

2004  
2004  
2004



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"POTENCIAL HIPOGLUCÉMICO DE LA CHAYA (*Cnidoscolus aconitifolius* ssp. *aconitifolius* Breckon) EN UN MODELO DE DIABETES TIPO II"**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MONSERRAT ALBA SANDOVAL HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2004

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H 70690 7

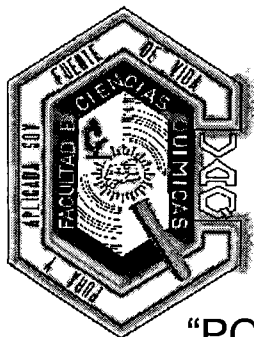
No. Título \_\_\_\_\_

Clas. IS

616.462

5218p

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“POTENCIAL HIPOGLUCÉMICO DE LA CHAYA (*Cnidocolus  
aconitifolius ssp. aconitifolius* Breckon) EN UN MODELO DE  
DIABETES TIPO II”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**MONSERRAT ALBA SANDOVAL HERNÁNDEZ**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO**

**SINODALES**

**Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Dra. EVA GONZÁLEZ JASSO**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. SANDRA O. MENDOZA DÍAZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
1. INSULINA	2
1.1 Estructura	2
1.2 Biosíntesis	3
1.3 Regulación de la secreción de insulina	4
1.4 Distribución y desintegración de insulina	5
1.5 Acciones celulares de la insulina	6
1.6 Cascada de transducción de señales de la insulina	6
1.6.1 Receptor de insulina	6
1.6.2 Sustratos del receptor de insulina (IRS)	6
1.6.3 Cinasa de 3 fosfatidilinositol (PI3K)	7
1.6.4 Akt (PKB)	8
1.7 Transportadores de glucosa	9
1.8 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de los nutrientes	11
1.8.1 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de los carbohidratos	11
1.8.2 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de los lípidos	11
1.8.3 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de las proteínas	11
2. Regulación de la ingestión de alimentos y el almacenamiento de energía	12
2. 1 Obesidad y su relación con la resistencia a la insulina	12

Contenido	Página
3. DIABETES	13
3.2 Clasificación	13
4. DIABETES TIPO II	14
4.1 Definición	14
4.2 Patofisiología	14
4.3 Factores que indican el desarrollo de la diabetes	15
4.4 Complicaciones de la diabetes	15
4.5 Modelos de animales para el estudio de la diabetes	16
4.5.1 Rata Zucker Fatty (ZF, fa/fa): Un modelo de estudio de la Diabetes Tipo II	17
5. TRATAMIENTO DE LA DIABETES	17
5.1 Hipoglucemiantes orales	18
5.1.1 Biguanidas: Metformina	18
5.1.2 Sulfonilureas: Clorpropamida	18
5.1.3 Mellitron	19
5.2 Plantas medicinales: la herbolaria mexicana	19
6. LA CHAYA	20
6.1 Botánica	20
6.2 Distribución	22
6.3 Uso como alimento	22
6.4 Medicina: Usos	22
6.5 Posible efecto antidiabético	23
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
GENERAL	27
ESPECÍFICOS	27
METODOLOGÍA	28
1. MATERIALES	28
1.1 Biológicos	28
1.2 Químicos	28

Contenido	Página
<b>2. MÉTODOS</b>	<b>30</b>
2.1 Preparación de té de chaya	30
2.2 Dosificación de Mellitrón	30
2.3 Tratamientos	30
2.4 Determinaciones de glucosa en sangre	31
2.5 Determinación de triglicéridos en plasma	31
2.6 Curva de Tolerancia a la Glucosa	31
2.7 Sacrificio de animales y toma de muestras	32
2.8 Preparación de tejido muscular	32
2.9 Cuantificación de proteínas	32
2.10 Western-Blot	32
2.10.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE	32
2.10.2 Análisis Densitométrico	33
2.11 Análisis estadístico	33
 <b>RESULTADOS</b>	 <b>34</b>
1. Fase 1: Tratamiento con el té de chaya	34
1.1 Efecto del té de chaya sobre el peso corporal de las ratas ZF	36
1.2 Efecto del té de chaya sobre la concentración de glucosa sanguínea en las ratas ZF	37
1.3 Efecto del té de chaya sobre la Curva de Tolerancia a la Glucosa en las ratas ZF	38
2. Fase 2: Tratamiento Chaya-Mellitrón	40
2.1 Efecto coadyuvante del té de Chaya - Mellitrón sobre el peso corporal de las ratas ZF	40
2.2 Efecto coadyuvante del té de Chaya- Mellitrón sobre la concentración de glucosa sanguínea en las ratas ZF	42
2.3 Efecto coadyuvante del té de Chaya - Mellitrón sobre los triglicéridos	44

Contenido	Página
2.4 Efecto coadyuvante del té de Chaya – Mellitrón sobre algunas proteínas de la cascada de señalización de la insulina	45
2.4.1 Proteína IR	45
2.4.2 Proteína IRS-1	47
2.4.3 Proteína p-AKT	48
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	65

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Transportadores de glucosa presentes en mamíferos	10
2. Plantas medicinales de uso intensivo en México para el tratamiento de la diabetes	20
3. Efecto del extracto de hojas de <i>Cnidocolus chayamansa</i> sobre los niveles de glucosa sanguínea en conejos no diabéticos y diabéticos por inducción con estreptozotocina (STZ)	23
4. Prueba de Tolerancia a la Glucosa en conejos sanos por administración gástrica de agua (control) y preparación de planta (té)	24
5. Porcentaje de incremento de glucosa en sangre de las ratas ZF tratadas con té de chaya	38



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la insulina	2
2. Síntesis de la insulina	3
3. Proceso de inducción de la secreción de insulina por glucosa en la célula $\beta$	5
4. Dominios de interacción proteína-proteína involucrados en la transducción de señales de la insulina	7
5. Cascada de transducción de señales de la insulina resultante en la translocación de los transportadores GLUT4 a superficie celular en músculo	8
6. Representación esquemática de un transportador de glucosa.	9
7. Cuatro variedades cultivables de chaya Estrella I, Picuda II, Chayamansa III y Redonda IV	21
8. Incremento del peso corporal en las ratas ZF tratadas con té de chaya, administrado en agua de uso	35
9. Determinación de glucosa en sangre en las ratas ZF con té de chaya, administrado en agua de uso	37
10. Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas ZF a los 34 días del tratamiento con té de chaya 2%	39
11. Incremento del peso corporal en las ratas ZF tratadas con té de chaya – Mellitrón, administrado en agua de uso	41
12. Disminución de glucosa sanguínea en porcentaje en ratas ZF tratadas con té de chaya -Mellitrón durante 31 días	43
13. Determinación de triglicéridos en ratas ZF tratadas con Mellitrón (56 mg/kg)	44
14. Expresión de la proteína IR en músculo esquelético en ratas ZF	46

