

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL**  
**CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**  
**Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

**“Efecto modulador de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y  
zarzamora (*Rubis fruticosis*) sobre biomarcadores de estrés oxidativo en  
ratas Wistar diabéticas inducidas con estreptozotocina”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L. en N. María Eugenia Albarrán Cornejo

Dirigida por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

**Centro Universitario**  
**Querétaro, Qro.**  
**Junio 2007**  
**México**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA  
REPÚBLICA (PROPAC)  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“Efecto modulador de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) sobre biomarcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar y diabéticas inducidas con estreptozotocina”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

L. en N. María Eugenia Albarrán Cornejo

Dirigida por:

Dra. Minerva Ramos Gómez  
SINODALES

Dra. Minerva Ramos Gómez  
Presidente

Dra. Rosalía Reynoso Camacho  
Secretario

Dra. Sandra O. Mendoza Díaz  
Vocal

Dr. Teódulo Quezada Tristán  
Suplente

Dra. Eva González Jasso  
Suplente

Q. B. Magali E. Aguilar Ortíz  
Director de la Facultad de Química

  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma  
Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Junio 2007  
México

## RESUMEN

La diabetes mellitus se caracteriza por el incremento de la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, mientras disminuye la capacidad del sistema de defensa antioxidante. Por lo que la identificación de diferentes antioxidantes en plantas y sus frutos, parece una estrategia altamente atractiva. Frutos como el arándano y la zarzamora son ricos en compuestos fenólicos, con una alta capacidad antioxidante. Para evaluar el efecto modulador de los frutos de arándano y zarzamora sobre biomarcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas inducidas con estreptozotocina, los frutos fueron liofilizados y se les determinó el contenido de fenoles y flavonoides totales, siendo la zarzamora con mayor contenido de fenoles y flavonoides, y mayor capacidad antioxidante (medidos por los métodos de ABTS<sup>•+</sup> y FRAP). En un estudio agudo (7 días), los frutos fueron administrados intragástricamente (50, 100 y 200 mg/kg), mostrando un efecto hipoglucemiante con zarzamora (100 y 200 mg/kg) en ratas sanas y diabéticas. La actividad enzimática de glutatión-*S*-transferesasa (GST) y los niveles de glutatión reducido (GSH) fueron estadísticamente mayores en el hígado y riñón de ratas sanas, siendo más significativa para las ratas tratadas con zarzamora a 200 mg/kg. Los grupos de ratas diabéticas consumieron más alimento (25%) y agua (70%) que las ratas sanas, confirmando la presencia de la enfermedad. Durante la fase experimental subcrónica (21 días) se observaron incrementos significativos en los niveles de glucosa, consumo de alimento y agua, así como pérdida de peso en los grupos de ratas diabéticas tratadas con y sin zarzamora. La actividad de GST, superóxido dismutasa y catalasa, así como los niveles hepáticos y renales de GSH se encuentran disminuidos en ratas diabéticas comparadas con los de ratas sanas. Sin embargo, se observó la inducción de enzimas antioxidantes por el sulfurofano (500 μmol/kg) y la zarzamora (100 y 400 mg/kg) incorporada en la dieta en ratas sanas y diabéticas. El presente estudio muestra el incremento de las enzimas de defensa antioxidante en la protección contra el estrés oxidativo en pacientes diabéticos por estos frutos.

Palabras clave: Diabetes mellitus, estrés oxidativo, sistema de defensa antioxidante, arándano y zarzamora.

## SUMMARY

Diabetes mellitus is characterized by the increase in the production of free radicals and reactive oxygen species, while the capacity antioxidant defense system is diminished. In this regard the identification of different antioxidants in plants and their fruits, seems a highly attractive strategy. Fruits like blueberry and blackberry are rich in phenolic compounds, with a high antioxidant capacity. To evaluate the effect of blueberry and blackberry fruits on oxidative stress biomarkers in diabetic Wistar rats induced with streptozotocin, fruits were lyophilized and the content of total phenols and flavonoids was determined, being the blackberry fruit with the highest content of phenols and flavonoides, and greater antioxidant capacity (measured by ABTS •+ and FRAP methods) than the blueberry. In a acute study (7 days), the fruits were intragastrically administrated (50, 100 and 200 mg/kg), showing a hypoglycemic effect with blackberry (100 and 200 mg/kg) in diabetic and healthy rats. The enzymatic activity of glutati3n-S-transferesasa (GST) and the levels of reduced glutati3n (GSH) were statistically greater in the liver and kidney of healthy rats, being more significant for the rats with blackberry (200 mg/kg). Diabetic rat groups consumed more food (25%) and water (70%) that healthy rats, confirming the presence of the illness. During a subchronic experimental phase (21 days) significant increments in the levels of glucose, consumption of food and water, as well as loss of weight were observed in diabetic rats treated with and without blackberry. The activity of GST, superoxide dismutase and catalase, as well as the renal and hepatic levels of GSH were found diminished in diabetic rats compared with those of healthy rats. Nevertheless, the antioxidant enzyme induction for sulfurophane (500  $\mu\text{mol/kg}$ ) and blackberry fruit (100 and 400 mg/kg) incorporated into the diet was observed in diabetic and healthy rats. The present study shows the increase of antioxidant defense enzymes provided by these fruits which protect against oxidative stress in diabetic patients.

Key words: Diabetes mellitus, oxidative stress, antioxidant defense systems, blueberry and blackberry fruits.

## DEDICATORIAS

*A mis padres por todo el amor que me han brindado, por su apoyo en tiempos difíciles, por sus oraciones, por haberme guiado para ser una persona de bien y que han hecho de mi ser una persona feliz y orgullosa de sus logros.*

**LOS AMO**

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma de Querétaro** y al **Posgrado de Alimentos** por haberme hecho parte de esta gran institución.

A **mi directora de tesis Minerva Ramos Gómez** por haber confiado en mí, haberme aceptado bajo su tutela, por apoyarme, orientarme y transmitirme sus valiosos conocimientos.

A cada uno los miembros de **mi comité** por haber aceptado fungir como mis sinodales, apoyarme y aportar a este trabajo su conocimiento.

A cada uno de **mis compañeros** de Maestría de la generación **2004- 2006**, por haber hecho agradable mi estancia en ella y recordarla con mucho cariño.

Al Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado durante la maestría.

A las personas que me alientan y creen en mi capacidad para salir adelante por difícil que parezca

A **Dios** por darme la vida en el tiempo y el espacio con las personas que en cada momento me rodean, pues me han enriquecido de experiencias que han hecho en el ser humano que soy ahora, la que concluye este trabajo y que sigue para adelante...

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	Pág. i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
1 Diabetes mellitus	3
1.1 Definición	3
1.2 Clasificación	3
1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1	3
1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2	4
1.2.3 Criterios de diagnóstico de la diabetes mellitus	6
1.3 Prevalencia	7
1.4. Complicaciones de la diabetes mellitus	9
1.5. Modelos animales para el estudio de la diabetes	11
2 Papel del estrés oxidativo en la diabetes y sus complicaciones	12
2.1 Estrés oxidativo	12
2.2 Sistemas de defensa antioxidante	17
3 Tratamientos empleados en el manejo de diabetes	19
3.1 Hipoglucemiantes orales	19
3.1.1 Sulfonilureas	20
3.1.2 Insulina	20
3.2 Plantas medicinales y comestibles empleadas tradicionalmente como antidiabéticas	21
3.2.1 El arándano ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	25
3.2.2 La zarzamora ( <i>Rubis fruticosis</i> )	28
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. HIPÓTESIS	32

V. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo General	32
5.2 Objetivos Específicos	32
VI. METODOLOGÍA	33
6.1. Materiales	33
6.1.1 Químicos	33
6.1.2 Biológicos	34
6.2. Métodos	34
6.2.1 Preparación de las muestras de los frutos de arándano y zarzamora	34
6.2.2 Determinación de fenoles y flavonoides totales de los frutos de arándano y zarzamora	35
6.2.2.1 Cuantificación de fenoles	35
6.2.2.2 Cuantificación de flavonoides	35
6.2.3 Determinación de la capacidad antioxidante de los frutos	36
6.2.3.1 Determinación de la Capacidad Antioxidante de los frutos de arándano y zarzamora por el método de 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS).	36
6.2.3.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante de los frutos de arándano y zarzamora por el método de Feric Reducing Antioxidant Power (FRAP)	36
6.2.4 Evaluación y selección del fruto con mayor potencia para inducir enzimas antioxidantes en ratas Wistar sanas y diabéticas en un estudio agudo (7 días)	37
6.2.4.1 Inducción de diabetes	37
6.2.4.1 Tratamientos	37
6.2.4.2 Determinaciones de peso, glucosa, consumo de alimento y agua	39
6.2.4.3 Sacrificio	39
6.2.4.4 Procesamiento de las muestras (extractos citosólicos)	40
6.2.4.5 Actividades enzimáticas y biomarcadores del estrés oxidativo	40
6.2.4.6 Cuantificación de Proteínas	41
6.2.5 Evaluar el efecto de la administración subcrónica (21 días) del fruto con mayor potencia inductora sobre los niveles de glucosa, enzimas antioxidantes y biomarcadores de estrés oxidativo en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina.	42
6.2.5.1 Tratamientos	42
6.2.5.2 Determinaciones de peso, glucosa, consumo de alimento, agua y procesamiento de las muestras	43

6.2.5.3	Determinación de triglicéridos y colesterolos en suero sanguíneo	44
6.2.5.4	Actividades enzimáticas y biomarcadores del estrés oxidativo	45
6.3	Análisis de Datos	46
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
7.1	Contenido de fenoles y flavonoides totales de los frutos de arándano y zarzamora	48
7.2.	Capacidad antioxidante de las muestras liofilizadas de los frutos de arándano y zarzamora por el método de ABTS	50
7.3.	Capacidad reductora de las muestras liofilizadas de los frutos de arándano y zarzamora por el método de FRAP	53
7.4	Efecto hipoglucemiante de los frutos de arándano y zarzamora en ratas sanas y diabéticas durante una fase experimental aguda (7 días)	54
7.4.1	Primer día de tratamiento	54
7.4.2	Segundo día de tratamiento	55
7.4.3	Tercer día de tratamiento	56
7.5	Ganancia de peso en ratas sanas y diabéticas tratadas con arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)	59
7.6	Consumo de alimento y agua en ratas sanas y diabéticas tratadas con arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)	61
7.7	Concentración de colesterol y triglicéridos de ratas diabéticas tratadas con arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)	65
7.8	Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)	67
7.9	Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y durante una fase experimental aguda (7 días)	69
7.10.	Efecto hipoglucemiante de la zarzamora administrada diariamente en el alimento (400 mg/kg de peso) en ratas sanas y diabéticas durante una fase experimental subcrónica (21 días)	72
7.11	Ganancia de peso en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg/kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	74
7.12	Consumo de alimento y agua en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento (400 mg/kg de peso) durante una fase	75

experimental subcrónica (21 días).

7.13 Análisis de supervivencia de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	78
7.14 Concentración de colesterol y triglicéridos de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	79
7.15 Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	81
7.16 Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	82
7.17 Actividad enzimática de SOD y CAT en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	84
VIII. CONCLUSIONES	89
IX. BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	100

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Grupos experimentales de ratas sanas y diabéticas tratadas con zarzamora y arándano en un estudio agudo (7 días)	38
2. Grupos experimentales de ratas sanas y diabéticas tratadas con zarzamora en un estudio subcrónico (21 días)	43
3. Contenido de fenoles y flavonoides totales de los frutos de arándano y zarzamora.	48
4. $I_{max}$ y $EC_{50}$ de muestras liofilizadas de los frutos de arándano y zarzamora diluidas en agua y metanol	52
5. Número de ratas sanas y diabéticas sobrevivientes en cada semana tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. El arándano ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	26
2. La zarzamora ( <i>Rubis fruticosis</i> )	29
3. Principio indirecto de la determinación de la actividad enzimática de SOD por medio de WST-1	46
4. Porcentaje de inhibición de la oxidación del ABTS con diferentes concentraciones de los liofilizados de arándano y zarzamora diluidos en agua	51
5. Porcentaje de inhibición de ABTS a diferentes concentraciones de los liofilizados de arándano y zarzamora diluidos en metanol	51
6. Capacidad antioxidante en las muestras liofilizadas de los frutos de arándano y zarzamora diluidas en agua y metanol por el método de FRAP	54
7. Cambio en la concentración de glucosa determinada cada hora después de la administración intragástrica de arándano y zarzamora en ratas sanas (a) y diabéticas (b) en el primer día de tratamiento de una fase experimental aguda (7 días)	55
8. Cambio en la concentración de glucosa determinada cada hora después de la administración intragástrica de arándano y zarzamora en ratas sanas (a) y diabéticas (b) en el segundo día de tratamiento de una fase experimental aguda (7 días)	56
9. Cambio en la concentración de glucosa determinada cada hora después de la administración intragástrica de arándano y zarzamora en ratas sanas (a) y diabéticas (b) respectivamente a cada grupo en el tercer día de tratamiento de una fase experimental aguda (7 días)	57
10. Cambio en la concentración de glucosa en ayuno en los días 3 y 5 de los grupos de ratas sanas y diabéticas tratadas con arándano y zarzamora de una fase experimental aguda (7 días)	58
11. Cambio en el peso corporal tomado en los días 1, 3 y 5 durante el periodo experimental agudo (7 días) de ratas sanas (a) y diabéticas (b) administradas con arándano y zarzamora	60
12. Consumo de alimento tomado en los días 2, 4 y 6 durante el periodo experimental agudo (7 días) de ratas sanas (a) y diabéticas (b) administradas con arándano y zarzamora	62
13. Consumo de agua tomado en los días 2, 4 y 6 durante el periodo experimental agudo (7 días) de ratas sanas (a) y diabéticas (b) administradas con arándano y	64

zarzamora

14. Concentración de colesterol sanguíneo de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina tratadas cada tercer día con arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)	66
15. Concentración de triglicéridos en sangre de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina tratadas cada tercer día con arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)	66
16. Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y zarzamora administrados cada tercer día durante una fase experimental aguda (7 días)	68
17. Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y zarzamora administrados cada tercer día durante una fase experimental aguda (7 días)	70
18. Cambio en la concentración de glucosa semanal de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	73
19. Ganancia o pérdida de peso semanal de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	75
20. Consumo de alimento en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento (400 mg/kg de peso) durante una fase experimental subcrónica (21 días)	76
21. Consumo de agua en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento (400 mg/kg de peso) durante una fase experimental subcrónica (21 días)	77
22. Curva de supervivencia semanal de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	79
23. Concentración de colesterol (a) y triglicéridos (b) en suero de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	80
24. Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	82

25. Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con zarzamora a dosis de 400 mg /kg de peso administrada diariamente en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	83
26. Actividad enzimática de SOD en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	85
27. Actividad enzimática de CAT en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)	86

## I. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios señalan que México se encuentra en una etapa de transición epidemiológica, disminuyendo la mortalidad por enfermedades infecciosas y aumentando la mortalidad por enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes mellitus. En México, como en otros países, las muertes de pacientes diabéticos se deben principalmente a las complicaciones que se desarrollan a largo plazo en esta enfermedad.

Un incremento en los niveles de estrés oxidativo puede ser una posible causa del desarrollo y progresión de la diabetes y sus complicaciones. Diversos estudios muestran que la diabetes está usualmente acompañada de un incremento en la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, así como un decremento de los niveles y la eficacia de los sistemas de defensas antioxidantes. Existen diferentes mecanismos por los cuales un aumento en el estrés oxidativo puede estar involucrado en las complicaciones diabéticas. Se cree que la oxidación de niveles elevados de glucosa es la principal fuente de radicales libres y especies reactivas del oxígeno, que a su vez tienen un efecto tóxico directo sobre los tejidos.

Bajo condiciones fisiológicas normales existen dos sistemas de defensa antioxidantes: los enzimáticos y los no enzimáticos, los cuales nos protegen contra los efectos adversos de los radicales libres. Sin embargo, durante el desarrollo de la diabetes se presentan alteraciones en estos sistemas, por ejemplo: alteraciones en las enzimas antioxidantes, desbalance en el metabolismo de glutatión y disminución del ácido ascórbico.

Hasta hace tiempo, el objetivo principal de los tratamientos para diabetes tipo 2 o diabetes mellitus en general era reducir los niveles de glucosa en sangre. Debido a que el estrés oxidativo está involucrado en las complicaciones macro y microvasculares asociadas al desarrollo de esta enfermedad metabólica, en años recientes considerables investigaciones se han enfocado en buscar diferentes tipos de antioxidantes a partir de numerosas plantas y frutos, como una estrategia en el tratamiento de las complicaciones de

la diabetes. A este respecto, la reevaluación de la problemática de los pacientes diabéticos ha encaminado a las investigaciones hacia la medicina alternativa, las prácticas tradicionales y el uso de plantas y frutos medicinales para identificar en ellas tanto propiedades antidiabéticas como actividad antioxidante. Información etnobotánica indica que más de 800 plantas son usadas como remedios tradicionales para el tratamiento de la diabetes, pero sólo muy pocas han sido investigadas científicamente. En México existen un promedio de 150 de estas plantas.

Frutos como el arándano (*Vaccinium myrtillus*) y la zarzamora (*Rubus fruticosus* L.) son ricos en vitamina C, taninos y compuestos fenólicos, compuestos con alta capacidad antioxidante, por lo que pudieran ser una alternativa directa para detener las complicaciones derivadas del estrés oxidativo. Además, pocos estudios científicos se han realizado para evaluar las propiedades de ambas plantas y sus frutos, por lo que es necesario llevar a cabo estudios exhaustivos que demuestren su capacidad hipoglucemiante y antioxidante que justifiquen el uso de ambas en el tratamiento de la diabetes y sus complicaciones.

## II. ANTECEDENTES

### 1 Diabetes mellitus

#### 1.1. Definición

La palabra diabetes proviene del griego diabeinen (“pasar a través”) y mellitus (dulce). La diabetes se define como un desorden metabólico de carbohidratos, proteínas y grasas, caracterizado por la presencia de hiperglucemia debido a la insuficiencia en la secreción o acción de la insulina endógena.

#### 1.2. Clasificación

En 1997, las nuevas recomendaciones para la clasificación y el diagnóstico de la diabetes mellitus establecidas por la Asociación Americana para la Diabetes y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, eliminaron los términos “diabetes mellitus insulino dependiente y no insulino dependiente” por diabetes mellitus tipo 1 y 2, respectivamente (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus, 1997).

##### 1.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células  $\beta$  de los islotes del páncreas productores de insulina. La intensidad de la destrucción de las células  $\beta$  es variable entre individuos. Los casos de diabetes tipo 1 dependen de insulina exógena para evitar la cetoacidosis y la muerte. Aunque se sabe que puede presentarse a cualquier edad, la mayor parte de los diagnósticos se presentan en personas menores de 30 años de edad. Si se desconocen las causas de la diabetes tipo 1, se le denomina diabetes tipo 1 idiopática, pero una causa conocida es la debida a factores inmunitarios que implica una predisposición genética (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus, 1997).

Las personas diagnosticadas con diabetes tipo 1 presentan síntomas como la hiperglucemia, la poliuria (orinar frecuentemente), polifagia (comer frecuentemente por una sensación de hambre), la polidipsia (beber agua por una sensación de sed), una baja de peso, la deshidratación, trastornos electrolíticos y cetoacidosis.

### 1.2.2 Diabetes mellitus tipo 2

La OMS define a la diabetes mellitus tipo 2 como una enfermedad no insulino dependiente, donde la causa no es la falta de insulina sino la poca eficacia de su acción en los tejidos muscular y adiposo. Es el tipo de diabetes con mayor prevalencia, ya que contribuye en un 90 a 95% de todos los casos de diabetes diagnosticados.

Los factores de riesgo para este tipo de diabetes incluyen una edad avanzada, la obesidad, los antecedentes familiares de diabetes o un antecedente de diabetes gestacional, la alteración en la homeostasis de la glucosa, la inactividad física, la raza o etnicidad. Además, la diabetes tipo 2 es una enfermedad cuya propensión a las complicaciones vasculares es muy elevada, sobre todo si coinciden con factores de riesgo como el sobrepeso, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, el sedentarismo y el tabaquismo (OMS, 1980).

La diabetes tipo 2 se caracteriza por resistencia a la insulina y una deficiencia relativa o predominante de esta hormona. Es decir, los niveles de insulina endógena en estos pacientes pueden ser normales, deprimidos o elevados pero son inadecuados para superar la resistencia a la insulina.

Cabe señalar que en los últimos años se ha hecho evidente un notable incremento de diabetes tipo 2 en niños y adolescentes obesos con un estilo de vida sedentario. Además, existe una predisposición familiar importante para desarrollarla (herencia), junto con la combinación de dos defectos:

1. Resistencia a la insulina: Se puede definir como la disminución en la capacidad de la insulina para llevar a cabo sus acciones fisiológicas, por lo general, precede durante varios años a la aparición de diabetes franca. Durante este tiempo la resistencia a la insulina se compensa con un incremento en la secreción de insulina por el páncreas, creando un estado de hiperinsulinemia, es decir, concentraciones de insulina superiores a lo normal que permite mantener cifras normales de glucosa sanguínea. La resistencia a la insulina es una condición heredada favorecida por la obesidad y la vida sedentaria.
2. Disminución en la secreción de insulina por el páncreas (deficiencia parcial): Este es el otro componente para el desarrollo de diabetes tipo 2. La deficiencia de insulina es precedida por un exceso en la secreción pancreática de insulina. El estado de hiperinsulinemia cambia progresivamente a un estado de hipoinsulinemia (insulina plasmática menor a lo normal) por pérdida progresiva en la capacidad del páncreas para producir y secretar insulina. Es entonces que se establece la combinación de resistencia a la insulina y disminución en la secreción de insulina que da lugar a la presencia de diabetes, con cifras de glucosa sanguínea en ayuno mayores a 126 mg/dL o mayores de 200 mg/dL después de una carga oral de glucosa.

Es importante hacer notar que la resistencia a la insulina con hiperinsulinemia compensatoria también se encuentra presente en otras condiciones patológicas como la hipertensión arterial, la obesidad, la dislipidemia (hipertrigliceridemia), LDL-colesterol alto, la hiperuricemia, etc. En conjunto, estas patologías constituyen lo que se denomina "síndrome metabólico" y que se relaciona con un aumento en el riesgo a la aterosclerosis, responsable a su vez de la enfermedad vascular coronaria (infarto), cerebral (embolia) y periférica (piernas y pies).

Otro aspecto que se debe resaltar es que, antes del desarrollo de diabetes franca, hay un período en el que la concentración de glucosa sanguínea no es normal pero tampoco corresponde con el diagnóstico de diabetes. Este estado intermedio se denomina intolerancia a la glucosa en ayuno (glucosa sanguínea mayor a 110 mg/dL pero menor a

126 mg/dL) o intolerancia a la glucosa 2 horas post carga de glucosa (glucemia igual o mayor a 140 mg/dL pero menor a 200 mg/dL) (Salud Pública, 2003). La intolerancia a la glucosa es entonces el paso previo al desarrollo de diabetes. Sin embargo, a partir de este período se inicia el daño vascular que da lugar a las complicaciones tardías de la diabetes, por lo que se hace evidente la importancia de su oportuna identificación y tratamiento.

Los enfermos o pacientes no siempre presentan los síntomas típicos de la diabetes no controlada (polidipsia, poliuria, polifagia y pérdida de peso), y pueden no ser propensos a presentar cetoacidosis, excepto en los momentos de estrés intenso. Aunque los diabéticos tipo 2 no requieren insulina exógena para sobrevivir, cerca del 40% tarde o temprano la requerirán para el control adecuado de la glucemia.

Existen otros tipos específicos de diabetes los cuales están relacionados con síndromes genéticos específicos, cirugía, medicamentos, desnutrición, infecciones y otras enfermedades. Sin embargo, estos casos de diabetes contribuyen del 1 al 2% de todos los casos diagnosticados.

### 1.2.3 Criterios de diagnóstico de la diabetes mellitus

Para la detección de la diabetes mellitus se utilizan tres criterios de diagnóstico:

- Un valor de glucemia plasmática en ayuno confirmado igual o mayor a 126 mg/dL.
- Ante la existencia de síntomas de diabetes, un valor confirmado de glucemia plasmática no en ayuno (casual o al azar) igual o mayor de 200 mg/dL indica diabetes, con los síntomas característicos de la diabetes (poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso inexplicable).
- Prueba de tolerancia a la glucosa oral, que implica administrar 75 g de glucosa y determinar el nivel de glucosa en plasma 2 horas más tarde. Valores confirmados de glucemia iguales o mayores a 200 mg/dL señalan un diagnóstico de la diabetes genética (Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus, 1997).

### *1.3. Prevalencia*

La Federación Internacional de Diabetes (FID, 2006) estimó que en el 2003 existían 194 millones de personas con diabetes en el mundo. Se prevé que esta cifra alcance los 333 millones para el año 2025 como consecuencia de una mayor esperanza de vida, un estilo de vida sedentario y el cambio de patrones alimenticios. Este aumento con toda probabilidad generará un incremento proporcional de las complicaciones diabéticas.

La diabetes presenta uno de los principales problemas de salud pública debido a su alta prevalencia en países industrializados y en países con una transición epidemiológica como lo es México, el cual ocupa el noveno lugar de diabetes en el mundo. La población de México con diabetes fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones, esto es, una prevalencia del 10.75% de los mexicanos de 20 a 69 años presentan algún tipo de diabetes mellitus lo que equivale a una población de más de 5 millones y medio de personas. De este gran total, 2 millones de personas aún no han sido diagnosticadas con algún tipo de diabetes, pero el 90% de las personas diagnosticadas presentan diabetes del tipo 2.

La Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas realizada en 1993 señaló varios datos de interés sobre el comportamiento de esta enfermedad en el país: un tercio de las personas que presentan diabetes desconoce que la padece. Por otra parte, la prevalencia de 10.75 % de los enfermos detectados por medio del estudio de glicemia sanguínea, se incrementó hasta 11.75% con la estimación de la curva de tolerancia a la glucosa. Las cifras más altas de prevalencia en el país se registraron en la región norte, que presentó 12 %, mientras que en la zona metropolitana del Distrito Federal se identificaron las cifras más bajas, con 8.4 % (Guerrero y Rodríguez, 1996).

La perspectiva futura señala que se mantendrá un incremento continuo en el número de pacientes diabéticos. De acuerdo con la información disponible, en el país cada año se presentarán 400 mil nuevos casos (Atlas de la Diabetes. Federación Internacional de Diabetes).

El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) de nuestro país estima que el gasto anual por el tratamiento de la diabetes en el 2003 fue de 317 millones de dólares (más de 3 mil millones de pesos) y para el 2006 este gasto fue de aproximadamente 330 millones de dólares. La mayor parte de los costos asociados a la atención de pacientes diabéticos corresponde a los gastos por hospitalización, que representan entre 30 y 65% del total (Secretaría de Salud, 2006).

Actualmente, la diabetes es la primera causa de muerte de mujeres y la segunda causa en hombres. En nuestro país la tasa de mortalidad por esta causa aumentó desde el 2001 de 20 por cada 100,000 a casi 50 hasta el 2006 y, actualmente, 49,855 personas mueren al año por esta causa. Es decir, cada hora mueren en México cinco personas por diabetes.

Anualmente en el territorio nacional 13 de cada 100 muertes son provocadas por la diabetes. En 2004 murieron 15 mil personas más que en el año 2000 a consecuencia de las complicaciones de la diabetes (como reflejo de los problemas ocasionados por el envejecimiento poblacional y la falta de un diagnóstico oportuno). (Atlas de la Diabetes. Federación Internacional de Diabetes ([www.eatlas.idf.org](http://www.eatlas.idf.org))).

Por tratarse de un padecimiento incurable, los diabéticos deben recibir tratamiento durante toda su vida. Esto determina que una gran parte de ellos, con el transcurso del tiempo, manifieste una baja adherencia al tratamiento, lo que conduce a un deficiente control metabólico de la enfermedad y a la consecuente aparición de complicaciones microvasculares y macrovasculares. Sólo una pequeña fracción de los afectados acude regularmente a los servicios de salud y de éstos entre 25 y 40% tienen un control metabólico de la enfermedad.

Además, en la mayoría de los casos inicia silenciosamente, de tal forma que cuando el paciente presenta síntomas, en muchas ocasiones ya existe cierto grado de daño en algún órgano blanco. La presencia de complicaciones incrementa el costo del tratamiento de los pacientes en más de 3 y media veces (Secretaría de Salud, 2006). Por lo tanto, esta

enfermedad por presentar distintos síntomas, ser crónica e incurable, representa altos índices de morbilidad y mortalidad y un costo muy elevado para los sistemas de salud pública mundial (Pallardo, 1989).

#### *1.4 Complicaciones de la diabetes mellitus*

Las muertes que ocurren cada año en México a causa de la diabetes mellitus están relacionadas principalmente con sus complicaciones, entre las que destacan por su frecuencia, la nefropatía, seguida de los trastornos de la circulación periférica. A pesar que la letalidad por complicaciones agudas ha disminuido con el uso de la insulina y de los hipoglucemiantes orales, los cuales han permitido la sobrevivencia de los enfermos por más tiempo, a la vez se ha observado un incremento de las complicaciones crónicas.

Las complicaciones que se desarrollan a largo plazo están directamente relacionadas con enfermedades macrovasculares y microvasculares. Las enfermedades macrovasculares más comunes son la cardiopatía coronaria, la vasculopatía periférica (enfermedad vascular) y las enfermedades cerebrovasculares; las dislipidemias e hipertensión, las cuales en su conjunto tienden a presentarse a edades más tempranas y son más graves y extensas en los pacientes diabéticos (Baynes y Thorpe, 1991).

Las anomalías en el metabolismo de lípidos son uno de los factores de riesgo que contribuyen a los problemas cardiovasculares de los pacientes diabéticos. El daño vascular aterosclerótico es la complicación más común en los diabéticos. La enfermedad coronaria y la cerebrovascular ocurren en una frecuencia mayor en el diabético que en aquellos no diabéticos. Estudios epidemiológicos destacan de manera especial que la frecuencia de insuficiencia arterial periférica es de 20 a 40 veces superior en los diabéticos comparados con las personas no diabéticas. La frecuencia de los trastornos cardiovasculares en el diabético es más elevado pero también resulta ser más letal, sobre todo si se presenta acompañada de hipertensión arterial y albuminuria (Illnait, 1997).

Las anomalías en la concentración de lípidos y lipoproteínas plasmáticas se

producen en casi el 30% de las personas con diabetes, ya que se ha encontrado una relación entre la deficiencia aguda de insulina y un aumento rápido de la movilización de los ácidos grasos desde los tejidos. El riesgo de enfermedades cardiovasculares es proporcional a la concentración de las lipoproteínas de baja densidad y al colesterol e inversamente proporcional a las lipoproteínas de alta densidad (Kannel y McGee, 1979).

Aunque los triglicéridos suelen estar elevados en las personas con diabetes no insulino-dependiente, no se sabe con exactitud si la hipertrigliceridemia es un estimador de la enfermedad cardiovascular. Tampoco se conoce con exactitud la relación entre la hiperglucemia y la arteriosclerosis. En las personas con diabetes, varias condiciones concomitantes pueden afectar la etiología de la arteriosclerosis: la obesidad, inactividad, hiperinsulinemia, anomalías de la función plaquetaria y defectos en la coagulación de la sangre. Entre las personas con diabetes, el incremento del riesgo hacia las enfermedades cardiovasculares puede ser consecuencia del aumento de los factores de riesgo. La diabetes por si misma ya es un factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular (Kannel y McGee, 1979).

Entre las enfermedades microvasculares relacionadas con la diabetes están aquellas que afectan los vasos sanguíneos pequeños e incluyen retinopatía, neuropatía y neuropatía periférica que suele afectar a los nervios que controlan la sensibilidad de los pies y manos. En los pacientes que acuden a las unidades hospitalarias de la Secretaría de Salud y Asistencia (SSA), las complicaciones identificadas con mayor frecuencia son la descompensación en los niveles de glucosa, en aproximadamente 25 por ciento de los casos, seguida de la necrobiosis (enfermedad degenerativa del tejido dérmico), la insuficiencia renal, la cardiopatía isquémica, la enfermedad vascular cerebral, el coma y los procesos infecciosos (neumonía, infección de vías urinarias). La retinopatía es la complicación identificada con menor frecuencia. Otros motivos de ingreso (causas quirúrgicas, traumatismos y ginecológicos, entre otros) representan cerca del 20 por ciento de los casos.

El estudio de las diversas complicaciones que acompañan a la diabetes ha venido

evaluándose a través de los diferentes modelos ya implementados para la enfermedad.

### *1.5 Modelos animales para el estudio de la diabetes*

Son diversos los métodos que permiten inducir la diabetes mellitus tipo 1, entre los cuales tenemos la manipulación genética, el empleo de agentes infecciosos o sustancias químicas y los procedimientos quirúrgicos.

