

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE  
CHAYA (*Cnidoscolus* ssp., Euphorbiaceae) SOBRE LA  
CASCADA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE LA  
INSULINA EN ANIMALES DIABÉTICOS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

**CECILIA LÓPEZ MARTÍNEZ**

DIRIGIDA POR

**Dra. ROSALIA REYNOSO CAMACHO**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007.

No. Adq. H72.912

No. Título \_\_\_\_\_

Clas. TS 616.462

LB64e

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## ÍNDICE GENERAL

Contenido

Página

ÍNDICE GENERAL

i

ÍNDICE DE CUADROS

vi

ÍNDICE DE FIGURAS

vii

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1

II. ANTECEDENTES

3

II.1 Diabetes Mellitus

3

II.1.1 Definición

3

II.1.2 Clasificación de la Diabetes

3

II.1.2.1 Diabetes Mellitus Insulinodependiente (DMID o TIPO I)

4

II.1.2.2 Diabetes Mellitus No insulinodependiente (DMNID o  
TIPO II)

4

II.2 Insulina

5

II.2.1 Definición

5

II.2.2 Función de la Insulina

5

II.2.3 Síntesis y secreción de la Insulina

6

II.2.4 Receptor de la Insulina

7

II.2.5 Sustrato del receptor de la Insulina (IRS)

8

II.2.6 PI3 Kinasa

9

II.2.7 Transportadores de glucosa

10

II.2.8 Defectos de la cascada de señalización de la Insulina

12

II.3 Diagnóstico de la Diabetes

14

II.3.1 Glucosuria

14

II.3.2 Glucosa e insulina sanguíneas en ayuno

14

II.3.3 Prueba de tolerancia a la glucosa

15

|   |    |
|---|----|
| II.4 Tratamientos para la Diabetes                                | 15 |
| II.4.1 Medicamentos administrados por vía oral                    | 16 |
| II.4.2 Administración de Insulina                                 | 16 |
| II.5 Medicina Herbolaria  | 16 |
| II.5.1 La chaya ( <i>Cinodoscolus ssp</i> ) como planta medicinal | 17 |
| II.5.2 Taxonomía  | 18 |
| II.5.3 Composición de la chaya                                    | 19 |
| II.5.4 Importancia de la medicina herbolaria                      | 20 |
| II.6 Modelos animales para el estudio de la Diabetes              | 21 |
| II.6.1 El mecanismo de acción de la estreptozotocina              | 21 |
| III. HIPÓTESIS  | 24 |
| IV. OBJETIVOS   | 25 |
| IV.1 General  | 25 |
| IV.2 Específicos  | 25 |
| V. METODOLOGÍA  | 26 |
| V.1 Materiales  | 26 |
| V.1.1 Químico para inducción de diabetes                          | 26 |
| V.1.2 Fármacos hipoglucemiantes                                   | 26 |
| V.1.3 Anticuerpos   | 26 |
| V.1.4 Químicos para Western blot                                  | 26 |
| V.1.5 Animales  | 26 |
| V.1.6 Extracto metanólico de chaya                                | 26 |
| V.2 Métodos   | 27 |
| V.2.1 Inducción química de diabetes en ratas Wistar               | 27 |
| V.2.2 Cuantificación de glucosa                                   | 27 |

|  |        |
|--|--------|
| V.2.3 Determinación de glucosa en ayuno (Hipoglucemia)   | 27     |
| V.2.4 Curva de tolerancia a la glucosa   | 27     |
| V.2.5 Obtención de la muestra de tejido muscular para<br>expresión de proteínas  | 28     |
| V.2.6 Extracción de proteínas en tejido muscular   | 28     |
| V.2.7 Determinación de la concentración de proteínas totales   | 28     |
| V.2.8 Determinación de la expresión de proteínas Akt y<br>GLUT4 en tejido muscular de ratas diabéticas<br>Inducidas químicamente           | 28     |
| V.2.8.1 Electroforesis SDS- PAGE   | 28     |
| V.2.8.2 Inmunoblot   | 29     |
| V.2.8.3 Reblotting   | 29     |
| V.2.9 Evaluación del extracto metanólico de chaya en<br>animales sanos   | 29     |
| V.2.9.1 Expresión de las proteínas Akt y GLUT4   | 29     |
| V.2.9.2 Evaluación hipoglucemiante de diferentes<br>concentraciones del extracto   | 30     |
| V.2.9.3 Evaluación de la capacidad antihiper glucémica del<br>extracto   | 30     |
| V.2.9.4 Comparación del efecto hipoglucemiante del extracto<br>de chaya con un fármaco (glibenclamida)                                     | 30     |
| V.2.9.5 Evaluación del efecto de la administración subaguda<br>del extracto en animales sanos y diabéticos                                 | 30     |
| V.2.9.5.1 Comparación del efecto del extracto comparado con<br>la administración de fármacos hipoglucemiantes<br>(insulina, glibenclamida) | 30     |
| V.2.9.5.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto   | 31     |
| V.2.10 Análisis estadístico de los datos   | 31     |
| <br>VI. RESULTADOS   | <br>32 |
| VI.1 Expresión de Akt y GLUT4 en ratas diabéticas inducidas  | 32     |

|   |    |
|---|----|
| químicamente  |    |
| VI.2 Determinación de la expresión de GLUT4 y Akt en músculo abdominal de ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas   | 33 |
| VI.2.1 Cantidad de transportador de glucosa GLUT4   | 33 |
| VI.2.2 Cantidad de la proteína Akt  | 34 |
| VI.1.3 Efecto hipoglucémico del extracto metanólico de chaya a diferentes concentraciones en ratas Wistar normoglicémicas   | 35 |
| VI.4 Evaluación del efecto antihiperglicémico del extracto de chaya en ratas Wistar y Sprague Dawley normoglicémicas  | 36 |
| VI.5 Efecto hipoglucémico del extracto metanólico de chaya en ratas Wistar diabéticas   | 38 |
| VI.6 Comparación del efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de chaya y el fármaco glibenclamida en ratas Wistar diabéticas  | 38 |
| VI.7 Evaluación del efecto antihiperglicémico del extracto en ratas Wistar diabéticas   | 41 |
| VI.8 Evaluación de la administración del extracto metanólico de chaya durante tres días en ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas  | 42 |
| VI.9 Evaluación de la administración de bajas concentraciones de extracto de chaya en animales diabéticos   | 44 |
| VI.10 De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, se demostró que las dosis de mayor efecto hipoglucémico fueron las de 10 mg/kg y la de 70 mg/kg, por lo tanto se monitoreo a nivel de glucosa sanguínea en ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas utilizando dichas concentraciones | 46 |
| VI.10.1 Evaluación del consumo de líquido   | 48 |
| VI.10.2 Evaluación de la ingesta de alimento  | 49 |

|                    |    |
|--------------------|----|
| VII. DISCUSIONES   | 50 |
| VIII. CONCLUSIONES | 54 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA   | 55 |
| ANEXO              | 58 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Desórdenes de glicemia en los tipos de diabetes y estados clínicos  | 3      |
| 2      | Transportadores de glucosa  | 12     |
| 3      | Características clínicas de los pacientes con Diabetes tipo I y tipo II   | 14     |
| 4      | Composición nutrimental de tres isótopos de chaya   | 19     |
| 5      | Efecto del té de chaya sobre el nivel de glucosa en conejos normoglicémicos y diabéticos inducidos con estreptozotocina | 21     |



## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Síntesis y secreción de la insulina por las células beta del páncreas   | 7      |
| 2      | Receptor de insulina  | 8      |
| 3      | Ruta de señalización para el transporte de glucosa  | 11     |
| 4      | Alteraciones en la ruta de señalización para incorporación de la glucosa  | 13     |
| 5      | Chaya ( <i>Cnidocolus ssp</i> )   | 18     |
| 6      | Productos de la descomposición de la estreptozotocina al ingresar a las células beta del páncreas   | 23     |
| 7      | Concentraciones de glucosa (mg/dl) en ratas Wistar diabéticas inducidas químicamente con administración de estreptozotocina a una dosis de 45 mg/kg           | 32     |
| 8      | Expresión de GLUT4 en tejido muscular de ratas Wistar normoglicémicas (N) y diabéticas (D)  | 33     |
| 9      | Expresión de la proteína Akt en tejido muscular de ratas Wistar normoglicémicas (N) y diabéticas (D)  | 34     |
| 10     | Efecto hipoglucemiante de diferentes dosis de extracto metanólico de chaya 10, 70 y 150 mg/kg en ratas Wistar normoglicémicas                                 | 35     |
| 11     | Efecto antihiperглиcémico del extracto de chaya en dosis de 70 mg/kg en dos cepas diferentes. Wistar normoglicémicas (a), (b) y Sprague Dawley (c)            | 39     |
| 12     | Efecto hipoglucémico del extracto metanólico de chaya en dosis de 70 mg/kg en ratas Wistar diabéticas   | 39     |
| 13     | Comparación del efecto hipoglucémico del extracto de chaya a la dosis de 70 mg/kg y el fármaco glibenclamida a la dosis de 3 mg/kg en ratas Wistar diabéticas | 40     |
| 14     | Efecto antihiperглиcémico del extracto de chaya a la dosis  | 41     |

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | de 70 mg/kg en ratas wistar diabéticas  |    |
| 15 | Efecto hipoglucémico del extracto de chaya en dosis de 70 mg/kg en ratas Wistar diabéticas y normoglicémicas tratada durante tres días(a)           | 43 |
| 16 | Efecto hipoglucemiante de diferentes concentraciones de extracto metanólico de chaya 10 mg/kg y 40 mg/kg en ratas Wistar diabéticas                 | 43 |
| 17 | Efecto hipoglucemiante de diferentes concentraciones de extracto metanólico de chaya 10 mg/kg y 40 mg/kg en ratas Wistar sanas (a) y diabéticas (b) | 46 |
| 18 | Consumo de líquido en grupos de ratas wistar normoglicémicas y diabéticas tratadas con extracto de chaya en dosis de 10 mg/kg y 40 mg/kg.           | 48 |
| 19 | Consumo de alimento de grupos de ratas wistar normoglicémicas y diabéticas tratadas con extracto de chaya en dosis de 10 mg/kg y 40 mg/kg           | 49 |

## RESUMEN

La medicina tradicional en México es ampliamente utilizada y dentro de las plantas más recomendada se encuentra la chaya. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento son contradictorios debido a que han evaluado algunos autores solamente efecto hipoglucemiante y otros han reportado efecto antihiperglicémico, diferentes, por lo tanto es importante continuar con estudios para demostrar si efectivamente la chaya puede ser usada con fines terapéuticos para esta enfermedad. Por otro lado, se tienen antecedentes de que el diabetógeno estreptozotocina, no solamente disminuye los niveles de insulina en los animales, sino que además disminuye otras respuestas relacionadas con la diabetes, tales como alteraciones en la cascada de señalización de la insulina afectando principalmente a IR, IRS-1, Akt y al transportador de glucosa GLUT4. Se realizó un estudio sobre los efectos hipoglucemiantes del extracto de chaya (*Cnidoscolus* spp. Euphorbiaceae), en ratas Wistar diabéticas. Se llevaron a cabo diversas pruebas variando la concentración de la chaya, además de la realización de curvas de tolerancia a la glucosa, después se realizó un experimento durante tres días continuos en donde la administración del extracto fue en ayuno y por medio de intubación gástrica. La determinación de los valores de glucosa en sangre, fue medida por medio de un glucómetro y la muestra de sangre fue obtenida por medio de una pequeña incisión en la cola.

## I. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus constituye un grave problema de salud pública que afecta mundialmente. México es uno de los países en donde ocupa los primeros lugares de mortalidad, esto se ve reflejado principalmente por los datos obtenidos de los certificados de defunción y de los estudios de prevalencia.

Este tipo de enfermedad es un problema de importancia principalmente para la Salud Pública, por el aumento de su prevalencia, de los factores de riesgo, de las complicaciones así como de la frecuencia patológica en edades tempranas, lo cual es atribuido a la falta de información sobre la enfermedad por parte de la población.

Otro factor que se ve afectado es la economía, puesto que se necesitan cuantiosos recursos para su adecuada atención y disponibilidad de opciones que permitan reducir su impacto. Se requiere de intervenciones que originen cambios en el estilo de vida, que comprende desde hábitos alimenticios, hasta una reducción de factores de riesgo como el consumo excesivo de alcohol, grasas y obesidad.

Debido a que es una enfermedad de importancia, se han realizado diversos estudios para su control, prevención y erradicación, uno de ellos es el control a base de extractos de plantas, entre los cuales se encuentra la Chaya, la cual era considerada un alimento importante en la dieta Maya. Actualmente es recomendada para diversas enfermedades como la diabetes, obesidad, cálculos, hemorroides, acné, problemas de los ojos, laxantes, diuréticos, estimuladores de la circulación así como estimuladores de la lactancia.

La Chaya (*Cnidoscolus* spp., Euphorbiaceae), es un arbusto que se encuentra principalmente en México y América Central, se caracteriza por tener hojas anchas verde oscuras grandes, en cantidades abundantes, tienen varias subespecies silvestres, en donde algunas constan de pelos urticantes. La chaya ha sido introducida a diversos países como Estados Unidos y Kenya ya que es considerada como un alimento nutricional, por su alto contenido de proteínas, calcio, hierro, fósforo, carotenoides (beta caroteno), riboflavina, tiamina, niacina, vitaminas A y C.

La chaya contiene compuestos con diferentes propiedades nutraceuticas que dan pie a su investigación científica, principalmente para ser empleada con fines terapéuticos, sin embargo, es importante resaltar que requiere de un tratamiento adecuado ya que también contienen glucósidos cianógenicos que son tóxicos para el organismo, por esta razón, su consumo debe ser específico, ya que para poder eliminar estas sustancias, tiene que ser cocida durante algunos minutos, sin excederse ya que se podría eliminar otros nutrientes, como el calcio y la vitamina C. Uno de los componentes importantes que han sido relacionados con la salud son los compuestos polifenólicos, los cuales otorgan numerosas propiedades biológicas y farmacológicas, que les permiten dar una protección contra las enfermedades crónicas especialmente como la diabetes mellitus no insulino dependiente, sin embargo, en la literatura existen datos contradictorios acerca del control que ejerce la chaya sobre los niveles de glucosa sanguínea.

En los estudios de diabetes se emplean diferentes modelos animales, actualmente los animales inducidos con estreptozotocina (STZ) son ampliamente utilizados, dicho fármaco destruye las células beta pancreáticas, generándose menor cantidad de insulina, sin embargo, existen reportes que sugieren que en este modelo animal también podrían presentarse alteraciones en la cascada de transducción de señales de la insulina. En base a lo anterior en este estudio se planteó determinar el efecto de la STZ sobre la expresión de algunas proteínas que participan en dicha cascada y su relación con el tratamiento de un extracto de chaya.



### II.1.2.1 Diabetes Mellitus Insulinodependiente (DMID o tipo I)

La diabetes tipo I conocida también como diabetes juvenil, ocurre antes de los 25 años de edad, es el resultado de la muerte de las células beta pancreáticas debido a un ataque viral o autoinmune ocasionando una menor secreción de insulina. La mayoría de sus manifestaciones fisiopatológicas pueden ser atribuidas a los principales efectos del déficit de insulina (Guyton, 2001; Salway, 2004).

Muchas de las enfermedades metabólicas alteran la síntesis de glucosa y de cuerpos cetónicos, modificando el balance entre el anabolismo y catabolismo que es la base de la homeostasis metabólica en la salud de los adultos. En la diabetes el estado anabólico es dañado por que la insulina no está disponible para mantener el balance, por lo tanto la homeostasis es dañada y predomina el catabolismo, induciendo las alteraciones en el metabolismo de los lípidos, proteínas y carbohidratos (Salway, 2004).

Entre estas manifestaciones se encuentra la hiperglicemia, como consecuencia de una menor captación de glucosa por los tejidos y de una mayor producción de glucosa por el hígado (aumento de la gluconeogénesis), se observa también una reducción de las proteínas orgánicas debido a que se presenta una disminución de su síntesis y un aumento de su catabolismo y por último hay un agotamiento de los depósitos de grasa y un aumento de la cetogénesis (Martindale, 1999; Guyton, 2001).