Figura	Página
15. Expresión de IRS-1 en músculo esquelético de ratas ZF	47
16. Fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, estimuladas con insulina en músculo esquelético de ratas ZF a diferentes tiempos	48
17. Actividad de p-Akt 1 en músculo esquelético de ratas ZF	49

## RESUMEN

Actualmente la diabetes es la primera causa de muerte en México. Alrededor del 95% de los pacientes padecen la diabetes tipo II. La herbolaria tradicional mexicana es un recurso adoptado como tratamiento por un gran porcentaje de esta población y dentro de estas plantas se encuentra la chaya, *Cnidosculus aconitifolius ssp. aconitifolius*. La chaya presenta una amplia variedad morfológica de hojas, las cuales son utilizadas para elaborar el té, como principal forma de tratamiento hipoglucémico. Sin embargo, existe poca información científica que respalde el uso de esta planta. En base a lo anterior, el objetivo del presente experimento consistió en evaluar la actividad hipoglucemiante del té de chaya a través de parámetros fisiológicos y su efecto sobre la cascada de señalización de la insulina, así como su capacidad coadyuvante con el empleo de un fármaco hipoglucémico. Se usaron ratas Zucker obesas como modelo de diabetes tipo II, las cuales fueron tratadas con el té de dos diferentes isotipos de hojas, chaya1 (trilobulada) y chaya2 (pentalobulada).

En la Fase 1 del estudio, los animales consumieron el té *ad libitum* durante 5 semanas. El té de chaya 1 y 2 a la concentración del 1% no produjo efecto hipoglicémico. La concentración del 2% disminuyó los niveles de glucosa en sangre del 17% y 28% con la chaya1 y 2, respectivamente. Sin embargo, dicho efecto hipoglicémico no fue constante. En la curva de tolerancia a la glucosa por vía oral, el té de chaya no ejerció actividad antihiperlipidémica.

En la Fase 2 del estudio, se evaluó en los animales el efecto coadyuvante de la administración *ad libitum* del té de chaya con Mellitrón durante 5 semanas. Se establecieron los grupos: control (agua), Mellitrón, chaya1, chaya1-Mellitrón, chaya2 y chaya2-Mellitrón. El tratamiento combinado de té de chaya1-Mellitrón (17 mg/kg) produjo un efecto hipoglucémico del 20% después de 13 días de este tratamiento. Asimismo, sólo se presentó una disminución del 27% en los niveles de glucosa después de dos días del incremento en la concentración del Mellitrón (56 mg/kg). El tratamiento combinado del té de chaya2-Mellitrón, mostró una tendencia no estadísticamente significativa en la disminución en los niveles de glucosa sanguínea. Los tés de chaya 1 y 2, así como el Mellitrón, produjeron un decremento significativo en los niveles de triglicéridos en un 30%, 40% y 58% respectivamente, comparados con el grupo control. El tratamiento combinado de ambos tés de chaya y Mellitrón durante cinco semanas no alcanzaron el efecto antilipolítico observado para el Mellitrón. En las muestras musculares, la expresión de las proteínas IR e IRS-1 y la actividad de Akt de la cascada de señalización de insulina, no mostraron aumento por efecto del tratamiento con chaya1, Mellitrón y por la combinación de chaya1-Mellitrón.

Los resultados derivados del presente estudio indican que el té de chaya a la concentración del 2% modula particularmente la hiperglicemia a corto plazo, sin producir actividad antihiperlipidémica. A largo plazo, el té de chaya no modifica la expresión de proteínas que participan en la cascada de transducción de señales de la insulina (IR, IRS-1 y Akt). Sin embargo, el té de chaya sí disminuye los niveles de triglicéridos, lo que puede conducir a la mejora del estado insulinoresistente propio de este modelo.

## INTRODUCCIÓN

La diabetes es la primera causa de muerte en México. Aproximadamente el 95 % de los diabéticos padecen la diabetes tipo II. Esta enfermedad crónico degenerativa se ha establecido como un problema prioritario de salud pública debido al incremento de su incidencia y de las complicaciones que se generan como consecuencia del curso de la enfermedad. La herbolaria tradicional de origen prehispánico usada para el control glicémico es extensa, así como su uso por el paciente diabético. Por ello, el interés científico se orienta hacia el estudio que caracterice dichas especies. Dentro de la lista de plantas usadas para el control de la diabetes, destaca la chaya (*Cnidoscolus aconitifolius ssp. aconitifolius* Breckon). La chaya presenta una amplia distribución, abarcando desde la costa del Golfo de México, destacando la Península de Yucatán, y continúa hasta América Central. Actualmente se cultiva en varios estados de la República Mexicana y Estados Unidos.

Esta planta ha sido usada desde los antiguos mayas como alimento, cuyo valor nutricional ya ha sido demostrado, y como tratamiento para diversas enfermedades. El té obtenido de las hojas es empleado para lograr el control glicémico.

Los antecedentes científicos proporcionan información contradictoria acerca de la capacidad hipoglucémica/antihiper glucémica del té de chaya, lo cual podría atribuirse a las variedades de hoja utilizadas, al tiempo de corte de la hoja, a la concentración del té, al modelo experimental utilizado o al período de duración del tratamiento.

Por lo tanto, es necesaria una investigación en la que a través de la administración crónica del té se simule la ingesta del paciente, para observar la respuesta fisiológica del organismo y, de manera más específica, su efecto sobre la cascada de transducción de señales de la insulina. Considerando el uso generalizado de la combinación de los tratamientos farmacológicos con los tradicionales resulta importante evaluar el efecto coadyuvante del té con los fármacos.

# ANTECEDENTES

## 1. INSULINA

### 1.1 Estructura

La insulina es una proteína de 5.8 kilodaltones, constituida por dos cadenas polipeptídicas (A y B) de 21 y 30 residuos respectivamente. Ambas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro entre residuos de cisteína, conectando A7 a B7 y A20 a B19, y un puente intracatenario que conecta los residuos 6 y 11 de la cadena A. La insulina contiene dos grupos N-terminal distintos, glicina y fenilalanina, y dos residuos C-terminal diferentes, asparagina y treonina. Existen pequeñas diferencias de especie a especie en los aminoácidos que conforman la molécula, sin embargo la ubicación de los puentes disulfuro es invariable y las cadenas poseen el mismo número de aminoácidos en casi todas las especies (Ganong, 1994; Mathews y Holde, 1998)(Figura1).

