

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL NOPAL (*Opuntia spp.*) Y SU EFECTO SOBRE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MA. DE JESÚS ARIADNA LÓPEZ GALVÁN

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004.

BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

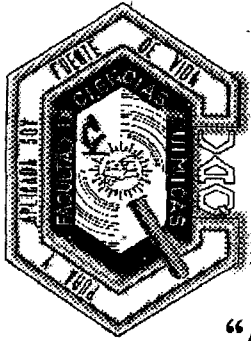
No. Adq. CH69049

No. Título _____

Clas Ts

616.462

L864a



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ACTIVIDAD HIPOGLUCEMIANTE DEL NOPAL (*Opuntia spp.*) Y SU EFECTO SOBRE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MA. DE JESÚS ARIADNA LÓPEZ GALVÁN

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SINODALES

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO.

DIRECTOR

Dra. EVA GONZÁLEZ JASSO.

SINODAL

Dra. SANDRA O MENDOZA DÍAZ.

SINODAL

Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODAL

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
I Generalidades de la Diabetes Mellitus	3
I.1 Clasificación de la diabetes	5
I.1.1 Diabetes tipo I	5
I.1.2 Diabetes Gestacional	5
I.1.3 Diabetes tipo II	6
I.2 Complicaciones de la diabetes	6
II Insulina	6
II.1 Síntesis biológica de la insulina	7
II.2 Regulación de la secreción de insulina	8
II.3 Distribución y desintegración de insulina	10
II.4 Acciones celulares de la insulina	10
II.5 Regulación del transporte de glucosa	10
II.6 Transporte de glucosa en tejidos dependientes de insulina	12
II.6.1 Receptor de insulina (IR)	12
II.6.2 Sustrato del receptor de insulina (IRS-1)	13
II.6.3 Cinasa de Fosfoinosítidos (PI3K)	13
II.6.4 Proteína cinasa B (PKB)	14
II.7 Resistencia a la insulina	14
III Modelos de animales para el estudio de la diabetes	15
IV Tratamiento de la Diabetes	16

IV.1	Biguanidas	16
IV.1.1	Propiedades de la metformina	16
IV.1.2	Farmacocinética de la metformina	16
IV.1.3	Mellitrón	17
V	El nopal como terapia herbolaria	18
V.1	Características del nopal	18
V.2	Composición química	18
V.3	Capacidad hipoglicemiante del nopal	19
	OBJETIVOS	22
	GENERAL	22
	ESPECÍFICOS	22
	METODOLOGÍA	23
I	MATERIALES	23
I.1	Biológico	23
I.2	Químico	23
II	MÉTODOS	23
II.1	Clasificación de grupos	23
II.2	Tratamiento	24
II.3	Determinaciones	24
II.3.1	Curva de tolerancia a la glucosa	24
II.3.2	Determinación de la expresión de IR, IRS-1 y Actividad de Akt	24
II.4	Análisis Estadístico	26
	RESULTADOS	27
I	Tratamiento con nopal	27
I.1	Efecto sobre la concentración de glucosa	27
I.2	Efecto sobre el peso corporal	29
I.3	Efecto sobre la curva de tolerancia a la glucosa	29
II	Tratamiento Nopal – Mellitrón	31
II.1	Determinación de glucosa	31
II.2	Efecto del Nopal – Mellitrón sobre el peso corporal	31

II.3	Efecto del Nopal – Mellitrón sobre los triglicéridos	33
III	Efecto del Nopal – Mellitrón sobre algunas proteínas de la cascada de señalización de la insulina	35
III.1	Proteína IR	35
III.2	Proteína IRS-1	36
III.3	Proteína p-Akt	36
	DISCUSIÓN	39
	CONCLUSIONES	44
	BIBLIOGRAFÍA	46
	ANEXOS	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características de los Transportadores de Glucosa.	11
2	Composición química por 100 gramos de nopal.	20
3	Porcentaje de cambio de glucosa sanguínea de ratas Zucker tratadas con licuado de nopal (0.71 g/Kg).	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales causas de mortalidad en México, 1997	3
2	Tasa de mortalidad de diabetes en México por cada 100,000 habitantes	4
3	Síntesis de la insulina	7
4	Liberación de insulina por la célula β	9
5	Regulación de la insulina en la translocación de GLUT4	14
6	Determinación de glucosa en sangre de ratas Zucker tratadas diariamente con licuado de nopal durante 36 días	28
7	Incremento de peso corporal de ratas Zucker tratadas con licuado de nopal durante 29 días	29
8	Curva de tolerancia a la glucosa en ratas Zucker a los 34 días del tratamiento con licuado de nopal	30
9	Determinación de glucosa en sangre de ratas Zucker tratadas con licuado de Nopal – Mellitrón	32
10	Incremento de peso corporal de ratas Zucker tratadas con licuado de nopal (1.42 g/Kg) – Mellitrón (17 mg/Kg) como agua de uso, durante 29 días	33
11	Determinación de triglicéridos en ratas Zucker tratadas con Mellitrón (56.6 mg/Kg)	34
12	Expresión de la proteína IR en músculo esquelético de ratas Zucker	35
13	Expresión de la proteína IRS-1 en músculo esquelético de ratas Zucker	36
14	Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, estimuladas con insulina en músculo esquelético de ratas Zucker a diferentes tiempos	37
15	Actividad de p-Akt 1 en músculo esquelético de ratas Zucker	38

RESUMEN

Actualmente más de 400 plantas y sus extractos, han sido ampliamente utilizadas para el tratamiento de la Diabetes. El empleo de la medicina tradicional tiene ciertas ventajas, ya que permite disminuir el costo y algunos de los efectos secundarios producidos por los fármacos químicos.

El empleo de nopal (*Opuntia spp.*) en el tratamiento de esta enfermedad es conocido por nuestros antepasados. Alrededor del 95% de los pacientes diabéticos en México presentan la diabetes no dependiente de insulina, en la cual, existen alteraciones en la cascada de transducción de señales de esta hormona y provoca una disminución en el transporte de glucosa en tejidos dependientes de insulina.

En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del nopal sobre la cascada de transducción de señales de la insulina, así como su efecto como coadyuvante en un modelo de diabetes.

En la primera fase se observó que la concentración de nopal (equivalente al consumo de 100g/día por un adulto), disminuyó significativamente la concentración sanguínea de glucosa en estado de ayuno en ratas Zucker genéticamente diabéticas. A partir de la curva de tolerancia a la glucosa el pico hiperglicémico se observó a los 15 minutos de administrado este carbohidrato, obteniéndose valores de 310 mg/dL y 457 mg/dL para los animales tratados con licuado de nopal (1.42 g/Kg) y controles (agua), respectivamente. El agente hipoglicemiante Mellitrón (56 mg/Kg) no tuvo ningún efecto en los niveles de glucosa sanguínea, pero sí se observó una acción antagónica al efecto del nopal cuando fueron administrados de manera conjunta. Con respecto a los niveles de triglicéridos, los animales tratados con licuado de nopal mostraron una disminución del 77% comparado con el grupo control. En cuanto a la expresión de las proteínas que participan en la señalización de la insulina, el licuado de nopal no tuvo ninguna influencia en la expresión de IR e IRS-1, así como en la actividad de p-Akt.

Se propone que existe un mecanismo adicional al de disminución de la absorción de glucosa, evaluado a través de las determinaciones en ayuno y al de la cascada de transducción de señales a través de las proteínas IR, IRS-1 y la actividad de Akt, mediante el cual el nopal ejerce su actividad antihiperglicémica.

INTRODUCCIÓN

México vive un estado de transición en muchos aspectos, incluyendo alimentación y salud. La población muestra una tendencia a consumir dietas modernas, las cuales contienen un exceso de energía, abundancia de proteínas, azúcares, grasas y colesterol, además de una baja cantidad de fibra. Todas estas características, aunadas al sedentarismo, se asocian con un incremento en la obesidad y enfermedades relacionadas como aterosclerosis, hipertensión, ciertos tipos de cáncer y diabetes.

En México, la diabetes es la tercera causa de muerte después de las afecciones cardiacas y el cáncer. Aproximadamente 8 millones de habitantes son diabéticos, entre los cuales predomina la diabetes tipo II, abarcando del 90 al 95% del total de pacientes. Esta enfermedad acelera su incidencia por los malos hábitos de alimentación, la falta de ejercicio y sobre todo la obesidad. La diabetes tipo II puede manejarse a menudo satisfactoriamente con ejercicio y terapia nutricional. Los pacientes con dicho tipo de diabetes se caracterizan por dos defectos metabólicos: 1) una alteración en la secreción de insulina que se produce en forma retardada o insuficiente por la carga de glucosa y 2) una incapacidad de los tejidos periféricos para responder a la insulina (resistencia a la insulina). Dichos pacientes presentan alteraciones en la cascada de transducción de señales de la insulina, tales como una disminución en la fosforilación de los residuos de tirosina del receptor de insulina (IR), sustrato del receptor de insulina (IRS-1) y una disminución de los transportadores de glucosa (GLUT4) en la superficie celular.

La diabetes no es una enfermedad que se localice en una sola región del cuerpo, sino que afecta a varios órganos vitales y desencadena complicaciones como ceguera, amputaciones, presión alta, enfermedades renales, dentales, complicaciones en el embarazo, etc. Esta patología puede ser controlada para disminuir dichas complicaciones y con ello tener una mejor calidad de vida. Sin embargo, el costo de algunos de los medicamentos es inaccesible para muchos pacientes, por lo que una gran parte de la población opta por el uso de la medicina tradicional.

Desde hace muchos años, nuestros antecesores utilizaban diferentes plantas para curar ciertas enfermedades. El nopal era considerado, además de un alimento frecuente, un remedio eficaz contra la diabetes, enfermedad que ya desde esa época se padecía.

El efecto hipoglicemiante producido por el nopal, es desde hace muchos años conocido y estudiado. Sin embargo, poco se conoce acerca de la dosis a la cual debe utilizarse, así como su mecanismo de acción y su capacidad coadyuvante con los fármacos más comúnmente usados en nuestro país.

Los componentes de las plantas con actividad hipoglicemiante actúan a diferente nivel: a) inhibiendo la absorción de glucosa, b) actuando como insulina, c) estimulando la secreción de la insulina y/o d) mejorando la cascada de transducción de señales de esta hormona. El conocer su mecanismo de acción nos permite darles el mejor uso para el tratamiento de la enfermedad. Por otro lado, en muchas ocasiones los pacientes utilizan un tratamiento farmacológico en conjunto con medicina tradicional. Esto podría traer una serie de consecuencias tales como los efectos sinérgicos produciendo una hipoglicemia muy severa o un efecto antagónico, en el cual se altera la capacidad hipoglicemiante del fármaco. En el caso del nopal, a pesar de ser el producto natural más utilizado en México, no existen estudios en los cuales se evalúe el efecto coadyuvante utilizando fármacos de uso común en nuestro país.

ANTECEDENTES

I. Generalidades de la Diabetes Mellitus

La diabetes Mellitus es un trastorno crónico que afecta al metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas. Un rasgo característico de esta enfermedad es la hiperglicemia, la cual refleja una alteración en la utilización de la glucosa como resultado de una respuesta defectuosa o deficiente de la secreción de insulina.

En 1997 en México, el grupo de enfermedades no transmisibles representó el 69% del total de causas de mortalidad. De ellas, el 30% lo integraban la diabetes, las enfermedades hipertensivas, cerebrovasculares e isquémicas del corazón (Kuri, 2001). La diabetes ha ascendido del cuarto lugar en 1996 al tercero como causa de mortalidad, con 38 muertes por cada 100 000 habitantes (Figura 1).

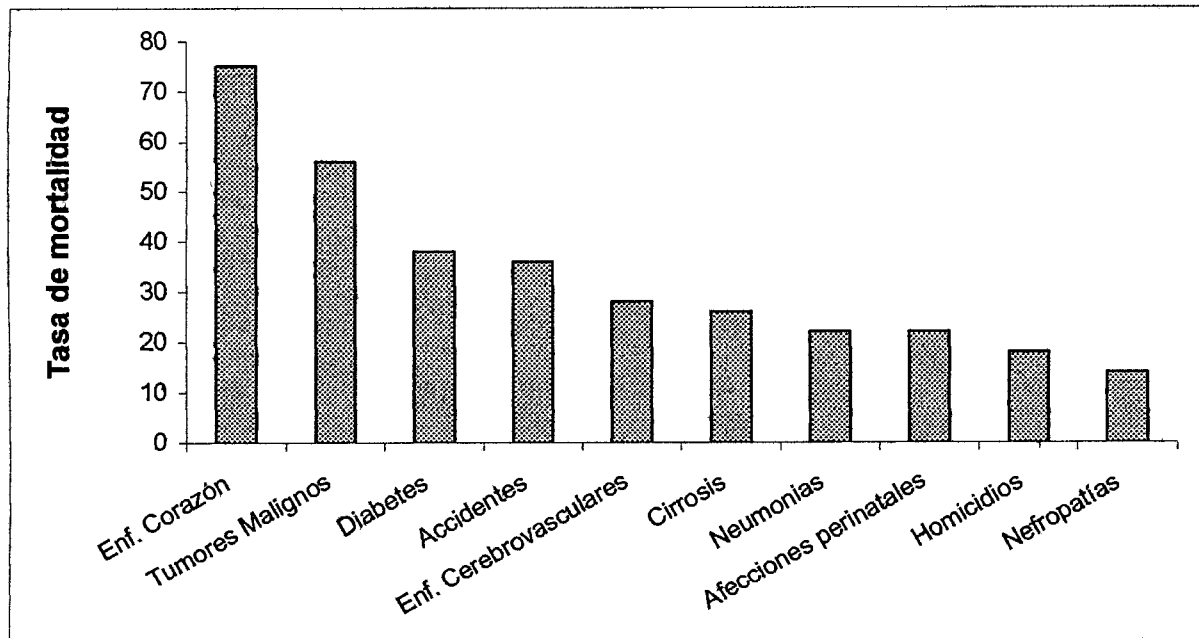


Figura 1. Principales causas de mortalidad en México, 1997 (Kuri, 2001). En esta figura se presentan las diferentes enfermedades causantes de muerte en nuestro país.