En cuanto al empleo de sustancias químicas, la estreptozotocina (STZ) es ampliamente utilizada en la inducción de diabetes mellitus tipo 1 o 2 en ratas y ratones, perros, hámsteres, ovejas y monos (Hugues y Rodríguez, 2001). La STZ es un antibiótico de amplio espectro, altamente citotóxico, la cual se administra en ratas de 2 formas: dosis alta y única (50-60 mg/kg p. c.) por la vía intravenosa o intraperitoneal (Szkudelski, 2001), lo que causa la muerte de las células  $\beta$  del páncreas dentro de las 24 h posteriores; o mediante dosis bajas subdiabetogénicas (5 mg/kg de peso, repetidas a los 5-6 días).

La acción de la STZ en las células  $\beta$  está acompañada de las alteraciones en las concentraciones de insulina y glucosa en la sangre. Dos horas después de la inyección, se observa hiperglucemia con una caída en la concentración de insulina en plasma. Alrededor de las seis horas, ocurre una hipoglucemia con un alto nivel de insulina en sangre. Finalmente, la hiperglucemia se desarrolla y el nivel de la insulina disminuye (West y col., 1996).

La diabetes mellitus tipo 2 puede ser fácilmente inducida en ratas por tratamiento intraperitoneal de 90 mg/kg de peso corporal de STZ al segundo día del nacimiento. Esto induce daño a las células  $\beta$ , seguido de una limitada regeneración como resultado de un proceso de mitosis. La desgranulación de las células  $\beta$  (causa al inicio un aumento en los valores de insulina sérica, resultando en una fase de hipoglucemia seguida de hiperglucemia persistente. A las 6-15 semanas de edad se manifiesta la enfermedad, aunque no es igual que en el ser humano, ya que por ejemplo la resistencia a la insulina no es inducida en este modelo (Verspohl, 2002).

Una vez que la STZ ingresa en la célula (por medio del transportador de glucosa GLUT2), ésta está disponible para su descomposición espontánea en isocianato y metildiazohidróxido. El isocianato puede sufrir carbamitación intramolecular o puede carbamitar otros componentes celulares. El metildiazohidróxido puede descomponerse en una forma altamente reactiva que es el ión carbonilo, el cual causa alquilación del ADN (Murata y col., 1999). Así mismo, estudios recientes han sugerido que las especies reactivas del oxígeno, incluyendo el ión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y óxido nítrico, juegan un papel crítico en el mecanismo de daño y citotoxicidad del ADN por STZ (Bolzan y Bianchi, 2002).

De gran interés resulta el hecho de que la diabetes inducida con STZ en ratas puede simular, con ciertas dosis y condiciones adecuadas, la manifestación propia de las anormalidades metabólicas y la historia natural de diabetes en poblaciones humanas (Zhang y col., 1992).

Otras sustancias con capacidad de inducir diabetes crónica son el aloxan, el clorotozin, el vacor y la ciproheptadina, sustancias que también son destructoras, pero con un efecto menor que la STZ, aunque todas son tóxicas (Pettersson y col., 1996; Bieg y Lernmark, 1999; Hsu y col., 2003).

## **2. Papel del estrés oxidativo en la diabetes y sus complicaciones**

### *2.1 Estrés oxidativo*

Varios estudios demuestran que el estrés oxidativo juega un papel muy importante en el desarrollo y progresión de la diabetes y sus diferentes complicaciones. El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de las especies reactivas del oxígeno (EROS) y la capacidad antioxidante de las células.

Las EROS se producen constantemente y principalmente en la mitocondria. Entre 2 a 5 % del oxígeno que entra en la cadena respiratoria es reducido de forma univalente para

producir el radical superóxido. Por otro lado, las sustancias y enzimas que participan en las reacciones de los sistemas de defensa antioxidante pueden ser inactivadas o se deterioran en determinadas situaciones. Por ejemplo, este deterioro puede ser causado por alguna enfermedad crónica o transitoria, lo que provoca un incremento sustancial en la producción de oxidantes y pro-oxidantes con la disminución de la capacidad antioxidante del organismo (Halliwell y Gutteridge, 1989).

Diversos estudios muestran que la diabetes está usualmente acompañada por el incremento de radicales libres (RL) y las EROS (Young y col., 1995; Baynes, 1999) o, así mismo, por un desbalance de las defensas antioxidantes (Maritim y col., 1999).

Un RL se define como cualquier especie con existencia independiente que contiene uno o más electrones sin aparear en el último orbital, de forma que puede reaccionar con cualquier otra molécula por diferentes mecanismos. Por otro lado, las EROS es el término colectivo de moléculas que contienen oxígeno (O) como el átomo central reactivo en forma de radical, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), o algunos derivados del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el ácido hipocloroso ( $HOCl$ ). Estas moléculas son continuamente producidas en el metabolismo normal de un organismo, pero éste se protege activando los sistemas de defensa antioxidante para reparar los dañados producidos por estas especies, así como evitar su acumulación y daño oxidativo a las moléculas importantes.

Los radicales hidroxilo ( $rOH^{\cdot}$ ) son una de las especies conocidas más reactivas, ya que poseen una vida media muy corta del orden de  $10^{-10}$  a  $10^{-11}$  segundos. Los  $OH^{\cdot}$  son agentes muy oxidantes y la reacción de este radical con moléculas orgánicas (proteínas, carbohidratos, lípidos, DNA y RNA) produce a su vez otros radicales libres secundarios.

El  $O_2^{\cdot-}$  es el producto de la reducción del oxígeno molecular. Este proceso fue descrito en 1931 por Haber y Willstater; mientras que en 1934, Haber y Weiss descubrieron que la reducción secuencial trivalente del  $O_2$  (en combinación con un catalizador en presencia de hierro) da lugar a la producción de intermediarios oxigenados muy reactivos.

En el año 1959, McCord y Fridovich aislaron una enzima, la superóxido dismutasa (SOD), que cataliza la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a partir del anión superóxido. Sin embargo, una acumulación de  $H_2O_2$  conduce a un incremento en la producción de radicales  $OH\cdot$  a través de la reacción de Haber-Weiss.

El  $O_2^{\cdot-}$  es mucho menos reactivo que el  $OH\cdot$  por el número de sustancias sensibles que reaccionan con éste. Sin embargo, el  $O_2^{\cdot-}$  también reacciona con el óxido nítrico (NO), un radical libre producido por varios tipos de células (fagocitos y células endoteliales) produciendo peroxinitrito. Se debe señalar que los productos derivados del NO se han sugerido como las especies responsables directas de la destrucción autoinmune de las células pancreáticas (Maritim y col., 1999).

Diversos estudios muestran que el  $H_2O_2$  puede actuar como una señal metabólica bajo ciertas circunstancias, posiblemente por la oxidación específica de los grupos tiol de proteínas que participan en eventos intracelulares. El  $H_2O_2$  cruza membranas celulares fácilmente, causando daño intracelular y posiblemente provocando muerte celular. Además, niveles elevados de  $H_2O_2$  pueden inactivar la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en mamíferos induciendo degradación neuromuscular (Hyslop y col., 1988; Baker y col., 1994).

En general, los niveles excesivos de RLs y EROS causan daño a las proteínas celulares, los lípidos de membrana y los ácidos nucleicos y, eventualmente, producen apoptosis o muerte celular.

Los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo está involucrado en las complicaciones diabéticas como la autooxidación de la glucosa, daño a la membrana celular, peroxidación de lípidos de membrana celular, incluyendo la activación de factores de transcripción, prácticamente ya son conocidos. Por lo tanto, conociendo estos mecanismos se podría intervenir para prevenir o disminuir los factores que principalmente causan estrés oxidativo.

Uno de los mecanismos que se sugieren es la propia oxidación de la glucosa que se cree es la principal fuente de radicales libres. Así, la glucosa es oxidada en presencia de un metal de transición como el hierro en su forma enediol, que a su vez es convertido en cetoaldehído reactivo y  $O_2^-$ , los cuales juegan un papel importante en el estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 1989).

El daño celular que resulta de una producción excesiva de radicales libres de oxígeno puede también ser consecuencia de la alteración de la membrana plasmática a través de la oxidación de los residuos de ácidos grasos de la bicapa lipídica (Tappel, 1973; Aust, 1983), proceso que se ha denominado “peroxidación lipídica”. Se considera que la peroxidación lipídica ocasiona cambios en la composición química y deterioros en la organización ultraestructural de las membranas celulares (Halliwell y Gutteridge, 1989; Gutteridge, y Halliwell, 1990), aumentando la fluidez de las mismas (Rice-Evans y Hochstein, 1981; Ohyashiki y col., 1986; Halliwell y Gutteridge, 1989), alterando con ello su permeabilidad e inactivando receptores y enzimas unidas a la membrana (Fridovich, 1978; Freeman y Crapo, 1982; Bulkley, 1983; Tiskow, 1995).

El proceso de peroxidación puede ser inducido en una gran variedad de sistemas in vivo e in vitro a través de diversos procesos tales como: el metabolismo de agentes químicos reductores (Thomas y Reed, 1988), o durante la alteración de la homeostasis celular normal, como es el caso del daño producido por la isquemia-reperfusión tisular (Ohyashiki y col., 1986), o la ausencia de calcio extracelular (Thomas y Reed, 1988).

Aunque, los residuos de ácidos grasos de la membrana celular son afectados por los radicales libres derivados del oxígeno, el papel o la importancia de la peroxidación lipídica en los procesos que conducen a muerte celular permanece aún sin dilucidarse en su totalidad. Por esta razón, se han propuesto que otros compuestos celulares pueden sufrir ataque por parte de los radicales libres que incluyen, los ácidos nucleicos y las glicoproteínas.

Es interesante y crucial mencionar que el interés actual por el estudio de la acción

de los radicales libres y de la peroxidación lipídica sobre las membranas biológicas y sobre distintas estructuras celulares, se debe a que se ha demostrado que estos procesos juegan un papel prominente en diversas patologías, como por ejemplo: envejecimiento celular, toxicidad del oxígeno, enfermedades neurológicas (enfermedades de Parkinson y Alzheimer), el cáncer, la diabetes mellitus, la aterosclerosis, la colitis ulcerativa, el enfisema pulmonar, las cataratas oculares, entre otras (Fridovich, 1978; Bulkley, 1983; Halliwell, y Gutteridge, 1989; Halliwell y Cross, 1991; Tiskow, 1995).

Se ha demostrado que la simple presencia de hiperglucemia promueve la peroxidación de lípidos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por la acción del  $O_2^-$ , resultando con ello la generación de RLs (Kawamura y col., 1994; Tsaiy col., 1994). Así mismo, estudios previos sugieren que el incremento de la peroxidación lipídica en diabetes experimental constituye una condición en el incremento del estrés oxidativo. Las EROS tienen efectos citotóxicos sobre los fosfolípidos de membrana resultando en la formación de malonildialdehído (MDA). Así, el incremento en el contenido de MDA puede deberse al incremento de los niveles de las EROS. La peroxidación de la membrana incrementa su fluidez y permeabilidad con pérdida en la integridad de la misma (Freeman y Crapo, 1982).

Otro recurso importante en la generación de radicales libres en la diabetes es la interacción de la glucosa con proteínas para formar los compuestos de Amadori, produciendo así productos de glicosilación avanzada (AGES). Estos AGES, vía receptores de AGES (RAGES), inactivan enzimas alterando su función y estructura (McCarthy y col., 2001), promoviendo a su vez la producción de RL y EROS (Baynes, 1995; 1999).

Considerable evidencia existe acerca del papel que juega la activación del sorbitol a través de la glucosa como un componente importante en la patogénesis de las complicaciones diabéticas, por ejemplo en la formación de cataratas y neuropatía periférica. Para la formación de las cataratas se sugiere que a través de la vía de los polioles, la glucosa es reducida por la enzima aldosa reductasa para formar sorbitol. Debido a que la aldosa reductasa requiere como cofactor NADPH, éste se ve disminuido continuamente por el incremento de la vía de los polioles, lo que a su vez provoca un cambio osmolar

lenticular. En general, el estrés oxidativo disminuye los niveles de glutatión y de NADPH. Alternativamente, lo anterior aumenta la actividad de la enzima sorbitol deshidrogenasa que está asociada a los niveles alterados de NADPH, lo cual resulta en una modificación proteica por glucosilación no enzimática (Yano y col., 1987; Ramalho y col., 1996).

## *2.2. Sistemas de defensa antioxidante*

Debido a que la hiperglucemia genera tanto RLs como EROS, el organismo hace uso de los sistemas de defensa antioxidante de varias maneras durante la diabetes. Los mecanismos antioxidantes involucran estrategias enzimáticas y no enzimáticas. Los antioxidantes no enzimáticos más comunes incluyen a las vitaminas A, C, E, el glutatión reducido (GSH) y otros como el ácido  $\alpha$  lipoico, los carotenoides, la coenzima Q10, varios flavonoides, algunos minerales antioxidantes (cobre, zinc manganeso y selenio) y cofactores (ácido fólico, vitaminas B1, B6, B3 y B12). Estos antioxidantes trabajan sinérgica y coordinadamente contra cada uno de los diferentes tipos de radicales producidos. Así, la vitamina E suprime la propagación de la peroxidación de lípidos, mientras que la vitamina E con la vitamina C inhiben la formación extracelular de  $H_2O_2$  (Halliwell, 1996).

Los sistemas enzimáticos involucrados en la defensa del organismo contra los RLs y las EROS involucran a la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la glutatión S-transferasa (GST), entre otras enzimas y proteínas antioxidantes.

La enzima superóxido dismutasa (SOD) se encarga de la reacción de dismutación del radical  $O_2^{\cdot-}$  intra celular. La enzima pertenece a la familia de las metaloenzimas y cataliza la conversión de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  (Halliwell y col., 1992). La presencia de varias formas activas de la SOD en diferentes compartimentos celulares, resalta su papel antioxidante. La MnSOD se localiza en la matriz mitocondrial, mientras que la Cu-ZnSOD se localiza en el citoplasma (McCord y Fridovich, 1959). Además, esta enzima está presente en todos los organismos animales y vegetales que viven bajo condiciones aeróbicas.

La CAT y GPx conforman el principal sistema enzimático de remoción de moléculas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (McCord y Fridovich, 1959). La CAT se localiza a nivel de peroxisomas, mientras que la GPx a nivel citosólico y mitocondrial. El mayor riesgo de la presencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la producción del altamente reactivo e inestable radical OH·. A bajas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, éste puede ser removido por la GPx en presencia de glutatión reducido (GSH), el cual es oxidado a glutatión oxidado (GSSG):  $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$  (Halliwell y Gutteridge, 1986). A altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la CAT se vuelve primordial en su remoción:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$  (Halliwell y col., 1988).

Simultáneamente a lo anterior existe la enzima glutatión reductasa (GR), que es una flavoenzima dependiente del nicotinamida adenín dinucleótido de fosfato reducido (NADPH). La enzima cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG):  $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$ , para regenerar el GSH, el cual será utilizado por la GPx para la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de lipoperóxidos (L-OOH). Por lo tanto, la GR tiene una función de pivoteo en el estrés oxidativo. La enzima se encuentra en todos los organismos aeróbicos, así como en algunas plantas superiores, por lo que aparenta ser una enzima casi universal (Viña y col., 1986).

La GR permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C y E, luego de participar en la eliminación de radicales libres generados. El GSH interviene, además, en la destoxicación de compuestos xenobióticos, el almacenamiento y transporte de cisteína, la regulación del balance redox de la célula, el metabolismo de los leucotrienos y las prostaglandinas, la función inmunológica, la síntesis de los desoxirribonucleótidos y la proliferación celular. Por tanto, la alteración de la actividad de la GR provocará una disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de EROS. Esta misma alteración se ha reportado en varios procesos patológicos y es asociada con un aumento del riesgo al estrés oxidativo (Spector, 1985), como la diabetes mellitus donde la unión no enzimática de azúcares a proteínas (glucosilación) es un fenómeno biológico común.

En la diabetes mellitus, la GR es susceptible a ser glicosilada y desarrollar una actividad alterada, ya que tanto la glucosa, como la glucosa 6-fosfato y la fructosa provocan una inhibición dependiente del tiempo de la actividad de la enzima; lo que favorece la formación de cataratas en pacientes diabéticos. La enzima puede ser protegida de la glicosilación por algunos medicamentos como la aspirina, que pueden ser usados para prevenir las cataratas en el paciente diabético (Spector, 1985).

### **3. Tratamientos empleados en el manejo de la diabetes**

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica que se puede controlar de manera satisfactoria haciendo cambios radicales en el estilo de vida. El tratamiento para la diabetes comprende desde la terapia nutricional médica, los medicamentos, los ejercicios, la vigilancia de la glucemia y un control constante del propio paciente para evitar las complicaciones. Es importante enfatizar que en México, como en otros países, las muertes de pacientes diabéticos se deben principalmente a las complicaciones que se desarrollan a largo plazo durante esta enfermedad.

#### *3.1 Hipoglucemiantes orales*

Varios tipos de medicamentos pueden ayudar a personas con diabetes mellitus tipo 2 a disminuir su glucosa en sangre. Cada tipo de medicamento disminuye los niveles de azúcar en sangre de manera diferente. Los medicamentos para el tratamiento de la diabetes pertenecen a alguno de estos grupos:

- Sulfonilureas. Estimulan al páncreas a producir más insulina.
- Biguanidas. Disminuyen la cantidad de azúcar producida por el hígado.
- Inhibidores de la alfa-glucosidasa. Retardan la absorción de glucosa proveniente de almidón de la dieta.
- Tiazolidinedionas. Producen una mayor sensibilidad a la insulina.
- Meglitinidas. Estimulan al páncreas para producir más insulina.
- Insulina

Los medicamentos hoy disponibles para el tratamiento de la diabetes, en particular las sulfonilureas, la metformiona o las glitazonas no son capaces de restablecer la normalidad de la homeostasis de la glucosa y, aunque compensan parcialmente las alteraciones metabólicas de la diabetes, no corrigen las lesiones bioquímicas subyacentes. Incluso el tratamiento insulínico no restaura completamente la homeostasis de la glucosa en los pacientes con diabetes tipo 1, sin contar que las sobredosis de insulina pueden incrementar el riesgo de aterogénesis y de episodios de hipoglucemia ([www.elmedicointeractivo.com/formacion\\_acre2004/tema2/insulinas](http://www.elmedicointeractivo.com/formacion_acre2004/tema2/insulinas)). Aunque es difícil que se encuentre entre las plantas un sustituto activo por vía oral de la insulina, si es posible que se encuentren moléculas que estimulen la biosíntesis y la secreción de la insulina endógena.

### 3.1.1 Sulfonilureas

Las sulfonilureas como la clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, la glimepirida, la glipizida, la gliquidona, la glisentida y la tolbutamida, son agentes que estimulan la secreción de la insulina al actuar sobre receptores pancreáticos. Son los fármacos de elección para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

El mecanismo de acción de las sulfonilureas se inicia a partir de la unión a un receptor específico, provocando el bloqueo de los canales de salida del potasio dependientes de ATP. Esto provoca una disminución en el flujo de potasio y despolarización de la membrana celular, lo que incrementa el flujo de calcio al interior de la célula, activando con ello el sistema celular que causa el desplazamiento de los gránulos secretores a la superficie celular, con expulsión de insulina a través de exocitosis (Ruíz y col., 2002).

### 3.1.2 Insulina

El tratamiento con insulina es obligado para los pacientes con diabetes tipo 1. Debido a que la diabetes tipo 2 es claramente una enfermedad progresiva con una constante

disminución en la secreción de insulina, ésta sólo se le administra al paciente diabético tipo 2 cuando ni la dieta ni los hipoglucemiantes orales son capaces de controlar el nivel de la glucosa. La insulina es, así mismo, el tratamiento de elección para la diabetes gestacional, ya que ésta no atraviesa la barrera placentaria (Bolli y col., 1999).

La insulina es degradada por vía oral, lo que obliga a que su uso se haga por inyección. Por lo general, se usa por vía subcutánea o intramuscular, siendo la subcutánea la vía más usada. La vida media de la insulina en plasma es corta (alrededor de 20 minutos) y es posteriormente destruida por la insulinasa del hígado y del riñón, aunque puede extenderse por formación de complejos de protamina. Existen diferentes preparados comerciales cuya acción va desde una respuesta rápida hasta una respuesta ultralenta y que permiten realizar las combinaciones de modo que se ajusten a las características del paciente. Estos preparados se diferencian en las sustancias añadidas con objeto de modificar sus características farmacocinéticas (inicio de la acción, tiempo de vida media y máxima concentración plasmática).

Existe evidencia de que el uso de medicamentos puede causar efectos secundarios. Por ejemplo con el uso de la insulina, la hipoglucemia es el efecto adverso más frecuente con este tratamiento; para las sulfonilureas incluyen: una reacción de baja del azúcar (hipoglucemia), malestar estomacal, erupción cutánea o picazón, aumento de peso, etc. Por lo tanto, el uso de terapias alternativas con bajos o nulos efectos secundarios, resulta altamente atractivo para el tratamiento de la diabetes. A este respecto, diversos estudios indican la ausencia de efectos secundarios con el uso de plantas medicinales ([www.puente-e.com/Med/medicamentos/Fitoterapia.html](http://www.puente-e.com/Med/medicamentos/Fitoterapia.html)).

### *3.2 Plantas medicinales y comestibles empleadas tradicionalmente como antidiabéticas y antioxidantes*

La identificación de agentes hipoglucemiantes a partir de plantas vegetales ha recibido considerable atención en los países que presentan un alta prevalencia de diabetes mellitus. Desde la antigüedad, los primeros testimonios que se conocen sobre el tratamiento

de la diabetes se refieren al uso de las plantas. Por ejemplo, el papiro de Ebers (1550 A.C.) recomendaba el uso de una dieta rica en fibra y ocre.

Otras civilizaciones han utilizado numerosas plantas para el tratamiento de la diabetes. La mayor parte de estos remedios han desaparecido en los países occidentales desde la llegada de la insulina, pero en los países en desarrollo siguen constituyendo la base fundamental del tratamiento de la diabetes.

En años recientes se ha observado un nuevo interés hacia las plantas medicinales como dignas de ser investigadas. Varias de las medicinas tradicionales de pueblos primitivos contienen principios activos susceptibles de ser aislados y posteriormente modificados químicamente para incrementar su efectividad.

Más de 800 plantas y extractos de plantas se han descrito como beneficiosos para el paciente diabético a nivel mundial. En promedio, 150 de estas plantas existen en México. Aunque en la mayor parte de los casos los efectos hipoglucemiantes son anecdóticos, en otros muchos casos no se ha investigado científicamente el potencial terapéutico de las mismas, mientras que existen algunos casos en los que si se ha comprobado un efecto real. Además, diversos estudios sugieren que el tratamiento con diferentes plantas medicinales y hierbas reduce las complicaciones causadas por la diabetes (Alarcón y col., 1998).

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes (Van Acquire y col., 1996; Bohm y col., 1998; Groot, 1998), antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas (Russo y col., 2000), antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas (Hirono, 1987) e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, la cinasa de la proteína C, cinasa de tirosina C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II (Formica y Regelson, 1995).

Los fenoles son fitoquímicos que protegen a las plantas del daño oxidativo e incluyen la subclase de los flavonoides. Comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la

cocoa, la cerveza y el vino rojo. Más de 800 flavonoides se han identificado entre los pigmentos de plantas y flores azules, azul rojizo y violeta. Estas sustancias depuran compuestos de radicales libres, como el anión de superóxido y el oxígeno solo.

Entre las propiedades biológicas de los flavonoides destaca su capacidad antioxidante (actividad, eficiencia, poder, potencia o potencial) que es un parámetro para caracterizar diferentes componentes químicos, los cuáles inhiben reacciones de oxidación. Esta capacidad antioxidante ha sido objeto de un sinnúmero de estudios principalmente de corte clínico y nutricional. Usualmente un antioxidante es efectivo porque es capaz de ser oxidado más fácilmente que la sustancia protegida. El término se aplica frecuentemente a componentes que pueden atrapar radicales libres, por medio del rompimiento de la reacción en cadena, ya que normalmente dichas reacciones originan daños a componentes biológicos (Halliwell y col., 1995).

Teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacológicas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados a nivel mundial, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E más vitamina C y  $\beta$ -caroteno), no producen los efectos esperados o éstos resultan dañinos, se recomienda incluir en la dieta una mezcla de flavonoides y taninos para lograr una mejor acción antioxidante (Hassing y col., 1999).

Existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de RLs (Bravo, 1998). Otros autores se refieren además a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (COX), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (Ferrandiz y Alcaraz, 1991), evitando la generación de las EROS *in vivo*, así como de hidroperóxidos orgánicos.

Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (Lindahl y Tagesson, 1997), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la CAT y la SOD (Sudes y col., 1999). De esta forma los flavonoides interfieren en

las reacciones de propagación de RLs y en la formación del radical en sí (Van Acquire y col., 1996).

Numerosas investigaciones han evaluado la actividad antioxidante de los flavonoides frente a los RLs generados durante la peroxidación lipídica, ya sea enzimática o no enzimática. La mayoría de los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' en el anillo B muestran mayor actividad antioxidante y, que este efecto, es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH libre en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4 (Ratty y Das, 1988).

Diversos estudios muestran que los flavonoides secuestran  $O_2^{\cdot-}$  y  $OH^{\cdot}$ . Morazzoni y Malandrino (1988) demostraron que la rutina, seguida de la quercetina, se comportó como el secuestrador más fuerte de  $O_2^{\cdot-}$ , generado enzimáticamente a través del sistema xantina/XO y no enzimáticamente a través del sistema NADH-metosulfato de fenacina. Los valores de la concentración efectiva  $CE_{50}$  de ambos flavonoides en homogenados de hígado de ratón oscilaron en el orden de  $10^{-6}$  M. En este mismo contexto, una investigación con 15 flavonoides dio a conocer que las constantes de reacción de estos con el  $O_2^{\cdot-}$  se encuentran en el intervalo de  $10^5$ - $10^7$   $M^{-1}s^{-1}$  (Morazzoni y Malandrino, 1988).

Los flavonoides inhiben los efectos degradativos provocados por el  $H_2O_2$ . Numerosas evidencias apuntan hacia la protección del ADN ejercida por los flavonoides al inhibir los efectos oxidativos que provocan las EROS sobre esta biomolécula. A través de un ensayo de electroforesis en gel con células individuales, se observó que el pretratamiento con flavonoides a concentraciones estandarizadas (7.6, 23.2, 93 y 279.4 mM) redujo el daño oxidativo al ADN generado por  $H_2O_2$  (100 mM) en linfocitos humanos (Noroozi y col., 1988).

La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus actividades antioxidantes. Existen evidencias de que la quercetina y la rutina inhiben la NADPH del sistema de la citocromo

P-450 en microsomas hepáticos. Este efecto pudiera impedir el metabolismo de una gran diversidad de xenobióticos (sustancias extrañas al organismo) que emplean esta vía para generar RLs.

Además de secuestrar RL, quelar iones metálicos e inhibir oxidasas, los flavonoides pueden aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes. Al mismo tiempo que son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de EROS (Van Acquire, 1996).

Las frutillas en general poseen propiedades nutracéuticas, ya que contienen antocianidinas, taninos, entre muchos otros compuestos fenólicos encargados de proporcionar su capacidad antioxidante (Howard y col., 2003).

Debido al papel preponderante que juega el estrés oxidativo para el desarrollo de la diabetes y sus complicaciones, plantas medicinales o comestibles como el arándano y la zarzamora con alto contenido en compuestos antioxidantes, tales como los fenoles y flavonoides, se perfilan como una fuente potencial para el tratamiento de la enfermedad.

### 3.2.1 El arándano (*Vaccinium myrtillus*)

El arándano (*Vaccinium myrtillus*) es una pequeña planta, con ramas rastreras de las que nacen tallos angulosos verdes muy ramificados y cubiertos de hojas alternas, ovales y caducas. Las flores nacen aisladas y tienen forma de vesícula, entre verdosas y rosáceas. Los frutos son bayas azules. El arándano se cultiva formando extensas colonias en los bosques y brezales de tierras sin cal, sobre todo en las montañas. La planta florece en primavera, madurando sus frutos bien entrado el verano. Los frutos (de sabor agridulce y muy ricos en vitamina C) se pueden comer recién recolectados (Figura 1).

De interés médico son sus hojas y frutos: las hojas deben recogerse cuando la planta alcanza su máximo desarrollo; los frutos se recolectan un poco más tarde, cuando ya han adquirido el color azulado, casi negro, señal de que ya están maduros. En la medicina

tradicional, el fruto se ha empleado contra múltiples dolencias, aunque en la mayoría de los casos sin fundamento.



Figura 1. El arándano (*Vaccinium myrtillus*)

En cuanto a sus propiedades, tradicionalmente el arándano se ha empleado como una planta muy astringente, además tiene virtudes como antidiabético (Frohne y Heidelbeerblätter, 1990), aunque esta última propiedad todavía se discute. Los frutos también poseen acción antiinflamatoria, antihemorrágica y acción vitamina P, esto es, mejoran la microcirculación, aumentan la resistencia y controlan la permeabilidad capilar. Se sabe que los frutos contribuyen a la regeneración del sistema vascular de la retina, aumentando la agudeza visual.

Varios estudios han demostrado que el fruto del arándano tiene la capacidad de proteger y fortalecer las paredes de los pequeños vasos sanguíneos conocidos como capilares. Esto lo hace útil en el tratamiento y la prevención de venas varicosas, flebitis y hemorroides, al igual que en la prevención de problemas de la visión causados por la ruptura de pequeños vasos sanguíneos en los ojos ([www.infoagro.com](http://www.infoagro.com))

Como dato histórico, durante la segunda guerra mundial algunos pilotos de la fuerza aérea británica que tenían que volar en misiones nocturnas notaron que cuando consumían una jalea hecha a base de arándano su visión mejoraba. Posteriormente, se han comprobado

éste y otros efectos del arándano sobre la visión.

Un aspecto que ha recibido gran atención en años recientes es la prevención de la pérdida de la visión a causa de la degeneración de la retina que se produce con gran frecuencia en personas de edades avanzadas. En otros estudios se ha encontrado que la combinación de arándano con vitamina E es muy eficaz para prevenir y frenar el avance de las cataratas, de aquí su importancia en el potencial uso como tratamiento de las complicaciones microvasculares como las cataratas en la diabetes.

El arándano contiene además unas sustancias conocidas como antocianidinas que ayudan a fortalecer el colágeno, el cual es una proteína que es parte importante de los ligamentos, tendones y el cartílago. Las antocianidinas también combaten los estados inflamatorios y tienen importantes propiedades antioxidantes. Estas propiedades hacen al arándano útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las articulaciones y de las encías ([www.juver.com/nutricion/frutas/arandano.htm](http://www.juver.com/nutricion/frutas/arandano.htm)).

En base a su contenido de fenoles totales, la USDA Human Nutrition Research Center recomienda el consumo de 100 gramos de arándanos frescos, ya que esta cantidad se ha encontrado como buena fuente de compuestos antioxidantes. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se ve determinada por su estructura química, por lo que existen diferencias importantes en la efectividad antioxidante entre los distintos grupos de compuestos (Rice y col., 1997). Por lo que esa es una buena razón para incluirlos en una dieta variada.

Las hojas del arándano contienen sustancias que reducen el contenido de glucosa en sangre, por lo que productos derivados de éstas son usadas por personas diabéticas para reducir su necesidad de medicamentos orales o de insulina. Sin embargo, algunos naturópatas, herbólogos e investigadores señalan que este efecto de las hojas de arándano sólo se consigue interfiriendo con un proceso normal del hígado, por lo que no es recomendable su uso durante tiempo prolongado. El consumo del fruto del arándano, por el contrario, sí es recomendable por su efecto protector sobre los capilares que es de

inestimable ayuda para prevenir muchas de las complicaciones de la diabetes ([www.saludparati.com/arandano.htm](http://www.saludparati.com/arandano.htm)).

Así mismo, Cignarella y colaboradores (1996) concluyeron que el fruto de arándano controla parcialmente el metabolismo de la glucosa, aunque éste no fue significativo. Sin embargo, sí se observó una reducción significativa de los niveles de triglicéridos, con lo que pudiera mejorar las complicaciones relacionadas con el metabolismo de lípidos.

Por otro lado, las hojas se emplean para curar diarreas y diabetes. Externamente, las hojas se pueden aplicar en micosis superficiales (infecciones por hongos), eczemas y estomatitis. La infusión a partir de las hojas se prepara añadiendo una cucharada pequeña de hojas en trozos a una taza de agua hirviendo, la cual se puede tomar 3 ó 4 tazas al día. En cocción se emplean las mismas concentraciones que la infusión, pero dejando hervir el agua con las hojas durante 5 minutos. Con los frutos se puede preparar igualmente infusión y decocción y si se quiere se puede añadir azúcar. En algunos países de Europa Central se añade una cantidad de azúcar suficiente para que se produzca una lenta fermentación; de esta manera se prepara el vino de arándanos (Allen, 1927).

