprsalova Z, Kvetnansky R. Acetylcholine and its enzymes in some brain areas of the rat under stress. *Brain Res.* 1987 oct; 424(1): 109-14
11. Estévez EE, Jerusalinsky D, Medina JH, De Robertis E. Cholinergic muscarinic receptors in rat cerebral cortex, basal ganglia and cerebellum undergo rapid and reversible changes after acute stress. *Neuroscience.* 1984 Dec;13(4):1353-7
12. Bonfante-Cabarcas R, Bravo I, Nello C, Gutiérrez-Reyes E, Loureiro Dos Santos NE, Moreno-Yanes JA. Pharmacological doses of Zn²⁺ induce muscarinic cholinergic supersensitivity. *J Biomed Sci.* 2002 Nov-Dec;9(6 Pt 2):639-44
13. Costa LG, Guizzetti M. Muscarinic cholinergic receptor signal transduction as a potential target for the developmental neurotoxicity of ethanol. *Biochem Pharmacol.* 1999 Apr 1;57(7):721-6.
14. Phillips TJ, Shen EH. Neurochemical bases of locomotion and ethanol stimulant effects. *Int Rev Neurobiol.* 1996;39:243-82
15. Scibelli AC, Phillips TJ. Combined scopolamine and ethanol treatment results in a locomotor stimulant response suggestive of synergism that is not blocked by dopamine receptor antagonists. *Alcohol Clin Exp Res.* 2009 Mar;33(3):435-47.
16. Miller MW, Rieck RW. Effects of chronic ethanol administration on acetylcholinesterase activity in the somatosensory cortex and basal forebrain of the rat. *Brain Res.* 1993 Nov 5;627(1):104-12.
17. Freund G, Ballinger WE. Loss of synaptic receptors can precede morphologic changes induced by alcoholism. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1991;1:385-91

Posible efecto antioxidante

de la atorvastatina en individuos hiperlipidemicos

Possible antioxidant effects of atorvastatin in hyperlipidemic individuals

Marielena Muñoz¹, Mercedes Elena Márquez², Maira Soledad Carrizales², Rosalía de Carmen Sutil de Naranjo³, María Esther Gómez⁴, Elias Sukkar⁵, Yulimir Khlaif⁶, Yudith Peña⁶. Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud Escuela de Medicina. Departamento de Farmacología. mmunoz@uc.edu.ve.

¹Especialista en Bioquímica Clínica. Supervisora del Laboratorio del Departamento de Farmacología. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo – Valencia. Venezuela.

²Dra. en Ciencias Médicas. Profesor Titular Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo – Valencia. Venezuela.

³Master en Educación. Mención Investigación. Profesor Titular Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo – Valencia. Venezuela.

⁴T.S.U. en Tecnología en Alimentos. Coordinadora del Laboratorio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) y de Gases del Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo – Valencia. Venezuela.

⁵Lic en Bioanálisis.

⁶Lic. en Bioanálisis. Supervisora del Laboratorio del Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo – Valencia. Venezuela.

Recibido: 06/07/2009

Aceptado: 02/10/2009

Resumen

La Atorvastatina es usada en el tratamiento de hiperlipidemias por su acción de inhibición de la 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A reductasa. Adicionalmente, se ha demostrado que pueden reducir el estrés oxidativo y la susceptibilidad de la LDL-C a la oxidación. Considerando estos efectos pleiotrópicos de la Atorvastatina, se propuso esta investigación con el **Objetivo:** Evaluar el posible efecto antioxidante de la Atorvastatina, sobre los niveles séricos de α -Tocoferol y Retinol en individuos hiperlipémicos. **Metodología:** previo consentimiento informado, a 30 individuos hiperlipidémicos, se les determinó el perfil lipídico, (enzimático-colorimétrico) y vitaminas A y E (HPLC) antes y después de tratamiento por un corto período (7 días) con dosis diferentes de Atorvastatina según criterio médico. **Resultados:** el tratamiento con 10 mg disminuyó significativamente los Triglicéridos, el Colesterol Total y LDL-C, ($p=0.0308$), ($p=0.031$) y ($p=0.0193$), con un incremento del 2,26% en las HDL-C. La dosis de 20 mg intensificó significativamente el efecto mencionado para los triglicéridos, Colesterol total y LDL-C ($p=0.0211$), ($p=0.0001$) y ($p=0.0001$) respectivamente. Los valores de Vitaminas A y E presentaron un incremento significativo con la dosis de 20 mg. **Conclusión:** el tratamiento con Atorvastatina a las dosis de 10 y 20 mg disminuyó Triglicéridos, el Colesterol Total y LDL-C en una forma dosis-dependiente. Este efecto y el incremento de las vitaminas A y E reflejan no sólo un efecto hipolipidemiante, sino además a un efecto pleiotrópico, en este caso antioxidante.

Palabras Claves: Hiperlipidemia, Atorvastatina, Antioxidantes.

Abstract

The Atorvastatin is used in the treatment of hyperlipidaemia owing its action of inhibition 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Additionally, they have showed to reduce oxidative stress and the susceptibility of LDL-C to oxidation. Considering these pleiotropic effects of Atorvastatin this research was proposed with the **Objective:** To evaluate the possible antioxidant effect of the Atorvastatin on the serum levels of α -Tocopherol and Retinol in hyperlipidemia individuals. **Methodology:** prior informed consent, 30 individuals with hyperlipidemia, was analyzed for lipid profile (enzymatic-colorimetric) and vitamins A and E (HPLC) before and after short-term treatment (7 days) with different doses of Atorvastatin. **Results:** Treatment with 10 mg significantly decreased triglycerides, total cholesterol and LDL-C, ($p = 0.0308$), ($p = 0.031$) and ($p = 0.0193$), an increase of 2.26% in HDL-C. The dose of 20 mg intensified significantly the mentioned effect, triglycerides, total cholesterol and LDL-C ($p = 0.0211$), ($p = 0.0001$) and ($p = 0.0001$), respectively. The values of Vitamins A and E showed a significantly increase with dose of 20 mg. **Conclusion:** Treatment with Atorvastatin at doses of either 10 or 20 mg decreased triglycerides, total cholesterol and LDL-C in a dose-dependent manner. The effect and the increase of Vitamin A and E levels could reflect not only a lipid lowering effect, but also a pleiotropic, in this case antioxidant effect.

Key words: Hyperlipidemia, Atorvastatin, Antioxidants.

Introducción

El efecto benéfico de la Atorvastatina, una estatina (inhibidora de la 3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A reductasa) es atribuido a su eficacia en la disminución de los niveles de LDL-C; por otro lado, ha sido demostrado que puede reducir el estrés oxidativo y la susceptibilidad de la LDL-C a la oxidación; el conocimiento de dichos efectos constituye un aporte adicional al beneficio clínico del tratamiento^{1,2,3}.

Puesto que, las estatinas pueden bajar los lípidos y los antioxidantes disminuyen el estrés oxidativo, se ha sugerido que una combinación de estos fármacos puede verse como una propuesta atractiva en la reducción de los niveles de LDL oxidada y del riesgo de enfermedad cardiovascular^{1,4,5,6}.

Tomando en consideración el auge que han tenido las estatinas por sus efectos pleiotrópicos, es importante analizar los cambios que pueden experimentar algunos indicadores del balance oxidativo en el organismo después del tratamiento, a corto plazo, con Atorvastatina, sobre los niveles séricos de α -Tocoferol (Vitamina E) y Retinol (Vitamina A) en individuos hiperlipidémicos y de esta manera evaluar el posible efecto antioxidante de la Atorvastatina.

Metodología

Muestra: Estuvo constituida por 30 Funcionarios de una Policía Municipal en edades comprendidas entre 30 y 50 años, quienes previo consentimiento informado, presentaban Hiperlipidemia y no habían sido tratados con estatinas, no suplementados con antioxidantes, no fumadores, ni poseedores de otras patologías asociadas. Posteriormente se les aplicó tratamiento con Atorvastatina, a las dosis de 10-20 mg según criterio médico.