La tasa de mortalidad de enfermedades crónico - degenerativas ha incrementado en las últimas décadas. En tiempos anteriores las enfermedades infecto - contagiosas representaban el mayor número de muertes. Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que a partir de la década de los 60, la tasa de mortalidad aumentó para las enfermedades crónico - degenerativas, como la diabetes Mellitus (Figura 2).

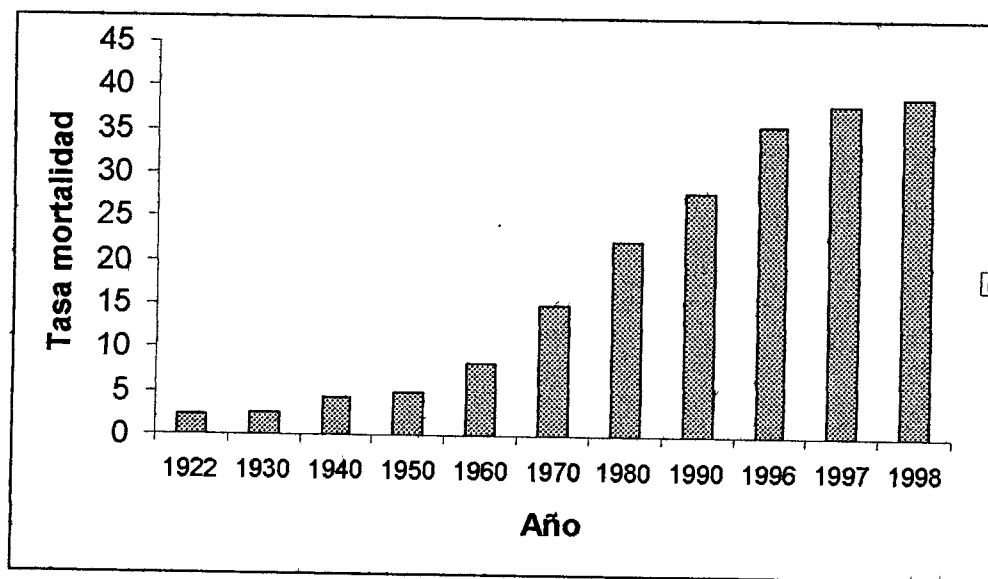


Figura 2. Tasa de mortalidad de diabetes en México por cada 100, 000 habitantes (Kuri, 2001).

En la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas realizada en 1993, se estimó una prevalencia de diabetes de 8.2 % entre la población de 20 a 65 años de edad, y del 20% en el grupo de 60 a 69 años.

Desafortunadamente, la incidencia de diabetes en México es de las más altas en el mundo y los individuos en edad productiva (entre los 35 y 60 años de edad) constituyen el grupo más afectado. Más del 50% de los pacientes diabéticos registrados en la Secretaría de Salud pertenecen a este grupo de edad.

I.1 Clasificación de la Diabetes

I.1.1 Diabetes Tipo I

Este tipo de diabetes es conocida como diabetes Mellitus dependiente de la insulina (Insulin Dependent Diabetes Mellitus, IDDM) o diabetes juvenil. La diabetes tipo I constituye del 5% y al 10% de todos los casos diagnosticados de diabetes. Los factores de riesgo están menos definidos para la diabetes de tipo I que para el tipo II, pero factores de autoinmunidad, genéticos y ambientales están involucrados en el desarrollo de este tipo de patología. Usualmente la diabetes juvenil ocurre antes de los 25 años de edad y es el resultado de la muerte parcial de células β pancreáticas seguida de un ataque viral/autoinmune. La diabetes tipo I está caracterizada por la incapacidad de las células β pancreáticas para producir y secretar insulina (Versphol, 2002).

I.1.2 Diabetes Gestacional

Se desarrolla entre el 2% y 5% de todos los embarazos, pero desaparece al final del mismo. El incremento de peso exagerado que se desarrolla durante el embarazo está asociado con un alto riesgo de desarrollar este tipo de diabetes. Las mujeres que han tenido diabetes gestacional tienen un riesgo más alto de desarrollar diabetes de tipo II en el futuro (Mathews, 2000).

Las concentraciones de aminoácidos en madres con diabetes Mellitus gestacional son similares a embarazadas normales, sin embargo los aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina) se incrementan después de una noche de ayuno en mujeres diabéticas gestacionales, comparadas con mujeres normales. Sin tratamiento, en este tipo de embarazos, puede encontrarse mortalidad materna, fetal, pérdida perinatal (aborto espontáneo, macrosomía fetal, síndrome de estrés respiratorio neonatal) y malformaciones congénitas, además de altos niveles de complicaciones obstétricas al momento del parto (Chiasson y col., 1989).

I.1.3 Diabetes Tipo II

También conocida como diabetes Mellitus no dependiente de insulina (Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus, NIDDM) o diabetes de adulto, la diabetes tipo II constituye entre el 90% y 95% de todos los casos diagnosticados de diabetes. Los factores de riesgo para este tipo de diabetes incluyen: envejecimiento, obesidad, historia familiar de diabetes, desarrollo de la misma durante el embarazo, intolerancia a la glucosa, inactividad física y origen racial/étnico, entre otros.

En investigaciones recientes se ha demostrado que para el desarrollo de este tipo de diabetes, se requiere tanto un defecto de las células pancreáticas β , como de una reducción de la sensibilidad de los tejidos a la insulina antes de que la diabetes no insulino dependiente fenotípica quede de manifiesto (Shalev, 1999).

En la NIDDM, los pacientes se caracterizan por dos defectos metabólicos:

1. Una alteración en la secreción de insulina que se produce en forma retardada o insuficiente para la carga de glucosa.
2. Una incapacidad de los tejidos periféricos para responder a la insulina (resistencia a la insulina).

El problema se complica por la frecuencia con que los pacientes con diabetes tipo II presentan obesidad. La obesidad, incluso en ausencia de diabetes, se caracteriza por resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Robbins, 1996).

I.2 Complicaciones de la Diabetes

Las muertes que ocurren cada año en México a causa de la diabetes Mellitus están relacionadas fundamentalmente con las complicaciones, entre las que destacan por su frecuencia la nefropatía, seguida de los trastornos de la circulación periférica, enfermedades de corazón, derrame cerebral, presión alta, ceguera, amputaciones, etc. Cabe señalar que la letalidad por complicaciones agudas ha disminuido con el uso de la insulina y de los hipoglicemiantes orales, los cuales han permitido la sobrevivencia de los enfermos por más tiempo, pero a la vez han propiciado el incremento de otro tipo de complicaciones, tales como náusea, diarrea, pérdida del apetito, malestar estomacal, alergias en la piel, mareos (Kuri, 2001).

II. Insulina

II.1 Síntesis biológica de la insulina

Las células β de los islotes pancreáticos sintetizan insulina a partir de un precursor de cadena única de 110 aminoácidos llamado preproinsulina.

Después de la translocación a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso, el péptido señal N-terminal de 24 aminoácidos de la preproinsulina se desdobra con rapidez hasta formar proinsulina (Zhang y col., 1999). Aquí, la molécula se pliega y se forman enlaces disulfuro. En el momento de la conversión de la proinsulina humana en insulina, en el complejo de Golgi, se eliminan mediante proteólisis cuatro aminoácidos básicos y el conector restante o péptido C. Esto da lugar a las dos cadenas de péptidos (A y B) de la molécula de insulina, que contiene un enlace disulfuro intrasubunidad y dos intersubunidad (Figura 3).

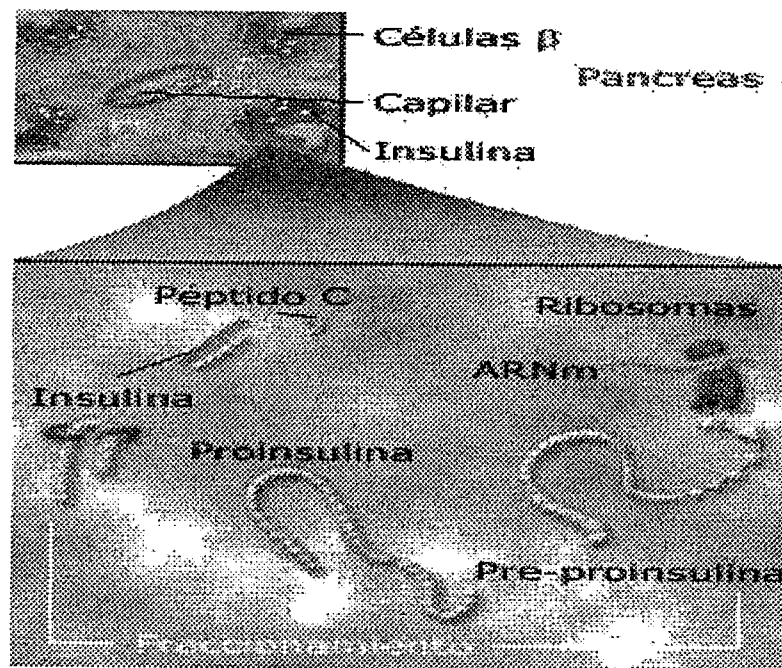


Figura 3. Síntesis de la insulina. Las células β pancreáticas sintetizan insulina a partir de preproinsulina. Esta molécula se pliega y se forman puentes de disulfuro para constituirse en proinsulina y finalmente formar las cadenas A y B.

Las cadenas A y B están compuestas de 21 y 30 residuos de aminoácidos respectivamente; de este modo, el peso molecular es de 5 800 Da. Aún cuando la

secuencia de aminoácidos de la insulina se ha conservado altamente en el transcurso de la evolución, hay variaciones importantes con respecto a otras especies de mamíferos en la sucesión de aminoácidos. Estas diferencias explican la potencia biológica así como de la inmunogenicidad de insulinas de diferente origen (De Meyts, 1994).

II.2 Regulación de la secreción de insulina

La secreción de insulina es un proceso regulado de manera estrecha, diseñado para proporcionar concentraciones estables de glucosa en la sangre tanto en ayuno como en la alimentación. Esta regulación se logra por medio de la interrelación coordinada de diversos nutrimentos, hormonas gastrointestinales (gastrina, secretina, péptido inhibitorio gástrico), hormonas pancreáticas y neurotransmisores del sistema nervioso autónomo (hormona del crecimiento, cortisol). La glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos favorecen la secreción de insulina. Los islotes de Langerhans del páncreas poseen una abundante innervación tanto adrenérgica como colinérgica. La estimulación de receptores α_2 -adrenérgicos inhiben la secreción de insulina, mientras que los agonistas de los receptores β_2 -adrenérgicos y la estimulación del nervio vago, aumentan su liberación.

La glucosa es el principal estímulo para la secreción de insulina en los seres humanos. La glucosa es más eficaz para desencadenar la secreción de insulina cuando se toma por vía oral que cuando se administra por vía intravenosa. Esto resulta cierto porque la ingestión de glucosa (o alimentos) induce la liberación de hormonas gastrointestinales, estimulando así la actividad vagal. La secreción de insulina es bifásica cuando es desencadenada por glucosa: la primera fase alcanza un máximo después de uno a dos minutos y es de corta duración, en tanto la segunda fase tiene inicio tardío pero duración más prolongada (horas).

La glucosa entra en la célula β pancreática mediante transporte facilitado, mediado por GLUT2, un subtipo específico de transportador de glucosa que no depende de insulina para su activación. A continuación, la glucocinasa lleva a cabo la

fosforilación de la glucosa. En contraste con otras hexocinasas que poseen una amplia distribución en los tejidos, la expresión de la glucocinasa se limita de manera primaria a las células y los tejidos que participan en la regulación del metabolismo de la glucosa, como es el caso del hígado y de las células β pancreáticas (Osman y col., 2000).

La glucosa se metaboliza y genera adenosintrifosfato (ATP). El cual, cierra los canales de K^+ sensibles al ATP. La disminución resultante en la salida de dicho ión despolariza la membrana celular, abriendo los canales de Ca^{2+} , y desencadenando a su vez la liberación de insulina por medio del proceso de exocitosis (Figura 4).

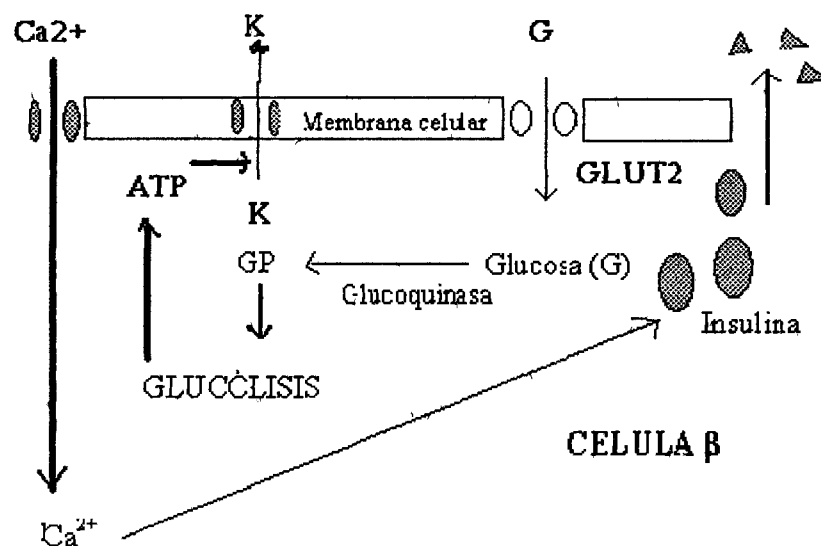


Figura 4. Liberación de la insulina por la célula β (Ruiz y col., 2002). La disminución de la concentración de ATP produce una despolarización de los canales de K^+ sensibles a esta molécula, provocando un incremento de la entrada de calcio a la célula, liberando insulina por medio de exocitosis.

La respuesta termina cuando un grupo separado de canales de K^+ dependientes de voltaje, activados por la despolarización de la membrana, permite una salida suficiente de K^+ para restaurar el potencial de membrana a su valor inicial. Si la concentración extracelular de glucosa permanece alta, el ciclo se repite y se libera más insulina. El control principal de la secreción de insulina es ejercido por un

efecto de retroalimentación por la concentración de glucosa sanguínea directamente sobre el páncreas (Ganong, 1998).