### II.1.2.2 Diabetes Mellitus No Insulinodependiente (DMNID o Tipo II)

Este tipo de diabetes es la más común, inicia por lo general a partir de los 40 años, a menudo entre los 50-60 años. Es considerada como un paradigma de enfermedad poligénica y multifactorial que surge como resultado de la interacción entre una predisposición genética y factores ambientales (Guyton, 2001).

Se caracteriza por la presencia de niveles elevados de glucosa, resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos (especialmente músculo y tejido adiposo), falla en la acción insulínica para inhibir la producción de glucosa en

hígado y una producción y/o secreción anormal de la insulina por las células beta del páncreas (Martindale, 1999; Cruz y col., 2000; Kotani y col., 2004).

La resistencia a la insulina es secundaria a la obesidad, ésta ocurre cuando la interacción entre la insulina y los receptores de insulina en las células del cuerpo se vuelve menos efectiva y la glucosa no puede penetrar a la célula. Debido a que se puede presentar daños en el sistema de señalización o de las enzimas que se relacionan con la homeostasis de la glucosa. La secreción de la citosina, del factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) por adipocitos está aumentada en obesos y a través de esto se produce resistencia a la insulina (Mathews y Van Holde, 2001; Salway, 2004; Kotani y col., 2004).

## II.2 Insulina

### II.2.1 Definición

La insulina es una proteína pequeña, la humana tiene un peso molecular de 5.88 KDa. Esta formada por 2 cadenas polipeptídicas, la cadena A formada por 21 aminoácidos y la cadena B constituida por 30 aminoácidos, estas cadenas están conectadas por 2 enlaces disulfuro, cuando estas se separan desaparece la actividad funcional de la molécula de insulina.

Cuando se secreta la insulina a la sangre, circula casi siempre en forma no ligada, su vida media plasmática es de unos 6 minutos por término medio y desaparece de la circulación en 10 a 15 minutos (Morris y Kahn, 1994; Guyton, 2001).

### II.2.2 Función de la Insulina

La insulina se encarga de regular los niveles de glucosa en sangre, estimulando la entrada en músculo y adipocitos e inhibe la producción de glucosa hepática (disminuye gluconeogénesis). También tiene efectos sobre la homeostasis del potasio, volumen, crecimiento y diferenciación de las células (Morris y Kahn, 1994; Haruta y col., 1995; Salway, 2004).

La insulina modifica la expresión o actividad de una variedad de enzimas y sistemas de transporte, su acción es mediada a través del receptor de insulina una



glucoproteína transmembranal con actividad proteica de cinasa de tirosina (Morris y Kahn, 1994).

### II.2.3 Síntesis y secreción de la Insulina

La insulina es sintetizada por las células beta del páncreas en forma de preprohormona. La preproinsulina, al perder 23 aminoácidos de la secuencia líder, se convierte en proinsulina unidos por puentes disulfuro intracatenarios y por el péptido C o péptido conector. Posteriormente la proinsulina se transforma en insulina por acción de las endoproteasas específicas quedando como hormona funcional con cadenas A y B de polipéptidos unidos por puentes disulfuro. Por último es secretada por las células beta del páncreas (islotos de Langerhans) en respuesta al incremento en los niveles de glucosa (Cruz y col., 2000).

La biosíntesis y secreción de la insulina por las células beta pancreáticas es regulada por una gran variedad de factores incluyendo a la glucosa, algunos aminoácidos, neurotransmisores y hormonas, por medio de una secuencia de eventos que acoplan al cierre de canales de  $K^+$  regulados por ATP con la liberación de insulina; proceso en el que los cambios en la concentración citoplásmica de  $Ca^{2+}$  en las células beta, es esencial (Morris y Kahn, 1994; Cruz y col., 2000; Mathews y Van Holde, 2001) (Figura1).

Estimulo de glucosa

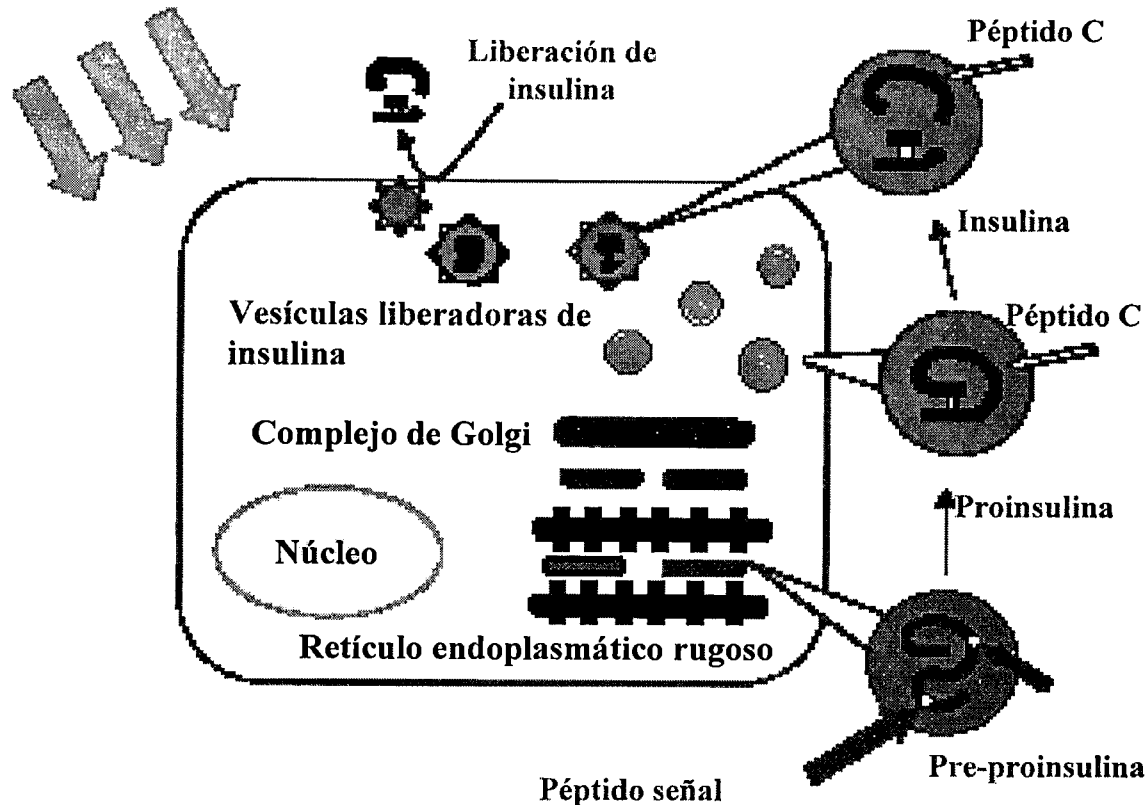


Figura1. Síntesis y secreción de la insulina por las células beta del páncreas (Cruz, 2000).

#### II.2.4. Receptor de insulina

Para que inicie sus efectos en las células efectoras, la insulina debe unirse y activar una proteína receptora en la membrana; ésta se localiza principalmente en las células musculares, tejido adiposo, hígado y páncreas en forma de tetrámero. Entre la insulina y el receptor hay una cooperatividad negativa ya que la unión de una molécula de glucosa con el receptor dificulta la unión con la segunda.

Este receptor tiene actividad de cinasa de tirosina, contiene 4 subunidades, dos alfa hacia el exterior, ricas en cisteínas y glicinas que interactúan con la insulina las cuales se unen por puentes disulfuro a las dos beta que están hacia el interior, las cuales atraviesan la membrana plasmática y cerca de la región del carboxilo terminal se encuentran los residuos de tirosinas.

El complejo insulina-receptor se internaliza, dando inicio con la unión de la insulina a las cadenas alfa del receptor, provocando un cambio conformacional en las cadenas alfa y la autofosforilación de las cadenas beta. Las tirosinas que contiene el receptor en las posiciones 1158, 1162 y 1163 son esenciales como mediadores de la actividad de cinasas de tirosina, la tirosina 960 como sitio de regulación y la tirosina 972 es para el anclaje y fosforilación del sustrato del receptor de la insulina (IRS) (Morris y Kahn, 1994; Cruz y col., 2000; Mathews y Van Holde, 2001) (Figura 2).

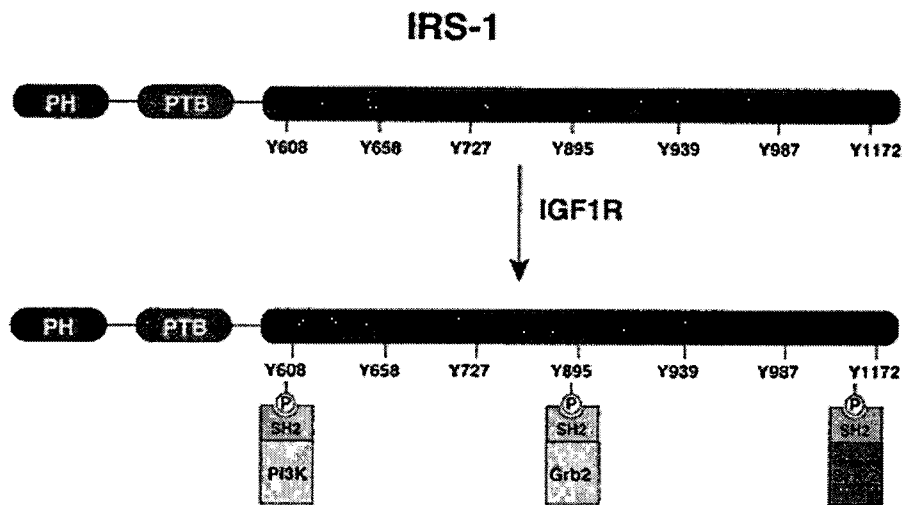


Figura 2. Receptor de insulina (Cruz y col., 2000)

### II.2.5. Sustrato del receptor de la Insulina (IRS)

Se han identificado cuatro proteínas IRS, (del 1 al 4) en donde IRS-1 e IRS-2 son responsables del control de la glucosa, estas proteínas contienen en su región NH<sub>2</sub>-terminal un grupo homólogo a pleckstrina (PH) que se asocia con fosfolípidos de membrana y/o proteínas intracelulares, seguido de una proteína de unión a fosfotirosina (PTB) la cual interactúa con la tirosina 960 en el motivo NPXY del receptor de la insulina (Cruz y col., 2000).

IRS-1 es el sustrato-1 del receptor de insulina, es una proteína citosólica, contiene 21 sitios que pueden ser fosforilados en tirosina y 30 sitios que pueden ser

fosforilados en serina/treonina, al menos 8 sitios de tirosina pueden ser activados por el receptor de insulina, una vez fosforilado reconoce y se une a dominios SH2 de varias proteínas de transducción de señales.

Después de la autofosforilación del receptor, se inicia la activación de las tirosina cinasas de los IRSs. El mecanismo de regulación de la actividad cinasa de tirosina es por acción de las fosfatasas SHP2 que apagan la fosforilación. Las serinas son activadas por las proteínas cinasas MAPCK, PKC, Akt/PKB, cinasa de caseína II, PI3-cinasa y TNF-alfa que disminuye la actividad de los IRSs (Morris y Kahn, 1994; Cruz y col., 2000).

#### II.2.6. PI3 Cinasa

La PI3-cinasa es la siguiente en activarse en la cascada de señalización, está compuesta de dos subunidades catalíticas p110 (110 kDa) y una subunidad regulatoria p85alfa (85 kDa) la cual posee dos dominios SH2, que se asocian específicamente con IRS-1 fosforilado (Morris y Kahn, 1994).

La unión de la subunidad p85 a IRS-1, es requerida para activar la subunidad catalítica p110, de la PI3-cinasa que es la responsable de catalizar la fosforilación de los fosfoinosítidos en la posición D-3 del anillo inositol para generar PI3-fosfato, el PI3,4-bifosfato y el 3,4,5 trifosfato (Robin y col., 1995).

En donde la síntesis de estos productos lipídicos, están envueltos en la activación de Akt/PKB, la cual es un homodímero que tiene un grupo homólogo a pleckstrina (PH) y dominios catalíticos, en los cuales poseen actividad serina/treonina cinasas, es regulada por fosforilación de Thr308 y Ser473 por PKD-1 y PKD-2. PKD es denominada cinasa de proteína dependiente de fosfoinosítidos que son atraídos a la membrana por los niveles basales de las moléculas PI3. Después de su activación Akt/PKB puede fosforilar a diversos sustratos en el citoplasma y en el núcleo.

Ha sido establecido que la actividad de PI3-cinasa es necesaria para la traslocación de GLUT4 a la membrana plasmática en músculo y tejido adiposo. Por lo tanto su inhibición catalítica no permite el transporte de la glucosa estimulado

por insulina y la traslocación de GLUT4 (transportador de glucosa) a la membrana plasmática. También se ha demostrado que la activación de Akt/PKB juega un rol esencial en la inducción de la insulina a la síntesis del glucógeno por inhibición de la cinasa de la sintetasa de glucógeno (GSK)-3 en hígado y músculo (Nawano y col., 1999; Somwar y col., 2001; Qiao y col., 2002; WU y col., 2004).

#### II.2.7. Transportadores de glucosa

La etapa final para el control de la glucosa se efectúa mediante los transportadores de glucosa (GLUT). Se han descrito 2 tipos de transportadores de glucosa. Los vinculados al sodio (intestinales y renales) y los que transportan glucosa a través del mecanismo de difusión por gradientes. En este último grupo se incluyen 5 proteínas homólogas de membrana: GLUT-1, 2, 3, 4 y 5, reguladas por diferentes genes (Sherpherd y Kahn, 1999; Cruz y col., 2000), (Cuadro 2).

El GLUT-4 es el principal transportador de la glucosa; es una proteína que atraviesa doce veces la membrana plasmática y es entre los dominios seis y siete donde se localiza el sitio de entrada a la glucosa, se encuentra preferentemente en el músculo y en los adipocitos (Cruz y col., 2000; Kotani y col., 2004).

En ausencia de insulina el GLUT4 queda retenido dentro de las células, en vesículas, que son llevadas hacia la membrana plasmática por la activación previa del complejo proteico PI3-cinasa, las proteínas Akt/PKB, la PKC y la cinasa JNK. Las vesículas transportadoras contienen proteínas V-SNARE (conocida como sinaptobrevina), VAMP2 y VAMP3 que interactúan físicamente con las proteínas T-SNARE (conocida como sintaxina 4 y SNAP23) que se encuentran localizadas en la cara interna de la membrana plasmática. Se requiere de otras proteínas que permiten el anclaje y fusión de la membrana con las vesículas que contienen los GLUT, entre ellas las de tipo Munc18c, Synip y NSF así como las proteínas del citoesqueleto la actina y la tubulina que interactúan con los complejos proteicos para la movilización y anclaje de los GLUT en la membrana plasmática ( Sherpherd y Kahn, 1999; Cruz y col., 2000).

Este efecto es reversible y una vez que la insulina se remueve, los transportadores de glucosa se regresan a la poza intracelular y se funden con unos sacos grandes de membrana, llamados endosomas, dentro de estas vesículas las moléculas de GLUT4 se separan en extensiones tubulares y se reempacan en vesículas (Sherpherd y Kahn, 1999) (Figura 3).