Se siguió un plan de trabajo de acuerdo al siguiente esquema:

- Toma basal: Donde se determinaron por métodos enzimático-colorimétricos: Colesterol Total, HDL-C, LDL-C, Triglicéridos TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico⁷ y por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) las Vitaminas A (Retinol) y E (α -tocoferol)
- 7 días de tratamiento con Atorvastatina 10-20 mg según criterio médico.
- 2da toma: Donde se determinaron: Colesterol Total, HDL-C, LDL-C, Triglicéridos, TBARS y Vitaminas A (Retinol) y E (α -tocoferol).

Se realizaron determinaciones de malondialdehído (MDA) por el método colorimétrico del ácido tiobarbitúrico modificado, indicador de estrés oxidativo. Valor de referencia **MDA:** 1.34 $\mu\text{mol/L}$ ⁷

La cuantificación de la concentración de alfa tocoferol y Retinol sérico se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), según el método desarrollado por el Internacional Vitamin A Consultive Group y estandarizado para Vitamina A y E por Márquez y col. Valores de referencia antioxidante: **Retinol (R-OH):** Deficiente < 80 $\mu\text{g/dl}$. Suficiente >80 $\mu\text{g/dl}$ **Tocoferol (T-OH):** Deficiente < 1300 $\mu\text{g/dl}$. Suficiente >1300 $\mu\text{g/dl}$ ⁸.

Técnicas de análisis estadístico:

Los resultados obtenidos fueron analizados a través del programa INSTAD 3 para Windows calculando medidas de tendencia central (promedios) y medidas de dispersión (desviación estándar). Se utilizaron métodos de análisis paramétricos ("t" de student), se aplicó el Kolmogorov-Smirnov encontrándose distribución normal de los datos.

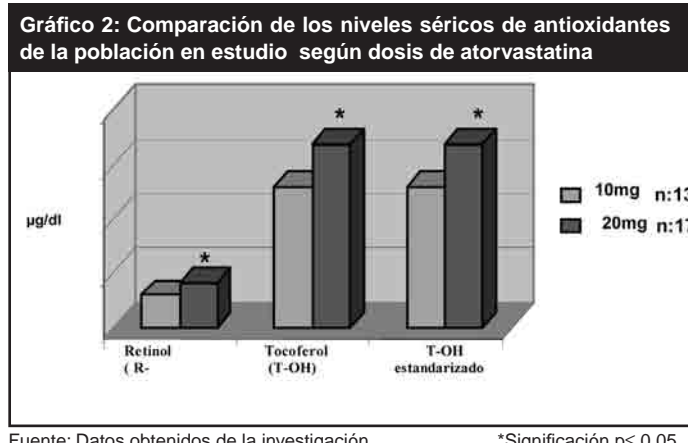
Resultados

La población en estudio estuvo constituida por 30 Funcionarios de una Policía Municipal en edades comprendidas entre 30 y 50 años. La distribución por sexo mostró un 57% del sexo masculino y 43% del sexo femenino (Gráfico I).

En la **Tabla 1**, se describen las características de la población en estudio presentados en promedios y desviaciones estándares así como también los valores máximo y mínimo de cada variable; el promedio de edad obtenido fue de 38,22 \pm 6,46; los valores de Glicemia y de Presión Arterial media estuvieron dentro de los valores referenciales. Los lípidos séricos evidencian niveles por encima de los valores referenciales a excepción del HDL-C cuyo valor promedio fue de 41,33 \pm 8,74mg/dl. Los valores de TBARS disminuyeron significativamente ($p \leq 0,05$) al aplicar el tratamiento. En cuanto a los antioxidantes estudiados se encontró que el promedio de Retinol fue de 150,64 \pm 56,52 $\mu\text{g/dl}$, considerándose suficiente según los valores de referencia mientras que el Tocoferol mostró un nivel deficiente de acuerdo a los valores referenciales (667,20 \pm 306,54 $\mu\text{g/dl}$). El Tocoferol estandarizado a los lípidos mostró un promedio de 667,20 \pm 297,57 $\mu\text{g/dl}$.

La **Tabla 2** se refleja la comparación de los lípidos antes y después del tratamiento a corto plazo con 10 mg de atorvastatina, donde el Colesterol Total disminuyó significativamente $p = 0,0031$. Igual comportamiento mostraron los niveles de LDL-C $p = 0,0193$ y los Triglicéridos $p = 0,0308$. Las HDL-C se mantuvieron en el tiempo siendo sus niveles semejantes a los valores basales. En el tratamiento con 20 mg de atorvastatina, (mostrados en la **Tabla 3**) se observó una disminución estadísticamente significativa para Colesterol Total $p = 0,0001$, LDL-C $p = 0,0001$ y Triglicéridos $p = 0,0211$. Por el contrario para HDL-C se observaron valores muy semejantes con respecto a los obtenidos antes de aplicar el tratamiento. En la **Tabla 4 y 5** se comparan los antioxidantes antes y después del tratamiento a corto plazo con 10 mg y 20 mg de atorvastatina, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa..

El **Gráfico 2**, se observa un aumento estadísticamente significativo entre los valores de Retinol con la dosis de 10 mg y 20 mg ($p = 0,0142$) de atorvastatina. Esto también se encontró para los valores de Tocoferol para 10 mg y para 20 mg ($p = 0,0156$). Así mismo, para el tocoferol estandarizado a los lípidos, se pudo observar aumento significativo con la dosis de 20 mg ($p = 0,0152$).



Fuente: Datos obtenidos de la investigación.

*Significación $p \leq 0,05$

Tabla 1: Características de la población en estudio

| Variables | n | Media | Desviación Estándar | Valor Mínimo | Valor Máxima |
|---------------------------------|----|--------|---------------------|--------------|--------------|
| Edad | 30 | 38,22 | 6,46 | 30 | 50 |
| Glicemia (mg/dl) | 30 | 90,23 | 9,71 | 72 | 109 |
| Presión Arterial Sistólica | 30 | 124 | 10,70 | 110 | 140 |
| Presión Arterial Diastólica | 30 | 74,33 | 7,28 | 60 | 80 |
| Presión Arterial Media | 30 | 90,88 | 7,47 | 76,67 | 100 |
| Colesterol Total (mg/dl) | 30 | 216,33 | 31,91 | 163 | 297 |
| HDL Colesterol (mg/dl) | 30 | 41,33 | 8,74 | 23 | 63 |
| LDL Colesterol(mg/dl) | 30 | 134,3 | 40,79 | 60 | 248 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 30 | 216,96 | 101,15 | 85 | 465 |
| TBARS Basal (µmol/L) | 30 | 2,69 | 2,45 | 0,26 | 7,94 |
| 7 días | 30 | 1,18 | 0,98 | 0,16 | 3,98 |
| Retinol (R-OH) µg/dl | 30 | 150,64 | 56,52 | 98,83 | 312,41 |
| Tocoferol (T-OH) µg/dl | 30 | 667,20 | 306,54 | 353,19 | 1741 |
| TOH Estandarizado a los lípidos | 30 | 667,20 | 297,57 | 335,02 | 1733,2 |

Tabla 2: Comparación de los lípidos séricos en individuos hiperlipidemicos antes y después del tratamiento a corto plazo con 10 mg de atorvastatina

| Variables | n | Antes | | Después | | Valor de p |
|--------------------------|----|--------|---------------------|---------|---------------------|------------|
| | | Media | Desviación Estándar | Media | Desviación Estándar | |
| Colesterol Total (mg/dl) | 13 | 202,84 | 22,88 | 165,23 | 34,92 | *0,0031 |
| HDL Colesterol (mg/dl) | 13 | 41,07 | 7,62 | 42 | 8,17 | 0,6864 |
| LDL Colesterol(mg/dl) | 13 | 123,76 | 32,99 | 94,23 | 30,52 | *0,0193 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 13 | 179,92 | 62,44 | 146,15 | 42,45 | *0,0308 |