II.3 Distribución y degradación de la insulina

La insulina circula en la sangre como el monómero libre, su volumen de distribución se aproxima al volumen del líquido extracelular. Después de ingerir una comida, se observa un aumento rápido en la concentración de insulina en la sangre porta, seguida por un incremento paralelo pero más pequeño en la circulación periférica. La vida media de la insulina en plasma es de cinco a seis minutos en sujetos normales y en pacientes con diabetes no complicada (Sodoyez y col., 1983).

La insulina se desintegra principalmente en hígado, riñones y músculo. Alrededor del 50% de la insulina que llega al hígado por medio de la vena porta se destruye y nunca llega a la circulación general. La insulina se filtra en los glomérulos renales y se resorbe en los túbulos, lo que también la desintegra.

II.4 Acciones celulares de la insulina

La insulina desencadena una amplia gama de respuestas biológicas. Los tejidos blancos de importancia para la regulación de la homeostasis de la glucosa por la insulina son hígado, músculo y adiposo. Sin embargo, la insulina también ejerce potentes efectos reguladores sobre otros tipos de célula. La insulina es la hormona primaria que se encarga de controlar la captación, la utilización y el almacenamiento de nutrientes celulares. Las acciones anabólicas de la insulina comprenden la estimulación del uso y almacenamiento intracelular de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, en tanto que bloquea procesos catabólicos, como la degradación de glucógeno, grasa y proteínas.

II.5 Regulación del transporte de glucosa

La estimulación del transporte de glucosa hacia los tejidos muscular y adiposo es un componente crucial de la respuesta fisiológica a la insulina. La glucosa entra en las células por medio de difusión facilitada. Hasta la fecha, se ha logrado clonar y secuenciar el DNA que codifica para una familia de seis transportadores de glucosa

de mamíferos. Se cree que cinco de estos (GLUT1 a GLUT5) participan en la difusión facilitada (independiente de Na^+) de glucosa hacia las células. GLUT6 es un pseudogén y GLUT7 se encuentra en el retículo endoplásmico el cual permite el flujo de salida de glucosa después de su desfosforilación por la glucosa-6-fosfatasa. Los transportadores de glucosa son glucoproteínas de membrana integrales, con masas moleculares de 50 kDa y cada uno posee 12 dominios α -helicoidales transmembranales (Ganong, 1998).

La insulina estimula el transporte de glucosa al favorecer la translocación de vesículas intracelulares que contienen los transportadores de glucosa GLUT4 y GLUT1 hacia la membrana plasmática en tejido muscular, adiposo y en hígado. Este efecto es reversible; los transportadores vuelven al fondo común intracelular en el momento en que se elimina la insulina (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características de los Transportadores de Glucosa (Ganong, 1998).

TRANSPORTADOR	FUNCIÓN	PRINCIPALES LUGARES DE EXPRESIÓN
GLUT 1	Captación basal de la glucosa	Placenta, encéfalo, eritrocitos, riñones, colon, tejido adiposo y músculo.
GLUT 2	Sensor de la glucosa de las células β , transporte hacia el exterior de las células epiteliales del intestino	Células β de los islotes, hígado, células epiteliales del intestino delgado y riñones
GLUT 3	Captación basal de glucosa	Encéfalo, placenta, riñones, etc.
GLUT 4	Captación de glucosa estimulada por insulina	Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo
GLUT 5	Absorción de fructosa	Yeyuno
GLUT 7	Transporte de glucosa-6-fosfato en el retículo endoplásmico.	Hígado

Los aminoácidos de los transportadores parecen formar canales a través de los cuales puede entrar la glucosa a la célula, probablemente de la siguiente manera:

- 1) la glucosa se une al transportador del lado externo,
- 2) el complejo de transportador y glucosa cambian de conformación,
- 3) el transportador libera a la glucosa dentro del citoplasma de la célula y por último
- 4)) el transportador no ocupado cambia su conformación, en el cual el sitio de unión a la glucosa queda hacia el exterior de la célula.

El transporte de glucosa es un paso limitante para la insulina estimulada en la utilización de glucosa en músculo esquelético y es un sitio potencialmente importante en la resistencia a la insulina en la obesidad y en la NIDDM. La estructura y expresión del transportador de glucosa, GLUT4, es normal en muchos individuos con obesidad o NIDDM, pero la translocación de GLUT4 no está determinada y esto es esencial para la funcionalidad de GLUT4. Un elemento crucial en la resistencia a la insulina, en la obesidad y NIDDM es la disminución en la translocación y función de GLUT4 (Kelley y col., 1996).

II.6 Transporte de glucosa en tejidos dependientes de insulina

En tejidos dependientes de insulina tales como hígado, tejido muscular y tejido adiposo, se requiere de esta hormona para llevar a cabo el transporte de glucosa en dichas células.

II.6.1 Receptor de Insulina (IR)

La insulina inicia sus efectos por medio de la unión a un receptor específico de superficie celular. Estos receptores se encuentran en casi todas las células de mamíferos (Ganong, 1998). El número de receptores varía desde 40 por célula en los eritrocitos, hasta 300 000 por célula en los adipocitos y hepatocitos.

El receptor de insulina es una glucoproteína transmembranal compuesta de dos subunidades α de 135 kDa y dos subunidades β de 95 kDa. Las subunidades están

unidas por medio de enlaces disulfuro para formar un heterotetrámero β - α - α - β . Las subunidades α son por completo extracelulares y contienen el dominio de unión a insulina, en tanto las subunidades β son proteínas transmembranales que poseen actividad de cinasas de tirosina (Goodman, 1996). Cuando la insulina se une a la subunidad α de IR, existe un cambio conformacional en el receptor y se estimula la actividad cinasa de la subunidad β .

La insulina unida a estas células en la superficie de receptor es rápidamente internalizada y degradada dentro del aparato endosomal (Di Guglielmo y col., 1998).

II.6.2 Sustrato del receptor de insulina (IRS)

El receptor autofosforilado fosforila a sustratos proteicos endógenos incluyendo IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4 en múltiples residuos de tirosina. IRS-1 es el sustrato principal del receptor de insulina, es una proteína citosólica con peso molecular de 185 kDa, la cual contiene 22 sitios que pueden ser fosforilados en tirosina y por lo menos 8 de éstos se fosforilan después de una estimulación con insulina (Kahn y col., 2001).

La proteína tirosina fosfatasa 1B es responsable de la regulación negativa de la señalización de la insulina al desfosforilar residuos en el receptor de insulina (Salmeen y col., 2000).

II.6.3 Cinasa de fosfoinosítidos (PI3K)

El IRS-1 fosforilado sirve como una proteína "dique" para otras proteínas que contienen los llamados dominios de homología Src2 (SH2). Una de estas proteínas de dominio SH2 es la cinasa de fosfoinosítidos PI3K, la cual es un heterodímero que consta de una subunidad catalítica de 110 kDa y una subunidad reguladora de 85 kDa (p85). La subunidad p85 contiene dos dominios SH2, a las cuales se une el IRS-1. PI3K fosforila fosfoinosítidos de membrana y los productos de dicha fosforilación activan a la proteína cinasa D (PKD).

II.6.4 Proteína cinasa B (PKB)

Los productos de la acción enzimática de PI3K, tales como PI 3, 4, 5 trifosfato activan a PKD-1 y PKD-2, los cuales a su vez fosforilan a PKB en residuos de serina y treonina.

PKB, también llamada Akt, es una proteína que pesa 60 kDa. Akt tiene dos sitios de fosforilación: el sitio 1 en la treonina 308 y el sitio 2 en la serina 473. A este respecto, dicha fosforilación correlaciona con la translocación de los GLUT4 a la superficie celular (Figura 5).

Estudios revelan que la señal de transducción a través de esta vía es de 4 a 40 minutos (Krook y col., 2000).

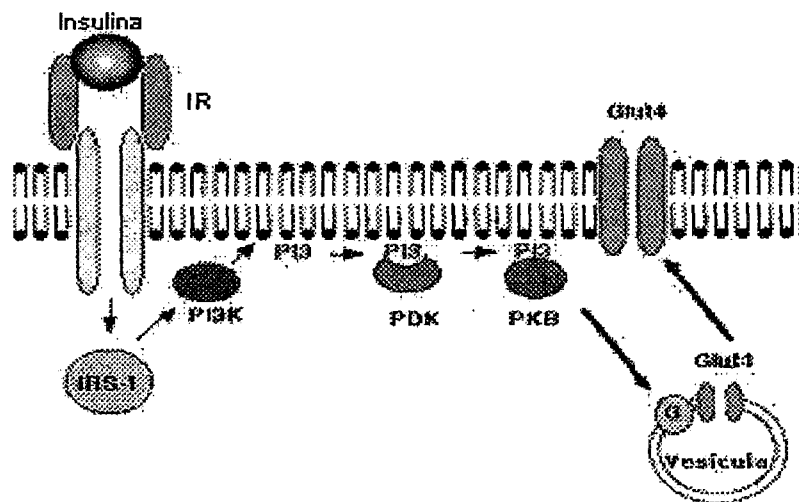


Figura 5. Regulación de la insulina en la translocación de GLUT4. IR = receptor de insulina; IRS = sustrato del receptor de insulina; PI3 = fosfoinositol-3,4,5-Trifosfato; PI3K = fosfoinositol-3-cinasa; PDK = cinasa activada por fosfoinosítidos; PKB = Proteína cinasa B. La insulina se une a su receptor y desencadena una serie de reacciones que conllevarán a la liberación de los transportadores GLUT4 de las vesículas intracelulares y a la formación de canales de estos transportadores que permiten el ingreso de glucosa al interior de la célula.

II.7 Resistencia a la Insulina

La resistencia a insulina es un síndrome provocado por anomalías en la cascada de transducción de señales de la insulina, lo cual produce entre otras cosas una disminución en el transporte de glucosa al interior de la célula (Ploug y col., 1998).

Las causas celulares de resistencia se dividen en defectos de unión y en defectos subsecuentes. En los defectos de unión pueden existir alteraciones en el número de receptores, en la afinidad de la insulina a su receptor o en ambos parámetros. En los defectos posreceptores, se presentan anomalías biológicas de proteínas efectoras (Masao y col., 1999). La resistencia a la insulina es una característica frecuente de la obesidad en la diabetes no dependiente de insulina (tipo II o NIDDM) y de algunas enfermedades cardiovasculares (Henry, 2003).

El músculo esquelético es el sitio primario de insulina que estimula la glucosa, el cual cuenta con el 70 – 80% de glucosa postprandial. Estudios *in vivo* revelan que la resistencia a la insulina en músculo esquelético es el primer defecto asociado con diabetes tipo II. Las bases moleculares para el desarrollo de la resistencia a la insulina queda poco claro, a pesar de que estas alteraciones se han observado en el músculo aislado de personas obesas y personas diabéticas tipo II (Kim y col., 2000).

III. Modelos de animales para el estudio de la diabetes

Actualmente existen varios modelos de estudios que nos permiten conocer el comportamiento de esta enfermedad, entre los cuales podemos citar a la diabetes inducida con estreptozotocina. Este compuesto tiene la capacidad de destruir las células β pancreáticas que dependiendo de la dosis, el daño producido puede ser parcial o total. Cuando se genera daño total este modelo es utilizado para evaluar la diabetes tipo I. Las ratas Zucker genéticamente diabéticas es el modelo más utilizado para los estudios de diabetes tipo II. Estos animales presentan alteraciones en el cromosoma 5, específicamente en el gen *fa* y esto trae como consecuencia un incremento en la obesidad, en el contenido de triglicéridos y colesterol. Los machos obesos muestran resistencia a la insulina y diabetes tipo II entre la séptima y décima semana de edad.

La selección del modelo de animal está determinada por la información que se requiera obtener de dichos estudios (Versphol, 2002).

IV. Tratamiento de la diabetes

Existen varios fármacos utilizados para el tratamiento de la diabetes entre los cuales podemos citar a los a) inhibidores de alfa-glucosidasas, b) meglitinidas, c) sulfonilureas y d) biguanidas.

IV.1 Biguanidas

Una de las biguanidas más ampliamente utilizada es la metformina, la cual es un agente con una potente propiedad antihiper glucémica. La metformina es eficaz en la reducción de hiperglicemia en la diabetes Mellitus tipo II y posee actividad similar a las sulfonilureas, tiazolidenodionas así como a la insulina (Wiemesperger y Bailey, 1999).

IV.1.1 Propiedades de la metformina

Las propiedades antihiper glucémicas de la metformina son principalmente atribuidas a la disminución de la producción hepática de glucosa, especialmente la gluconeogénesis y al incremento de la insulina en el tejido periférico (Stumvoll y col., 1995). Los mecanismos precisos de la acción hipoglicémica de la metformina no han sido esclarecidos. El fármaco probablemente interrumpe el proceso mitocondrial oxidativo en el hígado, así como también interrumpe el metabolismo del calcio intracelular en tejidos sensibles a la insulina (hígado, músculo esquelético, y adipocitos) y en el tejido cardiovascular (Järvinen y col., 1999).

El tratamiento con insulina y un agente hipoglicemiante, como la metformina, en pacientes con diabetes tipo II, pueden corregir varias de las primeras anomalías fisiopatológicas en este síndrome metabólico (Giannarelli y col., 2003). En los pacientes diabéticos, la metformina muestra una protección cardiovascular, además, de los efectos antihiper glucemiantes (Kirpichnikov, 2002).

IV.1.2 Farmacocinética de la metformina

La metformina se absorbe principalmente a partir del intestino delgado. El fármaco es estable, no se une a proteínas plasmáticas, se excreta sin cambios en la orina.

Tiene vida media de 1.3 a 4.5 horas. La dosis diaria máxima recomendada de metformina es de 3 g, tomados en tres dosis con las comidas (Bailey, 1992).

La metformina aumenta varias de las acciones biológicas de la insulina, incluyendo transporte de glucosa y síntesis de glucógeno y lípidos, en personas con predisposición de resistencia a la insulina (Stepensky y col., 2002).

