



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería

**Efecto de los extractos metanólicos de vaina y semilla de
Timbe (*Acaciella angustissima*) en ratas Wistar
diabéticas**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

M.C. Lucia Guerrero Becerra

Dirigido por:

Dra. María del Consuelo Lomas Soria

Querétaro, Qro. a mes año

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Efecto de los extractos metanólicos de vaina y semilla de Timbe (*Acaciella angustissima*) en ratas Wistar diabéticas

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ingeniería en Biosistemas

Presenta:

M.C. Lucia Guerrero Becerra

Dirigido por:

Dra. María del Consuelo Lomas Soria

Dra. María del Consuelo Lomas Soria
Presidente

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez
Secretario

Dr. Luis Antonio Reyes Castro
Vocal

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente 1

Dr. Luis Miguel Contreras Medina
Suplente 2

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (Mes Año)
México

Dedicatoria

“Dedico este proyecto a todos los que creyeron en mí, aun cuando yo no lo hice”

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI), por el otorgamiento de la beca que hizo posible la realización de mis estudios de doctorado, así como a la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro, por brindarme la oportunidad y el apoyo institucional para el desarrollo de este proyecto.

Quiero agradecer principalmente a mi familia por ser el pilar que me ha sostenido en cada etapa de este largo recorrido. A mi papá Rogelio, a mi mamá María y a mi hermano José, por su amor, comprensión y por creer en mí, incluso cuando yo dudaba. En especial, a mi hermana Irma, por sus mensajes diarios llenos de cariño, positivismo y apoyo incondicional; por estar siempre ahí, con las palabras justas que me devolvían la fuerza y la calma. A mi pareja Darinel, por acompañarme día a día, por su paciencia infinita y su amor inquebrantable. Gracias por estar a mi lado en los momentos más difíciles, por soportar conmigo los días de frustración, cansancio y enfermedad, y por ser mi sostén cuando las fuerzas parecían agotarse. A mi fiel compañera Maia, cuya presencia silenciosa y afectuosa fue un refugio en los días más exigentes, la compañía de mi perrita ayudó a cuidar mi bienestar emocional y a mantenerme en equilibrio mental durante todo este camino. Agradezco a mis amigos Gilary Acosta, Byanka Cruz, Pablo Godínez y Karina Rangel porque sin ustedes este doctorado no habría sido posible. Gracias por cada hora compartida en el laboratorio, por la paciencia infinita en los días largos y por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles. Su compañía transformó los experimentos en aprendizajes compartidos y las frustraciones en risas que aligeraban el camino. Gracias por esas reuniones improvisadas que empezaban como desahogo y terminaban como terapias colectivas llenas de humor, anécdotas y complicidad. Cada conversación, cada café y cada salida sirvieron para recordarme que este viaje no se trataba solo de ciencia, sino también de amistad, resiliencia y alegría.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi comité por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto. En especial, al Dr. Ramón Gerardo Guevara González, quien no solo formó parte de mi comité, sino que, en su calidad de coordinador, me brindó apoyo en un

nuevo inicio en el doctorado y me presentó la oportunidad de desarrollar este proyecto. Gracias por continuar formando parte de mi comité y por su constante respaldo a la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez, le agradezco profundamente por acompañarme en esta nueva etapa, por confiar en mí y por otorgarme una segunda oportunidad para continuar con la investigación, lo que me permitió avanzar hacia mi objetivo de concluir el doctorado. También extendo mi agradecimiento al Dr. Luis Miguel Contreras Medina por su participación en el trabajo en equipo y por los valiosos consejos brindados durante el desarrollo del proyecto. De igual manera, agradezco al Dr. Luis Antonio Reyes Castro por integrarse al equipo de trabajo, por su guía y orientación durante mi estancia en el INCMNSZ, así como por su apoyo en la redacción de artículos y de esta tesis. Sus observaciones y sugerencias contribuyeron de manera significativa a mejorar el proyecto. Finalmente, pero no por ello menos importante, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Consuelo Lomas Soria, mi directora de tesis, por su apoyo incondicional, su guía constante y el seguimiento semanal a distancia que permitieron el buen desarrollo del proyecto y por su guía diaria durante mi estancia en el INCMNSZ. Además, agradezco su comprensión y empatía ante los retos personales y de salud surgidos durante el proceso. Su acompañamiento humano y profesional fue fundamental para que pudiera culminar esta etapa. También quiero extender mi agradecimiento a la Dra. Sumiko Morimoto y la M.C. Tonantzin Citlali Sosa, quienes, aunque no formaron parte de mi comité, brindaron su tiempo, conocimiento y apoyo durante la realización de este proyecto. Su disposición para ayudar y su orientación fueron fundamentales para alcanzar este logro.

A todos ustedes, gracias por acompañarme, por creer en mí y por hacer posible este sueño.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2. 1. Diabetes.....	3
2.1.1 Islotes de Langerhans.....	3
2.1.2 Antidiabéticos	6
2. 2. Compuestos fenólicos	7
2. 3. Timbe (<i>Acaciella angustissima</i>).....	8
3. HIPÓTESIS	12
4. OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo general.....	12
4.2 Objetivos específicos	12
5. METODOLOGÍA.....	13
5.1 Aislamiento de los extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe	13
5.1.1 Material vegetal indicar.....	13
5.1.2 Determinación de fibra soluble e insoluble.....	13
5.1.3 Determinación de carbohidratos	14
5.1.4 Determinación de proteína	14

5.1.5	Preparación de los extractos metanólicos	14
5.2	Determinación de la capacidad antioxidante, del perfil metabólico y del perfil de ácidos grasos de los extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe.	15
5.2.1	Determinación de fenoles totales	15
5.2.2	Determinación de flavonoides totales	16
5.2.3	Determinación de taninos condensados	16
5.2.4	Capacidad antioxidante	17
5.2.5	Determinación de perfil de ácidos grasos en GC-MS	18
5.2.6	Determinación del perfil metabólico en GC-MS	18
5.3	Evaluación del efecto antidiabético en un modelo animal mediante la administración de extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe. ...	19
5.3.1	Inducción de diabetes	19
5.3.2	Grupos de estudio	20
5.3.3	Determinaciones semanales	21
5.3.4	Determinación de glucosa en suero	23
5.3.5	Determinación de triglicéridos en suero	24
5.3.6	Análisis de orina	24
5.3.7	Determinación de proteinuria y creatinina	25
5.4	Evaluación del efecto de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratas Wistar.	25
5.4.1	Extracción de islotes pancreáticos	25
5.4.2	Evaluación de la secreción de insulina	27
5.5	Identificación de los genes implicados en la secreción de insulina y evaluación del efecto modulador de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe.	29
5.5.1	Islotes pancreáticos para ARN	29

5.5.2	Obtención de ARN de islotes pancreáticos.....	30
5.5.3	Obtención de ADNc de islotes pancreáticos.....	30
5.5.4	Análisis de qPCR	31
5.6	Análisis estadístico.....	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1	Caracterización de semilla y vaina de Timbe	33
6.2	Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.....	34
6.3	Perfil metabólico por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas 37	
6.4	Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas 41	
6.5	Modelo in vivo	46
6.6	Secreción de insulina en islotes pancreáticos.....	58
6.7	Genes implicados en la regulación de la secreción de insulina	64
6.7.1.	Efecto de los extractos metanólicos de Timbe sobre la expresión génica en islotes pancreáticos sanos.....	64
6.7.2.	Efecto de los extractos metanólicos de Timbe sobre la expresión génica en islotes pancreáticos tratados con estreptozotocina (STZ)	68
7.	CONCLUSIONES	73
8.	BIBLIOGRAFÍA	74
9.	ANEXOS	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de estudio para la evaluación de los extractos de Timbe.	20
Tabla 2. Secuencias de genes para análisis de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).	31
Tabla 3. Contenido de proteínas, carbohidratos y fibras en semilla y vaina de Timbe.....	34
Tabla 4. Rendimiento de extracción de semillas, vaina y vaina-semilla de Timbe.	34
Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en semillas, vaina y vainas-semilla de Timbe.	36
Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de semillas, vainas y vainas-semilla de Timbe.	36
Tabla 7. Perfil de metabolitos secundarios en la semilla de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	38
Tabla 8. Perfil de metabolitos secundarios en la vaina de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	40
Tabla 9. Perfil de ácidos grasos en semilla de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	43
Tabla 10. Perfil de ácidos grasos en la vaina de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).	45
Tabla 11. Niveles de glucosa en sangre medidos semanalmente.	47
Tabla 12. Concentraciones séricas de glucosa y triglicéridos.	52
Tabla 13. Mediciones en orina: volumen, proteinuria y depuración de creatinina.	53
Tabla 14. Perfil urinario realizado mediante tiras reactivas.	54
Tabla 15. Secreción de insulina de los islotes pancreáticos tratados con 3 diferentes STZ.	56
Tabla 16. Efecto de los extractos de semilla y vaina de Timbe sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía y microestructura del páncreas.	4
Figura 2. Islotes de Langerhans sanos y diabéticos.	5
Figura 3. Clasificación principal de los compuestos fenólicos.	8
Figura 4. Timbe (<i>Acaciella angustissima</i>).	10
Figura 5. Recolección y separación de la vaina y la semilla de Timbe.	13
Figura 6. Preparación de extractos metanólicos.	15
Figura 7. Línea del tiempo para el experimento in vivo.	19
Figura 8. Inyección de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal.	20
Figura 9. Administración de extractos metanólicos de Timbe.	21
Figura 10. Medición de peso en ratas.	21
Figura 11. Recolección de orina.	22
Figura 12. Extracción de sangre.	23
Figura 13. Análisis de orina mediante tiras reactivas.	25
Figura 14. Extracción del páncreas en una rata Wistar macho.	26
Figura 15. Diagrama general de la extracción de islotes pancreáticos de rata Wistar 27	27
Figura 16. Grupos experimentales para el análisis de la secreción de insulina 28	28
Figura 17. Diagrama experimental de los tratamientos utilizados para evaluar la secreción de insulina 29	29
Figura 18. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en semilla de Timbe. 42	42
Figura 19. Perfil cromatográfico de ácidos grasos del extracto de semilla de Timbe. 43	43
Figura 20. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en la vaina de Timbe. 44	44
Figura 21. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en el extracto de la vaina de Timbe.... 46	46
Figura 22. Glucosa en sangre durante el período experimental. 48	48
Figura 23. Variación del peso corporal durante el periodo experimental. 49	49
Figura 24. Consumo de agua durante el periodo experimental. 50	50
Figura 25. Consumo alimenticio durante el periodo experimental. 51	51
Figura 26. Concentraciones séricas de glucosa y triglicéridos en la eutanasia. 52	52

Figura 27. Evaluación de la secreción de insulina en células beta expuestas a diferentes estreptozotocinas (STZ).	56
Figura 28. Comparación de la secreción de insulina entre el grupo control y STZ-3.	57
Figura 29. Secreción de insulina en islotes pancreáticos sanos.	61
Figura 30. Secreción de insulina en islotes pancreáticos tratados con STZ.	63
Figura 31. Efecto de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe sobre la expresión de genes asociados a la secreción de insulina en islotes pancreáticos.....	66
Figura 32. Efecto de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe sobre la expresión de genes asociados a la secreción de insulina en islotes pancreáticos con STZ..	72

Resumen

Acaciella angustissima, conocida comúnmente como Timbe, es una especie perteneciente a la familia Fabaceae, originaria de América Central y ampliamente distribuida en regiones áridas y semiáridas de México. Tradicionalmente, esta especie ha sido utilizada con diversos fines, incluyendo el uso de su madera, las hojas como forraje, su corteza para curtir pieles y en medicina tradicional. El objetivo de este estudio fue caracterizar la semilla y vaina Timbe, sus propiedades antioxidantes y farmacológicas con la evaluación de su potencial bioactivo sobre la función pancreática.

Las semillas y las vainas de Timbe fueron separadas y utilizadas para su caracterización. En ambas fracciones se determinaron los compuestos fenólicos totales, flavonoides y taninos condensados, así como su capacidad antioxidante, y se analizó el perfil de ácidos grasos y de metabolitos secundarios mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Tanto en semilla como en vaina se determinó el contenido de proteína, carbohidratos y humedad, en la semilla también se evaluó el perfil de ácidos grasos y fibra dietética debido a su interés nutricional. A partir de las semillas y vainas se obtuvieron extractos metanólicos, los cuales fueron evaluados en islotes pancreáticos (provenientes de ratas Wistar macho), controles y en islotes pancreáticos tratados con estreptozotocina (STZ), incubados a dos concentraciones de glucosa (3 y 11 mM). Finalmente, se analizó la expresión de genes relacionados con la función pancreática y el metabolismo de la glucosa, incluyendo GCK, IRS, GLUT2, SOD, CAT, TRX2, iNOS, INS2, NRF2, MafA y PDX1 con el fin de evaluar posibles cambios en su activación.

Los resultados mostraron que las vainas presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos y una capacidad antioxidante significativamente superior a las semillas. Asimismo, los extractos de vaina mostraron un efecto más favorable sobre la secreción de insulina, así como una mayor capacidad para mejorar la funcionalidad de islotes de Langerhans dañados con estreptozotocina (STZ), lo que sugiere que las vainas de Timbe constituyen una fuente de compuestos bioactivos con potencial antidiabético, lo que respalda su posible aplicación

en el desarrollo de fitoterapéuticos orientados a la prevención y el tratamiento de enfermedades metabólicas como la diabetes.

Palabras clave: Fabaceae; fabáceas; islotes de Langerhans; leguminosas; islotes pancreáticos; compuestos fenólicos.

Abstract

Acaciella angustissima, commonly known as Timbe, is a species belonging to the Fabaceae family, native to Central America and widely distributed in arid and semi-arid regions of Mexico. Traditionally, this species has been used for various purposes, including its wood, leaves as fodder, bark for tanning hides, and in traditional medicine. The objective of this study was to characterize the Timbe seed and pod, its antioxidant and pharmacological properties, and to evaluate its bioactive potential on pancreatic function.

The seeds and pods of Timbe were separated and used for characterization. Total phenolic compounds, flavonoids, and condensed tannins were determined in both fractions, as well as their antioxidant capacity, and the fatty acid and secondary metabolite profiles were analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The protein, carbohydrate, and moisture content were determined in both the seed and the pod. The fatty acid profile and dietary fiber were also evaluated in the seed due to its nutritional interest. Methanolic extracts were obtained from the seeds and pods, which were evaluated in pancreatic islets (from male Wistar rats), controls, and pancreatic islets treated with streptozotocin (STZ), incubated at two glucose concentrations (3 and 11 mM). Finally, the expression of genes related to pancreatic function and glucose metabolism, including GCK, IRS, GLUT2, SOD, CAT, TRX2, iNOS, INS2, NRF2, MafA, and PDX1, was analyzed to evaluate possible changes in their activation.

The results showed that the pods have a higher content of phenolic compounds and a significantly higher antioxidant capacity than the seeds. Likewise, the pod extracts showed a more favorable effect on insulin secretion, as well as a greater capacity to improve the functionality of Langerhans islets damaged with streptozotocin (STZ), suggesting that Timbe pods are a source of bioactive compounds with antidiabetic potential, supporting their possible application in the development of phytotherapeutics aimed at the prevention and treatment of metabolic diseases such as diabetes.

Key words: Fabaceae; fabaceous; islets of Langerhans; legume; pancreatic islets; phenolic compounds.

1. INTRODUCCIÓN

México es reconocido como uno de los cinco países más diversos del mundo, al albergar una proporción significativa de la biodiversidad vegetal global. Esta riqueza biológica representa una fuente invaluable de recursos naturales con alto potencial para el desarrollo de investigaciones científicas y biotecnológicas orientadas a la identificación, caracterización y aprovechamiento de compuestos bioactivos. Desde esta perspectiva, el estudio de plantas nativas y subutilizadas no solo contribuye a la generación de conocimiento fundamental, sino que también promueve su valorización económica, el uso sustentable de los recursos naturales y la conservación de la diversidad biológica. El aislamiento, clasificación, identificación y caracterización bioquímica de metabolitos secundarios de origen vegetal ha permitido el descubrimiento de moléculas con aplicaciones potenciales en sectores estratégicos como la agricultura, la industria alimentaria, la farmacéutica y la nutracéutica, particularmente en el desarrollo de productos funcionales dirigidos a la prevención y tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles (Kathiresan, 2020; Souza-Saldivar et al., 2019).

Entre las especies vegetales de interés se encuentra *Acaciella angustissima*, comúnmente conocida como Timbe, una leguminosa nativa ampliamente distribuida en regiones áridas y semiáridas de México. Esta especie ha sido utilizada tradicionalmente con diversos fines, incluyendo el uso de su madera como leña, sus hojas como forraje, su corteza como fuente de taninos para el curtido de pieles y su empleo en la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales e inflamatorios. El interés científico por el Timbe ha aumentado debido a la identificación de metabolitos secundarios con propiedades biológicas relevantes, particularmente en sus vainas, las cuales han sido reportadas como una fuente importante de polifenoles, flavonoides y taninos condensados. Diversos estudios han demostrado que los compuestos fenólicos presentes en las vainas de Timbe exhiben una amplia gama de actividades biológicas, entre las que destacan sus efectos antioxidantes, antimutagénicos, antimicrobianos y antidiabéticos (Alonso-Herrada et al., 2016; Rodríguez-Méndez et al., 2018; Vargas-Hernández et al., 2014). En particular, la actividad antidiabética observada en modelos experimentales ha sido asociada con la capacidad de estos compuestos

para modular la homeostasis de la glucosa, ya sea mediante la reducción del estrés oxidativo, la inhibición de enzimas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos. No obstante, a pesar de estos avances, la mayor parte de la evidencia disponible se ha centrado casi exclusivamente en el estudio de las vainas, dejando fuera otras estructuras de la planta como la semilla. Las semillas, al ser órganos de reserva, suelen concentrar metabolitos secundarios con funciones protectoras y reguladoras, lo que sugiere que podrían constituir una fuente relevante de compuestos biofuncionales con potencial terapéutico. Sin embargo, la falta de estudios sistemáticos que comparen el perfil fitoquímico y la actividad biológica de las semillas con respecto a las vainas limita el aprovechamiento integral de esta especie y restringe la comprensión de su verdadero potencial biotecnológico.

El incremento de la prevalencia de enfermedades metabólicas, como la diabetes mellitus, y la necesidad urgente de desarrollar alternativas terapéuticas más seguras, accesibles y sostenibles, hacen que los compuestos bioactivos de origen vegetal representen una estrategia prometedora como agentes terapéuticos complementarios. El análisis de su efecto sobre procesos clave, como la secreción de insulina y la funcionalidad de los islotes de Langerhans, resulta fundamental para sustentar científicamente su aplicación.

Por lo tanto, el estudio integral de las vainas y semillas de Timbe no solo permitirá ampliar el conocimiento sobre su perfil fitoquímico y su actividad biológica, sino que también contribuirá a establecer bases sólidas para su aprovechamiento en el desarrollo de productos con valor agregado. Este enfoque integral fortalece la biotecnología vegetal como una herramienta clave para la innovación en salud, alimentación y sostenibilidad, al tiempo que promueve el uso responsable de los recursos naturales y el rescate del conocimiento tradicional asociado a especies nativas de alto valor funcional.

2. ANTECEDENTES

2.1. Diabetes

La diabetes sacarina, o diabetes mellitus, es una enfermedad no transmisible (ENT) en la que se presentan niveles elevados de glucosa en sangre, por deficiencia de insulina o por nula respuesta del organismo a su acción y/o secreción. Se trata de una enfermedad metabólica crónica que, con el tiempo, puede causar graves complicaciones en distintos órganos y sistemas del cuerpo. Entre las principales consecuencias se incluyen enfermedades cardiovasculares (como infartos), accidentes cerebrovasculares, daño en los ojos que puede conducir a ceguera, afectación renal, daño en los nervios periféricos, amputaciones y, en muchos casos, una muerte prematura (Hu et al., 2023; OMS, 2023; Yedjou et al., 2023).

La prevalencia de la diabetes aumenta a nivel global, especialmente en los países en vías de desarrollo. Este crecimiento se debe a diversos factores que favorecen la aparición de la enfermedad, entre los que destacan el sobrepeso (frecuentemente asociado a una alimentación inadecuada), la falta de actividad física en la vida cotidiana y la predisposición genética. Las personas que desarrollan diabetes suelen presentar una serie de síntomas característicos, entre ellos: sed excesiva (polidipsia), necesidad frecuente de orinar (poliuria), visión borrosa, fatiga constante y pérdida de peso inexplicable, incluso sin cambios en la dieta. Estos signos suelen ser las primeras manifestaciones visibles de un desbalance metabólico que, de no tratarse a tiempo, puede derivar en complicaciones más graves (OMS, 2023).

2.1.1 Islotes de Langerhans

El páncreas desempeña funciones fundamentales para el organismo: participa en la digestión mediante la secreción de enzimas que facilitan la descomposición de los nutrientes, y regula el metabolismo de la glucosa mediante hormonas como la insulina y el glucagón, indispensables para mantener el equilibrio energético del cuerpo. Su doble función exocrina y endocrina lo convierte en un órgano clave tanto para el proceso digestivo como para el control metabólico (Cui et al., 2024; Wright et al., 2024). En la Figura 1 se expone la

organización anatómica y microestructural del páncreas, sus regiones macroscópicas(a): cabeza, cuello, cuerpo, cola y proceso uncinado, y su relación con estructuras aledañas, como el duodeno, la vesícula biliar y el bazo. Posteriormente, se representa la disposición del tejido glandular, destacando los acinos responsables de la secreción exocrina y los islotes de Langerhans (b). Finalmente (c), se muestra una ampliación de un islote en la que se distinguen los principales tipos celulares especializados (Atkinson et al., 2020).

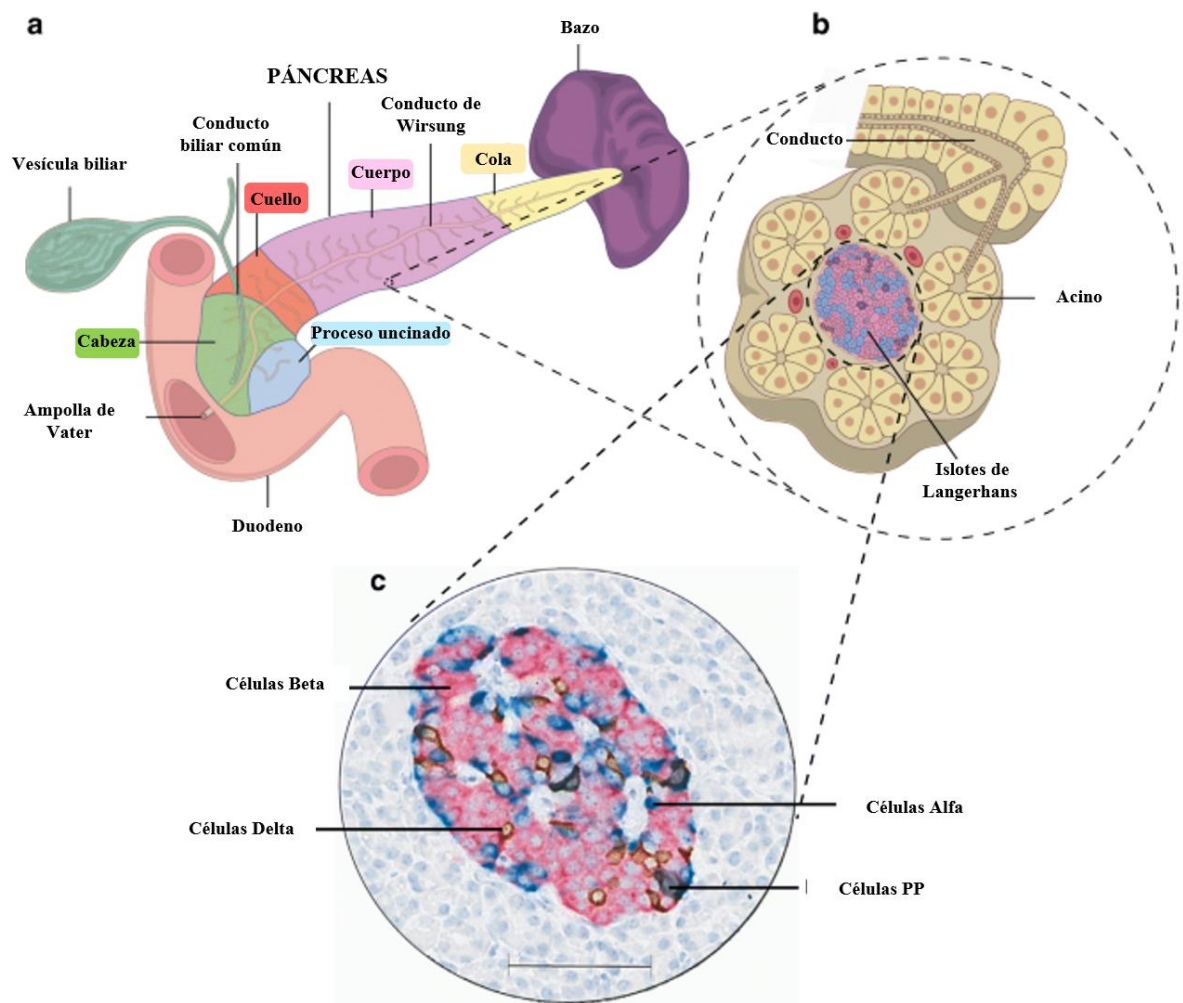


Figura 1. Anatomía y microestructura del páncreas.
Modificada de Atkinson *et al.* (2020)

Los islotes de Langerhans o islotes pancreáticos (Figura 2) son pequeñas agrupaciones de células situadas en el páncreas y desempeñan un papel esencial en la regulación de los niveles de glucosa en la sangre. Están compuestos por diversos tipos celulares, siendo los más relevantes las células beta, encargadas de la producción y liberación de insulina, y las células alfa, responsables de la secreción de glucagón (Bacos et al., 2023; Ustione et al., 2013). Estas hormonas actúan de manera coordinada para mantener un equilibrio adecuado de glucosa en el organismo: la insulina disminuye los niveles de glucosa en sangre al facilitar su entrada en las células, mientras que el glucagón aumenta dichos niveles cuando se encuentran bajos. La disfunción de los islotes de Langerhans, como se observa en enfermedades como la diabetes, puede perturbar este mecanismo de regulación, provocando fluctuaciones descontroladas en los niveles de glucosa. Por tal motivo, el estudio de estos islotes y de las células que los componen es de suma importancia para el desarrollo de tratamientos que restauren el equilibrio glucémico y mejoren la salud metabólica de las personas afectadas por la diabetes y otras patologías relacionadas (NIH, 2018).