*Significación $p \leq 0,05$

Tabla 3: Comparación de los lípidos séricos en individuos hiperlipidemicos antes y después del tratamiento a corto plazo con 20 mg de atorvastatina

| Variables | n | Antes | | Después | | Valor de p |
|--------------------------|----|--------|---------------------|---------|---------------------|------------|
| | | Media | Desviación Estándar | Media | Desviación Estándar | |
| Colesterol Total (mg/dl) | 17 | 226,64 | 34,54 | 162,23 | 29,85 | *0,0001 |
| HDL Colesterol (mg/dl) | 17 | 41,52 | 9,74 | 39,88 | 8,83 | 0,5149 |
| LDL Colesterol(mg/dl) | 17 | 142,35 | 45,16 | 87,58 | 34,08 | *0,0001 |
| Triglicéridos (mg/dl) | 17 | 245,29 | 116,85 | 174,52 | 74,72 | *0,0211 |

*Significación $p \leq 0,05$

Tabla 4: Comparación de antioxidantes en individuos hiperlipidemicos antes y después del tratamiento a corto plazo con 10 mg de atorvastatina

| Variables | n | Antes | | Después | | Valor de p |
|---------------------------------|----|--------|---------------------|---------|---------------------|------------|
| | | Media | Desviación Estándar | Media | Desviación Estándar | |
| Retinol (R-OH) µg/dl | 13 | 133,43 | 31,58 | 121,07 | 29,71 | 0,0919 |
| Tocoferol (T-OH) µg/dl | 13 | 577,19 | 127,97 | 519,65 | 117,64 | 0,1979 |
| TOH estandarizado a los lípidos | 13 | 556,13 | 151,56 | 519,64 | 110,29 | 0,4270 |

*Significación $p \leq 0,05$

Tabla 5: Comparación de antioxidantes en individuos hiperlipidémicos antes y después del tratamiento a corto plazo con 20 mg de atorvastatina

| Periodo | Antes | | | Después | | Valor de p |
|--|-----------|---------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------|
| Variables | n | Media | Desviación Estándar | Media | Desviación Estándar | |
| Retinol (R-OH) µg/dl | 17 | 163,80 | 67,97 | 164,59 | 58,79 | 0,9711 |
| Tocoferol (T-OH) µg/dl | 17 | 736,03 | 382,65 | 676,86 | 210,49 | 0,4237 |
| TOH estandarizado a los lípidos | 17 | 736,03 | 375,32 | 676,87 | 214,32 | 0,4227 |

*Significación p ≤ 0,05

Discusión

La Hiperlipidemia mixta está asociada con un incremento de la incidencia en las enfermedades cardiovasculares (ECV). La misma cursa con un aumento en el Colesterol Total y de la fracción de su lipoproteína LDL-C así como también de los Triglicéridos^{9,10,11}. El abordaje terapéutico en estos pacientes debe iniciarse con un programa dietético, sin embargo en la mayoría de los casos hay que hacerlo farmacológicamente.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el posible efecto antioxidante de la Atorvastatina (inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa). Para ello se seleccionó un grupo de estudio homogéneo de edad, no fumadores, con glicemia y presión arterial dentro de la normalidad según Séptimo Informe del Comité Nacional sobre Prevención, Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipertensión Arterial¹², constituido por individuos con hiperlipidemia a los cuales, se les aplicó un tratamiento a corto plazo (agudo) con atorvastatina en dosis de 10 y 20 mg.

Al analizar el perfil lipídico de la población estudiada, los valores promedio de Colesterol Total, LDL-C y Triglicéridos, se ubicaron fuera de los valores referenciales según el Consenso Venezolano de lípidos¹³, por lo tanto se partió de un grupo de pacientes hiperlipidémicos. Una vez aplicado el tratamiento a corto plazo con atorvastatina, se observó una disminución significativa en dichos lípidos; al desglosarlos se observa que el Colesterol Total disminuyó en un 81,4% con la dosis de 10 mg, efecto menor es reportado por Cangemi y cols.⁴, quienes administraron atorvastatina también en dosis de 10 mg y a los 3 días observaron una disminución del colesterol en 24,9%. En este orden de ideas, otros investigadores¹⁴, estudiaron 41 pacientes dislipidémicos de los cuales 26 eran hipercolesterolémicos y 21 cursaban con hiperlipidemia mixta (aumento de Colesterol Total y Triglicéridos) los cuales recibieron 10 mg de atorvastatina por 6 semanas observando un efecto mayor como hipocolesterolémico. En contraste con este último estudio, los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la atorvastatina a 10 mg disminuyó significativamente tanto Colesterol Total como Triglicéridos. En relación a la LDL-C (lipoproteína altamente aterogénica), estudios realizados por Poli, A¹⁵ encontraron que la atorvastatina fue una de las estatinas más efectivas no solo por sus efectos sobre la LDL-C, sino también por su capacidad de disminuir los niveles de Triglicéridos y la capacidad de modificar la composición de la lipoproteína en una forma no aterogénica; reportando una sustancial disminución de los niveles de LDL-C (entre 40-60 mg/dl) en pacientes con eventos cardiovasculares, comparado con altos niveles previos. Los resultados obtenidos en esta investiga-

ción muestran una disminución significativa de los valores de LDL-C, luego de aplicado el tratamiento a corto plazo con atorvastatina en un 76,13% con la dosis de 10 mg/día y con la dosis de 20 mg diarios descendieron las LDL-C en un 61,52% en tan solo 7 días de tratamiento reforzando lo antes dicho sobre la efectividad del fármaco, y coincidiendo con lo ya reportado por Marchesi y col.¹⁶, quienes encontraron una disminución del 75% en las LDL-C después de tratamiento con 10 mg de atorvastatina por 7 días. Igualmente en los niveles de Triglicéridos fue encontrada una disminución del 81,2% y de 71,14% con el tratamiento a corto plazo de la atorvastatina en dosis de 10 y 20 mg respectivamente.

Así mismo, la eficacia de la atorvastatina sobre los lípidos en general (Triglicéridos, Colesterol Total y sus fracciones: LDL-C y HDL-C) fue reportada por Jeetesh y cols.¹⁷, quienes realizaron un estudio de 33 pacientes hiperlipidémicos por 4 semanas los cuales recibieron 10 mg/día del fármaco observando una reducción significativa de Colesterol Total, LDL-C y Triglicéridos, mientras que no observaron cambios en las HDL-C, en el presente estudio, a esta dosis la atorvastatina incremento en un 2,26% la HDL-C.

En estudios recientes, las estatinas han sido señaladas como potentes inhibidoras de estrés oxidativo; de hecho Violi y col¹⁸ demostraron que en pacientes con hipercolesterolemia, la administración de una estatina tuvo relación con la reducción de isoprostanos urinarios, marcadores de estrés oxidativo y con la normalización de los niveles circulantes de Vitamina E, indicando que estos fármacos contribuyen a modificar el estado antioxidante. En investigaciones realizadas⁴, en 30 pacientes hipercolesterolémicos, a los cuales se les administró dieta más atorvastatina en dosis de 10 mg/día encontraron un incremento en los niveles de Vitamina E y una disminución de Colesterol Total indicando un independiente y temprano efecto antioxidante de la atorvastatina al modificar los niveles de Vitamina E.