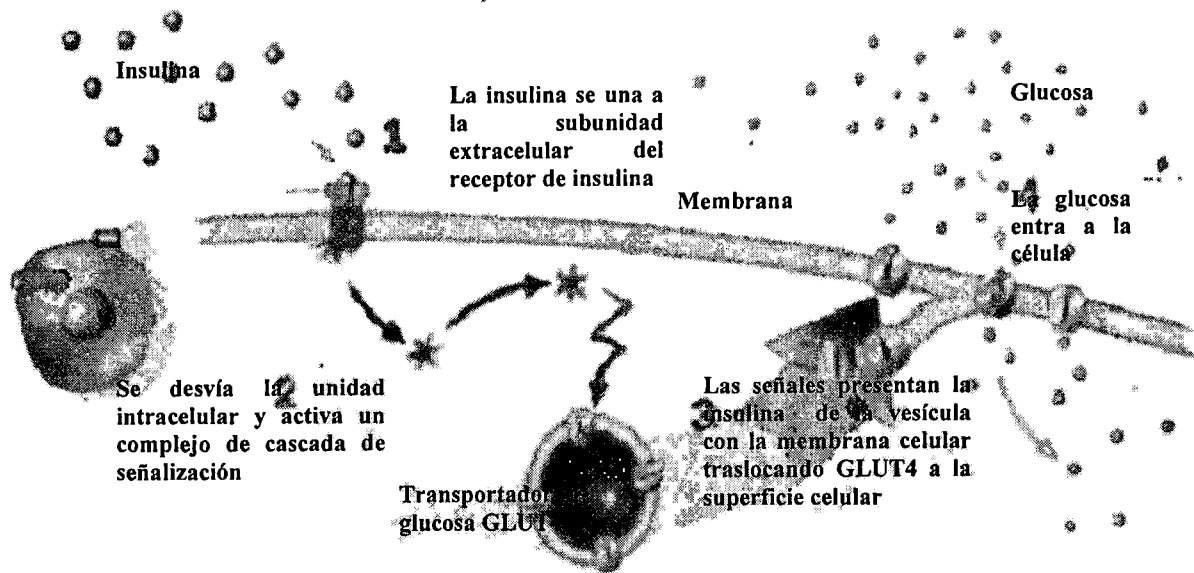


Figura 3. Ruta de señalización para el transporte de glucosa

Cuadro 2. Transportadores de glucosa (Sherpherd y Kahn, 1999).

| Transportador | Función   | Lugar de expresión   |
|---------------|---|--|
| GLUT1         | Transportador constitutivo de la glucosa  | Cerebro, eritrocitos, placenta, riñones, colon, tejido adiposo y músculo |
| GLUT2         | Tiene baja afinidad por la glucosa, es el sensor en las células beta del páncreas para la liberación de insulina en presencia de altas concentraciones de glucosa | Riñón, epitelio del intestino delgado, hígado                            |
| GLUT3         | Transportador de alta afinidad para la glucosa  | Neuronas y placenta  |
| GLUT4         | Transporte de glucosa estimulado por insulina   | Músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo                           |
| GLUT5         | Transportador de fructosa, absorción del suministro dietético   | Células espermáticas, riñón, cerebro, tejido muscular y adiposo          |
| GLUT7         | Transporte de glucosa microsomal.   | Hígado   |
| GLUT8         | Transporta glucosa es regulado hormonalmente  | Nivel testicular en el adulto  |

II.2.8. Defectos en la cascada de señalización de insulina  
 Cuando se presenta un defecto en la señalización, se puede producir una resistencia periférica a la acción de la insulina atribuida a una disminución en la fosforilación de los residuos de tirosinas e hiperfosforilación en los residuos de serinas y treoninas.

La alteración en la captación de glucosa mediada por la insulina también puede acontecer en respuesta de mecanismos proteicos regulatorios. Otros factores de tipo paracrino pueden influir en el transporte de glucosa estimulado por la insulina. Entre ellos se encuentran los ácidos grasos libres, crónicamente elevados en la diabetes y la obesidad, la existencia de hiperglucemia, que provoca efectos tóxicos.

sobre la secreción y acción periférica de la insulina, y el factor de necrosis tumoral alfa, potente inhibidor de los efectos de la insulina en el tejido adiposo y el músculo (Morris y Kahn, 1994) (Figura 4).

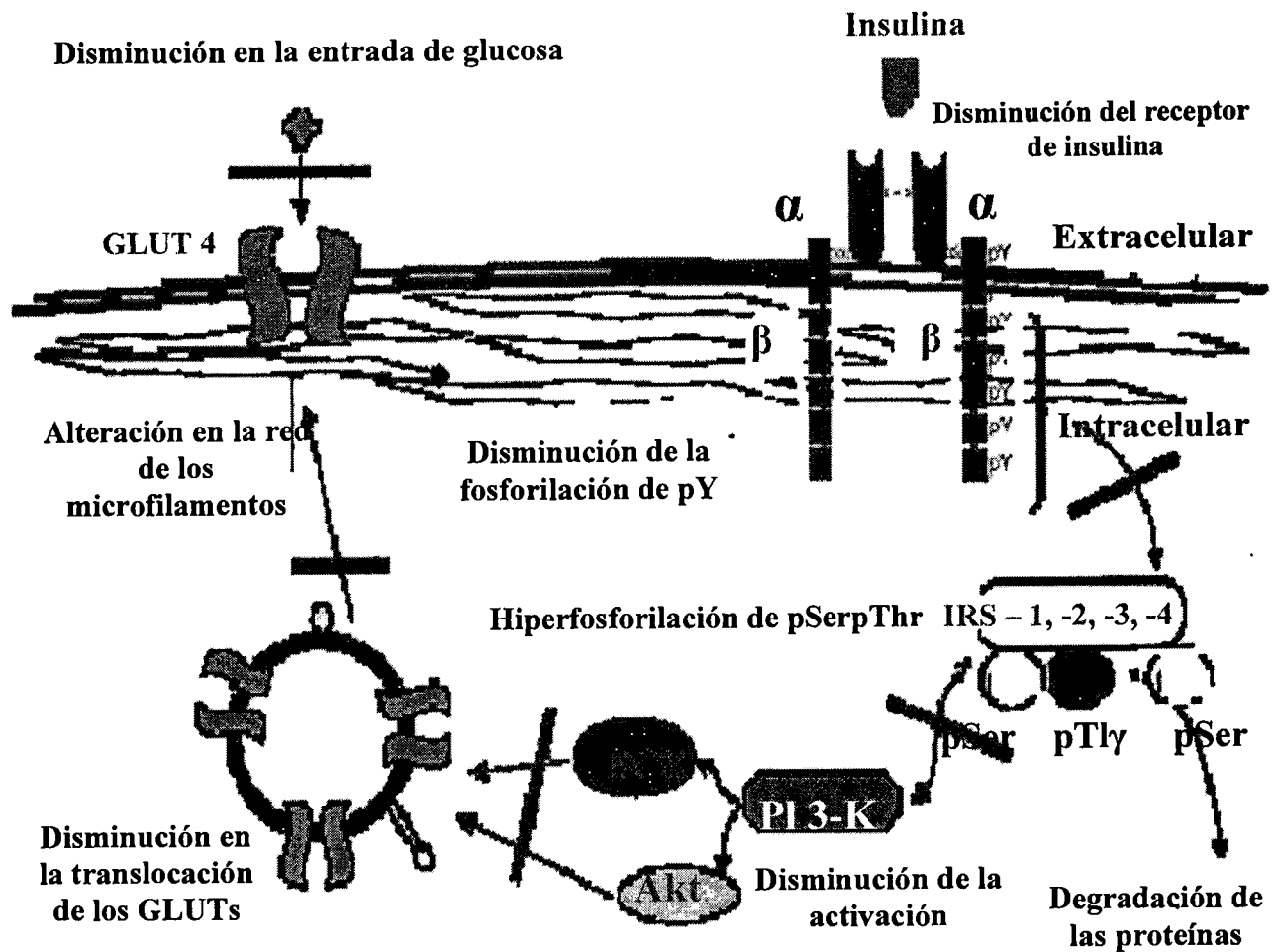


Figura 4. Alteraciones en la ruta de señalización para incorporación de la glucosa. (Cruz, 2000)



### II.3 Diagnóstico de la Diabetes

Los métodos habituales para el diagnóstico de la diabetes se basan en diversas pruebas químicas con la orina o con la sangre. Presentan diversas características de acuerdo al tipo de diabetes que se padece (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características clínicas de los pacientes con diabetes tipo I y tipo II.  
(Guyton, 2001)

| Dato                       | Tipo I                        | Tipo II   |
|----------------------------|-------------------------------|---|
| Edad de comienzo           | Generalmente < 20 años        | Generalmente >40 años                                       |
| Masa corporal              | Reducida (atrofiada) o normal | Obesidad  |
| Insulina plasmática        | Reducida o ausente            | Normal o elevada  |
| Glucagón plasmático        | Elevado, se puede suprimir    | Elevado, resistente a la supresión                          |
| Glucosa plasmática         | Aumento                       | Aumento   |
| Sensibilidad a la insulina | Normal                        | Reducida  |
| Tratamiento                | Insulina                      | Dieta, tiazolindionas, metmorfina, sulfonilureas, insulina. |

#### II.3.1 Glucosuria (glucosa en orina)

Se determina por pruebas cuantitativas, generalmente un individuo sano elimina cantidades indetectables de glucosa en orina, pero un diabético depende de la gravedad de la enfermedad y de la ingestión de carbohidratos. Se denomina glucosuria cuando la glucemia es superior a 180 - 200 mg/dl en orina. Se utiliza la prueba de la tira reactiva con glucosa – oxidasa específica para la glucosa (Guyton, 2001; Bernard, 1991)

#### II.3.2 Glucosa e insulina sanguíneas en ayuno

La glucosa se determina en sangre de pacientes en ayunas. En las primeras horas de la mañana, los niveles varían normalmente de 80 a 90 mg/100 ml; el límite

superior de la normalidad es de 110 mg/100 ml. Todo valor de glucemia superior a este indica Diabetes Mellitus.

Los valores plasmáticos de insulina en la diabetes tipo I son muy bajos o indetectables en ayunas e incluso después de la comida. Sin embargo para la diabetes tipo II, estos valores se elevan varias veces por encima de lo normal y suelen incrementarse aun más tras la ingesta de una sobrecarga normalizada de glucosa (Guyton, 2001; Bernard, 1991).

### II.3.3 Prueba de tolerancia a la glucosa

Esta prueba se realiza suministrando una carga oral de glucosa, 1.0 g/kg de peso corporal, y se extrae la sangre a intervalos de 30, 60, 120 y 180 minutos para determinar los niveles de glucosa. Los individuos sanos presentan un incremento de nivel de azúcar sanguíneo de 120 - 140 mg/100ml al cabo de una hora, que es insuficiente para pasar el umbral renal de 160 a 180 mg/100ml, concentración a la cual la glucosa comienza a aparecer en orina. En un periodo de 2 a 3 horas hay un descenso hacia un nivel normal. Un individuo diabético muestra un incremento mayor de concentración de glucosa en sangre que ya es superior al normal y un periodo prolongado de hiperglicemia con un descenso más lento (Guyton., 2001; Bernard, 1991).

### II.4 Tratamiento para la Diabetes

Se sabe a la fecha que no existe un método específico que cure la Diabetes Mellitus. Sin embargo, se utilizan diversos tratamientos para su control tales como: disminución del tabaco y bebidas alcohólicas, ejercicio físico y dieta.

La dieta es la base para los tratamientos contra Diabetes Mellitus, ya que proporciona el tipo y cantidad de alimentos a ingerir. Gran parte de los pacientes con diabetes tipo II degeneran su habilidad para la producción de insulina y una dieta adecuada puede facilitar la efectividad de la insulina natural.

#### II.4.1 Medicamentos administrados por vía oral.

Se administran medicamentos hipoglucemiantes (tabletas que disminuyen los niveles de glucosa en la sangre). Estos agentes pueden estimular la liberación de insulina y ayudan a reducir la resistencia a la insulina ya disponible. Sin embargo, solo son eficaces cuando únicamente el páncreas no puede generar una buena cantidad de insulina

Se clasifican en diversos grupos: Biguanidas, sulfonilureas, derivados de thiazolidinediona e inhibidores de la alfa-glucosidasa. Las sulfonilureas, además de potenciar la secreción de insulina, facilitan la traslocación del GLUT-4, al igual que las biguanidas, cuyo principal sitio de acción se localiza en el hígado. Las thiazolidinedionas son una nueva clase de drogas que incrementan la utilización de glucosa por parte de los tejidos en presencia de insulinoresistencia. Además de restaurar la expresión y traslocación del GLUT-4 en los adipocitos de roedores, ha demostrado aumentar la captación de glucosa por parte del músculo, aunque por un mecanismo diferente.

#### II.4.2. Administración de insulina.

El tratamiento para la Diabetes Mellitus tipo I se basa en administrar insulina suficiente para que el metabolismo de los hidratos de carbono, lipídico y proteico se normalicen lo mas posible. La insulina regular que se caracteriza por duración de su efecto de 3 a 8 horas mientras que otras formas (precipitadas con zinc o diversos derivados proteicos) se absorben lentamente desde el lugar de inyección y sus efectos se prolongan hasta 10 a 48 horas (Martindale, 1999; Guyton, 2001).

#### II.5 Medicina Herbolaria

La práctica tradicional de plantas medicinales para el control de la diabetes ha causado un aumento en el número de investigaciones experimentales y clínicas dirigidas a la validación de propiedades antidiabéticas, atribuidos empíricamente a esos remedios. Entre los estudios se encuentra el aislamiento, la purificación e

identificación de las sustancias responsables de la actividad hipoglucémica (Ramos y col.,1995; Alarcón y col.,1998).

En México se han usado plantas para tratar la diabetes. La información etnobotánica acerca de plantas medicinales reportan casi 800 usadas para su control, aproximadamente 150 de esas existen en México, sin embargo, solo un pequeño número ha sido estudiada (Alarcón y col.,1998).

Algunas de las plantas utilizadas son comestibles, es decir actúan como medicamento y comida, las cuales podrían ser incluidas en la dieta de los pacientes para mejorar el control de la enfermedad, permitiendo así una disminución potencial de agentes hipoglucémicos (Nammi y col.,2003).

Por otro lado las terapias alternativas, presentan algunos problemas, debido a que no pueden mantener las concentraciones de glucosa en sangre dentro de los límites relativos del rango presente en personas no diabéticas, se obtiene como resultado una hiperglucemia crónica que lleva a complicaciones severas. Estas terapias también producen serios daños hematológicos, cardiovasculares, reacciones gastrointestinales, coma hipoglucémico, daños en el riñón e hígado (Xie y col, 2001).

Por lo tanto el estudio de plantas medicinales puede ofrecer una alternativa natural, permitiendo que los pacientes diabéticos puedan disminuir potencialmente la dosis de agentes hipoglucémicos.

#### II.5.1 La chaya (*Cnidoscolus* ssp)

Mesoamérica (Sur de México y Centroamérica) es uno de los centros del mundo donde se originan y cultivan varios tipos de plantas, entre las que se encuentra la chaya, la cual es un arbusto perenne de 3 a 5 m de largo, produce hojas anchas verde oscuro con lóbulos palmados, savia lechosa y pequeñas flores blancas, pueden contener tres pistilos (Kuti y Torres, 1996; Ross y Molina, 2002) (Figura 5).

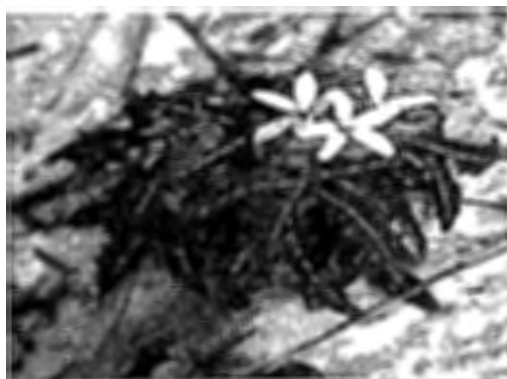


Figura 5. Chaya *Cnidoscolus* ssp

### II.5.2 Taxonomía

La chaya pertenece a la familia Euphorbiaceae, es miembro del género *Cnidoscolus*. Hay dos especies cultivadas: la *C. aconitifolius* y *C. chayamansa*. Es posible encontrar especies silvestres como *C. souzae* y *C. multilobus* principalmente en Yucatán (Franco y col., 2003).

Se han identificado cuatro variedades de cultivo de chaya, las cuales solo difieren en cuanto a su morfología, entre ellas se encuentra la estrella, que presenta cinco lóbulos separados no superpuestos, difiere del tipo silvestre solamente en la aparente falta de pelos urticantes. La picuda es parecida a la estrella, solo difiere en la cantidad de lóbulos, puede tener de cinco a nueve, son más estrechos y fuertemente dentados. La chayamansa es comúnmente de cinco lóbulos, estos se encuentran sobrepuestos desde el centro, las hojas exhiben pelos urticantes pequeños, otras producen granos de polen deformados, la variedad redonda presenta las hojas maduras exclusivamente de tres lóbulos con márgenes ligeramente dentados y aparentemente carentes de pelos urticantes (Ross y Molina, 2002).

El arbusto de la chaya presenta un crecimiento rápido debido a su adaptación a climas tropicales húmedos y secos, debido a que su cultivo es tolerante a

precipitaciones pluviales, resistente a sequías y a enfermedades que normalmente atacan a vegetales de clima tropical (Kuti y Torres, 1996).