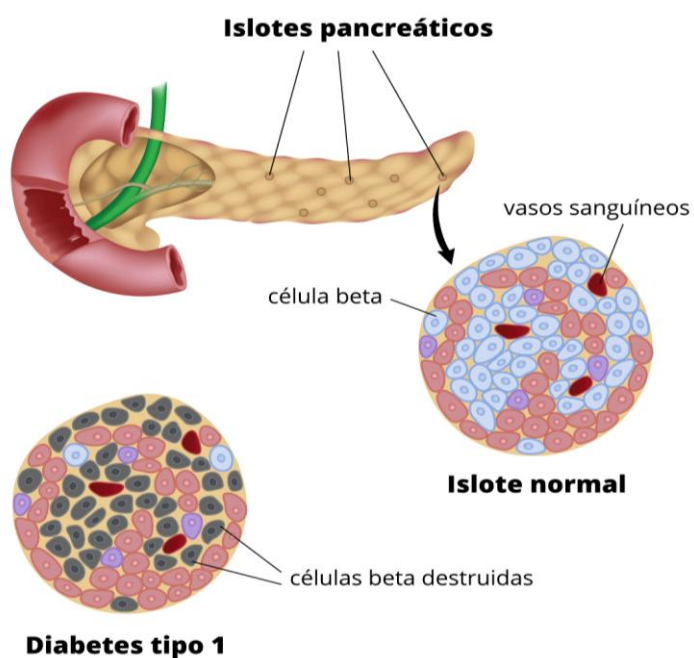


Figura 2. Islotes de Langerhans sanos y diabéticos.
Obtenida de NIH, 2018

2.1.2 Antidiabéticos

Los antidiabéticos son fármacos empleados para regular los niveles de glucosa en sangre en individuos con diabetes mellitus. Estos medicamentos se agrupan en diversas categorías terapéuticas, incluyendo los secretagogos de insulina (como las sulfonilureas y las meglitinidas), los sensibilizadores de la insulina (como la metformina y las tiazolidinedionas), los inhibidores de la alfa-glucosidasa, los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT2) y los análogos del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), entre otros. La selección de un tratamiento específico depende de factores como el tipo de diabetes, las características individuales del paciente y la respuesta terapéutica. Los antidiabéticos ejercen sus efectos mediante distintos mecanismos: algunos estimulan la secreción de insulina, otros aumentan la sensibilidad de los tejidos a la insulina, mientras que otros modulan la absorción de glucosa tanto a nivel intestinal como renal (Taylor et al., 2021; Weinberg Sibony et al., 2023).

La insulina es una hormona esencial para el adecuado funcionamiento del organismo humano. Su resistencia, insuficiencia o ausencia están estrechamente vinculadas al desarrollo de la diabetes mellitus. En la diabetes tipo 1, se observa una pérdida significativa de las células beta pancreáticas, en su mayoría atribuida a factores genéticos. Por otro lado, la diabetes tipo 2 se asocia principalmente con alteraciones metabólicas (Gawli & Bojja, 2024; Raghav et al., 2022). La deficiencia de células beta conduce a una disminución de la producción de insulina. Estos daños celulares pueden ser provocados por estrés oxidativo, niveles elevados de glucosa y lípidos, o por procesos inflamatorios. La insulina se libera en respuesta al consumo de glucosa, facilitando la captación de glucosa por las células y su posterior metabolismo (Gawli & Bojja, 2024). A través de la vía del receptor tirosina quinasa, la insulina regula una serie de procesos metabólicos: promueve la captación de glucosa, la síntesis de proteínas en el músculo, la glucogénesis y la lipogénesis. Este mecanismo implica la transferencia de grupos fosfato provenientes del ATP (adenosina trifosfato) a residuos de tirosina de proteínas diana intracelulares, lo que activa diversas funciones metabólicas (Rahman et al., 2021).

Además de los tratamientos farmacológicos convencionales, como los antidiabéticos orales e inyectables, se ha explorado el potencial terapéutico de compuestos naturales con propiedades hipoglucemiantes. La hiperglucemia crónica favorece la generación de radicales libres, lo que induce la autooxidación de la glucosa y la peroxidación lipídica. Estos procesos, sostenidos en el tiempo, pueden causar daño en órganos como los ojos, riñones, nervios y corazón (Heba Mohamed et al., 2020). En este contexto, los flavonoides han mostrado efectos antidiabéticos notables, atribuibles principalmente a su capacidad para inhibir las enzimas digestivas α -amilasa y α -glucosidasa, gracias a la acción de los grupos hidroxilo de su estructura. Asimismo, estos compuestos pueden reducir la absorción intestinal de glucosa al interferir con sus transportadores (Cahyana & Adiyanti, 2021). Entre las fuentes naturales ricas en flavonoides y otros compuestos bioactivos se encuentran las fabáceas, conocidas por su elevado contenido de fitoquímicos con propiedades benéficas para la salud. Estas plantas han sido ampliamente valoradas en la medicina alternativa por su potencial para el control de la obesidad y la diabetes, así como por sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes. Leguminosas como chícharos, garbanzos, lentejas, cacahuete, tamarindo, mezquite y soya, entre otras, son consideradas alimentos funcionales (Nawaz et al., 2023).

2. 2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se encuentran predominantemente en forma de glucósidos o agliconas, y pueden presentarse como compuestos matriciales o libres. En las frutas, estos compuestos son responsables del sabor amargo y, de manera similar a algunas verduras, contribuyen a la coloración característica de los productos vegetales. Los compuestos fenólicos se clasifican según su estructura química, como se ilustra en la Figura 3. Su estructura básica consiste en un anillo aromático (fenol), lo que les confiere la denominación común de «fenólicos». Los compuestos fenólicos más complejos, como los taninos, constituyen una subclase relevante dentro de esta categoría (Alara et al., 2021; Albergaria et al., 2020).

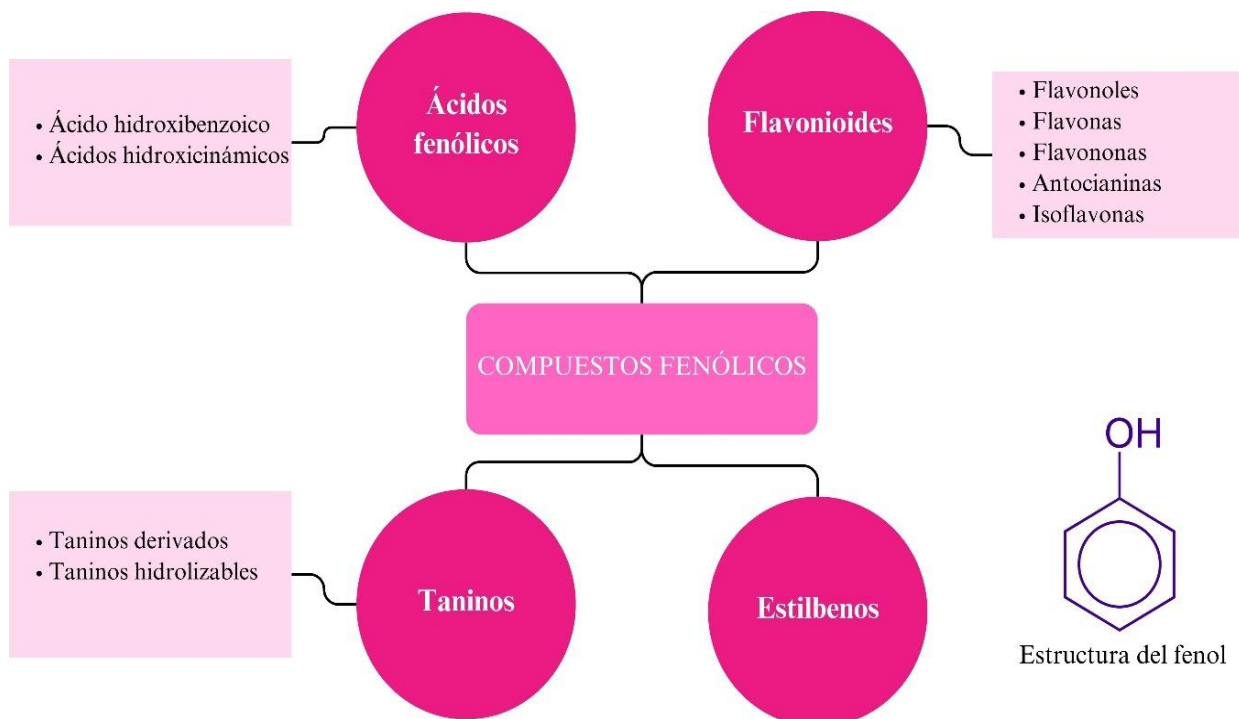


Figura 3. Clasificación principal de los compuestos fenólicos.

Modificado de Alara et al., 2021. Realizado en Biorender

2. 3. Timbe (*Acaciella angustissima*)

Acaciella angustissima (Mill.), conocida comúnmente como Timbe pertenece al género *Acacia*, dentro de la familia Fabaceae y la subfamilia Mimosoideae. Esta especie se distribuye naturalmente en diversas regiones del continente americano, incluidos Estados Unidos, México, Centroamérica, Venezuela, Colombia, Perú, Ecuador, Bolivia y Argentina. Asimismo, se ha reportado su presencia en otras zonas tropicales y subtropicales del mundo, como África, Asia, Oceanía y el Caribe. Es una especie arbórea que se adapta con facilidad y rapidez a áreas experimentales fuera de su hábitat original, donde ha demostrado un crecimiento eficiente. Una de sus características más notables es la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico mediante los nódulos presentes en sus raíces, un atributo común en miembros de su subfamilia (Rico Arce & Bachman, 2006). Además, se ha observado que el Timbe presenta una alta tolerancia a la sequía, atribuida en gran medida a su raíz pivotante bien desarrollada, que le permite acceder a fuentes de agua profundas (Odenyo et al., 2003).

Esta especie muestra una notable plasticidad ecológica, ya que puede prosperar en suelos infértiles o ácidos, con precipitaciones anuales entre 400 y 3000 mm y temperaturas entre 5 y 30 °C, soportando incluso condiciones climáticas extremas, como el frío o la escasez hídrica (Musara & Bosede Aladejana, 2020).

El árbol de Timbe (Figura 4), conocido comúnmente como Timbe, Timbre, Centeno o Guajillo, es una leguminosa que se desarrolla como un arbusto o un árbol pequeño, sin espinas, alcanzando alturas de entre 2 y 7 metros. Presenta hojas asimétricas de 10 a 25 cm de longitud y flores protándricas. Sus vainas, inicialmente verdes y de color café en la madurez, miden entre 10 y 25 cm de longitud y entre 6 y 9 mm de ancho. Estas vainas contienen semillas de color marrón oscuro y de aproximadamente 2.9–3.2 mm de largo, 2.5–3.0 mm de ancho y 1.7–2.0 mm de grosor. La producción de semillas es notablemente alta, con un estimado de 90,000 a 100,000 semillas por kilogramo (Alonso-Herrada et al., 2016; Musara & Bosede Aladejana, 2020). En México, las hojas de Timbe se utilizan comúnmente como forraje para el ganado. Además, su corteza se emplea en la fermentación de bebidas tradicionales como el tepache y el pulque. También se ha reportado su uso en la medicina tradicional: al hervirse, la corteza se utiliza en infusión para tratar la diarrea, mientras que la decocción de la raíz es empleada como remedio casero para la gastritis (Rico Arce & Bachman, 2006).

El Timbe ha sido utilizada tradicionalmente con diversos fines, tanto productivos como medicinales. Se emplea como leña y para la fabricación de postes, mientras que sus hojas se utilizan como forraje, especialmente para cabras y ovejas. Además, su corteza se ha aprovechado históricamente como fuente de taninos, empleados en el curtido de pieles (Alonso-Herrada et al., 2016). En México, esta especie también se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de dolores dentales, reumatismo, artritis, afecciones cutáneas, trastornos del tracto digestivo y diarrea. Asimismo, se ha reportado que la corteza se utiliza para precipitar materia mucilaginosa e inducir la fermentación en bebidas alcohólicas tradicionales, como el pulque y el tepache. Desde una perspectiva nutricional, el Timbe aporta vitaminas y minerales, lo que ha permitido su uso como complemento del heno en

pastos nativos; sin embargo, su uso alimentario está limitado por el contenido de taninos, que alcanza aproximadamente el 6% (Musara & Bosede Aladejana, 2020).



Figura 4. Timbe (*Acaciella angustissima*).
Realizado en Biorender, (Guerrero-Becerra & Lomas-Soria, 2025)

Diversas partes de la planta han sido estudiadas por su contenido de compuestos bioactivos. Las vainas de Timbe se han identificado como fuente de compuestos fenólicos con actividad antioxidante, registrando valores de IC_{50} entre 1 y 500 $\mu\text{g/mL}$, así como actividad antimutagénica en un rango de 0.625 a 5 mg/mL (Vargas-Hernández et al., 2014). Alonso-Herrada *et al.* (2016) reportaron que la mayor concentración de compuestos fenólicos totales se encuentra en la hoja joven, mientras que los taninos condensados predominan en la semilla, y los flavonoides totales alcanzan su mayor concentración en la hoja madura. Estos

hallazgos sugieren que el extracto de la semilla presenta la mayor capacidad antioxidante entre las partes del árbol evaluadas.

Por otro lado, se ha documentado que un extracto metanólico obtenido de la vaina de Timbe, con un alto contenido de compuestos fenólicos, presenta un efecto hipoglucemiante. En un estudio en ratas macho con diabetes inducida, la administración del extracto (100 mg/kg en el agua de bebida) redujo significativamente los niveles de glucosa en sangre, pasando de 372.6 ± 6.05 mg/dL en el grupo diabético no tratado a 146.2 ± 4.03 mg/dL en el grupo tratado. Este efecto se asoció a un aumento del 64% en los niveles séricos de insulina, lo que sugiere una mejora en la regulación glucémica. Además, se observaron reducciones significativas en los niveles de lípidos séricos —colesterol total (TC), triglicéridos (TG) y lipoproteínas de baja densidad (LDL)— junto con un aumento en las lipoproteínas de alta densidad (HDL). También se reportaron mejoras en los marcadores de estrés oxidativo y daño renal (Rodríguez-Méndez et al., 2018). Considerando que esta especie pertenece a la familia Fabaceae, un grupo de plantas reconocido por su riqueza en metabolitos secundarios con múltiples aplicaciones farmacológicas, nutraceuticas y agroindustriales, y considerando su alto contenido de compuestos bioactivos, el presente trabajo tiene como objetivo profundizar en el estudio de las vainas y semillas de Timbe, con el fin de caracterizar su perfil fitoquímico y evaluar su potencial como fuente de biomoléculas con actividad terapéutica y funcional, particularmente en enfermedades metabólicas como la diabetes, por su potencial fitoterapéutico.

3. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de la semilla y la vaina de Timbe (*Acaciella angustissima*) contienen compuestos fenólicos con potencial efecto antidiabético, capaces de modular la función de los islotes pancreáticos ex vivo, favoreciendo la secreción de insulina y sugiriendo un posible uso como agente complementario en el tratamiento de la diabetes mellitus.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar el efecto de los extractos metanólicos de la semilla y la vaina de Timbe (*Acaciella angustissima*) sobre la funcionalidad de islotes pancreáticos aislados de rata Wistar, en relación con la secreción de insulina y su posible actividad antidiabética ex vivo.

4.2 Objetivos específicos

1. Aislar extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe.
2. Evaluar la capacidad antioxidante, el perfil metabólico y el perfil de ácidos grasos de los extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe.
3. Evaluar el efecto antidiabético de los extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe en ratas Wistar diabéticas.
4. Evaluar el efecto de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratas Wistar; islotes control e islotes inducidos con estreptozotocina (STZ).
5. Identificar los genes implicados en la secreción de insulina, analizar las alteraciones en su expresión génica y evaluar el efecto modulador de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe.

5. METODOLOGÍA

5.1 Aislamiento de los extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe

5.1.1 Material vegetal indicar

La recolección de vainas maduras de los árboles de Timbe se realizó en el Campus Amazcala, ubicado en el municipio de El Marqués, Querétaro (20°42'18.39"N, 100°15'34.45"O), durante el mes de febrero de 2022 (Figura 5). Las vainas se dejaron secar durante 72 h a temperatura ambiente (T_{amb}). Posteriormente, las semillas se separaron de las vainas para su manipulación.



Figura 5. Recolección y separación de la vaina y la semilla de Timbe.

5.1.2 Determinación de fibra soluble e insoluble

La determinación de fibra se realizó por triplicado y conforme a la AOAC 985.29 (AOAC, 1995). Se tomó 1 g de muestra a la que se le agregaron 50 mL de buffer de fosfatos (pH 6; NaOH 0.275 N; HCl 0.325 M), seguidos de 100 μ L de α -amilasa. La mezcla se incubó a baño María durante 35 min, con agitación cada 5 min. Previo a la adición de la enzima, el pH se ajustó a 7.5 con NaOH (0.275 N). Posteriormente, se añadieron 100 μ L de proteasa (5 mg/mL) y el matraz se colocó nuevamente a baño María (60 °C) durante 30 min con agitación. Para la siguiente fase, el pH se ajustó a 4-4.6 con HCl (0.325 M), se añadieron 300 μ L de amiloglucosidasa y la mezcla se reincubó en baño María (60 °C) durante 30 min con agitación. Luego, la muestra fue centrifugada a 9500 g durante 20 min. El sobrenadante obtenido indicó la parte soluble. A esta fracción se le agregó etanol (78%) en una proporción

1:4 v/v. El precipitado obtenido correspondió a la fibra insoluble, la cual fue lavada con etanol (78%) y acetona, luego centrifugada nuevamente y se obtuvo la pasta insoluble. La fibra soluble e insoluble se calculó en porcentaje respecto de la muestra, utilizando la diferencia de peso obtenida entre las fracciones. Este análisis se priorizó en la semilla, por ser la porción consumible y por su potencial aplicación en la industria alimentaria.

5.1.3 Determinación de carbohidratos

El contenido total de carbohidratos se determinó por triplicado mediante una modificación de las metodologías de Melo-Ruiz et al. (2017) y del método Cleeg-Anthrone (Nollet, 2004). Se tomó una muestra de 0.1 g, que se digirió en 5 mL de ácido clorhídrico (2.5 N) a baño María a 90 °C durante 3 horas. Posteriormente, las muestras se neutralizaron con carbonato de calcio (1 M) y se diluyeron en agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 50 mL. Luego de ser centrifugadas (a 8500 rpm durante 10 min a 4 °C), se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante, la cual se reaccionó con 4 mL de antrona (0.2% p/v en ácido sulfúrico concentrado) y se incubó a baño María durante 8 min. Las absorbancias de las muestras se midieron a 630 nm. La curva estándar se construyó utilizando dextrosa a diferentes concentraciones (0-100 mg/mL).

5.1.4 Determinación de proteína

El contenido de proteína de la vaina y la semilla de Timbe se determinó por triplicado y de acuerdo con los métodos oficiales establecidos en la NMX-Y-118-SCFI-2001, en el laboratorio de análisis para la agricultura y la agroindustria. La muestra se digirió con ácido sulfúrico a alta temperatura y, posteriormente, se neutralizó con NaOH. El contenido de nitrógeno se determinó mediante titulación con ácido clorhídrico y la cantidad de proteína se calculó utilizando el factor de conversión de 6.25 (para el nitrógeno en proteína). Los resultados se reportaron en porcentaje.

5.1.5 Preparación de los extractos metanólicos

Para la preparación de los extractos se siguió la metodología de Rodríguez-Méndez et al., 2018, con modificaciones (Figura 6). Las muestras se molieron en un molino Grinder High-speed multifunction HC-2500 y se tamizaron a un tamaño de partícula de 0.5– 2 mm. Para

los extractos, se pesaron 50 g de harina de semilla; posteriormente, se maceraron en 200 mL de metanol. Cada 24 horas se realizó un cambio de metanol, repitiendo el proceso hasta que no presentó coloración (aproximadamente 7 días). Para separar la harina del metanol, se centrifugó a 8500 rpm durante 15 min a 4 °C. El extracto metanólico se rotaevaporó para obtener un extracto concentrado; este se congeló a -20 °C y se liofilizó para obtener el extracto en polvo. Se realizó el mismo procedimiento para la vaina (50 g), la combinación de vaina (25 g) y semilla (25 g). El rendimiento de extracción se calculó a partir de cinco repeticiones y se reportó como el promedio de los valores obtenidos $\pm$ error estándar, expresado en porcentaje de acuerdo con la Ecuación 1.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso de la muestra}} \right) * 100 \quad (1)$$

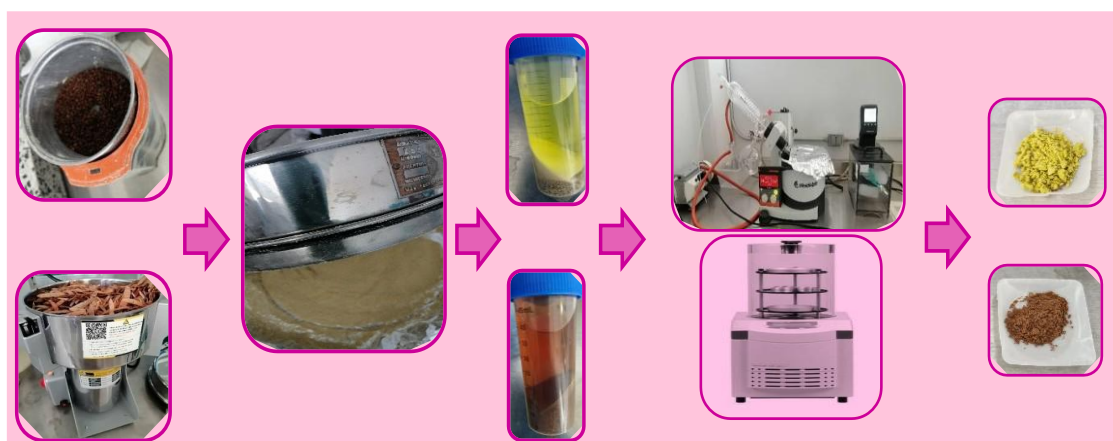


Figura 6. Preparación de extractos metanólicos.

5.2 Determinación de la capacidad antioxidante, del perfil metabólico y del perfil de ácidos grasos de los extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe.

5.2.1 Determinación de fenoles totales

Se prepararon extractos metanólicos para cuantificación (EMC), que se utilizaron en las determinaciones de compuestos fenólicos totales, flavonoides, taninos y de la capacidad antioxidante, siguiendo la metodología descrita por Cardador-Martínez et al., con algunas

modificaciones. Se pesaron 200 mg de muestra y se añadieron 10 mL de metanol. La mezcla fue sometida a sonicación durante 30 minutos a Tamb, seguida de una centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante resultante fue recuperado y almacenado a -20 °C hasta su análisis posterior (Cardador-Martínez et al., 2002). Para la determinación de los fenoles totales se tomaron 40 µL del extracto metanólico, adicionando 460 µL de agua destilada, se agregaron 250 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, posteriormente se agregaron 1250 µL de Na₂CO₃; se agitó en vórtex 10 s y se dejó reposar 2 h en la oscuridad. Cada muestra se colocó en una microplaca y se leyó a una longitud de onda de 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo scientific, multiskan go), para la curva estándar se utilizó ácido gálico con puntos entre 0 y 0.032 mg/mL (Oomah et al., 2005). Los resultados se expresan como la concentración de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (GAE/g).

5.2.2 Determinación de flavonoides totales

Para la determinación de flavonoides totales en la muestra, se tomaron 50 µL de EMC, se adicionaron 180 µL de metanol y se agregaron 20 µL de solución de 2-aminoetildifenil borato al 1%. Todas las muestras se colocaron por triplicado en una microplaca y se leyeron a 404 nm. Para el blanco se realizó con 230 µL de agua y 20 µL 2-aminoetildifenil borato al 1%, la curva estándar preparada fue con rutina a una concentración entre 2 y 200 mg/mL (Oomah et al., 2005). La concentración se expresa en equivalentes de rutina por gramo de muestra seca (RE/g).

5.2.3 Determinación de taninos condensados

La determinación de taninos condensados se realizó con 50 µL EMC a los que se le añadieron 200 µL de solución de vainillina al 0.5% (vainillina 1% en metanol y HCl 8% en metanol en una relación 1:1), esta se preparó al momento de usarse; todas las muestras se colocaron por triplicado en una microplaca y se leyeron a una longitud de onda de 492 nm. El blanco se realizó con 50 µL del metanol y 200 µL de HCL al 4%, con una curva estándar de catequina a una concentración de 0 a 1 mg/mL (Deshpande & Cheryan, 1987). Los resultados se presentan en términos de concentración de equivalentes de catequina por gramo de muestra seca (CE/g).

5.2.4 Capacidad antioxidante

a) DPPH

La capacidad de eliminación de radicales libres del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) se determinó por triplicado mediante la metodología de Brand-Williams, con algunas modificaciones. Se utilizaron 20 μ L del EMC (se midieron en triplicado) y se mezclaron con 200 μ L de una solución metanólica al 80% de DPPH (0.06 mg/mL). La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad. Para la preparación del blanco se utilizó metanol en lugar de la solución de DPPH, mientras que para el control se empleó agua desionizada en lugar de la muestra. La absorbancia fue registrada a una longitud de onda de 515 nm, la concentración se expresa en miligramos de Trolox por gramos de muestra seca (mg Trolox/g). La capacidad de eliminación de radicales libres fue calculada conforme a la Ecuación (2). Para la elaboración de la curva estándar, se utilizaron varias concentraciones de Trolox en un rango de 0 a 0.250 mg/mL (Brand-Williams et al., 1995).

$$\% \text{Captación de radicales libres} = \left[1 - \left(A_{\text{muestra}} - \frac{A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}}} \right) \right] * 100 \quad (2)$$

b) ABTS

La determinación de la capacidad de eliminación del radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) se realizó por triplicado. Solución 1: radical ABTS (7 mmol/L) mediante la reacción con persulfato de potasio (2.45 mmol/L) (5 mL y 88 μ L, respectivamente), la cual se dejó reposar en la oscuridad a 4 °C durante 12 horas para permitir la generación del radical. Posteriormente, se preparó la solución 2: 500 μ L de la solución 1 más 20 mL de metanol. Para el análisis, se utilizaron 20 μ L de EMC, a los que se añadieron 230 μ L de la solución 2. El blanco se preparó con 20 μ L de metanol y 230 μ L de etanol, mientras que el control consistió en 20 μ L de metanol y 230 μ L de la solución 2. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 734 nm, la concentración se expresa en miligramos de Trolox por gramos de muestra seca (mg Trolox/g) y la capacidad de captación de radicales libres fue calculada utilizando la Ecuación (3) (Re et al., 1999). Para construir la

curva de calibración, se utilizaron soluciones de Trolox con concentraciones comprendidas entre 0 y 0.250 mg/mL.

$$\% \text{Captación de radicales libres} = \left[1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) \right] * 100 \quad (3)$$

5.2.5 Determinación de perfil de ácidos grasos en GC-MS

Para la determinación de ácidos grasos en la vaina y la semilla de Timbe, se pesaron 50 mg de la muestra molida y tamizada. Se añadieron 400 μL de NaOH (1.25 M, preparada en metanol) y la mezcla se agitó en un vórtex durante 1 min. Posteriormente, se sonicó durante 5 min a 40 kHz y se añadieron 400 μL de H_2SO_4 (1.75 M, preparada en metanol). La mezcla se agitó nuevamente en agitador vórtex durante 1 min y se sonicó durante otros 5 min. A cada muestra se le añadieron 800 μL de hexano, se agitó en un vórtex durante 30 s y se centrifugó a 10 000 g durante 5 min para recuperar el sobrenadante. Este sobrenadante se filtró y se inyectó por duplicado en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) (Agilent Technologies 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector; sampler 80) para su análisis.