### 3.2.2 La zarzamora (*Rubis fruticosis*)

La zarzamora (Castellano: Zarza, mora; *Rubis fruticosis*) pertenece a la familia de las rosáceas. La zarza es considerada una planta invasora de los terrenos y molesta por las espinas punzantes que tanto incordian a la hora de recoger sus frutos (las moras). Es un arbusto con tallos sarmentosos, arqueados en las puntas, de cuatro a cinco metros de largo y con agujijones fuertes y ganchosos. Las hojas están divididas en cinco hojuelas elípticas; las flores son blancas o rosáceas en racimos terminales, cuyo fruto es la zarzamora. El fruto maduro es una baya compuesta de granillos negros y lustrosos, los cuales maduran en verano (agosto- septiembre) (Figura 2).



Figura 2. La zarzamora (*Rubis fruticosis*)

El valor nutritivo de la zarzamora se basa en un contenido de fibra superior al de otras frutas, además de contener antocianinas, pectinas, taninos e inositol. Los frutos son ricos en potasio y, en menor proporción, también aportan otros minerales como magnesio, cobre, fósforo, hierro, calcio y sodio. Además, la zarzamora destaca por su aporte de vitaminas C y A, aunque también contiene otras vitaminas en menor cantidad, entre las que se encuentran B1, B2 y B3 ([www.karlosnet.com/Varios/nuevanoticia.php?c=](http://www.karlosnet.com/Varios/nuevanoticia.php?c=)).

Los ácidos orgánicos presentes en el fruto son cítricos, lácticos, succínicos, oxálicos y salicílicos. Los salicilatos son compuestos naturales que también pueden obtenerse por síntesis y, debido a que se incluyen en la formulación de la aspirina, no se recomienda el consumo de esta fruta a las personas sensibles a dicho fármaco. La presencia de elevadas cantidades de potasio en su composición ayuda a mantener el equilibrio hidrosalino del organismo. Esto le confiere a la zarzamora propiedades diuréticas, favoreciendo la eliminación de agua y sales a través de los riñones.

Entre las propiedades que se le han atribuido a la zarzamora se incluyen: astringente, fortificante de las encías, antiescorbútico, antidiabético, emoliente, y antiulceroso.

Las hojas de la zarzamora son usadas para el tratamiento de la diabetes mellitus. La infusión se prepara hirviendo 20 g de hojas en un litro de agua durante unos 15 minutos y se recomienda tomar 2 tazas al día fuera de las comidas. Estudios realizados en ratones

diabéticos inducidos con estreptozotocina muestran una actividad antihiper glucémica después de la administración de la infusión de las hojas de esta planta (Swatson y col., 1990).

Aunque no se han realizado estudios con el fruto de la zarzamora para el tratamiento de la diabetes en modelos animales, su elevado contenido en antocianinas y taninos sugiere su alto potencial antioxidante para disminuir las complicaciones de la diabetes debidas al estrés oxidativo.

### III. JUSTIFICACIÓN

Diversas clases de agentes protectores contra el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas se han identificado, aislado y evaluado a partir de las plantas comestibles, hierbas y plantas medicinales. Entre los compuestos aislados se encuentran los polifenoles, bifenoles, 1,2-diol-3-iones, isocianatos como el sulfurofano, isoflavonas, flavonoides, cinamatos, cumarinas, tiocarbamatos y lactonas, entre otros (Talalay y col., 1988). A este respecto, existe suficiente evidencia que muestra que el consumo de estos componentes presentes en los vegetales induce la actividad de enzimas y proteínas antioxidantes en los diferentes tejidos de los animales de laboratorio, contribuyendo con ello a elevar los sistemas de defensa antioxidante del organismo (Benson y col., 1978; Ansher y col., 1986). Igualmente, el tratamiento de animales de experimentación con extractos de plantas o con algunos de sus componentes ha revelado un efecto hipoglucemiante contra la diabetes inducida químicamente en roedores (Zhang y col., 1992).

Cabe mencionar que aún existe una falta de información de carácter científico, lo que provoca cierta inseguridad en cuanto al empleo de estas plantas como una forma de terapia en el tratamiento de la diabetes. Por lo tanto, el tamizaje de plantas o frutos comestibles como una fuente potencial de compuestos hipoglucemiantes y con capacidad para inducir enzimas antioxidantes resulta altamente atractivo. Lo anterior, aunado a la disminución de los efectos secundarios y los bajos costos, justifica el estudio de plantas y frutos comestibles. Las investigaciones clínicas encaminadas hacia este campo han ido en aumento. Por lo que, ante la necesidad de conocer la relación entre el estado oxidativo y las complicaciones crónicas asociadas a la diabetes mellitus, es necesario desarrollar investigaciones con aplicaciones terapéuticas antioxidantes, con el propósito de evitar o postergar la aparición y/o progresión de la enfermedad.

## IV. HIPÓTESIS

Los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) poseen un efecto modulador sobre biomarcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas inducidas con estreptozotocina

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto modulador de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) sobre biomarcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas inducidas con estreptozotocina

### 5.2 Objetivos Específicos

- Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales en las muestras liofilizadas de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*).
- Determinar la capacidad antioxidante in vitro de las muestras liofilizadas de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*).
- Evaluar el efecto de la administración aguda (7 días) de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) sobre los niveles de glucosa, enzimas antioxidantes (GST) y biomarcadores de estrés oxidativo (GSH) en ratas Wistar sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina.
- Evaluar el efecto de la administración subcrónica (21 días) del fruto con mayor potencia inductora sobre los niveles de glucosa, enzimas antioxidantes (GST, SOD y CAT) y biomarcadores de estrés oxidativo (GSH) en ratas Wistar sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1. Materiales

#### 6.1.1 Químicos:

Los reactivos utilizados para determinar la capacidad antioxidante fueron: (+)-catequina, ácido gálico, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) 97%, 2,2'-azinobi-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) y persulfato de potasio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI).

La estreptozotocina (STZ) utilizada para la inducción de diabetes, y el sulfurofano [1-isocianato-(4*R*)-(sulfonilo demetano) butano], se adquirieron de la marca Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI).

Para la determinación de la concentración de proteínas se utilizó el método del ácido bicinónico (BCA), cuyos reactivos fueron de la marca Pierce (Pierce, Rockford, IL).

Los reactivos para las determinaciones enzimáticas tales como clorodinitrobenzenu (CDNB), glutatión reducido (GSH) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fueron adquiridos de la marca Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MI).

Los reactivos para la preparación de soluciones amortiguadoras, soluciones de extracción de proteínas y demás reactivos fueron de la marca Baker (J.T.Baker, Edo. de México).

Para la determinación de los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre periférica se utilizó un glucómetro marca Accutrend GCT, usando las tiras reactivas correspondientes a cada determinación de la misma marca.

Los kits para la determinación de triglicéridos y colesterol en sangre obtenida por punción cardiaca fueron de la marca Randox Laboratories. El kit para la determinación de la actividad enzimática de SOD fue de la marca de Fluka.

### 6.1.2 Biológicos

#### *Plantas:*

Las muestras de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y la zarzamora (*Rubis fruticosis*) fueron obtenidas de lotes completos comprados en un centro comercial en el mes de agosto del 2005.

#### *Animales:*

Para los estudios tanto en condiciones de normoglicemia como para los estudios con animales diabéticos, se usaron ratas macho Wistar de 200-250 g. Los animales fueron obtenidos del bioterio Rismart de México, se aclimataron por una semana en cajas metálicas y se alimentaron *ad libitum*. Durante el período experimental, los animales se mantuvieron en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad y bebieron agua *ad libitum*.

## **6.2. Métodos**

### 6.2.1 Preparación de las muestras de los frutos de arándano y zarzamora

El material fue hecho puré, congelado y liofilizado. Posteriormente ya pulverizado fue almacenado en un lugar seco y oscuro hasta su uso. Las muestras fueron resuspendidas en agua para su administración.

## 6.2.2 Determinación de fenoles y flavonoides totales de los frutos de arándano y zarzamora

### 6.2.2.1 Cuantificación de fenoles

Para la determinación de fenoles totales se empleó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Dewanto y col. (2002) (Anexo 1). Para este ensayo, las muestras liofilizadas se hicieron reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, carbonato de sodio al 20% y sus absorbancias fueron medidas en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 760 nm. Para obtener el contenido de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico se interpoló la absorbancia de las muestras a una curva de calibración de solución estándar de ácido gálico, realizada previamente. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra liofilizada.

### 6.2.2.2 Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides totales se realizó por el método descrito por Liu y col. (2002), modificado a técnica en microplaca (Anexo 2). La muestra se llevó a diferentes concentraciones, a través de diluciones seriadas, las cuales se hicieron reaccionar con nitrito de sodio al 5%, cloruro de aluminio al 10% y, finalmente, con hidróxido de sodio 1M. La absorbancia fue medida inmediatamente después de agregar el último reactivo en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA) a una longitud de onda de 510 nm y fueron comparadas con una curva estándar de (+)-catequina. Los resultados obtenidos fueron expresados en mg equivalentes de (+)-catequina por gramo de muestra liofilizada.

### 6.2.3 Determinación de la Capacidad Antioxidante

#### 6.2.3.1 Determinación de la Capacidad Antioxidante de los frutos de arándano y zarzamora por el método de ABTS

La capacidad antioxidante de los frutos de arándano y zarzamora fueron realizados mediante la técnica de ABTS (Soong, 2004) (Anexo 3). Esta técnica es un ensayo de decoloración aplicable tanto a antioxidantes lipofílicos como hidrofílicos (Re y col., 1999). Al oxidarse el ABTS, éste cambia su color a un azul-verde. Brevemente, se preparó un día antes el reactivo ABTS 5 mM poniéndolo a reaccionar con persulfato de potasio 140 mM a 25° C por 16 horas antes de usar. Para el ensayo, se ajustó la solución de ABTS con etanol hasta obtener una absorbancia de alrededor de 0.7 a una longitud de onda de 734 nm. Las muestras se prepararon pesando 0.05, 0.5, 1, 3, 5, 6, 10 y 12 mg/ mL de metanol o agua, respectivamente, posteriormente fueron centrifugadas a 10,000 g por 10 minutos. Se tomaron 20 µL del sobrenadante de la muestra y se colocó en microplaca junto con 230 µL del ABTS ajustado. Se usaron 2 blancos uno con agua y otro con metanol, teniendo un control con etanol y se procedió a leer a una longitud de onda de 734 nm. Para determinar la capacidad antioxidante de los frutos se determinó el % de inhibición y con este dato y el logaritmo de la concentración determinándose la concentración efectiva (CE<sub>50</sub>) de las muestras expresándose como µg/mL ó mg/mL de liofilizado.

#### 6.2.3.2 Determinación de la Capacidad Antioxidante de los frutos de arándano y zarzamora por el método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) modificado para microplaca.

El método de FRAP se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Omidreza (2005). Para ello, se preparó al momento de la determinación una solución FRAP (10 mL de amortiguador de acetatos 300 mM, 1 mL de la solución de cloruro férrico hexahidratado 20 mM y 1 mL de la solución de 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triacina (TPTZ) 10 mM. Las muestras se disolvieron a una concentración de 5 mg de muestra liofilizada por 1 mL de agua y metanol, respectivamente, posteriormente se centrifugaron a 10,000 g por 10 minutos. Se tomaron 25 µL del sobrenadante de la muestra y se añadió a microplaca junto

con 175  $\mu\text{L}$  de la solución FRAP, teniendo 2 blancos uno con metanol y otro con agua. Se realizó una curva estándar con el  $\text{FeSO}_4$  empleando concentraciones de 100, 600, 1000, 1600, 2000, 2600 y 3000  $\mu\text{M}$  y se procedió a leer a una longitud de onda de 595 nm a los 30 minutos. Los resultados se expresan en  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  por mg de liofilizado (Anexo 4).

6.2.4 Evaluación y selección del fruto con mayor potencia para inducir enzimas antioxidantes en ratas Wistar sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina en un estudio agudo (7 días).

Con el propósito de conocer el efecto modulador que poseen los frutos de arándano y zarzamora sobre biomarcadores de estrés oxidativo e hipoglucemiante en un estado no patológico (sanas) y hacer un comparativo con un estado patológico (diabéticas), se procedió a evaluar los frutos en ratas Wistar sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina.

#### 6.2.4.1 Inducción de diabetes

Se preparó una solución fresca de STZ (45 mg/kg de peso corporal) en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 4.5 (Anexo 10). La destrucción parcial de las células  $\beta$  pancreáticas por STZ da como resultado animales con un estado de hipoinsulinemia e hiperglicemia. Por lo tanto, 48 horas después de una sola administración de STZ vía intraperitoneal, aquellos animales con diabetes moderada (niveles mayores de 200 mg/dL de glucosa sanguínea en ayuno) fueron seleccionados para el experimento. Los animales del grupo control fueron tratados únicamente con amortiguador de citratos.

#### 6.2.4.2 Tratamientos

Una vez aclimatados los animales por una semana, los animales fueron divididos en 15 grupos experimentales, como se muestra en el cuadro 1. Las concentraciones usadas fueron 50, 100 y 200 mg de liofilizado por kg de peso corporal, basado en la literatura para la inducción de enzimas antioxidantes y de fase 2 *in vivo*. Los liofilizados fueron

resuspendidos según la dosis en un volumen no mayor a 3 mL de agua para su administración vía intragástrica. El sulforafano es un isotiocianato aislado del brócoli que se ha demostrado tiene una función protectora de tejidos induciendo enzimas que detoxifican carcinógenos (Begley, 1994) o bloqueando enzimas que promueven el crecimiento de tumores (Tadi, 1992). Por lo que al sulforafano se le consideró como control positivo (inductor de enzimas), administrándose vía intragástrica a una concentración de 500  $\mu\text{mol/kg}$  de peso por día disuelto en una solución salina isotónica por 5 días (Munday y Munday, 2004).

Cuadro 1. Grupos experimentales de ratas sanas y diabéticas tratadas con Zarzamora y Arándano

GRUPO	N	TRATAMIENTO	DOSIS (mg /kg)
SANAS			
1	4	Control Negativo (agua)	0
2	4	Zarzamora	50
3	4	Zarzamora	100
4	4	Zarzamora	200
5	4	Arándano	50
6	5	Arándano	100
7	5	Arándano	200
8	4	Control Positivo (Sulforafano)	500 $\mu\text{mol/kg}$
DIABÉTICAS			
9	5	Control Negativo (agua)	0
10	5	Zarzamora	50
11	5	Zarzamora	100
12	5	Zarzamora	200
13	5	Arándano	50
14	5	Arándano	100
15	5	Arándano	200

Todos los grupos recibieron tres dosis (cada tercer día) de fruto durante una semana. El intervalo de concentraciones y la frecuencia de la administración se siguieron de acuerdo a lo reportado en diversos estudios in vivo para la inducción óptima de enzimas y proteínas antioxidantes.

#### 6.2.4.3 Determinaciones durante el experimento

Consumo de agua y alimento: Durante el período de experimentación se midió y pesó el consumo de agua y alimento, respectivamente.

Peso de los animales: Al inicio y al final del período de experimentación se determinó el peso de los animales.

Para evaluar el efecto hipoglucemiante de los frutos, los animales fueron sometidos a un ayuno de 8 horas y se les tomaron muestras de sangre periférica para la determinación de la glucosa inicial usando el método de la glucosa oxidasa (tiras) mediante un glucómetro. Después de la administración intragástrica de los frutos, se realizaron de 3 a 4 muestreos sanguíneos cada 60 minutos para las determinaciones de los niveles glucosa.

#### 6.2.4.4 Sacrificio

Al final del tratamiento, los animales fueron anestesiados con éter etílico y sacrificados para extraer el hígado y el riñón. Ambos órganos fueron rápidamente removidos, lavados en una solución salina fría estéril, posteriormente fueron congelados con nitrógeno líquido, y almacenados a  $-71^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La selección de los órganos se determinó en base a la frecuencia de las complicaciones que acompañan a la diabetes, tales como la nefropatía, mientras que el hígado es el órgano metabolizador y destoxicador por excelencia.

#### 6.2.4.5 Procesamiento de las muestras (extractos citosólicos)

Para la determinación de la actividad enzimática de glutatión-*S*-transferasa (GST) y la concentración de GSH, ambos tejidos fueron pesados y colocados en tubos cónicos, adicionando 4 partes (peso/volumen) de una solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 7 (Anexo 5). Todos los tejidos fueron homogenizados en un homogenizador polytron (Kinematica, Suiza) hasta que no fueron visibles ningún grumo de tejido; posteriormente fueron centrifugados a 10,000 g por 15 minutos a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH Co. KG, Alemania). Se recuperó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y se colocó en tubos para ultracentrífuga, igualando el peso de un par de tubos con diferencia no mayor de 0.01 g, para posteriormente centrifugarse en una centrífuga Beckman Optima L-90K (Beckman, EUA) a 100,000 g por 1 h a 4°C. Los sobrenadantes (extracto citosólico) se recuperaron en tubos eppendorf y se almacenaron a -71 °C hasta su análisis.

#### 6.2.4.6 Actividades enzimáticas y la concentración de biomarcadores del estrés oxidativo

La actividad total de GST se determinó en ensayo por microplaca por el método de Habig y col., 1974 (Anexo 6). Este método se basa en la reacción catalizada de la GST entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro,-2,4-dinitrobenzenu), el cual tiene un amplio rango de detectar las diferentes isoenzimas (alfa, mu, pi y otras isoformas de GST). Brevemente, a cada pocito se le agregó 50 µL (4 pocitos por muestra) de solución citosólica (hígado diluido 1:100, riñón diluido 1:50 con buffer fosfatos 0.1 M pH 6.5), 100 µL de solución de GSH 3 mM y 150 µL de solución de CDNB 2 mM. La conjugación del compuesto CDNB con GSH por la enzima GST se monitoreó cada 20 segundos durante 2 minutos a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA). Los resultados fueron analizados con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA). Las actividades enzimáticas de GST fueron expresadas como nmol de producto formado o reducido por mg de proteína citosólica por minuto, usando la siguiente ecuación:

$$\text{nmol/mg/min} = \frac{\Delta \text{Abs}_{\text{min}2} - \text{Abs}_{\text{min}1}}{(\text{mg proteína}) (0.0096)}$$

Dónde:

$\text{Abs}_{\text{min}1}$  = Es la absorbancia a 340 nm al minuto 1 de la reacción

$\text{Abs}_{\text{min}2}$  = Es la absorbancia a 340 nm al minuto 2 de la reacción

mg proteína = mg proteína en la muestra

0.0096 = Coeficiente de extinción del CDNB ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

La concentración de glutatión reducido (GSH) se determinó por el método de Ellman, 1959 (Anexo 8). Brevemente, 200  $\mu\text{L}$  de extracto citosólico se mezclaron con 160  $\mu\text{L}$  de agua destilada, 40  $\mu\text{L}$  de ácido tricloro acético (TCA) al 5%, dejándolo reposar 30 minutos para precipitar la proteína; posteriormente se centrifugaron a 10,000 g a 4°C por 20 minutos. Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  sobrenadante claro y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7, 80  $\mu\text{L}$  de metanol y 20  $\mu\text{L}$  del DTNB. A los cinco minutos de reacción, se midieron las absorbancias a 412 nm en un lector de microplacas modelo Versa Max Turnable Microplate Reader (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA), contra un blanco que en lugar de citosol contenía 50  $\mu\text{L}$  más de buffer Tris-HCl. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{M}$  de GSH/mg de proteína, utilizando una curva de calibración del estándar de GSH (0 – 100  $\mu\text{M}$ ).

#### 6.2.4.7 Cuantificación de Proteínas

El contenido de proteína total se determinó mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA) (Pierce Inc.) (Anexo 8). Este método combina la reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  con proteína en un medio alcalino (reacción de Biuret) con alta sensibilidad y selectividad colorimétrica al ión Cu usando un único reactivo que contiene el ácido bicinonínico. El complejo colorido se desarrolla por 30 minutos a 37 °C, el cual es formado por dos moléculas de ácido bicinonínico y una del ión cobre. Este complejo es soluble en agua y muestra una alta absorbancia a 562 nm que es lineal al incremento en la concentración de proteína.

Para el ensayo, se realizaron diluciones 1:100 para las muestras hígado y 1:20 para las muestras riñón en buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5 (Anexo 9). Posteriormente, se colocaron en microplaca 50  $\mu$ L de citosol diluido (4 pozos por muestra) y 250  $\mu$ L de la solución de trabajo. Se dejó incubar 30 minutos a 37°C y finalmente se leyó en un lector de microplacas a una longitud de onda de 562 nm.

Se usó una curva estándar (0 – 120 g/50  $\mu$ L) con albúmina de suero bovina (BSA) para determinar la concentración de proteína. Los resultados fueron analizados con el software Pro Ver.4.7.1 (Molecular Devices Co., Sunnyvale, EUA) y expresados como  $\mu$ g/50  $\mu$ L.

A partir de los resultados anteriores se determinó el fruto con la mayor potencia para inducir enzimas antioxidantes (GST) (zarzamora a una dosis de 100 mg/kg de peso corporal), que posteriormente se evaluó en un estudio subcrónico en ratas normoglicémicas y diabéticas inducidas con STZ, de acuerdo a la siguiente fase.

Debido a que la diabetes es un padecimiento incurable y con el transcurso del tiempo, el tratamiento llega a ser poco efectivo, lo que conduce a un deficiente control metabólico de la enfermedad y, por consecuencia la aparición de complicaciones, fue necesario evaluar el efecto de la administración del fruto con mayor potencia inductora durante 21 días.

6.2.5 Evaluar el efecto de la administración subcrónica (21 días) del fruto con mayor potencia inductora sobre los niveles de glucosa, enzimas antioxidantes y biomarcadores de estrés oxidativo en ratas normoglicémicas y diabéticas inducidas con STZ.

#### 6.2.5.1 Tratamientos

Anterior a esta fase experimental, se realizó un estudio preliminar en ratas sanas para comparar la capacidad inductora sobre la enzima GST de una dosis de zarzamora de

400 mg/kg con la dosis de 100 mg/kg de peso, ambas incorporadas en el alimento molido y administradas diariamente por 7 días. Estos resultados demostraron que la dosis de 400 mg/kg de zarzamora tuvo la mayor capacidad inductora de GST, tanto en hígado como en riñón de ratas sanas después de 7 días de tratamiento.

En base a lo anterior, se decidió usar una dosis de 400 mg/kg de peso en esta fase experimental. Una vez aclimatados los animales por una semana, los animales fueron divididos en 4 grupos experimentales como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Grupos experimentales de ratas sanas y diabéticas durante el estudio subcrónico

GRUPO	N	TRATAMIENTO	DOSIS (mg / kg)
SC-	5	Sano control. negativo	0
ANTIOX	10	Diabético Control positivo (Diabion)	21
SZ400	5	Sano Zarzamora	400
DC-	10	Diabético Control negativo	0
DZ400	10	Diabético Zarzamora	400

El grupo SC- (n = 5) consistió en ratas sanas sin tratamiento (grupo control sano negativo); mientras que el grupo SZ400 (n= 5) incluyó ratas sanas tratadas con el liofilizado de zarzamora incorporado en el alimento molido a una dosis de 400 mg/kg de peso corporal. El grupo DC- (n = 10) consistió en ratas diabéticas (45 mg STZ/kg de peso corporal) sin tratamiento (grupo control diabético negativo). El grupo ANTIOX (n = 10) incluyó ratas diabéticas a las cuales se les administró “Diabion”, un complemento nutricional antioxidante comercial recomendado a pacientes diabéticos (21 mg/kg), incorporado en el alimento (grupo control diabético positivo).

#### 6.2.5.2 Determinaciones durante la fase experimental y preparación de las muestras (extractos citosólicos)

Los animales fueron observados diariamente, se registró el peso inicial de los animales y la

ganancia de peso semanalmente. Igualmente, el consumo de alimento y de agua se registró diariamente y se reporta semanalmente.

Para evaluar el efecto hipoglucemiante del consumo subcrónico del fruto de zarzamora a los 0, 7, 14, y 21 días de experimentación, los animales fueron sometidos a un ayuno de 8 horas y se les tomaron muestras de sangre periférica para determinar la concentración de glucosa utilizándose un glucómetro marca Roche.

Al final de los 21 días del período experimental (día del sacrificio), los animales fueron sometidos a un ayuno de 8 horas y anestesiados con éter etílico para la toma de muestras sanguíneas vía punción cardiaca para las determinaciones de la concentración de triglicéridos y colesterol.

El hígado y los riñones fueron removidos rápidamente, lavados en una solución salina fría y congelados en nitrógeno líquido. Los tejidos fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

La preparación de los extractos citosólicos para la determinación enzimática de GST y la cuantificación de proteína se realizó de acuerdo al método descrito previamente. Para las determinaciones de la actividad SOD y CAT, los extractos citosólicos se prepararon de la siguiente manera: los tejidos fueron homogenizados con 10 partes (peso/volumen) de una solución amortiguadora de fosfatos 5 mM con EDTA 0.5 mM, TRITON-X100 0.5% y etanol 1% a pH 7.8. Los homogenados posteriormente se centrifugaron a 10,000 g 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante para determinar la actividad enzimática de SOD y CAT.

#### 6.2.5.3 Determinación de triglicéridos y colesterol en suero sanguíneo

La concentración de triglicéridos se determinó a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas (Anexo 11). El indicador colorimétrico se midió a 500 nm, el cual es una quinoemina formada por peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazono y 4-clorofenol, bajo la

influencia catalítica de la peroxidasa. Los resultados fueron expresados en mg/dL. La concentración de colesterol se determinó por medio de la hidrólisis enzimática y oxidación de éste (Anexo 12). El indicador es una quinoneimina que se forma a partir de peróxido de hidrógeno y 4-amino-antipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Ambos compuestos se determinaron utilizando un kit de Randox (Randox Laboratories, LTD).

#### 6.2.5.4 Actividades enzimáticas y biomarcadores del estrés oxidativo

La actividad total de GST se determinó mediante la conjugación del compuesto CDNB con GSH (Habig y col., 1974) (Anexo 5). La actividad de CAT fue medida por el método de Aebi (1983), modificado para técnica en microplaca (Anexo 7). Brevemente, a cada pocito se le agregó 180  $\mu$ L de buffer de fosfatos 50 mM a pH 7, 20  $\mu$ L de citosol y 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM. La reacción comienza al agregarse el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se monitorea el decremento en la absorbancia por un período de 30 segundos basados en la velocidad de descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm a 25 °C. Los resultados fueron expresados en U/mg de proteína.

El ensayo para determinar la actividad de SOD en la fracción citosólica se basó en el método de McCord y Fridovich (1969), usando un Kit de la marca FLUKA (Anexo 13). Este método se basa en la cuantificación de la formación del color en una disolución de un reactivo WST-1 (sales solubles de tetrazolio) que reacciona rápidamente con anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) para formar un aducto colorido, en una celda de reacción a la que se adicionan reactivos generadores de superóxido (xantina y xantina oxidasa, xo) (Figura 3).

La efectividad del ensayo depende de la rapidez con la que la XO genera el superóxido, de la rapidez con la que el superóxido reaccione con el colorante WST1 y de la rapidez con la que la SOD puede remover el superóxido.

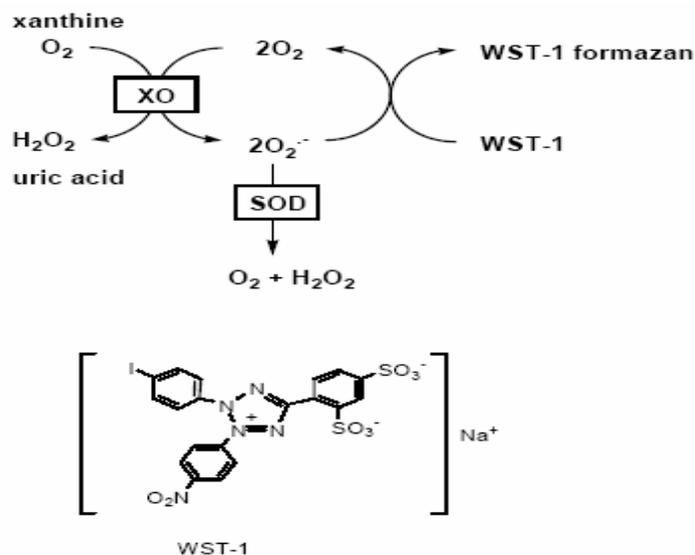


Figura 3. Principio de la determinación indirecta de la actividad enzimática de SOD por medio de WST-1.

Para determinar la actividad de esta enzima se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad SOD (\% inhibición)} = \frac{[(A_{\text{blanco1}} - A_{\text{blanco3}}) - (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco2}})] \times 100}{(A_{\text{blanco1}} - A_{\text{blanco3}})}$$

Donde:  $A_{\text{blanco1}}$ ,  $A_{\text{blanco2}}$  y  $A_{\text{blanco3}}$ , se indican en el anexo 13.

Los resultados se extrapolaron a una curva estándar usando la enzima SOD pura (0.2- 69 U/mL) realizada previamente (Anexo 13).

La concentración de GSH se determinó por el método de Ellman (1959) (Anexo 8). El contenido de proteína se determinó mediante el método de BCA descrito previamente (Anexo 9).

### 6.3 Análisis de Datos

Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media (EEM). La evaluación estadística de los datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA),

seguido de la prueba de Dunnet para la comparación entre los grupos tratados con cada extracto y el grupo control (negativo). La prueba de Tukey-Kramer se empleó en algunos casos para la comparación de las medias entre los grupos tratados y el sulfurofano y el Diabion (grupos control positivos). Se realizó la prueba de t-student para la comparación entre ratas sanas y ratas diabéticas. En todos los casos se empleó un nivel de significancia de  $P < 0.05$  con un nivel de confianza del 95%. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa estadístico Sigma Stat versión 3.5 (2000).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Contenido de fenoles y flavonoides totales de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*).

Numerosas investigaciones han evaluado la actividad antioxidante de los fenoles y flavonoides frente a los RLs y a las EROS, por su capacidad de secuestrar RL, quelar iones metálicos, inhibir oxidasas y, además, por aumentar la disponibilidad de antioxidantes endógenos, así como la actividad de enzimas antioxidantes. De manera adicional son capaces de inhibir enzimas involucradas en la generación de EROS. Por lo tanto, fue necesario determinar el contenido de fenoles y flavonoides totales en ambos frutos.

De los dos frutos estudiados, la zarzamora presentó el mayor contenido de fenoles totales con un valor de 112.136 mg en equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra liofilizada, siendo éste estadísticamente diferente comparado con el arándano que presentó un valor de 89.76 mg en equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra liofilizada ( $P < 0.05$ ). En cuanto al contenido de flavonoides, el arándano presentó un contenido de 1.378 mg en equivalentes de (+) catequina y la zarzamora fue de 1.4 mg en equivalentes de (+) catequina; sin embargo, esta diferencia entre los frutos no fue estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). El contenido de fenoles y flavonoides para ambos frutos se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 3. Contenido de Fenoles y flavonoides totales de los frutos de arándano y zarzamora.

<i>Muestra liofilizada</i>	<i>FENOLES TOTALES</i> <i>(mg en Equiv. Ácido Gálico)*</i>	<i>FLAVONOIDES</i> <i>(mg en Equiv. (+) Catequina)*</i>
<b>Arándano</b>	89.76 ± 0.07	1.38 ± 0.01
<b>Zarzamora</b>	112.14 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.01

Los datos representan la media (n= 8) ± la desviación estándar. \* Por gramo de muestra liofilizada. a = diferencia estadísticamente significativa.

En estudios realizados con extractos metanólicos de fresas se encontró un promedio de 273 mg en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (Meyers y col., 2003). Otro estudio determinó el contenido de fenoles totales en extractos metanólicos de arándano, obteniendo en promedio un valor de 357 mg en equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (Liu y col., 2002). Dichos estudios fueron realizados en extractos metanólicos, lo que explicaría que los valores en los liofilizados tanto del arándano como de la zarzamora fueran menores a los reportados. Se ha demostrado que con la extracción con metanol se encuentran mayores compuestos, debido a la composición y las características propias de la eficiencia de extracción. Sin embargo, Moyer y col. (2002) determinaron el contenido de compuestos fenólicos totales en arándano encontrando valores de 444 mg en equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de peso fresco. Nuestros datos obtenidos son más altos con respecto a los reportados por Moyer y col. (2002), pero más bajos con relación a los reportados por Yi y col. (2005). Estudios realizados por Sellappan y col. (2002) reportaron diferencias estadísticas en cuanto al contenido de compuestos fenólicos entre diferentes cultivos de arándanos. Esto pudiera explicar en parte las diferencias que existen al comparar nuestros resultados con los ya reportados por otros autores mencionados anteriormente.

Por otro lado, en un estudio realizado con un extracto metanólico de arándanos emplearon quercentina como el estándar de referencia para la determinación de flavonoides, encontrando valores de 196 mg por litro de extracto. En extractos de fresas se ha reportado un promedio de 70.5 mg en equivalentes de catequina por 100 g de peso fresco (Meyers y col., 2003). Liu y col. (2002) reportaron un promedio de 84 mg en equivalentes de catequina por gramo de extracto de arándanos. Por lo anterior, podemos mencionar que los valores tanto de fenoles como flavonoides no fueron notablemente elevados comparados a los estudios anteriormente mencionados, ni comparados a los alimentos que poseen buenas concentraciones de flavonoides y fenoles. Sin embargo hay que resaltar que los valores presentados en este trabajo representan el contenido de fenoles y flavonoides en el alimento tal cual para su consumo.