### II.5.3 Composición de la chaya

La chaya continua siendo valorada como fuente de nutrientes en la dieta y como una importante planta medicinal, lo que ha permitido su extensión a diversas áreas. Las hojas son principalmente ricas en vitamina C, provitamina A, proteínas, minerales (calcio, hierro, fósforo), niacina, riboflavina y tiamina. Debido a diversos estudios se conoce que presenta valores nutritivos mayores a las acelgas, berros y col (Kuti y Torres, 1996) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Composición nutrimental de tres isotipos de chaya (Ventura, 2004)

| Componente                          | Isotipo   |           |           |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                                     | AGS1      | AGS2      | AGS3      |
| Proteína (%)                        | 20.9±0.8  | 21.8±1.2  | 23.7±0.2  |
| FDT (%)                             | 4.26±0.14 | 3.83±0.05 | 4.08±0.08 |
| Fe (mg/100 g)                       | 21±1.1    | 14±1.3    | 20±0.4    |
| Se (mg/100 g)                       | 0.38±0.3  | 0.43±0.3  | 0.34±0.1  |
| Ca (mg/100 g)                       | 754±8.2   | 1446±37.6 | 1666±41.3 |
| Zn (mg/100 g)                       | 4.5±0.1   | 2.4±0.1   | 2.9±0.1   |
| Compuestos fenólicos totales (mg/g) | 31±1.6    | 39±0.9    | 51±4.6    |
| Vitamina C (mg/100 g)               | 1.9±0.08  | 17±1.0    | 15±1.4    |

Todos los resultados son presentados como la media ±DE.

El contenido de proteína se expresa en base seca.

FDT= Fibra Dietética Total.

Fe, Se, Ca, Zn: mg/100 g de material liofilizado

Los valores de compuestos fenólicos totales están expresados como equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (base seca).

La cuantificación de vitamina C es en extracto acuoso liofilizado.

#### II.5.4 Importancia en la Medicina Herbolaria

La chaya con fines medicinales se prepara hirviéndola de 15 a 20 minutos en poca agua y con sal, con el fin de eliminar los glucósidos cianógenicos, los cuales son tóxicos ya que forman ácido cianhídrico (HCN), son eliminados en el vapor y no permanecen en el agua de cocción. La cocción es necesaria pero no debe ser excesiva debido a que se pueden dañar otros nutrientes como la vitamina C. Por lo general el consumo es vía oral, ya sea cocinada, en infusión o té (Kuti y Torres, 1996; Molina y col., 1999; Ross y Molina, 2002).

La chaya tradicionalmente ha sido recomendada para un número de enfermedades entre ellas la diabetes, obesidad, cálculos en los riñones, hemorroides, acné, problemas en los ojos. Los retoños de chayas y hojas se han tomado como laxantes, diuréticos, estimulante de circulación y para mejorar la digestión.

El factor más importante que contribuye a la eficacia medicinal es indudablemente su valor nutricional. Sin embargo, con respecto a sus propiedades medicinales existen pocos estudios y solamente se han determinado sus efectos antidiabéticos. En un experimento realizado con conejos se demostró que la chaya disminuye los niveles de glucosa en ayuno (Cuadro 5), por lo que se sugiere que la chaya podría regular los niveles de glucosa producidos por el organismo o mejorar la cascada de transducción de señales de la insulina, sin embargo, estos efectos no han sido evaluados (Kuti y Torres, 1996; Ross y Molina, 2002).

Cuadro 5. Efecto del té de chaya sobre el nivel de glucosa en conejos normoglicémicos y diabéticos inducidos con estreptozotocina (Kuti y col., 1996).

| Concentración de glucosa en sangre (mg/dl) ± SE |               |         |            |          |
|---|---------------|---------|------------|----------|
|   | No diabéticos |         | Diabéticos |          |
| Tiempo (horas)                                  | agua          | "chaya" | agua       | "chaya"  |
| 0   | 87±3.1        | 85±2.5  | 112±8.3    | 118±13.2 |
| 1   | 86±2.7        | 91±3.9  | 138±4.6    | 114±7.3  |
| 2   | 87±2.6        | 99±4.3  | 143±6.4    | 103±8.7  |
| 3   | 87±3.1        | 82±1.6  | 139±8.0    | 96±9.3   |
| 4   | 88±3.0        | 85±2.1  | 153±6.3    | 92±5.8   |
| 5   | 87±4.7        | 84±4.2  | 158±7.4    | 89±3.6   |
| 6   | 87±3.1        | 82±2.7  | 162±9.0    | 87±2.7   |

## II.6 Modelos animales para el estudio de la diabetes

Para la inducción experimental de diabetes en modelos de animales experimentales se utilizan principalmente dos sustancias: el alloxan y la estreptozotocina (STZ), los cuales son selectivos para la destrucción de las células beta pancreáticas. La acción citotóxica de ambos agentes diabetogénicos es mediada por especies reactivas de oxígeno, sin embargo el origen de la generación es diferente en el caso del alloxan y de la estreptozotocina.

### II.6.1 El mecanismo de acción de la estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ, 2-deoxy-2-(3-(metil-3nitrosoureido)-D-glucopiranos) es utilizada para inducir Diabetes Mellitus Insulinodependiente (IDDM) y es frecuentemente administrada por vía intravenosa, en una sola dosis entre 40-60



mg/kg de peso corporal. También es eficaz al administrarla por vía intraperitoneal a dosis similares, pero a dosis menores a 40 mg/kg de peso corporal.

La acción de la STZ en las células beta es acompañada y caracterizada por alteraciones de la concentración de glucosa e insulina en sangre. Dos horas después de la inyección se observa una hiperglicemia con una concomitante caída de insulina en sangre. Seis horas después ocurre una hiperglicemia con altos niveles de insulina en sangre, finalmente desarrolla una hiperglicemia y una disminución de los niveles de insulina en sangre. Estos cambios ocasionan anormalidades en la función de las células beta. La STZ daña la oxidación de la glucosa y la biosíntesis y secreción de la insulina.

La STZ es tomada por las células beta pancreáticas a través del transportador de glucosa (GLUT 2), una vez ingresada en la célula induce su muerte por medio de la alquilación del DNA. El daño del DNA se debe a la activación de una poliribosilación del ADP, esto que ocasiona una disminución celular de NAD<sup>+</sup> y ATP. El aumento de la desfosforilación del ATP sufre un sustrato para la xantina oxidasa, resultando la formación de radicales superóxidos, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, otro factor que participa en el daño es la liberación de cantidades tóxicas de óxido nítrico, la destrucción de las células beta es por medio de una necrosis (Szkudelski, 2001; Kamalakkannan y col., 2003) (Figura 6).

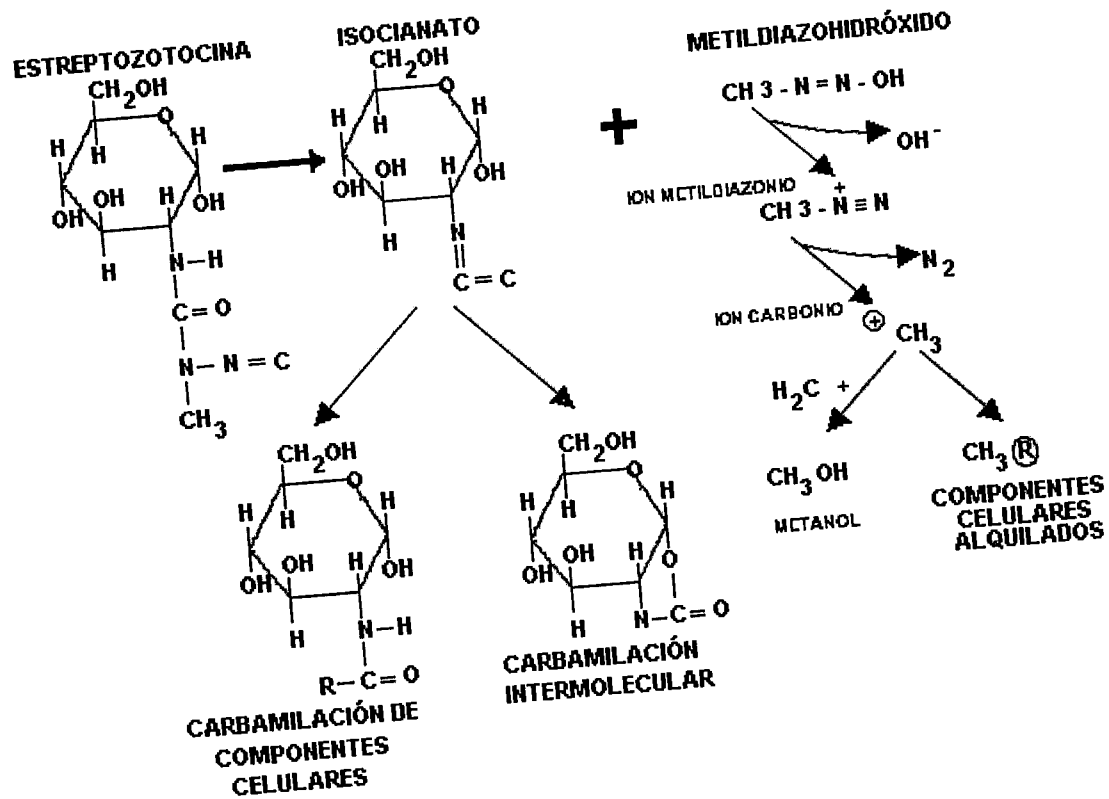


Figura 6. Productos de la descomposición de la estreptozotocina al ingresar a las células beta del páncreas (Szkudelski, 2001).

### III. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de las hojas de Chaya (*Cnidoscolus ssp*) presentan un efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina a través de una modulación de la cascada de transducción de señales de la insulina.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

- Evaluar el efecto de un extracto metanólico de chaya sobre la regulación de los niveles de glucosa de animales diabéticos inducidos químicamente y determinar su relación con la cascada de transducción de señales de la insulina.

### IV.2 Específicos

- Determinar la expresión de Akt y GLUT4 en un modelo de animales diabéticos inducidos químicamente.
- Evaluar el efecto hipoglucemiante de diferentes dosis de extracto metanólico de chaya en ratas Wistar normoglicémicas.
- Comparar el efecto antihiperглиcémico del extracto de chaya en ratas normoglicémicas Wistar y Sprague Dawley.
- Determinar la actividad hipoglucemiante y antihiperглиcémica del extracto de chaya en ratas diabéticas.
- Analizar el efecto de la administración subaguda del extracto de chaya en animales normoglicémicos y diabéticos y su efecto sobre las proteínas Akt y GLUT4.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Químico para inducción de diabetes

Estreptozotocina (Sigma)

#### V.1.2 Fármacos hipoglucemiantes

Glibenclamida

Insulina

#### V.1.3 Anticuerpos

Anticuerpos Primarios de Santa Cruz

- Glut4 rabbit polyclonal IgG 200 µg/ml
- Actina goat polyclonal IgG 20 µg/ml
- Akt1 goat polyclonal IgG 20 µg/ml

Anticuerpos secundarios de Zymed

- Goat anti rabbit IgG (H+L)
- Rabbit anti goat IgG (H+L)

#### V.1.4 Químicos para Western blot

- Reactivos para electroforesis de marca Bio-rad
- Membrana para Protein Blotting: Inmuno-Blot™ Polyvinyl-dinene difluoride (PVDF 0.2mm).
- kit de quimioluminiscencia de marca Roche Molecular Biochemicals

#### V.1.5 Animales

Se utilizaron ratas macho Wistar y ratas macho Sprague Dawley de 250-300 g de peso corporal. Los animales fueron obtenidos del Bioterio del CINVESTAV – México. Se sometieron a un periodo de adaptación durante una semana bajo ciclos de luz – oscuridad de 12 horas, con un consumo libre de agua y alimento.

### V.1.6 Extracto metanólico de chaya

Se utilizó un extracto metanólico de chaya, el cual se disolvió en agua HPLC para su administración.

## V.2 Métodos

### V.2.1 Inducción química de diabetes en ratas Wistar

Para la inducción se utilizaron animales con un ayuno de 8 horas, los cuales fueron tratados con una dosis única de estreptozotocina de 45 mg/Kg de peso por vía intraperitoneal.

La cuantificación de glucosa se realizó 2 días después de la inyección cuando los niveles en ayuno fueron mayores a 180 mg/dl se consideraron diabéticas.

La estreptozotocina se preparó en un buffer de citratos 0.1 M con pH de 4.5.

### V.2.2 Cuantificación de glucosa

La muestra de sangre se obtuvo de la vena caudal de las ratas en estado de ayuno. La glucosa se cuantificó utilizando un glucómetro de la marca ROCHE, utilizando tiras reactivas de la misma marca.

### V.2.3 Determinación de glucosa en ayuno

Los animales en ayuno de 8 horas fueron tratados con el extracto de chaya por vía intragástrica en la concentración correspondiente.

La toma de muestras se realizó a los 0, 60, 120, 180 y 240 minutos. En cada experimento se sometió un grupo control al que únicamente se le dió 3 ml de agua purificada por vía intragástrica.

### V.2.4 Curva de tolerancia a la glucosa

A los animales con un ayuno mínimo de 8 horas se les administró, la cantidad de extracto a evaluar, transcurridos cinco minutos fueron tratados con una solución de glucosa al 25% a una concentración de 3 g/kg de peso para simular la ingesta de alimento. Al grupo control se le administró 3 ml de agua purificada y la carga

correspondiente de glucosa por vía intragástrica. La toma de muestras para la determinación de glucosa se realizó a los 0, 30, 60, 120, y 180 minutos.

**V.2.5 Obtención de la muestra de tejido muscular para expresión de proteínas**  
Los animales se anestesiaron previamente en una cámara de éter, posteriormente se les realizó un corte abdominal, la muestra obtenida de tejido muscular se congeló en nitrógeno líquido.

**V.2.6 Extracción de proteínas en tejido muscular**  
El músculo se homogenizó en un amortiguador frío (Hepes 50mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, NaPP 10 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NaF 10 mM, EDTA (etilendiaminotetracético) 2mM, PMSF (Fluóruro de fenilmetilsulfonilo) 2 mM, leupeptina 5 µg/ml, NP-40 1% y glicerol al 10%. El homogenizado se incubó 45 min a 4 °C con agitación constante y después se centrifugó a 35000 g por 60 min a 4 °C. Al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteínas totales y posteriormente expresión de proteínas Akt y GLUT4

**V.2.7 Determinación de la concentración de proteínas totales.**  
La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (1951), utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

**V.2.8 Determinación de la expresión de proteínas Akt y GLUT4 en tejido muscular de ratas diabéticas inducidas químicamente.**

**V.2.8.1 Electroforesis SDS – PAGE**  
Una vez obtenida la muestra del extracto proteico, estas fueron separadas en un gel al 7% (SDS-PAGE), a 120 volts durante 120 minutos y a una temperatura de 4 °C.

### V.2.8.2 Inmunoblot

Una vez separadas las proteínas, estas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando una cámara semiseca (Trans-Blot SD de Bio-Rad Laboratories), durante 20 minutos a 15 Volts.

Los sitios no específicos de la membrana se bloquearon con una solución de proteínas al 5% (Blocking reagent Roche Molecular Biochemicals) durante una hora y media a temperatura ambiente con agitación constante. Después la membrana se incubó durante 3 horas con el anticuerpo monoclonal de interés a temperatura ambiente con agitación constante. Una vez concluido este tiempo, se le realizaron lavados a la membrana con TTBS. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo durante una hora a temperatura ambiente y con agitación constante. Finalmente la membrana se lavó y se incubó con la solución de quimioluminiscencia (Roche Molecular Biochemicals), se expuso a una película fotográfica Kodak BioMax Light (Eastman Kodak Company Rochester, NY.) y finalmente se reveló. Las bandas se cuantificaron en un fotodocumentador (software Kodak ID Image).

### V.2.8.3 Reblotting

Se utilizó para reactivar la membrana, la cual se sumergió en metanol-agua durante unos minutos, después se colocó durante 30 min con la solución para reblotting (2-mercaptoetanol 100 mM, 2% de SDS), una vez terminado el tiempo se le realizaron 2 lavados con TTBS de 15 min cada uno a temperatura ambiente.

## V.2.9 Evaluación del extracto metanólico de chaya en animales sanos y diabéticos

### V.2.9.1 Expresión de las proteínas Akt y GLUT4.

La expresión se determinó en muestras musculares de animales sanos y diabéticos.