5.2.6 Determinación del perfil metabólico en GC-MS

El perfil metabólico de la vaina y la semilla de Timbe se determinó a partir de muestras de 50 mg cada una (molidas y tamizadas). A cada muestra se le añadió 1 mL de metanol y se sonicó durante 15 min. Posteriormente, las muestras se agitaron en vórtex durante 30 s y se mantuvieron en agitación constante durante 3 h a 200 rpm en un agitador orbital (Stuart). Luego, las muestras fueron centrifugadas a 12 000 RCF durante 10 min a 4 °C. Del sobrenadante se tomó una alícuota de 250 μL , la cual se secó en un SpeedVac a temperatura ambiente. Para la derivatización, se añadieron 100 μL de derivatizante (BSTFA + 1% TMS), se sonicaron durante 3 min y se centrifugaron a 10 000 g durante 5 min para recuperar el sobrenadante. Este sobrenadante se filtró y se inyectó por duplicado en el cromatógrafo de gases para su análisis.

5.3 Evaluación del efecto antidiabético en un modelo animal mediante la administración de extractos metanólicos de semilla, vaina y vaina/semilla de Timbe.

El modelo murino se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ); de su bioterio se obtuvieron 21 ratas Wistar macho (de 250-330 g) para realizar el experimento *in vivo* (Figura 7).

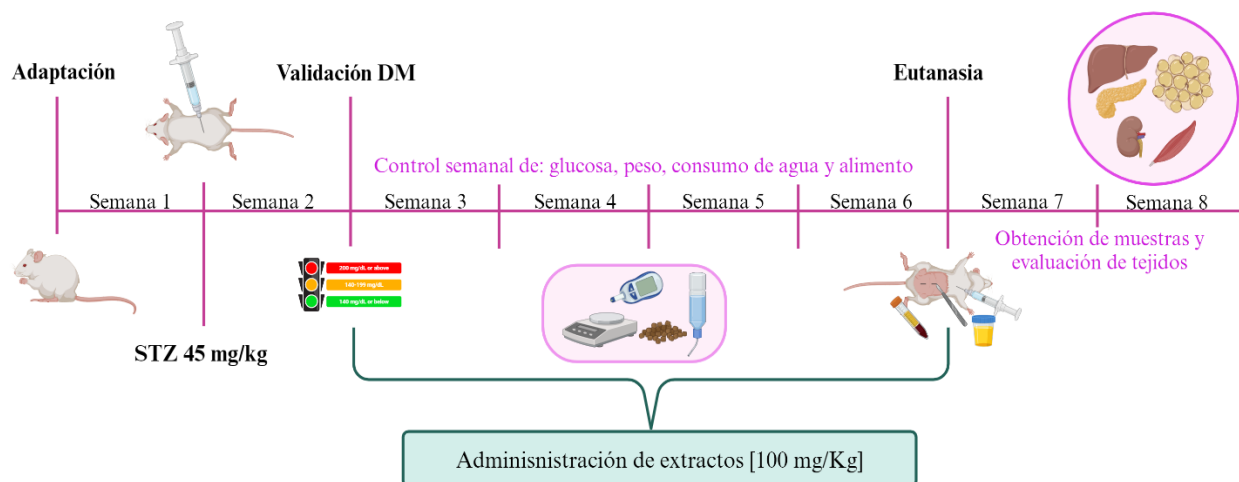


Figura 7. Línea del tiempo para el experimento *in vivo*.
Realizado con Biorender.

5.3.1 Inducción de diabetes

Las ratas tuvieron 24 horas de adaptación al ambiente a una temperatura de 25 °C, con un ciclo de luz y oscuridad de 12 h cada uno, y libre acceso a agua y comida (5001 Dieta para roedores; LabDiet). Se colocaron de 2 a 3 ratas por caja para medir el consumo de agua y de comida. Pasado el periodo de adaptación, las ratas permanecieron en ayuno durante 7 horas para inducir la diabetes, suministrando 500 μ L de estreptozotocina (STZ; Sigma, lote 102688764) a una dosis única de 45 mg/kg de peso corporal, inyectada por vía intraperitoneal (Figura 8). En las ratas del grupo control (sanas), la inyección se realizó únicamente con el vehículo (buffer de citrato de sodio 0.1 M a pH 4.5). Cuatro días después de la inducción, se procedió a medir la glucosa en sangre con el fin de seleccionar, de manera aleatoria, a

aquellas ratas que presentaran niveles entre 180 y 250 mg/dL de glucosa para la conformación de los distintos grupos experimentales (Rodríguez-Méndez et al., 2018).

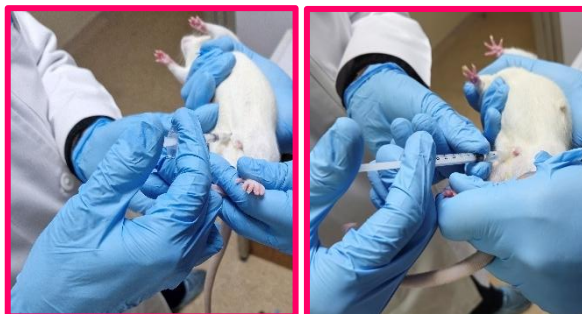


Figura 8. Inyección de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal.

5.3.2 Grupos de estudio

Se conformaron cinco grupos experimentales (descritos en la Tabla 1), todos manteniéndose en una dieta estándar y con acceso libre al agua. Para la administración del tratamiento, las dosis se ajustaron a 100 mg/kg de peso corporal, de acuerdo con lo reportado por Rodríguez-Méndez et al. (2018). Los extractos se diluyeron en una solución glucosada (30%) y, utilizando este vehículo, se preparó la dosis correspondiente para cada rata, obteniéndose un volumen de administración final de 500 μ L por animal (Figura 9).

Tabla 1. Grupos de estudio para la evaluación de los extractos de Timbe.

Grupos	Dosis de STZ (7° día)	Tratamiento
Control (4)	Buffer	Solución glucosada (30%)
Diabético (5)	45 mg/kg peso corporal de STZ	Solución glucosada (30%)
Diabético (4)	45 mg/kg peso corporal de STZ	Extracto de semilla (ES)
Diabético (4)	45 mg/kg peso corporal de STZ	Extracto de vaina-semilla (EV-S)
Diabético (4)	45 mg/kg peso corporal de STZ	Extracto de vaina (EV)

Buffer: solución de citrato de sodio 0.1 M a pH 4.5. La STZ se disolvió en el buffer (solución de citrato de sodio 0.1 M a pH 4.5). Los extractos se disolvieron en solución glucosada (30%).



Figura 9. Administración de extractos metanólicos de Timbe.

5.3.3 Determinaciones semanales

a) Glucosa

Semanalmente, se realizó una pequeña incisión en la cola de cada rata para obtener una muestra de sangre por vena caudal. La muestra se aplicó en una tira reactiva acoplada a un glucómetro (ACCU-CHEK) para determinar la concentración de glucosa en sangre. Previamente, los animales fueron sometidos a un ayuno de 7 horas. La medición se basó en la acción de la enzima glucosa deshidrogenasa, que cataliza la conversión de la glucosa en gluconolactona, lo que genera una señal eléctrica proporcional a la concentración de glucosa (mg/dL).

b) Peso

Cada rata fue pesada tres veces por semana, en días alternos, durante todo el experimento. Para ello, se utilizó una balanza con un modo específico para roedores (Sartorius), empleando una canastilla previamente tarada para asegurar la precisión de las mediciones (Figura 10).



Figura 10. Medición de peso en ratas.

c) Consumo de agua

Durante todo el experimento, se registró diariamente el consumo de agua por caja mediante una probeta graduada. Cada grupo experimental contó con dos cajas, y en cada una se midió el volumen de agua consumido. Todos los dispensadores fueron asegurados para evitar fugas que pudieran afectar la precisión de las mediciones.

d) Consumo de alimento

El consumo de alimento se registró diariamente por caja. Para ello, se pesó la cantidad de alimento ofrecido y, al día siguiente, se determinó el remanente, calculándose así el consumo diario. Cada grupo experimental contó con dos cajas y las mediciones se realizaron por unidad de caja.

e) Sacrificio y obtención de muestras

Una vez transcurridas las cuatro semanas del experimento, se recolectó la orina de las ratas durante 12 horas (Figura 11). Las ratas fueron sometidas a anestesia mediante la inhalación de isoflurano (Fluriso, VetOne), conforme con la NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Una vez anestesiadas, se recolectó la sangre y posteriormente se realizó la eutanasia de los animales con un corte directo en la aorta para después extraer los órganos de interés.



Figura 11. Recolección de orina.

La sangre fue extraída directamente de la aorta (Figura 12), la cual se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 minutos a 4 °C para obtener suero, el cual se almacenó a -70 °C. Asimismo, se extrajeron los riñones, páncreas, hígado, tejido adiposo y músculo de la pierna trasera; estos órganos fueron pesados y seccionados por la mitad, conservándose una parte en hielo seco para su posterior almacenamiento a -70 °C, y la otra parte (para análisis histológicos) se fijó en paraformaldehído 4% (diluido con PBS; 0.24 g KH_2PO_4 , 1.44 g Na_2HPO_2 , 0.2 g KCl y 8 g NaCl por litro).



Figura 12. Extracción de sangre.

5.3.4 Determinación de glucosa en suero

La glucosa en sangre se determinó por duplicado mediante un kit de glucosa (Glucose-TR, Trinder: GOD-POD BSIS 17-E; SPINREACT). Se preparó el reactivo de trabajo (RT) disolviendo el vial R2 (enzimas: glucosa oxidasa 15000 U/L, peroxidasa 1000 U/L y 4-aminofenazona 2.6 U/L) en el frasco R1 (tampón: TRIS 92 mM, pH 7.4 y fenol 0.3 mM). A 5 μL de suero se agregaron 500 μL de RT, dejándolo reposar durante 20 min a T_{amb} . Para preparar el patrón, se mezclaron 5 μL de estándar (patrón primario acuoso de glucosa 100 mg/dL) con 500 μL de RT, y el blanco fue RT, dejándolo reposar en las mismas condiciones.

Cada muestra se inyectó por duplicado (240 µL) en una microplaca y se midió a 505 nm. La concentración de glucosa en sangre se calculó mediante la Ecuación (4).

$$\text{Glucosa } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \left(\frac{\text{Muestra-Blanco}}{\text{Patrón-Blanco}} \right) * 100 \quad (4)$$

5.3.5 Determinación de triglicéridos en suero

Los triglicéridos en sangre se determinaron por duplicado mediante un kit (Triglicéridos-LQ, GPO-POD Líquido BSIS 49-E; SPINREACT). Se utilizó el reactivo (R; pH 6.3, factor de desaparecimiento de lípidos 50 mM, p-clorofenol 2 mM, lipoproteína lipasa 150000 U/L, glicerol quinasa 500 U/L, glicerol-3-oxidasa 3500 U/L, peroxidasa 440 U/L, 4-aminofenazona 0.1 mM, ATP 0.1mM). Se añadieron 5 µL de suero a 500 µL de R, para la preparación del patrón, se mezclaron 5 µL del estándar (patrón primario acuoso 200 mg/dL) con 500 µL de R, el blanco fue solo el R. Tanto las muestras, como el patrón y el blanco se dejaron reposar durante 10 minutos a T_{amb}. Cada muestra se inyectó por duplicado (240 µL) en una microplaca y la absorbancia se midió a 505 nm. La concentración de triglicéridos en sangre se calculó utilizando la Ecuación (5).

$$\text{Triglicéridos } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}} \right) = \left(\frac{\text{Muestra-Blanco}}{\text{Patrón-Blanco}} \right) * 200 \quad (5)$$

5.3.6 Análisis de orina

El análisis de orina se llevó a cabo el día de la recolección, utilizando tiras reactivas para orina (Sysmex; Figura 13), que permitieron detectar diversos parámetros, como LEU (leucocitos), URO (urobilinógeno), BLD (hematuria; sangre en orina), BIL (bilirrubina), KET (cuerpos cetónicos), GLU (glucosa), PRO (proteína), pH, NIT (nitrito) y S. G. (densidad específica). Se siguió el procedimiento estándar: se sumergieron las tiras reactivas en la muestra de orina y se evaluaron los resultados según las instrucciones del fabricante.



Figura 13. Análisis de orina mediante tiras reactivas.

5.3.7 Determinación de proteinuria y creatinina

La medición de creatinina en orina se realizó con un kit colorimétrico en un analizador automatizado (UniCel DxC 600, Beckman Coulter, Indianápolis, IN, USA). La proteinuria en orina se midió con el método de Bradford (Ramírez-Rodríguez et al., 2022).

5.4 Evaluación del efecto de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos de ratas Wistar.

5.4.1 Extracción de islotes pancreáticos

Para la obtención de islotes pancreáticos, se utilizaron ratas Wistar machos de 300-350 g (2 meses de edad). Las ratas fueron sometidas a anestesia mediante la inhalación de isoflurano (Fluriso, VetOne), conforme con la NOM-062-ZOO-1999, para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio y se extrajo el páncreas (Figura 14). Posteriormente, se realizó la eutanasia de los animales con un corte directo en la aorta.

Para la extracción de los islotes se necesita la solución de asilamiento (SA), preparándose dos soluciones, una con NaCl 11 mM, NaHCO₃ 10 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1.1 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, Hepes 25 mM, todos los reactivos de diluyeron en 100 mL de agua destilada y la segunda solución es de CaCl₂ 2.5 mM (diluida en 100 mL), el día que se usó SA se mezclan las dos soluciones y se agregan 300 mL de agua, se ajusta el pH a 7.4 y se agrega glucosa (3 mM) y albúmina (1%) y se afora a 1 L.

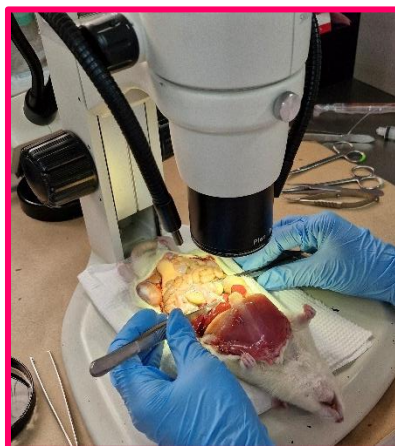


Figura 14. Extracción del páncreas en una rata Wistar macho.

Para la extracción del páncreas (Figura 15), se insufló con solución de extracción (SE: 10 mL de SA, hepes 25 mM, albúmina 2.5%, colagenasa 0.08% para cada rata), se cortó y se colocó en baño María con agitación (37 °C; 30 rpm) durante aproximadamente 30 min (hasta que el páncreas esté digerido). El páncreas se colocó en un tubo con 30 mL de SA y se agitó en vórtex durante 1 min (con el tubo en posición horizontal). Se colocó en hielo hasta que el páncreas precipitó. Se retiró el líquido (dejando 7 mL) y se agregaron 30 mL de SA. Se agitó y se dejó precipitar nuevamente. Se retiró la solución hasta dejar 7 mL; se coló y se enjuagó el sólido con SA (la necesaria para llenar un tubo de 15 mL). Los tubos se centrifugaron a 800 rpm, 4 °C durante 1 min. Se decantó (conservando el precipitado) y a estos se les agregaron 2 mL de ficol al 27% y se agitó en vórtex (solo para resuspender). Posteriormente, se agregaron en orden 2 mL de ficol al 23%, 2 mL de ficol al 20% y 2 mL de ficol al 11% (el gradiente de ficol se diluyó en SA). Los tubos con el gradiente de ficol se centrifugaron 15 min a 2200 rpm y 4 °C, los islotes pancreáticos se pasaron a SA y con el uso de un microscopio estereoscópico se recolectaron, para quitar el exceso de SA se centrifugaron (600 rpm, 4 °C, 20 s).

En una campana de flujo laminar los islotes pancreáticos fueron colocados en una microplaca (6 pocillos) con 3 mL/pocillo de solución estéril (SA con 1% de antibiótico y 10% de suero

fetal bovino; filtrada 0.20 μm), los islotes pancreáticos se dejan en reposo 24 horas en incubadora (37 °C, 4.7% CO₂ y 90% humedad relativa) (Ropero et al., 2002).

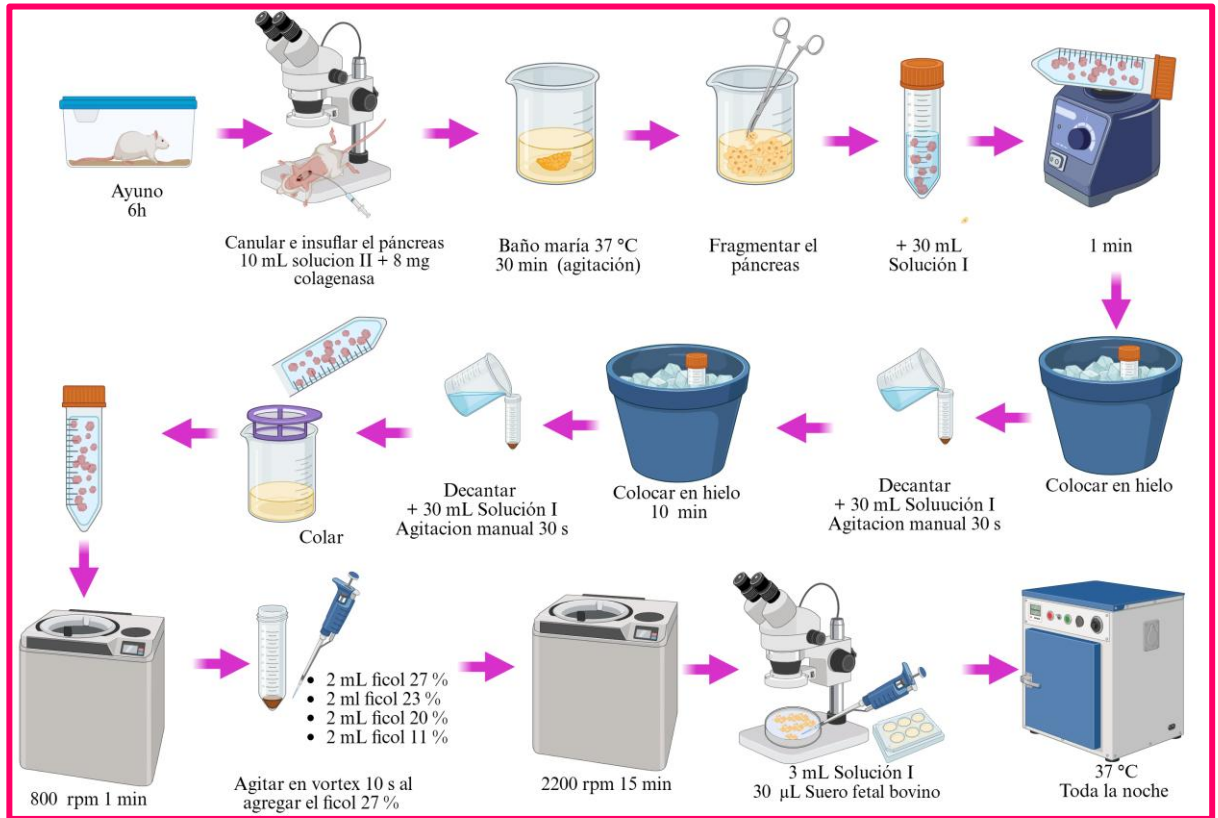


Figura 15. Diagrama general de la extracción de islotes pancreáticos de rata Wistar

5.4.2 Evaluación de la secreción de insulina

Después de 24 horas de recuperación de los islotes pancreáticos, se aplicaron los tratamientos, realizando 24 repeticiones por cada grupo, en total 6 grupos: control, control + semilla, control + vaina, STZ, STZ + semilla y STZ + vaina (Figura 16). En cada repetición se colocaron 5 islotes en 1 mL de SA (solución de aislamiento; sección 5.4.1), utilizando dos concentraciones de glucosa (3 mM y 11 mM).

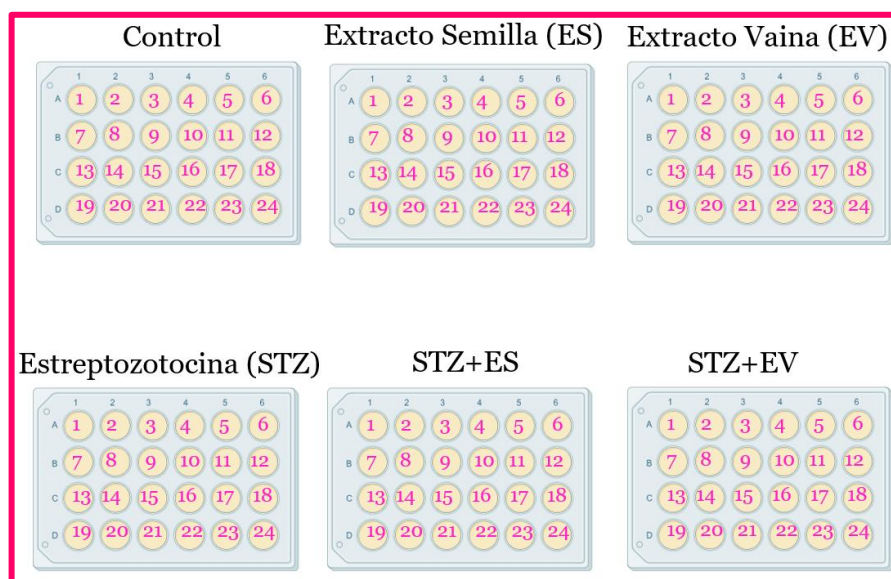


Figura 16. Grupos experimentales para el análisis de la secreción de insulina

Para la evaluación de los extractos metanólicos de semilla y vaina como agentes preventivos, se añadieron 10 μL de los extractos (20 mg/mL, diluidos en SA a 3 mM y 11 mM) a cada conjunto de 5 islotes (Figura 17). Los islotes se incubaron durante una hora a 37 $^{\circ}\text{C}$, con una concentración de CO_2 del 4.7% y una humedad relativa del 90%. Transcurrida la hora de incubación, se añadieron 10 μL de STZ (0.05 M) y se continuó la incubación durante 1 hora bajo las mismas condiciones. Al finalizar el tiempo de incubación, se recolectaron 500 μL de cada muestra, que se conservaron a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Los controles (islotes sin tratamiento), los islotes tratados con extracto de semilla y los tratados con extracto de vaina se incubaron durante 2 horas bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Para los extractos evaluados como tratamiento, se utilizaron las mismas concentraciones de SA (3 mM y 11 mM). Sin embargo, en este caso, se añadió primero la STZ (0.05 M) y, una hora después de la incubación, se añadieron los extractos correspondientes (Roper et al., 2002). La insulina se cuantificó mediante un radioinmunoensayo (RIA) comercial específico para ratas (Linco Research, St. Charles, MO, USA). La sensibilidad de la prueba fue de 0,1 ng/ml y los coeficientes de variación

intraensayo e interensayo fueron del 5% y del 10%, respectivamente (Rubio-Ruiz et al., 2010).

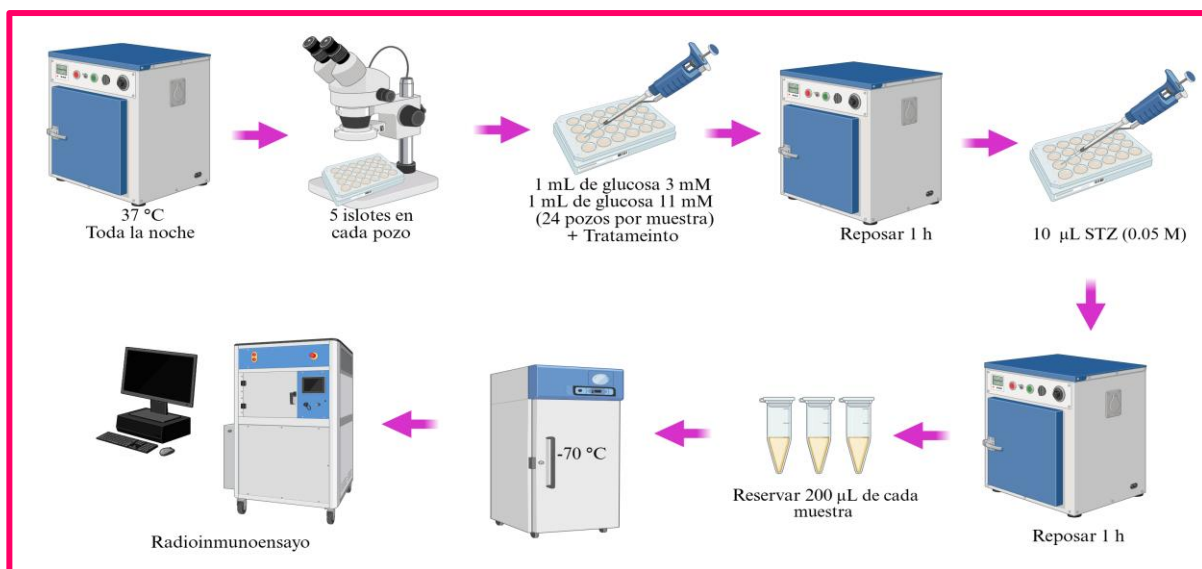


Figura 17. Diagrama experimental de los tratamientos utilizados para evaluar la secreción de insulina

5.5 Identificación de los genes implicados en la secreción de insulina y evaluación del efecto modulador de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe.

5.5.1 Islotes pancreáticos para ARN

La obtención de los islotes necesarios para la extracción de RNA, se realizó con el mismo procedimiento detallado en la sección 5.4.1. Una vez recuperados, se utilizaron 200 islotes por grupo de estudio: 1) control, 2) control + semilla, 3) control + vaina, 4) STZ, 5) STZ + semilla y 6) STZ + vaina, con 5 repeticiones por grupo. Posteriormente, se siguió el mismo protocolo empleado para evaluar la secreción de insulina. Para este análisis se agregaron 30 µL de los extractos metanólicos, por tratamiento a los 3 mL de SA que contenían los 200 islotes. Tras una incubación de 2 horas con los tratamientos correspondientes, se recolectaron los 200 islotes y se centrifugaron a 600 rpm durante 20 s a 4 °C para eliminar por completo

el SA. A los islotes precipitados se les añadieron 500 μ L de trizol y se agitaron durante 10 s en vórtex para homogeneizar; finalmente, se conservaron a -70 °C.

5.5.2 Obtención de ARN de islotes pancreáticos

Las muestras de islotes pancreáticos, previamente congeladas con Trizol a -70 °C, fueron descongeladas en hielo y sometidas a agitación en un vórtex durante 1 min para garantizar su homogeneización. A cada muestra se le adicionaron 200 μ L de cloroformo y posteriormente se agitó en vórtex durante 30 s. Las muestras fueron incubadas a 4 °C durante 5 minutos y, tras este periodo, se centrifugaron a 13,200 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa, que se presentó transparente, fue cuidadosamente extraída y transferida a un tubo estéril. A esta fase se le añadieron 400 μ L de isopropanol, se agitó en vórtex durante 10 segundos y las muestras se dejaron en reposo durante 20 minutos a 4 °C. Posteriormente, se procedió a una nueva centrifugación bajo las condiciones previamente mencionadas para recuperar únicamente el precipitado. A este precipitado se le adicionaron 800 μ L de etanol al 75% (previamente filtrado) y se agitó en un vórtex durante 5 segundos. Se realizó una segunda centrifugación y se conservó el precipitado. Los tubos con el precipitado fueron colocados sobre una gasa estéril para permitir su secado durante al menos 20 minutos. Finalmente, se adicionaron 20 μ L de agua de grado PCR y se agitó en un vórtex durante 5 segundos. La cantidad y pureza de las muestras fueron determinadas mediante espectrofotometría utilizando un equipo Biodrop, y las muestras fueron almacenadas a -70 °C (Sosa-Larios et al., 2023).