En relación a los resultados obtenidos en este estudio se observó que los individuos hiperlipidémicos luego del tratamiento a corto plazo con atorvastatina, mostraron una leve disminución de los niveles séricos de las Vitaminas A y E, debido probablemente a que la hiperlipidemia indujo incremento de la peroxidación lipídica en un 43,86% reflejado en los valores de TBARS, lo que trajo como consecuencia el consumo de las vitaminas antioxidantes. Sin embargo se observa una tendencia al aumento, cuando se administra la atorvastatina en 20 mg/día, siendo significativo cuando es analizado estadísticamente, lo que indica que a mayor dosis se modifican los valores de las vitaminas. Es necesario recordar que este estudio es a corto plazo y que los resultados obtenidos pudieran conllevar a un aumento en los

niveles séricos de las vitaminas en estudios a largo plazo donde posiblemente al disminuir los lípidos por efecto de la atorvastatina, desciende la peroxidación lipídica, por ende el estrés oxidativo y por lo tanto el consumo de las vitaminas antioxidantes tendiendo a mejorar la circulación de las vitaminas en el tiempo. En este sentido, ya en el 2000 Kawai y cols.¹⁹, señalaron que los niveles de vitaminas disminuyeron durante el estrés oxidativo debido a que los glóbulos rojos utilizan los almacenes séricos para protegerse del daño producido por los procesos oxidativo; en este orden de ideas en el 2004 Kolwalski y col⁶ encontraron una reducción significativa en los valores de MDA en eritrocitos y plasma, concluyendo que la capacidad antioxidante de la atorvastatina condujo a disminuir el estrés oxidativo, hallazgo semejante observado en la presente investigación. Otros estudios sobre como interviene la atorvastatina en el estrés oxidativo fue descrito por Delliaux y cols.²⁰, quienes analizaron los efectos de la atorvastatina sobre el estado oxidante-antioxidante inducido por el ejercicio en 10 pacientes dislipidémicos que recibieron 10 mg/día del fármaco por 6 meses y 13 sujetos sedentarios a los cuales les fue medido las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), encontrando que la atorvastatina redujo la actividad oxidante-antioxidante y el estrés oxidativo inducido por el ejercicio.

La mejora del estrés oxidativo, observado en esta investigación y reflejado con el retorno de los lípidos a los valores de referencia, pudiera ser atribuido al tratamiento con la atorvastatina, coincidiendo con los estudios realizados por Kural y cols.²¹, quienes concluyeron que la terapia con la atorvastatina en pacientes hiperlipidémicos disminuye el estrés oxidativo especialmente en pacientes con valores de HDL-C ubicados dentro de los valores referenciales considerados normales., situación semejante a la observada en el presente estudio.

Numerosos investigadores han analizado el rol de las vitaminas A, E y C en los procesos oxidativos denominándolas incluso barredoras de radicales libres^{1,22,23,24}. Adicionalmente, a la Vitamina E se le han atribuido efectos regulatorios de la agregación plaquetaria, inhibición de las fosfolipasa A₂, modulación de prostaglandinas y leucotrienos actuando de esta manera en los procesos inflamatorios^{23,25,26}.

En el mismo orden de ideas, Tousoulis y cols.²⁷ evaluaron el efecto de la administración de bajas dosis de atorvastatina (10mg/día), y Vitamina E (400 UI/día) sobre marcadores inflamatorios asociados a un elevado estatus de estrés oxidativo en pacientes con hipercolesterolemia y aterosclerosis avanzada; para ello estudiaron 38 pacientes, donde unos recibieron atorvastatina y otros atorvastatina más vitamina E, encontrando una disminución significativa de los marcadores inflamatorios con atorvastatina concluyendo entonces que el tratamiento con bajas dosis del fármaco mejoran la función endotelial y reducen la expresión de citoquinas proinflamatorias, efectos también deprimidos por la vitamina E.

En consecuencia y basándose en los resultados obtenidos en los pacientes hiperlipidémicos, el tratamiento con atorvastatina por un corto período de tiempo (7 días) a la dosis de 10 y 20mg disminuyó los Triglicéridos, el Colesterol Total

y su fracción LDL-C en una forma dosis-dependiente, con un incremento del 2,26% en las HDL-C solo con la dosis de 10mg de atorvastatina. Similar a estos hallazgos, se observó que con las vitaminas antioxidantes A y E, a la dosis de 10mg de atorvastatina, la concentración de dichas vitaminas disminuyó discretamente; asumiendo la depleción de los depósitos de Vitaminas A y E como un mecanismo compensatorio del organismo, ante el incremento del estrés oxidativo inducido por la hiperlipidemia. Al analizar el comportamiento a la dosis de 20 mg de atorvastatina, se encontró un aumento significativo en los valores de ambas vitaminas, lo cual permite inferir que a mayor dosis de atorvastatina se incrementan las concentraciones séricas de las vitaminas antioxidantes A y E y por ende ofertan su mayor disponibilidad para controlar el estrés oxidativo. Estos efectos reflejan no solo un efecto hipolipidemiante, sino además un efecto pleiotrópico: antioxidante de la atorvastatina.

Referencias

1. Rosenson, R. (2004) Statins in atherosclerosis: lipids lowering agents with antioxidant capabilities Review. *Atherosclerosis* 173, 1-12.
2. Cangemi R. Loffredo L. Carnevale R. Pignatelli P. Violi F. (2008a). Statins enhance circulating vitamin E. *Int J Cardiol.* 11:123(2):172-4.
3. Liao, J.K. Laufs U. (2005). Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89-118.
4. Cangemi R. Loffredo L. Carnevale R. Perri L. Patrizi MP. Sanguigni V. Pignatelli P. Violi F. (2008b). Early decrease of oxidative stress by atorvastatin in hypercholesterolaemic patients: effect on circulating vitamin E. *Eur Heart J.* 29(1): 54-62.
5. Kapur, NK.; Musunuru, K. (2008). Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag.* 4(2):341-53.
6. Kowalski, J.; Pawlicki, L.; Grycewicz, J.; Blaszczyk, J.; Irmanski, R.; Ceglinski, T.; Kowalczyk, E. (2004) Plasma antioxidative activity during atorvastatin and fluvastatin therapy used in coronary Herat disease primary prevention. *Fundam Cin Pharmacol.* 18(1):93-6.
7. Cano C, Bermúdez V, Sulbarán G, Morales R, Medina M, Amell A, Souki A, Ambard M, Nuñez M, Garcia D, Restrepo H, Vargas M.E, Seyfi H y Cruz S. (2001). Influencia de la edad y el sexo en el balance oxidación/antioxidación. *Arch. Ven. Farmacol. Ter.* 20(1):63-68.
8. Márquez, M.; Yépez, C.E.; Sutil-Naranjo, R.; Rincón, M. (2002). Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. *Investigación Clínica* 43:191-204.
9. Van Ganse, E.; Laforest, L.; Burke, T.; Phatak, H.; Souchet, T. (2007) Mixed Dyslipidemia among patients using lipid-lowering therapy in French general practice: an observational study. *Clin Ther.* 29(8): 1671-81.
10. Avisar I.; Brook JG. Wolfovitz E. (2008). Atorvastatin monotherapy vs. combination therapy in the management of patients with combined hyperlipidemia. *Eur J Intern Med.* 19(3):203-8.
11. Nicholls, S.J.; Tuzcu, E.M.; Sipahi, I.; Grasso, A.W.; Schoenhagen, P.; Hu, T.; Wolski, K.; Crowe, T.; Desai, M.Y.; Hazen, S.L.; Kapadia, S.R.; Nissen, S.E. (2007) Statins high-density. Lipoprotein cholesterol, and regression of coronary atherosclerosis. *JAMA* 7.297(5): 499-508.
12. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC7).

Traducción de la Versión Original en inglés publicada en 2003.