Existen diversos factores que influyen en el contenido y tipo de metabolitos

secundarios presentes en los frutos; como los cambios estacionales incluyendo la luz, la radiación ultravioleta, temperatura, el pH, el oxígeno, el entorno de la planta, así como el suelo en el que crece (Yao y col., 2005). Esta sensibilidad a factores ambientales significa que hay diferencia de valores en las concentraciones de un año a otro. Debido a lo anterior pueden presentarse variaciones entre las actividades biológicas con el consumo de estos frutos en el organismo.

## 7.2. Capacidad antioxidante de las muestras liofilizadas de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) por el método de ABTS

Los frutos de arándano y zarzamora contienen compuestos antioxidantes (fenoles y flavonoides), a los cuales por su estructura molecular se les ha atribuido la capacidad de atrapar radicales como el ABTS<sup>•+</sup>.

En la figura 4 se muestra la relación entre el % de inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup> con el logaritmo de la concentración de las muestras de arándano y zarzamora disueltas en agua, observándose una curva sigmoideal en ambos frutos. Con esta relación se puede determinar el valor de la concentración efectiva al 50% (CE<sub>50</sub>), que es la concentración de la muestra a la cual es capaz de inhibir o atrapar el 50 % de la concentración del radical ABTS<sup>•+</sup>. Para la zarzamora se necesitan  $3372 \pm 1.032$  µg/ ml, mientras que para la muestra de arándano, se necesitan  $2037 \pm 1.590$  µg/ml. En la misma figura se observa que la zarzamora tiene un porcentaje de inhibición máximo (I<sub>max</sub> %) de 93.58 % y el arándano de 81.28 % sobre el radical ABTS<sup>•+</sup>, indicando así que, el liofilizado de zarzamora diluido en agua a una concentración menor tiene mayor capacidad antioxidante que el arándano.

En la figura 5 se muestra la relación entre el % de inhibición y el logaritmo de la concentración de las muestras de la zarzamora y el arándano disueltas en metanol. De acuerdo a la CE<sub>50</sub> de la figura 5 se necesitan  $1448 \pm 1.148$  µg/mL de liofilizado de zarzamora y  $3459 \pm 1.015$  µg/mL de liofilizado de arándano. En la misma figura se observa que la zarzamora en este caso tiene un porcentaje mayor de inhibición (I<sub>max</sub> = 90.6%) que el arándano (I<sub>max</sub> = 85.8%); los datos de ambas figuras pueden observarse en el cuadro 5.

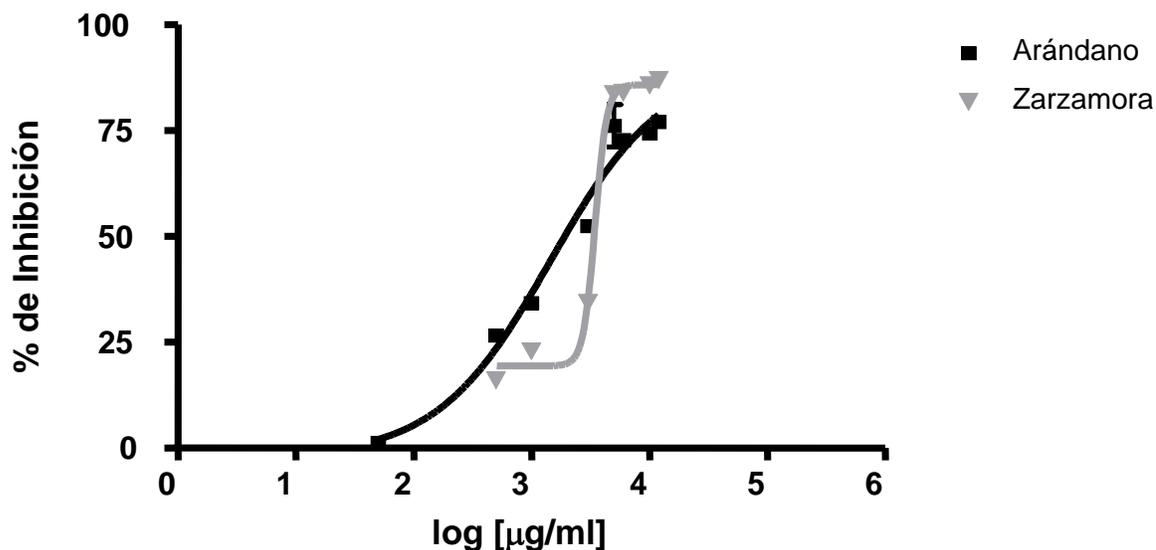


Figura 4. Porcentaje de inhibición de la oxidación del ABTS con diferentes concentraciones de los liofilizados de arándano y zarzamora disueltos en agua.

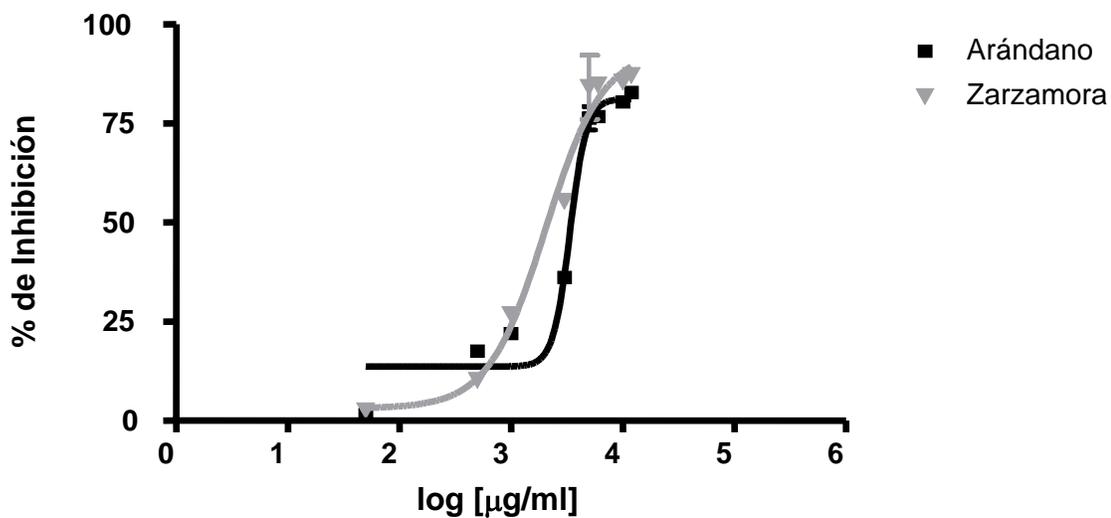


Figura 5. Porcentaje de inhibición de la oxidación del ABTS con diferentes concentraciones de los liofilizados de arándano y zarzamora disueltos en metanol.

Cuadro 5.  $I_{\max}$  y  $EC_{50}$  de muestras liofilizadas de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) diluidas en agua y metanol.

DILUCIÓN	ACUOSA		METANÓLICA	
	ZARZAMORA	ARÁNDANO	ZARZAMORA	ARÁNDANO
$I_{\max}$ (%)	93.58 ± 2.205	81.28 ± 1.637	90.63 ± 5.840	85.84 ± 0.53
$EC_{50}$ (µg/ml)	3372 ± 1.032	2037 ± 1.590	1448 ± 1.148	3459.39 ± 1.015
$EC_{50}$ (mg/ml)	3.372 ± 0.001	2.037 ± 0.001	1.448 ± 0.001	3.45 ± 0.001

Los valores muestran la media ± el error estándar de las muestras.

Siendo así que la zarzamora tiene mayor capacidad antioxidante en cualquiera de las soluciones (acuosa o metanólica) comparada con el arándano, ya que se requiere una menor concentración para lograr el mismo % de inhibición. Cabe resaltar que la zarzamora contiene mayor cantidad de fenoles totales que el arándano, por lo que ambos parámetros pudieran estar inversamente relacionados. Se ha demostrado que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende del solvente de extracción y los constituyentes propios del alimento (en especial los aminoácidos), ya que estos interfieren con los fenoles presentes, produciendo una capacidad antioxidante diferente por estas mismas técnicas a los que producirían los compuestos fenólicos por sí mismos (Jara y col., 2006).

Los flavonoides poseen coeficientes de partición intermedios, que dependen en gran medida de su estructura química precisa y de los sustituyentes asociados (grupos hidroxilo, metoxilo, azúcares, etc.). Generalmente, los compuestos hidrofóbicos entran en las células más rápido que los hidrofílicos por procesos de difusión simple. Una vez en el organismo, los compuestos fenólicos más hidrofóbicos tendrán su destino en ambientes lipídicos y los más hidrofílicos quedarán en medios más acuosos (Parr y Bolwell, 2000). Así, la unión de azúcares hace a los compuestos fenólicos más hidrosolubles pero disminuye su actividad antioxidante (Rice-Evans y col., 1997). Por ello, los compuestos fenólicos con más afinidad por los ambientes lipídicos del organismo podrían tener una mayor relevancia en la prevención de enfermedades. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de ambos frutos dependerá del solvente en que se preparen las soluciones (agua o metanol), ya que los metabolitos que componen estos frutos son solubles dependiendo del solvente utilizado. En el caso de este trabajo, en los experimentos in vivo las dosis de los frutos fueron disueltas

en agua a manera que se asemeje la forma natural de comer los frutos.

### *7.3. Capacidad reductora de las muestras liofilizadas de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) por el método de FRAP*

El método de FRAP descrito por Omidreza (2005) mide la capacidad reductora de cualquier sustancia, que en medio de reacción tiene la capacidad de reducir el complejo TPTZ-Fe(III) al complejo TPTZ-Fe(II). Este método fue utilizado para evaluar la capacidad antioxidante los frutos de arándano y zarzamora, ya que contienen fenoles y flavonoides a los cuales se les ha atribuido este mecanismo antioxidante.

En la figura 6 se muestra la capacidad antioxidante en las muestras liofilizadas de los frutos de arándano en agua (AH<sub>2</sub>O) y metanol (AMeOH); así como de zarzamora diluida en agua (ZH<sub>2</sub>O) y metanol (ZMeOH) por el método de FRAP. Los resultados se expresan en mM de FeSO<sub>4</sub>/mg de liofilizado, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre todas las muestras, utilizando el método de Holm-Sidak que realiza comparaciones múltiples.

Estos datos coinciden con los datos de la capacidad antioxidante obtenidos con la técnica de ABTS, ya que los liofilizados de zarzamora diluidos en agua y metanol muestra mayor capacidad reductora que el liofilizado de arándano en ambas soluciones.

El uso de diferentes técnicas para determinar la capacidad antioxidante (ABTS y FRAP, en este estudio) respalda el hecho que la mayor capacidad antioxidante la tiene la zarzamora. Con respecto a lo anterior, diversos estudios muestran que existe una alta correlación en ambas técnicas para los frutos de arándano (Connor y col., 2002). Igualmente, Awika y col. (2003) observaron una alta correlación entre el método de ABTS y FRAP para este fruto. En otro estudio sobre la comparación de varias técnicas para determinar la capacidad antioxidante en guayabas, se encontró una alta correlación (0.97) entre las técnicas de ABTS y FRAP (Kriengsak y col., 2005). Por lo tanto, los resultados de capacidad antioxidante por ambas técnicas pueden ser comparativos. Sin embargo, los

frutos podrían variar en cuanto a composición de fitoquímicos con capacidad antioxidante, ya que algunos de estos compuestos antioxidantes se disuelven mejor en un diluyente que en otro (agua o metanol).

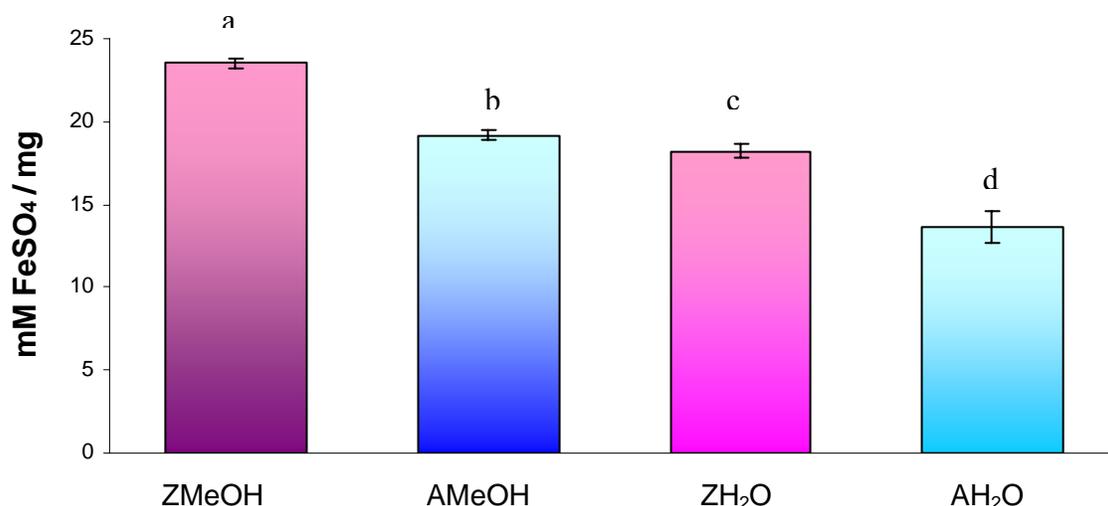


Figura 6. Capacidad reductora de las muestras liofilizadas de los frutos de arándano y zarzamora disueltas en agua y metanol por el método de FRAP (expresada como mM de FeSO<sub>4</sub> por mg de liofilizado).

Los datos muestran la media (n = 9) ± la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa entre las muestras.

#### 7.4 Efecto hipoglucemiante de los frutos de arándano y zarzamora administrados cada tercer día en ratas sanas y diabéticas durante una fase experimental aguda (7 días)

##### 7.4.1 Primer día de tratamiento

Después de una administración intragástrica de arándano en dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso (A50, A100 y A200, respectivamente) y zarzamora en dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso (Z50, Z100 y Z200, respectivamente) en ratas sanas, la concentración de glucosa fue registrada cada 60 minutos en el primer día de tratamiento (Figura 7a), encontrándose una disminución estadísticamente significativa al minuto 60 con Z100 (-22

mg/dL), y en el minuto 120 con A100, con respecto al control negativo (agua).

Con respecto a la concentración de glucosa de ratas diabéticas (Figura 7b), se encontró que a los 60 minutos el grupo de A200 tuvo una reducción de glucosa estadísticamente significativa (-29.4 mg/dL), con respecto al grupo control negativo. A los 120 y 180 minutos, el grupo de ratas diabéticas con Z200 tuvo una reducción de glucosa de 32.8 y 38.8 mg/dL, respectivamente, siendo ambas reducciones estadísticamente significativas con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ).

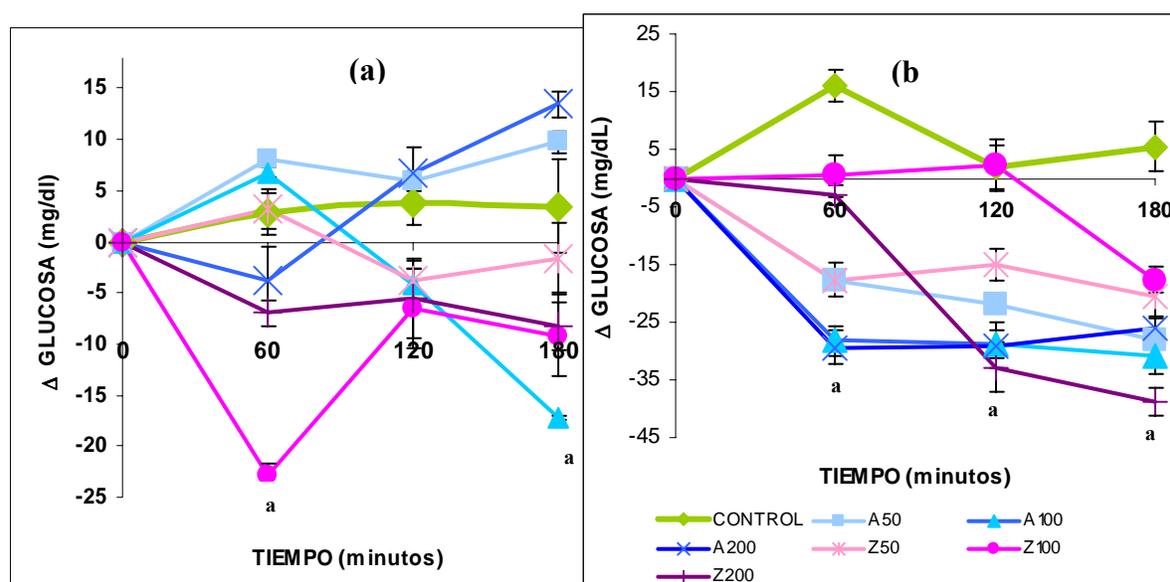


Figura 7. Cambio en la concentración de glucosa determinada cada hora después de la administración intragástrica de arándano (A50, A100 y A200) y zarzamora (Z50, Z100 y Z200) en dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso, respectivamente, en ratas sanas (a) y diabéticas (b), en el primer día de tratamiento.

<sup>a</sup> significa que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

#### 7.4.2 Segundo día de tratamiento

Similarmente, durante el segundo día de tratamiento y después de una administración intragástrica de arándano y zarzamora en ratas sanas (Figura 8a), la concentraciones de glucosa fueron registrados cada 60 minutos. Se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración de glucosa con respecto al

control negativo a los minutos 120 con A50 (-21.3 mg/dL) y a los 180 y 240 minutos después de la administración intragástrica de Z100 (-17.6 y -14.2 mg/dL, respectivamente), con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ).

Con respecto a la concentración de glucosa de ratas diabéticas (Figura 8b) después de la administración intragástrica de arándano y zarzamora, se encontró que a los 60 minutos el grupo de A100 tuvo una reducción de glucosa estadísticamente significativa (-18.6 mg/dL), con respecto a un grupo control negativo ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, a los 120 minutos el grupo de ratas diabéticas con A50 tuvo una reducción estadísticamente significativa de glucosa (12.4 mg/dL) con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ).

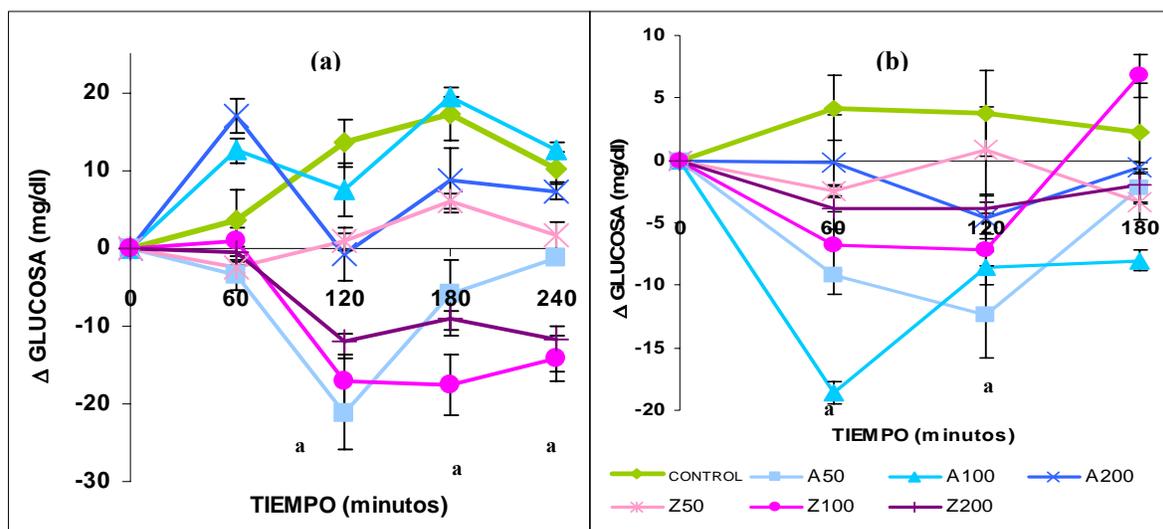


Figura 8. Cambio en la concentración de glucosa determinada cada hora después de la administración intragástrica de arándano (A50, A100 y A200) y zarzamora (Z50, Z100 y Z200) en dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso, respectivamente, en ratas sanas (a) y diabéticas (b) en el segundo día de tratamiento.

<sup>a</sup> significa que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

### 7.4.3 Tercer día de tratamiento

En el tercer día de tratamiento y después de una administración intragástrica de arándano y zarzamora en ratas sanas (Figura 9a), se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración de glucosa a los 60, 120 y 180 minutos

con A200 (-9, -14.75, -11.25 mg/dL, respectivamente) y a los minutos 60 y 120 con Z50 (-11.2 y -12.6 mg/dL, respectivamente), comparada con el control negativo. Con respecto a los niveles de glucosa en ratas diabéticas después de una administración intragástrica de arándano y zarzamora (Figura 9b), se encontró que hasta los 180 minutos el grupo de Z100 tuvo una reducción de glucosa estadísticamente significativa (-23.4 mg/dL), con respecto a un grupo control negativo ( $P < 0.05$ ).

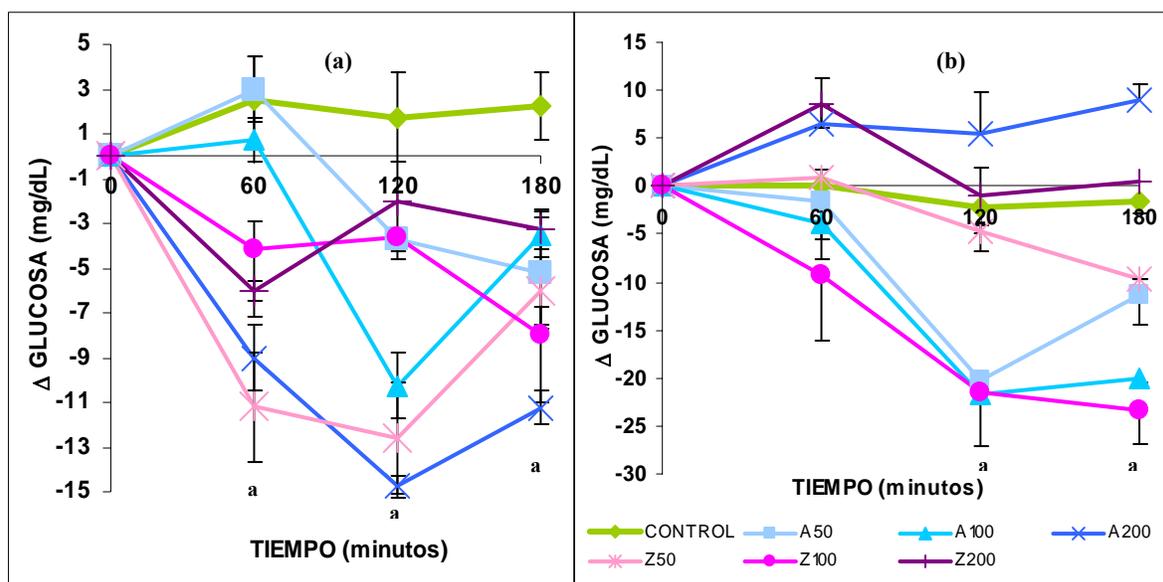


Figura 9. Cambio en la concentración de glucosa determinada cada hora después de la administración intragástrica de arándano (A50, A100 y A200) y zarzamora (Z50, Z100 y Z200) en dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso, respectivamente en ratas sanas (a) y diabéticas (b) en el tercer día de tratamiento.

<sup>a</sup> significa que existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ ). Los resultados son expresados como la media  $\pm$  el error estándar de la media.

A manera de resaltar el efecto del consumo de los frutos de arándano y zarzamora, se analizaron los cambios en la concentración de glucosa inicial (glucosa en ayuno) durante los días 3 y 5, (Figura 10), donde la concentración de glucosa aumenta en los grupos de ratas sanas a lo largo del periodo experimental, pero no se observa un aumento en el grupo tratado con zarzamora a dosis de 100 mg/kg de peso. Este resultado respalda el efecto hipoglucemiante que tiene este fruto a esa dosis, mostrando así que el consumo de zarzamora disminuye la concentración de glucosa en sangre.

Por otro lado, la concentración de glucosa inicial (glucosa en ayuno) disminuyó en los grupos de ratas diabéticas tratadas con los frutos a sus diferentes dosis durante el periodo experimental, siendo más clara esta disminución en los grupos tratados con zarzamora a dosis de 100 y 200 mg/kg de peso y, en menor medida, con arándano a dosis de 100 y 200 mg/kg de peso (Figura 10).

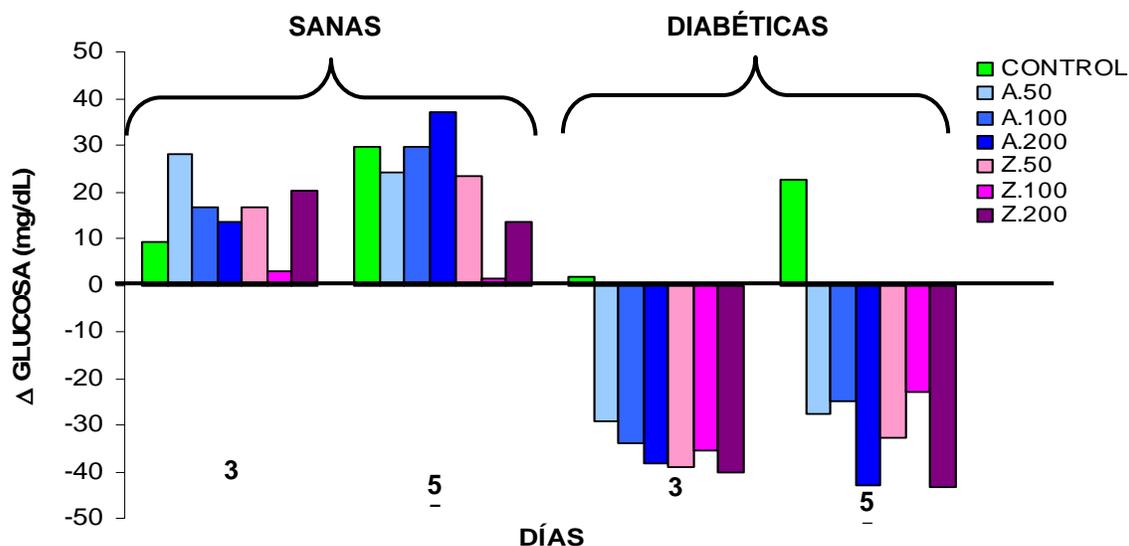


Figura 10. Cambio en la concentración de glucosa en ayuno en los días 3 y 5 de los grupos de ratas sanas y diabéticas tratadas con arándano en dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso (A50, A100 y A200) y zarzamora en dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso (Z50, Z100 y Z200).

Al final del estudio agudo, la concentración de glucosa del grupo control diabético (189 mg/dL) aumentó con respecto a la glucosa inicial (166 mg/dL) (Anexo 14), demostrando con esto la progresión de la enfermedad en este grupo sin ningún tratamiento, comparado con los demás grupos tratados a las diferentes dosis de los frutos de arándano y zarzamora. Lo anterior sugiere que el posible mecanismo que tienen estos frutos sea hipoglucemiante (disminuir la glucosa presente en sangre); sin embargo, será necesario realizar nuevos experimentos para evaluar en que medida estos frutos puedan tener un mecanismo antihiper glucémico (inhibir el incremento de la glucosa en sangre).

En base a lo anterior, un estudio realizado por Lemus y col. (1999) reportó una actividad hipoglucemiante importante con la infusión de las hojas de zarzamora en ratas diabéticas inducidas con STZ. Hassan y col. (2002) encontraron un efecto hipoglucemiante en ratas sanas con la administración de un extracto acuoso de zarzamora, indicando con esto que el extracto de zarzamora tiene una gran capacidad para regular los mecanismos que normalizan rápidamente la concentración de glucosa, pero no se descartan que también puedan corregir la resistencia a la insulina, o inhibir la producción de glucosa o activar la glucogénesis a través de la enzima glucógeno sintasa (Burcelin y col., 1995).

A partir de los resultados del presente estudio, se sugiere que esta disminución en los niveles de glucosa es estadísticamente importante (22-43 mg/dL), pudiera no ser biológicamente importante para personas diabéticas. Sin embargo, una disminución hasta de 10 mg/dL es de valor biológico, ya que podría llevar a la persona sana a un estado de hipoglucemia al consumir estos frutos en estado de ayuno.

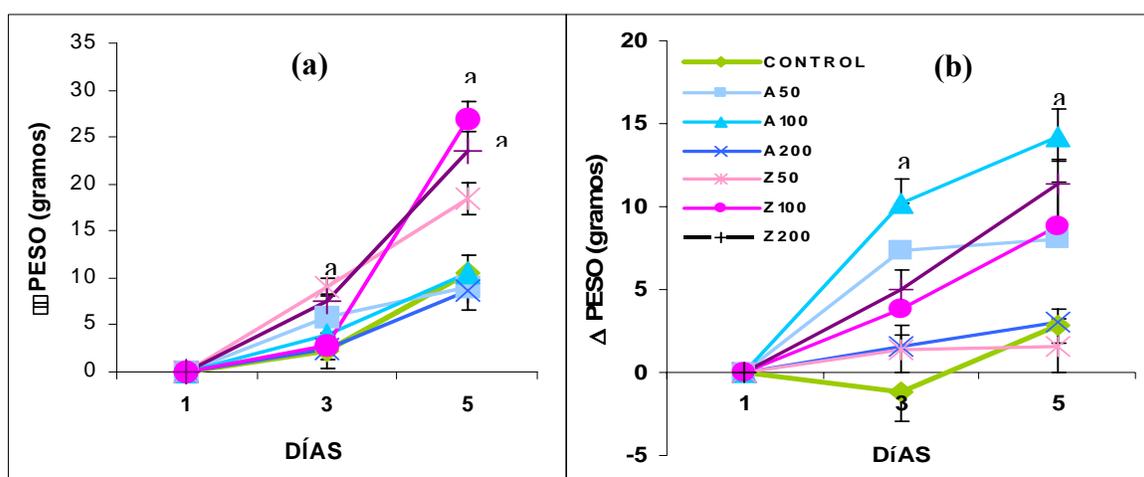
Es importante tomar en cuenta la composición de los frutos, en especial la presencia de fenoles y flavonoides (taninos), ya que estos son los principales constituyentes en extractos acuosos a los cuales se les ha atribuido efecto hipoglucemiante. Los fitoquímicos presentes en estos frutos pueden actuar separadamente o sinérgicamente para causar hipoglucemia (Marles y Farnsworth, 1995). En el presente estudio, los frutos administrados fueron liofilizados, por lo que contienen la fibra total, entre otros compuestos; por lo tanto, sería conveniente aislar estos compuestos de los frutos y analizarlos por separado, para determinar el componente que ejerce el efecto hipoglucemiante.

#### *7.5 Ganancia de peso en ratas sanas y diabéticas tratadas cada tercer día con diferentes dosis de los frutos arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)*

Las ratas sanas tratadas con zarzamora 100 mg/kg de peso (Z100) mostraron un incremento de peso estadísticamente significativo (27 g por 7 días, tiempo experimental) con respecto al control negativo (Figura 11a) ( $P < 0.05$ ). Lo anterior indica un incremento de peso ligeramente superior al compararlo con una curva de crecimiento normal, ya que

para esta edad de (15 semanas), los animales ganan como máximo 25 gramos por semana. También se encontró un incremento de peso superior en las ratas tratadas con zarzamora a sus diferentes dosis comparadas con los grupos con arándano y el grupo control.

Las ratas diabéticas tratadas con arándano 100 mg/kg de peso mostraron un incremento de peso estadísticamente significativo (14.2 g por 7 días, tiempo experimental) con respecto al control negativo (Figura 11b) ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, este incremento de peso (24 g) en una semana para esta edad promedio (17 semanas) está dentro de los parámetros normales de crecimiento de peso comparado con una curva de crecimiento de esta cepa de ratas.



Peso inicial promedio:  $251.3 \pm 2.5$  g

Peso inicial promedio:  $280 \pm 9.5$  g

Figura 11. Cambio en el peso corporal medido en los días 1, 3 y 5 durante el periodo experimental agudo (7 días) de ratas sanas (a) y diabéticas (b) tratadas con arándano (A50, A100 y A200) y zarzamora (Z50, Z100 y Z200) en dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso corporal, respectivamente.

<sup>a</sup> significa que existe una diferencia significativa con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar.

Comparando las ganancias de peso entre las ratas sanas y diabéticas a lo largo del periodo experimental (7 días), las ratas diabéticas no siguieron el patrón normal de ganancia de peso característico de los animales sanos. Esto debido al estado diabético de las ratas, demostrando así que la pérdida de peso es una característica común en pacientes diabéticos como un indicativo de la progresión, mal manejo o inadecuado tratamiento de la

misma enfermedad. Sin embargo cabe destacar que tanto en ratas sanas como diabéticas, el consumo de zarzamora tuvo un efecto en el peso de los animales, comparado con sus respectivos controles (Anexo 15) ( $P > 0.05$ ).