5.5.3 Obtención de ADNc de islotes pancreáticos

A partir del ARN se obtuvo el ADNc (ADN, ácido desoxirribonucleico complementario). Las muestras fueron descongeladas en hielo y sometidas a agitación en un vórtex durante 10 s. Posteriormente, se centrifugaron a 8,000 rpm durante 10 s. En un tubo estéril se añadió agua de grado PCR (la cantidad se determinó según la concentración de cada muestra, calculada para alcanzar una concentración final de 1 μ g de ARN). A cada muestra se incorporó el ARN correspondiente. Se adicionaron 6 μ L de Mix (4 μ L de Sx ReaccionMix + 2 μ L de Maxima Enzima; Kit Thermo Scientific), tomando precauciones para evitar la

formación de espuma. Las muestras fueron centrifugadas mediante un giro corto (1 spin) de 10 s en un microcentrífuga MiniSpin (Eppendorf). Las muestras fueron colocadas en un termociclador (Veriti, Applied Biosystems), donde se programaron las condiciones del kit utilizado: 10 min a 25 °C, 28 min a 50 °C, 5 min a 85 °C y una fase final de 4 °C (Sosa-Larios et al., 2023).

5.5.4 Análisis de qPCR

El análisis de expresión génica se realizó mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real, utilizando el kit LightCycler® TaqMan® Master y las sondas Universal ProbeLibrary Set, Human Probes #1–#90 (REF 04683633001, Roche). En cada pocillo de la placa de reacción se adicionaron 1.5 µL de cADN y 8.5 µL de mezcla de reacción para PCR, preparada de la siguiente manera: 6 µL de agua grado PCR, 2 µL de mezcla enzimática (preparada al momento de su uso, conforme a las indicaciones del kit: 8 µL de enzima reconstituida en el volumen de agua especificado), 0.2 µL del oligonucleótido forward (L), 0.2 µL del oligonucleótido reverse (R), y 0.1 µL de la sonda específica, seleccionada de acuerdo con el gen a analizar (Tabla 2), además del gen constitutivo L-32. La amplificación y detección de los productos de PCR se realizaron en un equipo LightCycler®, lo que permitió la cuantificación en tiempo real (Sosa-Larios et al., 2023).

Tabla 2. Secuencias de genes para análisis de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Gen	# Sonda	Secuencias
GCK (Glucoquinasa)	49	L 5'-CTGGACGACAGAGCCAGGAT-3'
		R 5'-CTGGAAGTCTGCCAGGATCT-3'
IRS (Receptor de insulina)	13	L 5'-CAGGGCAAGCTCTTCTTCCA-3'
		R 5'-TCCGGACACTTCTCCATCT3'-
GLUT2 (Transportador de glucosa 2)	38	L 5'-TTCAGCAACTGGGTCTGCAA-3'
		R 5'-AAGAACACGTAAGGCCCGAG-3'
SOD (Superóxido dismutasa)	5	L 5'-GGACACATTGGCCACACC-3'
		R 5'-GGTCCAGCGGATGAAGAG-3'

CAT (Catalasa)	63	L 5'-AATGAAGACAACGTCACCTCAGG-3' R 5'-TGTTCTCACACAGGCGTTTC-3'
TRX2 (Tiorredoxina-2)	2	L 5'-TGCATCCCTCTGCTCACA-3' R 5'-GGAGATGACTGAGGTCAGGAAC-3'
iNOS (Óxido nítrico sintasa inducible)	71	L 5'-AGACAGGAAAGTCGGAAGCG-3' R 5'-CAACCTTGTTGTTGAAGGCG-3'
INS2 (Insulina 2)	10	L 5'-CGAAGTGGAGGACCCACA-3' R 5'-TGCTGGTGCAGCACTGAT-3'
NRF2 (Factor de transcripción)	6	L 5'-TTCCTAGCAGAGCCCAGTG-3' R 5'-TCAGAGAGGGACTGACTAATGG-3'
MafA (Factor de transcripción)	10	L 5'-GACAAGTGCCAGCTCCAGA-3' R 5'-TACAGGTCCCGCTCCTTG-3'
PDX1 (Factor de células endocrinas pancreáticas)	74	L 5'-CTAAGGCCGGAAGGCAGT-3' R 5'-GGA GGT GTT GTC CCC TCA-3'
L-32 (Constitutivo)	17	L 5'-CCGGAAGTTTCTGGTCCAC-3' R 5'-GCACAGTAAGATTTGTTGCA-3'

5.6 Análisis estadístico

Los resultados de rendimiento de extracción, contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante se presentan como medias y errores estándar, ya que las muestras se hicieron por triplicado; dichos datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional, seguido de la prueba post hoc de Tukey. Tanto los resultados de la secreción de insulina como los de todos los genes se presentaron como medias y errores estándar, y se analizaron mediante un ANOVA de dos vías. Se consideraron diferencias significativas entre los tratamientos cuando el valor de p fue inferior a 0.05. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0.2.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos metanólicos obtenidos de las semillas de Timbe (*Acaciella angustissima*) permitieron la extracción y la caracterización de los compuestos fenólicos presentes en esta planta. El uso del metanol como disolvente facilitó la solubilización de estos compuestos bioactivos, lo que permitió su posterior identificación y análisis.

6.1 Caracterización de semilla y vaina de Timbe

Los resultados de la Tabla 3, muestran que la semilla posee un perfil nutricional destacado, caracterizado por un alto contenido de proteínas (43.17%), carbohidratos (27.76%) y fibra total (17.77%), de la cual se observó una proporción considerable de fibra soluble (11.78%) e insoluble (88.22%), lo que indica que la semilla es una excelente fuente de nutrientes esenciales. Esta composición sugiere un gran potencial para su uso en aplicaciones alimentarias y nutricionales, especialmente por su aporte de proteínas y fibras que favorecen la salud digestiva y metabólica, al ser una leguminosa es comparable con otras por ejemplo las lentejas, que al ser similar físicamente en cuanto a la tiene una mayor cantidad de proteína, ya que para esta se reporta una concentración cerca de 25–27% de proteína (Mustafa et al., 2022; Taghi-Gharibzahedi et al., 2012; Xia et al., 2023) y en cuanto a la fibra está dentro del rango reportado, debido a que este va de 5 al 30% (Taghi-Gharibzahedi et al., 2012) dependiendo de la variedad de la lenteja. Una de las leguminosas más estudiadas y reportadas por su contenido nutricional y beneficios para actividades biológicas es la soya, que tiene un valor proteico similar al de Timbe, con 32–35% de proteínas, 9-35% de carbohidratos y 5–20% de fibra total (Anyiam et al., 2025; Lakhssassi et al., 2024).

Por otro lado, la vaina de Timbe presenta un contenido nutricional más limitado, con valores de proteínas (12.90%) y de carbohidratos (9.53%) inferiores a los de la semilla. Su contenido de macronutrientes sugiere un cierto valor nutricional o funcional, aunque su papel principal en la planta probablemente sea estructural o protector. Sin embargo, al comparar estos resultados con la literatura, se observa que el contenido proteico de la vaina de Timbe es superior al rango reportado para vainas de fabáceas (2–8 %), mientras que el contenido de carbohidratos es considerablemente al rango reportado de 60–90 % (Zhong et al., 2018).

Tabla 3. Contenido de proteínas, carbohidratos y fibras en semilla y vaina de Timbe.

Determinación	Semilla (%)	Vaina (%)
Proteína	43.17 ± 0.06	12.90 ± 0.05
Carbohidratos	27.76 ± 0.60	9.53 ± 0.59
Humedad	1.00 ± 0.05	1.10 ± 0.06
Lípidos	7.472 ± 0.12	No determinado
Fibra total	17.77 ± 0.34	No determinado
Fibra soluble	11.78 ± 0.84	No determinado
Fibra insoluble	88.22 ± 0.84	No determinado

Los datos se expresan como media ± error estándar. Algunos parámetros no se determinaron en la vaina, ya que esta fracción no se considera de interés alimentario. El análisis se priorizó en la semilla, por ser la porción consumible y por su potencial aplicación en la industria alimentaria.

6.2 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

De los extractos metanólicos, la semilla de Timbe presentó el mayor rendimiento de extracción, con un $16.04 \pm 1\%$, significativamente superior al de la vaina y de la vaina-semilla ($p < 0.05$). La mezcla vaina-semilla produjo 6.814 ± 0.23 g de extracto, con un rendimiento intermedio de $13.63 \pm 1\%$, mientras que la vaina presentó el menor rendimiento, de $9.36 \pm 1\%$ (Tabla 4).

Tabla 4. Rendimiento de extracción de semillas, vaina y vaina-semilla de Timbe.

Muestra	Extracto (g/50g)	Rendimiento (%)
Semilla	8.020 ± 0.27^a	16.04 ± 0.53^a
Vaina	4.678 ± 0.21^c	9.36 ± 0.43^c
Vaina-Semilla	6.814 ± 0.24^b	13.63 ± 0.49^b

Los datos se expresan como media ± error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados indican que la semilla es la fracción más eficiente para la obtención de extractos metanólicos, mientras que la vaina resultó ser la menos eficiente. Cabe destacar que esta diferencia no solo se debe a la concentración de compuestos fenólicos, sino también a la composición propia de cada fracción. La semilla contiene una mayor proporción de componentes lipídicos, lo que contribuye a una mayor capacidad de extracción con disolventes orgánicos como el metanol, a diferencia de la vaina, que presenta una composición más fibrosa y menor contenido de grasa.

En la Tabla 5 se observa que la vaina presenta el mayor contenido de compuestos fenólicos totales (7.151 mg GAE/g), flavonoides (2.235 mg RE/g) y taninos condensados (6.213 mg CE/g), así como la mayor capacidad antioxidante, tanto en términos de equivalentes de Trolox (DPPH: 9.745 mg/g; ABTS: 7.931 mg/g) como en porcentaje de inhibición (DPPH: 84.52%; ABTS: 96.36%). La mezcla vaina-semilla presentó valores intermedios en todos los parámetros, superando significativamente a la semilla sola, que mostró los niveles más bajos de compuestos bioactivos y de actividad antioxidante. Estos resultados indican que la vaina posee un mayor potencial antioxidante que la semilla y que su incorporación a las mezclas mejora significativamente las propiedades funcionales del producto. Sin embargo, los valores de compuestos fenólicos obtenidos para el Timbe fueron inferiores a los reportados por Rodríguez-Méndez (2018). Esta diferencia podría atribuirse a diversos factores fisiológicos y ambientales que inciden en la biosíntesis de compuestos fenólicos. La producción de estos metabolitos secundarios depende de las condiciones de crecimiento de la planta, como la radiación solar, la temperatura, la disponibilidad de agua, el tipo de suelo y la etapa de madurez del fruto, así como de factores genéticos propios de cada variedad (Guerrero-Becerra et al., 2025). En general, es probable que el Timbe presente una menor acumulación de compuestos fenólicos debido a variaciones en su metabolismo o en las condiciones ambientales durante su desarrollo.

Tabla 5. Contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en semillas, vaina y vaina-semilla de Timbe.

Análisis	Semilla	Vaina	Vaina-semilla
Fenoles totales (mg GAE/g)	4.810 ± 0.03 ^c	7.151 ± 0.02 ^a	5.838 ± 0.08 ^b
Flavonoides (mg RE/g)	0.121 ± 0.01 ^c	2.235 ± 0.14 ^a	0.979 ± 0.01 ^b
Taninos condensados (mg CE/g)	1.677 ± 0.21 ^c	6.213 ± 0.37 ^b	8.352 ± 0.49 ^a
DPPH (mg Trolox/g)	3.979 ± 0.05 ^b	9.745 ± 0.04 ^a	9.543 ± 0.05 ^a
ABTS (mg Trolox/g)	5.989 ± 0.21 ^b	7.931 ± 0.05 ^a	7.858 ± 0.04 ^a
DPPH (% inhibición)	14.43 ± 1 ^b	84.52 ± 1 ^a	82.06 ± 1 ^a
ABTS (% inhibición)	76.51 ± 1 ^b	96.36 ± 0 ^a	95.61 ± 1 ^a

Los datos se expresan como media ± error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

También se realizaron los análisis de compuestos fenólicos y de capacidad antioxidante directamente en los extractos metanólicos (Tabla 6), observándose una concentración de los compuestos en comparación con la matriz vegetal directa y una capacidad antioxidante similar a la de esta matriz.

Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de semillas, vaina y vaina-semilla de Timbe.

Análisis	ES	EV	EV-S
Fenoles totales (mg GAE/g)	7.57 ± 0.00	25.56 ± 0.07	5.39 ± 0.10
Flavonoides (mg RE/g)	10.12 ± 0.92	71.14 ± 1.07	45.31 ± 2.83
Taninos condensados (mg CE/g)	20.32 ± 1.09	29.93 ± 1.02	41.56 ± 1.72
DPPH (mg Trolox/g)	3.40 ± 0.08	9.00 ± 0.04	99.94 ± 0.13
ABTS (mg Trolox/g)	7.51 ± 0.08	8.03 ± 0.06	72.58 ± 0.88
DPPH (% inhibición)	8.42 ± 0	75.29 ± 0	97.47 ± 0
ABTS (% inhibición)	89.85 ± 0	96.66 ± 0	85.15 ± 1

ES: extracto de semilla. EV: extracto de vaina. EV-S: extracto vaina/semilla. Los datos se expresan como media ± error estándar

6.3 Perfil metabólico por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Los metabolitos secundarios son compuestos bioactivos clave en las plantas, ya que constituyen su herramienta de supervivencia y adaptación al medio en el que se desarrollan; en los humanos, estos compuestos pueden aportar beneficios para la salud y/o la prevención de enfermedades (Guerrero-Becerra et al., 2025). El conjunto de metabolitos secundarios identificados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS; Tabla 7) en la semilla de Timbe incluye aminoácidos, azúcares, alcoholes, ácidos grasos, esteroides y compuestos fenólicos. En cuanto a la distribución del área relativa (%), se observó que la sacarosa fue el compuesto mayoritario (54.734%), seguida por 1-monooleoilglicerol (22.342%) y el ácido linoleico (4.026%). La predominancia de sacarosa indica un elevado contenido de carbohidratos simples, lo cual es consistente con matrices vegetales ricas en reservas energéticas (Gallardo et al., 2008). Asimismo, la presencia considerable de monoacilglicéridos y ácidos grasos sugiere actividad metabólica asociada a rutas lipídicas y posibles funciones estructurales o de señalización biológica (Zhang et al., 2020). Entre los aminoácidos detectados se identificaron L-valina, L-leucina, L-prolina, serina y L-treonina, aunque en concentraciones relativamente bajas (<1%), lo que sugiere un contenido limitado de compuestos nitrogenados libres en la matriz analizada. Estos aminoácidos pueden actuar como precursores metabólicos relevantes y contribuir a las propiedades funcionales del extracto (Avula et al., 2025).

También se identificaron polialcoholes como D-glucitol (0.813%), D-manitol (0.216%) y pinitol (0.502%), compuestos asociados a funciones osmoprotectoras y al metabolismo de carbohidratos, lo que puede indicar procesos adaptativos fisiológicos en el material de origen (Dumschott et al., 2019; Keller & Ludlow, 1993). De igual forma, la presencia de fitoesteroides, como el estigmasterol (0.247%), y de antioxidantes naturales, en particular α -tocoferol (0.181%), refuerza el potencial bioactivo de la muestra, en particular en mecanismos de protección celular frente al estrés oxidativo (Yoshida & Niki, 2003). Los resultados sugieren que la matriz estudiada contiene una mezcla significativa de carbohidratos, compuestos lipofílicos y moléculas con actividad biológica, lo cual podría estar asociado a efectos funcionales relevantes, como la actividad antioxidante y la capacidad

de protección celular. La predominancia de sacarosa y monooleoilglicerol podría reflejar el estado fisiológico de la fuente vegetal y sus reservas metabólicas, mientras que la detección de ácidos grasos y esteroides confirma la presencia de componentes estructurales propios de las membranas biológicas. Estos hallazgos son similares a lo reportado en la literatura sobre extractos con propiedades nutraceuticas y farmacológicas (Doan et al., 2019; Prommaban et al., 2020; Rarison et al., 2023).

En el perfil de metabolitos secundarios del extracto metanólico de la semilla de Timbe se identificaron compuestos de naturaleza lipídica y aromática, entre los cuales destacaron el ácido mirístico, el ácido palmítico, el ácido linoleico y el ácido 11-trans-octadecenoico, así como el derivado aromático 1,4-bis(trimetilsilil)benceno. La presencia concurrente de ácidos grasos saturados (mirístico y palmítico) e insaturados (linoleico y 11-trans-octadecenoico) indica una composición lipídica heterogénea, propia de matrices vegetales con potencial bioactivo. Es importante señalar que el perfil del extracto de la semilla de Timbe podría ser aún más amplio, dado que otros compuestos podrían presentar concentraciones inferiores al límite de detección del equipo.

Tabla 7. Perfil de metabolitos secundarios en la semilla de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Tiempo de retención (min)	Nombre	Área (%)
5.759	L-Valina	0.694
6.741	L-Leucina	0.126
7.202	L-Prolina	0.187
7.984	Pirimidina	0.222
8.456	Serina	0.107
8.987	L-Treonina	0.115
9.595	Ácido l-aspártico	0.216
10.213	Pentitol	0.258
10.961	Ácido butanodioico	0.159

Tiempo de retención (min)	Nombre	Área (%)
11.52	Ácido pidólico	0.211
16.457	D-Glucitol	0.813
19.29	D-Manitol	0.216
19.652	D-Pinitol	0.502
20.507	Ácido hexadecanoico	2.823
21.697	Mioinositol	1.289
22.023	Decanamida	0.484
23.389	Ácido linoleico	4.026
24.068	Ácido octadecanoico	0.893
30.245	D-mioinositol	0.269
33.062	Ácido hexadecanoico	0.206
34.414	Sacarosa	22.342
35.166	1-monooleoilglicerol	0.664
35.909	Ácido tetracosanoico	0.109
36.222	D-galactosa	0.072
37.113	4-O- β -Galactopiranosil-D-manopiranososa	0.332
37.55	Galactinol	0.125
38.318	α -Tocoferol	0.181
38.665	D-Glucosa	0.413
39.678	Estigmasterol	0.247
40.125	β -Gentiobiosa	1.026
40.654	3-Bromo-5-etoxi-4-hidroxibenzaldehído	0.964
41.565	Sacarosa	54.734
43.159	Ácido succínico	3.878
43.994	Ácido ciclohexanocarboxílico	1.097

Por otro lado, el perfil de metabolitos secundarios de la vaina de Timbe (Tabla 8) mostró una composición dominada por lípidos, destacando el ácido cis-13-docosenoico con un 44.1% del área, lo que sugiere una abundante presencia de ácidos grasos insaturados con posible función estructural o de reserva. Le siguen el ácido palmítico y el ácido linoleico, ambos importantes en la formación de membranas celulares y en la señalización (Grela et al., 2017; Khrisanapant et al., 2019). El estigmasterol, un fitosterol, y la β -amirina, un triterpeno, refuerzan la presencia de compuestos con potencial bioactivo, relacionados con la defensa vegetal o la actividad antioxidante (Yoshida & Niki, 2003). La sacarosa (7.89%) y el D-pinitol (8.08%) indican un rol en el transporte de energía y la regulación osmótica, mientras que el ácido 2-piperidina carboxílico (2.57%), posiblemente un alcaloide, sugiere funciones defensivas (Hammond & White, 2008; Liu et al., 2025). El ácido α -cetoglutarato (1.95%), aunque más vinculado al metabolismo primario, podría reflejar una conexión con rutas biosintéticas secundarias. En conjunto, estos resultados muestran un perfil rico en metabolitos con funciones estructurales, energéticas y bioactivas, característico de tejidos vegetales en fase de alta actividad metabólica o de respuesta adaptativa (Hirai et al., 2023; Qin et al., 2025).

Tabla 8. Perfil de metabolitos secundarios en la vaina de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Tiempo de retención (min)	Nombre	Área (%)
11.515	Ácido 2-piperidina carboxílico	2.565
17.485	D-pinitol	8.083
19.367	Ácido α -cetoglutarato	1.953
20.516	Ácido palmítico	10.452
23.389	Ácido linoleico	8.608
34.386	Sacarosa	7.890
35.809	Ácido cis-13-docosenoico	44.104
39.678	Estigmasterol	13.063
40.438	B-amirina	3.282

En el extracto metanólico de la vaina de Timbe se identificaron compuestos como carbohidratos, ácidos grasos, aldehídos, compuestos fenólicos y triterpenos. Los compuestos detectados fueron D-galactosa, ácido palmítico, ácido linoleico, 9,17-octadecadienal, ácido ftálico, sucrosa, 3- α -mannobiosa, vitamina E y α -amirina. Este perfil revela la presencia de azúcares simples y disacáridos, lo que sugiere una posible actividad asociada a reservas energéticas y a componentes estructurales del tejido vegetal. Asimismo, la detección de vitamina E y α -amirina resulta particularmente relevante, dado que ambos compuestos han sido asociados con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo que sugiere que la vaina podría aportar metabolitos con potencial bioactivo (Asbaghi et al., 2020; Melo et al., 2011; Viet et al., 2021). No obstante, es probable que el extracto contenga otros compuestos de baja concentración que no hayan sido detectados.

6.4 Perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

El cromatograma (Figura 18) de la semilla de Timbe mostró un perfil de ácidos grasos dominado por ácidos grasos insaturados. En la Tabla 9 se presenta el perfil cromatográfico de los ácidos grasos identificados en la semilla de Timbe. El ácido linoleico (C18:2) fue el compuesto predominante, con un área del 55.31% y una concentración de 3404.04 $\mu\text{g/g}$. Este ácido graso poliinsaturado, perteneciente a la familia omega-6, es esencial para el ser humano y se ha asociado con funciones biológicas clave, como la regulación de la respuesta inflamatoria, el mantenimiento de la fluidez e integridad de las membranas celulares y la participación en la síntesis de eicosanoides bioactivos. Asimismo, estudios reportan que su consumo adecuado contribuye a reducir factores de riesgo cardiovascular, siempre y cuando exista un equilibrio adecuado con los ácidos grasos omega-3 (Belury, 2023; Xu et al., 2025).

El segundo compuesto más abundante fue el ácido oleico (C18:1), con un 17.10% de área y 2424.10 $\mu\text{g/g}$. Este ácido graso monoinsaturado tiene efectos cardioprotectores, destacando su capacidad para reducir los niveles de colesterol LDL y mejorar el perfil lipídico plasmático. Además, se ha asociado con efectos antiinflamatorios y con la mejora de la función endotelial, lo que refuerza su importancia en la salud cardiovascular. El ácido oleico

también destaca por su evidencia de mejora de la sensibilidad a la insulina, la reducción de la resistencia insulínica y el control glucémico, estas características son un efecto positivo para el manejo y la prevención de la diabetes tipo 2 (López-Gómez et al., 2020; Perdomo et al., 2015; Ryan et al., 2000).

En menor proporción se encontraron los ácidos grasos saturados: el ácido palmítico (C16:0) con un 23.078% y el ácido esteárico (C18:0) con un 4.020%. Aunque los ácidos grasos saturados tradicionalmente han sido asociados con efectos adversos sobre la salud cardiovascular, no contribuyen de manera significativa a la elevación del colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad), a diferencia de otros ácidos grasos saturados (Shen et al., 2025; van Rooijen et al., 2021). Finalmente, el ácido eicosanoico (C20:0) se presentó en baja proporción (0.486). Este ácido graso saturado de cadena larga es común en matrices vegetales y desempeña una función estructural en la célula (Bach & Faure, 2010). La abundancia de ácidos linoleico y oleico, reconocidos por sus efectos antiinflamatorios, antioxidantes indirectos, cardioprotectores y en el control de la glucemia, sugiere un potencial de valor funcional de la semilla de Timbe.

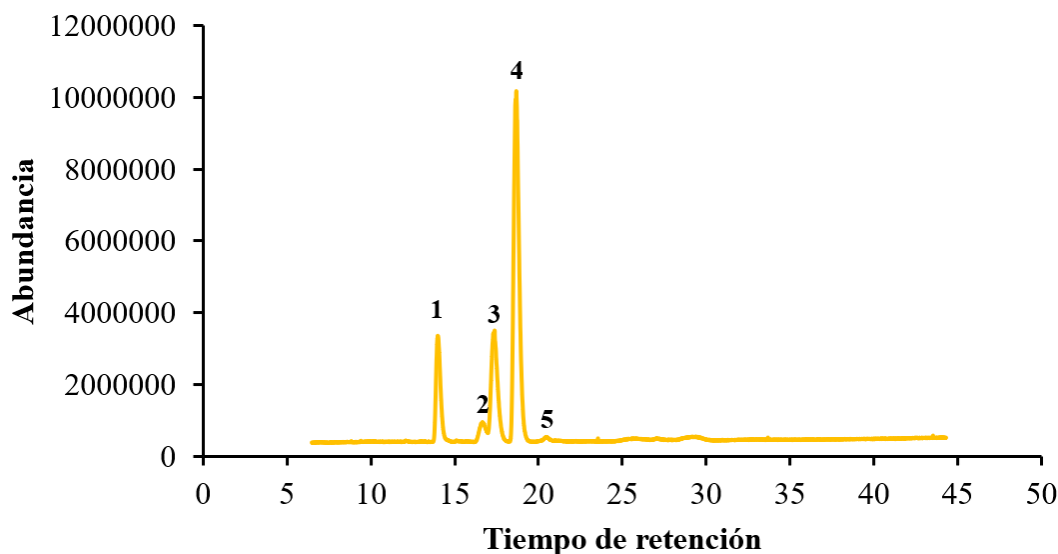


Figura 18. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en semilla de Timbe.

Tabla 9. Perfil de ácidos grasos en semilla de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

# Pico	Tiempo de retención (min)	Nombre	Área (%)	Concentración (µg/g muestra)
1	14.017	Ácido palmítico	23.078	843.249
2	16.676	Ácido esteárico	4.020	237.454
3	17.408	Ácido oleico	17.105	2424.105
4	18.700	Ácido linoleico	55.311	3404.042
5	20.490	Ácido eicosanoico	0.486	50.888

Asimismo, se analizó el perfil de ácidos grasos del extracto metanólico de la semilla de Timbe (Figura 19), el perfil lipídico mostró que dicho extracto conservó principalmente los ácidos grasos palmítico, esteárico y linoleico (24.60%, 4.29% y 71.11% de área; respectivamente), lo que indica que estos compuestos presentan una mayor afinidad por el disolvente metanólico o una mayor estabilidad durante el proceso de extracción. Estos resultados confirman que la extracción metanólica permitió la recuperación de compuestos de interés funcional, lo que respalda el potencial nutracéutico de la semilla evaluada y complementa los hallazgos observados en la matriz completa.