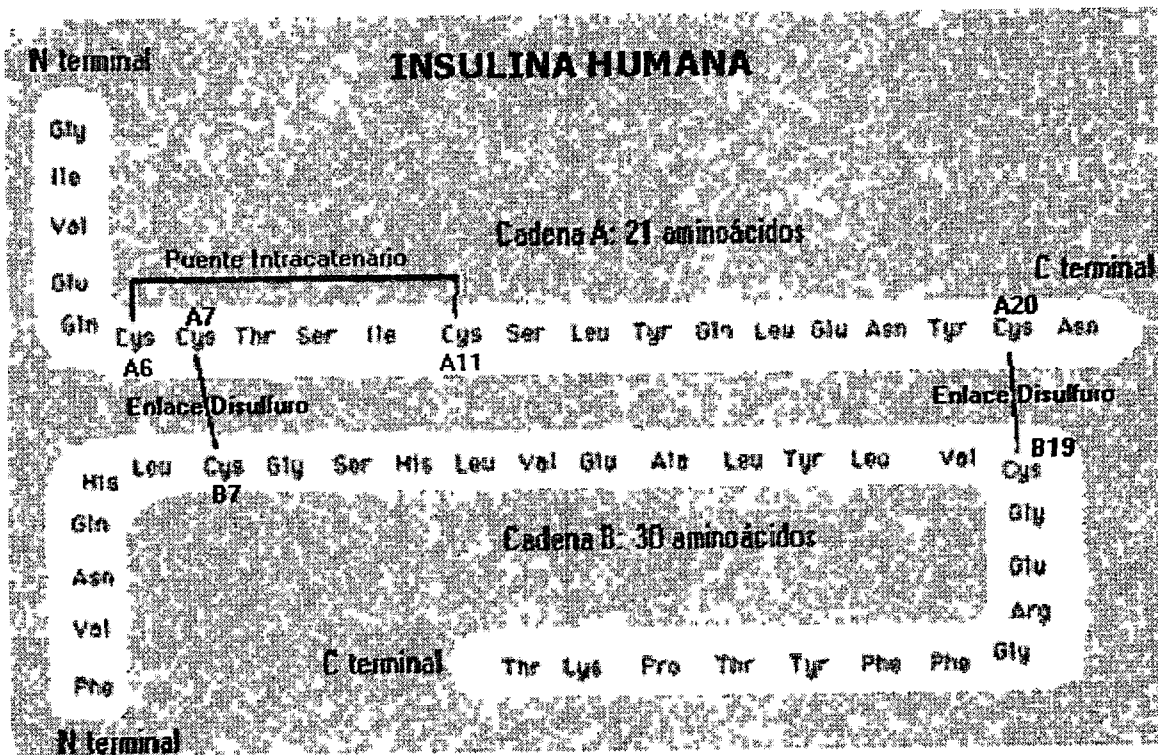


Figura 1. Estructura de la Insulina en la cual se muestra la cadena A de 21 aminoácidos y la B de 30 aminoácidos con sus respectivos enlaces (Sanger, 1959).

## 1.2 Biosíntesis

La insulina es sintetizada en forma de preprohormona en las células beta ( $\beta$ ) de los islotes de Langerhans en el páncreas, por los ribosomas acoplados al retículo endoplásmico. La preprohormona insulínica tiene un péptido señal el cual es removido al entrar al retículo endoplásmico. El resto de la molécula posteriormente se pliega y se forman puentes de disulfuro dando origen a la proinsulina. Posteriormente, el péptido (péptido C), que conecta las cadenas A y B, es escindido de la proinsulina originando la molécula madura de insulina que es empaquetada en gránulos secretores en el aparato de Golgi (Figura 2) (Ganong, 1994; Mathews y Holde, 1998; Guyton y Hall, 2000).

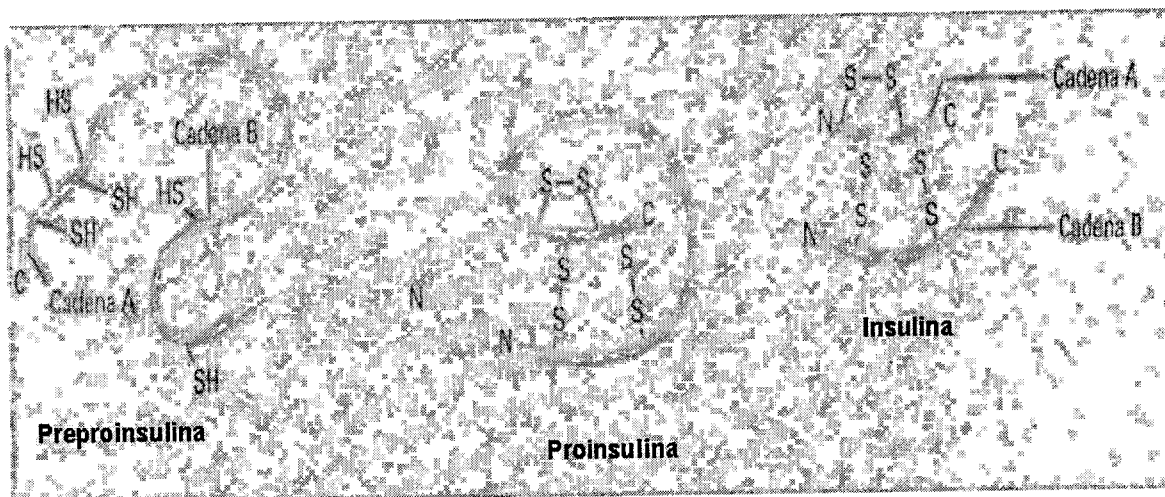


Figura 2. Síntesis de la insulina. La síntesis da inicio con la preproinsulina en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico. Ésta posee una secuencia líder que, tras ingresar a éste orgánulo, se escinde obteniéndose la proinsulina que se pliega en una conformación estable por la formación de enlaces disulfuro. Posteriormente en el aparato de Golgi, la secuencia conectora de las cadenas A y B también es escindida obteniéndose la insulina madura que es empaquetada en gránulos secretores (Mathews y Holde, 1998).

### 1.3 Regulación de la secreción de insulina

La secreción de insulina es un proceso regulado de manera estrecha, diseñado para proporcionar concentraciones estables de glucosa en la sangre tanto en ayuno como en la alimentación. La regulación se logra por la interrelación coordinada entre nutrimentos, hormonas gastrointestinales, hormonas pancreáticas y neurotransmisores del sistema nervioso autónomo. La glucosa, los aminoácidos, los ácidos grasos y los cuerpos cetónicos favorecen la secreción de insulina (Goodman, 1996).