#### V.2.9.2 Evaluación hipoglucemiante de diferentes concentraciones del extracto.

Se trabajó con cuatro grupos de animales sanos, conformado cada uno de ellos por 5 animales. Los grupos se clasificaron de la siguiente manera: 1) Grupo control, 2) extracto de chaya 10 mg/kg de peso, 3) extracto de chaya 70 mg/kg de peso y 4) extracto de chaya 150 mg/kg de peso corporal.

En los animales diabéticos se evaluó el efecto de la concentración del extracto de chaya con mayor capacidad hipoglucemiante determinada en los animales sanos.

#### V.2.9.3 Evaluación de la capacidad antihiperглиcémica del extracto.

Se trabajó con ratas normoglicémicas y diabéticas inducidas químicamente, se les administró primero el extracto de chaya y después de 5 minutos una carga de solución de glucosa al 25%. Se utilizaron dos grupos: 1) Grupo control, 2) extracto de chaya 70 mg/kg de peso

#### V.2.9.4 Comparación del efecto hipoglucemiante del extracto de chaya con un fármaco (Glibenclamida)

Se trabajó con ratas diabéticas inducidas químicamente. Se utilizaron tres grupos: 1) Grupo control, 2) extracto de chaya 70 mg/kg de peso 3) Fármaco (glibenclamida 3 mg/kg de peso). Fue administrado por vía intragástrica.

#### V.2.9.5 Evaluación del efecto de la administración subaguda del extracto en animales sanos y diabéticos.

##### V.2.9.5.1 Comparación del efecto del extracto comparado con la administración de fármacos hipoglucemiantes (insulina, glibenclamida).

Se utilizaron 6 grupos, dos grupos de animales normoglicémicos y cuatro grupos diabéticos, se trabajó con la concentración de mayor efecto determinada en los experimentos anteriores.

La administración de cada grupo fue la siguiente: Diabéticos Grupo 1) control diabético, 3 ml de agua; Grupo 2) extracto de chaya 70 mg/kg de peso; Grupo 3) fármaco glibenclamida 3 mg/kg de peso; Grupo 4) fármaco insulina (3u/100g peso).

Sanos Grupo 1) control sano, 3 ml de agua; Grupo 2) extracto de chaya 70 mg/kg de peso.

El tratamiento se administró a animales con un ayuno de 8 horas. Se determinó la concentración de glucosa el primer día y el último día de dicho tratamiento.

#### V.2.9.5.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto

Se utilizaron 6 grupos, tres grupos de animales diabéticos y los otros 3 de animales sanos y se trabajó con la concentración de mayor efecto determinada en los experimentos anteriores.

La administración de cada grupo fue la siguiente: Diabéticos Grupo 1) control diabético, 3 ml de agua; Grupo 2) extracto de chaya 10 mg/kg de peso; Grupo 3) extracto de chaya 70 mg/kg de peso; Sanos Grupo 4) control sano, 3 ml de agua; Grupo 5) extracto de chaya 10 mg/kg de peso; Grupo 6) extracto de chaya 70 mg/kg de peso.

El tratamiento se administró a animales con un ayuno de 8 horas. Se determinó la concentración de glucosa el primer día y el último día de dicho tratamiento, se registró el consumo de agua y alimento. Al finalizar el experimento se tomaron muestras de músculo abdominal para la determinación de GLUT4 en membrana celular.

#### V.2.10 Análisis estadístico de los datos

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  SEM. Se determinó el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95% y se realizó el análisis de comparación de medias aplicando la prueba de Tukey-Kramer para la comparación entre diferentes tratamientos así como también la prueba de Dunnet en los casos en los que sólo se compararon tratamientos con respecto a un control.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Expresión de Akt y GLUT4 en ratas diabéticas inducidas químicamente.

Primeramente se realizó la inducción de diabetes en ratas Wistar utilizando una dosis única de 45 mg/kg del diabetógeno estreptozotocina. Como se muestra en la Figura 7 al quinto día después de la inducción de diabetes los animales mostraron niveles de glucosa de 160 mg/dl y dicha glicemia se incrementa considerablemente a través del tiempo alcanzando niveles de 320 mg/dl, lo cual nos indica que los animales presentan una enfermedad progresiva. Se consideraron ratas diabéticas aquellas que presentaron niveles de glucosa en sangre superior a 180 mg/dl.

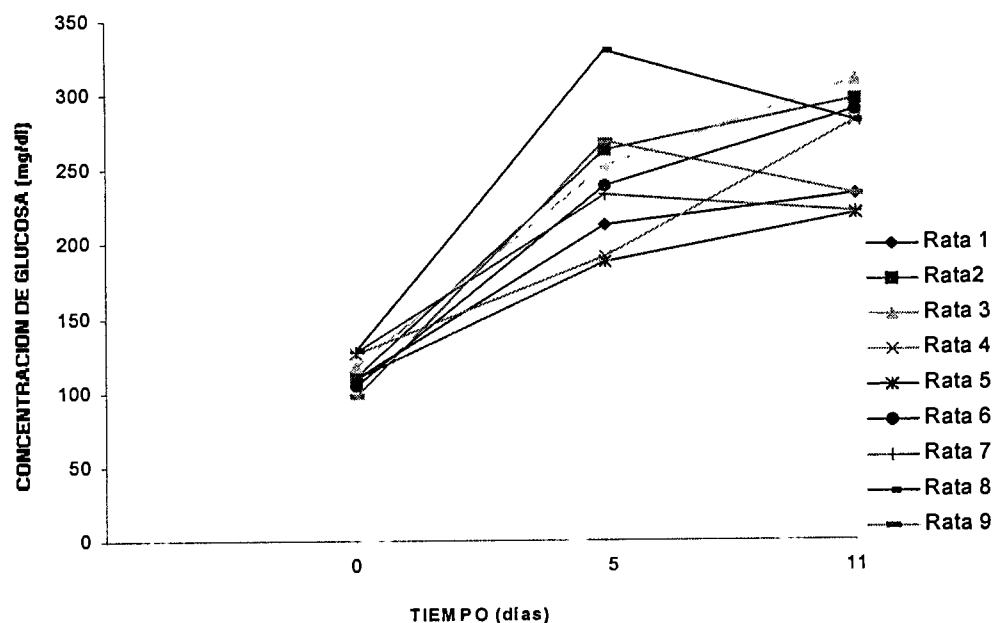


Figura 7. Concentraciones de glucosa (mg/dl) de ratas Wistar diabéticas inducidas químicamente con estreptozotocina a una dosis de 45 mg/kg.

VI.2 Determinación de la cantidad de GLUT4 y Akt en músculo abdominal de ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas.

Después de la inducción de diabetes se realizó la obtención del tejido muscular, de dichas ratas, a través de un corte abdominal para obtener muestras y evaluar la cantidad de las proteínas GLUT4 y Akt.

### VI.2.1 Cantidad de transportador de glucosa GLUT4

En la Figura 8 se muestra la cantidad del transportador de glucosa GLUT4, en músculo esquelético de ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas. En las ratas Wistar diabéticas se observa una menor cantidad de esta proteína comparada con las ratas normoglicémicas. Se realizó la determinación de actina con el fin de asegurar que la concentración de proteína cargada en cada carril del gel fue constante.

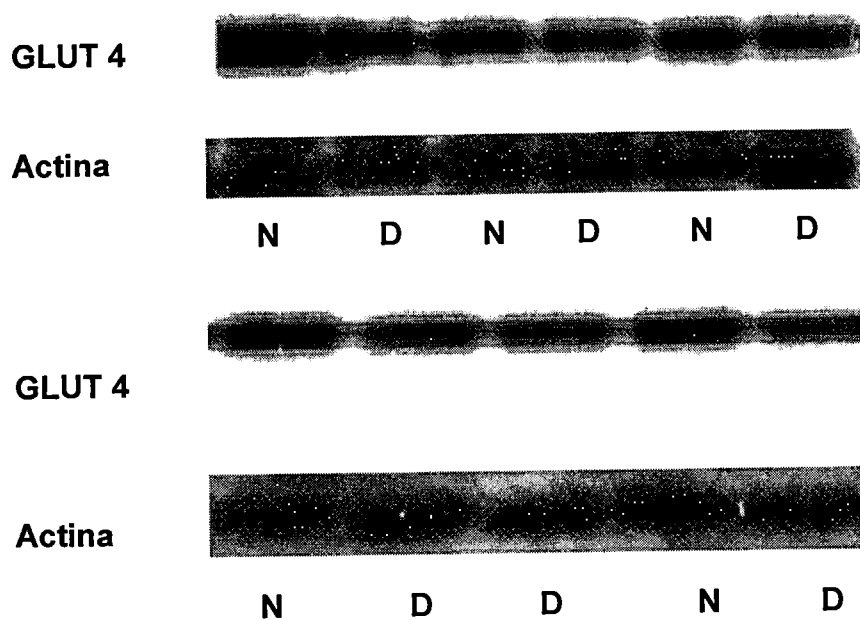


Figura 8. Cantidad de GLUT4 en tejido muscular de ratas Wistar normoglicémicas (N) y diabéticas (D). Las diabéticas fueron tratadas con estreptozotocina (STZ) a dosis única de 45 mg/kg. Se utilizó como estándar interno la actina. La proteína GLUT4 se identificó a través de una banda simple de 45 kD y la proteína actina con una banda de 42 kD.

### VI.2.2 Cantidad de la proteína Akt.

En la figura 9 se muestra la cantidad de la proteína Akt en músculo esquelético en ratas normoglicémicas y diabéticas. En las ratas Wistar diabéticas se observa una menor expresión de esta proteína comparada con las ratas normoglicémicas. Se realizó el reblotting para actina con el fin de asegurar que la concentración de proteína cargada en cada línea del gel es constante.

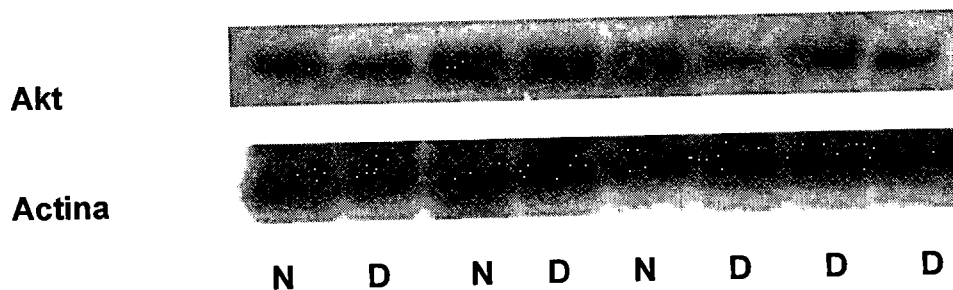


Figura 9. Cantidad de la proteína Akt en tejido muscular de ratas Wistar normoglicémicas (N) y diabéticas (D). Las diabéticas fueron tratadas con estreptozotocina (STZ) a dosis única de 45 mg/kg. Se utilizó como estándar interno la actina. La proteína Akt se identificó a través de una banda simple de 55 kD y la proteína actina con una banda de 42 kD.

VI.3 Efecto hipoglucémico del extracto metanólico de chaya a diferentes concentraciones en ratas Wistar normoglicémicas.

En la primera fase de este proyecto se evaluaron diferentes concentraciones del extracto de chaya (10 mg/kg, 70 mg/kg y 150 mg/kg) en ratas normoglicémicas Wistar con el fin de encontrar la dosis con mayor efecto hipoglucémico.

En la Figura 10 se muestra las diferencias de concentración de glucosa sanguínea de los animales en tratamiento con respecto al tiempo y se demostró que la dosis de 70 mg/kg disminuye significativamente ( $P < 0.10$ ) los niveles de glucosa en un 57% con respecto al control a los 240 minutos. En el caso de la dosis de 150 mg/kg no se presentó ningún efecto significativo, contrario a lo esperado la dosis de 10 mg/kg mostró hiperglicemia a los 60 y 180 minutos ( $3 \pm 13.7$ ,  $4.7 \pm 12.9$ ), con respecto al control ( $-12.6 \pm 7.2$ ,  $-11.2 \pm 6.79$ ).

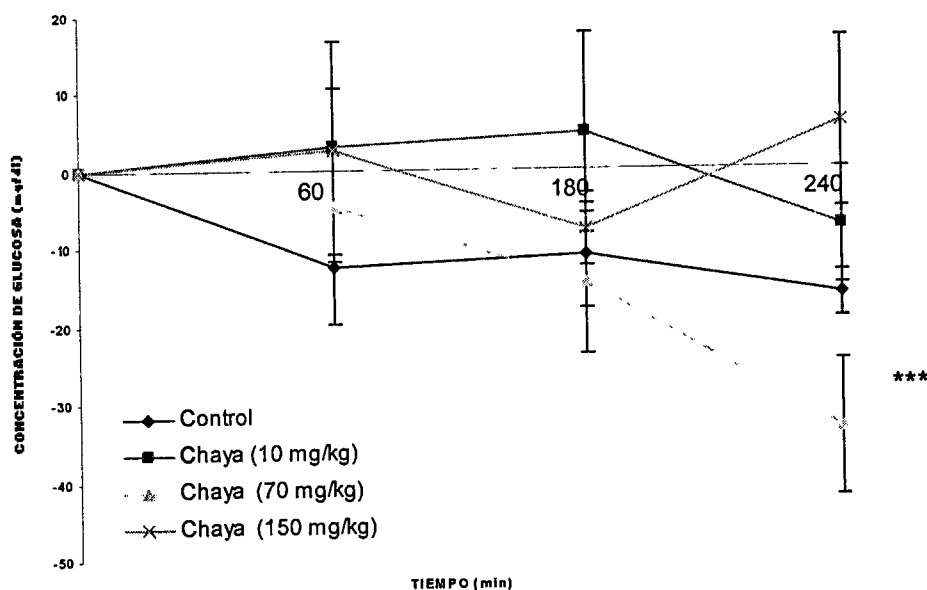


Figura 10. Efecto hipoglucemiante de diferentes concentraciones de extracto metanólico de chaya 10, 70 y 150 mg/kg en ratas Wistar normoglicémicas. Los valores son presentados como media de la diferencia de concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

\*\*\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.10$ ) con respecto al control

VI.4 Evaluación del efecto antihiperlicémico del extracto de chaya en ratas Wistar y Sprague Dawley normoglicémicas.

Una vez seleccionada la dosis de 70 mg/kg, se determinó la actividad antihiperlicemia en ratas Wistar, a través de la cual se simula la ingesta de alimentos mediante una carga determinada de glucosa. En la Figura 11a se muestra que en todos los tiempos evaluados los niveles de glucosa sanguínea son mayores en los animales tratados con el extracto de chaya, siendo estadísticamente significativo a los 120 minutos, presentando los animales control niveles de glucosa de  $110 \pm 8$  mg/dl y los tratados  $158 \pm 22$  mg/dl. En base a estos resultados se repitió el experimento con otro grupo de ratas Wistar (Figura 11b) y el resultado fue similar al obtenido con anterioridad.

En estudios realizados en el laboratorio se demostró que el efecto antihiperlicémico de algunas plantas varía dependiendo de la cepa de animal utilizada, por tal motivo se evaluó este mismo efecto en ratas Sprague Dawley, obteniendo así un efecto de antihiperlicemia estadísticamente significativo a los 60 minutos con concentración de glucosa de los animales diabéticos de  $138 \pm 3.0$  mg/dl y de los controles de  $171.2 \pm 7.6$  mg/dl (Figura 11c).