13. Consenso Venezolano de Lipidos. International Lipid Information Bureau. Capitulo Venezuela. Park Davis, 2000. pp 1-39.
14. Cihan Örem, Hüseyin Avni Uydu, Remzi Yılmaz, Mustafa Gökce, Mehrih Baykan, Selcuk Eminagaoglu and Asim Örem (2004) The Effect of Atorvastatin Treatment on the Fibrinolytic System in Dyslipimemic Patients Japanese Hear Journal. 45(6):977-987.
15. Poli A (2007). Atorvastatin: pharmacological characteristics and lipid-lowering effects. *Drugs*. 67(1): 3-15.
16. Marchesi S, Lupattelli G, Siepi D, Schillaci G, Vaudo G, Roscini AR, Sinzinger H, Mannarino E. (2000) Short-term atorvastatin treatment improves endothelial function in hypercholesterolemic women. *J. Cardiovasc Pharmacol*. 36(5):617-21.
17. Jeetesh, V. Patel, Sandeep Gupta, Frank Lie, and Hughes Elizabeth A. (2005). Efficacy and Safety of Atorvastatin in South Asian Patients with Dyslipidemia: An Open Label Noncomparative Pilot Study. *Vasc Health Risk Manag*.; 1(4): 351-356.
18. Violi, F.; Cangemi, R. (2008) Statin treatment as a confounding factor in human trial with vitamin E. *J Nutr*. 138(6):1179-81.
19. Kawai, Y.; Shimomitsu, T.; Takanami Y.; Murase, N.; Katsumura, T.; Maruyama, C. (2000). Vitamine E Levels Changes in Serum and Red Blood Cells Due To Acute Exhaustive Exercise in Collegiate Women. *Journal of Nutritional Sciences*. 46. 119-124.
20. Delliaux, S.; Steinberg JG.; Bechis, G.; Paganelli, F.; Oliver, C.; Lesavre, N.; Jammes, Y. (2007). Statins alter oxidant-antioxidant status and lower exercise-induced oxidative stress. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 45(4):244-52.
21. Kural, B.V.; Orem, C.; Uydu, H.A.; Alver, A.; Orem, A. (2004). The effects of lipid-lowering therapy on paraoxanase activities and their relationships with the oxidant-antioxidant system in patients with dyslipidemia. *Coron Artery Dis*. 15(5):277-83.
22. Yépez, R.D.; Rivas de Yépez, C.E.; Sutil de Naranjo R.; Márquez, A. (2006) Vitaminas antioxidantes y catarata. *Revista Oftalmológica Venezolana*. 62(2):55-64.
23. Barbosa K, Bressan J, Zulet M, Martínez Hernández J. (2008) Influence of dietary intake on plasma biomarkers of oxidative stress in humans. *An Sist Sanit Navar*. 1;31(3):259-280.
24. Durant, R; Klouche, K; Delbosc, S; Morena, M; Amigues, L; Beraud, J; Canaud, B; Cristol, J. (2004.) Superoxide anion overproduction in sepsis: effects of vitamin E and simvastatin. *Shock*. 22(1):34-39.
25. Márquez, M; Yépez, C; Sutil de Naranjo, R; Rincón, M. (2003) Vitaminas E y A: Aspectos Básicos y su importancia en la Aterosclerosis. *Clínica de Dislipidemias*. Dpto. de Farmacología, Escuela de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud. Editado por Universidad de Carabobo-Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Venezuela.
26. Tam, L.S.; Li, E.K.; Leung, V.Y.; Griffith, J.F.; Benzie, I.F.; Lim, P.L.; Whitne, B.; Lee, V.W.; Lee, K.K.; Thomas, G.N.; Tomlinson, B. (2005). Effects of vitamins C and E on oxidative stress markers and endothelial function in patients with systemic lupus erythematosus: a double blind, placebo controlled pilot study. *J Rheumatol*. 32(2):275-82.
27. Tousoulis, D.; Antoniades C.; Vassiliadou, C.; Toutouza, M.; Pitsavos, C.; Tentolouris, C.; Trikas, A.; Stefanadis, C. (2005). Effects of combined administration of low dose atorvastatin and vitamin E on inflammatory markers and endothelial function in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 7(7):1126-32.

La Revista Latinoamericana de Hipertensión es indexada por:

**SCIENCE CITATION INDEX EXPANDED (SciSearch)
JOURNAL CITATION REPORTS/SCIENCE EDITION
LATINDEX**

**LIVECS (Literatura Venezolana para la Ciencias
de la Salud)**

**LILACS (Literatura Latinoamericana y del Caribe
en Ciencias de la Salud)**

ELSEVIER BIBLIOGRAPHIC DATABASES:

EMBASE

Compendex

GEOBASE

EMBIology

Elsevier BIOBASE

FLUIDEX

World Textiles

Scopus

www.lash-hipertension.org

Solicítela a través del e-mail:

latinoamericanadehipertension@gmail.com



www.lash-hipertension.org

Iatrogenic equine

metabolic syndrome in thoroughbred horses

Abelardo Morales, Francisco García, Víctor Bermúdez, María Morales, Luís Leal, Pedro López, Gilberto Planas, Carlos Rodríguez.

Department of Veterinary Pathology Faculty of Veterinary Science, Central University of Venezuela, Aragua State (AM, FG, VB); National Racetrack "La Rinconada" Caracas Venezuela (LL, PL, GP, CR). Maternity "Concepción Palacios" Caracas, Venezuela (MM).

Corresponds author: Abelardo Morales Department of Veterinary Pathology Faculty of Veterinary Science, Central University of Venezuela, Aragua State. Building 3, office 3, Campus Maracay.

Phone: 058 0243 550 60 29. Telefax: 058 0243 550 60 29. Cell phone: 058 0414 4563101

Recibido: 08/09/2009

Aceptado: 02/10/2009

Summaries

Reasons for performing study: Equine metabolic syndrome (EMS) is a cluster of problem that includes obesity, insulin resistance and laminitis. In EMS peripheral adipocytes synthesize adipokines which are analogous to cortisol, resulting in Cushing syndrome like-signs and insulin resistance. The used of dexamethasone and triancinolone is very common and not permitted.

Hypothesis or Objectives: The objective of this study was to describe metabolic syndrome iatrogenic in Thoroughbred horses.

Methods: Were studied 22 Thoroughbred horses (12 female and 10 male), between 2-5 years old, in the national race Track "La Rinconada" Caracas-Venezuela. All equine were euthanized and study by necropsy. Samples were collected from the adrenal glands, gastric mucosa, pancreas, kidneys, liver, spleen, lungs, heart and adenohipofisis. Tissue sections were prepared and stained with Hematoxilín & Eosín (H&E) for light microscopy.

Results: Clinical signs were polyuria, polydipsy and secondary diabetes mellitus, recurrent infection, lethargie, laminitis and weight loss syndrome. Were isolates of recurrent in-

fection: *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter cloacae*. Necropsy revealed: weight loss, loss fatty subcutaneous, xantomatosis of subcutaneous tissue. Abscess in coxal tuberos, facial and shoulder region. Liver was swollen, friable and icteric. Renal cortical and papillary necrosis. Equine gastric ulcer syndrome severed. Liver with periacinar necrosis with a prominent acinar pattern and fatty degeneration severed. Necrosis and vacuolar (glycogen) degeneration islets of langerhans, fibrosis and chronic. Renal cortical and medullary necrosis, acute tubular necrosis and glycogen nephrosis, glomerulonephritis membranous. Hemorrhages in adrenal cortex and atrophy cortical.

Conclusions: These results suggest a iatrogenic EMS in Thoroughbred associated with overdose and chronic dexamethasone and triancinolona.

Potential relevance: This article is a clinical study, laboratory, bacterial, macroscopic and histopathological describing the clinical pathologic presentation of metabolic syndrome pathological in Thoroughbreds horses associated with overdose and chronic dexamethasone and triancinolona.

Keys words: Equine, metabolic, Thoroughbred, iatrogenic.