El aumento repentino y sostenido de la glucemia (hasta dos o tres veces el valor normal) induce una secreción elevada de insulina, la cual se describe en dos fases. En la primera fase la concentración plasmática de la insulina puede elevarse hasta 10 veces en los primeros 3 a 5 minutos. A nivel celular, la glucosa entra en la célula  $\beta$  a través del transportador de glucosa Glut2 (Figura 3). Posteriormente, la glucosa es metabolizada por la enzima glucocinasa (GK), entrando en la ruta glucolítica. Esto produce una elevación de los niveles de ATP, equivalentes reducidos NADPH e hiperpolarización de la membrana mitocondrial. El incremento del ATP citosólico producirá el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP ( $K_{ATP}$ ), la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de canales de calcio tipo L dependientes de voltaje (Roche, 2003). La entrada y, por consiguiente, la elevación del calcio intracelular, activa las fosfolipasas  $A_2$  y C, lo que da como resultado la formación de ácido araquidónico, fosfatidilinositol y diacilglicerol. El inositol-1,4,5-trifosfato también moviliza  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplásmico. Esto corresponde a la fase de secreción dependiente de calcio y coincide con el primer pico de la liberación de insulina procesada y empaquetada en vesículas listas para fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido hormonal (Roche, 2003). Aproximadamente 15 minutos después del estímulo, se observa por segunda vez un aumento en la secreción de insulina mayor a la primera fase, alcanzando una meseta en las 2 a 3 horas siguientes. Esta segunda fase de secreción de la insulina es dependiente de la concentración de glucosa, y consiste

en la liberación de la hormona previamente formada aunada a la sintetizada (Guyton y Hall, 2000).

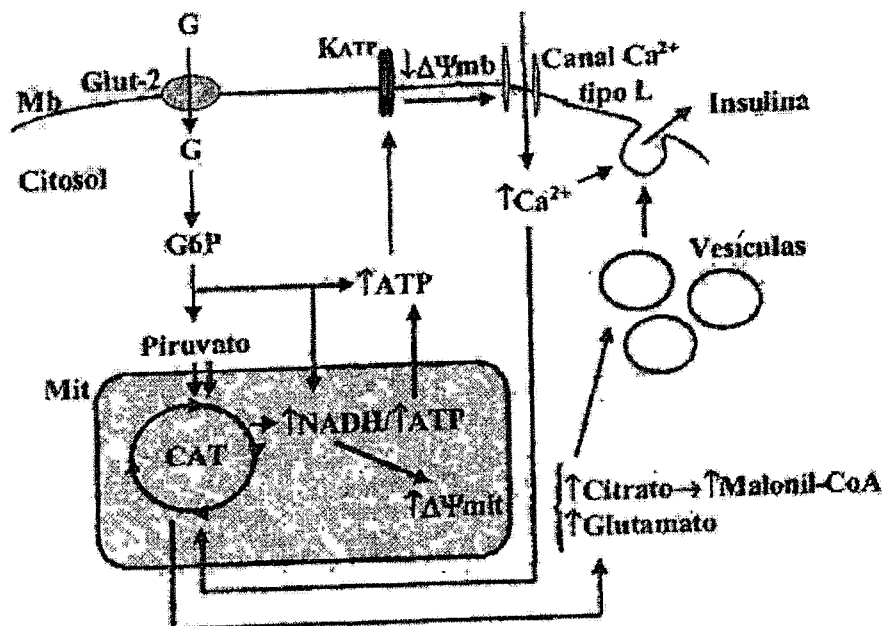


Figura 3. Proceso de inducción de la secreción de insulina por glucosa en la célula  $\beta$ . La glucosa (G) entra en la célula a través del transportador de membrana Glut-2 (Roche, 2003).

#### 1.4 Distribución y desintegración de insulina

La insulina circula en la sangre como monómero libre. Presenta una vida media en plasma de cinco a seis minutos en individuos normales y en pacientes con diabetes no complicada. Se desintegra principalmente en hígado, riñones y músculo. Alrededor del 50% de la que llega por la vena porta al hígado es degradada. Se filtra en los glomérulos renales y se resorbe en los túbulos, donde también se desintegra.

Su desintegración proteolítica en el hígado ocurre de manera primaria después de la internalización de la hormona y su receptor y, en menor grado en la superficie celular. Varias enzimas han sido relacionadas en la desintegración de la insulina, la principal es una tiol metaloproteínasa, que se localiza primordialmente en los hepatocitos (Goodman, 1996).



## **1.5 Acciones celulares de la insulina**

Los efectos de la insulina de acuerdo al tiempo de acción son clasificados como: 1) Inmediatos: aparecen en el transcurso de segundos o minutos e involucran la activación de los sistemas de transporte de iones y glucosa; y la modificación covalente (la fosforilación o desfosforilación de enzimas); 2) Intermedios: se presentan en horas, y se relacionan con la transcripción de genes y síntesis de proteínas; 3) A largo plazo: se manifiestan en días y actúan sobre la proliferación y diferenciación celular (Goodman, 1996).

## **1.6 Cascada de transducción de señales de la insulina**

### **1.6.1 Receptor de insulina**

Este receptor se encuentra presente en todos los tejidos de vertebrados. En adipocitos y hepatocitos existen más de 200 000 receptores (White y Kahn, 1994), el hígado expresa la mayor concentración siendo  $>10^5$  por hepatocito (Guglielmo y col., 1998). El receptor de insulina es una glucoproteína transmembranal compuesto por dos subunidades  $\alpha$  (135 kDa) y dos  $\beta$  (94 kDa), las cuales se unen de forma covalente a través de puentes disulfuro para formar un tetrámero. Las subunidades  $\alpha$  son extracelulares y poseen el sitio de unión de la insulina; mientras que las subunidades  $\beta$  son transmembranales y contienen la actividad de cinasa de tirosina en sus dominios citosólicos (Guglielmo y col., 1998). La autofosforilación en tirosina ocurre en la subunidad  $\beta$  después de la unión de la insulina al receptor (White y Kahn, 1994).

### **1.6.2 Sustratos del receptor de insulina (IRS)**

Los IRSs son proteínas que son fosforiladas por el receptor de insulina activado. Poseen un dominio PH (homólogo de plekstrina) y PTB (unión a fosfotirosina). El dominio PH se une a las cabezas polares de fosfoinosítidos específicos y dirigen a las proteínas IRS a la membrana adyacente al receptor de insulina. Los dominios PTB reconocen la secuencia NPXpY del receptor de insulina. El sustrato principal del receptor de insulina es IRS-1, que presenta un peso de 185 kDa.

Durante la interacción con el receptor de insulina, los IRSs son fosforilados en numerosos residuos de tirosina por el receptor, creando sitios de reconocimiento- unión para los dominios SH2 (Src homólogo 2) de proteínas adaptadoras (Virkamäki y col.,1999) (Figura 4).