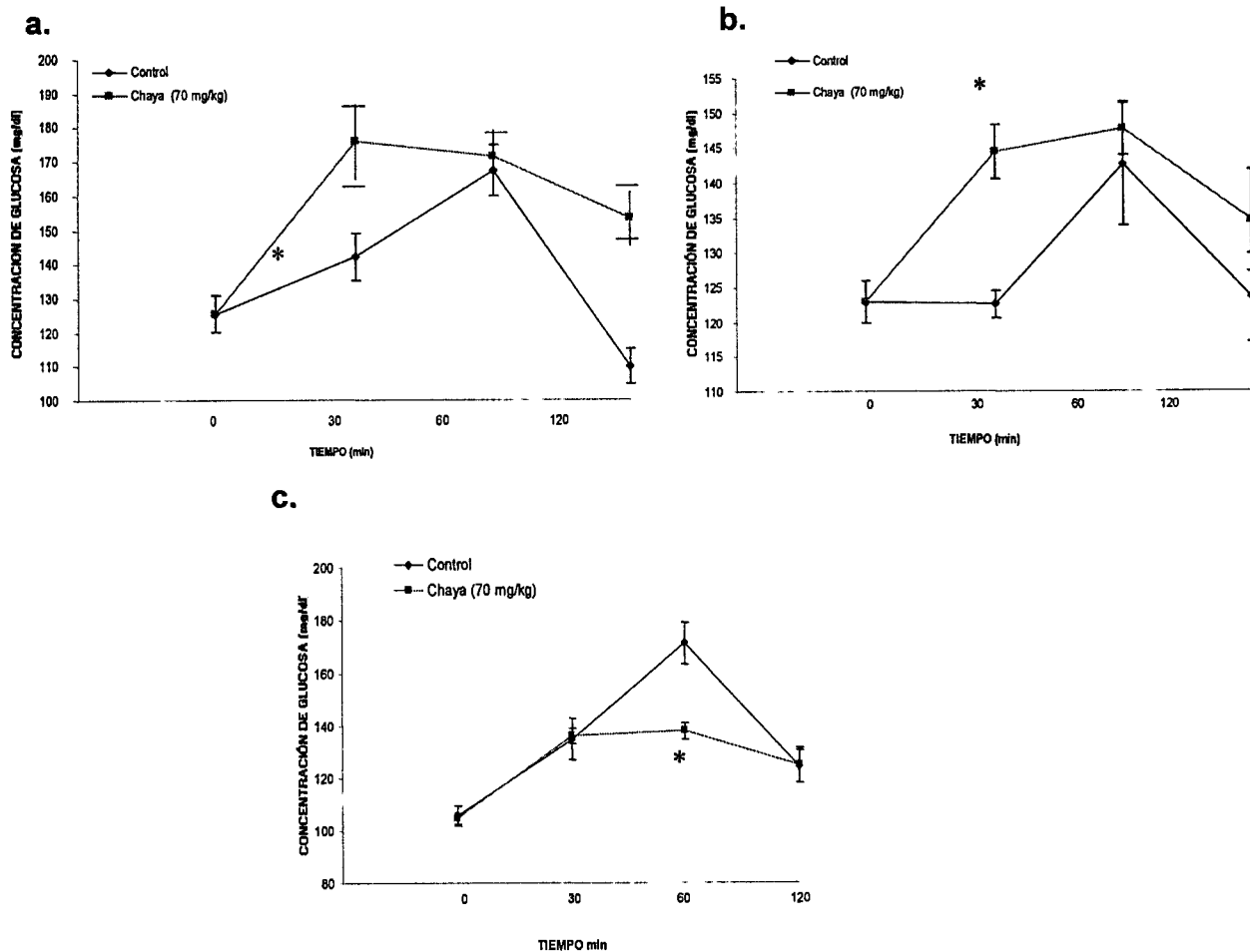


Figura 11. Efecto antihiperglucémico del extracto de chaya en dosis de 70 mg/kg en dos cepas diferentes. Wistar (a), (b) y Sprague Dawley (c) normoglicémicas. Los valores son presentados como media de la concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.01$ ) con respecto al control

\*\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto al control



#### VI.5 Efecto hipoglucémico del extracto metanólico de chaya en ratas Wistar diabéticas.

Se evaluó el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de chaya, utilizando la dosis previamente seleccionada (70 mg/kg), en ratas Wistar diabéticas. En la Figura 12 se muestran las concentraciones de glucosa sanguínea de los animales en tratamiento con respecto al tiempo, observándose una disminución estadísticamente significativa a los 120 y 300 minutos ( $P < 0.10$ ), presentando los animales control niveles de glucosa de  $231 \pm 2.0$  mg/dl y  $250.7 \pm 11.4$  mg/dl y los tratados de  $208.3 \pm 8.1$  y  $177.6 \pm 25.5$  respectivamente.

#### VI.6 Comparación del efecto hipoglucemiante del extracto metanólico de chaya y el fármaco glibenclamida en ratas Wistar diabéticas.

En base a resultados previamente obtenidos acerca del efecto hipoglucémico del extracto a dosis de 70 mg/kg en ratas Wistar diabéticas, se realizó nuevamente el experimento, sometiendo también un grupo tratado con un fármaco (glibenclamida) a dosis de 3 mg/kg, con el fin de comparar el efecto hipoglucemiante del extracto de chaya. En la Figura 13 se muestran las concentraciones de glucosa sanguínea de los animales en tratamiento con respecto al tiempo, el grupo tratado con extracto presenta una tendencia hipoglucemiante estadísticamente significativa a los 120 minutos ( $P < 0.05$ ), y a los 180 minutos ( $P < 0.10$ ), los animales control presentan niveles de glucosa de  $268.4 \pm 7.3$  y  $277.8 \pm 6.2$  y los tratados de  $230.4 \pm 13.7$  y  $224 \pm 22.5$ . El grupo tratado con el fármaco se comportó como se esperaba presentando una tendencia hipoglucemiante estadísticamente significativa con respecto al control a los 120 minutos ( $P < 0.05$ ), y a los 180 minutos ( $P < 0.01$ ), con niveles de glucosa de  $225 \pm 11.8$  y  $242.6 \pm 7.8$  mg/dl.

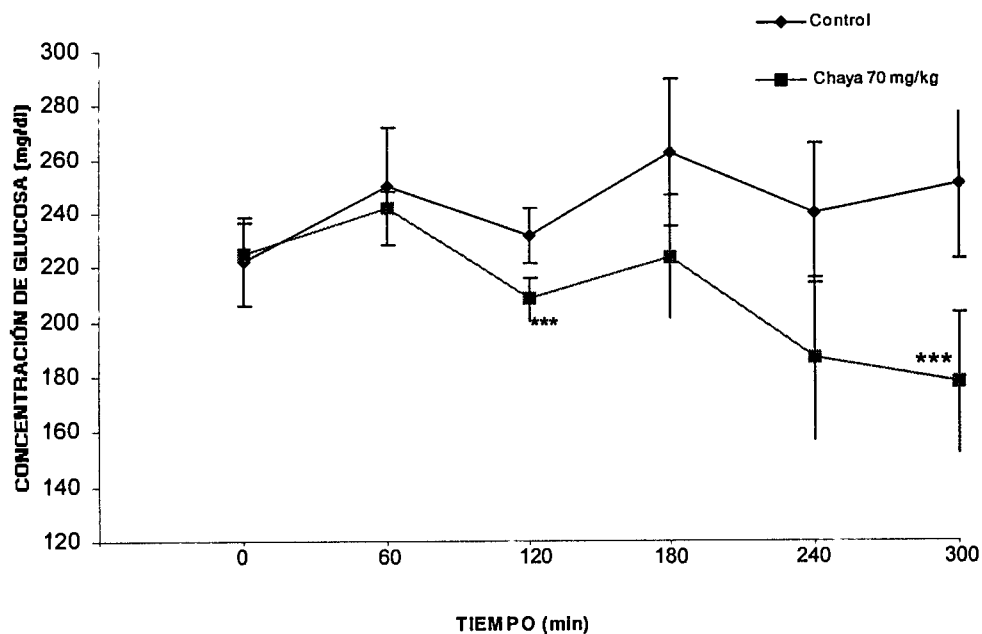


Figura 12. Efecto hipoglucémico del extracto metanólico de chaya en dosis de 70 mg/kg en ratas Wistar diabéticas. Los valores son presentados como media de la concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet. \*\*\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.10$ ) con respecto al control

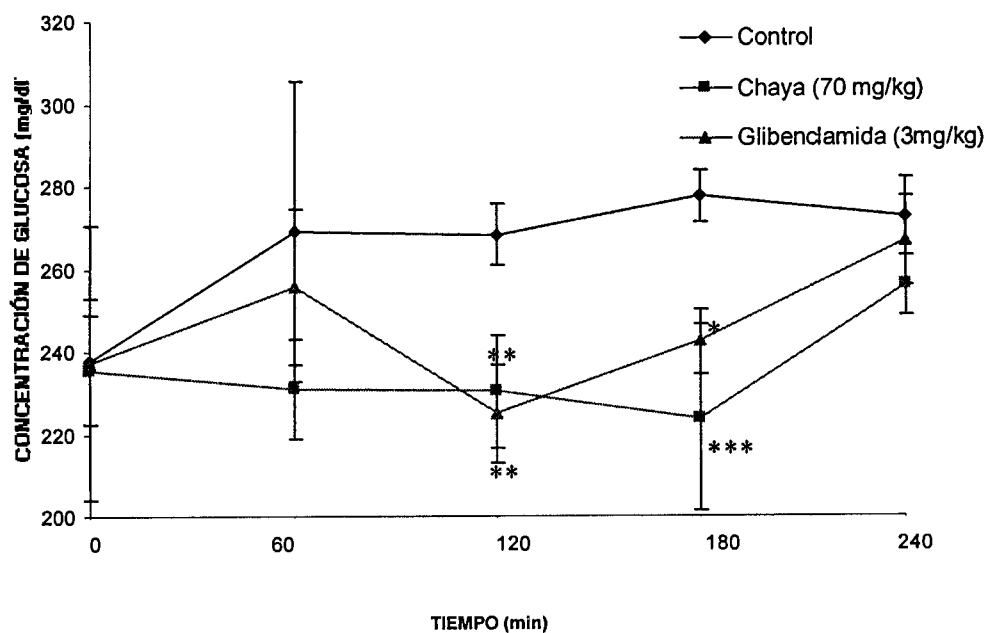


Figura 13. Comparación del efecto hipoglucémico del extracto de chaya a la dosis de 70 mg/kg y el fármaco glibenclámda a la dosis de 3 mg/kg en ratas Wistar diabéticas. Los valores son presentados como media de la concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.01$ ) con respecto al control

\*\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto al control

\*\*\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.10$ ) con respecto al control

### VI.7 Evaluación del efecto antihiper glucémico del extracto en ratas Wistar diabéticas

Se realizó una curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar diabéticas para determinar si presentan un efecto antihiper glucémico al ser administrada una carga de glucosa seguida de la administración del extracto. En la Figura 14 se muestra que el grupo tratado con chaya y glucosa presenta un comportamiento de hiper glucemia en todos los tiempos evaluados, siendo incluso mayor que los niveles de glucosa presentados por el grupo control, este comportamiento es similar al observado en las ratas Wistar normoglicémicas.

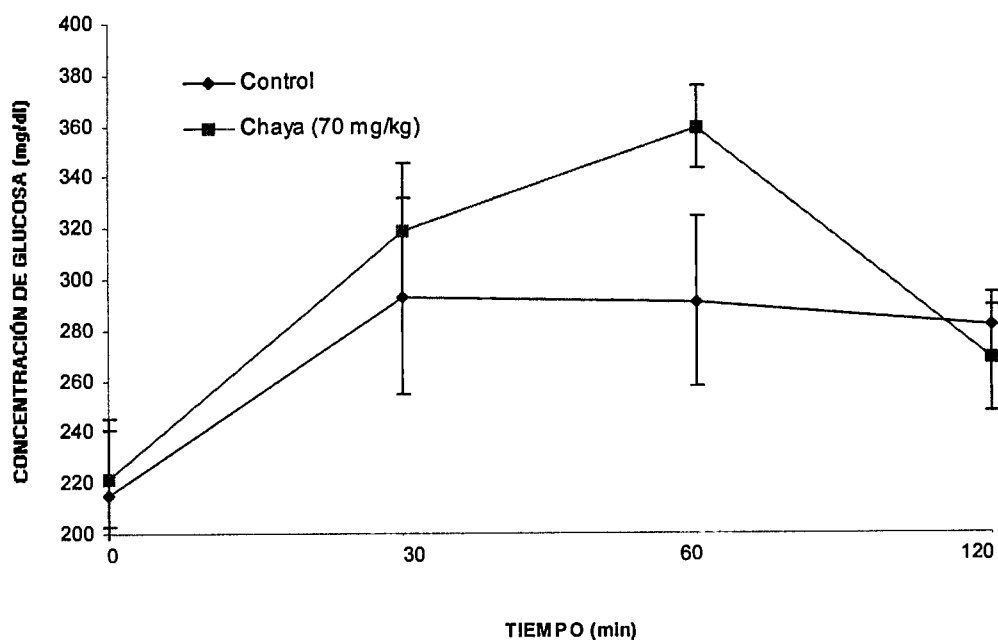


Figura 14. Efecto antihiper glucémico del extracto de chaya a la dosis de 70 mg/kg en ratas Wistar diabéticas. Los valores son presentados como media de la concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

VI.8 Evaluación de la administración del extracto metanólico de chaya durante tres días en ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas.

Se evaluó el efecto hipoglucemiante del extracto de chaya con respecto a dos fármacos (glibenclamida e insulina), durante una administración de tres días, se formaron seis grupos: 1) normoglicémico control 2) normoglicémico tratado con extracto (70 mg/kg), 3) diabético control 4) diabético tratado con extracto (70 mg/kg), 5) diabético tratado con glibenclamida (3 mg/kg), 6) diabético tratado con insulina. En la Figura 15 se muestra que los grupos de animales normoglicémicos tratados con chaya presentaron niveles de glucosa similar al control que recibió agua purificada, sin presentar diferencia estadística significativa. Con respecto a los animales diabéticos, el grupo tratado con chaya durante tres días no mostró efecto hipoglucemiante al compararlo con su respectivo control diabético, este mismo efecto fue mostrado por el grupo tratado con el fármaco glibenclamida, sin embargo el tratamiento con insulina disminuyó significativamente los niveles de glucosa en este grupo presentando valores de  $111 \pm 5.7$  mg/dl y el control de  $267.6 \pm 13.2$  mg/dl.

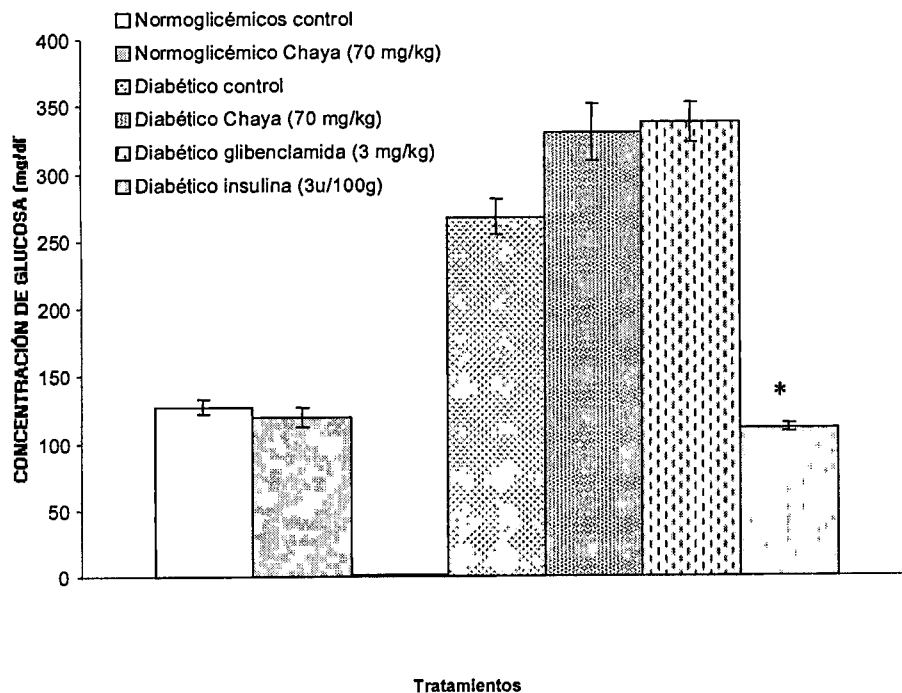


Figura 15. Efecto hipoglucémico del extracto de chaya en dosis de 70 mg/kg en ratas Wistar diabéticas y normoglicémicas tratada durante tres días. Los valores son presentados como media de la concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.01$ ) con respecto al control

VI.9 Evaluación de la administración de bajas concentraciones de extracto de chaya en animales diabéticos.

Debido a que el extracto de chaya no mostró efecto hipoglucemiante, se buscaron otras concentraciones de extractos de chaya. En la Figura 16 se muestran las diferencias significativas de glucosa sanguínea de animales tratados con respecto al tiempo, el grupo tratado con dosis de 10 mg/kg de peso presenta una tendencia hipoglucémica en los tiempos determinados con respecto al control, presentando una disminución significativa a los 180 minutos, el control presenta una diferencia de niveles de glucosa sanguínea de  $53 \pm 23.7$  mg/dl y los tratados  $-127 \pm 51.6$  mg/dl. Contrario a lo obtenido en el grupo tratado a dosis de 40 mg/kg no mostró efecto hipoglucemiante. Cabe resaltar que la dosis de 10 mg/kg se había evaluado en animales normoglicémicos y bajo esas condiciones no se observó efecto hipoglucemiante, estos resultados nos indican que el efecto de la chaya es dependiente del estado fisiológico del animal.