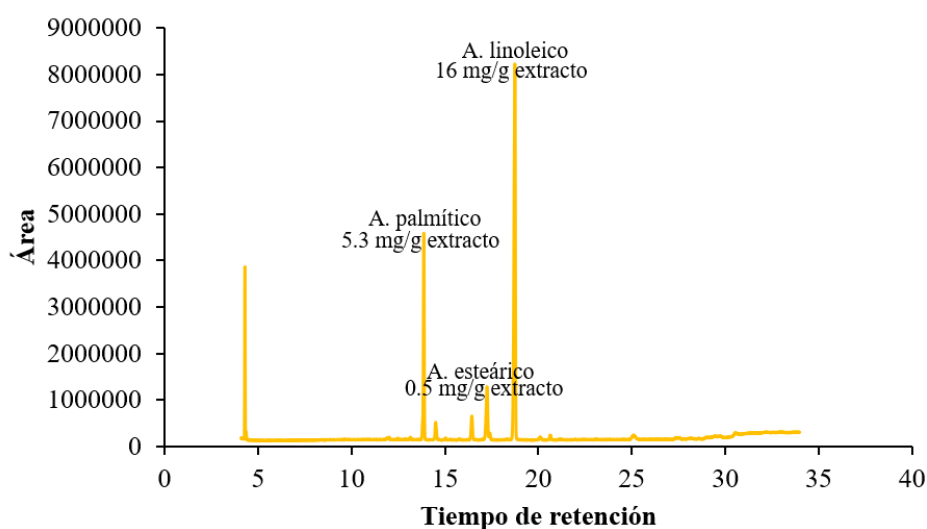


Figura 19. Perfil cromatográfico de ácidos grasos del extracto de semilla de Timbe.

En el caso de la vaina de Timbe, el cromatograma (Figura 20) mostró una mayor variabilidad en los ácidos grasos presentes; el perfil detectó una predominancia del ácido palmítico (C16:0), con un 37.87% de área, seguido del ácido linoleico (C18:2) con 23.06% y del ácido 6-octadecenoico (6C18:1) con 20.17%, también se identificaron cantidades relevantes de ácido esteárico (C18:0), representando un 12.05% de la composición de ácidos grasos (Tabla 10). En proporciones menores se detectaron compuestos como el ácido tetradecanoico (1.67%) y el ácido nonanodioico (0.60%), aunque no se cuantificaron porque estuvieron por debajo del límite de cuantificación (fuera de la curva de calibración). Asimismo, se identificaron los ácidos etanedioico, propanodioico, butanodioico y butanoico, todos por debajo del 1%. Estos resultados reflejan una mezcla compleja de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, así como la presencia de otros ácidos orgánicos de cadena corta que podrían contribuir al perfil funcional. El perfil de ácidos grasos en la vaina evidencia un perfil lipídico mixto con compuestos saturados e insaturados que podrían conferir propiedades biológicas de interés, particularmente en relación con la salud metabólica y cardiovascular.

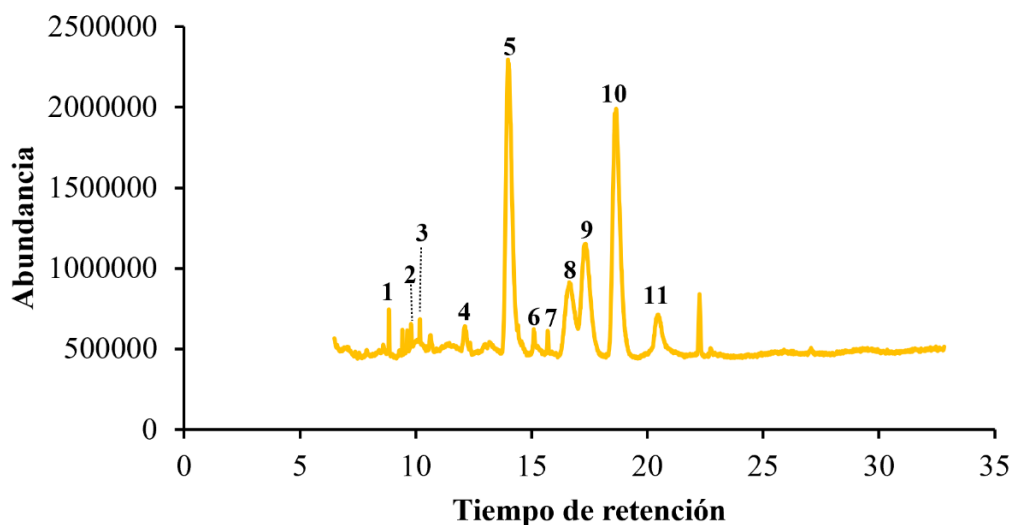


Figura 20. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en la vaina de Timbe.

Tabla 10. Perfil de ácidos grasos en la vaina de Timbe, obtenido mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

# Pico	Tiempo de retención (min)	Nombre	Área (%)	Concentración (µg/g muestra)
1	8.858	Ácido etanedioico	0.760	No cuantificado
2	9.439	Ácido propanodioico	0.324	No cuantificado
3	10.194	Ácido butanodioico	0.544	No cuantificado
4	12.130	Ácido tetradecanoico	1.673	No determinado (<curva)
5	13.997	Ácido palmítico	37.871	498.944
6	14.436	Ácido butanoico	0.644	No cuantificado
7	15.712	Ácido nonanodioico	0.600	No determinado (<curva)
8	16.640	Ácido esteárico	12.052	260.789
9	17.313	Ácido 6-octadecenoico	20.173	1033.730
10	18.667	Ácido linoleico	23.063	511.773
11	20.532	1,3,14,16-Nonadecatetraeno	2.295	42.122

En el cromatograma del extracto metanólico de la vaina de Timbe (Figura 21) se identificaron el butanodioico, palmítico, nonanodioico, esteárico, linoléico y tetracosanoico (0.40%, 58.25%, 0.64%, 20.89%, 10.30% y 9.52% de área, respectivamente), de los cuales se cuantificaron el palmítico (3.16 mg/g de extracto), esteárico (1.9 mg/g de extracto), linoléico (0.9 mg/g de extracto) y tetracosanoico (0.8 mg/g de extracto). La detección de estos compuestos confirma que el metanol favoreció la extracción de moléculas lipofílicas y de bajo peso molecular presentes en la vaina de Timbe.

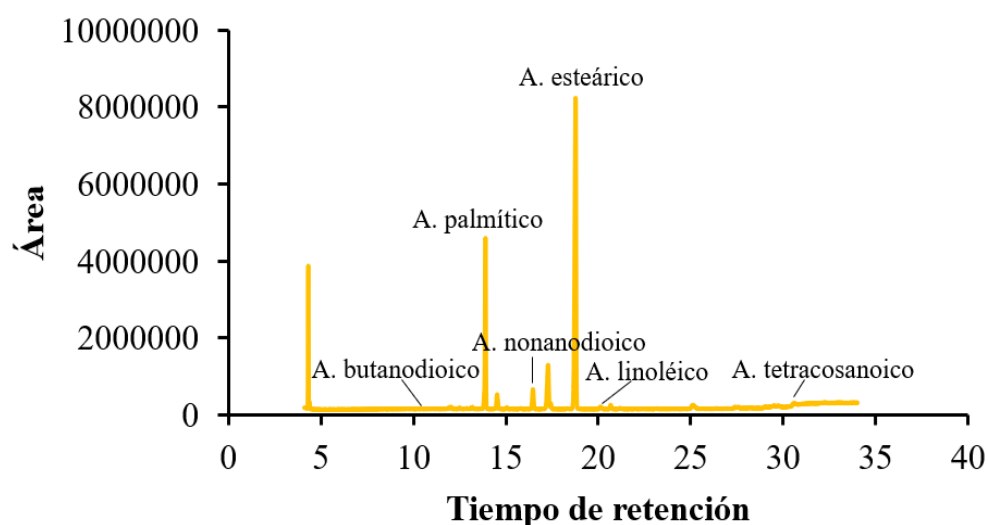


Figura 21. Perfil cromatográfico de ácidos grasos en el extracto de la vaina de Timbe.

6.5 Modelo in vivo

Se evaluó a un total de 48 ratas, de las cuales 17 se utilizaron como experimento piloto y 21 para la administración de los extractos de semilla, vaina y vaina-semilla de Timbe, en 5 grupos experimentales: control, diabéticas (D), D + extracto de semilla, D + extracto de vaina y D + extracto de vaina-semilla. Las 10 ratas restantes se destinaron a garantizar que la inducción intraperitoneal con STZ (estreptozotocina) fuera adecuada para obtener ratas diabéticas.

El experimento piloto se realizó inicialmente con 8 ratas para evaluar la viabilidad del estudio, lo que permitió identificar posibles problemas, ajustar el diseño y verificar la efectividad de los métodos empleados. Cinco días después de la inducción con STZ, solo una de las ratas presentó niveles elevados de glucosa (332 mg/dL), indicativos de diabetes, mientras que las otras 7 mostraron valores similares a los valores basales (132 ± 15 mg/dL). Incluso una semana después, las ratas presentaron niveles de glucosa basal, excepto una. Tras revisar las posibles causas, se observó que la única diferencia había sido el pH del vehículo, por lo que se solicitaron 9 ratas adicionales para realizar una nueva inducción. Sin embargo, tras esta segunda inducción, las ratas presentaron niveles de glucosa similares a los basales;

solo una mostró 211 mg/dL, aunque una semana después sus niveles de glucosa se igualaron a los de las demás. Con estos resultados, se atribuyó el uso de una STZ ya vieja y almacenada desde hace años, lo que probablemente redujo su efectividad.

Con una nueva STZ, se indujo la diabetes en 21 ratas (4 de ellas solo con vehículo) para evaluar la eficacia de los extractos metanólicos de Timbe. Los grupos se formaron de manera aleatoria; sin embargo, debido a los niveles de glucosa, no todas las ratas inducidas con STZ presentaron niveles de glucosa correspondientes a valores que se presentan con diabetes (Tabla 11). A pesar de ello, se les dio seguimiento y se administraron los extractos correspondientes a cada grupo. Sin embargo, dado que solo había dos ratas diabéticas por grupo, los resultados no fueron reproducibles debido a la variación de la glucemia en sangre entre los grupos.

Tabla 11. Niveles de glucosa en sangre medidos semanalmente.

Grupo	Basal	Diagnóstico	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Eutanasia
Control (C)	115 ± 1	115 ± 6	119 ± 3	107 ± 4	103 ± 5	108 ± 2
Diabético (D)	116 ± 2	287 ± 66	223 ± 70	263 ± 67	246 ± 81	269 ± 73
D + ES	113 ± 4	225 ± 56	175 ± 51	189 ± 72	150 ± 42	254 ± 90
D + EV	118 ± 11	252 ± 53	297 ± 70	274 ± 55	263 ± 65	215 ± 70
D + EV-S	123 ± 3	224 ± 60	242 ± 59	257 ± 61	265 ± 78	251 ± 60

La glucosa en sangre se expresó en mg/dL. Los datos se expresan como media ± error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía, seguido de la prueba t de Student, con análisis en cada tiempo de medición.

A lo largo del estudio, los valores registrados en los grupos experimentales mostraron patrones claramente diferentes de la glucosa (Figura 22). El grupo C mantuvo cifras estables desde la fase basal hasta la eutanasia, lo que refleja una condición fisiológica sana. En contraste, el grupo D presentó un incremento marcado desde el diagnóstico, con valores persistentemente elevados y variables en los tiempos subsecuentes. Los grupos con tratamientos (D+ES, D+EV y D+EV-S) también mostraron aumentos importantes en el diagnóstico; sin embargo, no todas las ratas de cada grupo presentaron el mismo

comportamiento. Por lo que no existió ninguna diferencia significativa entre los grupos a lo largo del tiempo.

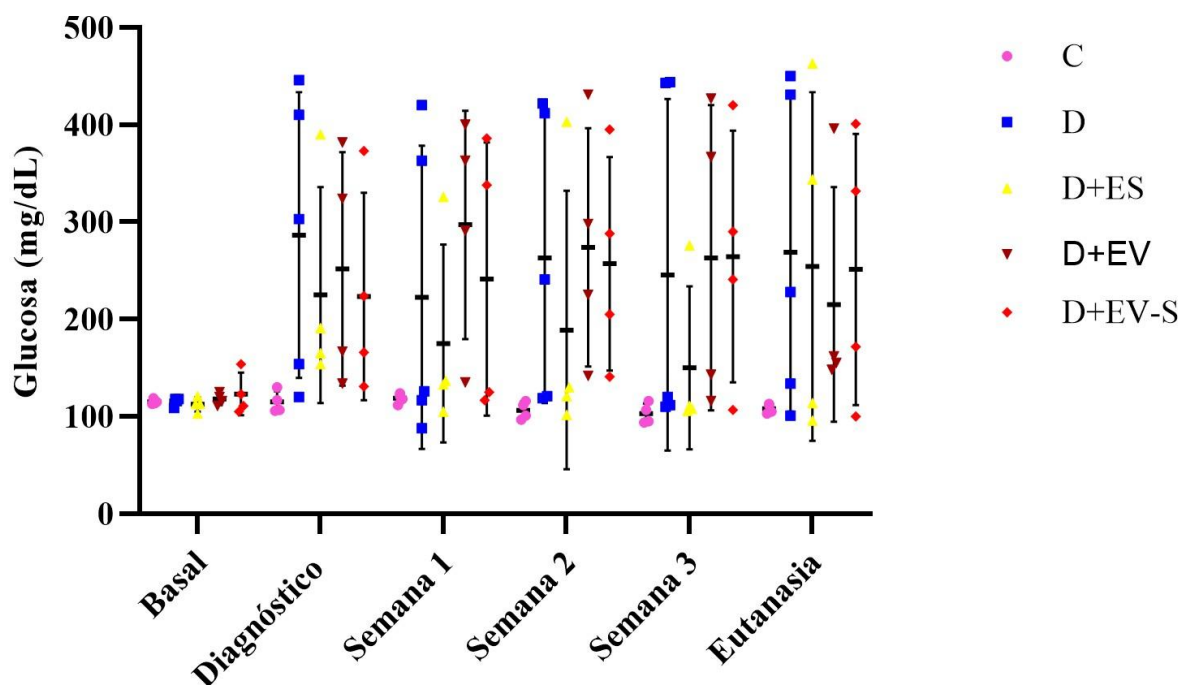


Figura 22. Glucosa en sangre durante el período experimental.

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student en cada tiempo analizado.

El peso corporal (Figura 23) mostró una evolución desde la etapa basal hasta la eutanasia. Se observó que todos los grupos aumentaron de peso, aunque en distintas proporciones. El grupo diabético sin tratamiento presentó el menor aumento de peso, especialmente al final, lo que sugiere efectos negativos de la diabetes no tratada. En contraste, los grupos diabéticos que recibieron tratamientos (D+ES, D+EV, D+EV-S) mostraron una recuperación más notable del peso, siendo el grupo D+EV el que alcanzó los valores más altos, similares a los del grupo control. Sin embargo, al igual que en los valores de glucosa, las ratas no presentaban pesos similares dentro de cada grupo, lo que indicaba que la diabetes no se manifestaba de manera uniforme en todos los individuos.

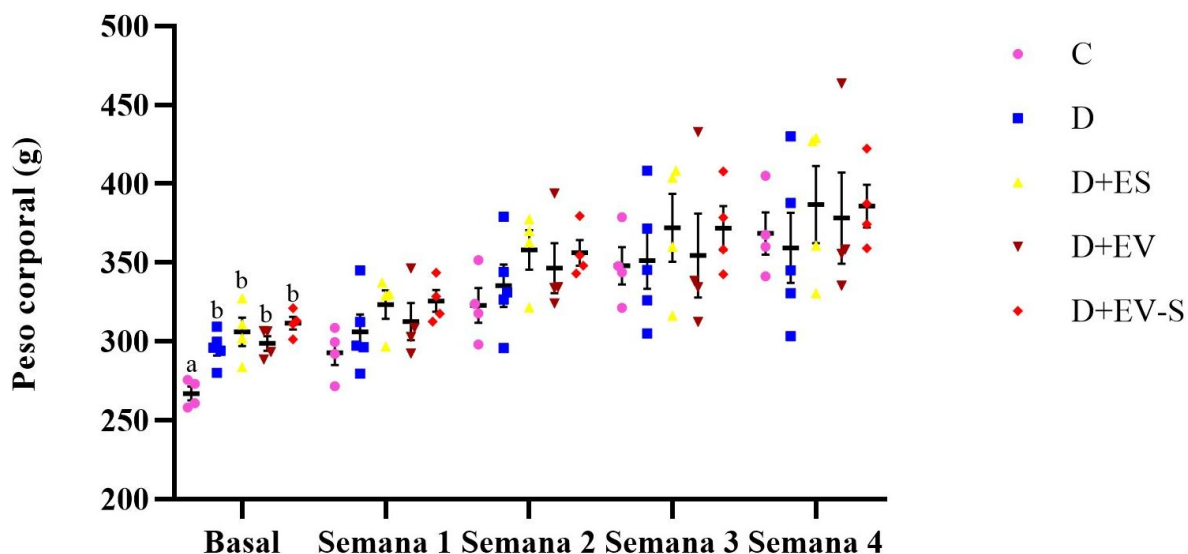


Figura 23. Variación del peso corporal durante el periodo experimental.

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student en cada tiempo analizado. Letras diferentes en un mismo tiempo de medición indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Las ratas antes del tratamiento (estado basal) consumían la misma cantidad de agua (Figura 24), sin embargo, a pesar de que no todas las ratas inducidas con STZ parecían ser diabéticas, presentaron un aumento significativo en la ingesta de agua con respecto al control, lo cual fue coherente con la poliuria y polidipsia características de la diabetes. Con el paso del tiempo, se observaron diferencias significativas entre el grupo diabético y los grupos tratados, especialmente en los tratados con EV y EV-S. Sin embargo, lejos de mostrar mejoría, las ratas tratadas consumían incluso más agua que las que no recibieron tratamiento.

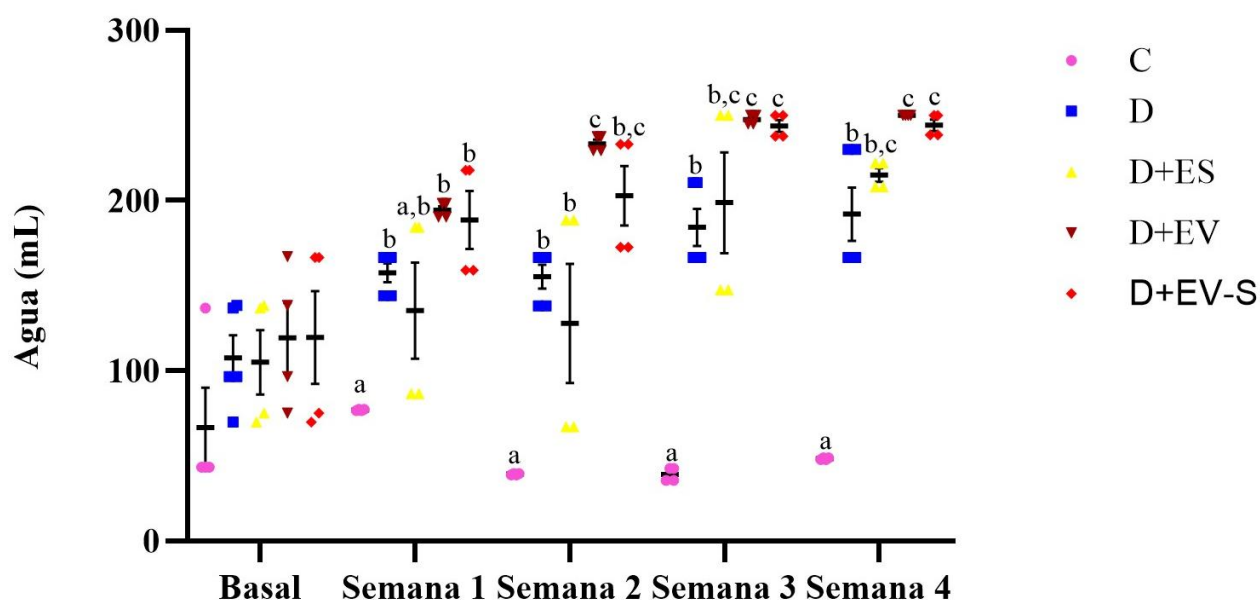


Figura 24. Consumo de agua durante el periodo experimental.

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student en cada tiempo analizado. Letras diferentes en un mismo tiempo de medición indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Con respecto al consumo de alimentos (Figura 25), se observó que los grupos inyectados con STZ presentaron un aumento notable en la ingesta de alimentos, alcanzando los valores más altos en la semana 3, lo cual es consistente con la polifagia, un síntoma típico de la diabetes. En cambio, el grupo control mantuvo un consumo bajo y estable durante todas las semanas. En la semana 4, las ratas diabéticas tratadas con EV y EV-S mostraron una ligera disminución del consumo, lo que posiblemente indica una estabilización metabólica como respuesta parcial al tratamiento; sin embargo, las diabéticas sin tratamiento tenían menos consumo de alimentos que estas.

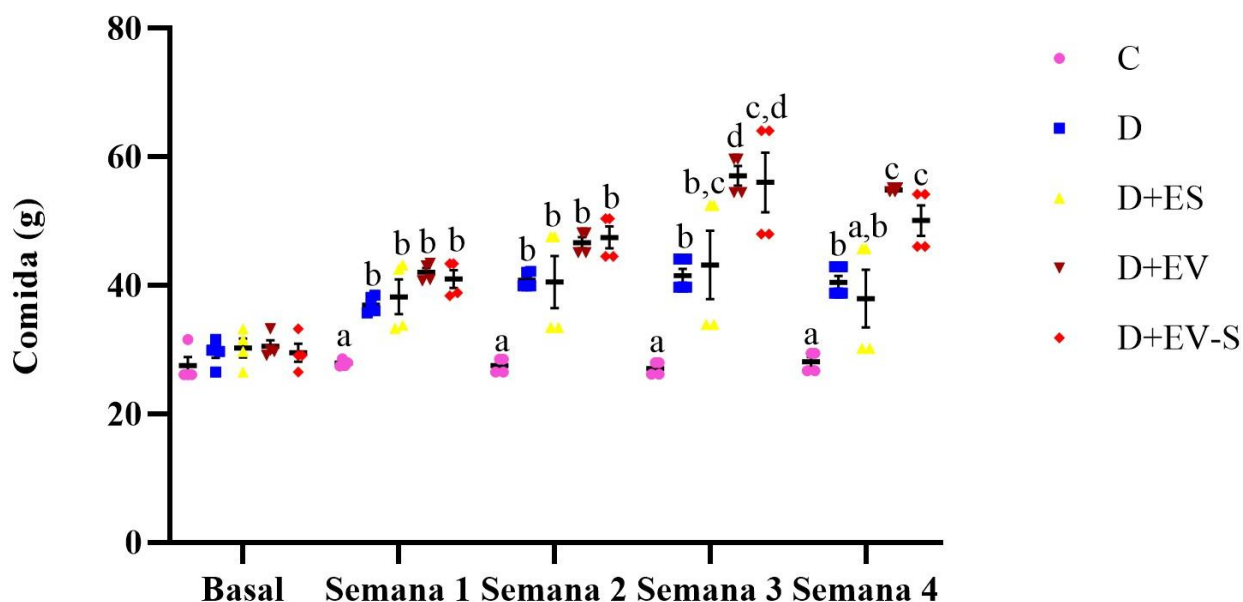


Figura 25. Consumo alimenticio durante el periodo experimental.

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student en cada tiempo analizado. Letras diferentes en un mismo tiempo de medición indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La Tabla 12 muestra los resultados séricos de glucosa y triglicéridos; el grupo control presentó niveles normales, mientras que el grupo diabético mostró una marcada hiperglucemia (341.8 mg/dL) y una reducción de triglicéridos respecto al grupo control. El tratamiento con extracto de semilla no logró controlar eficazmente la glucosa y, además, elevó los triglicéridos (326.9 mg/dL). Por otro lado, el grupo tratado con extracto de vaina presentó la mayor hiperglucemia (442.9 mg/dL), aunque mostró una reducción significativa de los triglicéridos (127.0 mg/dL). Finalmente, el grupo tratado con el extracto de la combinación vaina y semilla fue el que mostró mejores resultados generales, con una disminución tanto en glucosa (314.4 mg/dL) como en triglicéridos (108.3 mg/dL), lo que sugiere un efecto más equilibrado y potencialmente más eficaz del extracto combinado sobre el metabolismo de glucosa y lípidos, aunque los resultados no son concluyentes debido a la alta variabilidad entre ellos.

Tabla 12. Concentraciones séricas de glucosa y triglicéridos.

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
Control	139.317 ± 31	290.159 ± 110
Diabético	341.814 ± 91	154.413 ± 61
Diabético + ES	332.520 ± 52	326.984 ± 111
Diabético + EV	442.887 ± 119	126.984 ± 29
Diabético + EV-S	314.352 ± 90	108.254 ± 25

Los datos se expresan como media ± error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student.

La Figura 26 muestra los niveles individuales de glucosa y triglicéridos en suero; el grupo D presenta valores de glucosa más elevados que el control, lo que confirma un estado metabólico alterado, pero no se observa diferencia significativa entre los grupos. Algunos grupos tratados parecen reducir parcialmente los niveles de triglicéridos, especialmente en D+EV y D+EV-S, donde tienden a valores más bajos; sin embargo, no se observa diferencia significativa entre los grupos.

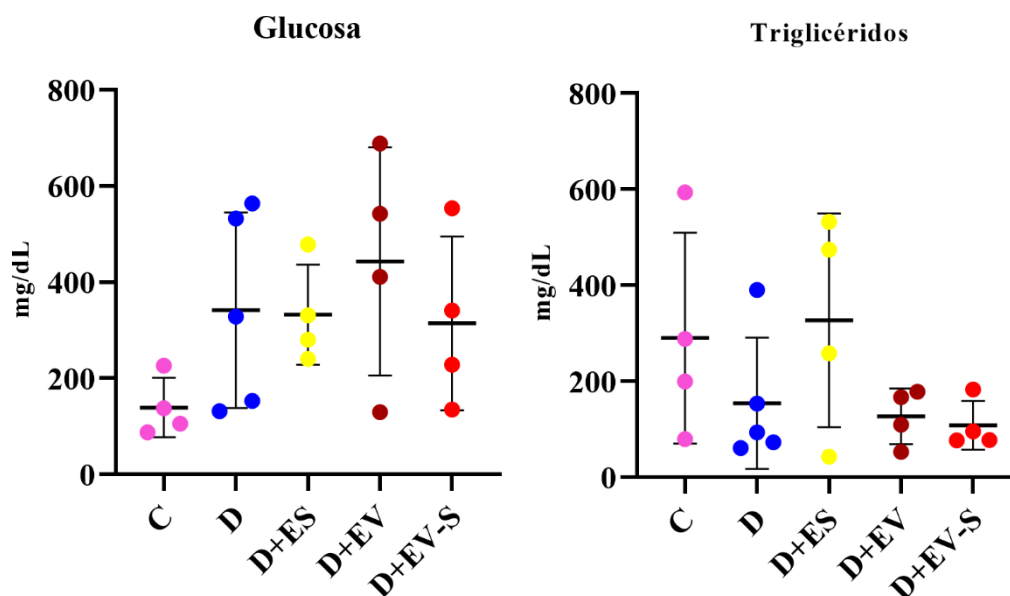


Figura 26. Concentraciones séricas de glucosa y triglicéridos en la eutanasia.