IV.1.3 Mellitrón

La terapia combinada con metformina es a menudo superior a la terapia con un solo agente hipoglicemiante (DeFronzo y col., 1995). A este respecto, Mellitrón es la combinación de dos agentes hipoglicemiantes orales: metformina y clorpropamida. El primero pertenece al grupo de las biguanidas, el segundo es una sulfonilurea. Este compuesto tiene un efecto hipoglicemiante agudo actuando sobre la célula β del páncreas en un estímulo de la secreción de insulina. El agente posee, además, un efecto hipoglicemiante crónico que se debe a la potenciación de la acción de la insulina, a través de un aumento del número de receptores para la insulina o de su unión a ellos en los tejidos sensibles a la misma (DeFronzo, 1999).

Los tratamientos farmacológicos están basados en dos tipos de drogas: la inyección de insulina y los agentes hipoglicemiantes como las biguanidas y sulfonilureas (Hundal y col., 2000). El uso de drogas orales es limitado debido a las posibles reacciones adversas que pueden causar incompatibilidad con otros mecanismos y llegar a ser menos efectivos con el uso prolongado. La inyección de insulina decrementa la glucemia, pero no mantiene fisiológicamente los niveles normales de glucosa en sangre. Por otro lado, la prevalencia de este desorden metabólico está incrementándose rápidamente y los tratamientos actuales para algunos pacientes resultan demasiado costosos (Scheen, 2003). Para algunas enfermedades como la diabetes, el uso de plantas medicinales resulta una alternativa altamente atractiva para el tratamiento de dicha enfermedad.

V. El nopal como terapia herbolaria

Las dietas humanas basadas en plantas contienen una diversidad de compuestos fitoquímicos, los cuales no pueden ser considerados nutrientes, pero aparecen para jugar un rol en el tratamiento de ciertas enfermedades. A estas sustancias se les denominan agentes nutraceuticos. En algunos casos donde el proceso de la enfermedad es parcialmente incomprendido, algunos elementos de protección pueden relacionarse a un compuesto simple o estructuralmente similar a un grupo de compuestos en la dieta.

En investigaciones sobre los efectos de agentes nutraceuticos en la expresión de genes involucrados, se ha demostrado que estos agentes pueden resultar auxiliares en el tratamiento de enfermedades tales como la obesidad, diabetes, aterosclerosis, hipertensión y cáncer (Orzechowski y col., 2002).

En México existe una diversidad de plantas usadas para el tratamiento de la diabetes, entre las cuales podemos citar al diente de león, la sábila, el guarumo, la chaya, la trompetilla, la hierba dorada, el cuajilote, así como el nopal.

Se ha demostrado que una especie de nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) posee una acción hipoglicémica tanto en animales de experimentación con hiperglicemia, como en humanos con diabetes Mellitus no dependiente de insulina (Fraty y col., 1991).

V.1 Características del nopal

Los nopales son plantas carnosas, arbustivas de 1-5 m de altura, con tallos o ramas (pencas) oblongas, aplanadas y de color verde. El conocimiento y uso de los nopales en México deben haberlo iniciado los primeros pobladores, hace más de 25 000 años. Estas plantas deben haber sido los primeros recursos de subsistencia y asentamiento de estos pobladores.

V.2 Composición química

Los nopales y tunas de nopal son ricos en agua, fibra, vitamina C, calcio y potasio. Como es una planta fibrosa, el nopal contiene altos niveles de ambas fibras. Las

fibras solubles presentes en el nopal incluyen mucílagos, pectina y gomas. Las fibras insolubles incluyen celulosa (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química por 100 g de nopal (Villegas y de Gante, 1995).

Componente	Nopal (penca)
Energía (kcal)	27-37
Proteína (g)	1.1 – 1.7
Extracto etéreo	0.4
Hidratos de carbono	5.6-8.8
Cenizas (g)	0.9
Calcio (mg)	93-110
Fósforo (mg)	20
Hierro (mg)	0.5
Vitamina A (µg eq)	41-50
Tiamina (mg)	0.04
Niacina (mg)	0.02
Ácido ascórbico (mg)	19
Riboflavininas (mg)	0.04

Se consideran fibras de la dieta a las sustancias vegetales que no digieren las enzimas gastrointestinales humanas. No se absorben y por lo tanto no proporcionan energía.

Según la composición de las fibras, se producen determinados efectos metabólicos, así, pectina, mucílagos y gomas reducen algunos lípidos séricos (colesterol y triglicéridos) y la glucemia. La celulosa reduce la glucemia pero tiene poca acción sobre los lípidos mientras que la lignina tiene afinidad por las sales biliares y el colesterol (Fрати y col., 1989b). La diabetes Mellitus en adultos puede ser una de las enfermedades de la civilización relacionadas con la deficiencia de fibra dietética. La viscosidad, ocasionada por la fibra dietética soluble, parece retardar y reducir la

absorción de la glucosa sanguínea. La fibra dietética es hipocolesterémica en humanos y además incrementa la excreción fecal de sales biliares. La fibra actúa como una barrera física y acelera los movimientos intestinales ocasionando una reducción en la absorción de los alimentos. También puede ligar al colesterol propiciando una mayor excreción fecal. La excreción del colesterol y sus metabolitos se incrementa después del consumo de alimentos ricos en fibra dietética (Cárdenas y col., 1998).

V.3 Capacidad hipoglicemiante del nopal

En humanos sanos se ha observado que la ingestión de nopal atenúa la hiperglicemia que sigue a una carga de glucosa por vía bucal. En individuos con diabetes Mellitus no dependiente de insulina, la ingesta cotidiana de tallos de nopal logra, en pocos días, reducir la glucemia en ayunas. Así mismo, la administración de la savia del nopal a largo plazo ha contribuido a mejorar el control de la diabetes (Cárdenas y col., 1998).

Los estudios en animales indican que de los varios extractos de nopal (licuado entero, jugo y savia) tienen acción hipoglicemiante en animales de experimentación con hiperglicemia, el preparado con mayor acción es el licuado entero de nopal. En experimentos realizados por Frati y col., (1991), se encontró que el efecto hipoglicemiante máximo se obtiene entre 3 y 4 horas después de la ingesta de nopal. Este efecto hipoglicemiante podría deberse a diversos mecanismos tales como cambios en las hormonas reguladoras de la glucemia, en la sensibilidad celular a la insulina, en el consumo de glucosa o su almacenamiento como glucógeno hepático, o incluso en la conversión de glucosa en fructosa.

La actividad hipoglicemiante de un extracto purificado del nopal (*Opuntia fuliginosa*) fue evaluada en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina. Los niveles de glucosa en sangre fueron reducidos a valores normales por la combinación de la insulina y el extracto de *Opuntia* como tratamiento. Más aún, cuando la insulina fue retirada del tratamiento combinado, el extracto de nopal fue capaz de mantener los niveles normoglicémicos en las ratas diabéticas (Trejo y col., 1996).

El efecto hipoglucémico de nopal se le ha atribuido principalmente a las fibras dietarias. Actúan cambiando las características físicas del contenido intestinal y modificando la absorción de algunas sustancias como la glucosa y así mismo disminuyen la magnitud de la hipoglucemia posprandial (Fрати y col., 1989c).

Por otro lado, esta fibra soluble es capaz, además, de disminuir los niveles de colesterol en animales y humanos con hiperlipidemia (Wolfram y col., 2002). La disminución del colesterol depende aparentemente de la absorción de las sales biliares por las fibras vegetales, ya que al administrarlas aumenta la excreción fecal de sales biliares y colesterol (Fрати y col., 1989a).

Sin embargo, es probable que el efecto de la fibra no explique todas las acciones del nopal. Aunque tanto en animales como en humanos, la administración del extracto de nopal mejora la tolerancia a la glucosa parenteral, subcutánea e intravenosa, no significa que el extracto no ejerza una disminución de los niveles de glucosa sanguínea simplemente por reducir la absorción de glucosa a nivel gastrointestinal. Estudios han revelado que en animales diabéticos la administración de extracto de nopal modificó la tolerancia a la glucosa parenteral, mientras que en humanos con diabetes Mellitus tipo II, la ingestión de 500g de *O. streptacantha* Lemaire redujo en forma aguda la glicemia en ayunas. En ambos casos se descartó el efecto de la fibra, pues no se administraron carbohidratos por vía oral (Fрати y col., 1989b). Por lo tanto, se puede sugerir que la cactácea posee dos formas de acción. Una forma de acción puede estar mediada por las fibras dietarias y otra con un mecanismo de acción diferente. En esta última, existe una mejora de la resistencia a la insulina en la cual podría estar involucrada la cascada de transducción de señales de esta hormona.

En base a lo anteriormente expuesto, es importante evaluar la actividad hipoglucemiante y antihiperglucémica del nopal en ratas genéticamente diabéticas y determinar el efecto coadyuvante del nopal durante la administración de un medicamento comúnmente utilizado para el tratamiento de esta enfermedad.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la actividad hipoglucemiante, antihiperglicémica y coadyuvante del nopal (*Opuntia spp.*) en ratas diabéticas Zucker, así como su efecto en la cascada de transducción de señales de la insulina.

ESPECÍFICOS

- Determinar la capacidad hipoglucemiante del nopal en ratas Zucker.
- Evaluar la actividad antihiperglicémica del nopal mediante una curva de tolerancia a la glucosa.
- Estudiar la acción coadyuvante del nopal sobre los niveles de glucosa en ratas genéticamente diabéticas tratadas con Mellitrón.
- Cuantificar la expresión y la actividad de IR e IRS-1, así como la actividad de Akt en músculo esquelético de ratas diabéticas tratadas con un licuado de nopal.

METODOLOGÍA

I. MATERIALES

I.1 Biológico

Se trabajó con ratas machos Zucker de 4 semanas de edad (Harlan®). Los animales se aclimataron durante 4 semanas antes de iniciar el experimento y se alimentaron con Nutricubos (Harlan®) y agua *ad libitum*.

I.2 Químico

Los reactivos para electroforesis fueron Bio-Rad. Los anticuerpos utilizados para el análisis de Inmuno blot fueron: actina (Goat polyclonal IgG), p-Akt 1 (rabbit polyclonal IgG), IRS-1 (mouse monoclonal IgG), IR (Mouse monoclonal IgG), todos adquiridos de Santa Cruz Biotechnology. Los anticuerpos secundarios fueron de Zymed Laboratories.

El kit de quimioluminiscencia fue el BM chemiluminescence blotting substrate (POD) de Roche diagnostics.

II. MÉTODOS

II.1 Clasificación de grupos

Los animales fueron asignados al azar en cuatro grupos:

- ratas control tratadas con vehículo de licuado de nopal (agua)
- ratas tratadas con Mellitrón (17 y 56.6 mg/kg)
- ratas tratadas con nopal (0.71 g/kg y 1.42 g/kg)
- ratas tratadas con nopal y Mellitrón (1.42 g/kg y 56.6 mg/kg respectivamente).

II.2 Tratamiento

En la primera fase del tratamiento, los animales consumieron diariamente licuado de nopal en el agua de uso durante 36 días. En la segunda fase los animales recibieron licuado de nopal y Mellitrón en el agua de uso por 31 días. La dosis de nopal y Mellitrón es el equivalente al consumo de 100g y tres tabletas, respectivamente, para un paciente de 70 Kg.

II.3 Determinaciones

Las ratas se pesaron cada semana y se les determinó la concentración de glucosa sanguínea en ayuno. La curva de tolerancia a la glucosa se realizó a los quince días de iniciado el tratamiento.

II.3.1 Curva de tolerancia a la glucosa

Primeramente, las ratas fueron sometidas a un ayuno por 12 horas y se tomaron muestras de sangre antes de iniciar el experimento (tiempo 0). Posteriormente, los animales recibieron una carga de glucosa al 70% (3.7 ml por animal) y se tomaron muestras de sangre a los 5, 15, 30, 60 y 120 minutos. Los niveles de glucosa sanguínea se determinaron utilizando un glucómetro marca Roche.

II.3.2 Determinación de la expresión de IR, IRS-1 y actividad de Akt

Preparación de la muestra

Las ratas permanecieron en ayuno por 12 horas, se anestesiaron con pentobarbital sódico (80 mg/kg) por vía intraperitoneal y posteriormente se les inyectó insulina (3 Unidades), por vía cardiaca. Se tomaron muestras de tejido muscular a los 0, 3, 5 y 15 minutos. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a -70° C hasta su utilización.

El tejido muscular congelado se homogenizó con una solución amortiguadora conteniendo: Hepes 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, NaPP 10 mM, Na_3VO_4 2 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 1 mM, NaF 10 mM, EDTA 2 mM, PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 2 mM, leupeptina 5 mg/ml, NP-40 1% y glicerol 10%. El

homogenizado se incubó 45 minutos a 4° C con agitación y después se centrifugó a 65.34 g durante 30 minutos. Al sobrenadante se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.

Electroforesis en geles de poliacrilamida con Duodesil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)

El extracto proteico (40 µg) se mezcló 1:1 (v/v) con la solución digestora de muestra. Las mezclas se incubaron a 60°C en baño maría por 30 minutos y fueron posteriormente sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida (7%) con SDS, a voltaje constante (120 volts) durante 1 hora. La electroforesis se rectificó por la tinción del gel con Azul de Coomasie G-250.

Western-Blot

Después de la electroforesis, las muestras fueron transferidas a las membranas de PVDF a 15 volts durante 1 hora en un Transfer Cell Semi-Dry (BIO-RAD).

Las membranas se bloquearon con una solución amortiguadora TBS 10% por toda la noche a 4 °C, se incubaron con un primer anticuerpo durante 2 horas a temperatura ambiente y se realizaron lavados con solución TBS-T. Posteriormente, se incubaron con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (1:1000) en solución de bloqueo de electrotransferencia a temperatura ambiente por 45 minutos. Finalmente, las membranas se lavaron con TBS-T, se incubó con la solución de quimioluminiscencia en oscuridad (5 – 15 segundos) y finalmente se visualizó al exponer las membranas a placas fotográficas (Fuji Medical X-ray Film). En el proceso de revelado de las placas se usaron soluciones comerciales (KODAK) y las bandas se cuantificaron en un fotodocumentador (KODAK 1D Image Analysis Software). Ver Anexos.