Introduction

The term metabolic syndrome (MS) refers to a clustering of risk factors of metabolic origin that promote the development of cardiovascular disease and type 2 diabetes. Metabolic syndrome includes such pathological factors as insulin resistance, hyperinsulinemia, abdominal obesity, impaired glucose tolerance, type 2 diabetes, microalbuminuria, high level of triglycerides, low level of HDL cholesterol, elevated blood pressure, and proinflammatory and prothrombotic state (Pacholczvk et al 2008). Equine metabolic syndrome (EMS) is a cluster of problem that includes obesity, insu-

lin resistance and laminitis. In EMS peripheral adipocytes synthesize adipokines which are analogous to cortisol, resulting in Cushing syndrome like-signs and insulin resistance. In Venezuela phenylbutazone and furosemide only are permitted in the racecourse of Thoroughbred horses. The used of dexamethasone and triancinolone is very common in horses and not permitted in national race trak from Venezuela. Certain management practices tend to promote the development of obesity (metabolic syndrome) in mature horses as they enter their teenage years. These manage-

ment practices include the provision of starch-rich (high glycemic index) and fat-supplemented rations to healthy horses that are relatively inactive. Some horse breeds and ponies appear to be genetically predisposed to metabolic syndrome. The accretion of intra-abdominal adiposity by equids is associated with the development of insulin insensitivity (hyperinsulinemia), glucose intolerance, dyslipidemia, hypertension, and insidious-onset laminitis (Johnson 2002; Eustace 2002). Omental adipocytes are metabolically active, secreting free fatty acids and hormonally active mediators including cortisol, leptin, and resistin that might contribute to persistence and worsening of insulin refractoriness and the obese phenotype. We have hypothesized that obesity-associated laminitis arises as a consequence of vascular changes and a hypercoagulable state, similar to the development of atherosclerosis in human type 2 diabetes (Johnson 2002). Several molecular mechanisms that might serve to explain the development of insulin insensitivity as a result of excessive adiposity have been incriminated (Johnson 2002). Obesity, insulin resistance, hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia are components of an equine metabolic syndrome phenotype associated with increased laminitis risk in horses. Links between these conditions and laminitis must still be elucidated, but human medicine provides candidate mechanisms for future study, including inflammation associated with obesity, vascular compromise induced by insulin resistance, and endothelial dysfunction (Geor and Frank 2009). Clinically affected horses range in age from 6 to 20 years, but rarely are these horses presented initially as geriatric horses, unless undiagnosed until this time. Breed predilection has been observed and has been reported for some pony breeds, domesticated Spanish mustangs, Peruvian Paso's, Paso Fines, European Warmbloods, American Saddlebreds, and Morgan Horses. One common similarity among affected horses is a tendency for obesity; specific locations of fat deposition include crest of the neck, over the gluteus region, and in geldings commonly the prepuce is quite thickened with adipose tissue. Affected female horses are noted for their difficulty in being successfully bred and demonstrate abnormal ovarian cycling activity. Managers of affected horses describe these horses to "live on air" and in many cases this is despite a significant effort implemented to try to improve the horses' body condition. Upon examination of these horses, either with an ultrasound or during exploration of the peritoneal cavity significant intraabdominal fat is observed. In many cases, the presenting complaint includes a history of laminitis, many clinicians have observed the strong association between the development of laminitis in horses with EMS. The objective of this study was to describe metabolic syndrome iatrogenic in Thoroughbred horses.

Material and methods

Animals: Were studied 22 Thoroughbred horses (12 female and 10 male), between 2-5 years old, in the National Race Track "La Rinconada" Caracas-Venezuela.

Clinical signs: were polyuria, polydipsy, secondary diabetes mellitus, recurrent infection of skin, lethargy, laminitis and weight loss syndrome (Figure 1). All equine were treatment

with dexamethasone (2,2 mg/kg IA weekly for 2 months) and triamcinolone (0,09 mg/kg IM weekly for 2 months).

Hematological and Biochemistry: Bloods of sample were collected ante mortem (Aluja and Constantino 2002). Samples were processed to measure with automatic prosecution equipment: Hemoglobin g/L, Hematocrit %, Protein g/L, Leucocytes $\times 10^9$ /L. Urea Nitrogen mmol/L, Creatinine μ mol/L, Glucose mmol/L, cholesterol mmol/L, Cortisol nmol/L, Bilirubin Total μ mol/L, Unconj μ mol/L, Conj μ mol/L. Alkaline phosphatase U/L, Lactate dehydrogenase U/L, Sorbitol dehydrogenase U/L, Creatin Phosphokinase U/L, Transaminases Aspartate amino U/L, Alanine amino UL, Albumin and Globulin.

Necropsy and histology: All equine were euthanized and study by necropsy (Aluja and Constantino 2002). Samples of tissue were collected from the adrenal glands, gastric mucosa, pancreas, kidneys, liver, spleen, lungs, heart, skin and adenohypofisys (Aluja and Constantino 2002).. Tissue sections were prepared and stained with Hematoxilin & Eosin (H&E) for light microscopy (Banks 1996)

Culture: Were isolates of recurrent infection: Salmonella sp., E. coli, Streptococcus sp, Staphylococcus, Enterococcus faecalis and Enterobacter cloacae. Antibiogram revealed whose resistance to gentamicin, ciprofloxacin and nalidixic acid.

Results

Necropsy: revealed weight loss, loss fatty subcutaneous, xantomatosis of subcutaneous tissue (Figure 1). Abscess in coxal tuberos, facial and shoulder region. Multiples hemorrhages in the adrenal cortex (Figure 2). Liver was swollen, friable with fibrosis chronic and icteric. Multifocal necrotic areas were present in the other lobes (Figure 8). Renal cortical and papillary necrosis, acute tubular necrosis (Figure 4). Nine equine (female) presented pyelonefritis abscess and cystitis. Spleen presented severed congestion, hemorrhage. Equine gastric ulcer syndrome severed and ten with colitis chronic (Figure 6). Edema and hemorrhage pulmonary. Petchiae epicardial hemorrhage. Two horses with epicardial abscess. Severe laminitis chronic were observed in all cases with the distal phalanx is torn from the inner hoof wall cells of the lamellar epidermis survive, proliferate to form the weak, flaky lamellar wedge. The hoof distal phalangeal bond had weakened and the distal phalanx had descended into the hoof capsule. Crescent-shaped zone of necrosis. Osteomyelitis were observed in 16 equine.

Histology: Liver with periacinar necrosis with a prominent acinar pattern and fatty degeneration severed (Figure 9). Centre-acinar necrosis and bilirubin cluster. Necrosis and vacuolar (glycogen) degeneration islets of langerhans, fibrosis and chronic. Renal cortical and medullary necrosis, acute tubular necrosis, degeneration vacuolar and glycogen nephrosis, glomerulonephritis membranous (Figure 5). Hemorrhages in adrenal cortex, capsule thickening and atrophy cortical with coagulation necrosis of zona glomerulosa, coagulation necrosis focal zona fasciculata and coagulation necrosis, congestion of the zona reticularis (Figure 3). Spleen germinal center development within the lymphoid follicles should be noted as decreased. Reactive extramedullary hematopoiesis may be seen in conjunction with conditions that

target the destruction of lymphocytes. Decreased cellularity of the lymphoid follicles, marginal zone and red pulp region were presented. Chronic gastritis surface, erosion focal and hyperkeratosis infiltrated of lymphocytes in the lamina propria (Figure 7). Chronic colitis lymphoplasmocytic. Laminitis and osteomyelitis were showed cause failure of the hoof-distal phalanx bond the epidermal lamellae are stretched beyond their normal limits and significant epidermal lamellar necrosis.

Hematology and biochemistry: value average were Hemoglobin 52-60 g/L, Hematocrit 30-28%, Protein 25-32 g/L, Leucocytes 5,3-6,2 x 10⁹/L. Urea Nitrogen 19-21 mmol/L, Creatinine 125-130 µmol/L, Glucosa 7,27-8,8 mmol/L, cholesterol 4,7-5,4 mmol/L, Cortisol 450-520 nmol/L, Bilirrubin Total 25,2-29,5 µmol/L, Unconj 16,6-18,2 µmol/L, Conj 9,6-11,3 µmol/L. Alkaline phosphatase 61,0 -62 U/L, Lactate dehydrogenase 17,7-18,1 U/L, Sorbitol dehydrogenase 2,2-3,6 U/L, Creatin Phosphokinase 46,4-48,1 U/L, Transaminases Aspartate amino 167,2- 170 U/L, Alanine amino 3,8-4,7 UL. Albumin 22-26 g/L, Globulin 21-25 g/L.