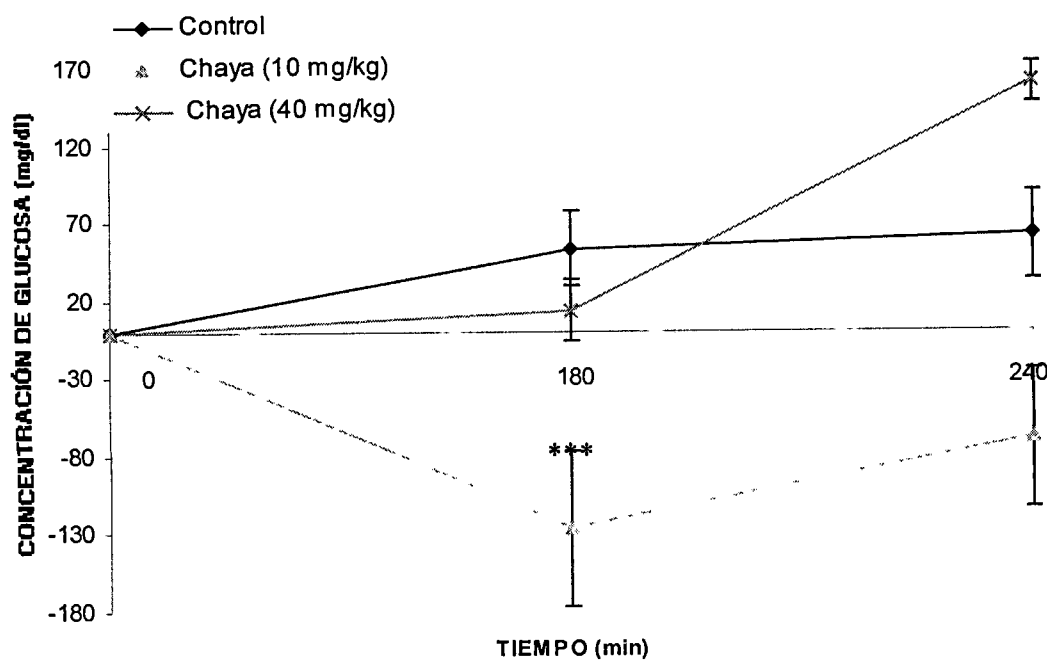


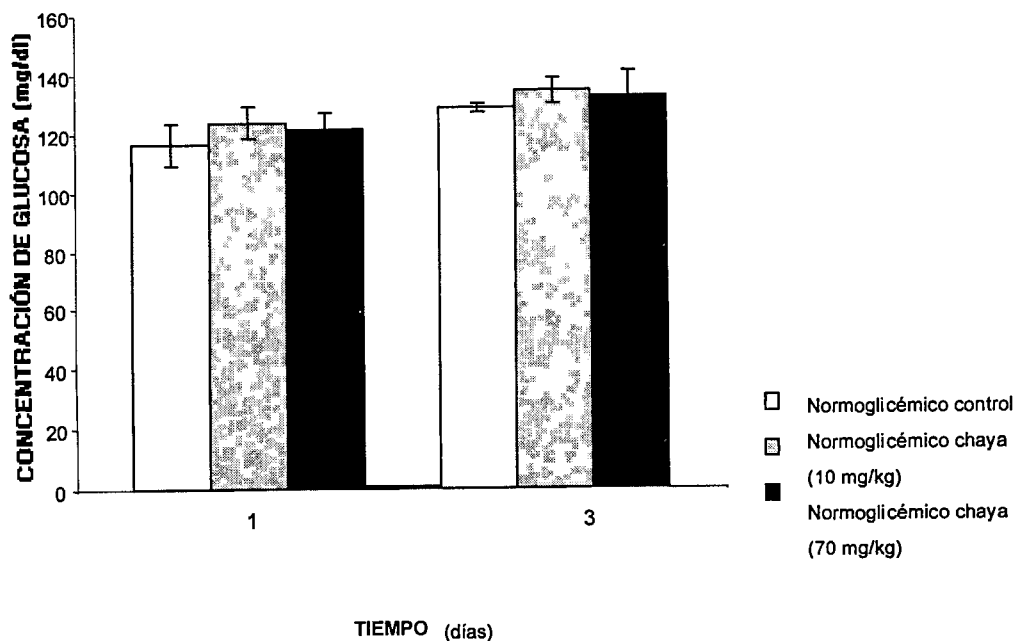
Figura 16. Efecto hipoglucemiante de diferentes concentraciones de extracto metanólico de chaya 10 mg/kg y 40 mg/kg en ratas Wistar diabéticas. Los valores son presentados como media de la diferencia de concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

\*\*\* Indica diferencia estadística significativa ( $P < 0.10$ ) con respecto al control



VI.10 De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, se demostró que las dosis de mayor efecto hipoglucémico fueron las de 10 mg/kg y la de 70 mg/kg, por lo tanto se monitoreo a nivel de glucosa sanguínea en ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas utilizando dichas concentraciones. En la Figura 17a se muestran los niveles de glucosa sanguínea en ratas Wistar normoglicémicas evaluadas después del primer y tercer día de tratamiento y se observa que ninguna de las dosis evaluadas muestra efecto alguno sobre los niveles de glucosa sanguínea. Con respecto al comportamiento de las ratas Wistar diabéticas, en la Figura 18b se muestra que los animales no presentaron una diferencia significativa en los niveles de glucosa con respecto al control. Estos resultados coinciden con el experimento realizado con anterioridad.

a.



b.

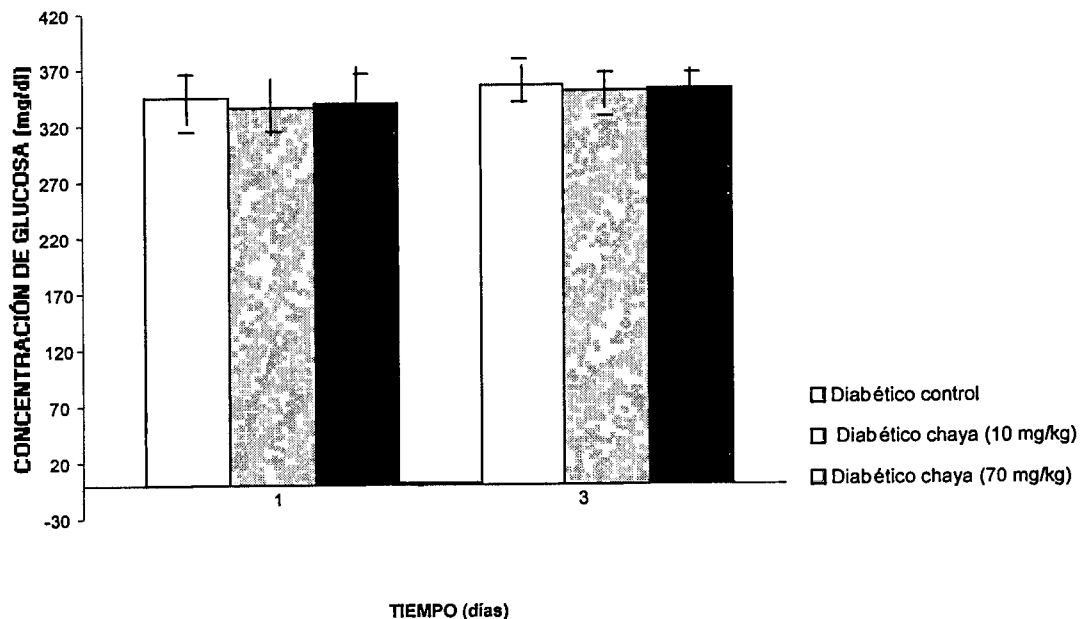


Figura 17. Efecto hipoglucemiante de diferentes concentraciones de extracto metanólico de chaya 10 mg/kg y 40 mg/kg en ratas Wistar sanas (a) y diabéticas (b). Los valores son presentados como media de la concentración de glucosa  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

### VI.10.1 Evaluación del consumo de líquido.

Se realizó un monitoreo de consumo de líquido (agua), durante tres días con el fin de utilizarlo como indicador de la enfermedad en los animales diabéticos y normoglicémicos durante la administración subaguda del extracto. La Figura 18 muestra que los grupos control normoglicémicos (327-451 ml), consumieron menos líquido que los grupos diabéticos (605-618 ml). Entre los grupos normoglicémicos el grupo tratado con dosis de 70 mg/kg fue el de mayor consumo de agua respecto al de dosis de 10 mg/kg y control. En los grupos diabéticos el consumo de agua fue similar entre control y tratamientos.

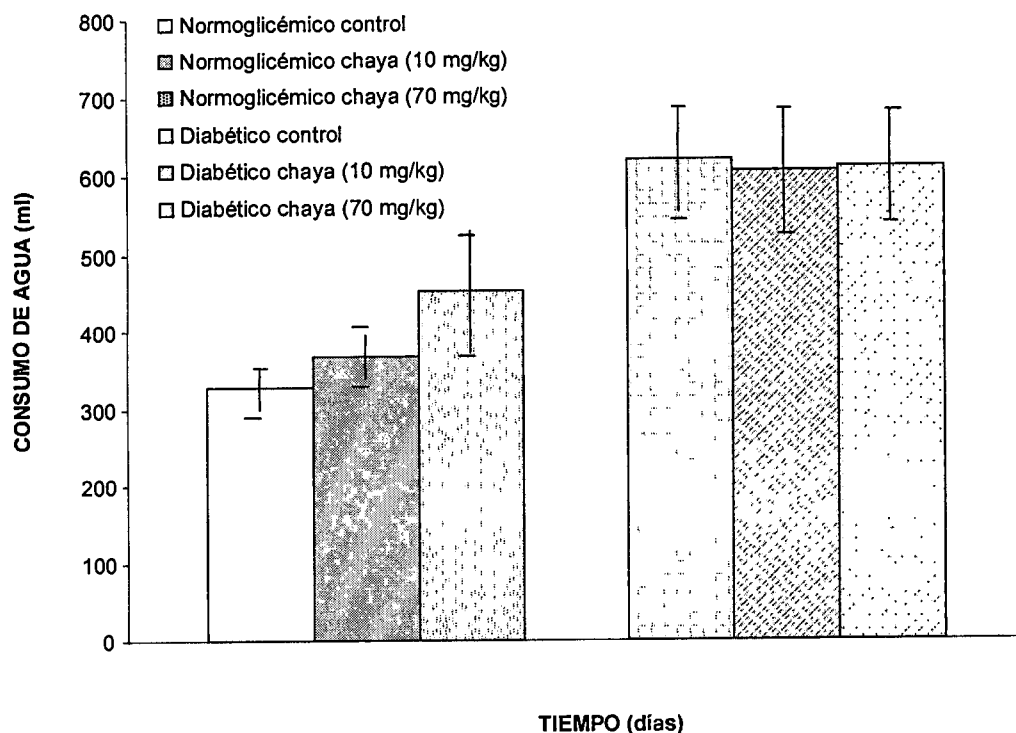


Figura 18. Consumo de líquido en grupos de ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas tratadas con extracto de chaya en dosis de 10 mg/kg y 40 mg/kg. Los valores son presentados como media del consumo de agua  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

### VI.10.2 Evaluación de la ingesta de alimento

Se realizó un monitoreo del consumo de alimento, en los animales diabéticos y normoglicémicos durante la administración subaguda del extracto. La figura 19 muestra que los grupos control normoglicémicos (52-110 g), consumieron menos alimento que los grupos diabéticos (141-174 g). Entre los grupos normoglicémicos el grupo tratado con dosis de 10 mg/kg fue el de mayor ingesta de alimento respecto al de dosis de 70 mg/kg y al control. En los grupos diabéticos el consumo no presenta diferencia significativa debido a que es muy similar en ambos grupos.

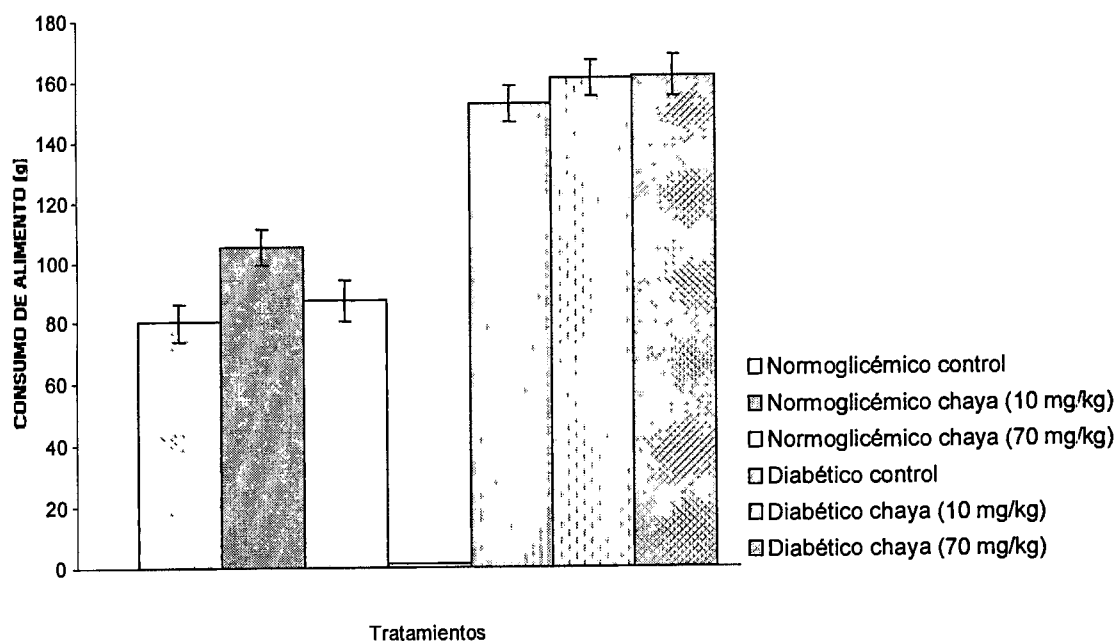


Figura 19. Consumo de alimento de grupos de ratas Wistar normoglicémicas y diabéticas tratadas con extracto de chaya en dosis de 10 mg/kg y 40 mg/kg. Los valores son presentados como media del consumo de alimento  $\pm$  SEM y analizados con la prueba de Dunnet.

## VII. DISCUSIONES

La inducción experimental de animales para el estudio de diabetes mellitus se realiza por diferentes métodos, entre ellos el uso de sustancias químicas que causan principalmente un daño en las células beta del páncreas, la más utilizada es la estreptozotocina, la cual destruye a las células  $\beta$  pancreáticas. Durante el experimento la dosis que se administró en ratas adultas por vía intraperitoneal fue de 45 mg/kg de peso corporal, como dosis única, obteniendo un modelo de animales de diabetes tipo I, esto concuerda con lo mencionado por Szkudelski (2001), que evaluó un rango de dosis de estreptozotocina de 40-60 mg/kg de peso para la inducción de la diabetes tipo I. En los resultados presentados se observó que al quinto día de administración de la estreptozotocina se presenta un estado de hiperglicemia lo cual sugiere que existe ya una alteración de la secreción de insulina, el incremento de dicha hiperglicemia con respecto al tiempo demostró que existía una enfermedad degenerativa.

El músculo esquelético es uno de los tejidos que dispone de manera mayoritaria de glucosa para su funcionamiento y el transporte de este carbohidrato depende de las señales por insulina, en el músculo esquelético el transportador de glucosa principal es el GLUT4, de acuerdo a estudios realizados en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, se reportó que tanto el mRNA como la proteína de GLUT4 se encuentran disminuidos hasta en un 50 % en músculo esquelético (Liu y col., 2000), sin embargo Yong y col (2004) no observaron diferencias estadísticas significativas para la expresión total de GLUT4 entre las ratas sanas y diabéticas. Los resultados obtenidos en nuestro proyecto demuestran que las ratas diabéticas disminuyen de manera significativa la expresión total de GLUT4 en músculo esquelético, por lo tanto, este factor podría además influir de manera importante en una disminución de la incorporación de glucosa a las células dependientes de esta hormona.