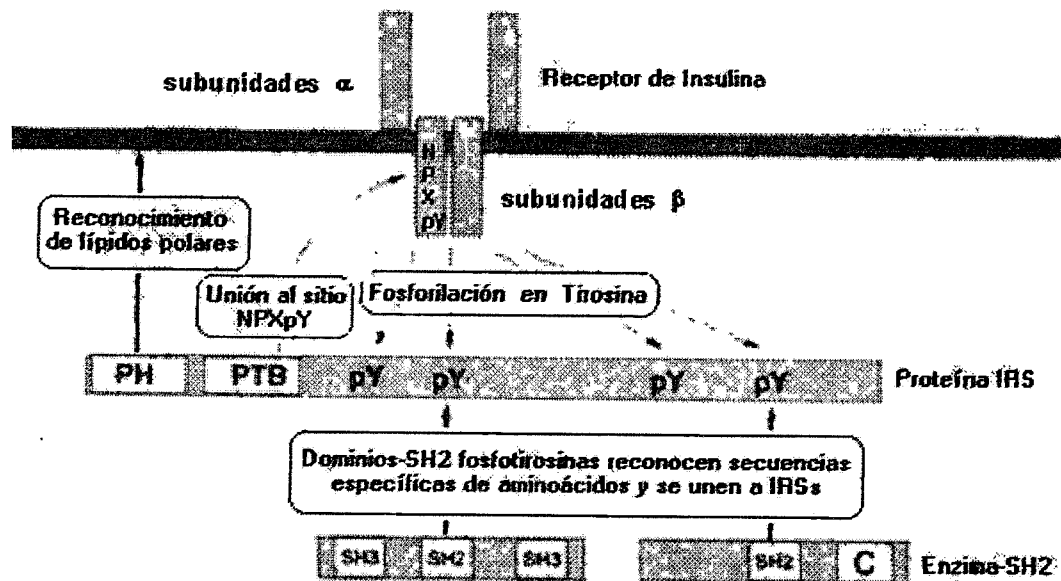


Figura 4. Dominios de interacción proteína-proteína involucrados en la transducción de señales de la insulina. Una típica proteína IRS contiene un dominio PH, el cual dirige la proteína a membrana celular; mientras que el dominio PTB, se une a NPXpY en la subunidad β del receptor de insulina. El dominio SH2 de adaptadores y enzimas SH2 liga múltiples fosfotirosinas de proteínas IRS (Virkamäki y col.,1999).

### 1.6.3 Cinasa de 3 fosfatidilinositol (PI3K)

PI3K es una proteína SH2 que se asocia con IRS-1. Esta proteína está constituida por las subunidades p110 (110 kDa), con actividad catalítica, y p85 (85 kDa), con actividad reguladora (Virkamäki y col.,1999). El dominio SH2 localiza la región donde se asocia p110 con p85 e interactúa con los residuos de fosfotirosina, activando con ello la subunidad catalítica p110 .

p110 fosforila a fosfatidilinositol (PI), a fosfatidilinositol 4 fosfato (PI(4)P), a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>) en la posición 3 del anillo inositol para

producir fosfatidilinositol 3 fosfato (PI(3)P), fosfatidilinositol 3,4 bifosfato (PI(3,4)P<sub>2</sub>) o fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) respectivamente (Galetic y col., 1999). Posteriormente, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> se une a los dominios PH de la cinasa dependiente de PI3K (PKD-1), y de Akt (Le Roith y Zick, 2001) (Figura 5).

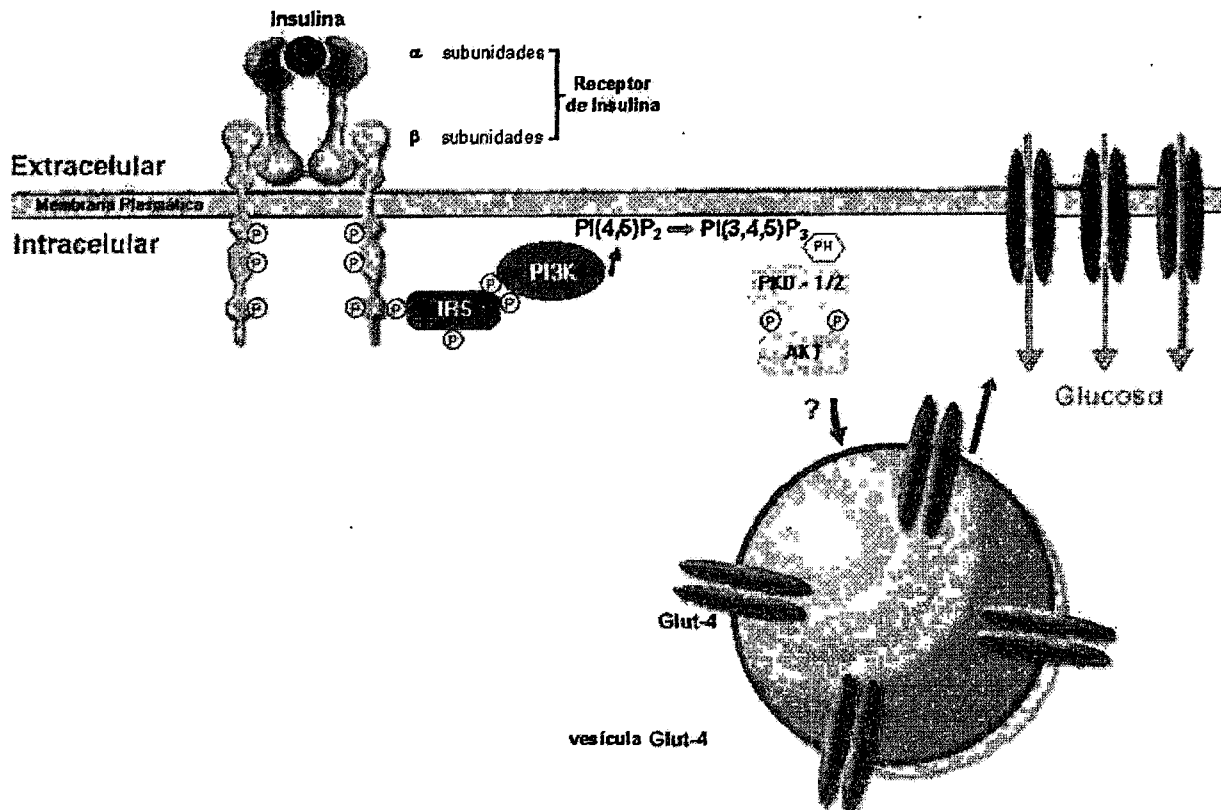


Figura 5. Cascada de transducción de señales de la insulina resultante en la translocación de los transportadores GLUT4 a superficie celular en músculo promoviendo la entrada de glucosa (Adaptado de Sanger, 2003).