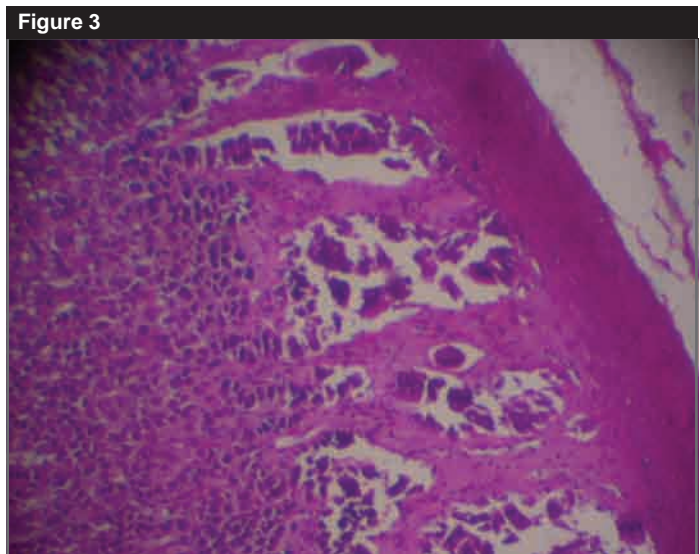
Culture: Were isolates of recurrent infection: *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Streptococcus sp*, *Staphylococcus*, *Enterococcus faecalis* and *Enterobacter cloacae*. Antibiogram revealed whose resistance to gentamicin, ciprofloxacin and nalidixic acid.



Equine with iatrogenic equine metabolic syndrome with weight loss. Abscess in coxal tuberous, facial and shoulder region and lesion of skin.



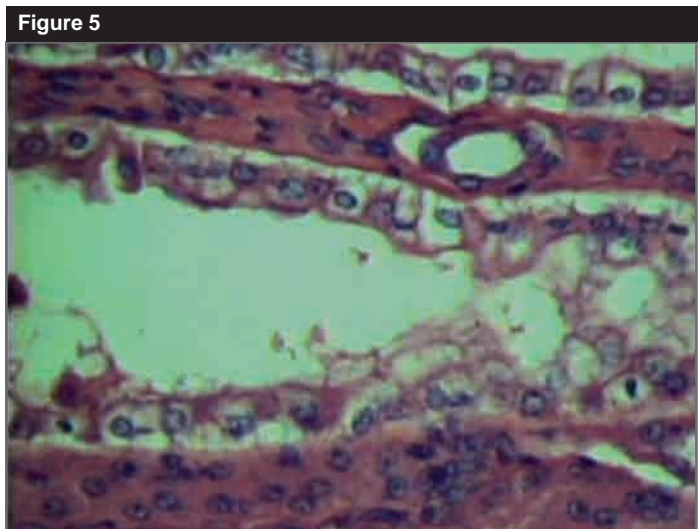
Adrenal glands of equine with atrophic and multiples hemorrhages in the adrenal cortex



Adrenal glands histology of equine with iatrogenic equine metabolic syndrome showed hemorrhages in adrenal cortex, capsule thickening and atrophy cortical with coagulation necrosis of zona glomerulosa, coagulation necrosis focal zona fasciculata and coagulation necrosis, congestion of the zona reticularis (Hematoxilin & Eosin 10X)



Kydney of equine with iatrogenic equine metabolic syndrome Renal cortical and papillary necrosis, acute tubular necrosis.



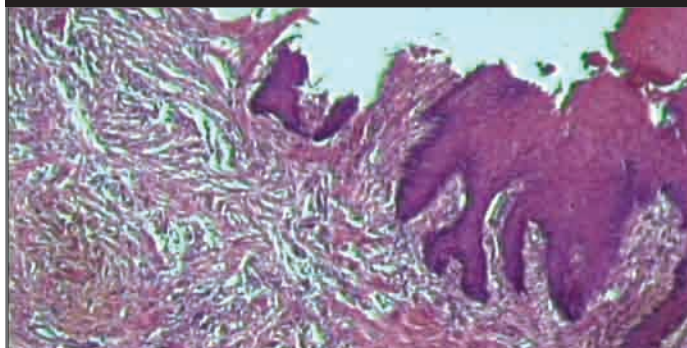
Kidneys histology of equine with iatrogenic equine metabolic syndrome acute tubular necrosis and severed degeneration vacuolar. (Hematoxilin & Eosin 20X).

Figure 6



Gastric mucosa of equine with iatrogenic equine metabolic syndrome with equine gastric ulcer syndrome severed, multiple ulcers and focal erosion with exposition of lamina propria

Figure 7



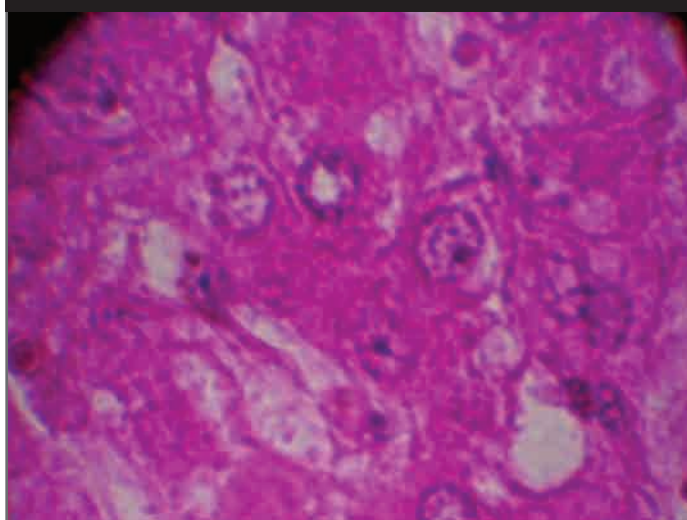
Gastric mucosa histology of equine with iatrogenic equine metabolic syndrome showed chronic gastritis surface, focal ulcer, erosion focal and hyperkeratosis infiltrated of lymphocytes in the lamina propria. (Hematoxylin & Eosin 10 X).

Figure 8



Liver of equine with iatrogenic equine metabolic syndrome, swollen, friable with fibrosis chronic and icteric. Multifocal necrotic areas were present in the other lobes

Figure 9



Liver histology of equine with iatrogenic equine metabolic syndrome with peri-acinar necrosis with a prominent acinar pattern and fatty degeneration severed (Figure 9). Centre-acinar necrosis and billirubin cluster (Hematoxylin & Eosin 20X).

Discussion

These results suggest of an iatrogenic EMS in Thoroughbred. The metabolic syndrome is a common and complex disorder combining obesity, dyslipidemia, hypertension, and insulin resistance. It is a primary risk factor for diabetes and cardiovascular disease. We showed for the first time that the metabolic syndrome is associated with a higher fraction of oxidized LDL and thus with higher levels of circulating oxidized LDL. Hyperinsulinemia and impaired glycaemic control, independent of lipid levels, were associated with increased in vivo LDL oxidation, as reflected by the higher prevalence of high oxidized LDL. High levels of oxidized LDL were associated with increased risk of future myocardial infarction, even after adjustment for LDL-cholesterol and other established cardiovascular risk factors (Jubb et al 1984; Pacholczvk et al 2008). Situations of glucocorticoid excess such as stress or pituitary dysfunction may stimulate the production of hormonally active adipocytes that lead to metabolic syndrome (Botana et al 2002; Eustace 2008;