El incremento de peso en ratas sanas se podría atribuir a que los grupos de zarzamora consumieron más alimento (Figura 11a). Contrariamente, para el caso de las ratas diabéticas, los animales que fueron tratados con zarzamora (200 mg/kg de peso), mostraron una ganancia de peso corporal menos importante. Estos resultados indican que el control significativo de la diabetes por este tratamiento, también contribuye a una regulación positiva de la ganancia de peso, posiblemente regulando el metabolismo de lípidos como los triglicéridos (Figura 15) y/o consumo de alimento (control de la polifagia) (Figura 11b).

#### *7.6 Consumo de alimento y agua en ratas sanas y diabéticas tratadas cada tercer día con diferentes dosis de los frutos de arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)*

El consumo de alimento fue medido durante 24 horas después de la administración intragástrica de los frutos, lo que corresponde a los días 2, 4 y 6 del periodo experimental (Figura 12). En las ratas sanas control negativo y las diferentes dosis de arándano, el consumo fue de 118 g, no encontrándose diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre las diferentes dosis; además, se mantuvo esa tendencia de consumo durante todo el experimento. Para los grupos de ratas sanas tratados con zarzamora a sus distintas dosis, se observó un consumo de 155 g, 37 g más de alimento en estos grupos comparados con los grupos tratados con arándano a sus diferentes dosis (Figura 12a). A lo largo del periodo experimental, el consumo de alimento en los grupos de ratas tratadas con zarzamora a sus diferentes dosis fue disminuyendo paulatinamente, ya que para el día dos consumieron 191 g, para el día cuatro 153 g y para el día seis 120 g (Anexo 15).

El consumo de alimento durante 24 horas en las ratas diabéticas se presenta en la figura 12b, donde el consumo de alimento del grupo de ratas control negativo fue de 185 g.

Para los grupos de arándano a sus diferentes dosis, el consumo fue de 196 g y no se encontró diferencia estadística ( $P > 0.05$ ) entre las diferentes dosis de este fruto, manteniéndose esta tendencia de consumo durante todo el experimento. Por otro lado, el grupo de zarzamora a dosis de 200 mg /kg de peso (Z200) consumió 170 g de alimento, esto quiere decir que consumió 23 g menos de alimento que los grupos Z50 y Z100. Este efecto también puede atribuirse a un control de la enfermedad, ya que se ha demostrado que el incremento en el consumo de alimentos o respuesta hiperfágica depende de la disminución de los péptidos anoroxigénicos (disminuyen el consumo de alimento) dependiente de la deficiencia de insulina o el aumento de péptidos orexigénicos (aumentan el consumo de alimento (Wynne y col., 2005). En este modelo de diabetes se presenta una disminución de la concentración de la insulina, por lo tanto, al disminuir el consumo de alimento, la zarzamora podría contribuir a incrementar los niveles de insulina.

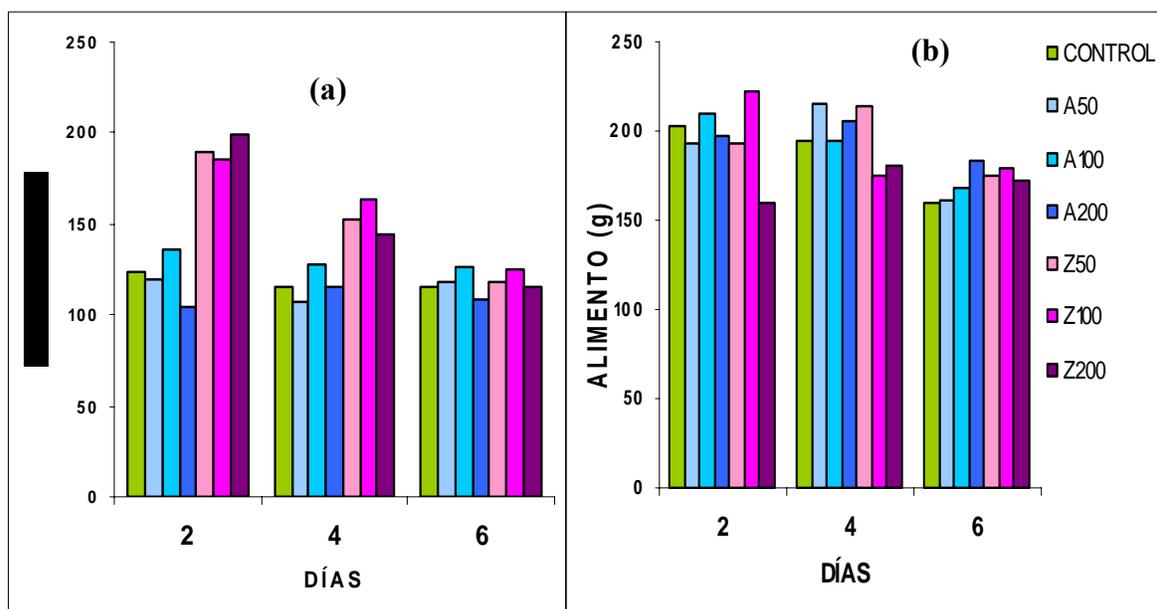


Figura 12. Consumo de alimento en los días 2, 4 y 6 del periodo experimental agudo (7 días) de ratas sanas (a) y diabéticas (b) tratadas con arándano (A50, A100 y A200) y zarzamora (Z50, Z100 y Z200) en dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso, respectivamente.

Durante los días dos y cuatro la tendencia de consumo fue similar; sin embargo, para el sexto día, el consumo de alimento disminuyó para todos los grupos, excepto para el grupo de arándano a dosis de 200 mg/kg de peso (A200) (Anexo 15). Comparando entre los

grupos sanos y diabéticos, independientemente del tratamiento, la tendencia general fue que las ratas diabéticas consumen más alimento (25%) que las ratas sanas, demostrando así que, un aumento en el consumo de alimento (polifagia) es también una característica común en pacientes diabéticos como un indicativo de la progresión, mal manejo o inadecuado tratamiento de la misma enfermedad.

El consumo de agua de ratas sanas durante 24 horas después de la administración intragástrica de los frutos correspondiente a los días 2, 4 y 6 del periodo experimental, se muestra en la figura 13a, donde el consumo de agua del grupo control negativo fue de 80.5 mL. Para los grupos de arándano a sus diferentes dosis, el consumo fue de 87.5 mL y no se encontró diferencia estadística entre las diferentes dosis de este fruto, manteniéndose esa tendencia de consumo durante todo el experimento.

Para los grupos de zarzamora a sus distintas dosis, se observó un consumo de 145 mL, esto es 57.5 mL más de agua comparados con el consumo de los grupos con arándano; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa entre los grupos tratados con las diferentes dosis de zarzamora ( $P > 0.05$ ). Además, el consumo de agua de los grupos tratados con zarzamora a sus diferentes dosis fue disminuyendo a lo largo del periodo experimental, ya que para el día dos consumieron 170 mL, para el día cuatro 147 mL y para el día seis 120 mL (Figura 13a) (Anexo 15).

Similarmente, el consumo de agua durante 24 horas de las ratas diabéticas se muestra en la figura 13b, lo que corresponde a los días 2, 4 y 6 del periodo experimental, donde el consumo de agua del grupo control negativo fue de 420 mL. Para los grupos de arándano a sus diferentes dosis fue de 466 mL, encontrándose diferencia estadística con arándano a la dosis de 100 mg/kg de peso (A100), con un consumo de 426 mL. Cabe mencionar que el consumo de agua durante el experimento fue aumentando para estos grupos. Los grupos tratados con zarzamora en general consumieron menor cantidad de agua (20 a 50 %) comparado con su respectivo control, indicando así que la zarzamora controla parcialmente la polidipsia, quizá como reflejo a que este fruto también controla ligeramente los péptidos anorexigénicos o por una disminución en la concentración de la glucosa debida

a la mejor utilización de insulina (Wynne y col., 2005).

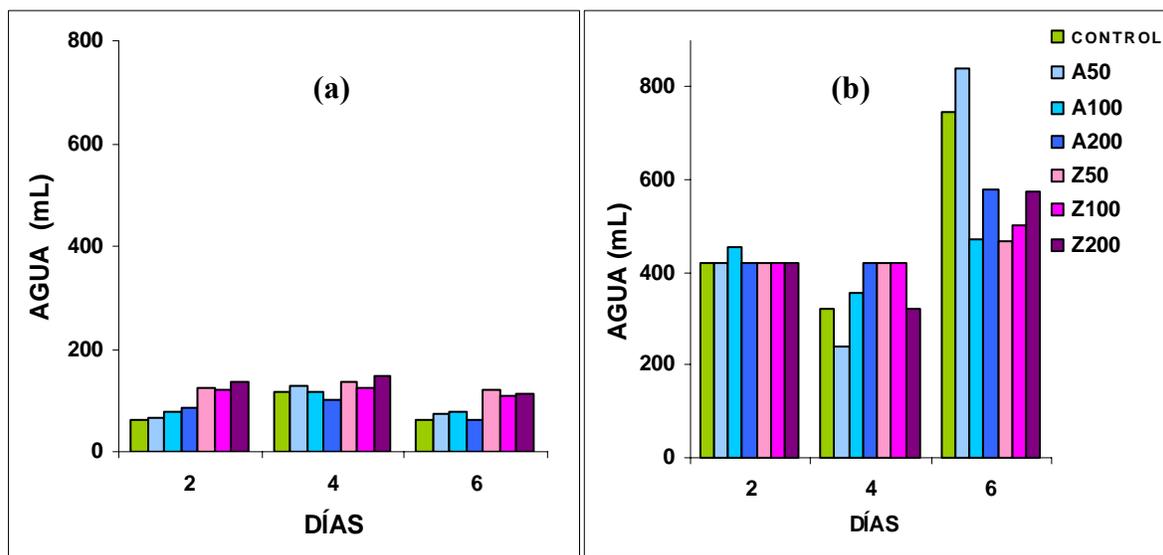


Figura 13. Consumo de agua en los días 2, 4 y 6 durante el periodo experimental agudo (7 días) de ratas sanas (a) y diabéticas (b) tratadas con arándano (A50, A100 y A200) y zarzamora (Z50, Z100 y Z200) en dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso, respectivamente.

En general durante los días dos y cuatro la tendencia de consumo de agua fue la misma, sin embargo, para el sexto día ésta cambió, ya que aumentó el consumo de agua para todos los grupos (Anexo 15), demostrando así la presencia de polidipsia como signo de la progresión de la enfermedad. Además, haciendo una comparación entre los grupos sanos y diabéticos, la tendencia general fue que las ratas diabéticas consumen más agua (70 %) que las ratas sanas, demostrando así nuevamente la presencia de polidipsia como una característica común en pacientes diabéticos como un indicativo de la progresión, mal manejo o inadecuado tratamiento de la misma enfermedad.

Durante la diabetes, la polidipsia evita la deshidratación debido a la gran cantidad de orina excretada (poliuria). La nula o poca utilización de la glucosa ingerida origina pérdida de peso a medida que el organismo intenta compensar la "inanición" percibida. La interacción del "centro de saciedad" en la región ventromedial del hipotálamo con el centro de alimentación en la región lateral de dicha estructura controla la cantidad de alimentos ingeridos. La cantidad de glucosa que ingresa a las células del centro de la saciedad afecta directamente la sensación de hambre; mientras la glucosa entra a esas células, menor será la

sensación de hambre y viceversa la capacidad de la glucosa para entrar a las células en el centro de la saciedad esta mediada por insulina. En diabéticos con falta relativa o absoluta de insulina, las glucosas no entran a las células del centro de la saciedad, lo que origina falta de inhibición del centro de la saciedad, que a su vez origina falta de inhibición del centro de la alimentación. De este modo, individuos diabéticos presentan polifagia a pesar de la hiperglucemia.

### *7.7 Concentración de colesterol y triglicéridos de ratas diabéticas tratadas cada tercer día con diferentes dosis de los frutos de arándano y zarzamora durante una fase experimental aguda (7 días)*

Varios investigadores han reportado que la hiperglucemia y la hiperlipidemia pueden ser inducidas por la administración de estreptozotocina en ratas, y con el fin de comprobar esta observación, al final del periodo experimental fue necesario determinar la concentración de colesterol y triglicéridos como parámetros de hiperlipidemia.

En la figura 14 se muestra la concentración de colesterol sanguíneo determinada por medio de kits en ratas diabéticas inducidas con STZ tratadas con arándano y zarzamora ambos a dosis de 50, 100, 200 mg/kg de peso durante 7 días. Cabe resaltar que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos al final del periodo experimental ( $P < 0.05$ ). Al parecer en este estadio diabético, hasta el tiempo de la determinación (7 días), no se han presentado alteraciones en los niveles de colesterol. Altos niveles de colesterol total y triglicéridos en sangre son de los factores de riesgo más importantes para sufrir enfermedades coronarias.

Por otro lado, en la figura 15 se muestra la concentración de triglicéridos en sangre de ratas diabéticas tratadas con arándano y zarzamora a dosis de 50, 100, 200 mg/kg de peso durante 7 días, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Ambos frutos, el arándano y la zarzamora, a dosis de 200 mg/kg de peso (A200 y Z200, respectivamente), mostraron una reducción estadísticamente significativa (53.7 y 59.8 mg/dL, respectivamente), comparados con el control negativo (P

< 0.05). Lo anterior podría explicarse ya que ambos frutos a esas mismas dosis mostraron un efecto hipoglucemiante y se ha comprobado que mediante el control de la concentración de la glucosa permite disminuir la concentración de triglicéridos en sangre.

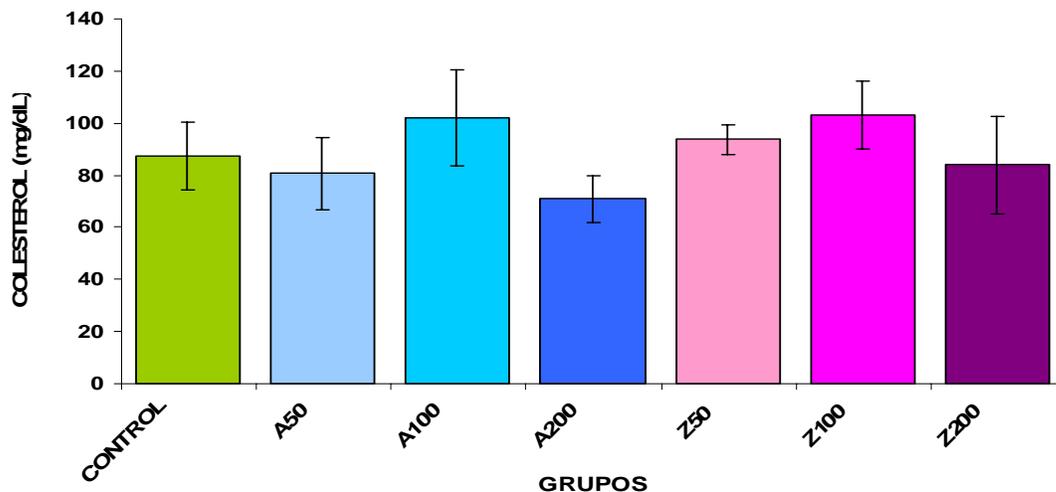


Figura 14. Concentración de colesterol sanguíneo de ratas diabéticas tratadas cada tercer día con arándano y zarzamora ambos a dosis de 50, 100, 200 mg/kg de peso (A50, A100, A200 y Z50, Z100 y Z200, respectivamente) durante una fase experimental aguda (7 días). Los datos muestran la media de las muestras  $\pm$  el error estándar.

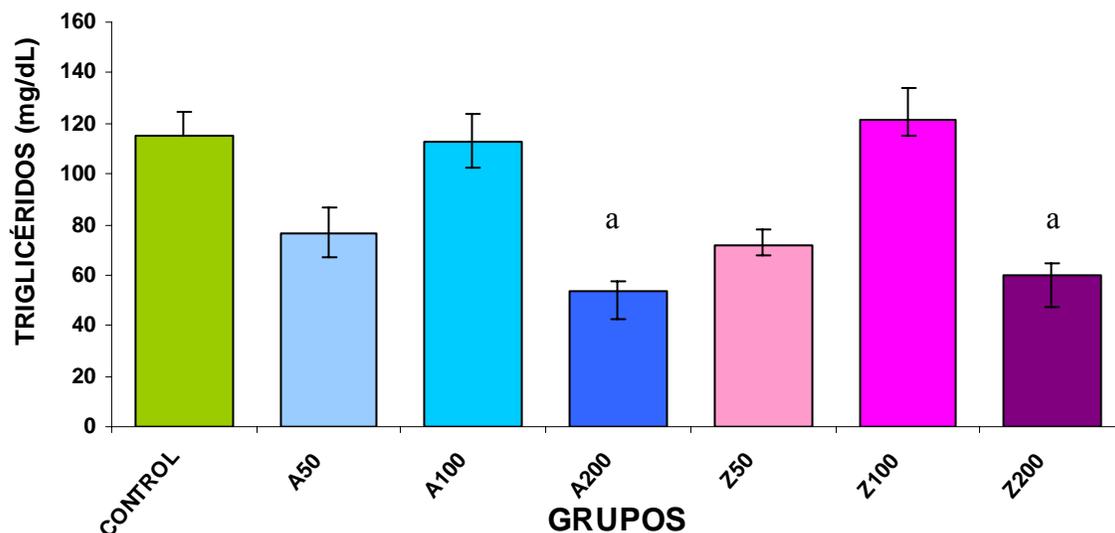


Figura 15. Concentración de triglicéridos en sangre de ratas diabéticas tratadas cada tercer día con arándano y zarzamora ambos a dosis de 50, 100, 200 mg/kg de peso (A50, A100, A200 y Z50, Z100 y Z200, respectivamente) durante una fase experimental aguda (7 días). <sup>a</sup> = diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto al control negativo. Los datos muestran la media de las muestras  $\pm$  el error estándar.

Al disminuirse los niveles de glucosa en sangre, este carbohidrato se incorpora a células dependientes de insulina, como las del tejido adiposo. La glucosa se metaboliza y se produce glicerol, el cual se utiliza para re-esterificar ácidos grasos libres provenientes de los triglicéridos del plasma, lo que provoca una disminución de estos lípidos (Ceriello, 2003). Por lo tanto, una regulación de los niveles de glucosa en sangre puede producir un decremento de los niveles de triglicéridos.

Con respecto a la disminución estadísticamente significativa de triglicéridos con arándano a 200 mg/kg de peso (A200), Ciganarella y col. (1996) encontraron que la infusión de hojas de arándano disminuye la concentración de triglicéridos en ratas diabéticas, posiblemente debido a la estimulación del catabolismo de lipoproteínas ricas en triglicéridos, bajo condiciones de deficiencia de insulina. Por lo tanto, es necesario aislar los constituyentes activos de este fruto y considerarlos como una opción de tratamiento en el desorden del metabolismo de los lípidos en la diabetes.

El estado diabético puede llevar a desarrollar factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares. El desarrollo aterosclerótico en pacientes diabéticos no controlados posiblemente es causado por esta asociación entre hiperglucemia, hipercolesterolemia e hipertriglicéridemia, lo cual muestra la importancia que tiene el control de estas tres condiciones para prevenir las complicaciones de la diabetes (Kaur y col., 2002).

*7.8 Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y zarzamora a dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso administrados cada tercer día durante una fase experimental aguda (7 días)*

La GST cataliza la conjugación de los productos electrofílicos con el GSH (Cerimele y col., 1990) para detoxificar productos derivados del estrés oxidativo como los hidroperóxidos generados por el daño a lípidos de membrana celular (Hayes y Strange, 1995), o para la detoxificación de xenobióticos, los cuales son conocidos como cofactores para la formación de RLs (Ketterer y Meyer, 1989; Berhane y col., 1994) y generados

durante un estado diabético, por lo cual se determinó la actividad de esta enzima en esta fase experimental.

En la figura 16 se muestra la actividad de GST en hígado de ratas sanas, observándose un incremento significativo para el grupo de Z200 (1236 nmol/mg\*min), comparado con todos los grupos, incluso con el grupo tratado con sulfurofano (SFN) empleado en este caso para demostrar que el sistema de inducción de enzimas responde a un agente inductor potente. En ratas diabéticas, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la actividad enzimática de GST, ni con respecto al control ( $P > 0.05$ ). Comparando la actividad enzimática de GST en hígado de ratas sanas con la actividad de las diabéticas, los niveles enzimáticos de GST en ratas sanas se encuentran más elevados (20%) que en ratas diabéticas.

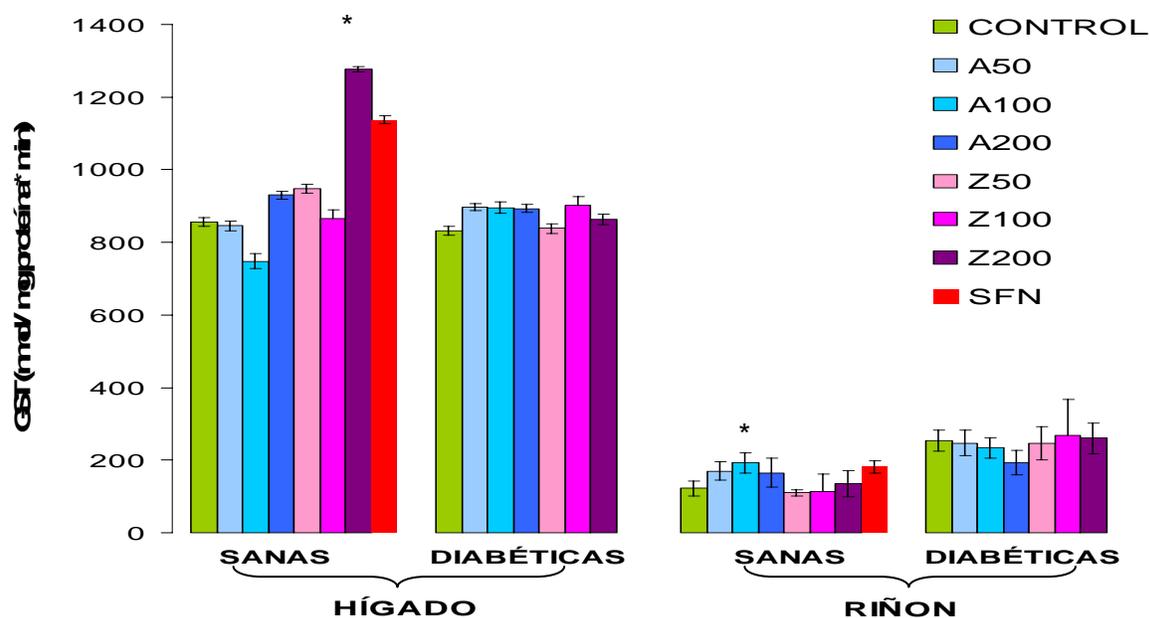


Figura 16. Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y zarzamora a dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso (A50, A100, A200 y Z50, Z100 y Z200, respectivamente), administrados cada tercer día durante una fase experimental aguda (7 días).

\* = diferencias significativas con respecto a su control ( $P < 0.05$ ). Los datos muestran la media  $\pm$  el error estándar.

La actividad enzimática de GST en riñón de ratas sanas fue estadísticamente mayor

para el grupo de arándano a una dosis de 100 mg/ kg de peso (A100), con respecto al control negativo ( $P>0.05$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad renal de GST entre los grupos de ratas diabéticas, ni con respecto al control ( $P>0.05$ ). Comparando la enzima GST en riñón de ratas sanas con diabéticas, la actividad de GST en ratas diabéticas se encuentra más elevada (40%) (Figura 16).

Similarmente, Subramanian y Leelavionthan, (2002) encontraron niveles significativamente disminuidos en la actividad de GST en hígado y riñón de ratas diabéticas. La disminución en la actividad de GST puede ocasionar que aumente el daño oxidativo, debido a la acumulación de productos tóxicos que promueven la generación de EROS y estrés oxidativo, con el consecuente efecto en cascada que afecta la integridad estructural y funcional de la célula y membranas de los organelos (Raza y col., 2000). Por lo tanto, es importante metabolizar rápidamente los compuestos extraños, sobre todo en aquellos tejidos que detoxifican al organismo, como el hígado. La GST hepática tienen una actividad enzimática claramente superior a la de otros tejidos, como por ejemplo pulmón, riñón, etc. (Guthemberg y Mannervik, 198; Strange y col., 1982), por lo que si es importante resaltar que la zarzamora potencia la actividad de GST en hígado.

#### *7.9 Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y zarzamora a dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso administrados cada tercer día durante una fase experimental aguda (7 días)*

La función general del GSH incluye la protección de las células contra los RLs, las EROS y compuestos tóxicos de origen exógeno y endógeno. Durante el estado diabético, la presencia de hiperglucemia genera RLs que causan daño celular, sin embargo, en presencia de concentraciones adecuadas de GSH, los RL y EROS son conjugados y posteriormente metabolizados o excretados como mecanismo de detoxificación (Larsen y col., 1985).

En la figura 17 se muestra que la concentración de GSH en hígado de ratas sanas fue estadísticamente mayor para el grupo de zarzamora a 200 mg/kg de peso (Z200) comparado con todos los grupos, incluso con el agente inductor SFN ( $P < 0.05$ ). Por otro

lado, no hubo incrementos significativos en la concentración de GSH en hígado de ratas diabéticas, con respecto al control negativo ( $P < 0.05$ ). Comparando la concentración de GSH en hígado de ratas sanas con las diabéticas, independientemente del tratamiento, la concentración de GSH en ratas sanas fue estadísticamente mayor (72 %).

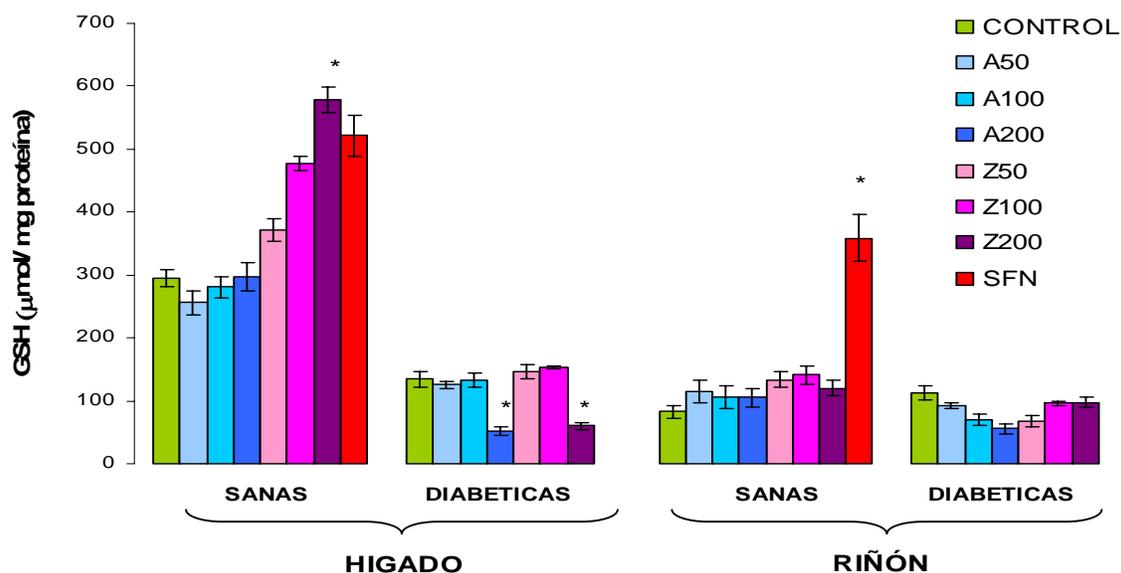


Figura 17. Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con los frutos de arándano y zarzamora a dosis de 50, 100 y 200 mg /kg de peso (A50, A100, A200 y Z50, Z100 y Z200, respectivamente), administrados cada tercer día durante una fase experimental aguda (7 días).

\* = diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) comparando entre grupos. Los datos muestran la media  $\pm$  el error estándar.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de GSH en riñón de ratas sanas con respecto al control negativo; sin embargo fue estadísticamente menor al grupo tratado con SFN. Entre los grupos de ratas diabéticas no hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de GSH en riñón con respecto al control ( $P < 0.05$ ). Comparando la concentración de GSH en riñón de ratas sanas con las diabéticas, independientemente del tratamiento, la concentración de GSH en ratas diabéticas fue menor (10%) (Figura 17).

La disminución de la concentración de GSH incrementa la susceptibilidad al daño oxidativo ocasionado por el  $H_2O_2$  en un estado de hiperglicemia. Renny y col. (2001) reportaron que en el grupo de pacientes diabéticos tipo 2 (con control y sin control de la

glicemia basal) se observaron valores significativamente reducidos de GSH plasmático, al compararlos con el grupo de sujetos sanos. Esto apoya el hecho teórico que nos indica la condición pro-oxidativa del paciente diabético, la cual es favorecida por la extensa formación de EROs que ocurren normalmente y para el cual se opone el GSH. Esto es que el GSH tiene un compromiso importante en el sistema antioxidante en los pacientes diabéticos. Algunos estudios revelan que la concentración sérica de sistemas antioxidantes como el GSH son altamente susceptibles de cambio y los mismos pueden estar disminuidos, aumentados e incluso no relacionados (Meister, 1994).

El GSH representa el más abundante antioxidante endógeno involucrado en numerosas acciones biológicas de la célula (Meister y Anderson, 1983). Si la concentración de GSH se mantiene, el daño celular suele ser menor porque la actividad de los EROS podría reducirse (Mgmobile y col., 1985). En mamíferos, el hígado constituye el órgano central para el metabolismo de GSH, que generalmente se encuentra en altas concentraciones, lo que podría proveer de GSH a otros tejidos vía circulación (McCormick, 1990). Aunque la eliminación de xenobioticos por conjugación con GSH representa una pérdida irreversible del GSH endógeno, estudios en ratas han demostrado que la concentración de GSH en hígado aumenta en respuesta a la exposición de algún tóxico como un mecanismo de defensa (Emerole y col., 1979).

El hígado es la glándula de mayor tamaño en el organismo, ya que representa del 2 al 5% del peso corporal, mientras que el riñón solo representa el 0.5 al 1%. Sin embargo, la biotransformación de sustancias tóxicas y su excreción como un mecanismo de protección para el organismo constituye la función metabólica más importante que realizan estos dos órganos en su conjunto (McCormick, 1990). Por lo tanto, es una buena estrategia determinar los niveles de GSH en ambos órganos para evaluar la condición antioxidante y procurar el buen mantenimiento de ellos.

Se han registrado concentraciones normales de GSH en hígado de 400 a 1000 mol/mg de proteína, por otro lado la concentración de GSH en riñón se ha reportado que va de 200 a 250  $\mu$ mol/mg de proteína (Quezada y col., 2002). Cabe añadir que la actividad

enzimática general del hígado es más alta que en el riñón, ya que el hígado podría tener una mayor responsabilidad en los procesos de detoxificación y eliminación que el riñón.

Debido a que la actividad enzimática de GST y la concentración de GSH fueron estadísticamente mayores en hígado y riñón de ratas sanas, siendo esta significativa para el grupo de ratas sanas tratadas con zarzamora a 200 mg / kg de peso (Z200) y SFN, y, aunque no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos de ratas diabéticas, la tendencia fue que estos biomarcadores se incrementaron en los grupos tratados con zarzamora y no con arándano. Por lo tanto, se eligió el fruto de zarzamora como el fruto con mayor potencia inductora para evaluar en la siguiente fase experimental subcrónica (21 días).

Previo al estudio subcrónico, se realizó un ensayo preliminar en ratas sanas tratadas con zarzamora, a las dosis de 100 y 400 mg/kg de peso, incorporada en la dieta molida, para determinar la dosis con mayor potencia inductora sobre estos biomarcadores. Los resultados muestran una mayor respuesta para la dosis de 400 mg/kg de peso de zarzamora incorporada en el alimento.

#### *7.10. Efecto hipoglucemiante de la zarzamora administrada diariamente en el alimento (400 mg/kg de peso) en ratas sanas y diabéticas durante una fase experimental subcrónica (21 días)*

Durante la primera semana de la fase experimental se observaron aumentos estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) en la concentración de glucosa de los grupos diabéticos con 400 mg/kg de peso de zarzamora (DZ400), diabético sin zarzamora (DC-) y diabético con antioxidante comercial (21 mg/kg de peso, ANTIOX), comparada con la concentración glucosa de los grupos de ratas sanas con 400 mg/kg de peso (SZ400) y sanas sin zarzamora (SC-) (Figura 18).