Control de la concentración de proteína en Western-Blot

Para comprobar que la concentración de proteína cargada (80 μ g) en el gel es la misma para todas las muestras, se llevó a cabo un Western-blot para actina, utilizando un anticuerpo policlonal anti-actina.

2.4 Análisis Estadístico

Los resultados son presentados como medias \pm Desviación Media del Error (S.E.M). Para el análisis de las diferencias, se llevó a cabo una comparación de medias por la prueba de rangos múltiples de Tukey.

RESULTADOS

I. Tratamiento con nopal

Para evaluar el efecto del nopal sobre los niveles de glucosa en ratas Zucker, el licuado de nopal fue incorporado directamente en el agua de beber. Por lo tanto, las concentraciones de esta cactácea están determinadas en base al consumo diario del líquido por rata.

I.1 Efecto sobre la concentración de glucosa

En la figura 6 se muestran los niveles de glucosa sanguínea con respecto a los días de tratamiento. En base a los resultados se observa que las ratas que consumieron nopal a la concentración de 0.71 g/Kg no mostraron ninguna diferencia estadística significativa en los niveles de glucosa sanguínea comparados con el grupo control después de doce días de iniciado el tratamiento. Por lo que se incrementó la concentración de nopal a 1.42 g/Kg durante el resto del experimento. Este incremento en la concentración de nopal provocó niveles de glucosa menores en los animales tratados en todos los tiempos determinados y una diferencia estadística significativa.

En el cuadro 3 se muestra el cambio (%) de glucosa en sangre de ratas Zucker tratadas con licuado de nopal durante 36 días. Se puede observar que el tratamiento con nopal (0.71 g/Kg) durante 10 días redujo en un 7.21% la concentración de glucosa, comparada con su valor inicial (95.5 ± 9.06). Durante el tiempo restante de experimentación, los incrementos en porcentaje de glucosa oscilaron entre 9 – 15%, excepto el día 24.

En cuanto al grupo control, el porcentaje de glucosa aumentó un 86.64% después de 15 días de tratamiento, manteniéndose arriba del 40% durante el resto del periodo experimental.

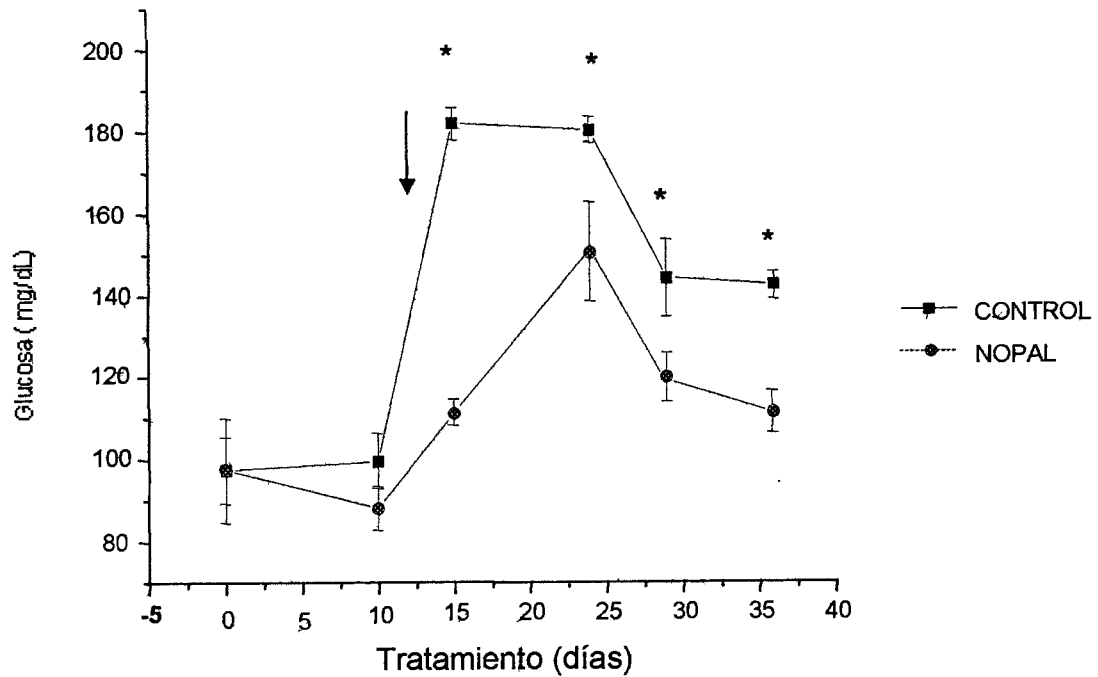


Figura 6. Determinación de glucosa en sangre de ratas Zucker tratadas diariamente con licuado de nopal durante 36 días.

Los valores son presentados como media \pm SEM, n = 5.

↓ Indica el día al cual se incrementó la concentración de nopal de 0.71 g/Kg a 1.42 g/Kg.

* P < 0.05, por la prueba de Tukey

Cuadro 3. Porcentaje de cambio de glucosa sanguínea de ratas Zucker tratadas con licuado de nopal (0.71 g/Kg).

DIAS DE TRATAMIENTO	10	15	24	29	36
GRUPO					
CONTROL	2.05	86.64	84.59	47.60	45.89
NOPAL	-7.21	10.43	40.80	15.49	9.36

I.2 Efecto sobre el peso corporal

La ganancia de peso de los animales tratados con el licuado de nopal fue similar al grupo control para cada uno de los tiempos determinados. Al final del experimento, las ratas control y las tratadas con nopal presentaron un incremento de peso de $202.02 \pm 35.43\text{g}$ y $205.29 \pm 34.61\text{g}$, respectivamente (Figura 7).

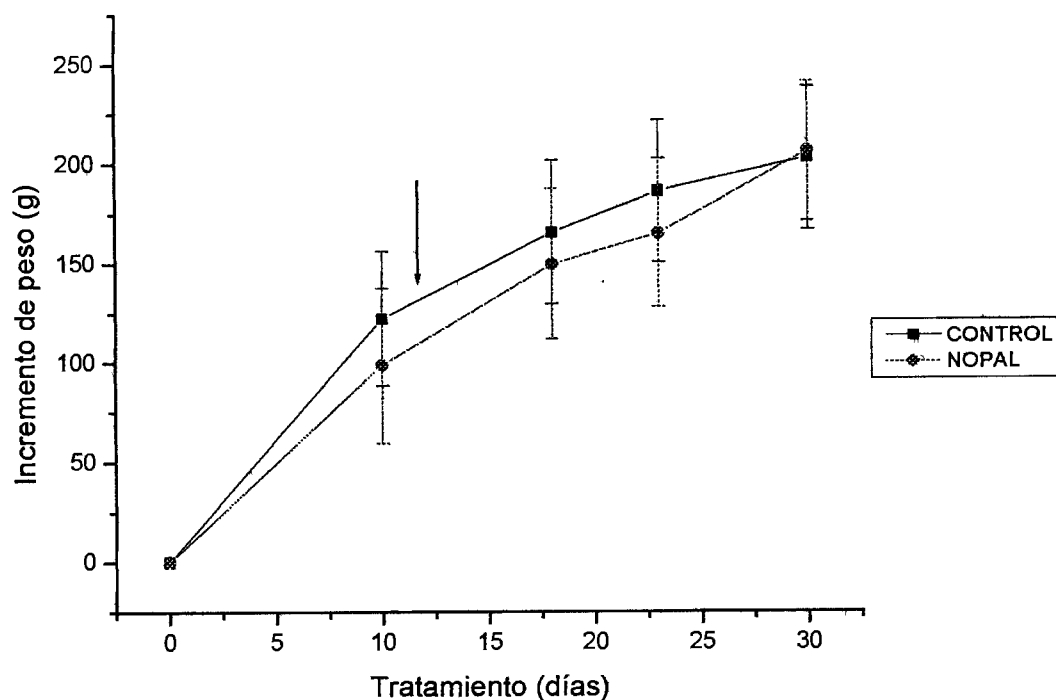


Figura 7. Incremento de peso corporal de ratas Zucker tratadas con licuado de nopal durante 29 días.

Los valores son presentados como media \pm SEM, $n = 5$.

↓ Indica el día (12vo) al cual se incrementó la concentración de nopal de 0.71 g/Kg a 1.42 g/Kg.

* $P < 0.05$, por la prueba de Tukey

I.3 Efecto sobre la curva de tolerancia a la glucosa

En la figura 8 se muestran los resultados obtenidos de la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) en las ratas Zucker tratadas con el licuado de nopal durante 34 días.

Esta gráfica muestra que los valores iniciales al minuto 0 del grupo control y grupo nopal son similares. El pico máximo de hiperglicemia en el grupo control se obtuvo a los 15 minutos (457 ± 41 mg/dL) mientras que en los animales tratados con nopal la concentración fue solamente de 312 ± 81 mg/dL a este tiempo. Sin embargo, a los 30 y 60 minutos los niveles de glucosa sanguínea son similares en ambos grupos. A los 120 minutos los animales tratados con licuado de nopal presentaron menores valores de glucosa que el grupo control ($280 \pm 32,5$ mg/dL y 355 ± 33 mg/dL, respectivamente).

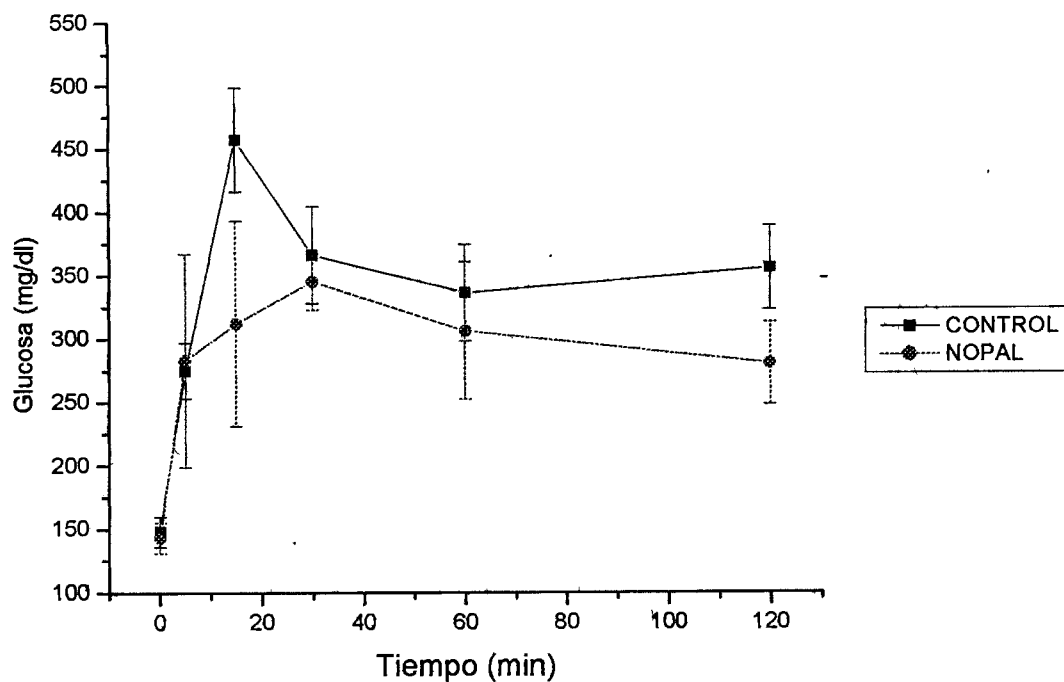


Figura 8. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas Zucker a los 34 días del tratamiento con licuado de nopal.

Los valores son presentados como media \pm D.E., n = 5.
4.9 g/Kg de glucosa por intubación gástrica.

* $P < 0.05$, por la prueba de Tukey

II. Tratamiento Nopal - Mellitrón

II.1 Determinación de glucosa

Para evaluar el efecto coadyuvante del licuado de nopal con Mellitrón (metformina + clorpropamida) en ratas Zucker se trataron a estos animales durante 31 días, incorporando ambos compuestos en el agua de beber. En la figura 9 se presentan los niveles de glucosa sanguínea en ayuno con respecto al tiempo. Durante los primeros doce días de tratamiento con Mellitrón no se observó ningún cambio en los niveles de glucosa de los animales tratados con este medicamento (17 mg/kg), por lo que a partir de ese día se incrementó la dosis del fármaco (56.6 mg/kg). Sin embargo, a pesar de este incremento no se observó el efecto hipoglicémico característico de dicho fármaco. Cabe señalar que no se consideraron dosis mayores ya que se podrían causar efectos toxicológicos en el animal.

El grupo tratado con nopal presentó, en promedio, los valores más bajos de glucosa (valor inicial 134.66 ± 2.02 mg/dL, valor al final del tratamiento 90.6 ± 0.6 mg/dL), mostrando una diferencia estadística significativa los días 22 y 28 con respecto al control sin fármaco. Para el efecto coadyuvante, a los días 28 y 31 se observa un efecto antagónico del fármaco para el nopal.

II.2 Efecto del Nopal – Mellitrón sobre el peso corporal

En la figura 10 se presenta el incremento en peso durante los 31 días que duró el tratamiento con licuado de nopal y Mellitrón. Se puede observar que este incremento fue menor cuando se administró el licuado de nopal con Mellitrón, aunque no fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control.

Los valores del peso corporal de las ratas al final del tratamiento fueron 568 ± 20.3 mg/dL g, 593 ± 8.51 mg/dL g, 649 ± 4 mg/dL g y 628 ± 11.79 mg/dL g para los animales control sin tratamiento, control tratado con Mellitrón, tratado con licuado de nopal y grupo tratado con licuado de nopal y Mellitrón, respectivamente. Y

aunque se aumentó la dosis de Mellitrón (56.6 mg/Kg) al doceavo día, esta concentración no produjo ningún efecto sobre el peso de los animales.