Los datos se expresan como media ± error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student. Letras diferentes en cada gráfico indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

La recolección de orina nos permitió obtener datos sobre el volumen urinario, la proteinuria y la depuración de creatinina (Tabla 13). El grupo diabético presentó un aumento marcado del volumen de orina, consistente con la poliuria característica de la diabetes, mientras que la proteinuria fue ligeramente mayor que en el grupo control. Los grupos tratados con los extractos metanólicos de semilla, vaina y la combinación (vainas semilla) mostraron volúmenes urinarios intermedios, con una reducción en comparación con el grupo diabético no tratado. En particular, el grupo tratado con extracto de semilla presentó la mayor proteinuria (28.98 mg/24 h), lo que podría indicar un posible daño renal persistente o una respuesta al extracto, sin embargo, nuevamente el número reducido de ratas no nos permite concluir dichos hallazgos. Los valores de creatinina fueron similares entre todos los grupos. No obstante, debido a la alta variabilidad de los resultados, especialmente en los parámetros de volumen y de proteinuria, estos deben interpretarse con reservas, además que ninguna presenta diferencias significativas.

Tabla 13. Mediciones en orina: volumen, proteinuria y depuración de creatinina.

Grupo	Volumen (mL/24h)	Proteinuria (mg/24h)	Creatinina (mL/min)
Control	10.5 ± 4	14.88 ± 2	0.86 ± 0.36
Diabético	25.3 ± 7	16.99 ± 4	0.94 ± 0.18
Diabético + ES	16.5 ± 6	28.98 ± 7	1.03 ± 0.17
Diabético + EV	19.5 ± 5	21.31 ± 5	0.95 ± 0.11
Diabético + EV-S	19.5 ± 4	22.06 ± 7	1.02 ± 0.19

Los datos se expresan como media ± error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student.

La Tabla 14 muestra el análisis de orina realizado con las tiras reactivas, que determina distintos parámetros. En los controles, los valores suelen estar dentro de rangos normales o con alteraciones leves. En cambio, las muestras de las ratas diabéticas presentaron niveles elevados de glucosa, cetonas y proteínas, lo que sugiere un mal control metabólico y un posible daño renal. Sin embargo, en los grupos tratados con extractos de semilla, vaina o su combinación, se aprecia una disminución de glucosa y cetonas, lo que podría indicar una

mejora en el manejo de la diabetes, aunque no se observa un efecto contundente. El grupo control presentó valores de glucosa negativos o mínimamente positivos, mientras que el grupo diabético mostró glucosas elevadas, entre 250 y 2000 mg/dL. Los grupos tratados con semilla, vaina o la combinación vaina-semilla exhibieron niveles intermedios, con valores que oscilaron entre 100 y 500 mg/dL, lo que sugiere una reducción parcial de la glucosa urinaria en comparación con el grupo diabético no tratado.

Tabla 14. Perfil urinario realizado mediante tiras reactivas.

LEU	URO	BLD	BIL	KET	GLU	PRO	pH	NIT	S.G.
Unidades	mg/dL	Escala	Escala	Escala	mg/dL	mg/dL	Escala	mg/dL	Escala
Control									
1+	N	HB+-	1+	1+	N-	2+100	7	N-	1.030
2+	N	HB+-	1+	1+	N-	2+100	6	N-	1.020
2+	N	HB+-	2+	1+	1+100	2+200	8	+0.1	1.030
2+	-	HB+-	-	1+	-	1+30	7	-	1.020
Diabéticas									
-	N	HB+1	-	-	4+2000	+15	7	+0.1	1.020
-	N	HB+-	-	-	2+250	+15	6	-	1.030
2+	N	HB+1	-	-	-	1+30	8	-	1.025
1+	N	HB+1	-	2+	3+500	1+30	6	-	1.020
1+	N	HB+-	1+	1+	-	1+30	7	-	1.030
Diabéticas + Semilla									
1+	N	HB+-	1+	-	3+500	+15	6	-	1.025
3+	N	HB+-	1+	-	3+500	2+100	6	-	1.030
2+	N	HB+-	-	-	1+100	1+30	8	+0.1	1.020
2+	N	HB+-	-	1+	-	2+100	6	-	1.025
Diabéticas + Vaina									
2+	N	HB+-	2+	-	-	2+100	6	-	1.025
2+	N	HB+-	-	-	2+250	2+100	6	-	1.020
1+	N	HB+1	1+	-	3+500	1+30	6	-	1.030
1+	N	HB+1	1+	-	3+500	1+30	6	-	1.025
Diabéticas + Vaina-semilla									
1+	1+2	HB+-	-	-	3+500	1+30	6	-	1.030
2+	-	HB+-	1+	-	4+2000	+15	7	-	1.020
1+	N	HB+1	1+	-	3+500	1+30	6	+0.1	1.025
3+	1+2	HB+-	1+	1+100	2+100	1+30	6	-	1.025

Dado que no todas las ratas del experimento desarrollaron diabetes, se identificó una única variable pendiente de ajuste: la administración de la inyección. Por ello, un veterinario especializado en la administración intraperitoneal se encargó de inducir a 10 ratas nuevas. Sin embargo, el procedimiento no fue exitoso, ya que ninguna de las ratas presentó niveles de glucosa compatibles con un estado diabético. Ante estos resultados, se realizaron pruebas en islotes pancreáticos, lo que permitió confirmar que el nuevo lote de STZ no era funcional.

En total, se utilizaron 48 ratas para el experimento: 5 se mantuvieron como grupo control y los 43 restantes fueron inducidas con distintos lotes de STZ. Solo 8 desarrollaron hiperglucemia; con ello, solo se podía inferir que el problema residía en la eficacia del lote de STZ empleado, por lo que se planeó un experimento directamente en islotes pancreáticos para evaluar la STZ empleada y dos lotes diferentes.

Se obtuvieron islotes pancreáticos de tres ratas con pesos entre 421.43 y 459.98 g, a partir de los cuales se evaluó el daño inducido por tres lotes distintos de estreptozotocina (STZ). Los lotes analizados fueron: STZ-1 (lote nuevo y utilizado en el experimento *in vivo*), STZ-2 (sin usar, pero almacenado en condiciones óptimas durante varios años) y STZ-3 (abierto y conservado adecuadamente desde hace varios años), los tres lotes fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. En total, se generaron 24 repeticiones independientes, cada una con cinco islotes pancreáticos, además de un grupo de control. Tanto los tratamientos con STZ como el control mostraron patrones diferenciados de secreción de insulina al exponerse a concentraciones de glucosa de 3 μM y 11 μM .

Los resultados de la Tabla 15 muestran que el grupo control a 11 μM de glucosa presenta la mayor secreción de insulina (2.027 ± 0.4), significativamente diferente de los grupos de STZ. En contraste, los lotes de STZ a 3 μM muestran secreciones de insulina más bajas, especialmente en STZ-2 (0.159 ± 0.1) y STZ-1 (0.387 ± 0.2), lo que sugiere un impacto negativo en la función de los islotes pancreáticos. A 11 μM , los lotes STZ-1 y STZ-2 presentan una secreción intermedia, mientras que STZ-3 (0.773 ± 0.4) presenta la secreción más baja. Las letras indicadas reflejan las diferencias estadísticas entre los grupos, con los

controles mostrando diferencias significativas frente a los lotes de STZ en ambas concentraciones de glucosa (Figura 27).

Tabla 15. Secreción de insulina de los islotes pancreáticos tratados con 3 diferentes STZ.

Muestra	Insulina (ng/mL)	Insulina (ng/mL)
	(estímulo 3 mM)	(estímulo 11 mM)
Control	0.600 ± 0.1^a	1.905 ± 0.1^a
STZ-1	0.495 ± 0.1^a	1.198 ± 0.1^b
STZ-2	0.662 ± 0.1^a	0.663 ± 0.1^c
STZ-3	0.129 ± 0.1^b	0.850 ± 0.1^c

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de la prueba t de Student. Letras diferentes en cada columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

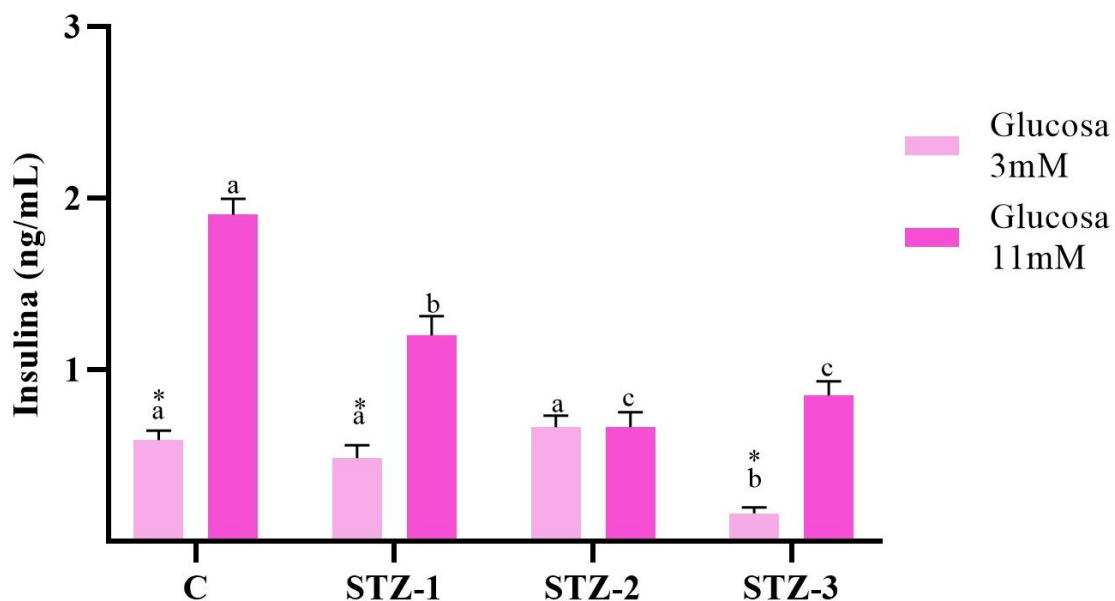


Figura 27. Evaluación de la secreción de insulina en células beta expuestas a diferentes estreptozotocinas (STZ).

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizó un ANOVA de dos vías. Las letras diferentes en las columnas con la misma concentración de glucosa indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos. El * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo a distintas concentraciones de glucosa.

Debido a que la STZ-3 fue la única que presentó diferencia significativa con el control, se hizo la comparativa directa (Figura 28). En el grupo control se obtuvo la respuesta esperada con una mayor secreción de insulina con el estímulo de glucosa (11 mM) comparado con la basal (3 mM). Sin embargo, el tratamiento con STZ-3 reduce significativamente la secreción de insulina en ambas concentraciones de glucosa, lo que sugiere que afecta negativamente la función de las células beta pancreáticas.

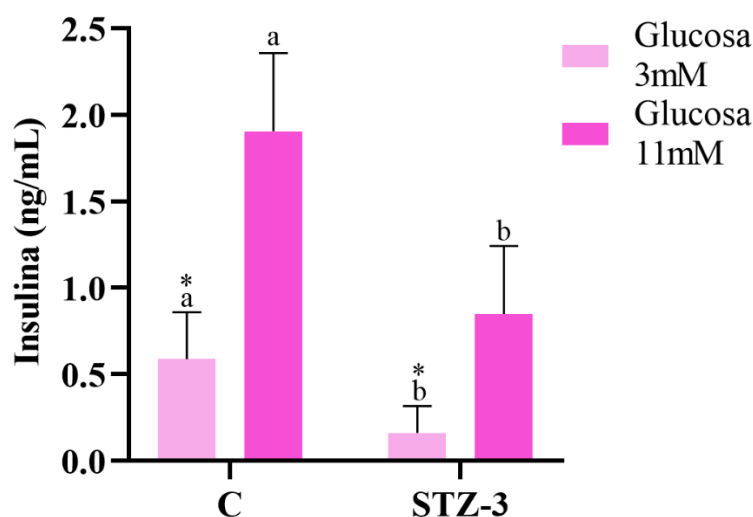


Figura 28. Comparación de la secreción de insulina entre el grupo control y STZ-3.

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar. Se realizó un ANOVA de dos vías. Las letras diferentes en las columnas con la misma concentración de glucosa indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos. El * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo a distintas concentraciones de glucosa.

Por lo tanto, se decidió utilizar STZ-3 en los experimentos *ex vivo* posteriores con células beta, ya que este compuesto permite reproducir el daño característico de la diabetes en un modelo controlado. Esto facilitó evaluar con precisión si los extractos de Timbe ejercen un efecto preventivo, protegiendo a las células beta del estrés oxidativo y de la apoptosis.

6.6 Secreción de insulina en islotes pancreáticos

Dado que un tratamiento para el control metabólico debe ser seguro y no alterar negativamente la función celular normal, primero se investigó el efecto de los extractos sobre islotes pancreáticos sanos. La Tabla 16 muestra los niveles de insulina liberados por los diferentes grupos experimentales con glucosa a 3 mM y 11 mM. En el grupo control, la secreción de insulina aumentó con la mayor concentración de glucosa, lo que reflejó la respuesta fisiológica esperada. El tratamiento con extracto de vaina mostró una mayor secreción de insulina en respuesta a 3 mM de estímulo, en comparación con el control y con el extracto de semilla, lo que sugiere un efecto insulínico basal. En el modelo tratado con estreptozotocina (STZ), la liberación de insulina fue menor en ambas condiciones, lo que confirma la alteración funcional de las células pancreáticas inducida por el tratamiento diabético. Sin embargo, la administración de los extractos (STZ+ES y STZ+EV) mejoró significativamente la secreción de insulina, especialmente con el extracto de vaina, que presentó los valores más altos tanto en condiciones basales como en condiciones estimuladas con glucosa. Estos resultados sugieren que ambos extractos tienen un efecto protector sobre las células beta pancreáticas.

Tabla 16. Efecto de los extractos de semilla y vaina de Timbe sobre la secreción de insulina en islotes pancreáticos.

Grupo	Insulina (ng/mL) (estímulo 3 mM)	Insulina (ng/mL) (estímulo 11 mM)
Control	4.114 ± 0.8 ^f	7.583 ± 1.3 ^d
Extracto de semilla (ES)	4.036 ± 1.2 ^f	9.053 ± 1.4 ^{b,c}
Extracto de vaina (EV)	8.768 ± 1.2 ^{b,c}	8.279 ± 1.5 ^{c,d}
Estreptozotocina (STZ)	2.816 ± 0.9 ^g	4.030 ± 1.0 ^f
STZ + ES	6.488 ± 1.0 ^e	8.759 ± 1.7 ^{c,d}
STZ + EV	9.659 ± 1.8 ^{a,b}	10.287 ± 2.3 ^a

Los datos se expresan como media ± error estándar. Se realizó un ANOVA de dos vías. Las letras diferentes en las columnas con la misma concentración de glucosa indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos.

En la Figura 29 se observa que, en el grupo control de islotes pancreáticos, con el aumento de la glucosa de 3 mM a 11 mM, se incrementó significativamente la liberación de insulina, lo cual corresponde a la respuesta fisiológica esperada de las células beta pancreáticas. Con la administración de los extractos del Timbe los islotes pancreáticos tuvieron una mayor secreción de insulina. El extracto de semilla aumentó significativamente la secreción de insulina únicamente bajo estímulo de alta glucosa (11 mM), superando al control y mostrando un efecto insulínico. Por otra parte, el extracto de vaina mostró la mayor respuesta secretora a 3 mM de glucosa, alcanzando niveles significativamente superiores tanto al control como al extracto de semilla, lo que sugiere que los compuestos presentes en el extracto de vaina podrían potenciar aún más la actividad de las células beta. Por ejemplo, los azúcares simples, como la D-galactosa y la sacarosa, pueden inducir la liberación de insulina al aumentar la disponibilidad de glucosa o de sus metabolitos en las células beta pancreáticas. Además, ciertos ácidos grasos, como el ácido palmítico y el ácido linoleico, pueden modular la secreción de insulina al activar receptores específicos (como FFAR1/GPR40), aunque el efecto depende de la concentración para ser estimulante (Kristinsson et al., 2015; Salehi et al., 2005). Por otra parte, los triterpenos, como la α -amirina, han demostrado en estudios previos una acción insulínica y sensibilizadora, que promueve la liberación de insulina y mejora la función de las células beta (Adebajo et al., 2013; Santos et al., 2012).

Por otro lado, dentro de cada grupo se confirmó que la secreción de insulina fue significativamente mayor en condiciones de glucosa alta (11 mM) que en condiciones de glucosa basal (3 mM). Sin embargo, tras la administración del extracto de vaina, aunque se observó una diferencia significativa entre ambas concentraciones de glucosa, el patrón de respuesta no siguió el comportamiento fisiológico esperado, ya que la secreción de insulina fue mayor a la menor concentración de glucosa. Probablemente el Timbe contiene compuestos como los aminoácidos y los ácidos grasos, los cuales pueden estimular la secreción de insulina, la glucosa es el principal regulador de este proceso. La secreción de insulina de las células β pancreáticas comienza con la entrada de glucosa a través del transportador GLUT2, seguida de su metabolismo para generar piruvato, que entra a la mitocondria y se oxida mediante el ciclo del ácido tricarboxílico para producir ATP

(adenosina-5'-trifosfato), que se transfiere al citoplasma y cierra los canales de potasio dependientes de ATP, provocando la despolarización de la membrana celular y abriendo canales de calcio permitiendo la entrada de Ca^{2+} , que con el complejo SM/SNARE (proteínas del complejo Spliceosomal/receptoras de proteínas activadoras del factor sensible a N-etilmaleimida solubles) actúan como señal de vesículas secretoras y facilitan la exocitosis de insulina hacia la sangre para regular los niveles glucémicos (Cui et al., 2024; Kolb et al., 2020).

Al mismo tiempo, los compuestos fenólicos influyen directamente en el proceso de acoplamiento estímulo-secreción, ya que pueden mejorar el metabolismo de la glucosa dentro de la célula y favorecer la producción de ATP, lo cual facilita el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP y la entrada de calcio, que es la señal clave para que la insulina se libere. Además, algunos polifenoles activan rutas de señalización como PKC (proteína quinasa C) y ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares), que actúan como amplificadores de la secreción al aumentar el calcio intracelular y potenciar la exocitosis de insulina. También pueden interactuar con receptores específicos, como FFAR1 (receptor de ácidos grasos libres), que potencian la respuesta secretora en presencia de glucosa (Papuc et al., 2021; Quesada-Vázquez et al., 2024; Shahidi & Danielski, 2024).

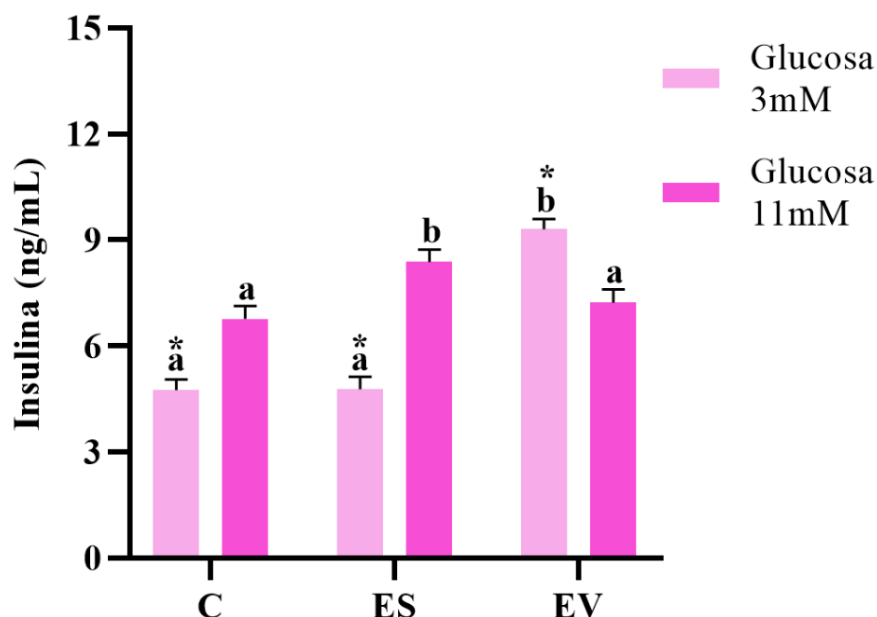


Figura 29. Secreción de insulina en islotes pancreáticos sanos.

Se realizó un ANOVA de dos vías. Las letras diferentes en las columnas con la misma concentración de glucosa indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos. El * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo a distintas concentraciones de glucosa.

La STZ, utilizada en la investigación como diabetógeno, ingresa a las células beta a través del transportador de glucosa GLUT2, compite con la glucosa por el mismo transportador, ya que es un análogo de esta. Una vez dentro, la STZ provoca un estrés oxidativo intenso y daño al ADN, activando vías de apoptosis que conducen a la disfunción y la muerte celular. El daño reduce la capacidad de las células beta para sintetizar y secretar insulina, alterando los niveles de esta hormona y el control de la glucosa sanguínea (Nahdi et al., 2017a; Ogbonnaya Eleazu et al., 2013). La Figura 30 muestra que en el grupo tratado con STZ los islotes pancreáticos no presentan diferencias significativas entre ambas concentraciones de glucosa, este comportamiento es consistente con la citotoxicidad de la STZ sobre las células beta pancreáticas y su efecto diabetogénico, evidenciado por valores bajos y sin diferencias entre ambas concentraciones, lo que indica pérdida del mecanismo dependiente de glucosa (Nahdi et al., 2017a; Ogbonnaya Eleazu et al., 2013). El estrés oxidativo es uno de los principales factores que dañan a las células β y limitan su capacidad de respuesta; al activar vías como NRF2 (factor de transcripción). Los compuestos fenólicos pueden modular la secreción de insulina; sus propiedades antioxidantes reducen el estrés oxidativo. Además, estos

compuestos fortalecen las defensas antioxidantes internas y ayudan a mantener la viabilidad y la funcionalidad de las células. Así mismo, los compuestos fenólicos pueden mejorar, modular o, en algunos casos, alterar la secreción de insulina, principalmente al proteger a las células β del daño oxidativo y al intervenir en los pasos clave que regulan la entrada de calcio y la liberación de la hormona (Papuc et al., 2021; Quesada-Vázquez et al., 2024; Shahidi & Danielski, 2024).

La administración de los extractos metanólicos mostró un efecto protector sobre los islotes pancreáticos, lo que se reflejó en un aumento significativo de la secreción de insulina. Este efecto fue más notable en el tratamiento con el extracto de vaina, que mostró la mayor respuesta secretora, y ambos extractos presentaron el mismo comportamiento en ambas concentraciones de glucosa. El extracto de vaina mostró una diferencia significativa entre las dos concentraciones de glucosa, presentando un comportamiento similar en los islotes sin STZ, con una mayor secreción a 3 mM de glucosa.

De los compuestos identificados en la vaina de Timbe algunos podrían tener una protección de las células beta pancreáticas frente a la STZ. Por ejemplo, la presencia de α -tocoferol debido a que este ha sido reportado como antioxidante (Yoshida & Niki, 2003) Además, el D-pinitol y el mioinositol ejercen efectos protectores frente al daño oxidativo de proteínas y lípidos, favoreciendo la preservación de la función vascular y la regulación de la coagulación sanguínea. Asimismo, se le reconocen propiedades antidiabéticas, antiinflamatorias y antioxidantes (Azab, 2022; Pandi et al., 2022; Poongothai & Sripathi, 2013; Rolnik et al., 2024).

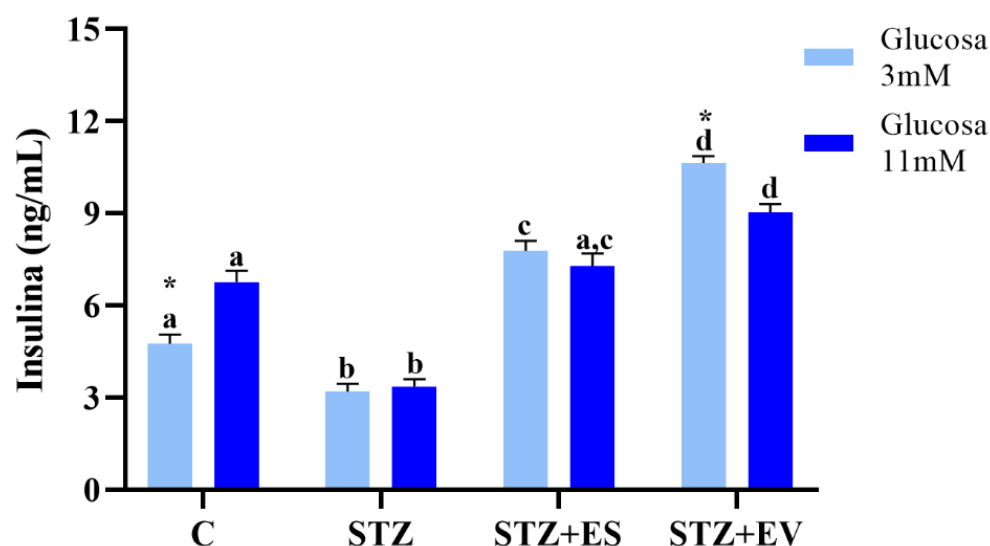


Figura 30. Secreción de insulina en islotes pancreáticos tratados con STZ.