#### 1.6.4 Akt (PKB)

PKB es una cinasa de serina/treonina de 60 kDa y es un blanco regulado cuesta abajo por la PI3K (Krook y col., 1998). La presencia de los lípidos PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y PI(3,4)P<sub>2</sub> parece tener un papel importante en la activación del proceso. La proteína cinasa dependiente de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (PKD1) posee un dominio PH, se piensa que ésta se dirige hacia membrana y forma un complejo en donde es activada por

PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Dado que Akt posee también un dominio PH, ésta puede dirigirse hacia membrana, donde para ser activada requiere que PKD1 la fosforile en el sitio Thr<sup>308</sup> y PKD2 en Ser<sup>473</sup>. Akt está implicada en la translocación de las vesículas transportadoras de glucosa GLUT4 hacia membrana celular (Galetic y col., 1999) (Figura 5).

### 1.7 Transportadores de Glucosa

Los transportadores de glucosa son glucoproteínas que pueden formar parte de la membrana celular o estar contenidos en vesículas intracelulares. Los transportadores que se encuentran como proteínas integrales de membrana están constuidos por 12 dominios  $\alpha$  helicoidales, poseen una masa molecular de aproximadamente 50 kDa (figura 6), y son los responsables de la difusión facilitada de la glucosa al interior de las células en los tejidos como el cerebro, cuyo funcionamiento depende principalmente del uso de este carbohidrato (Mueckler, 1990).

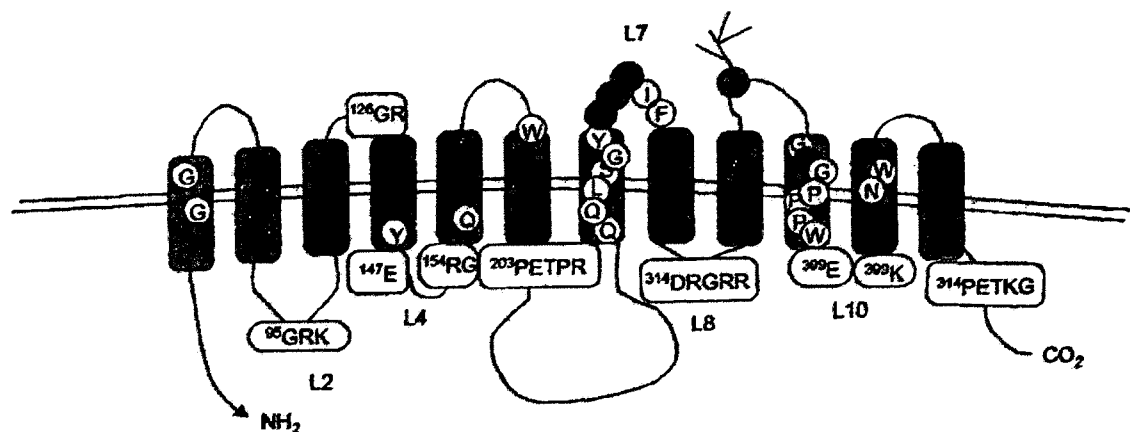


Figura 6. Representación esquemática de un transportador de glucosa. Éste presenta doce dominios transmembranales (Cruz y col., 2000).

Los transportadores sensibles a la insulina contenidos en vesículas intracelulares en tejidos periféricos, tales como el músculo y el tejido adiposo. En estos tejidos, la insulina estimula el transporte de glucosa al favorecer la translocación (dependiente de energía) de las vesículas intracelulares que contienen los transportadores de

glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática. Este efecto es reversible, ya que los transportadores vuelven al fondo común intracelular en el momento en que se elimina la insulina donde se funden con unos sacos grandes de membrana llamados endosomas. Dentro de estas partículas, las moléculas de GLUT4 se separan en extensiones tubulares y se reempacan en vesículas (Lienhard y col., 1992).

En el cuadro 1 se muestran los diferentes transportadores que se han identificado, indicando brevemente el tipo de transporte que realizan y los principales lugares de expresión.

Cuadro 1. Transportadores de glucosa presentes en mamíferos (Adaptado de Ganong, 1994; Cruz y col., 2001).

TRANSPORTADOR	FUNCIÓN	PRINCIPALES LUGARES DE EXPRESIÓN
TRANSPORTE ACTIVO Cotransportador de Na <sup>+</sup> - glucosa	Transporte activo secundario de la glucosa	Intestino delgado, túbulos renales
DIFUSIÓN FACILITADORA GLUT1	Captación basal de glucosa	Placenta,encéfalo,eritrocitos, riñones, colon, tejido adiposo y músculo.
GLUT2	Sensor de la glucosa en las células β, transporte hacia el exterior de las células epiteliales del intestino y del riñón	Células β de los islotes, hígado, células epiteliales del intestino delgado, riñón.
GLUT3	Captación basal de glucosa	Encéfalo, riñones, placenta, etc.
GLUT4	Captación de glucosa estimulada por insulina	Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo
GLUT5	Transporte de fructosa	Intestino delgado, células espermáticas, riñón, cerebro, tejido muscular y adiposo.
GLUT8	Transporte de glucosa	Regulación hormonal a nivel testicular en adulto.

## **1.8 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de los nutrientes**

### **1.8.1 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de los carbohidratos**

Directamente, la insulina fomenta el transporte de la glucosa al miocito y la captación del exceso del carbohidrato por el hígado para su depósito casi inmediato en forma de glucógeno, correspondiente al 5-6 % de la masa hepática. Además, la insulina inhibirá la síntesis de glucosa hepática, estimulando solamente el proceso de síntesis de glucógeno. El músculo puede disponer del 70 al 80% de la glucosa postprandial, considerándose como el sustrato energético principal. Cuando el músculo no se ve ejercitado, se promueve el depósito de la glucosa como glucógeno, que podrá ser usado en períodos posteriores con fines energéticos.

### **1.8.2 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de los lípidos**

Cuando la glucosa captada por el hepatocito rebasa el depósito de glucógeno, cesa la síntesis del polisacárido y la insulina estimula a que el exceso del carbohidrato tenga conversión en ácidos grasos. Los ácidos grasos forman triglicéridos, los cuales son empaquetados dentro de lipoproteínas de muy baja densidad para ser transportados a través de la sangre al tejido adiposo. En el tejido adiposo los ácidos grasos formarán triglicéridos, constituyendo así el almacén energético de estas células.

### **1.8.3 Efecto de la insulina sobre el metabolismo de las proteínas**

La elevación de la concentración de la insulina tras la ingesta de alimentos estimula la absorción de los aminoácidos por las células, favoreciendo su uso como proteínas. A su vez, se estimula la síntesis de enzimas relacionadas con el almacenamiento de carbohidratos, lípidos y proteínas. Aunado a esto, se inhibe el catabolismo de proteínas, principalmente musculares, con lo que se tiene una liberación disminuida de aminoácidos al plasma. Dentro del hígado, la insulina inhibe la gluconeogénesis a partir de aminoácidos como sustrato, conservándolos para el depósito corporal (Guyton y Hall, 2000).