Durante la segunda semana de la fase experimental, la concentración de glucosa del grupo tratado con zarzamora (400 mg/kg de peso) fue menor (70 mg/dL) comparada con la

del grupo DC-, siendo ésta estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) (Anexo 16). Así mismo, durante la tercera semana se observó un incremento significativo en la concentración de glucosa de los grupos de ratas diabéticas con y sin zarzamora (DZ400 y DC-, respectivamente) con respecto a los grupos de ratas sanas. Por el contrario, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de ratas diabéticas tratadas con el antioxidante comercial (ANTIOX) y los grupos de ratas sanas (Figura 18), debido a la baja concentración de glucosa en el grupo antioxidante comercial. Sin embargo, este descenso de glucosa se ha observado comúnmente en animales diabéticos previos a la muerte. Así mismo, cabe aclarar que solo un animal de este grupo (ANTIOX) sobrevivió hasta el final de la tercera semana de la fase experimental.

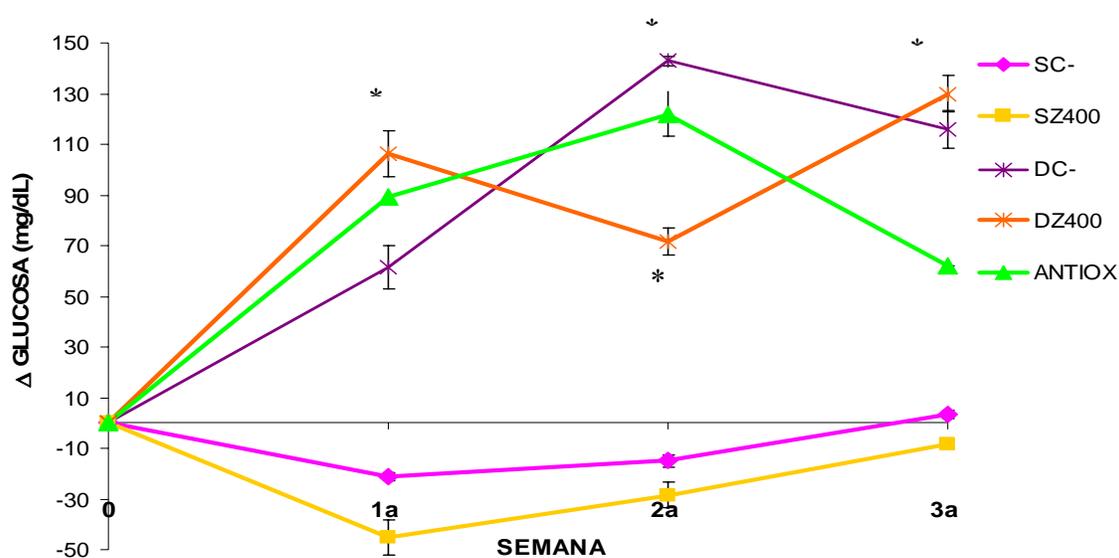


Figura 18. Cambio semanal en la concentración de glucosa de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

\* Diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo de ratas sanas control negativo (SC-).  
 \*\* Diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo de ratas diabéticas control negativo (DC-). Los datos muestran la media  $\pm$  el error estándar.

Durante la segunda semana de la fase experimental, la concentración de glucosa del grupo tratado con zarzamora (400 mg/kg de peso) fue menor (70 mg/dL) comparada con la

del grupo DC-, siendo ésta estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) (Anexo 16). Así mismo, durante la tercera semana se observó un incremento significativo en la concentración de glucosa de los grupos de ratas diabéticas con y sin zarzamora (DZ400 y DC-, respectivamente) con respecto a los grupos de ratas sanas. Por el contrario, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de ratas diabéticas tratadas con el antioxidante comercial (ANTIOX) y los grupos de ratas sanas (Figura 18), debido a la baja concentración de glucosa en el grupo antioxidante comercial. Sin embargo, este descenso de glucosa se ha observado comúnmente en animales diabéticos previos a la muerte. A este respecto, cabe aclarar que solo un animal de este grupo (ANTIOX) sobrevivió hasta el final de la tercera semana de la fase experimental.

En la figura 18 se observa claramente un aumento la concentración de glucosa de las ratas diabéticas durante el periodo experimental, comparada con las ratas sanas, indicando así la progresión de la enfermedad. También se observó que el consumo de zarzamora incorporado en el alimento disminuye la concentración de glucosa en ratas sanas. Esto es biológicamente importante, ya que en personas sanas puede ser peligroso un descenso de la concentración de glucosa que podría llevarlos a un estado de hipoglucemia. Esta disminución en la concentración de glucosa también se observó en el grupo de ratas sanas tratadas con zarzamora durante 7 días de experimentación (estudio agudo). Sin embargo, el hecho de no encontrar una disminución en la concentración de glucosa en ratas diabéticas con zarzamora (400 mg/kg de peso), podría deberse a que la zarzamora a concentraciones por arriba de 400 mg/dL ya no es capaz de disminuir o controlar la concentración de glucosa (Anexo 16).

#### *7.11. Ganancia de peso en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg/kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)*

En la primera semana, la ganancia de peso ganado fue estadísticamente mayor en las ratas sanas tratadas con zarzamora (SZ400) en comparación con todos los grupos de las ratas diabéticas; sin embargo, no hubo diferencia estadísticamente significativa en

comparación con las ratas sanas sin zarzamora (SC-). En la segunda semana, la pérdida de peso de los grupos diabéticos fue estadísticamente significativa, principalmente para el grupo de ratas diabéticas tratadas con antioxidante, en comparación con los grupos de ratas sanas. Para la tercera semana de tratamiento, el peso de las ratas diabéticas disminuyó significativamente en comparación con los grupos de ratas sanas (Figura 19). Esto indica que la administración de zarzamora no evita la pérdida de peso durante el periodo experimental, lo cual es un indicativo de la progresión de la enfermedad y clínicamente es un claro síntoma de la presencia de diabetes y un mal cuidado de la misma, ya que los grupos de animales diabéticos presentaron concentraciones elevadas de glucosa (> 400 mg/dL).

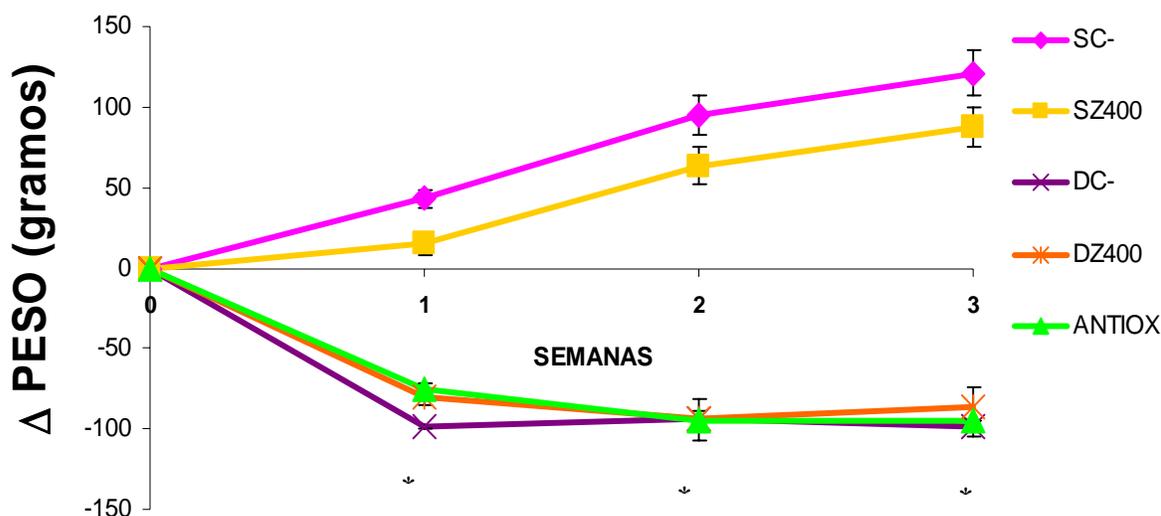


Figura 19. Ganancia o pérdida de peso semanal de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg/kg) en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

\* diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.001$ ) con respecto al grupo de ratas sanas sin tratamiento (SC-). Los datos muestran la media  $\pm$  el error estándar.

### 7.12 Consumo de alimento y agua en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento (400 mg/kg de peso) durante una fase experimental subcrónica (21 días)

Durante la primera semana, el consumo promedio diario de alimento en los grupos diabéticos fue mayor (40 % para el grupo DZ400 y 60 % para el grupo ANTIOX) en comparación con los grupos de ratas sanas. Entre los grupos de ratas sanas, el grupo tratado con zarzamora (SZ400) consumió más alimento (32%) que las ratas sanas sin tratamiento (SC-) quizá probablemente a que la zarzamora podría incrementar el apetito.

Durante la segunda semana de tratamiento, el consumo promedio de alimento diario en los grupos diabéticos fue mayor (37 % para el grupo DZ400 y 49 % para el grupo DC-) en comparación con los grupos de ratas sanas, exceptuando al grupo de ratas diabéticas tratadas con el antioxidante (ANTIOX). Sin embargo, lo anterior fue debido a la muerte de 5 ratas, mientras que en los grupos diabéticos con y sin tratamiento, 3 de las 10 ratas murieron durante este periodo. En este periodo permaneció la tendencia en el consumo entre los grupos de ratas sanas.

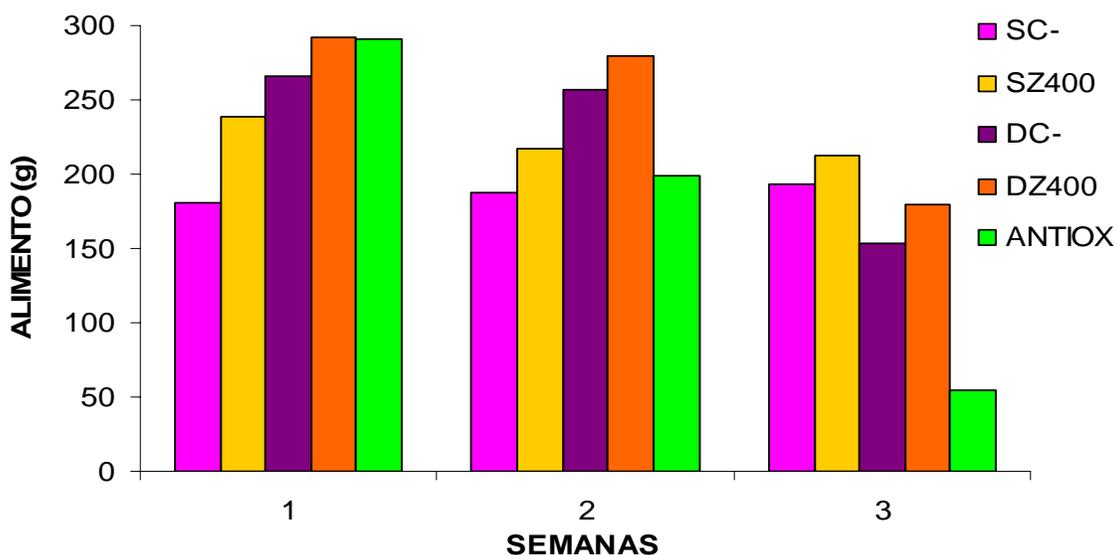


Figura 20. Consumo de alimento en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento (400 mg/kg de peso) durante una fase experimental subcrónica (21 días).

Finalmente, el consumo de alimento permaneció constante para los grupos de ratas sanas durante la última semana de tratamiento. Sin embargo, disminuyó el consumo de

alimento en los grupos de ratas diabéticas (7 % para el grupo DZ400 y 71% para el grupo ANTIOX), esto es debido a que en el grupo de ratas diabéticas ANTIOX solo se cuantificó el consumo de una rata que sobrevivió durante el periodo experimental, en el grupo de diabéticas sin tratamiento (DC-) sobrevivieron 4 ratas y en el grupo de diabéticas con tratamiento (DZ400) sobrevivieron 3 ratas de 10 ratas cada grupo (Figura 20).

El consumo de agua en la primera semana para los grupos de ratas diabéticas fue mayor que el de ratas sanas; esta misma tendencia se observó a lo largo de la fase experimental, excepto en la tercera semana para el grupo de antioxidante (ANTIOX), cuyo consumo se refiere únicamente a una rata que sobrevivió en este grupo. No se mostraron diferencias en el consumo de agua entre los grupos de ratas sanas (Figura 21).

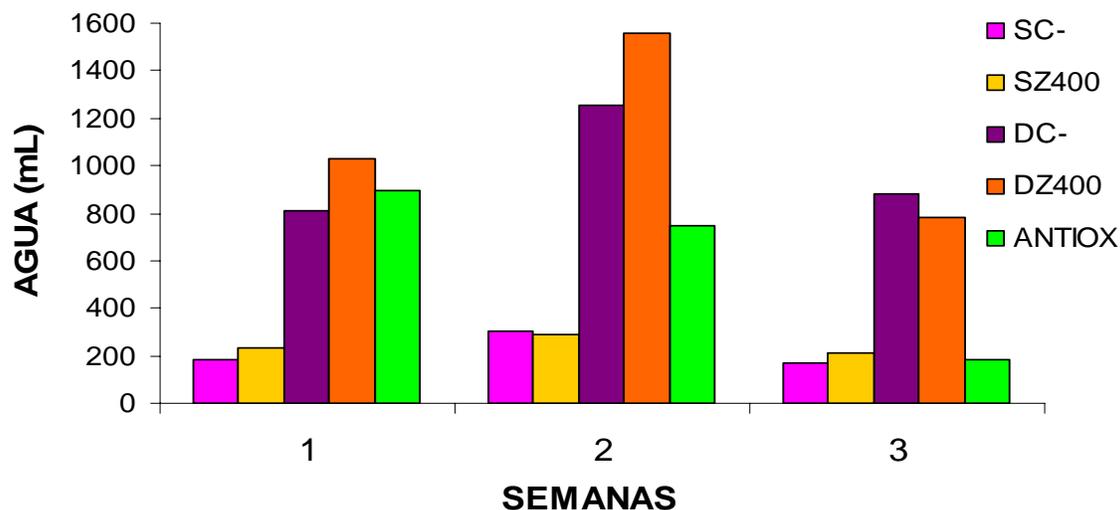


Figura 21. Consumo de agua en ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento (400 mg/kg de peso) durante una fase experimental subcrónica (21 días).

Los cuatro signos clásicos de la diabetes mellitus son poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. En base a los resultados en este trabajo en cuanto al consumo de agua y alimento la administración de zarzamora incorporada en el alimento a concentraciones de glucosa elevadas (400 mg/dL) no es capaz de corregir los signos de la diabetes como la polidipsia, la polifagia y la pérdida de peso en un experimento subcrónico. Por lo anterior, la zarzamora podría ser usada para el control de la glucosa en pacientes prediabéticos o diabéticos controlados cuyas concentraciones de glucosa estén alrededor de 200 mg/dL.

En este trabajo, debido a la muerte de varias ratas de algunos grupos y a la sobrevivencia de una rata en el grupo diabético tratado con el antioxidante comercial (ANTIOX), fue necesario realizar un análisis de sobrevivencia.

*7.13. Análisis de sobrevivencia de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)*

En el cuadro 6 se muestra el número de animales que iniciaron el tratamiento y los que sobrevivieron cada semana durante el período experimental. Mediante un análisis estadístico por medio de Chi-cuadrada se observó una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre el número de sobrevivientes en los diferentes grupos.

Cuadro 5. Número de ratas sanas y diabéticas sobrevivientes en cada semana tratadas diariamente con zarzamora incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

GRUPO/ TIEMPO	INICIO	7 DÍAS	8 - 14 DÍAS	15 - 21 DÍAS
SC-	5	5	5	5
SZ400	5	5	5	5
DC-	10	7	4	4
DZ400	10	7	6	3
ANTIOX	10	5	4	1

Posteriormente, mediante la prueba de Gehan-Breslow para el análisis de curvas de sobrevivencia, se observó que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las curvas de sobrevivencia de cada grupo (Figura 22). Para aislar el grupo o los grupos que difieren de los otros grupos, se realizó una comparación múltiple por el método de Holm-Sidak encontrándose que existe una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos de ratas sanas con y sin tratamiento con el grupo de ratas tratadas con el antioxidante, esto quiere decir que las primeras tienen una mayor probabilidad de sobrevivencia que las ratas tratadas con el antioxidante.

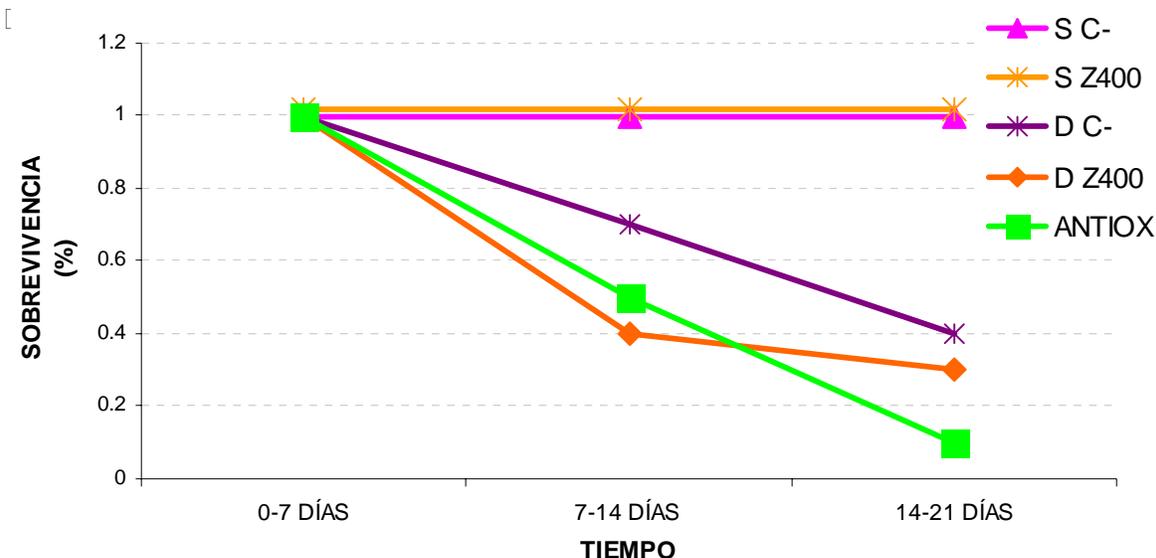


Figura 22. Curva de sobrevivencia semanal de ratas sanas y diabéticas tratadas a diariamente con zarzamora incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

\* = diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) comparado con los grupos de ratas sanas con y sin tratamiento.

Por otro lado no existe diferencia significativa entre los grupos diabéticos, esto es, que todos los grupos tienen la misma probabilidad de sobrevivir independientemente del tratamiento, ya que la presencia, la alta concentración de la glucosa y el daño físico como progresión de la diabetes es decisivo en la sobrevivencia de estos grupos. Con lo anterior cabe destacar que la sobrevivencia de las ratas depende en gran medida de la concentración de glucosa, ya que si se realiza un comparativo entre el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento en el estudio agudo con las análogas en el estudio subcrónico en los mismos 7 días, murió el 50% de las ratas diabéticas del estudio subcrónico. Debido a lo anterior, y a que solo sobrevivió un animal en el grupo ANTIOX, este grupo se eliminó de los análisis subsecuentes.

*7.14 Concentración de colesterol y triglicéridos de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora a dosis de 400 mg /kg de peso incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)*

Las determinaciones de las concentraciones de colesterol y triglicéridos se realizaron al final del periodo experimental, encontrándose una concentración estadísticamente mayor de colesterol en las ratas del grupo diabético sin tratamiento (DC-) ( $P < 0.05$ ). Aunque no fue estadísticamente significativo, se encontró una menor concentración de colesterol en el grupo diabético tratado con zarzamora (DZ400) comparando con el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento (DC-), indicando que la administración de zarzamora a dosis de 400 mg/kg de peso corporal ayuda a disminuir la concentración de colesterol sanguínea (Figura 23a), aunque como se vio anteriormente no es capaz de controlar otros signos característicos de la diabetes.

En cuanto a la concentración de triglicéridos, los grupos de ratas diabéticas sin tratamiento (DC-) y con zarzamora (DZ400) son estadísticamente mayores ( $P < 0.05$ ) comparados con la concentración del grupo de ratas sanas sin tratamiento (SC-). (Figura 23b). Demostrando así, que en este caso el tratamiento con zarzamora a dosis de 400 mg/kg de peso corporal no disminuye la concentración de triglicéridos en suero.

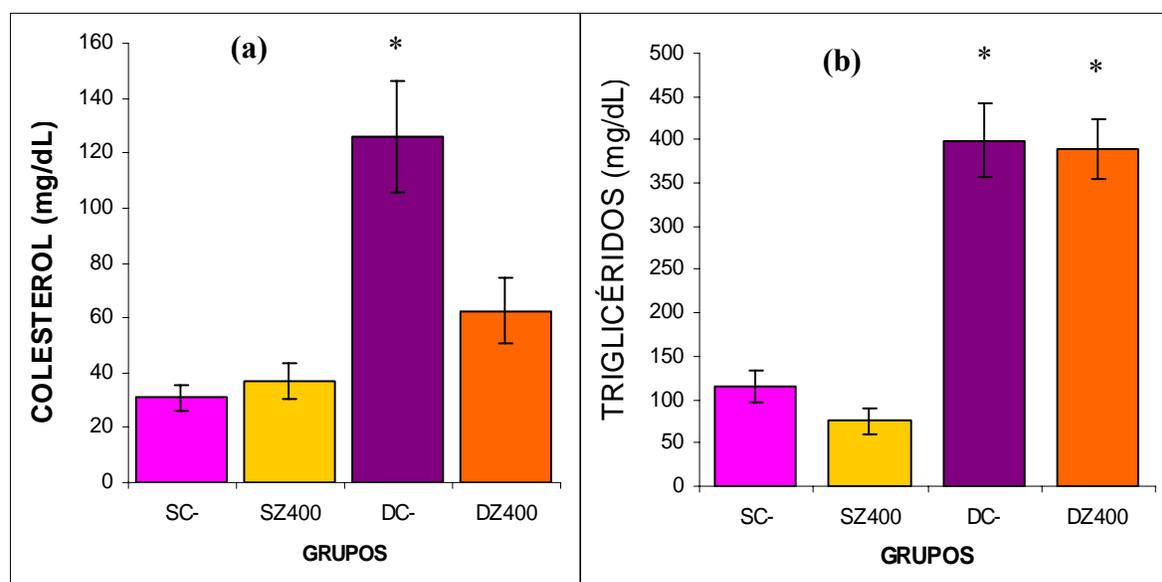


Figura 23. Concentración de colesterol (a) y triglicéridos (b) en suero de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

\* = diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al SC-. Los datos muestran la media de las muestras  $\pm$  el error estándar.

Lo anterior indica que los niveles de colesterol no varían tan rápidamente durante la progresión de la enfermedad, pero si los niveles de triglicéridos, ya que biológicamente éstos son utilizados como fuente de glucosa en la gluconeogénesis. Esto corrobora por que los problemas cardiovasculares en los pacientes diabéticos son muy comunes, debido a que los altos niveles y la movilización de estos lípidos se acumulan en las arterias, bloqueándolas y provocando con esto enfermedades al corazón.

#### *7.15 Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)*

En cuanto a la actividad enzimática de GST en hígado, se encontró que existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los tratamientos por medio de las pruebas de medias de rango múltiple por el método Tukey (Figura 24).

El grupo sano con tratamiento (SZ400) muestra una actividad de GST mayor que el resto de los grupos. Lo anterior indica que la actividad basal (grupo SC-) de GST en ratas sanas aumentan con el consumo de zarzamora (400 mg/ kg de peso corporal). Por otro lado, la actividad basal (grupo DC-) de GST en ratas diabéticas aumenta con el consumo de zarzamora a la misma dosis (grupo DZ400) (Figura 24).

Sin embargo, en cuanto a la actividad de GST en riñón (Figura 24 y Anexo 17) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos ( $P > 0.05$ ). Comprobando así que la actividad hepática de GST en ratas diabéticas disminuye, ya que este órgano es el principal destoxicador de EROS y, con base en estudios anteriores (Raza y col., 2000; Latha y Pari, 2003), se demuestra que los niveles de GST en ratas diabéticas están disminuidos.

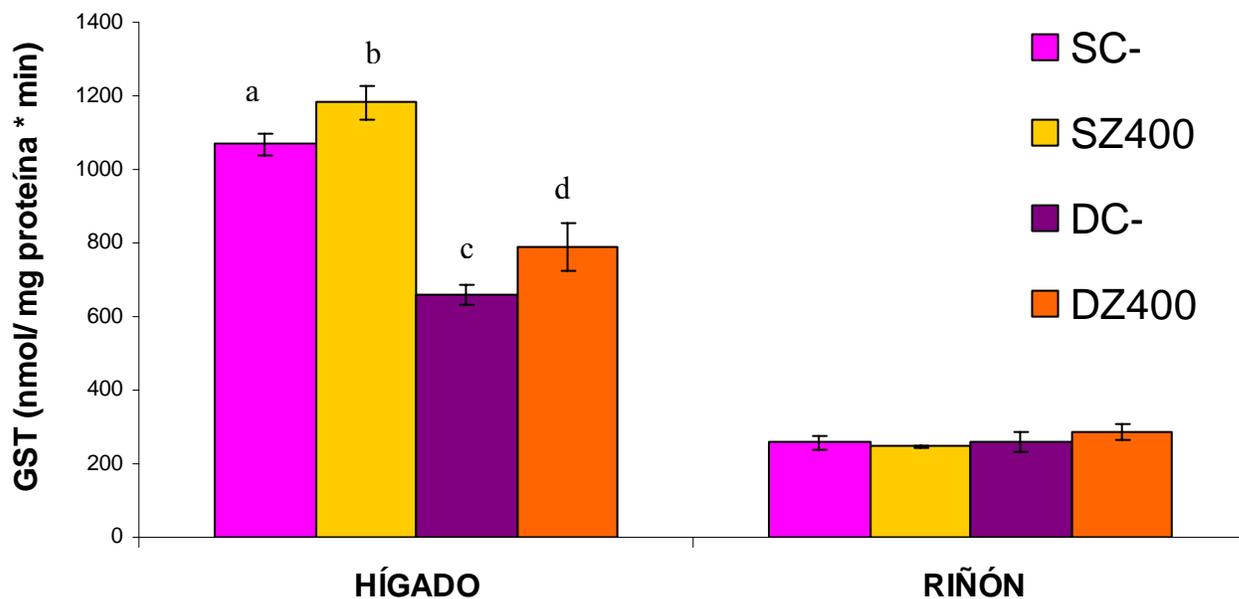


Figura 24. Actividad enzimática de GST en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días). Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $P < 0.005$ ). Los datos muestran la media de las muestras  $\pm$  el error estándar.

Un estudio realizado por Presterá y colaboradores (1993) muestra que la inducción de GST en células animales expuestas a una variedad de antioxidantes fenólicos y compuestos electrofílicos responde a la unión de factores de transcripción como Nrf2, Jun y Fos, entre otros, a los elementos de respuesta a antioxidantes y electrofílicos, los cuales se encuentran en la región promotora de los genes que codifican para enzimas antioxidantes y detoxificación como la GST. Sin embargo, aún es necesario conocer las proteínas que específicamente interactúan con estos elementos y median la acción de estos inductores enzimáticos. Por lo que la presencia de compuestos fenólicos en la zarzamora podría activar este mecanismo para inducir la expresión así como la actividad de GST.

*7.16 Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)*

En cuanto a la concentración de GSH en hígado no se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $P > 0.05$ ) (Figura 25). Sin embargo, se observa una concentración de GSH ligeramente mayor en el grupo de ratas sanas tratadas con zarzamora (400 mg/kg de peso), comparada con el grupo de ratas sanas sin tratamiento, indicando así que en ratas sanas la concentración basal de GSH aumenta con el consumo de zarzamora (400 mg/kg de peso). Debido a que la zarzamora contiene gran cantidad de compuestos fenólicos, se ha demostrado que el consumo de estos compuestos aumentan la inducción hepática de la concentración de GSH en ratas sanas (Yeh y Yen, 2005).

Por otro lado, la concentración basal de GSH en ratas diabéticas disminuye ligeramente como consecuencia de la enfermedad, comparados con la concentración de ratas sanas, mientras que el consumo diario de zarzamora en la dieta no es capaz de inducir la síntesis de GSH para restablecer la concentración basal (Figura 25 y Anexo 17).

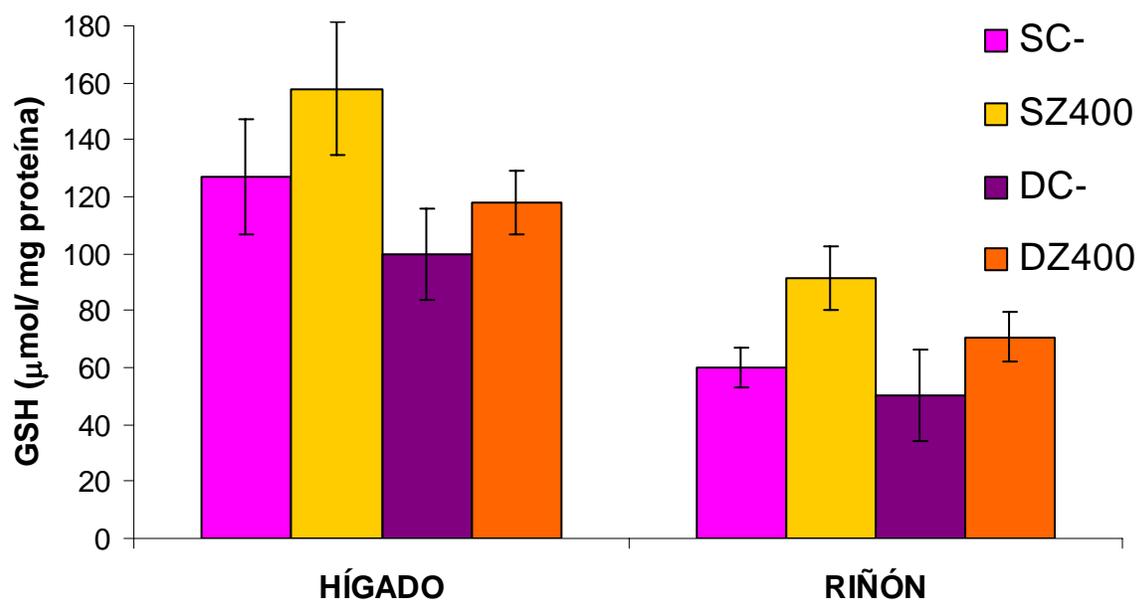


Figura 25. Concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con zarzamora a dosis de 400 mg /kg de peso administrada diariamente en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

Los datos muestran la media de las muestras  $\pm$  el error estándar.

Al igual que en hígado, la concentración basal de GSH en riñón de ratas sanas aumenta con el consumo diario de zarzamora (400 mg/kg de peso), mientras que en ratas diabéticas la concentración basal de GSH es menor como consecuencia de la enfermedad. Sin embargo, la concentración renal de GSH aumentó en ratas diabéticas que recibieron zarzamora comparando con la concentración renal de GSH de ratas diabéticas sin ningún tratamiento, comprobando así el efecto inductor con el consumo de zarzamora. Así mismo, en la figura 25 se puede observar que la concentración de GSH en hígado es mayor que en el riñón, debido posiblemente a la gran capacidad detoxificadora de este órgano. La alta concentración intracelular de GSH disminuye el riesgo de daño celular bajo condiciones de estrés oxidativo (Dickinson y col., 2003), por lo cual, es recomendable mantener o aumentar las concentraciones de GSH con el consumo de zarzamora.

#### *7.17 Actividad enzimática de SOD y CAT en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días)*

Dentro del mecanismo de defensa antioxidante sobre las EROs, las enzimas SOD y CAT son enzimas catalizadoras claves pues constituyen la primera fase de defensa antioxidante, ya que la SOD cataliza la reacción de destrucción de  $O_2^-$  mediante su transformación en  $H_2O_2$ , el cual puede ser destruido posteriormente por la actividad de CAT, seguido por la actividad de la GPx (Fridovich, 1998). Por lo tanto, el incremento en la actividad de estas enzimas antioxidantes puede promover la eficiencia detoxificadora de estos órganos (Yeh y Yen, 2005).

En hígado, la actividad de SOD es estadísticamente menor ( $P < 0.05$ ) en el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento (DC-) con respecto al grupo de ratas sanas sin tratamiento (SC-). Entre los demás grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). Demostrando así, que el consumo de zarzamora (400 mg/kg de peso) puede ayudar a mantener la actividad basal de la SOD en hígado. En cuanto a la actividad renal de SOD, no se encontraron diferencias estadísticas entre los diferentes grupos ( $P > 0.05$ ) (Figura 26 y Anexo 17).