Hardman J and Limbird 2003). Interestingly the active adipocytes contain an enzyme called 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type-1 (11betaHSD-1). This enzyme has the critical function of turning inactive cortisone into active cortisol which is the active glucocorticoid. This production of cortisol occurs locally and exerts both paracrine (local) and autocrine (back to the originating cell) effects. Therefore, these adipocytes, due to the presence of 11betaHSD-1 have the capacity to maintain and perpetuate themselves. The overall extent to which 11betaHSD-1 generated cortisol exerts effects in the body as a whole, remains to be determined. New strategies aimed at inhibiting omental 11betaHSD-1 production are believed to be potentially useful for the management of metabolic syndrome. Moreover, although the effects of GC are apparent it is important to recognize that this is not a condition of abnormal adrenal function. Even though glucocorticoid are involved in the pathogenesis of disease, since adrenal function is normal, diagnostic assays designed for detection of altered circulating cortisol levels are within normal limits; subsequently,

therapeutic strategies aimed at treating pituitary dysfunction will have no effect on horses with EMS unless there is concurrent pituitary dysfunction present. Studies are now required to determine the exact mechanisms responsible for the increased predisposition to laminitis observed in horses with equine metabolic syndrome (Geor and Frank 2009). In Venezuela is a very common the chronic treatment of dexamethasone and triamcinolone in Thoroughbreds. Cumulative doses of dexamethasone and triamcinolone induce EMS, possibly associated with training, and career management practices. The lesions, necropsy and histology observed in this study are similar to the EMS, with the exception of obesity (Donald 1996; Jubb et al 1984). The multiple organ failures complicating the clinical and compromises the horse's life. Immunosuppression appears to be one of the consequences that lead to chronic and recurrent in these horses, not responsive to therapy. This syndrome leads to huge economic losses each year in the equine industry. In conclusion our reported a iatrogenic equine metabolic syndrome in Thoroughbred horses from Venezuela associated with overdose and chronic dexamethasone and triamcinolone.

References

- Aluja A, Constantino C. (2002). Technical of Necropsy in domestic animals. 2nd ed., pp 103. Manual Moderno. México.
- Banks W. (1996). Veterinary Applied Histology. 2nd ed., 487-492. Manual Moderno México.
- Botana L, Landoni F, Martín T. (2002). Veterinary Pharmacology and therapeutical. 1 ed., pp 3-690. Madrid España.
- Eustace R. (2008). Equine metabolic syndrome and Cushing's disease clinical trial. Vet Rec. 2, 163-164.
- Donald M. (1996). Special Veterinary Pathology. 3rd ed., 24-29. Mosby, USA.
- Geor R, Frank N. (2009). Metabolic syndrome-from human organ disease to laminar failure in equids. Vet Immunol Immunopathol. 129, 141-151.
- Hardman J & Limbird L. (2003). Pharmacology and therapeutical bases. 10th ed., vol. 2, pp 1237-1251. Mc Graw-Hill. Mexico-Mexico.
- Johnson PJ. (2002). The equine metabolic síndrome peripheral Cushing's syndrome. Vet Clin North Am Equine Pract. 16, 271-93.
- Jubb K, Kennedy P. y Palmer N. (1984). Domestic animal pathology. 3 ed., vol. 2., 59-90. Hemisferio Sur, S.R.L. Uruguay.
- Pacholczvk M, Ferenc T, Kowalski J. (2008). The metabolic syndrome. Part I: definitions and diagnostic criteria for its identification. Epidemiology and relationship with cardiovascular and type 2 diabetes risk. Postepy Hig Med Dosw. 62, 36-42.

libros
publicaciones
volantes
papelería

Imagen corporativa
tarjetas de presentación
carpetas
folletos
encartes
revistas

afiches
trípticos

Comunicación Visual

Diseño Gráfico



mayraespino@gmail.com

Índices acumulativos de autores

Volumen 28 - 2009

| | | | |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------|
| Aguzzi Alejandra, | 2009; 28(1): 19, 28 | Majano Mendoza Amanda, | 2009; 28(1): 23 |
| Almaguer Marisol Díaz, | 2009; 28(2): 51 | Manfredi Roberto, | 2009; 28(1): 12 |
| Aramburú Guillermo, | 2009; 28(1): 19 | Manfredi Roberto, | 2009; 28(2): 48, 54 |
| | | María Esther Gómez, | 2009; 28(2): 71 |
| Benedetta Piergentili, | 2009; 28(2): 54 | Márquez M. A. | 2009; 28(1): 43 |
| Bermúdez Víctor, | 2009; 28(2): 77 | Márquez Mercedes Elena, | 2009; 28(2): 71 |
| Bonfante-Cabarcas Rafael Armando, | 2009; 28(2): 66 | Martínez Motas Isabel, | 2009; 28(1): 23 |
| Bravo Fariñas Laura, | 2009; 28(1): 23 | Martínez Romero María Rosarys, | 2009; 28(2): 51 |
| Brunocilla Eugenio, | 2009; 28(2): 54 | Mederos Cuervo Lilian, | 2009; 28(1): 23 |
| | | Mederos Cuervo LM, | 2009; 28(2): 61 |
| Carrizales Maira Soledad, | 2009; 28(2): 71 | Mir Narbona Ioana, | 2009; 28(2): 63 |
| Castro-Escarpulli, Graciela, | 2009; 28(1): 23 | Montoro Cardoso Ernesto, | 2009; 28(2): 51, 61 |
| Correa María Fernanda, | 2009; 28(1): 36 | Morales Abelardo, | 2009; 28(2): 77 |
| Chacón Lozán Francisco J, | 2009; 28(2): 66 | Morales María, | 2009; 28(2): 77 |
| Chappi Estévez Yanet, | 2009; 28(2): 63 | Motta Norma, | 2009; 28(1): 40 |
| Chávez E. Paredes C, | 2009; 28(1): 43 | Mújica Andrés, | 2009; 28(1): 36 |
| | | Muñoz Marielena, | 2009; 28(2): 71 |
| Daubront Yumar Vanessa, | 2009; 28(1): 40 | Núñez Fidel, | 2009; 28(1): 23 |
| Daza Damelis, | 2009; 28(2): 66 | | |
| Dentale Nicola, | 2009; 28(2): 54 | Peña Yudith, | 2009; 28(2): 71 |
| Díaz Piñera Addys, | 2009; 28(2): 63 | Pisonero Sosias José, | 2009; 28(2): 63 |
| | | Planas Gilberto, | 2009; 28(2): 77 |
| Enseñat Sánchez Raimy, | 2009; 28(2): 63 | Pomier Suárez O, | 2009; 28(2): 61 |
| | | Pultrone Cristian, | 2009; 28(2): 54 |
| Fernández Abreu Anabel, | 2009; 28(1): 23 | | |
| Fiorino Sirio, | 2009; 28(2): 48 | Ramírez A., | 2009; 28(1): 43 |
| Fiterre Lancis Irene, | 2009; 28(2): 63 | Ramírez Álvarez Margarita, | 2009; 28(1): 23 |
| Fonseca Gómez C, | 2009; 28(2): 61 | Ricco Verónica, | 2009; 28(1): 19 |
| | | Rodríguez Carlos, | 2009; 28(2): 77 |
| García Douglas, | 2009; 28(2): 66 | Rodríguez María, | 2009; 28(1): 40 |
| García Francisco, | 2009; 28(2): 77 | Rodríguez Uribe Sandra, | 2009; 28(2): 63 |
| García Grechen, | 2009; 28(2): 51 | Rondón J Cristians G. C., | 2009; 28(1): 43 |
| Gómez Gilberto Pardo, | 2009; 28(2): 63 | | |
| Gómez-Barrios Juan Vicente, | 2009; 28(1): 2 | Sabbatani Sergio, | 2009; 28(2): 48 |
| González-Mujica Freddy, | 2009; 28(1): 40 | Sánchez M María del Rosario. | 2009; 28(1): 31, 36 |
| Guanche Garcell Humberto, | 2009; 28(2): 63 | Sardiña Aragón Misleidis, | 2009; 28(2): 51 |
| | | Sukkar Elias, | 2009; 28(2): 71 |
| Hasegawa Masahisa, | 2009; 28(1): 40 | Sutil de Naranjo Rosalía de Carmen, | 2009; 28(2): 71 |
| | | | |
| Khloid Yulimir, | 2009; 28(2): 71 | Tortorici Víctor, | 2009; 28(1): 2 |
| | | Trujillo Avalos A, | 2009; 28(2): 61 |
| Leal Luís, | 2009; 28(2): 77 | | |
| López Pedro, | 2009; 28(2): 77 | Virga Carolina, | 2009; 28(1): 19, 28 |