En resumen, la función de la insulina consiste en fomentar la utilización preferente de la glucosa con fines energéticos y reducir el uso de los lípidos. Es en esencia la concentración de glucosa sanguínea la que controla el uso de uno u otro sustrato energético, ya que el aumento de la glucemia intensifica la secreción de insulina y la reducción de la glucemia disminuye también los niveles de insulina.

## **2. Regulación de la ingestión de alimentos y el almacenamiento de energía.**

En nuestro país, se han dado cambios en las condiciones de los estilos de vida en los últimos años, observándose un aumento en el consumo de alimentos hiperenergéticos (grasa, carbohidratos refinados, poca fibra) y hábitos sedentarios (poca o nula actividad física). Los primeros contribuyen a la alteración de los mecanismos de regulación de la ingesta, sobreviniendo el depósito incontrolado y aumento de las reservas energéticas. Aunado a esto, la población latinoamericana, dada su mezcla racial, posee un mayor número de genes que le predisponen al desarrollo de la obesidad y la diabetes tipo II. Se ha comprobado que dichos genes son activados por los cambios de los estilos de vida. Por lo que en los últimos 10 años se ha detectado un aumento de la prevalencia de la obesidad en muchos países occidentales.

### **2.1 Obesidad y su relación con la resistencia a la insulina**

La obesidad está asociada con el desarrollo de la resistencia a la insulina, que es un factor de riesgo de la diabetes tipo II medible desde la etapa prediabética temprana y que se encuentra en la mayoría de los pacientes con diabetes tipo II (Golstein, 2002; Petersen y Shulman, 2002).

Durante la obesidad, el tejido adiposo del compartimiento visceral (central o abdominal) se encuentra preferentemente aumentado. La grasa visceral es poco sensible a la insulina, consecuentemente desarrolla una elevada lipólisis, introduciendo a la sangre grandes cantidades de ácidos grasos.

Se ha encontrado que al existir niveles elevados de ácidos grasos circulantes en plasma e ingresar a la célula muscular o hepática, se generan productos de la ruta

lipogénica como el diacilglicerol, específicamente 1,2 diacilglicerol (DAG). Este compuesto activa la proteína cinasa C (PKC, proteína que requiere del fosfolípido fosfatidilserina y del ión  $\text{Ca}^{2+}$ ), tras incrementar la afinidad de ésta por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Activada la PKC, ésta fosforila residuos de serina y treonina en sus proteínas diana. Se ha observado, además, un incremento en las fosforilaciones de los residuos en serina de IR e IRS-1 en tejido muscular y hepático. Por otro lado, las fosforilaciones en serina sobre IR e IRS-1 causadas por la PKC resultan similares a las producidas por el control negativo de la cascada, produciendo una disminución en la autofosforilación y en la actividad cinasa de tirosina del receptor. Esto disminuye el acoplamiento de IRS-1 hacia IR y sustratos cuesta abajo, observándose una disminución en la actividad de PI3K y Akt1. Finalmente, esto produce una deficiencia en la activación de los transportadores GLUT4 hacia membrana, conduciendo al desarrollo de la resistencia a la insulina (Qu y col., 1999; Petersen y Shulman, 2002).

Por otro lado, al tener acceso directo a la circulación porta el excedente de ácidos grasos procedentes de la lipólisis del compartimiento visceral, llegan en abundancia al hígado, en donde producirán alteraciones en el metabolismo de carbohidratos al incrementar la producción endógena de glucosa. Así, el hígado se torna resistente a la acción inhibitoria de la gluconeogénesis regulada por la insulina (Goldstein, 2002; Gastaldelli y col., 2004).

### **3. DIABETES**

México ocupa actualmente el noveno lugar mundial en la prevalencia de la diabetes. En 1981, la tasa de mortalidad por 100 mil habitantes fue de 21.4%, ascendiendo a 33.4% en 1993 y llegando hasta un 43.5% en el 2000, para constituirse en el 2004 como la primer causa de muerte en el país (Rodríguez, 2004).

#### **3.2 Clasificación**

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad puede ser clasificada como: diabetes insulino dependiente (IDDM o diabetes tipo I) debido a la destrucción autoinmune de



las células  $\beta$  pancreáticas; diabetes no insulino dependiente (NIDDM o diabetes tipo II), ésta a su vez puede dividirse en las variantes que presentan o no obesidad; y en un tercer tipo, más raro, conocido como la diabetes juvenil (Robbins, 1985).

## **4. DIABETES TIPO II**

### **4.1 Definición**

La diabetes tipo II no insulino dependiente (NIDDM) se presenta en más del 95% de los casos de diabetes en nuestro país.

En la mayoría de los casos es una enfermedad poligénica. Factores ambientales, especialmente la dieta, la actividad física, la edad y la etnicidad, interactúan con la predisposición genética afectando significativamente la prevalencia de la enfermedad. La susceptibilidad a la resistencia y a los defectos de la actividad secretora de la insulina parecen estar determinados genéticamente (Goodman, 1996; Kahn, 1998).

### **4.2 Patofisiología**

El desarrollo de la resistencia a la insulina conduce a un estado de hiperinsulinemia que compense el deterioro de la sensibilidad del control fisiológico en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, constituyen los marcadores de la etapa temprana del desarrollo de la diabetes tipo II. En el paciente insulino resistente obeso y con diabetes tipo II se ha encontrado que la fosforilación de IRS-1, la actividad de PI3K y Akt y la traslocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática se encuentran alteradas en el músculo esquelético (Krook y col., 1998, Krook y col., 2000), generando una baja disposición del carbohidrato por el músculo. Así mismo, se observa que la supresión de la gluconeogénesis hepática requiere de hasta 2 o 4 veces mayor cantidad de insulina (DeFronzo, 1999; Petersen y Shulman, 2002). Debido a que la gluconeogénesis hepática se encuentra altamente activa, ésta contribuye aproximadamente con el 50 a 60% de la glucosa circulante en el paciente diabético (Song y col., 2000). La baja disposición de la glucosa por el músculo y la gluconeogénesis hepática altamente activa, someten al organismo a

un estado constante de hiperglicemia. Lo anterior origina que se pierda la primera fase de la secreción de la insulina, lo que a su vez genera un desfase en la secreción de la hormona y, posteriormente bajo condiciones más graves, la pérdida de la sensibilidad al estímulo hiperglicémico. En el paciente diabético, la pérdida de la primera fase de secreción de la insulina trae consigo una alta y tardía secreción de la hormona, observada como la intolerancia a la glucosa, que genera la hiperglicemia postprandial.