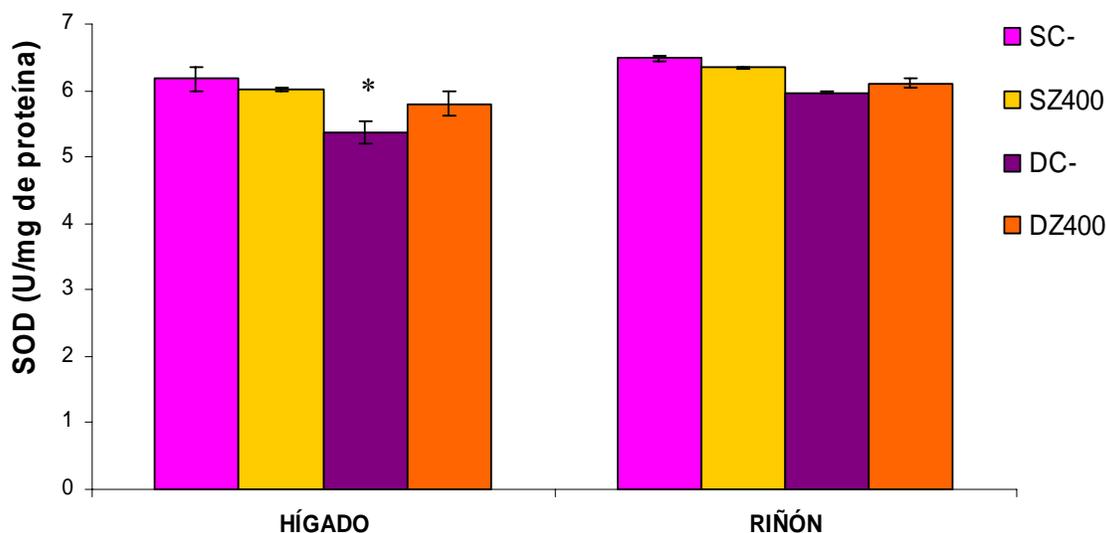


Figura 26. Actividad enzimática de SOD en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

Los datos muestran la media de las muestras  $\pm$  el error estándar.

Con los resultados anteriores se demuestra que ratas diabéticas inducidas con STZ tienen una actividad menor de SOD hepática que las ratas sanas, y que la actividad renal de SOD no se altera en ratas diabéticas ni en sanas debido a que el tiempo de tratamiento de todos los grupos no fue suficiente para observar cambios. Lo anterior sugiere extender el tiempo de experimentación para encontrar niveles alterados en la actividad de esta enzima, ya que se ha encontrado que la actividad de SOD en el riñón está dentro de los niveles “normales” después de 6 semanas de la administración de la STZ (Maritim y col., 1999), pero están elevados después de las 6 a 12 semanas en un estado diabético (Kedziora y col., 2000). En el hígado, la actividad de SOD disminuye entre la tercera y cuarta semana con diabetes (Aragno y col., 1999), pero es normal o elevada 8 semanas después de la administración de la STZ (Jang y col., 2000).

Cabe señalar que los cambios en la actividad de SOD en los diferentes tejidos dependen del químico inductor de la diabetes, la edad del animal, la duración de la diabetes

y el tejido analizado. Además, las alteraciones en los niveles de SOD en animales diabéticos pueden normalizarse con un tratamiento farmacológico diabetogénico (Maritim y col., 2002). Por lo que probablemente no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratas diabéticas con los grupos de ratas sanas. Estos resultados serán necesarios tomar en cuenta en posteriores estudios.

Con respecto a la actividad hepática de CAT, se encontró un aumento estadísticamente significativo de esta enzima en el grupo de ratas diabéticas tratadas con zarzamora (400 mg/kg de peso), comparado con el grupo sano sin tratamiento (SC-), indicando con esto que el consumo de zarzamora en un estado diabético puede mantener y aumentar la actividad basal de CAT en hígado. En cuanto a la actividad renal de CAT, se encontró un aumento estadísticamente significativo en el grupo de ratas sanas tratadas con zarzamora (400 mg/kg de peso), comparado con el grupo sano sin tratamiento (SC-), mostrando nuevamente que el consumo de zarzamora a dosis de 400 mg/kg de peso aumenta la actividad basal de CAT en riñón. Aunque estadísticamente no hubo diferencia, se observa una disminución en la actividad de CAT en el grupo de ratas diabéticas sin ningún tratamiento, con respecto al grupo SC- en ambos órganos, indicando con ello que el estado diabético disminuye la actividad de CAT (Figura 27 y Anexo 17).

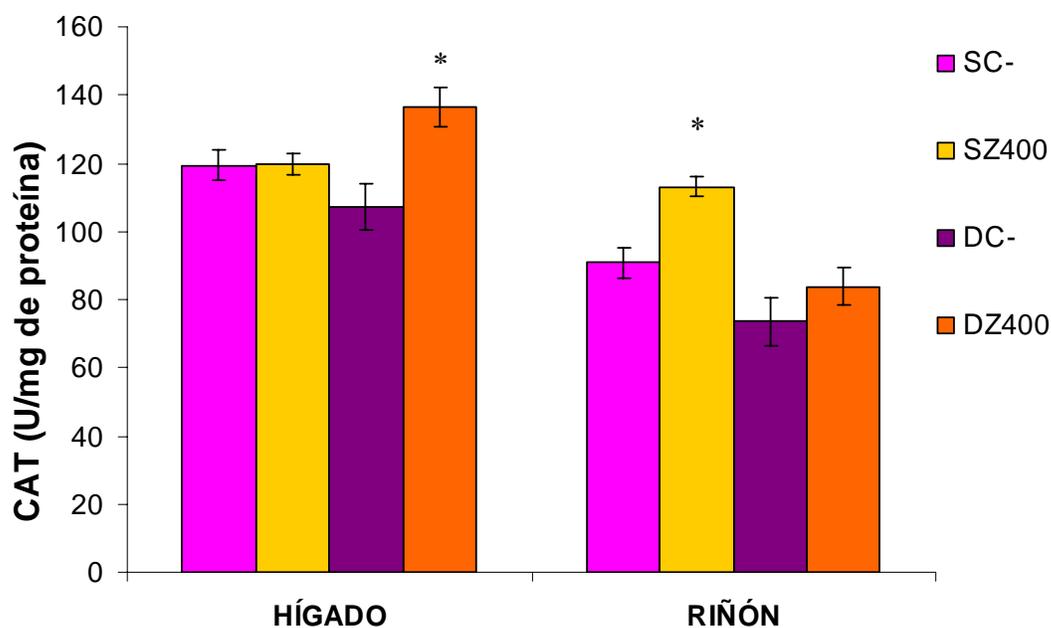


Figura 27. Actividad enzimática de CAT en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas diariamente con zarzamora (400 mg /kg de peso) incorporada en el alimento durante una fase experimental subcrónica (21 días).

\* = diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo SC-. Los datos muestran la media  $\pm$  el error estándar.

La actividad de CAT disminuye en riñón (Maritim y col., 1999; Kedziora y col., 2000) e hígado (Aragno y col., 1999) de ratas diabéticas después de la administración de STZ, pero esta actividad se encuentra elevada después de las 6 a 12 semanas en un estado diabético. En hígado se ha observado que la actividad de CAT disminuye entre la tercera y cuarta semana (Kedziora y col., 2000). Sin embargo, Latha (2003) encontró que a las 3 semanas de tratamiento con un compuesto fenólico, las ratas diabéticas tienen menor actividad enzimática de CAT en hígado y riñón, comparada con grupos de ratas sanas.

El mecanismo por el cual las enzimas SOD y CAT son inducidas o moduladas después de la administración de la zarzamora, se basa probablemente en el efecto inductor ya demostrado para algunos fenoles y flavonoides. Se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que ambos compuestos tienen la propiedad de reaccionar con radicales libres eliminándolos, de inhibir enzimas que generan radicales libres y/o estimular las enzimas de fase 2, las enzimas antioxidantes y los sistemas celulares detoxificantes que eliminan a los radicales libres (Maritim y col., 1999). Igualmente, los fenoles y flavonoides actúan sobre algunos procesos enzimáticos vinculados a los mecanismos celulares de óxido-reducción; aumentan los niveles tisulares del mRNA de la SOD, e incrementan asimismo la producción y regeneración de GSH, mediante estimulación de la gamma-glutamilcisteína-sintetasa (GSSG) y la promoción de otras enzimas, como la GPx, la GR, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la CAT y sintasa del óxido nítrico (Sewerynek y col., 1996).

La activación a nivel trascricional de enzimas de fase 2 es regulada por los elementos de respuesta a antioxidantes (AREs) que se encuentran en las regiones promotoras de los genes que codifican para estas enzimas. Diversos estudios moleculares demuestran que el factor de transcripción Nrf2 regula positivamente a los AREs, mediando la expresión de genes de enzimas de fase 2 (Katsuoka y col., 2005). Yeh y Yen (2005)

concluyeron que la vía de activación y el incremento de la expresión de Nrf2 están mediados por el consumo de compuestos fenólicos y, que a su vez, éste juega un papel muy importante para la inducción y activación de genes de enzimas antioxidantes. Sin embargo el consumo de cierto tipo de compuesto fenólico puede inducir selectivamente al mRNA de ciertas enzimas como SOD, CAT, GPx y GST, así como la regulación cuesta arriba de los genes de transcripción para factores de transcripción como el Nrf2. En base a lo anterior, sería interesante determinar el mecanismo por el cual puede inducirse la actividad de las enzimas antioxidantes, así como encontrar el o los componentes de los frutos responsables de aumentar la actividad antioxidante de estas enzimas.

En base a su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, a la capacidad antioxidante medida a través del atrapamiento de radicales libres, así como a su actividad antioxidante medida a través de la inducción de enzimas antioxidantes en ratas sanas y diabéticas, el consumo de los frutos de arándano y zarzamora representa una alternativa biológicamente importante para el control del estrés oxidativo característico de la diabetes.

## VIII. CONCLUSIONES

- ◆ En base al contenido de compuestos antioxidantes, la zarzamora presentó el mayor contenido de fenoles, así como una mayor capacidad antioxidante (medida por los métodos de ABTS<sup>•+</sup> y FRAP) en comparación con el arándano. Estos resultados podrían estar implicados en la mayor inducción de enzimas antioxidantes (GST, SOD y CAT) y la concentración de GSH en el hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas tratadas con la zarzamora, tanto en estudios agudos (7 días) como subcrónico (21 días).
  
- ◆ El efecto hipoglucemiante de la zarzamora depende de la progresión de la diabetes, ya que la administración de zarzamora durante 7 días disminuye los niveles de glucosa, tanto en ratas sanas como en diabéticas. Sin embargo, no fue posible demostrar un efecto hipoglucemiante importante de este fruto en los grupos de ratas diabéticas con concentraciones de glucosa > 300 mg/dL obtenidas durante el estudio subcrónico.
  
- ◆ En base al efecto inductor de enzimas antioxidantes, los resultados del presente trabajo recomiendan el consumo de los frutos de arándano y zarzamora como parte de una dieta habitual para la población en general. Sin embargo, en las personas diabéticas el consumo de los mismos debe acompañarse de un tratamiento hipoglucemiante.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Aebi, H. (1983). Catalase *in vitro*. Methods in Enzimology. Packer, L. San Diego press. *Acedemic Press Inc* **105**:121-6.
- Alarcón, A., Román, R.R., Pérez, G.S., Aguilar, C.A., Contreras, W.C., and Flores, S.J. (1998). Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J Ethnopharmacol.* **61**:101-10.
- Allen, F. M. (1927). Blueberry leaf extract: physiologic and clinical properties in relation to carbohydrate metabolism. *J Am Med Ass.* **89**:1577-81.
- Ansher, S. S., Dolan, P., and Bueding, E. (1986). *Hepatology.* **3**:392-935.
- Aragno, M., Tamagno E., Gatto, V. (1999). Dehydroepiandrosterone protects tissues of Streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radical Biol Med.* **26**:1467-1474.
- Aust, S., and Thomas, C. (1983). Free radicals and environmental toxins. *Annals Emerg Med.* **15**:1075-1083.
- Awika, J. M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistr.y.* **51**:6657–6662
- Baker, M. S., Bolis, S., and Lowther, D.A. (1994). Oxidation of articular cartilage glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) occurs *in vivo* during carrageenin-induced arthritis. *Agents Actions.* **32**:299-305.
- Baynes, J. W. and Thorpe, S.R. (1991). Role of stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes.* **48**:1-9.
- Baynes, J.W. (1995). Reactive oxygen in the etiology and complications of development of diabetes. Drug, diet and disease. Volume 2: Mechanistic approach to diabetes. Flan, P.R. and Hertfordshire, I.C. (Eds.). Ellis Horwood Limited. Editorial, ciudad, 203-31.
- Baynes, J.W. (1999). Role of stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* **40**:405-12.
- Begley, S. (1994). Beyond vitamins, *Newsweek.*41-45.
- Benson, A. M., Batzinger, R.P., Ou S-Y., Bueding, E., Cha, Y.N., and Talalay, P. (1978). Elevation of the hepatic glutathione S-transferase activities and protection against

- mutagenic metabolites of benzo (a) pyrene by dietary antioxidants. *Cancer Res.* **38**:4486-4495.
- Berhane, K., Widersten, M., Engstrom, A., Kozarich, J., Manervik, B. (1994). Detoxification of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl Acad Sci USA.* **9**:1480-1484.
- Bieg, S. and Lernmark, A. (1999). Animal models for insulin-dependent diabetes mellitus. En: Totowa, NJ. Contemporary endocrinology autoimmune endocrinopathies. *Human Press* **2**:113-139.
- Bohm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., and Krok, A. (1998). Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss.* **2**:147-63.
- Bolli, G. B., Mrach, D., Park, G. D. (1999). Insulin analogue and their potential in the management of diabetes mellitus. *Diabetology.* **42**:1151-67.
- Bolzan, A. D., and Bianchi, M.S. (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mut. Res.* **512**:121-34
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* **56**:317-33.
- Bulkley, G. B. (1983). The role of free radicals in human disease processes. *Surgery.* **94**, 407-411.
- Burcelin, R., Eddouks, M., Maury, J. (1995). Excessive glucose production, rather than insulin resistance, accounts for hyperglycemia in recent-onset Streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia.* **38**:283-290.
- Cignarella, A., Caval, A., and Puglisi, L. (1996). Novel lipid lowering properties of *vaccinium myetillus* leaves, a traditional antidiabetic treatment in several model of rat dyslipidemia: A comparison with ciprofibrato. *Thrombosis Res.* **84**:5, 311-22.
- Ceriello A. (2003). The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetologia*; **46**:9-16.
- Cerimele D, Celleno L, Serri F. (1990). Physiological changes in ageing skin. *Br J Dermatol.* **122** (suppl. 25): 13-20.
- Connor, A. M., Luby, J. J., Tong, C.B.S., (2002). Variability in antioxidant activity in blueberry and correlations among different antioxidant activity assays. *J Amer Societ Horticult S.* **127**:238-244.

- Dewanto, V., Wu, X. and Liu, R. (2002). Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* **50**: 4959–4964.
- Dickinson, D. A., Moellering, D. R., Iles, K. E., Patel, R. P., Levonen A. L., Wigley, A. Darley-Usmar V. M. and Forman, H. J. (2003). Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. *Biol Chem.* **384**:527–537.
- Ellman, G. (1959). Determination of glutathione. *Arch Biochem Biophys.* **82**:70-79.
- Emerole, G., Neskovic, N., Dixon, R. (1979). The detoxification of aflatoxin B1, with glutathione in the rat. *Xenobiotica.* **9**:737-743.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of diabetes mellitus (1997). *Diabetes Care.* **20**:1183.
- Ferrandiz, M. L. and Alcaraz, M. J. (1991). Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions.* **32**:283-288.
- Formica, J.V, Regelson, W. C. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* **33**:1061-1080 .
- Freeman, B. A., and Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Investig.* **47**, 412-426.
- Frohne, D., and Heidelbeerblätter, W. (1999). Teedrogen. Wissenschaftliche Verlagsgesell., Stuttgart. M Wichtl (ed). 217-219).
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science.* **201**:875-880.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol.* **201**:1203-1209.
- Groot, H., Rauen, U. (1998). Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol.* **3**:249-255.
- Guerrero, R. y Rodríguez, M. (1996). Diabetes mellitus: un análisis de mortalidad por causa básica. *Rev. Med IMSS* **34**(1): 43-48.
- Guthemberg, C. and Mannervik, B. (1981). Glutathione S-transferase from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase from erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* **661**:255-260.
- Gutteridge, J. and Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS.* **15**:129-135.
- Haber, F., and Weiss, Y. (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by ion salts. *J Proc Roy Soc.* **147**:332-351.

- Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* **249**:7130-7139.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* **246**:501-514.
- Halliwell, B., Hoult, J. and Blake, D. (1988). Oxidants, inflammation and the anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* **2**: 2867-2873.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (1989). Lipid peroxidation: a radical chain reaction. *Free Rad Biol Med.* **12**:188-266.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (1989). Free radical and metal ions in human diseases. In: Free radicals in biology and medicine. 2<sup>nd</sup> ed. Clarendon Press. Oxford: University. 156-210.
- Halliwell, B., and Cross, C. (1991). Reactive oxygen species, antioxidants and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med.* **157**:29-31.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. and Cross, C. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* **119** (6): 598-620.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. and Cross, C. (1995). The definition and measurement of antioxidant in biological systems. *Free Rad Biol Med.* **18**:125-126.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutrition.* **16**: 33-50.
- Hassan, J., Mhamed, M., Mohamed, E. (2002). Hypoglycemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and Streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacology.* **81**:351-356.
- Hassing, A., Liang, W.X., Schwabl, H., and Stampfli, K. (1999). Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses.* **52**:479-481.
- Hayes, J and Strange, R. (1995). Potential contribution of the glutathione-S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res Commun.* **22**:193-207.
- Hirono I (1987). Bioactive molecular. Naturally occurring carcinogenes of plant origin. Toxicology pathology and Biochemistry. *Biol Pharm Bull.* **2**:120-158.

- Howard, L. Clark, J., and Browmiller, C. (2003). Antioxidant capacity and phenolic content in blueberries as affected by genotype and growing season. *J Sci Food Agric* **83** (12):1238-1247.
- Hsu, F., Liu, I., Kuo, D., Chen, W., Su, H., and Cheng, J. (2003). Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetics rats. *J Nat Prod.* **66**:788-792.
- Huges, B., and Rodríguez, G. (2001). Animales de laboratorio en la endocrinología: Biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1. *Rev Cuban Endocrinol* **12** (3):168-177.
- Hyslop, P., Hinshaw, D., Halsey, W. (1988). Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* **236**:1665-1675.
- Illnait, P.J. (1997). La dislipidemia en el paciente diabético. Parte I: Bioquímica Patológica. *Rev Cub Med Gen Integr.* **13**(4):372-377.
- Jang Y., Sonn J., Shin Y. (2000). Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabeti rats. *Pharmacol Res.* **42**:361-371.
- Jara, H., Pérez, J., Saura, F. (2006) Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Inter.* **39**:791–800.
- Kannel, W., and McGee, D., (1979). Diabetes and cardiovascular disease: the Framingham Study. *J Am Med Assoc* **241**:2035-2038.
- Katsuoka, F., Motohashi, H., Engel, J. D., Yamamoto, M. (2005). Nrf2 transcriptionally activates the mafG gene through an antioxidant response element. *J Biol Chem.* **280**:4483–4490.
- Kawamura, M., Heinecke, J., and Chai, A. (1994). Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by superoxide dependent pathway. *J Clin Invest.* **94**(2):771-778.
- Ketterer, B. and Meyer, D. (1989). Glutathione transferases: a possible role in the detoxification and repair of DNA and lipid hydroperoxides. *Mutat Res* **214**:33-40.
- Kriengsak, T., Unaraj, B., Crosbyb K. (2005). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Agric and Food Chem.* **23**:98-103
- Larsen, C., Erlich M, Discoll C, Gross WB. (1985). Aflatoxinantioxidant effects on growth of young chicks. *J Poultry Sci.* **64**, 2287-2291.
- Marles, RJ y Farnsworth, N. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine.* **2**:137-189.

- Latha, M. (2003). Modulatory effect of *Scoporia dulcis* in oxidative stress-induced lipid peroxidación in Streptozotocin diabetics rats. *J Med food*. **4**, 379-386.
- Lemus, I., García, R., Delvillar, E., Knop, G. (1999). The hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy Research*. **13** (2):91-94.
- Lindahl, M., Tagesson C (1997). Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2. *Inflammation*. **21**:347-356.
- Liu, M., Li, X., Weber, C., Lee, C., Brown j, Liu R. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J Agric Food Chem*. **50**:2930-2956.
- Maritim, A., Moore, B., Sanders, R. (1999). Effects of melatonina on oxidative stress in streptozotocin induced diabetes rats. *Int J Toxicol*. **18**:161-166.
- Maritim, A., Moore, B., Sanders, R. (2002). Diabetes, Oxidative Stress, and antioxidants: a review. *Int J Toxicol*. **17**:24-38.
- Marles, R. y Farnsworth, N. (1995). Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine*. **2**, 137-189.
- McCarty, A., Etcheverry, S. and Cortizo, A. (2001). Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor- I and its binding proteins: Role of osteoblast development. *Acta Diabetol* **38** (3):113-122.
- McCord, J. and Fridovich, Y. (1969). Superoxide Dismutase, an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem*. **244**:6049-6055.
- McCormick, C. (1990). Symposium: liver metabolism in the chicken (Introduction). *Poultry Sci*. **69**:1182.
- Meister, A. and Anderson, M. (1983). *Glutathione*. *Ann Rev Biochem*. **52**:711-760.
- Meister, A. (1994). Glutathione-Ascorbic Acid Antioxidant System in Animals. *J of Biol Chem*. **269**:9397-9400.
- Meyers, K., Watkins, C., Pritts, M., Liu, R. (2003). Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem*. **51**:6887-6892.
- Mgbodile, M., Holscher, M., Neal, R. (1975). A possible protective role for reduced glutathione in aflatoxin B1 toxicity: effect of pretreatment of rats with Phenobarbital and 3-methylcholanthrene on aflatoxin toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. **43**:128-142.

- Morazzoni, P. and Malandrino, S. (1988). Anthocyanins and their aglycons as scavengers of free radicals and antilipoperoxidant agents. *Pharmacol Res Comm.* **20**:254.
- Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., Frei, B., Wrolstad, R. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *Journal of Agric and Food Chem.* **50**:519-525.
- Murata, M., Takahashi, A., Saito, I. and Kawanishi, S. (1999). Site- specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin. *Biochem Pharm* **57**:881-887.
- Noroozi M, Angerson, W., Lean, M., (1998). Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am J Clin Nutr.* **67**:1210-1218.
- Ohyashiki, T., Ohtsuka, T., and Mohri, T. (1986). A change in the lipid fluidity of the porcine intestinal brush border membranes by lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* **861**:311-318.
- Omidreza, F. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “Ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. Italy. *Biochimica et biophysica.* 174-184.
- OMS, (1980). Expert committee on Diabetes mellitus. Second report. Technical report series 646. *World Health Organisation, Geneva*, 61.
- Pallardo, L. (1989). Diabetes Mellitus no insulinodependiente. *Lab Boehringer Mannheim.* **5**:236-238.
- Parr, A. and Bolwell, G. (2000). Phenols in the plant and in man, the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric.* **80**:985-1012
- Petterson, A., Jacob, H. and Lernmark, A. (1996). Lessons from the animals models: the BB rat. En: Palmer JP, ed. Diabetes prediction. Prevention and genetic counseling in IDDM. New York: John Wiley, 182-200.
- Prester, T., Holtzclaw, W., Zhang, Y. and Talalay, P. (1993) Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci* **90**:2965-2669.
- Prochaska, H., Santamarina, A. and Talalay, P. (1992). Rapid detection of inducers of enzymes that protects against carcinogens. *Proc Natl Acad Sci* **89**:2394-2398.
- Quezada, T., Jaramillo, F., Valdibia, A., Reyes, J., y col. (2002). Estudio comparativo de la concentración de glutatión reducido y actividades de la gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutatión en hígado y riñón de pollos y ratas. *Vet Mex.* **33**(2):125-135.

- Ramvalho, J., Marques, C., Pereira, P. and Mota, M. (1996). Role of glycation in humans lens protein structure change. *Eur J Ophthalmol.* **6**(2):155-161.
- Raza, H., Ahmed, I., John A., Shrama A. (2000). Modulation of xenobiotics metabolism and oxidative stress in chronic Streptozotocin induced diabetic rats fed with Momodica charatia fruit extract. *J Biochem Mol toxicol.* **3**:31-139.
- Ratty, A., Das, N. (1998). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol.* **39**:69-79.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:1231-1237.
- Renny, I., Núñez, C., López, E., Socarras, B., González, Z., Chávez, J., Clímaco, C., González, A., Suárez, G. (2001). Determinación de agentes antioxidantes séricos en diabéticos tipo 2. *J of Biol Chem.* **17**:4 1-10.
- Rice-Evans, C. and Hochstein, P. (1981). Alterations in erythrocyte membrane fluidity by phenylhydrazine- induced peroxidation of lipids. *Biochemi. Biophys. Res. Commun.* **100**:1537-1542.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **2**:152-159.
- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y., and Takahashi, H. (2003). Glucose toxicity in b-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes.* **52**:581-587.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol.* **16**:91-98.
- Secretaría de Salud, (2006). Dirección general de Evaluación del Desempeño. Dirección General de Información en Salud, subsecretaría de Innovación y Calidad. México. 46-47.
- Sellappan, S., Akoh, C., Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* **50**:2432-2438.
- Soong, Y. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. Singapore. *Food Chemistry.* **88**:411-417

- Spector, A. Aspects of the biochemistry of cataract. (1985). Maisel H. (Ed): The Ocular Lens: Structure Function and Pathology. New York: *Marcel Dekker*.**1**:405-438.
- Strange, R., Johnson, P., Lawton, A., Moulton, J., Tector, M., Tyminski, R., Cotton W. (1982). Studies on the variability of glutathione S-transferase from human erythrocytes. *Clin Chim Acta*.**120**:251-260.
- Subramanian, V. and Leelavionathan, P. (2002). Antioxidant effect of phaseolus vulgaris in Streptozotocin-induced diabetic rats. *Asia Pacific J Clinic Nutr*.**11**:206-209.
- Sudheesh S, Sandhya C, Sarah KA, Vijayalakshmi NR (1999). Antioxidant activity of flavonoids from Solanum melongena. *Phytother Res*. **13**:393-396
- Swatson-Fall., S., Day, C., Bailey, C., and Flatt, P. (1990). Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal streptozotocin diabetic mice. *Diabetologia* **33**(8):462-464.
- Sewerynek, E., Reiter, R., Melchiorri, D., Ortiz, G., Lewinski A. (1996). Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion. *Hepato gastroenterology*. **43**:898-903.
- Szkudelski, T. (2001). The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in  $\beta$  Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res*. **50**:536-546.
- Tadi, P. P. (1992). Anticarcinogenic, antitumor, and antifungal properties of allium sativum (garlic). *Diss Abstr Int*. **52**(08B):41-44.
- Talalay, P., De Long, M., and Prochaska, H. (1988). Identification of common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **85**:8261-8265.
- Tappel, A. ,L. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc*. **32**:415-438.
- Tiskow, G. (1995). Efecto del tratamiento con PC de soya sobre el funcionamiento de riñones de rata, sometidos a isquemia-reperfusion. Tesis de grado de Ph.Sc. Ediciones del CEA. Marín, R. Director de la Tesis de Grado.
- Thomas, C., and Reed, D. (1986). Effect of extracellular  $Ca^{++}$  omission on isolated hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **245**:493-500.
- Tsai, E., Hirsch, I., Brunzell, H. and Chait, A. (1994). Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation poorly controlled. IDDM. *Diabetes*. **43**(8):1010-10114.

- Van Acquire, S., Van den Berg, D., Tromp, M., Griffioen, D., Van Bennekom, W., Van der Vijgh, W. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.* **20**:331-342.
- Versphol, E. (2002). Recommended Testing in Diabetes *Research. Planta Med.* **68**:581-90.
- West, E., Simon, O. and Morrison, E. (1996). Streptozotocin alters pancreatic beta cells responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *W Ind Med J.* **45**:60-62.
- Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. (2005). Appetite control. *J Endocrinol.* **184**: 291-318.
- Viña, J, Viña, J. and Sáez, G. (1986). Glutathione: metabolism and physiological functions. *Life Chem Reports* **4**:1-35.
- Yano, M., Matsuda, S., Bando, Y., and Shima, K. (1987). Lens protein glycation and the subsequent degree of opacity in streptozotocin-diabetic rats, *Diabetes Res Clin Pract* **7**(4):259-262.
- Yao, L., Caffin, N., D'arcy, B., Jiang, Y., Shi, J, Singanusong, R., Liu, X., Datta, N., Kakuda, Y., Xu, Y. (2005). Seasonal variations of phenolic compounds in Australia-grown tea (*Camellia sinensis*). *J Agric Food Chem.* **53**:6477-4783.
- Yeh, C., y Yen, G. (2005). Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr.* **136**:11–15.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., y Akoh, C. (2000). Phenolic Compounds from Blueberries Can Inhibit Colon Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **8**:519-525.
- Young, S, I., Tate, S., Lightbody, I, H., MacMaster, D., and Trimble, E, R.(1995). The effects of desferoxiamine and ascorbate on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free radical Biol Med* **18**(5):833-40.
- Zhang, T., Talalay, P., Cho, C., and Posner, G. (2003). *Proc Natl Acad Sci.* **89**:2399-2405.
- [www.eatlas.idf.org](http://www.eatlas.idf.org)
- [www.biopsicologia.net/fichas/page\\_284.html](http://www.biopsicologia.net/fichas/page_284.html)
- [www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/arandano.htm#8.%20VALOR%20NUTRICIONAL](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/arandano.htm#8.%20VALOR%20NUTRICIONAL)

[www.saludparati.com/arandano.htm](http://www.saludparati.com/arandano.htm)

[www.juver.com/nutricion/frutas/arandano.htm](http://www.juver.com/nutricion/frutas/arandano.htm)

[www.elmedicointeractivo.com/ formacion\\_ace2004/tema2/insulinas6.htm](http://www.elmedicointeractivo.com/formacion_ace2004/tema2/insulinas6.htm). © Copyright  
EL MEDICO INTERACTIVO - Capitán Haya, 60 28020 Madrid (España)

[www.karlosnet.com/Varios/nuevanoticia.php?c=](http://www.karlosnet.com/Varios/nuevanoticia.php?c=)

[www.puente-e.com/Med/medicamentos/Fitoterapia.html](http://www.puente-e.com/Med/medicamentos/Fitoterapia.html)



## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### DETERMINACION DE FENOLES TOTALES MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEU

#### REACTIVOS:

- Folin ciocalteu 1N
- Carbonato de sodio al 20%
- Solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL)

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

##### -Folin Ciocalteu 1N

El reactivo comercialmente se encuentra como 2N, por lo que se procede a diluir.

$V_1C_1=V_2C_2$  v.g.r. 5 mL de agua destilada 5 mL de reactivo de Folin Ciocalteu.

El procedimiento debe realizarse en campana de extracción y conservar en frasco ámbar con tapón de aluminio y en refrigeración (a 4°C)

Verifique que el color del reactivo sea de color dorado, no utilizarse si tiene un color verde olivo.

##### -Carbonato de Sodio al 20%

Pesar 2 gr de Carbonato de Sodio y disolver en aproximadamente 8 mL de agua grado HPLC y sonicar hasta dilución completa, posteriormente aforar a 10 mL

##### -Solución Estándar de Ácido Gálico (0.1 mg/mL)

Pesar 5 mg de Ácido Gálico y aforar en agua destilada a 5mL (1mg/ml). Posteriormente realizar una dilución 1:10 con agua destilada (0.1mg/ml). **Usar siempre una solución recién preparada.**

No. Tubo	Solución Ác.gálico(µL)	Agua destilada (µL)	Reactivo de Folin (µL)	Sol. de carbonato de sodio (µL)
Blanco.	0	500	250	1250
1	20	480	250	1250
2	40	460	250	1250
3	60	440	250	1250
4	80	420	250	1250
5	100	400	250	1250
6	120	380	250	1250
7	140	360	250	1250

Para determinar el contenido de fenoles totales en las muestras se procedió de la siguiente manera:

Se pesa aprox. 25 mg de muestra, se disuelve en 1 mL de metanol (Sol. A)

Se toma 100µL de la sol A y se le adiciona 900 µL de agua destilada (Sol. B 2.5 mg/ml)

**NOTA:** Adicionar los reactivos en el orden indicado en el procedimiento que se encuentra en la siguiente tabla.

Muestra	Peso Muestra (mg)	Sol B ( $\mu\text{L}$ )	Agua Destilada ( $\mu\text{L}$ )	Folin 1N ( $\mu\text{L}$ )	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ 20% ( $\mu\text{L}$ )
Blanco.	---	---	50	25	1250
Muestra	2.5	100	400	250	1250

## ANEXO 2

### DETERMINACION DE FLAVONOIDES TOTALES MÉTODO POR EL MÉTODO DE LIU Y COLABORADORES (2002), MODIFICADO PARA MICROPLACA

#### REACTIVOS:

- Nitrito de sodio al 5%
- Cloruro de aluminio al 10%
- Hidróxido de sodio 1M
- Solución estándar de catequina para la curva de calibración

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

*-Nitrito de Sodio al 5%*

Para preparar 5 ml pesar 0.25 g de  $\text{NaNO}_2$  y aforar en matraz a 5 ml.