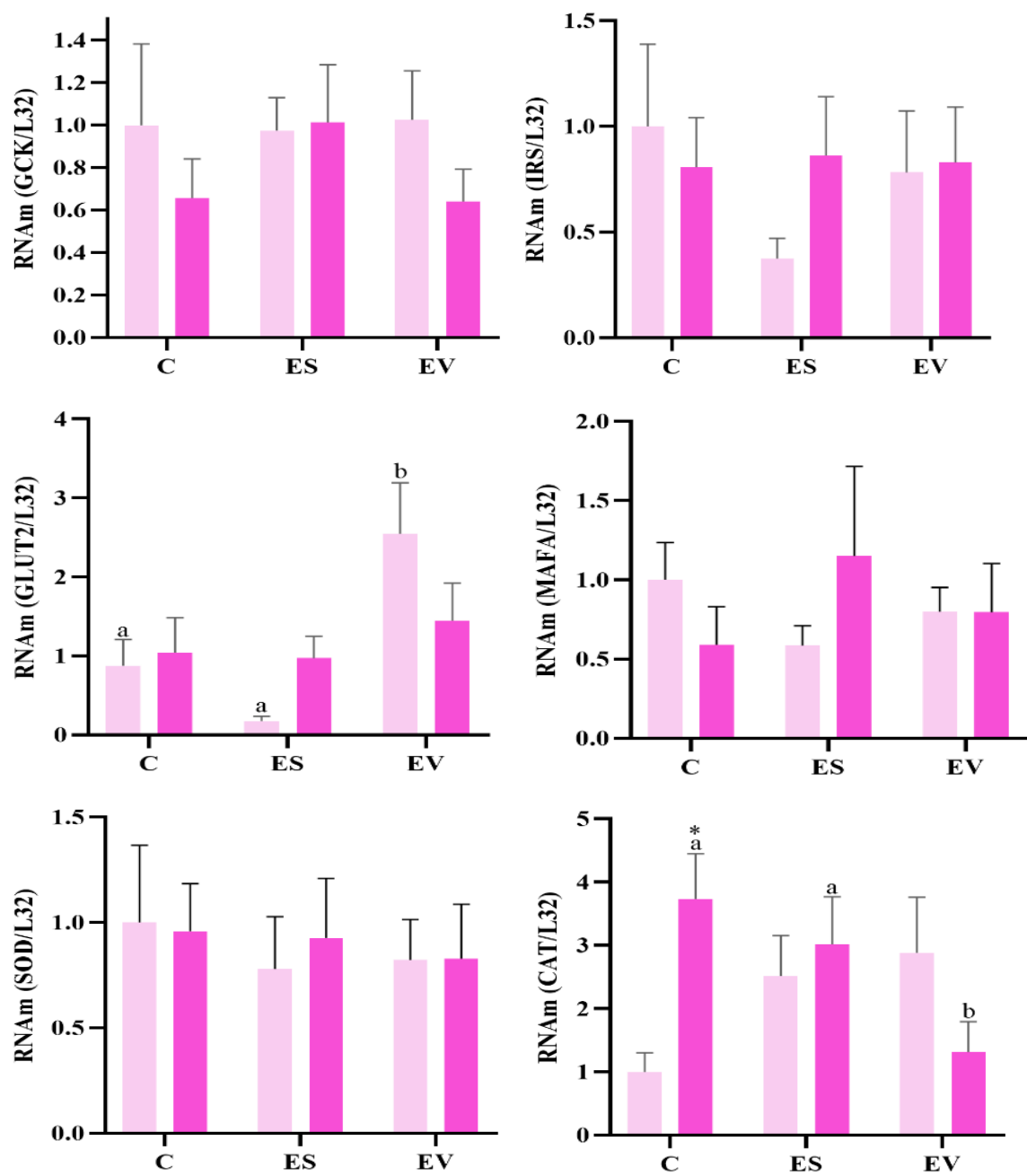
Se realizó un ANOVA de dos vías. Las letras diferentes en las columnas con la misma concentración de glucosa indican una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los grupos. El * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo a distintas concentraciones de glucosa.

Los compuestos fenólicos neutralizan los radicales libres y reducen la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), evitando el daño a membranas, proteínas y ADN que normalmente conduce a la apoptosis de las células beta. Al reducir el estrés oxidativo y mejorar la homeostasis celular, los polifenoles protegen la exocitosis de insulina. Además, sus efectos antiinflamatorios y moduladores de señalización disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias y previenen rutas intracelulares que inducen apoptosis, favoreciendo la supervivencia celular (Dinić et al., 2022; Eguchi et al., 2021; Martiniakova et al., 2025).

6.7 Genes implicados en la regulación de la secreción de insulina

6.7.1. Efecto de los extractos metanólicos de Timbe sobre la expresión génica en islotes pancreáticos sanos

En la Figura 31 se muestra la expresión de genes asociados a la vía de señalización de la secreción de insulina, expuestos a los extractos metanólicos de semilla y vaina a dos concentraciones de glucosa (3 mM y 11 mM). Se observan diferencias significativas únicamente en algunos genes; por ejemplo, para iNOS, tanto en 3 mM como en 11 mM de glucosa, los grupos tratados con los extractos de semilla y vaina presentaron una expresión significativamente mayor en comparación con el control; el ES incrementó la respuesta en un 50%, mientras que el EV 200% para 3 mM de glucosa y 200% y 150% respectivamente en 11 mM de glucosa, lo que indica que ambos extractos estimulan la vía relacionada con el óxido nítrico aun en células sanas. En GLUT2, a 3 mM de glucosa, el EV mostró una mayor expresión que el control (150% más, aproximadamente), lo que sugiere un efecto positivo del extracto sobre la captación y el reconocimiento de la glucosa en condiciones de estimulación. Por último, en CAT se observó un incremento, aunque no significativo, en el grupo tratado con ES y EV con respecto al control a una concentración de 3 mM de glucosa (150 % más en ES y 200% más en EV), mientras que a 11 mM de glucosa el extracto EV mostró un incremento del 30% aproximadamente en comparación con el control, lo que indica que los extractos modulan el sistema antioxidante de forma diferenciada.



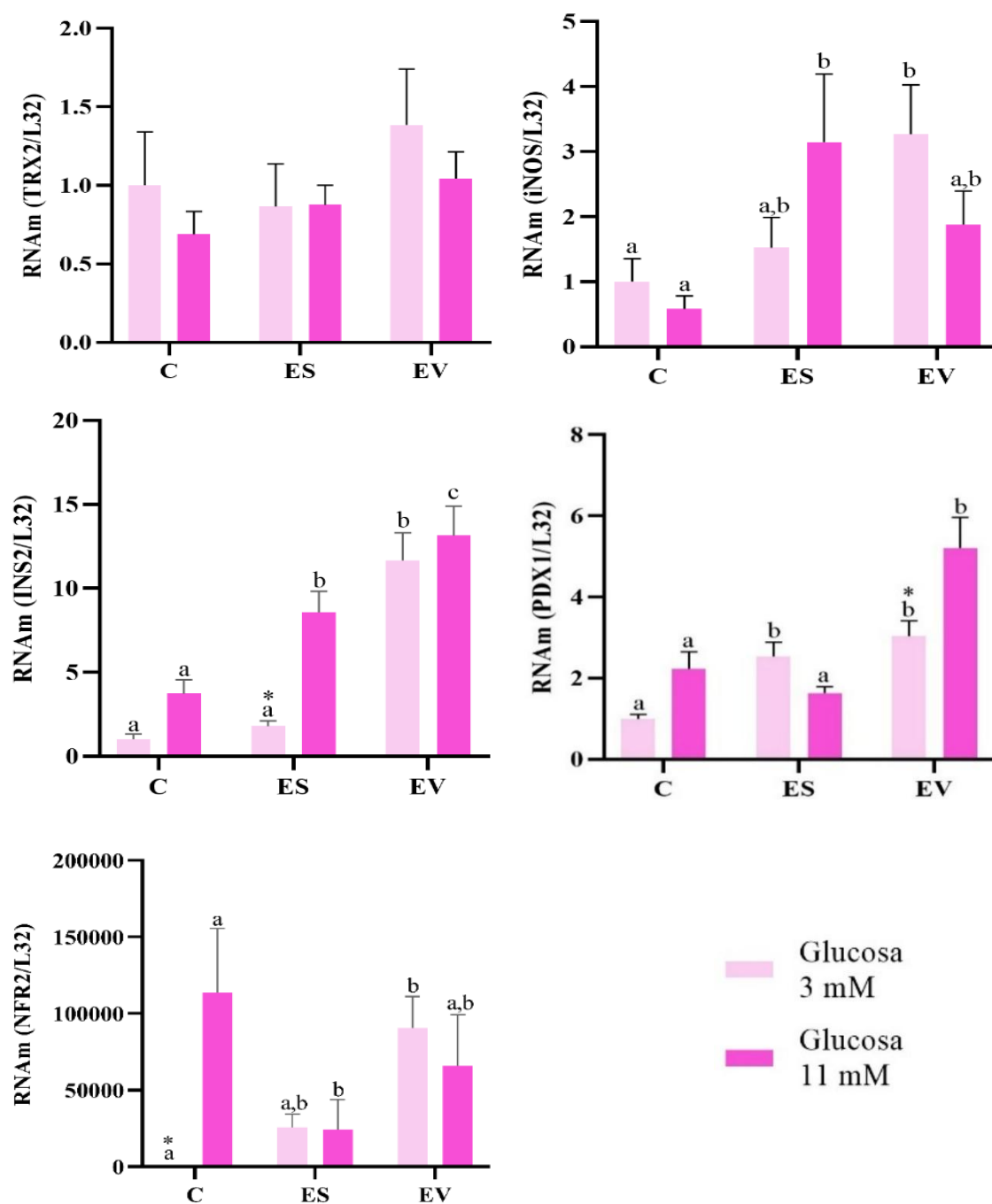


Figura 31. Efecto de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe sobre la expresión de genes asociados a la secreción de insulina en islotes pancreáticos. Los valores se expresan como media $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos dentro de la misma condición de glucosa. El * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo a distintas concentraciones de glucosa.

La expresión de INS2 (Figura 31) mostró diferencias estadísticamente significativas, lo que indica una modulación del tratamiento sobre la regulación transcripcional de este gen. En el grupo C se detectó una expresión basal baja, compatible con un estado fisiológico sin estimulación. En contraste, el grupo ES a 11 mM presentó un incremento significativo de INS2 respecto al control (11 mM), lo que sugiere que este estímulo es capaz de activar mecanismos celulares asociados a la inducción de la expresión del gen. El aumento de expresión también se presenta en el mismo grupo con la estimulación de glucosa, siendo menor a una concentración basal (3 mM). El grupo EV mostró el nivel más alto de expresión de INS2, significativamente superior tanto al control como a ES, lo que sugiere un efecto potenciador del estímulo aplicado en este grupo en las dos concentraciones de glucosa (3 y 11 mM). Los tratamientos ES y EV promueven la activación funcional del programa génico asociado a INS2, siendo EV la condición más eficaz, lo que podría tener implicaciones relevantes en la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de genes relacionados con la función endocrina y la diferenciación celular.

Por otro lado, el gen NRF2 mostró un comportamiento similar, con sobreexpresión que podría ser beneficiosa debido a su papel en la protección y la función de las células beta. Esta sobreexpresión se observó principalmente con la estimulación con glucosa a 11 mM. Sin embargo, en este gen, la expresión a esa concentración fue menor en las células tratadas con los extractos de Timbe, especialmente en el grupo ES. En contraste, a una concentración baja de glucosa (3 mM), la expresión de NRF2 fue mayor que en el grupo C, especialmente en el grupo EV.

Los genes INS2, GLUT2, GCK, IRS y MAFA están directamente relacionados con la producción y secreción de insulina en las células beta del páncreas: INS2 codifica la insulina, GLUT2 facilita la entrada de glucosa para activar su liberación, GCK inicia el metabolismo de la glucosa, IRS receptor de insulina que ayuda con el acoplamiento entre receptores y las vías de señalización intracelular, y MAFA regula la expresión del gen de insulina; la estimulación de estos genes con los extractos metanólicos de Timbe podría aumentar la actividad de las células beta por lo que podría hacerlas más eficientes (Bathina et al., 2023; Thorens, 2015; H. Wang et al., 2007; C. Zhang et al., 2005). Por otro lado, NRF2, SOD, CAT

y TRX2 participan en la defensa antioxidante de las células beta, protegiéndolas del estrés oxidativo que puede deteriorar su capacidad de secretar insulina. Estos genes podrían responder a los extractos metanólicos mediante la activación de mecanismos preventivos que mejoran la resistencia al estrés oxidativo (Chen et al., 2024; Yagishita et al., 2013). Por último, iNOS suele aumentarse en condiciones inflamatorias y producir niveles elevados de óxido nítrico, lo que puede dañar las células beta y reducir la secreción de insulina (Pan et al., 1996). La estimulación por los extractos metanólicos de Timbe en células sanas podría reforzar la capacidad de producir y secretar insulina y mejorar la protección antioxidante, preparando a la célula para resistir un estrés futuro sin alterar su funcionamiento normal.

6.7.2. Efecto de los extractos metanólicos de Timbe sobre la expresión génica en islotes pancreáticos tratados con estreptozotocina (STZ)

Las células beta pancreáticas con STZ presentan alteraciones significativas en la expresión de genes clave implicados en la función y la supervivencia de estas células. La STZ altera tanto los genes involucrados en la secreción de insulina como los responsables de la defensa antioxidante. Genes directamente relacionados con la síntesis y secreción de insulina, como INS2, GCK, GLUT2 y MAFA, presentan una reducción de su expresión debido a la conocida capacidad de STZ para inducir estrés oxidativo y daño al ADN. El IRS presenta una reducción de su expresión en presencia de la STZ, lo que podría interferir con la vía de señalización intracelular necesaria para la regulación de la secreción de insulina. Los genes asociados con la defensa antioxidante, como NRF2, SOD, CAT y TRX2, suelen mostrar cambios en su expresión como respuesta al exceso de especies reactivas de oxígeno inducido por STZ. Por otro lado, la expresión de iNOS tiende a aumentar, lo que indica que STZ también activa vías de estrés y proinflamatorias (Nahdi et al., 2017b; Tonne et al., 2013; N. Wang et al., 2018; Xiang et al., 2010).

En los islotes pancreáticos expuestos a STZ (Figura 32) se observaron diferencias significativas en varios genes. Para GCK, bajo glucosa alta (11 mM), el grupo STZ+EV presentó una expresión significativamente mayor que en el grupo STZ, lo que indica que el

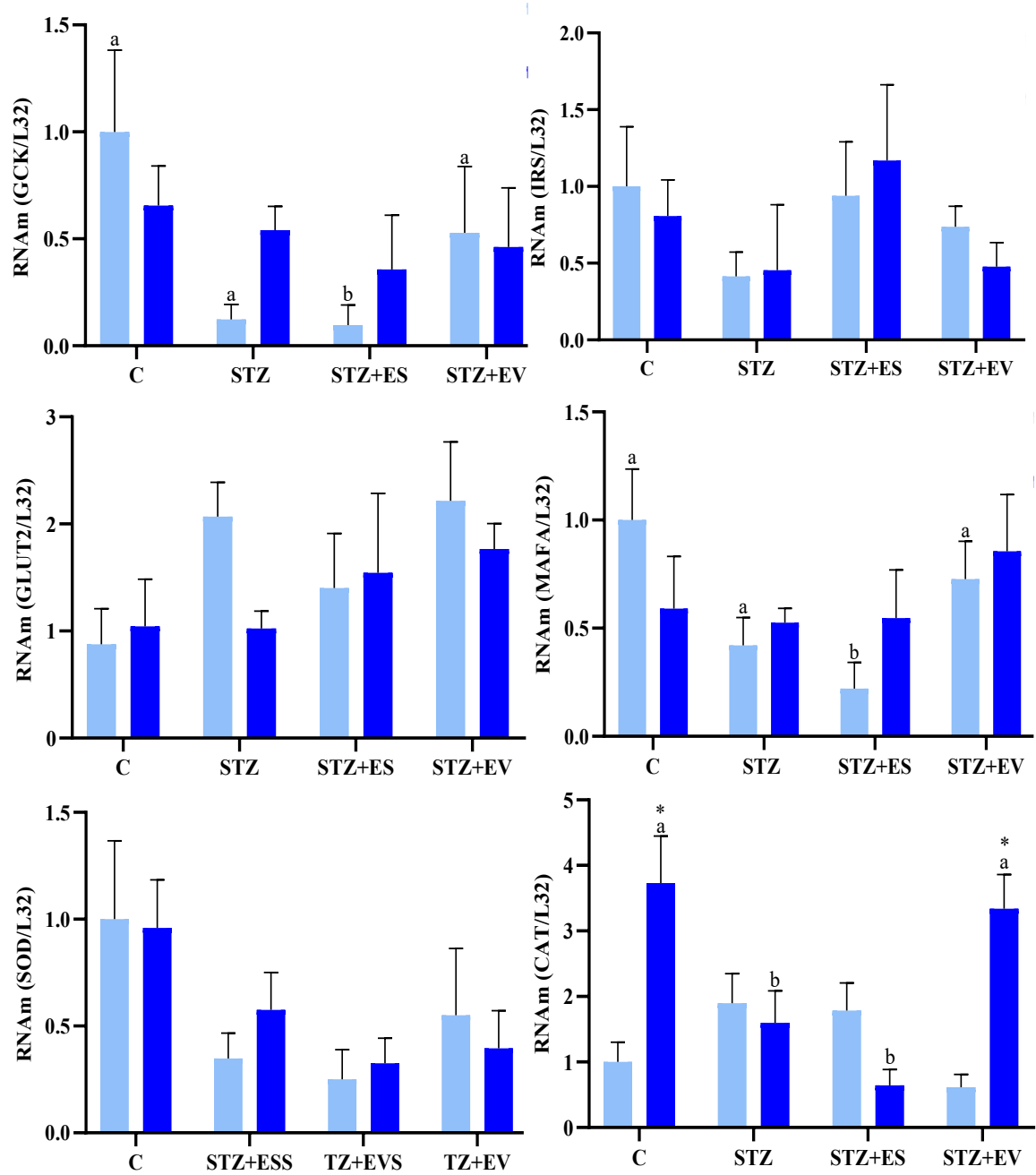
extracto vegetal favorece la fosforilación de la glucosa en células no dañadas. En MAFA, se observó una disminución significativa en STZ a 3 mM de glucosa respecto al control, mientras que los extractos metanólicos de Timbe mostraron valores más altos, destacando el EV a 11 mM. En CAT, STZ redujo significativamente la expresión frente al control, mientras que ambos tratamientos incrementaron su expresión, con mayor notoriedad en STZ+EV, lo que indica un efecto restaurador del sistema antioxidante. Para TRX2, tanto STZ como los tratamientos mostraron menor expresión que el control en 3 mM, pero a partir de 11 mM, el grupo STZ+EV mostró una expresión significativamente mayor que STZ. En iNOS, la expresión fue menor en STZ que en el control con glucosa baja, mientras que STZ+EV mostró un incremento significativo en 11 mM de glucosa respecto a STZ, lo que evidencia una modulación del sistema de óxido nítrico bajo daño. Estos resultados indican que los extractos, especialmente EV, ejercen un efecto protector y restaurador sobre genes clave del metabolismo de la glucosa y de la respuesta antioxidante en islotes dañados por STZ.

La expresión génica de INS2 muestra diferencias significativas en la regulación transcripcional tanto en el daño inducido con STZ como en los tratamientos de semilla y vaina de Timbe. En el grupo C, la expresión de INS2 se mantiene en niveles basales bajos, lo que refleja un estado fisiológico normal. La administración de STZ produjo un incremento significativo en la expresión de INS2 en comparación con el control independientemente de la estimulación de glucosa, lo cual podría interpretarse como una respuesta compensatoria inicial de las células frente al daño citotóxico inducido por este agente diabetogénico (STZ).

En el grupo STZ+ES, la expresión de INS2 fue mayor con respecto al control con glucosa de 3 Mm. Aunque no existió una diferencia significativa entre el grupo STZ y STZ+ES existe una ligera reducción con el extracto, lo que sugiere que el tratamiento ES modula parcialmente esta respuesta, posiblemente favoreciendo mecanismos de regulación o estabilización transcripcional. Por otro lado, el grupo STZ+EV a 3 mM de glucosa no presentó diferencia significativa respecto del control, mientras que a 11 mM de glucosa si existe una diferencia destacando una expresión génica en el grupo que tiene la vaina (STZ+EV), este comportamiento puede sugerir una activación más eficiente de la expresión de INS2, posiblemente asociada a procesos de regeneración celular o aumento de la actividad

transcripcional en células productoras de insulina. Aunque la STZ altera de manera significativa la expresión de INS2, los tratamientos ES y EV modulan esta respuesta de forma diferencial, siendo EV el que muestra el mayor potencial para restaurar o potenciar la expresión del gen. En el caso del NRF2, el grupo STZ presentó una marcada sobreexpresión a 11 mM de glucosa, en comparación con el control y con los grupos tratados con extractos, un comportamiento similar al observado en ES a 3 mM; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Los compuestos fenólicos han mostrado que activan vías antioxidantes (mediante NRF2) y aumentan enzimas como SOD y CAT, lo que reduce ROS y NO, y disminuye la apoptosis en las células beta expuestas a STZ. Este efecto protector crea las condiciones necesarias para que esos genes expresen normalmente, preservando la funcionalidad de la secreción de insulina (Bhakkiyalakshmi et al., 2014). Diferentes compuestos fenólicos han demostrado una marcada capacidad para proteger directamente a las células β frente al daño inducido por STZ, y esta acción se relaciona con la modulación de genes clave involucrados en el equilibrio redox y en la supervivencia celular. La activación de antioxidantes contribuye directamente a reducir la apoptosis inducida por el estrés oxidativo asociado al tratamiento con STZ. Por otro lado, se disminuye la expresión de iNOS y la producción de óxido nítrico, moléculas que suelen elevarse significativamente en condiciones de inflamación y de daño inducido. De este modo, se atenúa la carga nitrosativa y se preservan la viabilidad y la funcionalidad de las células beta. Un flavonoide ampliamente estudiado, como la naringenina, ha mostrado efectos protectores tanto en células beta aisladas como en modelos animales tratados con STZ. Su acción resalta por la activación de Nrf2 y en la restauración de sistemas antioxidantes esenciales como SOD, CAT y glutatión, lo que conduce a una disminución de los niveles intracelulares de ROS, una mejora de la viabilidad celular y una recuperación parcial de la capacidad secretora de insulina. La mayoría de los estudios sobre los compuestos fenólicos muestran que ejercen una acción protectora principalmente mediante la activación de Nrf2 y la subsecuente inducción de genes antioxidantes, como SOD, CAT y, posiblemente, TRX2, además de la supresión de iNOS (Li et al., 2024; Rajappa et al., 2019; Sireesh et al., 2017; N. Wang et al., 2018).



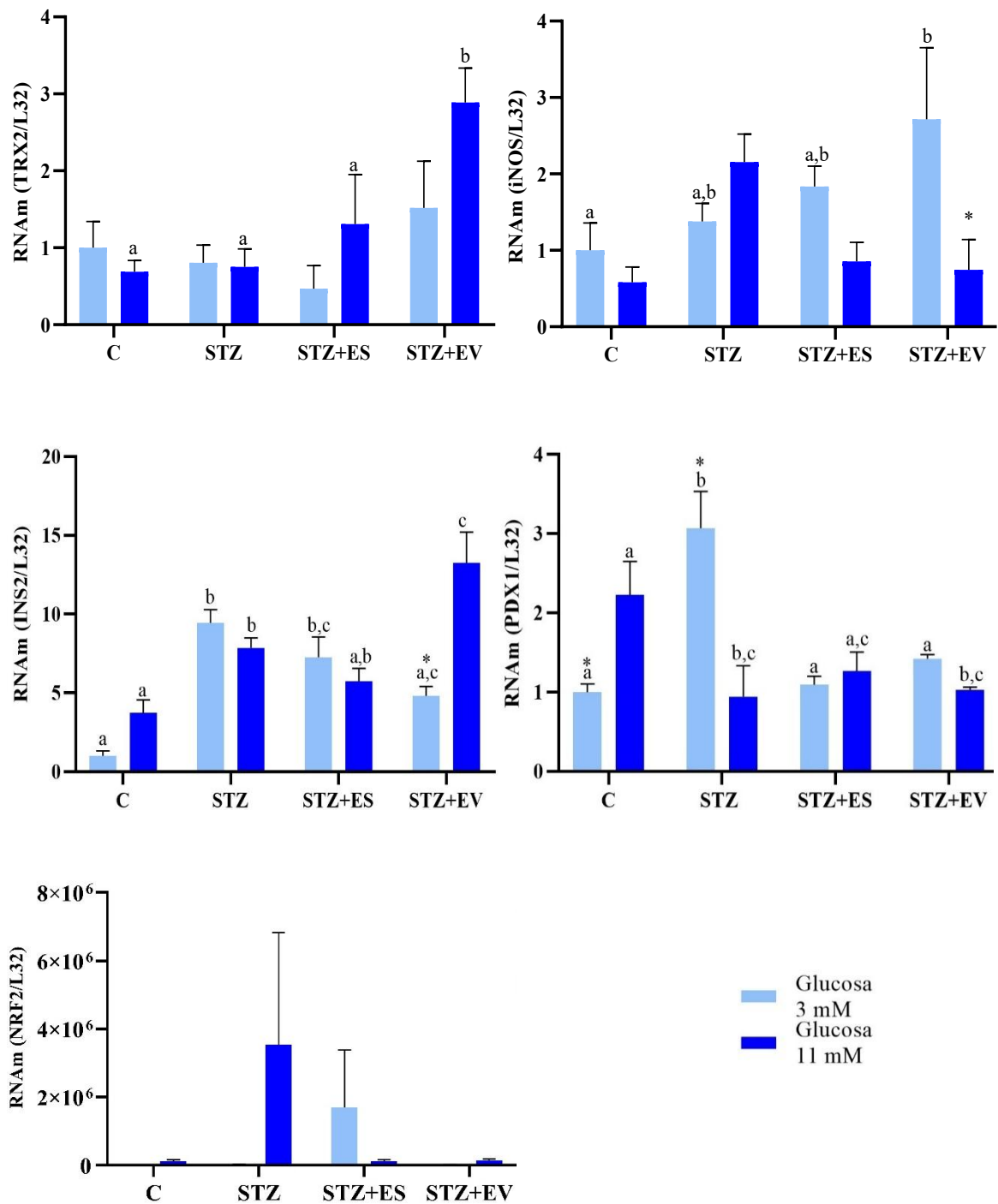


Figura 32. Efecto de los extractos metanólicos de semilla y vaina de Timbe sobre la expresión de genes asociados a la secreción de insulina en islotes pancreáticos con STZ. Los valores se expresan como media $\pm$ error estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos dentro de la misma condición de glucosa. El * indica una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) dentro del mismo grupo a distintas concentraciones de glucosa.

7. CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que la estreptozotocina provoca una disminución significativa de la secreción de insulina y altera la respuesta dependiente de la glucosa en los islotes pancreáticos, lo que confirma el daño funcional de las células β . Sin embargo, los extractos metanólicos de Timbe protegieron contra esa disfunción, lo que evidenció una recuperación de la capacidad de secreción de insulina, especialmente con el extracto de vaina. Dicho extracto no solo incrementó los niveles basales de insulina, sino que también restableció la respuesta a la estimulación por glucosa, lo que sugiere un efecto protector sobre la función de las células beta pancreáticas. Los resultados obtenidos en este estudio respaldan el potencial de los compuestos bioactivos presentes en Timbe como moduladores de la función pancreática, haciéndolo un candidato prometedor para el desarrollo de estrategias terapéuticas orientadas al manejo de la disfunción de las células β pancreáticas asociada a la diabetes. A nivel *ex vivo*, el tratamiento con Timbe mostró la capacidad de mitigar el estrés celular y prevenir la muerte celular, favoreciendo un entorno que permite mantener la funcionalidad de la secreción de insulina, incluso en islotes pancreáticos expuestos a un agente diabetogénico. Estos hallazgos concuerdan con la evidencia científica disponible, la cual sugiere un efecto protector del Timbe sobre las células pancreáticas.