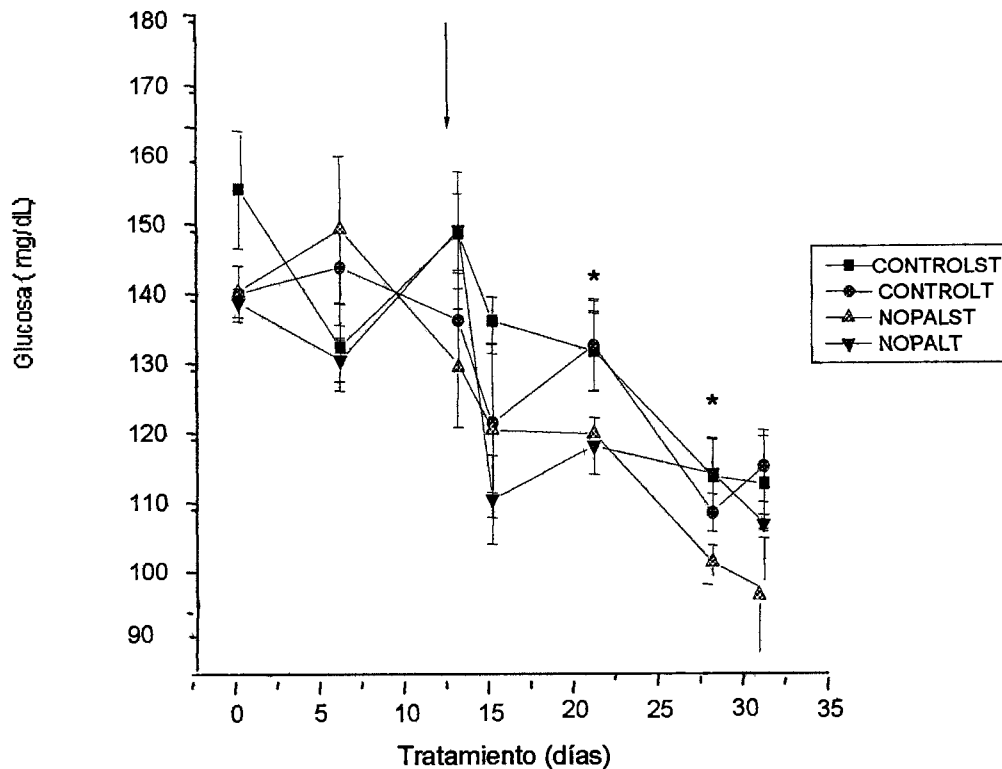


Figura 9. Determinación de glucosa en sangre de ratas Zucker tratadas con licuado de Nopal-Mellitrón.

Los valores son presentados como media \pm SEM, n = 5.

Control ST = control sin tratamiento (agua)

Control T = control tratado (agua + Mellitrón)

Nopal ST = nopal sin tratamiento (licuado de nopal)

Nopal T = nopal tratado (licuado de nopal + Mellitrón)

↓ Indica el día al cual se incrementó la dosis de Mellitrón a 56.6 mg/Kg

* Indica que hay diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento por la prueba de Tukey (P < 0.05).

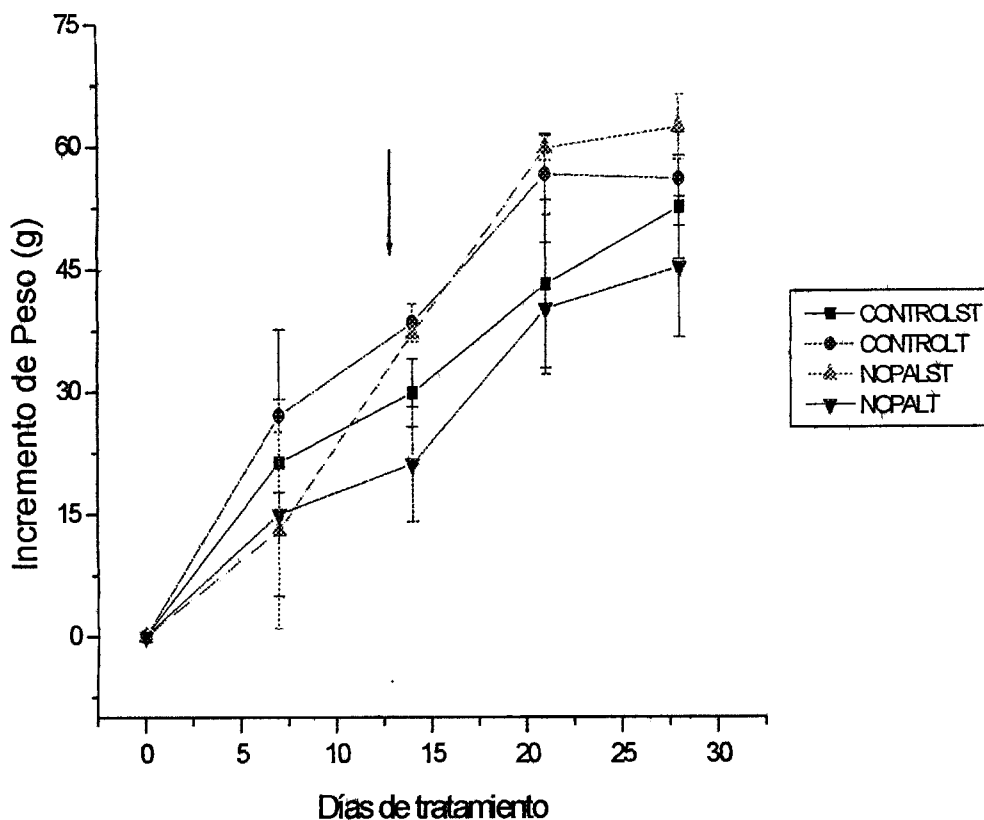


Figura 10. Incremento de peso corporal de ratas Zucker tratadas con licuado de nopal (1.42 g/Kg) - Mellitrón (17 mg/Kg) como agua de uso, durante 29 días.

Los valores son presentados como media \pm SEM, n = 5.

Control ST = control sin tratamiento (agua)

Control T = control tratado (agua + Mellitrón)

Nopal ST = nopal sin tratamiento (licuado de nopal)

Nopal T = nopal tratado (licuado de nopal + Mellitrón)

↓ Indica el día al cual se incrementó la dosis de Mellitrón (56.6 mg/Kg).

* Indica que hay diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

II.3 Efecto del Nopal – Mellitrón sobre los triglicéridos

Los triglicéridos están relacionados con el estado de resistencia a la insulina, razón por la cual se determinó su concentración en el plasma de los animales tratados con nopal y/o Mellitrón.

Los niveles de triglicéridos (TG) fueron de 7 nmol/L y 2.8 nmol/L para los grupos control sin tratamiento y control tratados con Mellitrón, respectivamente.

A pesar que el medicamento no disminuyó los niveles de glucosa sanguínea, los TG fueron disminuidos en los animales tratados con Mellitrón (65.27% del grupo control tratado y 52.77% del grupo tratado con licuado de nopal, con respecto al grupo control sin tratamiento). Así mismo, el consumo de nopal disminuyó significativamente los niveles de TG (80.55% para el grupo sin tratamiento y 52.77% para el grupo tratado con licuado de nopal y Mellitrón, respectivamente) con respecto al grupo control sin tratamiento.

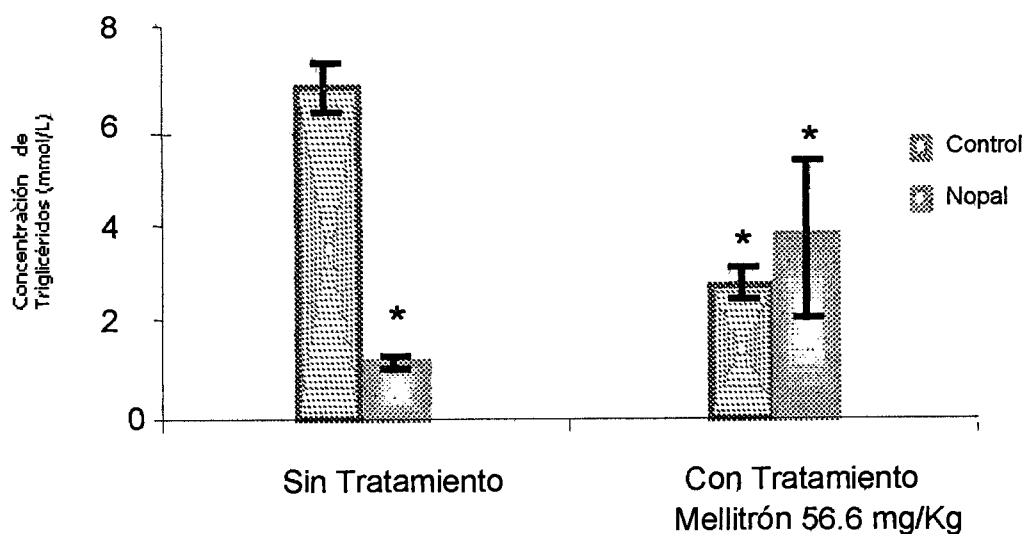


Figura 11. Determinación de triglicéridos en ratas Zucker tratadas con Mellitrón (56.6 mg/Kg)

Los valores son presentados como media \pm SEM, n = 5.

* Indica que hay diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento por la prueba de Tukey (P < 0.05).

III. Efecto del Nopal – Mellitrón sobre algunas proteínas de la cascada de señalización de la insulina

III.1 Proteína IR

Para determinar el efecto del nopal sobre la cascada de transducción de señales se evaluó la expresión de IR e IRS-1 que son las primeras proteínas participantes en la cascada de transducción. El músculo esquelético fue aislado, homogenizado e inmunoprecipitado con anticuerpo anti-IR. En la parte superior de la figura 12, se muestra un gel representativo de la expresión de la proteína IR en el músculo esquelético de ratas Zucker, con actina como control de concentración. En base al análisis estadístico de los resultados, no se observó diferencia significativa para ninguno de los tratamientos comparados con el control tratado con Mellitrón.

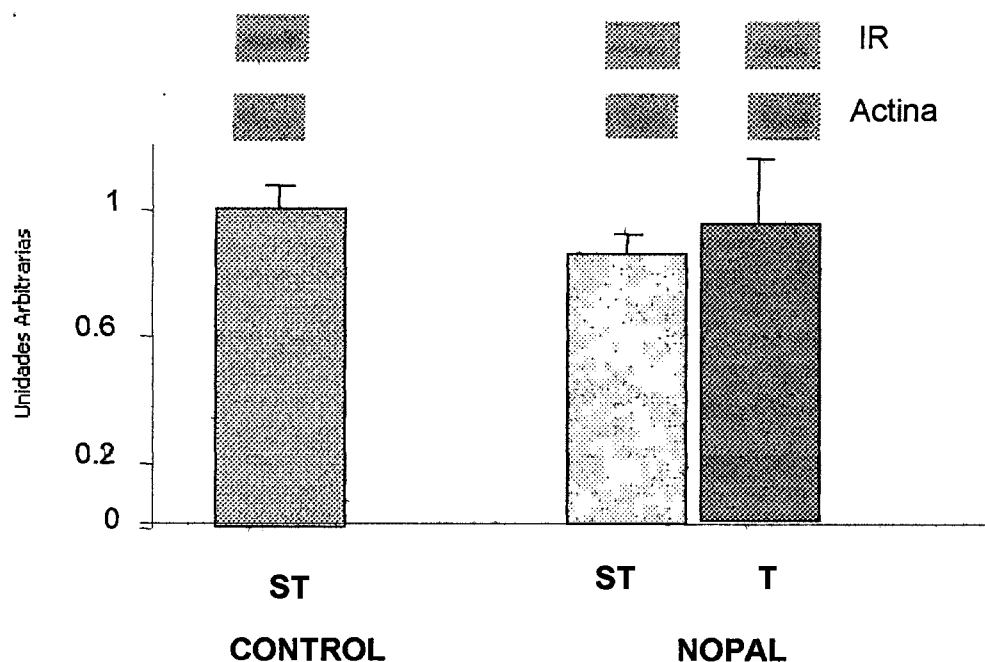


Figura 12. Expresión de la proteína IR en músculo esquelético de ratas Zucker.

Cada barra presenta la media \pm D.E. (n=4)

Control ST = control sin tratamiento (agua)

Nopal ST = grupo nopal sin tratamiento (licuado de nopal)

T = grupo nopal tratado (licuado de nopal + Mellitrón)

* Indica que hay diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En la parte superior de la figura se muestran las bandas representativas de Western-blot para la proteína IR y Actina.

III.2 Proteína IRS-1

La figura 13 muestra la expresión de la proteína IRS-1 en ratas Zucker de los grupos control y grupo tratado con nopal. Como se puede observar, el efecto fue similar a IR, ya que no se presentó diferencia estadística en la expresión de los grupos tratados comparados con el grupo control.

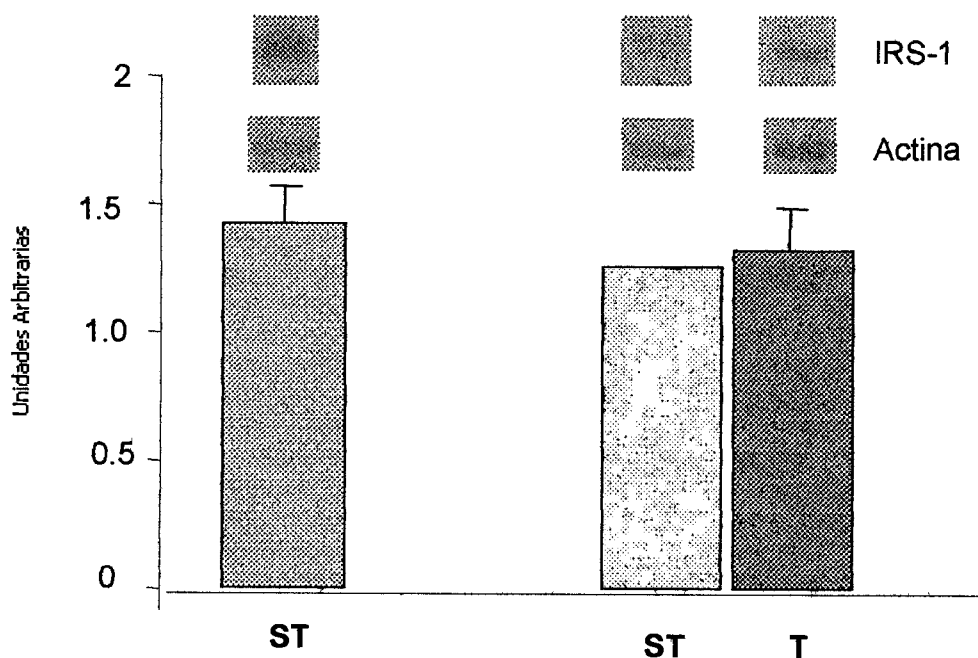


Figura 13. Expresión de IRS-1 en músculo esquelético de ratas Zucker.