*-Cloruro de Aluminio al 10%*

Para preparara 5 ml de este reactivo, pesar 0.5 g de  $\text{AlCl}_3$  y aforar en matraz de 5 ml.

*-Hidróxido de Sodio 1M*

Para preparar 25 ml de  $\text{NaOH}$  1M, se pesa 1 g de  $\text{NaOH}$  y se afora en un matraz de 25 ml.

*-Solución estándar de catequina*

Pesar 10 mg de catequina y adicionar 10 ml de metanol (1 mg/ ml). **Usar siempre una solución recién preparada.**

#### PREPARACION DE CURVA DE CALIBRACIÓN

Adicionar las cantidades adecuadas los reactivos siguiendo la siguiente tabla:

No. Tubo	Solución de catequina ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	Sol. $\text{NaNO}_2$ ( $\mu\text{L}$ )	Sol. $\text{AlCl}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	Sol. $\text{NaOH}$ ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )
Blanco.	0	125	7.5	15	50	52.5
1	2	125	7.5	15	50	50.5
2	4	125	7.5	15	50	48.5
3	6	125	7.5	15	50	46.5
4	8	125	7.5	15	50	44.5
5	10	125	7.5	15	50	42.5
6	12	125	7.5	15	50	40.5
7	14	125	7.5	15	50	38.5

Adicionar los reactivos en el orden siguiente:

1. Adicionar a cada pocito la cantidad correspondiente de solución de catequina
2. Adicionar a cada pocito la cantidad correspondiente de agua destilada
3. Adicionar a cada pocito la cantidad correspondiente de solución de  $\text{NaNO}_2$
4. Esperar 6 minutos
5. Adicionar a cada pocito la cantidad correspondiente de Solución de  $\text{AlCl}_3$
6. Esperar 5 minutos
7. Adicionar a cada pocito la cantidad correspondiente de solución de  $\text{NaOH}$
8. Adicionar a cada pocito la cantidad correspondiente de agua destilada.
9. Cuidar de no exponer los pocitos a la luz
10. Leer en el espectrofotómetro antes de que pasen 30 minutos a una longitud de onda de 510 nm.

Para determinar el contenido de Flavonoides totales en las muestras liofilizadas se procedió de la siguiente manera:

Se pesa aprox. 25 mg de muestra, se disuelve en 1 mL de agua destilada.

**Adicionar los reactivos en el orden indicado en el procedimiento de la curva de calibración.**

No. Tubo	Solución de catequina (muestra) ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	Sol. $\text{NaNO}_2$ ( $\mu\text{L}$ )	Sol. $\text{AlCl}_3$ ( $\mu\text{L}$ )	Sol. $\text{NaOH}$ ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )
Blanco.	0	125	7.5	15	50	52.5
Muestra	14	125	7.5	15	50	38.5

Se obtiene el contenido de flavonoides totales en equivalentes de catequina extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración realizada previamente.

### ANEXO 3

#### CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE ABTS MODIFICADO PARA MICROPLACA

##### REACTIVOS:

-ABTS 5 mM

-Persulfato de Potasio 140 mM

##### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

-ABTS 5 mM

Pesar 0.0192 g de ABTS y aforar a 5 mL con agua destilada.

-Persulfato de potasio 140 mM

Pesar 0.1892 g de persulfato de potasio y aforar a 5 mL con agua destilada.

**PROCEDIMIENTO:**

1. Antes del día del ensayo se pone a reaccionar el ABTS (5 mL) con el Persulfato de Potasio (176 µl). Taparlo de la luz y mantenerlo a temperatura ambiente por 16 horas antes de usar .
2. Ajustar con etanol el ABTS preparado hasta que tenga una absorbancia de alrededor de 0.7 a una longitud de onda de 734 nm.
3. Preparar las muestras pesando 5 mg de liofilizado y diluirlo en 1ml de metanol o agua respectivamente y centrifugar a 10 000 g por 10 minutos (preparar diferentes concentraciones).
4. Una vez preparado lo anterior colocar en placa de la manera siguiente:

	ETANOL µl	METANOL µl	AGUA µl	MUESTRA µl	ABTS µl
BLANCO 1	230	20	-	-	-
BLANCO 2	230	-	20	-	-
CONTROL	-	20	-		230
MUESTRA	-	-	-	20	230

5. Leer inmediatamente a una longitud de onda de 734 nm a 25 °C.

**CÁLCULOS:**

Para calcular la capacidad antioxidante primero determinar el porcentaje de inhibición usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [(A \text{ control} - A \text{ muestra}) / A \text{ control}] \times 100.$$

Posteriormente se determina el CE<sub>50</sub> tomando en cuenta el % de inhibición y el logaritmo de la concentración de la muestra. Los resultados se expresan en CE<sub>50</sub> por µg o mg de liofilizado.

**ANEXO 4****CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE FRAP (FERIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER) MODIFICADO PARA MICROPLACA****REACTIVOS:**

- Ácido clorhídrico (HCl) 40 mM
- Cloruro férrico hexahidratado 20 mM (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O)
- 2,4,6-Tris(piridil-s-triasina) 10 mM (TPTZ)
- Amortiguador de acetato 300 mM a pH 3.6
- Solución FRAP
- Stock de FeSO<sub>4</sub> 3mM (curva estándar)

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS:**

- Ácido clorhídrico 40 mM

Colocar 170  $\mu$ l de ácido clorhídrico y aforar a 50 ml con agua destilada.

*-Cloruro férrico hexahidratado 20 mM*

Pesar 0.05406 g de cloruro férrico hexahidratado y aforar a 10 ml con agua destilada. Proteger de la luz.

*-2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triasina (TPTZ)*

Pesar 0.0156 g de 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triasina (TPTZ) 10 mM. y aforar a 5 ml con el ácido clorhídrico 40 mM.

*-Amortiguador de acetato 300 mM a pH 3.6*

Pesar 0.6838 g de acetato de sodio de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) y aforarlo en matraz a 50 ml de agua destilada. Disolver 4 ml de ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) y aforar en 50 ml de agua. En un matraz aforado de 250 ml colocar ambas soluciones, aforar y checar finalmente el pH a 3.6.

*-Solución FRAP*

Mezclar en un vaso de precipitados 10 ml de amortiguador de acetatos 300 mM, 1ml de la solución de cloruro férrico hexahidratado 20 mM y 1 ml de la solución de 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triasina (TPTZ) 10 mM. Proteger de la luz y colocarlo a baño maría a 37 °C. Esta solución debe prepararse al momento.

**PROCEDIMIENTO:**

1. Realizar una curva estándar con el  $\text{FeSO}_4$  usando concentraciones de 200, 150, 100, 80, 50 y 30  $\mu\text{M}$ .
2. Preparar las muestras pesando 5 mg de liofilizado y diluirlo en 1ml de metanol y centrifugar a 10 000 g por 10 minutos (preparar diferentes concentraciones diluyendo con metanol).
3. Una vez preparado lo anterior añadir en placa de la manera siguiente:

	METANOL $\mu\text{l}$	AGUA $\mu\text{l}$	MUESTRA $\mu\text{l}$	DILUCIÓN $\text{FeSO}_4$ $\mu\text{l}$	FRAP $\mu\text{l}$
BLANCO 1	25		-	-	175
BLANCO 2	-	25	-	-	175
CURVA $\text{FeSO}_4$	-		-	25	175
MUESTRA	-	-	25	-	175

4. Leer la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm a los tiempos 0, 4, 10, 30 y 60 minutos a 25 °C.

**CÁLCULOS:** Los resultados se expresan en  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  por mg de liofilizado.

## ANEXO 5

### PREPARACION DE BUFFER TRIS/SACAROSA (pH 7) PARA REALIZAR ENSAYOS CITOSÓLICOS

1. Pesar cada una de las sustancias para preparar un litro de solución amortiguadora.
  - 7.9 g de Tris-HCl
  - 2.1 g de  $MgCl_2$
  - 1.9 g de KCl
  - 85.6 g de Sacarosa ultrapura
2. Después de remover los órganos del animal, los tejidos son pesados y homogenizados en politron con 4 volúmenes relación con el peso, hasta que no sean visibles ningún grumo de tejido.
3. Centrifugar los homogenizados a 10 000 g por 20 minutos a 4°C.
4. Remover cuidadosamente el sobrenadante y pasarlo a tubos para ultracentrifugación. Balancear cada tubo y centrifugar a 100 000 g durante 1 hora a 4 °C.
5. Remover el sobrenadante (citosol) y almacenar en diferentes alícuotas y congelar a 71°C hasta su uso.

## ANEXO 6

### DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST) POR MEDIO DEL CLORODINITROBENCENO (CDNB), MODIFICADO PARA MICROPLACA

#### REACTIVOS:

- Buffer de Fosfatos 0.1 M, pH 6.5
- Stock de GSH 150 mM
- Buffer de trabajo de GSH 3 mM
- Stock de CDNB 60 mM
- Buffer de trabajo CDNB 2 mM

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- Buffer de Fosfatos 0.1 M, pH 6.5

Para preparar 200 ml, pesar 1.89 g de  $NaH_2PO_4$  y 0.895 g de  $Na_2HPO_4$ . Aforar a 200 ml con agua destilada.

- Stock de GSH 150 Mm

Para preparar 5 ml del stock, pesar 0.2347 g de GSH y aforar en matraz de 5 ml con buffer de fosfatos 0.1 M. El stock se mantiene en refrigeración (4°C) por una semana, mantenerlo en oscuridad.

- Buffer de trabajo de GSH 3 mM

Calcular el volumen a ocupar (100 µl por pocito). De la solución stock se realiza una dilución 1:50 con buffer de fosfatos 0.1 M. Preparar el mismo día de la determinación.

*-Stock de CDNB 60 mM*

Para preparar 5 ml del stock, pesar 0.061 g de CDNB y aforar en matraz de 5 ml con etanol al 100%. El stock se mantiene en refrigeración (4°C) por una semana, mantenerlo en oscuridad.

*-Buffer de trabajo CDNB 2 mM*

Calcular el volumen a ocupar (150 µl por pocito). De la solución stock se hace una dilución 1:30 con buffer de fosfatos 0.1 M. Preparar el mismo día de la determinación.

**PROCEDIMIENTO:**

1. Diluir los citosoles con buffer de fosfatos 0.1 M.
2. Adicionar a cada pocito (hacer 4 replicas por muestra) 50 µl de la solución muestra o en caso del blanco agregar 50 µl de buffer de fosfatos.
3. Adicionar a cada pocito 100 µl de buffer de trabajo de GSH.
4. Adicionar a cada pocito 150 µl de buffer de trabajo de CDNB.
5. Diseñar la placa de 96 pocitos, marcando claramente las muestras del blanco.
6. Leer inmediatamente después de agregar el buffer de CDNB en modo de cinética durante 2 minutos con lecturas de cada 20 segundos a 340 nm.

**CÁLCULOS:**

La actividad específica se determina realizando la diferencia de las absorbancias del minuto 2 menos el minuto 1/  $\epsilon \times \text{mg de proteína}$   $\epsilon =$  coeficiente de extinción para el CDNB  $9.600 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Los resultados se expresan como nmol/minuto/mg de proteína.

**ANEXO 7**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CATALASA (CAT).  
ENSAYO UV**

**REACTIVOS:**

*-Buffer de Fosfatos 50 mM, pH 7*

*-Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 mM*

**PREPARACIÓN DE REACTIVOS:**

*-Buffer de Fosfatos 50 mM, pH 7*

Pesar 6.81g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 8.90 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Aforar cada uno a 1000 ml con agua destilada. Para preparar la cantidad de buffer necesaria, mezclarse ambos en una proporción de 1:1.5 (v/v).

*-Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 mM*

Diluir 340 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (presentación en solución al 30%) con 100 ml de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.

**PROCEDIMIENTO:**

1. Hacer diluciones con los citosoles (muestras) de hígado y riñón 1:2 respectivamente con el buffer de fosfatos.
2. Ajustar el Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 30 mM, realizando una lectura 240 nm y calculando su absorbancia con la siguiente fórmula :

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \text{ mM} = A_{240} / 0.0436$$

3. Colocar los reactivos en el orden y volumen en la placa según se muestra en la siguiente tabla:
- 4.

	BUFFER FOSFATOS μl	DILUCIÓN MUESTRA μl	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 mM μl
BLANCO	2000	-	1000
MUESTRA	1700	300	1000

5. Leer inmediatamente siguiendo el decremento en la absorbancia a 240 nm por 30 segundos a temperatura ambiente con un programa de cinética.

**NOTA:** La reacción comienza al agregar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM. La absorbancia inicial puede ser aproximadamente de 0.5. Los citosoles deben ser analizados dentro de 5 a 10 minutos después de su dilución.

**CÁLCULOS:**

Calcular la actividad de CAT usando la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Act Enz (U/ml)} = (\Delta\text{ABS/min}) (\text{Vol tot}) (\text{fact dil})]}{(\text{coef ext}) (\text{vol mta}) (\text{min})}$$

Donde:

Vol tot (ml)= 3mL

Fact Dil = 1 a 2

Coef ext H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>= 0.0436

vol mta. (ml) = 0.30 ml

min =0.5 min

La actividad de CAT finalmente se expresa como actividad enzimática específica (U/mg de proteína) = Act enz / conc prot

## ANEXO 8

### DETERMINACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) POR MEDIO DE CLORO DINITRO BENCENO (DTNB), MODIFICADO PARA MICROPLACA

#### REACTIVOS:

-Buffer Tris-EDTA pH 8.2

-Stock de 5,5'-ditiol- 2- ácido nitrobenzónico (DTNB)

-Stock de GSH 2 mM

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

-Buffer Tris-EDTA pH 8.2 (100 ml)

Pesar 0.744g de EDTA y 3.152 g de TRIS diluir ambas cantidades en agua destilada, ajustar el pH a 8.2 y aforar a 100 ml.

-Stock de 5,5'-ditiol- 2- ácido nitrobenzónico (DTNB)

Pesar 0.243 g de DTNB y aforar a 25 ml con metanol

-Stock de GSH 2 mM

Pesar 1.843 mg de GSH y aforar a 10 ml con el buffer Tris-EDTA pH 8.2

#### PROCEDIMIENTO:

1. Realizar una curva con el stock de GSH (2 mM), diluyendo con el buffer Tris-EDTA.
2. Desproteínizar los citosoles (muestras) agregando en un tubo eppendorf por muestra: 50 µl, 40 de H<sub>2</sub>O µl y 10 µl de TCA al 50%. Incubar en hielo por 30 minutos para precipitar las proteínas. Centrifugar a alta velocidad durante 5 minutos a 4 °C. Separar el sobrenadante que es la fracción que se utiliza para el ensayo.
3. Colocar cada uno de los reactivos de la siguiente manera para la curva, blanco y citosoles:

	Stock GSH (µl)	Concentración de GSH (µM)	Metanol (µl)	Buffer Tris-EDTA	Citosol (µl)	DTNB (µl)
BLANCO	0	0	130	150	-	20
CURVA	10	20	120	150	-	20
CURVA	20	40	110	150	-	20
CURVA	30	60	100	150	-	20
CURVA	40	80	90	150	-	20
CURVA	50	100	80	150	-	20
CURVA	60	120	70	150	-	20
MUESTRA	-	-	80	150	50	20

4. Permitir que desarrolle el color por 5 minutos y leer las absorbancias a 412 nm.

### CÁLCULOS:

Se obtiene el contenido de GSH en  $\mu\text{M}$  extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración realizada previamente. Los resultados se expresan en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína para la cual hay que determinar el contenido de ésta en las muestras sin desproteínizar y con la dilución apropiada (tomar en cuenta para los cálculos el factor de dilución).

## ANEXO 9

### CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO PROTEÍCO DE LAS DISTINTAS FRACCIONES CELULARES A MICROESCALA POR EL MÉTODO DE BCA

#### REACTIVOS:

Kit BCA:

-Solución de trabajo: Solución A + Solución B

-Albúmina estándar (2mg/ ml) para curva de calibración

#### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

-Solución de trabajo (10.2 ml)

10 ml Solución A + 200  $\mu\text{l}$  Solución B

-Albúmina estándar (2mg/ ml) para curva de calibración

#### PROCEDIMIENTO:

1. Realizar una curva de proteínas con albúmina estándar (2 mg/ml), haciendo diluciones con la albúmina
2. Diluir en tubos ependorff de la siguiente manera:

Albúmina ( $\mu\text{l}$ )	H <sub>2</sub> O HPLC ( $\mu\text{l}$ )	Concentración de albúmina ( $\mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ )
150	100	60
100	150	40
50	200	20
25	225	10
12.5	237.77	5
6.277	243.72	2.5
3.11	246.89	1.25
0	250	0

3. Colocar 50  $\mu\text{l}$  de cada dilución de la albúmina (realizar 4 réplicas) o 50  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O de agua HPLC.

4. Colocar 250 µl de la solución de trabajo (mezcla de reactivos A + B de acuerdo al protocolo del proveedor).
5. Incubar por 30 minutos a 37 °C o por una hora a temperatura ambiente.
6. Diseñar la placa de 96 pocitos, marcando claramente las muestras del blanco.
7. Leer inmediatamente a 562 nm

#### **CÁLCULOS:**

Se obtiene el contenido de proteína en µg extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración realizada previamente.

## **ANEXO 10**

### **INDUCCIÓN DE DIABETES CON ESTREPTOZOTOCINA**

La estreptozotocina se disuelve en buffer de citratos 10 mM, pH 4.5

1. Preparación del buffer de Citratos (100 ml):

Pesar 1.29 g de ácido cítrico

Pesar 1.14 g de citrato de sodio

Pesar cada uno de los animales a inducir y sumar los pesos

2. Calcular la cantidad total de estreptozotocina de acuerdo a una dosis de 45 mg/kg de peso.

3. Calcular el volumen total a administrar intraperitonealmente a cada rata tomando en cuenta que como máximo se administra un volumen de 0.5ml de la estreptozotocina disuelta en el buffer de citratos.

4. Inyectar a la rata 2 dedos arriba del pene e introducir la aguja de la jeringa en un ángulo de 45°.

Nota: El buffer se puede preparar un día antes y dejarlo en refrigeración a 4 °C.

Al mezclar la estreptozotocina con el buffer de citratos no debe pasar más de una hora antes de inyectar a los animales.

## **ANEXO 11**

### **DETERMINACION DE TRIGLICÉRIDOS EN SUERO SANGUÍNEO TÉCNICA MODIFICADA PARA MICROPLACA**

1. Durante el sacrificio de las ratas se extrae por medio de punción cardiaca la sangre, se coloca en tubos de ensaye y se centrifugan 10 minutos a 5000 rpm a 4°C.
2. Se retira el sobrenadante (suero) con una pipeta Pasteur y se coloca en tubos eppendorf. Ultracongelarlos a -71°C hasta su uso.

#### **Reactivos del Kit:**

- *Buffer*
- *Reactivo Enzima*
- *Patrón*

**Preparación de los Reactivos:**

1. Mezclar 250 ul de reactivo enzima con 15 ml de Tampón. El reactivo así preparado es estable durante 3 semanas de 2- 8°C.
2. El patrón, está listo para usarse. Es estable hasta la fecha de caducidad conservado de 2 a 8°C.

**Procedimiento:**

1. Colocar en tubos eppendorf los reactivos como se muestra en el siguiente cuadro:

	REACTIVO BLANCO (μL)	PATRÓN (μL)	MUESTRA (μL)
MUESTRA	-	-	10
PATRÓN	-	10	-
REACTIVO	1010	1000	1000

2. Mezclar bien y vaciar a placa 250 ul de cada muestra haciendo 4 replicas.
3. Incubar por 10 minutos de 20 a 25 °C.
4. Leer a una longitud de onda de 500nm.

**CÁLCULOS:**

Se obtiene el contenido de triglicéridos en mg/dL llevando las Absorbancias del ensayo a la siguiente fórmula:

$$\text{Triglicéridos} = \frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times 200 = \text{mg /dL}$$

**ANEXO 12****DETERMINACIÓN DE COLESTEROL EN SUERO SANGUÍNEO TÉCNICA MODIFICADA PARA MICROPLACA****Reactivos del Kit:**

- *Reactivo Enzima, listo para usarse*
- *Patrón, listo para usarse*

**Procedimiento:**

1. Colocar en tubos eppendorf los reactivos como se muestra en el siguiente cuadro:

	BLANCO	PATRÓN	MUESTRA
AGUA DESTILADA	10 ul	-	-
MUESTRA	-	-	10
PATRÓN	-	10	-
REACTIVO	1000	1000	1000

5. Mezclar bien y vaciar a placa 250  $\mu$ l de cada muestra haciendo 4 replicas.
6. Incubar por 10 minutos de 20 a 25  $^{\circ}$ C.
7. Leer a una longitud de onda de 500nm.

#### **CALCULOS:**

Se obtiene el contenido de triglicéridos en mg/dL llevando las absorbancias del ensayo a la siguiente fórmula:

$$\text{Colesterol} = \frac{A \text{ muestra}}{A \text{ patrón}} \times 200 = \text{mg /dL}$$

### **ANEXO 13**

#### **DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) POR MEDIO DE KIT**

##### **REACTIVOS CONTENIDOS EN EL KIT:**

- *Solución WST 5 ml*
- *Solución Enzimática 100  $\mu$ l*
- *Solución buffer 100 ml*
- *Buffer de dilución 50 ml*

##### **PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO (para una placa de 96 pocitos):**

- *Solución WST de trabajo*

Diluir 1 ml de WST en 19 ml de la solución buffer

- *Solución Enzimática de trabajo*

Diluir 15  $\mu$ l de la enzima en 2.5 ml de buffer de dilución

##### **PROCEDIMIENTO:**

1. Añadir 20  $\mu$ l de la solución muestra (para blanco 2 y muestras), o agua HPLC (para blanco 1 y 3).
2. Añadir 200  $\mu$ l de solución de trabajo WST.
3. Añadir 20  $\mu$ l de buffer de dilución a los blancos 2 y 3.
4. Añadir 20  $\mu$ l de la solución enzimática de trabajo a cada muestra y al blanco.
5. Realizar una curva estándar con SOD, diluyéndola con el buffer de dilución siguiendo concentraciones de: 200, 100, 50, 20, 10, 5, 1, 0.1, 0.01, 0.001 U/ml.
5. Incubar a 37  $^{\circ}$ C durante 20 minutos.
6. Leer la absorbancia a 450 nm.

	MUESTRA	CURVA SOD	BLANCO 1	BLANCO 2	BLANCO 3
SOLUCION MUESTRA	20 µl	20 µl	-	20 µl	-
H2O HPLC	-	-	20 µl	-	20 µl
SOL. WST TRABAJO	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
SOL. ENZIMÁTICA TRABAJO	20 µl	20 µl	20 µl	-	-
BUFFER DE DILUCIÓN	-	-	-	20 µl	20 µl

**CALCULOS:**

Calcular la actividad de SOD como % de inhibición usando la siguiente ecuación:

Actividad enzimática de SOD (% inhibición) =  $\{[(\text{Ablanco1} - \text{Ablanco3}) - (\text{Amuestra} - \text{Ablanco2})] / (\text{Ablanco1} - \text{Ablanco3})\} \times 100$ . Extrapolar el % de inhibición dentro de la curva estándar de SOD. Los resultados se expresan en U/ mg de proteína.

## ANEXO 14

Concentración de glucosa (mg/dL) en ratas sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina, tomada antes y después de una administración intragástrica de diferentes dosis de arándano y zarzamora durante los días 1, 3 y 5 de la fase experimental.

GRUPOS	DIA 1				DIA 3					DIA 5			
	INICIAL	60*	120*	180*	INICIAL	60*	120*	180*	240*	INICIAL	60*	120*	180*
<b>SANAS</b>													
CONTROL (4)	108 ± 8.64	110.75 ± 6.66	111.75 ± 10.7	111.5 ± 4.17	117.25 ± 8.09	120.75 ± 4.13	130.75 ± 5.04	134.5 ± 5.42	127.5 ± 6.01	137.75 ± 1.31	125.5 ± 5.80	120.25 ± 8.21	132.5 ± 2.96
A50 (4)	101 ± 7.25	109 ± 6.42	107 ± 6.12	110.75 ± 8.34	129 ± 8.07	125.5 ± 9.89	107.75 ± 17.58	123 ± 12.50	127.75 ± 7.55	125 ± 11.02	131 ± 1.87	121.25 ± 11.54	119.75 ± 6.38
A100 (4)	101 ± 9.5	107.75 ± 8.89	96.75 ± 12.13	83.75 ± 9.81	117.75 ± 2.95	130.25 ± 4.63	125.25 ± 6.55	137.25 ± 2.95	130.25 ± 12.45	130.75 ± 6.03	131.5 ± 5.81	120.5 ± 9.24	134.25 ± 5.02
A200 (4)	103 ± 10.26	99.25 ± 2.06	109.75 ± 7.76	116.5 ± 3.97	116.5 ± 10.74	133.5 ± 3.66	115.75 ± 5.30	125.25 ± 1.55	123.75 ± 4.64	140 ± 4.06	131 ± 2.61	125.25 ± 4.31	128.75 ± 7.10
Z50 (4)	107.6 ± 6.46	110.8 ± 8.09	103.2 ± 0.73	106 ± 9.46	124.4 ± 4.99	122 ± 5.28	124.8 ± 5.28	130.4 ± 7.02	126 ± 3.02	130.8 ± 13.61	119.6 ± 4.09	118.2 ± 5.76	124.8 ± 6.94
Z100 (5)	122.6 ± 1.94	99.8 ± 7.49	116 ± 5.92	113.4 ± 6.10	125.4 ± 2.71	125.8 ± 4.92	108.2 ± 8.20	107.8 ± 12.30	110.6 ± 6.15	123.8 ± 10.60	119.6 ± 4.09	120.2 ± 5.18	115.8 ± 6.63
Z200 (5)	117.25 ± 1.44	110.25 ± 13	111.75 ± 5.98	109 ± 9.19	137.5 ± 4.66	137 ± 3.76	125.5 ± 5.80	128.5 ± 3.57	125.75 ± 6.74	130.75 ± 5.20	124.75 ± 5.25	128.75 ± 3.12	136 ± 3.81
<b>DIABÉTICAS</b>													
CONTROL (5)	166.5 ± 3.42	182.5 ± 10.78	168.25 ± 14	161 ± 15.18	168.25 ± 8.53	128.25 ± 10.05	143.5 ± 6.81	138 ± 7.48	ND	189.2 ± 24.07	189.2 ± 31.8	166.2 ± 27.66	187.6 ± 25.29
A50 (5)	180.4 ± 15.74	162.6 ± 6.99	158.4 ± 7.47	152.4 ± 8.18	151.2 ± 4.81	141.8 ± 2.06	138.8 ± 1.77	153.4 ± 5.38	ND	152.6 ± 12.25	151 ± 3.65	132.4 ± 11.35	141.2 ± 9.23
A100 (5)	181 ± 15.58	152.8 ± 4.38	152.2 ± 4.54	150 ± 8.34	147.2 ± 9.54	128.6 ± 12.32	138.6 ± 13.41	139.2 ± 12.68	ND	156.2 ± 6.48	152.4 ± 6.67	134.4 ± 6.20	136.2 ± 5.91
A200 (5)	177.2 ± 11.77	147.8 ± 4.56	148.2 ± 7.42	151 ± 5.52	139 ± 3.76	139.2 ± 7.83	134.4 ± 2.28	139.6 ± 4.31	ND	134.4 ± 7.51	141 ± 5.49	139.8 ± 3.10	143.4 ± 5.50
Z50 (5)	178.2 ± 11.24	160.6 ± 4.16	163.2 ± 8.41	157.6 ± 7.8	139.2 ± 4.01	136.8 ± 4.20	140 ± 9.04	135.8 ± 5.04	ND	145.4 ± 3.53	146.2 ± 2.75	140.8 ± 7.17	135.4 ± 3.30
Z100 (5)	182.8 ± 12.53	183.2 ± 24.7	185.2 ± 30.5	165.2 ± 14.71	147.4 ± 2.45	140.6 ± 7.03	140.2 ± 2.70	154.5 ± 4.16	ND	160 ± 14.17	150.8 ± 7.15	138.6 ± 4.30	136.6 ± 10.96
Z200 (5)	182.4 ± 11.35	179.4 ± 13.1	149.6 ± 2.34	143.6 ± 4.68	142.2 ± 3.45	138.4 ± 5.11	138.4 ± 3.75	140.2 ± 2.08	ND	139 ± 4.76	147.6 ± 1.99	138 ± 7.37	139.4 ± 4.93

Media ± el error estándar de la media. El número entre paréntesis indica el número de animales. \* Minutos después de la administración intragástrica de los diferentes tratamientos. ND = No determinado.

## ANEXO 15

Consumo de alimento y agua, así como el peso de los grupos de ratas sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina tratadas con las diferentes dosis de arándano y zarzamora durante los días 2, 4 y 6 de la fase experimental.

GRUPOS	ALIMENTO (g)			AGUA (ml)			PESO (g)		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
<b>SANAS</b>									
CONTROL (4)	123	115	116	63.5	115	63	254 ± 2.16	256.25 ± 3.94	266.75 ± 1.25
A50 (4)	119	107	118	65	128	73.5	250 ± 3.74	255.75 ± 3.28	259 ± 7.63
A100 (4)	136	128	126	79.5	114	78.6	253 ± 3.11	257 ± 3.24	263.5 ± 1.19
A200 (4)	104	116	109	86	101	62	248 ± 2.84	250 ± 1.60	257 ± 5.05
Z50 (4)	190	152	118	125	136	119	254 ± 2	263 ± 2.65	272 ± 3.65
Z100 (5)	185	163	125	185	163	125	251 ± 0.97	254 ± 1.47	278 ± 1.82
Z200 (5)	199	144	116	199.	144	116	249 ± 2.43	256 ± 7.88	272 ± 4.92
<b>DIABÉTICAS</b>									
CONTROL (5)	202	195	160	420	320	745	280 ± 10.66	279 ± 12.49	283 ± 16.22
A50 (5)	192	215	161	420	240	840	298 ± 10.64	305 ± 11.73	306 ± 15.20
A100 (5)	210	194	168.5	455	355	470	277 ± 7.55	287 ± 10.86	291 ± 13.80
A200 (5)	198	205	223.5	420	420	580	270 ± 9.45	272 ± 10.18	273 ± 10.35
Z50 (5)	193	214	174.5	420	420	468	270 ± 10.36	269 ± 11.32	269 ± 12.83
Z100 (5)	222	175	179	420	420	500	283 ± 16.33	279 ± 15.88	274 ± 18.18
Z200 (5)	160	180	172.5	420	420	573	282 ± 10.80	287 ± 9.55	293 ± 9.26

Media ± el error estándar de la media. El número entre paréntesis significa el número de animales.

## ANEXO 16

Concentración de glucosa (mg/dL) semanal en ratas sanas y diabéticas tratadas con zarzamora a dosis de 400 mg/kg de peso en un estudio subcrónico (21 días).

GRUPOS	SEMANA			
	0 (Inicial)	1a	2a	3a
SC-	131.2 ± 8.37	110.20 ± 1.07	116 ± 3.07	134.4 ± 6.75
SZ400	150.8 ± 6.68	105.80 ± 5.01	121.6 ± 4.27	142.6 ± 8.31
DC-	295 ± 15.46	356.43 ± 14.55	438.75 ± 19.80	411 ± 8.40
DZ400	293 ± 14.19	399.71 ± 4.73	364.5 ± 15.96	423.33 ± 6.60

Media ± el error estándar de la media.

## ANEXO 17

Acitidad enzimática de GST, SOD y CAT y concentración de GSH en hígado y riñón de ratas sanas y diabéticas inducidas con estreptozotocina tratadas con zarzamora a dosis de 400 mg/kg de peso corporal durante el estudio subcrónico.

GRUPOS	HÍGADO				RIÑÓN			
	GST $\xi$	GSH $\infty$	SOD $\ddagger$	CAT $\dagger$	GST $\xi$	GSH $\infty$	SOD $\ddagger$	CAT $\dagger$
SC- (5)	1068.5 ± 105	126.7 ± 15.7	6.2 ± .03	119.3 ± 4.3	247.3 ± 5.8	91.4 ± 5.2	6.4 ± .02	90.7 ± 4.3
SZ400 (5)	1181.3 ± 64	99.9 ± 4.6	6 ± .18	119.7 ± 3	257 ± 40.8	70.7 ± 9.2	6.3 ± .04	113.1 ± 3
DC- (4)	658.3 ± 54	50.3 ± 11.7	5.3 ± .17	107.2 ± 6.9	259 ± 51.5	117.9 ± 6.3	5.9 ± .07	73.4 ± 6.9
DZ400 (3)	790.6 ± 113	59.8 ± 9	5.8 ± .17	136.5 ± 5.6	286 ± 37.9	158 ± 4.4	6.1 ± .02	83.8 ± 5.6

Media ± el error estándar de la media. El número entre paréntesis significa el número de animales. GST  $\xi$  = nmol/minuto/mg de proteína GSH  $\infty$  =  $\mu$ M/ mg de proteína SOD  $\ddagger$  = U/mg de proteína CAT  $\dagger$  = U/mg de proteína.