Además de GLUT4, otra de las alteraciones importantes en la cascada de transducción de señales de la insulina en los pacientes diabéticos es la baja expresión y actividad de Akt, la cual envía la señal para la translocación de

GLUT4 de las vesículas a la membrana celular (Sherpherd y Kahn., 1999). En nuestros experimentos además se encontró que la expresión de Akt se encuentra disminuida en el músculo de animales diabéticos. Dicho resultado en conjunto con la baja expresión de GLUT4, demuestra que en los animales inducidos con estreptozotocina no solamente se disminuye la secreción de insulina, sino que además se presentan alteraciones en la cascada de transducción de señales de la insulina.

La chaya es considerada como una planta medicinal, su mayor contribución se debe a su alto valor nutricional. Es utilizada para diversas enfermedades, entre ellas la Diabetes Mellitus, los estudios relacionados con su posible efecto antidiabético son muy pocos. En nuestro estudio se llevó a cabo la evaluación de diferentes concentraciones de extracto metanólico de chaya en animales normoglicémicos previamente en ayuno, se mostró que el efecto hipoglucemiante depende de la dosis administrada de dicho extracto, a dosis de 10 mg/kg se presentó un estado de hiperglicemia, sin embargo a la dosis de 70 mg/kg de peso se presentó un efecto hipoglucémico, dicho resultado también fue presentado por los animales diabéticos. El comportamiento obtenido en este experimento es semejante al reportado en la literatura por Kuti y Torres (1996), los cuales realizaron la evaluación de la potencia antidiabética de la chaya en conejos normoglicémicos y diabéticos inducidos con estreptozotocina. Se llevó a cabo también la evaluación antihiperglicémica del extracto realizando curvas de tolerancia a la glucosa tanto en animales normoglicémicos como diabéticos, la respuesta obtenida fue igual en ambos casos, presentaron hiperglicemia en todos los tiempos evaluados, con respecto a la literatura las curvas de tolerancia a la glucosa probadas con otros tipos de chaya, muestran incremento del pico de hiperglicémico (Alarcón y col., 1988). Sin embargo el comportamiento de algunas plantas varía de acuerdo a la cepa del animal, por lo tanto se realizó la prueba con ratas Sprague Dawley mostrando un efecto antihiperglicémico.

Durante el experimento se comparó el efecto hipoglucemiante del extracto de chaya contra un fármaco hipoglucemiante oral de vida corta, de acuerdo a los

resultados el comportamiento del extracto fue similar al del fármaco, el cual actúa mediante la estimulación de las células  $\beta$  del páncreas para la liberación de insulina, por lo tanto es posible que al presentar efecto el grupo tratado con glibenclamida, se deba a que no se obtuvo una destrucción total de las células  $\beta$  del páncreas con la dosis empleada de estreptozotocina. De acuerdo a la literatura se ha encontrado que a estas dosis se produce una destrucción incompleta de las células  $\beta$ , por lo tanto existe la posibilidad de que algunos agentes activen la liberación de insulina o actúen como insulina (Kamalakkanan, 2003).

El estudio del comportamiento del extracto de chaya durante una administración de tres días no mostró efecto hipoglucemiante tanto en animales normoglicémicos ni en diabéticos, sin embargo el grupo tratado con insulina disminuyó las concentraciones de glucosa sanguínea de manera significativa, debido a la incorporación de glucosa originada por dicho medicamento. Este experimento se llevo a cabo nuevamente utilizando dos dosis de extracto metanólico de chaya, el comportamiento fue similar al realizado primero, es decir no presentó actividad hipoglucemiante en los animales normoglicémicos ni en los diabéticos, dicho resultado fue diferente al obtenido en los experimentos cortos. Estos resultados nos sugieren que posiblemente la chaya presente un comportamiento similar al de la insulina rápida, en donde su inicio de acción es de 5-10 min y su duración de efecto de 4 horas. Esto se puede asociar con el comportamiento de los experimentos rápidos en donde el seguimiento de los niveles de glucosa es en un periodo de 3 a 4 horas, y en el largo de 24 horas por lo tanto para su determinación la chaya ya no produce algún efecto. Debido a que el extracto de chaya no disminuyó los niveles de glucosa durante el tratamiento subagudo, no se realizó la determinación de la concentración de proteínas GLUT4 y Akt.

Las alteraciones fisiológicas presentadas por la diabetes están relacionadas con los grados de hiperglicemia, provocando un desequilibrio osmótico trayendo como consecuencia la polidipsia (sed excesiva), manifestándose así la poliuria, esto debido a la deshidratación por aumento de la salida de glucosa en orina (Equigua, 2001). El comportamiento sobre el consumo del líquido en los animales

normoglicémicos fue menor comparado con el diabético, sin embargo dentro del grupo de los normoglicémicos el grupo tratado con la dosis más alta del extracto de chaya presentó un mayor consumo de agua, este comportamiento se relaciona con el efecto diurético que se le atribuye a la chaya (Alarcón y col., 1998). En los animales diabéticos el consumo fue muy similar sin presentar una diferencia significativa. Otra característica de la diabetes mellitus es la polifagia (hambre excesiva) que se da por la falta de insulina ya que esta se encarga de inhibir la expresión de péptidos orexigénicos (inducen el hambre) y los péptidos anorexigénicos (provocan sensación de saciedad), (Equigua, 2001). En nuestro estudio se obtuvo una ingesta de alimento menor en los animales normoglicémicos que en los animales diabéticos, como era de esperarse debido que al modelo que se trabajo fueron de diabetes tipo I (Kamalakkanan, 2003). Sin embargo el tratamiento con chaya no disminuye los niveles de glucosa en los animales diabéticos, así como ninguno de los parámetros relacionados con la enfermedad.



## VIII. CONCLUSIONES

En el músculo de ratas diabéticas inducidas químicamente con estreptozotocina, la concentración de Akt y GLUT4 se encuentran disminuidas con respecto a las ratas wistar normoglicémicas.

El porcentaje de disminución de los niveles de glucosa producidos por el extracto de chaya en pruebas agudas no representa ventajas fisiológicas para el control de la enfermedad.

El extracto metanólico de chaya sólo muestra efecto en tiempos cortos y bajo condiciones de ayuno en presencia de glucosa no tiene la capacidad de disminuir los niveles de glucosa en sangre.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Alarcón, F.J., Roman, R.R., Perez, G.S., Aguilar, C.A., Contreras, W.C.C., Flores, S.J.L. 1998.** Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. 61: 101-110.
- Bernard, J. H.1991.** Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. 8ª ed. Salvat Editores, S.A., Barcelona España: 219.
- Cruz, M., Velasco, E., Kumate, J. 2000.** Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Gaceta Médica de México*. Vol. 137: 135-144.
- Franco, S.L., Castro, S.C., McNab, J.M., Quijano, C.R., Reyes, R.R. 2003.** Effect of age of regrowth on chemical composition of chaya (*Cnidoscolus aconitifolius*) leaves. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 83: 609-612.
- Guyton, A.C. 2001.** Tratado de Fisiología Médica. 10ª. ed. McGraw-Hill, México: 1063-1079.
- Haruta, T., Morris, J.A., Rose, D.W., Nelson, J.G., Mueckler, M., Olefsky, J.M. 1995.** Insulin-stimulated GLUT4 Translocation Is Mediated by a Divergent Intracellular Signaling Pathway. *Divergent Insulin Signaling Pathways*. Vol. 270: 27991-27994.
- Hugues. B. , Rodriguez, JC., Rodriguez, JC. 2001.** Animales de Laboratorio en la Endocrinología: biomodelos de la Diabetes Mellitus tipo I. *Revista Cubana de Endocrinología*. Vol. 12:168-177.
- Kamalakkanan, N., Phil, P., Rajadurai, M., Phil, M., Stanley, M. 2003.** Effect of Aegle marmelos Fruits on Normal and Streptozotocin-Diabetic Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food*. Vol. 6: 93-98.
- Kotani, K., Peroni, O.D., Minokoshi, Y., Boss, O., Kahn, B.B. 2004.** GLUT4 glucose transporter deficiency increases hepatic lipid production and peripheral lipid utilization. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 114: 1666-1675.
- Kuti, J.O., Torres, E.S. 1996.** Potential Nutritional and Health Benefits of Tree Spinach. *The Journal of Biological Chemistry*: 516-520.

- Liu, M., Hsu, L.F., Chen, F.C., Cheng, T.J.** 2000. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 129: 631-363.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, U.L.,** .Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **1951.** *J. Biol. Chem.* Vol. 193:265-275.
- Martindale, J.**1999. *The complete drug reference.*32 ed. Kathleen Parfitt, USA: 313.
- Mathews, C., Van Holde, K.** **2001.** *Bioquímica.* 2ª ed. Mc Graw-Hill, España:916-917,935.
- Molina, C.A., Solórzano M., Brezan R.** **1999.**Procesamiento de las hojas de chaya (*Cnidioscolus aconitifolius*; Eurhorbiaceae) para consumo humano: I. Cocción en agua hirviente y almacenamiento de hojas frescas. *Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de Alimentos.* Vol. 6: 1-5.
- Morris, F.W., Kahn R.** **1994.** The Insulin Signaling System. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 269: 1-4.
- Nammi, S., Boini M.K., Lodagala S., Behara B.R.** **2003.** The juice of fresh leaves of *Catharanthus roseus* Linn. Reduces blood glucose in normal and alloxan diabetics rabbits. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* Vol. 3: 1-4.
- Nawano, M., Ueta, k., Oku, A., Arakawa, K., Saito, A., Funaki, M., Anai, M., Kikuchi, M., Oka, Y., Asano, T.** **1999.** Hyperglycemia Impairs the Insulin Signaling Step between PI 3 -kinase and Akt/PKB Activations in ZDF Rat Liver. *Biochemical and Biophysical Researched Communications.* Vol. 266: 252-256.
- Quiao, L., Zhande, R., Jetton, T.L., Zhou, G., Sun, J.X.** **2002.** In *Vivo* Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 at Serine 789 by Novel Serine Kinase in Insulin-resistant Rodents. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 277: 26530-26539.
- Ramos, R., Flores-Saenz, F.J., Alarcón-Aguilar.** **1995.** Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *Journal of Ethnopharmacology.* Vol. 48: 25-32.

- Robin, A., Harrinson, H., Morin M., Czech P.M. 1995.** Insulin Regulation of Membrane-associated Insulin Receptor Substrate 1. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270: 24442-24450.
- Ross, I.J., Molina C.A. 2002.** The Ethnobotany of Chaya (*Cnidocolus aconitifolius* ssp. *Aconitifolius Breckon*): a Nutritious. *Economic Botany*. Vol. 56: 350-365.
- Salway, J.G. 2004.** *Metabolism at a Glance*. 3<sup>a</sup> ed. Blackwell Publishing :108-119.
- Sherpherd, P., Kahn B. 1999.** Transportadores de la Glucosa y Acción Insulínica. Consecuencias para la Resistencia Insulínica y la Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 341: 248-257.
- Somwar, B. Niu, W., Kim, D.Y., Sweeney, G. Randhawa K.V., Huang, C., Ramlal, T., Klip, A. 2001.** Differential Effects of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition on Intracellular Signals Regulating GLUT4 Traslocation and Glucose Transport. *The Journal Biological Chemistry*. Vol. 273: 48079-48087.
- Szkudelski, T. 2001.** The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiological Research*. Vol. 50: 536-546.
- WU, Y., Ouyang, J.P., Zhou Y.F., Wu, K., Zhao, D., Wen, C. 2004.** Mechanism of improving effect of losartan on insulin sensitivity of non-insulin-dependent diabetes mellitus rats. *Acta Physiologica Sinica*. Vol. 56: 539-549.
- Xie, J.T., Aung, H.H., Wu, A.J., Attele, A.S., Yuan, C.S. 2001.** Effects to American Ginseng Berry Extract on Blood Glucose Levels in ob/ob Mice. *The American Journal of Chinese Medicine*. Vol. 30: 187-194.

## ANEXOS

### Anexo 1. Preparación de reactivos

#### Buffer para extracción de proteínas

| REACTIVO                        | CONCENTRACIÓN INICIAL | VOLUMEN  | CONCENTRACIÓN FINAL |
|---------------------------------|-----------------------|----------|---------------------|
| NP40                            |                       | 0.4 ml   | 1%                  |
| HEPES                           | 500 mM                | 4 ml     | 50 mM               |
| NaCl                            | 1500 mM               | 4 ml     | 150 mM              |
| NaPP                            | 100 mM                | 4 ml     | 10 mM               |
| Na <sub>3</sub> Va <sub>4</sub> | 200 mM                | 0.4 ml   | 2 mM                |
| MgCl <sub>2</sub>               | 10 mM                 | 4 ml     | 1mM                 |
| CaCl <sub>2</sub>               | 25 mM                 | 1.6 ml   | 1mM                 |
| NaF                             | 500 mM                | 0.8 ml   | 10 mM               |
| EDTA                            | 20 mM                 | 4 ml     | 2 mM                |
| PMSF                            | 60 mM                 | 1.33 ml  | 2 mM                |
| Glicerol                        |                       |          | 15%                 |
| Leupeptina                      |                       | 200 µl   | 5 µg/ml             |
| Agua destilada                  |                       | 11.27 ml |                     |

#### Solución digestora para muestras SDS-PAGE

SDS 5%

Glicerol 30%

Tris 100mM pH 6.8

Mercaptoetanol 4%

Azul de coomassie 0.02%

## Electroforesis

### Gel separador al 7%

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Acrilamida 30%-bisacrilamida 0.938% | 3.5 ml     |
| Tris 3M-HCl 1M-SDS 0.3%             | 5.0 ml     |
| Glicerol 79.5% (v/v)                | 2.0 ml     |
| Agua                                | 4.53 ml    |
| Persulfato de amonio 10%            | 50 $\mu$ l |
| Temed concentrado                   | 5 $\mu$ l  |

### Gel concentrador al 3%

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| Acrilamida 30%-bisacrilamida 0.938% | 0.6 ml     |
| Tris 3M-HCl 1M-SDS 0.3%             | 1.5 ml     |
| Agua                                | 3.9 ml     |
| Persulfato de amonio 10%            | 40 $\mu$ l |
| Temed concentrado                   | 4 $\mu$ l  |

### Buffer superior

|         |       |
|---------|-------|
| Tris    | 0.1 M |
| Tricina | 0.1 M |
| SDS     | 0.1%  |

### Buffer inferior

Tris 0.2M-HCl pH 8.9

### Tinción de azul de coomassie para gel

#### Colorante azul de coomassie

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Azul de coomassie    | 0.2%   |
| Ácido acético        | 7%     |
| Metanol 50% Aforar a | 100 ml |

Solución para desteñir

Metanol al 50%

Solución para fijar

Ácido acético al 7.5%

**Transferencia:**

Buffer de transferencia

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Tris                | 5.8 gr  |
| Glicina             | 2.93 gr |
| Agua destilada para | 1 L     |

**Western Blot**

TBS (Buffer tris-sodio)

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Tris 1M-HCl pH 8      | 0.5 ml |
| NaCl 5M               | 1.5 ml |
| Agua destilada aforar | 50 ml  |

TTBS (Buffer tris-tween-sodio)

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Tris 1M-HCl pH 8      | 0.5 ml |
| NaCl 5M               | 1.5 ml |
| Tween 20              | 0.5 ml |
| Agua destilada aforar | 50 ml  |

Solución bloqueante al 10%

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Solución bloqueadora | 10 ml |
| TBS                  | 90 ml |

Solución bloqueante al 5%

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Solución bloqueadora | 5 ml  |
| TBS                  | 95 ml |

Solución reveladora (1:9)

|                  |        |
|------------------|--------|
| Revelador HC-110 | 100 ml |
| Agua destilada   | 900 ml |

Solución fijadora

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Fijador rápido reactivo A | 249.94 ml |
| Fijador rápido reactivo B | 27.36 ml  |
| Agua destilada aforar     | 1 L       |

Solución de quimioluminiscencia (100:1)

|                               |              |
|-------------------------------|--------------|
| Substrato luminiscente sol. A | 1485 $\mu$ l |
| Solución iniciadora B         | 15 $\mu$ l   |

Solución de Reblotting

|                  |        |
|------------------|--------|
| 2-Mercaptoetanol | 0.1 M  |
| SDS 2%           | 2 gr   |
| TBS aforar a     | 100 ml |