Cada barra representa la media \pm D.E. (n = 4).

Control ST = control sin tratamiento (agua)

Nopal ST = grupo nopal sin tratamiento (licuado de nopal)

T = grupo nopal tratado (licuado de nopal + Mellitrón)

* Indica que hay diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En la parte superior de la figura se muestran las bandas representativas de Western-blot para la proteína IRS-1 y Actina.

III.3 Proteína p-Akt

La actividad de Akt está determinada por su fosforilación en residuos de serina, la cual precede a su vez de las fosforilaciones en tirosina de algunas proteínas de la cascada de transducción de señales de la insulina. Por lo tanto, primero se evaluó el tiempo en el cual se muestra la máxima fosforilación de las proteínas en residuos

de tirosina después de la estimulación con insulina. Para ello, los animales se anestesiaron, se les inyectó insulina vía punción cardiaca y posteriormente se tomaron muestras de músculo a los 0, 3 y 15 minutos. Finalmente, los residuos de tirosina fosforilados se determinaron mediante Western-blot.

En base a estos resultados, se obtuvo que la mejor expresión en la fosforilación de p-Tyr se presentó a los 3 minutos (Figura 14).

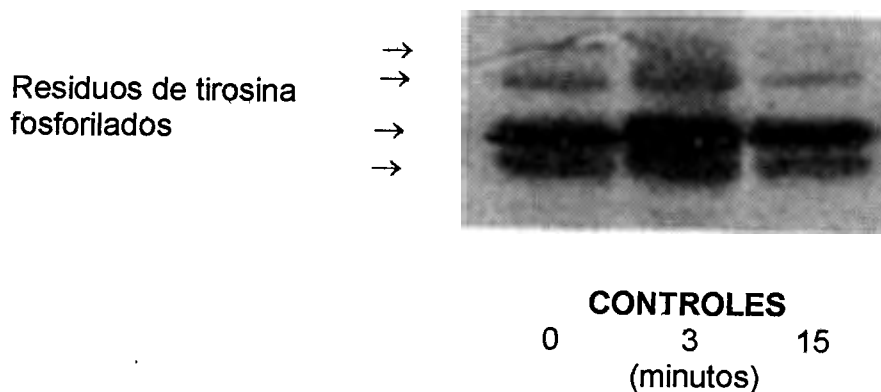


Figura 14. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, estimuladas con insulina en músculo esquelético de ratas Zucker a diferentes tiempos.

En la figura 15 se muestra la actividad de la proteína p-Akt en el músculo esquelético de ratas Zucker. Se puede observar que el licuado de nopal aumenta ligeramente la actividad de esta proteína, tanto en el grupo tratado solamente con nopal como en el grupo tratado con Mellitrón (1.31 ± 0.03 y 1.22 ± 0.03 unidades arbitrarias, respectivamente) comparado con el grupo control sin tratamiento (1.1 ± 0.17 unidades arbitrarias). Sin embargo, dicho incremento en la actividad de la proteína p-Akt no es estadísticamente significativa.

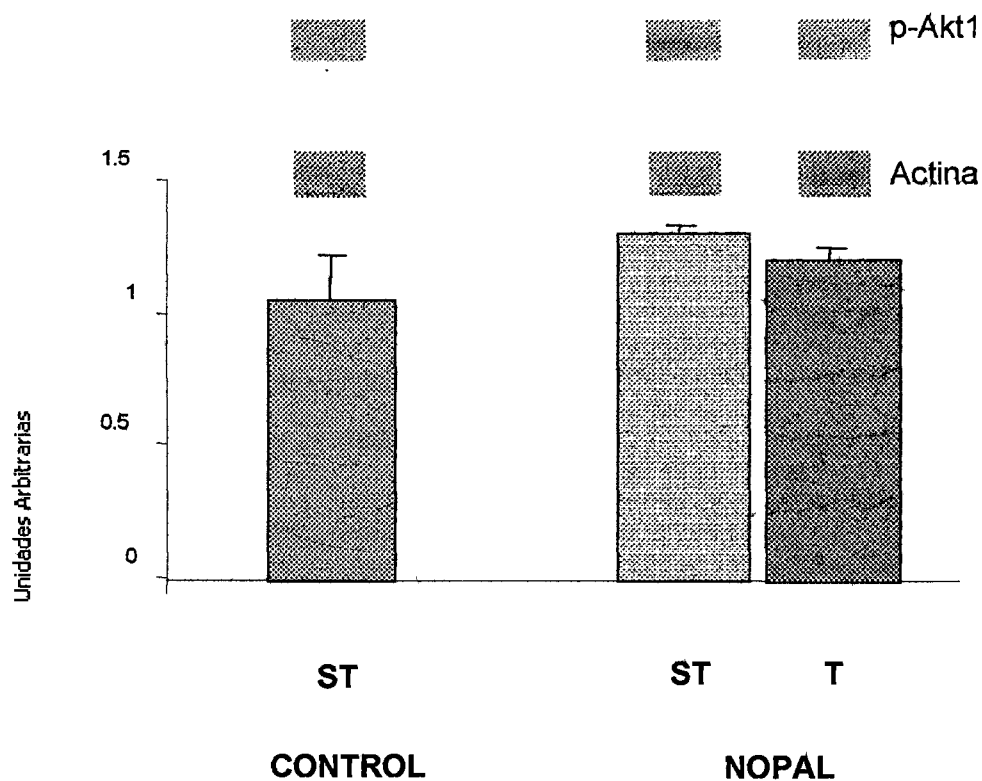


Figura 15. Actividad de p-Akt 1 en músculo esquelético de ratas Zucker.

Cada barra representa la media \pm D.E. (n = 4)

Control ST = control sin tratamiento (agua)

Nopal ST = grupo nopal sin tratamiento (licuado de nopal)

T = grupo nopal tratado (licuado de nopal + Mellitrón)

* Indica que hay diferencia significativa con respecto al grupo control sin tratamiento por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

En la parte superior de la figura se muestran las bandas representativas de Western-blot para la proteína p-Akt y Actina.

DISCUSIÓN

Una característica de las ratas Zucker es su condición hiperglicémica dependiente de la edad, la cual se presenta después de las 8-10 semanas de vida del animal. En este estudio los animales eran normoglicémicos (97 ± 5.4 mg/dL) al inicio del experimento. A las 10 semanas de edad, las ratas control presentaron hiperglicemia (180 ± 3.9 mg/dL), la cual fue disminuida con el tratamiento de nopal (135 ± 4.98 mg/dL).

Durante los 12 primeros días de tratamiento con nopal no se observó una diferencia estadística significativa. Lo anterior pudo deberse a la baja concentración de nopal o al estado normoglicémico de los animales, ya que en estudios realizados por Frati y col., (1990) con individuos sanos se demostró que sólo al inducir hiperglicemia se muestra una disminución en la concentración de glucosa sanguínea. Esto sugiere que el nopal tiene características importantes que deben ser consideradas para el tratamiento de la diabetes, con ventajas sobre los fármacos actualmente utilizados debido a que estos producen hipoglicemia en individuos sanos.

Los estudios realizados en este experimento se llevaron a cabo en condiciones de ayuno del animal. Durante el ayuno el organismo depende de la producción hepática de este carbohidrato para mantener los niveles de glucosa a través de glucogenólisis y gluconeogénesis y de la utilización periférica de la glucosa (Trejo y col., 1996). Se ha propuesto que el efecto del nopal es debido a la presencia de las fibras dietarias, las cuales pueden actuar interfiriendo o disminuyendo la absorción intestinal de glucosa. Sin embargo, dichas fibras no tienen la capacidad de disminuir los niveles de glucosa sanguínea en ayuno, lo que sugiere que pueda existir un mecanismo adicional a través del cual el nopal ejerce su acción.

En cuanto al efecto que tiene el nopal sobre el peso corporal, se sabe que éste ha sido recomendado para el tratamiento de la obesidad (Frati y col., 1989a). Una disminución del peso corporal trae como consecuencia una mejora de la resistencia

a insulina, la cual es una característica de las ratas Zucker. Sin embargo, la concentración de nopal utilizada en este estudio no tiene influencia sobre la ganancia de peso de estos animales. Estos resultados son similares a los reportados por Bwititi y col., (2000), quienes informan que ratas diabéticas inducidas químicamente con estreptozotocina y tratadas con nopal (120 mg/100g) durante cinco semanas no presentaron una diferencia de peso corporal con respecto a las ratas no tratadas.

Al realizar la curva de tolerancia a la glucosa se observó que la ingesta de licuado de nopal causó una disminución significativa en el pico hiperglicémico y/o el área bajo la curva durante la CTG. Con estos resultados se corrobora la capacidad anti-hiperglicémica de esta cactácea. En lo referente a la concentración de esta planta, estudios hechos por Frati y col., 1988, demuestran que en pruebas de tolerancia a la glucosa los efectos producidos por la ingesta de 100 o 500 g de nopal no existe diferencia estadística significativa entre estas concentraciones. Por lo tanto, el consumo de 100 g de nopal es suficiente para observar una disminución en la concentración de glucosa en sangre en condiciones de hiperglicemia, tal y como se observó en el presente estudio.

Para evaluar el efecto del tratamiento conjunto del nopal con un agente hipoglicemiante, los animales fueron tratados con uno de los fármacos más utilizados para el control de esta enfermedad, El Mellitrón, el cual es un agente hipoglicemiante compuesto de una sulfonilurea y una biguanida (clorpropamida y metformina, respectivamente). En el presente estudio el grupo de animales tratados con el fármaco no mostraron ninguna disminución de los niveles de glucosa sanguínea. Se ha reportado que la metformina incorporada en el agua de beber tiene capacidad hipoglicemiante en ratas Zucker a la concentración de 120 mg/kg (Song y col., 2000). Sin embargo, la máxima concentración sugerida para un efecto hipoglicemiante de la metformina es de 14 mg/kg (DeFronzo, 1999), la cual fue administrada durante 12 días en el presente estudio, no observándose el efecto deseado. Por lo que se incrementó la concentración del fármaco a 56 mg/kg. Sin

embargo, aún a esta concentración no fue posible obtener una disminución en los niveles de glucosa sanguínea. Cabe señalar que concentraciones más altas pueden producir efectos adversos en los animales, los cuales podrían confundir el efecto del nopal.

Es importante mencionar que el Mellitrón antagoniza el efecto producido por el nopal. Los componentes del Mellitrón actúan incrementando la respuesta a la insulina, lo que sugiere que el nopal podría tener cierta participación en la señalización de la insulina.

Un incremento de lípidos en la circulación altera el metabolismo de la glucosa tanto en su oxidación como en su almacenamiento, lo que podría traer como consecuencia un estado de resistencia a insulina. Por otro lado, la disminución de estos lípidos promueve una mejora en la respuesta a esta hormona (Pan y col., 1997), lo cual correlaciona con el efecto hipoglicémico observado en los animales tratados con nopal.

Así mismo el Mellitrón disminuyó los niveles de triglicéridos administrado sólo y en conjunto con el nopal. Se ha demostrado que en ratas Zucker diabéticas tratadas durante 12 semanas con metformina, se disminuyen significativamente los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres (Sreenan y col., 1996).

Durante el tratamiento con nopal y Mellitrón se presentó un incremento en los niveles de triglicéridos, comparado con el tratamiento único de nopal. Es importante considerar estos efectos, ya que el tratamiento combinado además de no disminuir los niveles de glucosa incrementa la hipertriglicéridemia en un estado de diabetes. Se ha reportado que el efecto hipoglicémico del nopal no se debe a una mayor liberación de insulina, ya que aparece incluso en animales post-pancreatectomizados, aunque requiere de la presencia de cuando menos pequeñas concentraciones de insulina, ya que no ocurre el efecto hipoglicémico en animales tratados con estreptozotocina. Así mismo, el efecto no es atribuible a

la fibra dietaria, puesto que el nopal tiene la capacidad de disminuir los niveles de glucosa en curvas de tolerancia a la glucosa parenteral (Frati y col., 1990). Otro de los mecanismos de acción de los agentes hipoglicemiantes es mejorar la cascada de transducción de señales de la insulina, por lo que también se realizaron determinaciones de algunas de las proteínas que participan en esta vía.

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la expresión de la proteína IR, IRS-1 y la actividad de Akt, medida a través de su fosforilación, no cambian con el tratamiento de nopal comparado con el grupo control.

Se sabe que la fosforilación en tirosina de IR e IRS-1, la actividad de PI 3-kinasa y la fosforilación en serina de Akt/PKB se ven disminuidas en los animales obesos Zucker (Zhen y col., 1999). Sin embargo, durante el tratamiento con algunos agentes hipoglucemiantes tales como las tiazolidenodionas y el ejercicio, se mejora la tolerancia a la glucosa, lo cual correlaciona con un incremento en la concentración de IRS-1 y la fosforilación de Akt. Cabe mencionar que estos fármacos, las tiazolidenodionas, no tienen la capacidad de disminuir los niveles de triglicéridos en plasma.

Los fibratos son compuestos que mejoran la sensibilidad a la insulina y disminuyen los triglicéridos en plasma. Tanto las tiazolidenodionas como los fibratos, actúan sobre el receptor nuclear activado por el proliferador de los peroxisomas (PPAR), PPAR γ y PPAR α , respectivamente. PPAR α aumenta los niveles de oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma, reduce la expresión en hígado de la ApoCIII, el principal componente de las partículas VLDL, así como también reduce la expresión de PEPCK (fosfoenol piruvato carboxilasa) en hígado. Lo anterior trae como consecuencia una disminución en la gluconeogénesis hepática. En tejido adiposo las tiazolidenodionas y los fibratos regulan la expresión de PEPCK incrementando la reesterificación de los ácidos grasos libres y disminuyendo los

lípidos circulantes, lo que produce una mejora de la resistencia a insulina (Brand y col., 2003).