Como perspectivas futuras, se sugiere evaluar los efectos del Timbe en modelos *in vivo*, con el fin de ver la eficacia biológica y su impacto fisiológico. Asimismo, se propone ampliar el análisis molecular mediante la evaluación de otros genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo y en la regulación de la función celular pancreática, lo que permitiría una comprensión más profunda de los mecanismos de acción del Timbe. Adicionalmente, el desarrollo y evaluación de un extracto acuoso representaría una alternativa relevante para facilitar la posible implementación en productos para humanos, promoviendo el consumo del Timbe como una estrategia complementaria para el cuidado de la salud.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adebajo, A. C., Ayoola, M. D., Ogediran, S. A., Aladesanmi, A. J., Schmidt, T. J., & Verspohl, E. J. (2013). Evaluation of Ethnomedical Claim III: Anti-hyperglycemic activities of *Gongronema latifolium* root and stem. *Journal of Diabetes*, 5(3), 336–343. <https://doi.org/10.1111/1753-0407.12019>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Albergaria, E. T., Oliveira, A. F. M., & Albuquerque, U. P. (2020). The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 131, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.002>
- Alonso-Herrada, J., Rico-Reséndiz, F., Campos-Guillén, J., Guevara-González, R. G., Torres-Pacheco, I., & Cruz-Hernández, A. (2016). Establishment of in vitro regeneration system for *Acaciella angustissima* (Timbe) a shrubby plant endemic of México for the production of phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 86, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.040>
- Anyiam, P. N., Phongthai, S., Sai-Ut, S., Kingwascharapong, P., Jung, Y. H., Zhang, W., & Rawdkuen, S. (2025). Nutritional Components and Digestibility Profiles of Some Potential Plant-Based Protein Sources. *Foods*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/foods14101769>
- Asbaghi, O., Sadeghian, M., Nazarian, B., Sarreshtedari, M., Mozaffari-Khosravi, H., Maleki, V., Alizadeh, M., Shokri, A., & Sadeghi, O. (2020). The effect of vitamin E supplementation on selected inflammatory biomarkers in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73741-6>
- Atkinson, M. A., Campbell-Thompson, M., Kusmartseva, I., & Kaestner, K. H. (2020). Organisation of the human pancreas in health and in diabetes. *Diabetologia*, 63(10), 1966–1973. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05203-7>
- Avula, B., Katragunta, K., Parveen, I., Tatapudi, K. K., Chittiboyina, A. G., Wang, Y. H., & Khan, I. A. (2025). Comprehensive Profiling of Free Proteinogenic and Non-Proteinogenic Amino Acids in Common Legumes Using LC-QToF: Targeted and Non-Targeted Approaches. *Foods*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/foods14040611>
- Azab, A. (2022). D-Pinitol—Active Natural Product from Carob with Notable Insulin Regulation. *Nutrients*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/nu14071453>

- Bach, L., & Faure, J. D. (2010). Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter. *Comptes Rendus - Biologies*, 333(4), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.01.014>
- Bacos, K., Perfilyev, A., Karagiannopoulos, A., Cowan, E., Ofori, J. K., Bertonnier-Brouty, L., Rönn, T., Lindqvist, A., Luan, C., Ruhrmann, S., Ngara, M., Nilsson, Å., Gheibi, S., Lyons, C. L., Lagerstedt, J. O., Barghouth, M., Esguerra, J. L. S., Volkov, P., Fex, M., ... Ling, C. (2023). Type 2 diabetes candidate genes, including PAX5, cause impaired insulin secretion in human pancreatic islets. *Journal of Clinical Investigation*, 133(4). <https://doi.org/10.1172/JCI163612>
- Bathina, S., Faniyan, T. S., Bainbridge, L., Davis, A., & Chhabra, K. H. (2023). Normal β -Cell Glut2 Expression Is not Required for Regulating Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Systemic Glucose Homeostasis in Mice. *Biomolecules*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/biom13030540>
- Belury, M. A. (2023). Linoleic acid, an omega-6 fatty acid that reduces risk for cardiometabolic diseases: premise, promise and practical implications. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 26(3), 288–292. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000919>
- Bhakkiyalakshmi, E., Shalini, D., Sekar, T. V., Rajaguru, P., Paulmurugan, R., & Ramkumar, K. M. (2014). Therapeutic potential of pterostilbene against pancreatic beta-cell apoptosis mediated through Nrf2. *British Journal of Pharmacology*, 171(7), 1747–1757. <https://doi.org/10.1111/bph.12577>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Cahyana, Y., & Adiyanti, T. (2021). Review: Flavonoids as antidiabetic agents. *Indonesian Journal of Chemistry*, 21(2), 512–526. <https://doi.org/10.22146/ijc.58439>
- Cardador-Martínez, A., Castaño-Tostado, E., & Loarca-Piña, G. (2002). Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) against aflatoxin B1. *Food Additives and Contaminants*, 19(1), 62–69. <https://doi.org/10.1080/02652030110062110>
- Chen, X., Zhou, Q., Chen, H., Bai, J., An, R., Zhang, K., Zhang, X., An, H., Zhang, J., Wang, Y., & Li, M. (2024). Glutathione Induces Keap1 S-Glutathionylation and Mitigates Oscillating Glucose-Induced β -Cell Dysfunction by Activating Nrf2. *Antioxidants*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/antiox13040400>
- Cui, D., Feng, X., Lei, S., Zhang, H., Hu, W., Yang, S., Yu, X., & Su, Z. (2024). Pancreatic β -cell failure, clinical implications, and therapeutic strategies in type 2 diabetes. *Chinese Medical Journal*, 137(7), 791–805. <https://doi.org/10.1097/CM9.00000000000003034>

- Deshpande, S. S., & Cheryan, M. (1987). Determination of Phenolic Compounds of Dry Beans Using Vanillin, Redox and Precipitation Assays. *Journal of Food Science*, 52(2), 332–334. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06606.x>
- Dinić, S., Arambašić Jovanović, J., Uskoković, A., Mihailović, M., Grdović, N., Tolić, A., Rajić, J., Đorđević, M., & Vidaković, M. (2022). Oxidative stress-mediated beta cell death and dysfunction as a target for diabetes management. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1006376>
- Doan, L. P., Nguyen, T. T., Pham, M. Q., Tran, Q. T., Pham, Q. L., Tran, D. Q., Than, V. T., & Bach, L. G. (2019). Extraction process, identification of fatty acids, tocopherols, sterols and phenolic constituents, and antioxidant evaluation of seed oils from five fabaceae species. *Processes*, 7(7), 1–11. <https://doi.org/10.3390/pr7070456>
- Dumschott, K., Dechorgnat, J., & Merchant, A. (2019). Water deficit elicits a transcriptional response of genes governing d-pinitol biosynthesis in soybean (*Glycine max*). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102411>
- Eguchi, N., Vaziri, N. D., Dafoe, D. C., & Ichii, H. (2021). The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms22041509>
- Gallardo, K., Thompson, R., & Burstin, J. (2008). Reserve accumulation in legume seeds. *Comptes Rendus - Biologies*, 331(10), 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.017>
- Gawli, K., & Bojja, K. S. (2024). Molecules and targets of antidiabetic interest. *Phytomedicine Plus*, 4(1). <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2023.100506>
- Grela, E. R., Samolińska, W., Kiczorowska, B., Klebaniuk, R., & Kiczorowski, P. (2017). Content of Minerals and Fatty Acids and Their Correlation with Phytochemical Compounds and Antioxidant Activity of Leguminous Seeds. *Biological Trace Element Research*, 180(2), 338–348. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1005-3>
- Guerrero-Becerra, L., Morimoto, S., Arrellano-Ordoñez, E., Morales-Miranda, A., Guevara-Gonzalez, R. G., Feregrino-Pérez, A. A., & Lomas-Soria, C. (2025). Polyphenolic Compounds in Fabaceous Plants with Antidiabetic Potential. *Pharmaceuticals*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ph18010069>
- Hammond, J. P., & White, P. J. (2008). Sucrose transport in the phloem: Integrating root responses to phosphorus starvation. *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 93–109. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm221>
- Heba Mohamed, A., Nema Abd El-Hameed, M., Hussein Khamis, H., Kamal Sharkawy, G., & El-latif Heba Samir, A. (2020). Antidiabetic and anti-inflammatory effects of two

- Fabaceae extracts against streptozotocin induced diabetic impairment in male rats. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 2020(03), 2581–9615. <https://doi.org/10.30574/wjarr>
- Hirai, M. Y., Mizutani, M., & Nakamura, Y. (2023). Revisiting Plant Metabolite Functions. *Plant and Cell Physiology*, 64(12), 1433–1435. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcad155>
- Hu, K., Huang, H., Li, H., Wei, Y., & Yao, C. (2023). Legume-Derived Bioactive Peptides in Type 2 Diabetes: Opportunities and Challenges. *Nutrients*, 15(5), 1096. <https://doi.org/10.3390/nu15051096>
- Kathiresan, K. (2020). Bioprospecting potential of mangrove resources. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources* (pp. 225–241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819532-1.00008-1>
- Keller, F., & Ludlow, M. M. (1993). Carbohydrate Metabolism in Drought-Stressed Leaves of Pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Journal of Experimental Botany*, 44(265), 1351–1359. <http://jxb.oxfordjournals.org/>
- Khrisanapant, P., Kebede, B., Leong, S. Y., & Oey, I. (2019). A comprehensive characterisation of volatile and fatty acid profiles of legume seeds. *Foods*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120651>
- Kolb, H., Kempf, K., Röhling, M., & Martin, S. (2020). Insulin: Too much of a good thing is bad. *BMC Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01688-6>
- Kristinsson, H., Bergsten, P., & Sargsyan, E. (2015). Free fatty acid receptor 1 (FFAR1/GPR40) signaling affects insulin secretion by enhancing mitochondrial respiration during palmitate exposure. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(12), 3248–3257. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.022>
- Lakhssassi, N., El Baze, A., Knizia, D., Salhi, Y., Embaby, M. G., Anil, E., Mallory, C., Lakhssassi, A., Meksem, J., Shi, H., Vuong, T. D., Meksem, K., Kassem, M. A., AbuGhazaleh, A., Nguyen, H. T., Bellaloui, N., Boualem, A., & Meksem, K. (2024). A sucrose-binding protein and β -conglycinins regulate soybean seed protein content and control multiple seed traits. *Plant Physiology*, 196(2), 1298–1321. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiae380>
- Li, H., Zhang, H., Wang, T., Zhang, L., Wang, H., Lu, H., Yang, R., & Ding, Y. (2024). Grape Seed Proanthocyanidins Protect Pancreatic β Cells Against Ferroptosis via the Nrf2 Pathway in Type 2 Diabetes. *Biological Trace Element Research*, 202(12), 5531–5544. <https://doi.org/10.1007/s12011-024-04093-9>
- Liu, H., Iyer, L. M., Norris, P., Liu, R., Yu, K., Grant, M., Aravind, L., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2025). Piperidine-6-carboxylic acid regulates vitamin B6 homeostasis

- and modulates systemic immunity in plants. *Nature Plants*, 11(2), 263–278. <https://doi.org/10.1038/s41477-025-01906-0>
- López-Gómez, C., Santiago-Fernández, C., García-Serrano, S., García-Escobar, E., Gutiérrez-Repiso, C., Rodríguez-Díaz, C., Ho-Plágaro, A., Martín-Reyes, F., Garrido-Sánchez, L., Valdés, S., Rodríguez-Cañete, A., Rodríguez-Pacheco, F., & García-Fuentes, E. (2020). Oleic acid protects against insulin resistance by regulating the genes related to the pi3k signaling pathway. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/jcm9082615>
- Martiniakova, M., Sarocka, A., Penzes, N., Biro, R., Kovacova, V., Mondockova, V., Sevcikova, A., Ciernikova, S., & Omelka, R. (2025). Protective Role of Dietary Polyphenols in the Management and Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Nutrients*, 17(2). <https://doi.org/10.3390/nu17020275>
- Melo, C. M., Morais, T. C., Tomé, A. R., Brito, G. A. C., Chaves, M. H., Rao, V. S., & Santos, F. A. (2011). Anti-inflammatory effect of α,β -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation Research*, 60(7), 673–681. <https://doi.org/10.1007/s00011-011-0321-x>
- Musara, C., & Bosede Aladejana, E. (2020). *Acaciella angustissima* (Mill.) Brit. & Rose: Botanical Features, Distribution, Medicinal and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, 10(6), 325–330. <https://doi.org/10.29169/1927-5951.2020.10.06.2>
- Mustafa, A. M., Abouelenein, D., Acquaticci, L., Alessandroni, L., Angeloni, S., Borsetta, G., Caprioli, G., Nzekoue, F. K., Sagratini, G., & Vittori, S. (2022). Polyphenols, Saponins and Phytosterols in Lentils and Their Health Benefits: An Overview. *Pharmaceuticals*, 15(10). <https://doi.org/10.3390/ph15101225>
- Nahdi, A. M. T. A., John, A., & Raza, H. (2017a). Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic β -Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7054272>
- Nahdi, A. M. T. A., John, A., & Raza, H. (2017b). Elucidation of Molecular Mechanisms of Streptozotocin-Induced Oxidative Stress, Apoptosis, and Mitochondrial Dysfunction in Rin-5F Pancreatic β -Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7054272>
- Nawaz, T., Nawaz, S., Khalid, W., & Mohamedahmed, K. A. (2023). Dietary phytochemicals beneficial to obesity and cancer management: a review. *International Journal of Food Properties*, 26(1), 2006–2024. <https://doi.org/10.1080/10942912.2023.2240544>
- NIH. (2018, October). *Trasplante de islotes pancreáticos*. National Institutes of Health .

- Odenyo, A. A., Osuji, P. O., Reed, J. D., Smith, A. H., Mackie, R. I., Mcsweeney, C. S., & Hanson, J. (2003). *Acacia angustissima*: Its anti-nutrients constituents, toxicity and possible mechanisms to alleviate the toxicity-a short review. *Agroforestry Systems*, 5(3), 141–147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1026360912944>
- Ogbonnaya Eleazu, C., Chinedum Eleazu, K., Chukwuma, S., & Essien, U. N. (2013). *Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans*. <http://www.jdmdonline.com/content/12/1/60>
- OMS. (2023, April 5). *Diabetes*. Organización Mundial de La Salud.
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 935–942. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2019>
- Pan, J., Burgher, K. L., Szczepanik, A. M., & Ringheim, G. E. (1996). Tyrosine phosphorylation of inducible nitric oxide synthase: implications for potential post-translational regulation. *Biochem. J*, 314, 889–894.
- Pandi, A., Kalappan, V. M., & Chandrashekar, N. (2022). Effects of d-pinitol on diabetes mellitus: an updated review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00820-1>
- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., Tudoreanu, L., & Ștefan, G. (2021). Plant polyphenols mechanisms of action on insulin resistance and against the loss of pancreatic beta cells. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(2), 325–352. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1815644>
- Perdomo, L., Beneit, N., Otero, Y. F., Escribano, Ó., Díaz-Castroverde, S., Gómez-Hernández, A., & Benito, M. (2015). Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process. *Cardiovascular Diabetology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12933-015-0237-9>
- Poongothai, G., & Sripathi, S. K. (2013). A Review on Insulinomimetic Pinitol from Plants. *Int J Pharm Bio Sci*, 4(2), 992–1009. www.ijpbs.net
- Prommaban, A., Utama-Ang, N., Chaikitwattana, A., Uthaipibull, C., Porter, J. B., & Srichairatanakool, S. (2020). Phytosterol, lipid and phenolic composition, and biological activities of guava seed oil. *Molecules*, 25(11). <https://doi.org/10.3390/molecules25112474>
- Qin, W., Deng, J., Guo, J., Yang, W., & Liu, J. (2025). Metabolic reallocation in soybeans under shade stress alters phenylpropanoid profiles with implications for stress adaptation and seed composition. *BMC Plant Biology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06893-0>

- Quesada-Vázquez, S., Eseberri, I., Les, F., Pérez-Matute, P., Herranz-López, M., Atgié, C., Lopez-Yus, M., Aranaz, P., Oteo, J. A., Escoté, X., Lorente-Cebrian, S., Roche, E., Courtois, A., López, V., Portillo, M. P., Milagro, F. I., & Carpené, C. (2024). Polyphenols and metabolism: from present knowledge to future challenges. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 80(3), 603–625. <https://doi.org/10.1007/s13105-024-01046-7>
- Raghav, S. S., Kumar, B., Sethiya, N. K., & Kaul, A. (2022). A Mechanistic Insight on Phytoconstituents Delivering Hypoglycemic Activity: A Comprehensive Overview. *Future Pharmacology*, 2(4), 511–546. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2040032>
- Rahman, M. S., Hossain, K. S., Das, S., Kundu, S., Adegoke, E. O., Rahman, M. A., Hannan, M. A., Uddin, M. J., & Pang, M. G. (2021). Role of insulin in health and disease: An update. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126403>
- Rajappa, R., Sireesh, D., Salai, M. B., Ramkumar, K. M., Sarvajayakesavulu, S., & Madhunapantula, S. R. V. (2019). Treatment with naringenin elevates the activity of transcription factor Nrf2 to protect pancreatic β -cells from streptozotocin-induced diabetes in vitro and in vivo. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01562>
- Rarison, R. H. G., Truong, V. L., Yoon, B. H., Park, J. W., & Jeong, W. S. (2023). Antioxidant and Anti-Inflammatory Mechanisms of Lipophilic Fractions from *Polyscias fruticosa* Leaves Based on Network Pharmacology, In Silico, and In Vitro Approaches. *Foods*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/foods12193643>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rico Arce, M. de L., & Bachman, S. (2006). A taxonomic revision of *Acaciella* (Leguminosae, Mimosoideae). *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 63(2). <https://doi.org/10.3989/ajbm.2006.v63.i2.7>
- Rodríguez-Méndez, A. J., Carmen-Sandoval, W., Lomas-Soria, C., Guevara-González, R. G., Reynoso-Camacho, R., Villagran-Herrera, M. E., Salazar-Olivo, L., Torres-Pacheco, I., & Feregrino-Pérez, A. A. (2018). Timbe (*Acaciella angustissima*) pods extracts reduce the levels of glucose, insulin and improved physiological parameters, hypolipidemic effect, oxidative stress and renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112812>

- Rolnik, A., Olas, B., Szablińska-Piernik, J., Lahuta, L. B., Gromadziński, L., & Majewski, M. S. (2024). Antioxidant and anticoagulant properties of myo-inositol determined in an ex vivo studies and gas chromatography analysis. *Scientific Reports*, *14*(1), 25633. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76527-2>
- Ropero, A. B., Soria, B., & Nadal, A. (2002). *A Nonclassical Estrogen Membrane Receptor Triggers Rapid Differential Actions in the Endocrine Pancreas*. <https://academic.oup.com/mend/article/16/3/497/2741557>
- Rubio-Ruiz, M. E., Vargas-González, A., Monter-Garrido, M., Díaz-Díaz, E., & Guarner-Lans, V. (2010). Aortic vasoreactivity during a postnatal critical window of the pancreas in rats. *Heart and Vessels*, *25*(3), 248–253. <https://doi.org/10.1007/s00380-009-1166-x>
- Ryan¹, M., Mcinerney², D., Owens³, D., Collins⁴, P., Johnson⁴, A., & Tomkin¹, G. H. (2000). Original papers QJM Diabetes and the Mediterranean diet: a beneficial effect of oleic acid on insulin sensitivity, adipocyte glucose transport and endothelium-dependent vasoreactivity. *Q J Med*, *93*, 85–91.
- Salehi, A., Flodgren, E., Nilsson, N. E., Jimenez-Feltstrom, J., Miyazaki, J., Owman, C., & Olde, B. (2005). Free fatty acid receptor 1 (FFA1R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell and Tissue Research*, *322*(2), 207–215. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0017-z>
- Santos, F. A., Frota, J. T., Arruda, B. R., De Melo, T. S., Da Silva, A. A. D. C. A., Brito, G. A. D. C., Chaves, M. H., & Rao, V. S. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α,β -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in Health and Disease*, *11*. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-98>
- Shahidi, F., & Danielski, R. (2024). Review on the Role of Polyphenols in Preventing and Treating Type 2 Diabetes: Evidence from In Vitro and In Vivo Studies. *Nutrients*, *16*(18). <https://doi.org/10.3390/nu16183159>
- Shen, X., Miao, S., Zhang, Y., Guo, X., Li, W., Mao, X., & Zhang, Q. (2025). Stearic acid metabolism in human health and disease. *Clinical Nutrition*, *44*, 222–238. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2024.12.012>
- Sireesh, D., Ganesh, M. R., Dhamodharan, U., Sakthivadivel, M., Sivasubramanian, S., Gunasekaran, P., & Ramkumar, K. M. (2017). Role of pterostilbene in attenuating immune mediated devastation of pancreatic beta cells via Nrf2 signaling cascade. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *44*, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.015>
- Sosa-Larios, T. C., Ortega-Márquez, A. L., Rodríguez-Aguilera, J. R., Vázquez-Martínez, E. R., Domínguez-López, A., & Morimoto, S. (2023). A low-protein maternal diet during gestation affects the expression of key pancreatic β -cell genes and the methylation status

- of the regulatory region of the MafA gene in the offspring of Wistar rats. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1138564>
- Souza-Saldivar, V., Eguiarte-Frums, L. E., Equihua-Zamaro, C., & Espinosa-Asuar, L. (2019). *Perdida de la biodiversidad, una problematica en México y el mundo*. En: *Biología*. Macmillan Education .
- Taghi-Gharibzadeh, S. M., Mousavi, S. M., Jafari, M. S., & Faraji, K. (2012). PROXIMATE COMPOSITION, MINERAL CONTENT, AND FATTY ACIDS PROFILE OF TWO VARIETIES OF LENTIL SEEDS CULTIVATED IN IRAN. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(6), 851–852.
- Taylor, S. I., Yazdi, Z. S., & Beitelshees, A. L. (2021). Pharmacological treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 131(2). <https://doi.org/10.1172/JCI142243>
- Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58(2), 221–232. <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3451-1>
- Tonne, J. M., Sakuma, T., Deeds, M. C., Munoz-Gomez, M., Barry, M. A., Kudva, Y. C., & Ikeda, Y. (2013). Global gene expression profiling of pancreatic islets in mice during streptozotocin-induced β -cell damage and pancreatic Glp-1 gene therapy. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 6(5), 1236–1245. <https://doi.org/10.1242/dmm.012591>
- Ustione, A., Piston, D. W., & Harris, P. E. (2013). Minireview: Dopaminergic regulation of insulin secretion from the pancreatic islet. *Molecular Endocrinology*, 27(8), 1198–1207. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1083>
- van Rooijen, M. A., Plat, J., Blom, W. A. M., Zock, P. L., & Mensink, R. P. (2021). Dietary stearic acid and palmitic acid do not differently affect ABCA1-mediated cholesterol efflux capacity in healthy men and postmenopausal women: A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, 40(3), 804–811. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.08.016>
- Vargas-Hernández, M., Munguía-Fragozo, P. V., Cruz-Hernández, A., Guerrero, B. Z., Gonzalez-Chavira, M. M., Feregrino-Pérez, A. A., Mendoza-Díaz, S. O., Loarca-Piña, G., Torres-Pacheco, I., Hernández-Salazar, M., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2014). Bioactivity and gene expression studies of an arbustive Mexican specie *Acaciella angustissima* (Timbe). *Industrial Crops and Products*, 52, 649–655. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.018>
- Viet, T. D., Xuan, T. D., & Anh, L. H. (2021). α -Amyrin and β -Amyrin Isolated from *Celastrus hindsii* Leaves and Their Antioxidant, Anti-Xanthine Oxidase, and Anti-Tyrosinase Potentials. *Molecules*, 26(23). <https://doi.org/10.3390/molecules26237248>

- Wang, H., Brun, T., Kataoka, K., Sharma, A. J., & Wollheim, C. B. (2007). MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia*, 50(2), 348–358. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0490-2>
- Wang, N., Zhang, J., Qin, M., Yi, W., Yu, S., Chen, Y., Guan, J., & Zhang, R. (2018). Amelioration of streptozotocin-induced pancreatic β cell damage by morin: Involvement of the AMPK-FOXO3-catalase signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 41(3), 1409–1418. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3357>
- Weinberg Sibony, R., Segev, O., Dor, S., & Raz, I. (2023). Drug Therapies for Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/ijms242417147>
- Wright, J. J., Eskaros, A., Windon, A., Bottino, R., Jenkins, R., Bradley, A. M., Aramandla, R., Philips, S., Kang, H., Saunders, D. C., Brissova, M., & Powers, A. C. (2024). Exocrine Pancreas in Type 1 and Type 2 Diabetes: Different Patterns of Fibrosis, Metaplasia, Angiopathy, and Adiposity. *Diabetes*, 73(7), 1140–1152. <https://doi.org/10.2337/db23-0009>
- Xia, M., Li, M., de Souza, T. S. P., Barrow, C., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2023). LC-ESI-QTOF-MS2 Characterization of Phenolic Compounds in Different Lentil (*Lens culinaris* M.) Samples and Their Antioxidant Capacity. *Frontiers in Bioscience - Landmark*, 28(3). <https://doi.org/10.31083/j.fbl2803044>
- Xiang, F. L., Lu, X., Strutt, B., Hill, D. J., & Feng, Q. (2010). NOX2 deficiency protects against streptozotocin-induced β -cell destruction and development of diabetes in mice. *Diabetes*, 59(10), 2603–2611. <https://doi.org/10.2337/db09-1562>
- Xu, R., Molenaar, A. J., Chen, Z., & Yuan, Y. (2025). Mode and Mechanism of Action of Omega-3 and Omega-6 Unsaturated Fatty Acids in Chronic Diseases. *Nutrients*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/nu17091540>
- Yagishita, Y., Fukutomi, T., Sugawara, A., Kawamura, H., Takahashi, T., Pi, J., Uruno, A., & Yamamoto, M. (2013). *Nrf2 Protects Pancreatic β β β β -Cells from Oxidative and Nitrosative Stress in Diabetic Model Mice Running title: Keap1-Nrf2 System Protects Pancreatic β -Cells.*
- Yedjou, C. G., Grigsby, J., Mbemi, A., Nelson, D., Mildort, B., Latinwo, L., & Tchounwou, P. B. (2023). The Management of Diabetes Mellitus Using Medicinal Plants and Vitamins. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24109085>
- Yoshida, Y., & Niki, E. (2003). Antioxidant Effects of Phytosterol and Its Components. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49, 277–280.

- Zhang, C., Moriguchi, T., Kajihara, M., Esaki, R., Harada, A., Shimohata, H., Oishi, H., Hamada, M., Morito, N., Hasegawa, K., Kudo, T., Engel, J. D., Yamamoto, M., & Takahashi, S. (2005). MafA Is a Key Regulator of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 4969–4976. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.12.4969-4976.2005>
- Zhang, G., Ahmad, M. Z., Chen, B., Manan, S., Zhang, Y., Jin, H., Wang, X., & Zhao, J. (2020). Lipidomic and transcriptomic profiling of developing nodules reveals the essential roles of active glycolysis and fatty acid and membrane lipid biosynthesis in soybean nodulation. *Plant Journal*, 103(4), 1351–1371. <https://doi.org/10.1111/tpj.14805>
- Zhong, L., Fang, Z., Wahlqvist, M. L., Wu, G., Hodgson, J. M., & Johnson, S. K. (2018). Seed coats of pulses as a food ingredient: Characterization, processing, and applications. *Trends in Food Science and Technology*, 80, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.021>

9. ANEXOS