Por lo tanto, el control glicémico puede ser llevado a cabo de manera independiente a la cascada de señalización de la insulina. Uno de los mecanismos podría ser la activación de los PPAR, los cuales regulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y glucosa dentro de la célula (Mezei y col., 2003).

CONCLUSIONES

- La concentración de nopal licuado de 0.71 g/Kg no mostró reducción significativa en los niveles de glucosa con respecto al grupo control. Sin embargo, a la concentración de 1.42 g/Kg se produjo una disminución de los niveles de glucosa para todos los tiempos estudiados.
- El incremento de peso de ratas Zucker con el tratamiento de licuado de nopal a la dosis de 1.42 g/Kg no mostró una diferencia estadística significativa con respecto al grupo control.
- La ingesta de licuado de nopal causó una disminución en el pico hiperglicémico durante la CTG.
- El grupo de animales tratados con Mellitrón (56 mg/Kg) no mostraron ninguna disminución de los niveles de glucosa sanguínea, e incluso muestran una tendencia a antagonizar el efecto del nopal.
- El consumo de nopal (1.42 g/Kg) disminuyó en 77,21% los niveles de TG en las ratas Zucker obesas, pero en el tratamiento con Nopal – Mellitrón este efecto es antagónico.
- La máxima fosforilación de tirosina en proteínas del músculo se detectó a los tres minutos después de la administración de insulina.
- No se observó ningún incremento en la expresión de las proteínas IR e IRS-1 en el músculo de animales tratados con nopal y nopal-Mellitrón.
- La actividad de la proteína Akt evaluada a través de sus fosforilaciones en serina mostró un ligero incremento en las ratas Zucker tratadas con licuado

de nopal (1.47 g/Kg de peso corporal). Sin embargo, este no fue estadísticamente significativo comparado con el control.

- En las prácticas medicinales tradicionales el nopal ha sido ampliamente utilizado para controlar la diabetes Mellitus. En este estudio se demostró la capacidad antihiperglicémica del nopal a la dosis de 100 mg/Kg (correspondiente a 1.42 g/Kg utilizado en este experimento). Más aún, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que es importante considerar que el empleo combinado del nopal con algunos fármacos puede antagonizar su efecto de disminuir los niveles de glucosa sanguínea.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey, C. J. 1992.** Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care*: Vol. 15: 755 - 772
- Brand, C., Sturis, J., Gotfredsen, C., Fleckner, J., Fledelius C., Hansen, B., Andersen, B., Ye, J., Sauerberg, P., Wassemann, K. 2003.** Dual PPAR / activation provides enhanced improvement of insulin sensitivity and glycemic control in ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*: Vol. 284: E841 – E854.
- Bwititi, P., Musabayane, C.T., Nhachi, C.F. 2000.** Effects of *Opuntia megacantha* on blood glucose and kidney function in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*: Vol. 69: 247 – 252.
- Cárdenas M., Serna, S., Velazco, J. 1998.** Efecto de la ingestión de nopal crudo y cocido (*Opuntia ficuas indica*) en el crecimiento y perfil de colesterol total, lipoproteína y glucosa en sangre de ratas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.*: Vol. 48: (4).
- Chiasson, F. L., Achkar, G.C.É., Ducros F. 1989.** Glucose turnover and gluconeogenesis during pregnancy in normal and type I (insulin dependent) diabetic women. *Diabetologia*: Vol. 32: 475A.
- DeFronzo, R. A., Goodman, A.M., and the Multicenter Metformin Study Group. 1995.** Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*: Vol. 333: 541 – 549.
- DeFronzo R. A. 1999.** Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.*: Vol. 131: 281 – 303.

De Meyts, P. 1994. The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative cooperativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling. *Diabetología*: Vol. 37: S135-S148.

Di Guglielmo, G., Drake, P., Baass, P., Authier, F., Posner, B., Bergeron, J. 1998. Insulin receptor internalization and signalling. *Molecular and Cellular Biochemistry*: Vol. 182: 59 – 63.

Frati, M.A., Ríos, G. U., Ariza, A.R., Islas, A. S., López, L. 1988. Duración de la acción hipoglucemiante de *Opuntia streptacantha* Lem. *Rev. Archiv. Invest. Méd.*: Vol. 20: 297.

Frati, M.A., Del Valle, M. L., Ariza, A. R., Islas, A.S., Chávez N. 1989a. Acción hipoglucemiante de diferentes dosis de nopal (*Opuntia streptacantha* Lemaire) en pacientes con diabetes mellitus tipo II. *Archiv. Invest. Méd.* : Vol. 20.

Frati Munari A.C. 1989b. Acción hipoglucemiante de *Opuntia streptacantha* lemaire: investigación con extractos puros. *Archiv. Invest. Med.*: Vol. 20:321.

Frati Munari A.C.. 1989c. Influencia de un extracto deshidratado de nopal (*Opuntia ficus indica* mill) en la glucemia. *Archiv. Invest. Med.*: Vol. 20: 1-15.

Frati, M.A., Ariza, A. R., Chávez N., Licona Q.R., López L. 1990. Acción de *Opuntia streptacantha* en individuos sanos con hiperglucemia inducida . *Rev. Archiv. Invest. Méd.*: Vol. 21: 99.

Frati, A.C., Gordillo, B., Altamirano P., Ariza, C., Cortes, R., Chávez A., Islas, S. 1991. Influence of nopal intake upon fasting glycemia in type II diabetic and healthy subjects. *Arch. Inv Med.*: Vol. 22: 51 – 56.

Ganong, William F. 1998. Fisiología Médica. 9na Edición. Manual Moderno, México, D.F.: 359-383.

Giannarelli, R., Aragona, M., Coppelli A., Del Prato, S. 2003. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab.* : Vol. 29: 28 – 35.

Goodman, A. 1996. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9na. Edición. Mc-Graw Hill Interamericana Editores, México: 1581 – 1609.

Henry, R.R. 2003. Insulin resistance: from predisposing factor to therapeutic target in type 2 diabetes. *Clin Ther.*: Vol. 25: B47 – B63.

Hundal RS., Krssak, M., Dufour S., Laurent D., Lebon V., Chandramouli, V. 2000. Mechanism by which metformin reduce glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*: Vol. 49: 2063 – 2069.

Järvinen Y., Nikkilä, K., Mäkimattila S. 1999. Metformin prevents weight gain by reducing dietary intake during insulin therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Drugs*.: Vol. 58: 75 – 82.

Kahn, S.E., Prigeon, R.L., Schwartz, R.S., Fujimoto, W.Y., Knopp, R.H., Brunzell, J.D. 2001. Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and islet β -cell function as explanation for metabolic diversity. *J. Nutr.* : Vol. 131: 354S – 360S.

Kelley, D., Mintun, M., Watkins, S., Simoneau, J., Jadali, F., Fredrickson, A., Beattie, J. 1996. The effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity on glucose transport and phosphorylation in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.*: Vol. 97: 2705 – 2713.

Kim, Y., Peron, D., Franke, T., Kahn, B. 2000. Divergent regulation of Akt1 and Akt2 isoforms in insulin target tissues of obese Zucker rats. *Diabetes*: Vol. 49: 846 – 856.

Kirpichnikov, D., McFarlane, S., Sowers, J. 2002. Metformin: An update. *Annals of Internal Medicine*: Vol. 137: 25 – 33.

Kuri, M.P. 2001. La Diabetes en México. Investigación y Desarrollo. *Periodismo de Ciencia y Tecnología*: Vol. 20: 1-15.

Krook, A., Bjornholm, M., Galuska, D., Jiang, X., Fahlman, R., Myers M., Zierath, J. 2000. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*: Vol. 49: 289 – 292.

Masao N., Kiichiro U., Akira, O., Kenji, A., Akira, S., Makoto, F., Motonobu, A., Masatoshi, K., Yoshitomo, O., Tomoichiro, A. 1999. Hiperglucemia impairs the insulin signaling step between PI 3-Kinase and Akt/PKB activations in ZDF rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communication*: Vol. 266: 252 – 256.

Mathews, Chistopher K. 2000. Bioquímica. McGraw-Hill Interamericana. México: 162, 315, 926- 941.

Mezei, O., Banz, W., Steger, R., Peluso, M., Winters, T., Shay, N. 2003. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr.*: Vol. 133 (5): 1238 – 1243.

Orzechowski, A., Ostaszewski, P., Jank, M., Berwid, S.J. 2002. Bioactive substances of plant origin in food-impact genomics. *Reprod. Nutr. Dev.*: Vol. 42: 625.

Osman, A., Pendergrass, M., Koval, J., Maezono, K., Cusi, K., Pratipanawatr, T., Mandarino, L. 2000. Regulation of MAP kinase pathway activity in vivo in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*: Vol. 278: E992 – E999.

Pan, D., Lillioja, S., Kriketos, A., Milner, M., Baur, L., Bogardus, C., Jenkins, A., Storlien, L. 1997. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*: Vol. 46: 983 – 988.

Ploug, T., van Deurs B., Cushman S.W., Aristón E., 1998. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are reduced by insulin and muscle contraction. *J. Cell. Biol.* : Vol. 142: 1429 – 1446.

Robbins S. L. 1996. Pathologic basis of disease. Edition Saunders. USA: 972-989.

Ruiz, R.B., Pérez, O.L., Requero, A. 2002. Posibilidades de la fibra dietética en el control del enfermo diabético no insulino dependiente. *Schironia*: Vol. 1: 22 – 26.

Salmeen, A., Andersen, J., Myers, M., Tonks, N., Barford, D . 2000. Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Diabetes*: Vol. 38: 35-48.

Shalev, A. 1999. Hope for insulin mimetic oral antidiabetic drugs. *European Journal of Endocrinology* : Vol. 141: 561 – 562.

Scheen, A. J. 2003. Is there a role for alpha- glucosidase inhibitors in the prevention of type 2 diabetes mellitus? *Drugs*: Vol. 63: 933 – 951.

Sodoyez, L.C. , Sodoyez-Goffaux, F., Guillaume,M., Merchie, G. 1983. Insulin metabolism in normal rats and humans: external detection by a scintillation camera, *Science*: Vol. 219: 865-867.

Song, S., Andrikopoulos, S., Filippis, C., Thorburn, A., Khan, D., Proietto, J. 2000. Mechanism of fat – induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*: 281: E275 – E282.

Sreenan, S., Sturis J., Pugh W., Burant C., Polonsky, K. 1996. Prevention of hyperglycemia in the Zucker diabetic fatty rat by treatment with metformin or troglitazone. *Am J Physiol.*: Vol 271 : E742 – E747.

Stepensky, D., Friedman, M., Raz, I., Hoffman, A. 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the glucose-lowering effect of metformin in diabetic rats reveals first-pass pharmacodynamic effect. *Drugs, Metabolism and Disposition*: Vol. 30: 861 – 868.

Stumvoll, M., Nurjan, N., Perriello, G., Dailey, G., Gerich, J.E. 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.*: Vol. 333: 550 – 554.

Versphol, E.J. 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med*: Vol. 68: 561 – 590.

Trejo, G.A., Gabriel, O.G., Puebla, P.A., Guisar, C.M., Munguia, M.M., Mejía, A.S., Calva, E. 1996. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *Ethnopharmacol*: Vol. 55: 27 – 33

Villegas y de Gante. 1995. El nopal como alimento tradicional mexicano. *Cuadernos de nutrición*: Vol. 18: 14-15

Wiernesperger, N. F. y Bailey, C. J. 1999. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. *Drugs*: Vol. 58: 75 – 82.

Wolfram, RM., Kritz H., Efhimiou Y., Stomatopoulos, J., Sinzinger H. 2002. Effect of prickly pear (*Opuntia robusta*) on glucose- and lipid-metabolism in non-diabetics with hyperlipidemia – a pilot study. *Wien Klin Wochenschr*. Vol. 114 : 840 – 846.

Zhang, B., Salituro G., Szalkowski, D., Li, Z., Zhang, Y., Royo, I. 1999. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*: Vol. 284: 974 – 977.

Zhen, Y., You, W., Clemont, A., Feener, E., Hein, K., Igarashi, M., Yamauchi, T., White M., King, G. 1999. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (*fa/fa*) rats. *J.Clin. Invest.*: 104: 447 – 457.

ANEXOS

1. Soluciones para Western – Blot

A. TBS

Tris (3M) – HCl pH = 8 10 ml

NaCl 5M 30 ml

Aforar a un litro con agua destilada

B. TTBS

Tris (3M) – HCl pH =8 1.0 ml

NaCl 5M 3.0 ml

Tween 20 1.0 ml

Aforar a un litro con agua destilada

C. Solución Bloqueante 10% (para bloquear la membrana y para preparar los anticuerpos)

Solución bloqueante 10.0 ml

TBS 90.0 ml

D. Solución bloqueante 5%

Solución bloqueante 5.00 ml

TBS 95.0 ml

E. Anticuerpos

- Proteína P- Akt 1
 - Primer anticuerpo 0.4 μ l por cada 2 ml (1:5000)
 - Segundo anticuerpo (anti-cabra) 1.0 μ l por cada 2 ml (1:2000)

- Proteína IRS-1
 - Primer anticuerpo 0.5 μ l por cada 2 ml (1:4000)
 - Segundo anticuerpo (anti-ratón) 1.0 μ l por cada 2 ml (1:2000)

- Proteína IR
 - Primer anticuerpo 0.5 μ l por cada 2 ml (1:4000)
 - Segundo anticuerpo (anti-ratón) 1.0 μ l por cada 2 ml (1:2000)

- Proteína Actina
 - Primer anticuerpo 0.2 μ l por cada 2 ml (1:10,000)
 - Segundo anticuerpo (anti-cabra) 1.0 μ l por cada 2 ml (1:2000)

Nota: los anticuerpos se aforan con la solución de TBS

2. Solución de Quimioluminiscencia

Reactivo A 15 μ l por cada 1.5 ml

Reactivo B 1485 μ l por cada 1.5 ml

Nota: Este reactivo se debe proteger de la luz