Después de un largo período de hiperinsulinemia compensatoria, la función de la célula  $\beta$  se pierde progresivamente. Se ha observado que el agotamiento y la muerte celular reducen la cantidad de las células  $\beta$  hasta un 50%. Entonces, la resistencia a la insulina y la excesiva gluconeogénesis, que ya no pueden ser compensadas satisfactoriamente debido a la ahora deficiente secreción de insulina, conducen a un estado constante de hiperglicemia a lo largo del día, mismo que es detectado bajo la condición de ayuno (Goldstein, 2002).

#### **4.3 Factores que indican el desarrollo de la diabetes**

Los valores normales de glucosa en sangre en ayuno se encuentran entre 80 y 90 mg/dl. El límite superior bajo condición de ayuno es de 110 mg/dl, y al rebasarlo se diagnostica el desarrollo de la diabetes. Cuando la hiperglucemia alcanza valores mayores del valor umbral de 180 mg/dl en sangre, se produce la eliminación del carbohidrato por vía renal, lo que se denomina glucosuria. Los síntomas inducidos por la glucosuria son poliuria (eliminación excesiva de orina) y polidipsia (aumento de la sed).

#### **4.4 Complicaciones de la diabetes**

Los pacientes con diabetes pueden desarrollar complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovasculares (infarto de miocardio, enfermedades vasculares periféricas). De esta forma, el 40% de los pacientes diabéticos que presentan problemas de retinopatía culminan en ceguera. El 14 % de los pacientes desarrollan problemas renales. Problemas de neuropatía

periférica y autonómica (trastornos reflejos cardiovasculares, alteraciones del control vesical, la disminución de la sensibilidad de miembros) ocurren en un 10%. La enfermedad cerebrovascular es 2.5 veces mayor en diabéticos que en el resto de la población. El 30% de los problemas de pie diabético culminan en amputación (Kuri, 2001).

Por otro lado, como consecuencia del metabolismo anómalo de lípidos se desarrollan la arteriosclerosis y la lesión renal y, de ésta última se deriva la hipertensión arterial.

#### **4.5 Modelos de animales para el estudio de la Diabetes**

En torno al estudio de la diabetes tipo II o NIDDM existen varios modelos experimentales de animales que nos permiten evaluar los mecanismos de acción y las vías de señalización desarrolladas en la patología, así como los posibles tratamientos.

Los modelos de ratones frecuentemente utilizados son los que incluyen alteraciones en genes específicos que conducen al desarrollo de diabetes (*db*) y obesidad (*ob*). Los modelos de ratas han sido desarrollados más recientemente. El gen *fa* responsable de la obesidad fue descrito primeramente en la rata Zucker (Peterson y col., 1990). Así también se usan ratas diabéticas por inducción química con estreptozotocina (STZ) que puede producir diabetes tipo I y II dependiendo de la dosis administrada (Kawa y col., 2004).

Dentro de las ratas Zucker existen tres variedades. Las Zucker lean control (ZLC *+fa* ó *+/+*) son usadas como control no diabético delgado. Las Zucker fatty (ZF *fa/fa*) son obesas e insulino-resistentes. Las Zucker Diabetic Fatty (ZDF Gmi, *fa/fa*) son obesas, insulino-resistentes y diabéticas (hiperglucemia de 450 mg/dl) (Kuhlmann y col., 2003). Éstas dos últimas son utilizadas para el estudio de la diabetes tipo II debido a la similitud de las alteraciones en la patología desarrollada en humanos (Pick y col., 1998).

#### **4.5.1 Rata Zucker Fatty (ZF, fa/fa): Un modelo de estudio de la Diabetes Tipo II**

La rata ZF (*fa/fa*) es genéticamente obesa debido a una mutación en el receptor de leptina (Pick y col., 1998; Szayna y col., 2000). La rata ZF es leptinorresistente registrando hiperfagia desde las primeras semanas de vida y disminución significativa de la actividad física (Bray, 1977), lo que le origina una elevada ganancia de peso durante su crecimiento (Ionescu y col., 1985). La rata ZF desarrolla intolerancia a la glucosa después de la 6ta semana de edad, declarándose fisiológicamente insulino-resistente (Ionescu y col., 1985). El modelo se considera normoglicémico en el rango de 90 mg/dl a 135 mg/dl en promedio hasta las 18 semanas de edad (Fursinn y col., 1991; Pedersen y col., 1992; Pick y col., 1998; Zhen y col., 1999; Szayna y col., 2000; Saengsirisuwan y col., 2001; Liu y col., 2002; Li y col., 2003), desarrollando hiperglicemia ( $\geq 156$  mg/dl) asociada con la edad en la etapa adulta, alrededor de los 12 meses, cuando el páncreas presenta agotamiento y muerte celular de las células  $\beta$  con la resultante disminución de secreción de insulina (Pedersen y col., 1992; Pick y col., 1998).

El desarrollo característico de hipertrigliceridemia en las ratas ZF se debe a la producción elevada de lipoproteínas de baja densidad en hígado; presentándose también un incremento en los niveles de colesterol. Las ratas muestran un aumento en el número y tamaño de los adipositos, específicamente en los depósitos subcutáneo y retroperitoneal. Asimismo, la lipólisis se encuentra aumentada en animales jóvenes y disminuye con la edad (Bray, 1977).

### **5. TRATAMIENTO DE LA DIABETES**

El tratamiento de la diabetes tiene como finalidad lograr el control glicémico para reducir el riesgo de desarrollar complicaciones y con ello de la disminución de enfermedades cardiovasculares, renales, etc.

En pacientes con diabetes tipo II, la terapia basada en agentes orales es la más indicada cuando la dieta y el ejercicio no logran un control aceptable de la glucemia. Actualmente, entre los agentes orales usados se incluye a las sulfonilureas, biguanidas, tiazolidinedionas e inhibidores de la absorción de

glucosa. Así mismo, la insulina se puede aplicar en combinación con algún agente de la terapia oral.

## **5.1 Hipoglucemiantes orales**

### **5.1.1 Biguanidas: Metformina**

La Metformina es una biguanida usada para el control de la glucosa sanguínea del paciente que es insulinoresistente y para la prevención de la diabetes en el que ha desarrollado intolerancia a la glucosa. En la etapa temprana del desarrollo de la diabetes tipo II, cuando el paciente aún es capaz de secretar cantidades suficientes de insulina, así como para el paciente con diabetes tipo II que presenta obesidad.

La Metformina produce la disminución de la glucosa sanguínea principalmente por supresión de la producción de glucosa hepática. Los estudios en torno al mecanismo de acción de la metformina indican que al promover la re-esterificación de los ácidos grasos del tejido adiposo produce la inhibición de la lipólisis. De esta forma, al reducir la lipotoxicidad, indirectamente contribuye en la supresión de la gluconeogénesis hepática (Stolar, 2002; Giannarelli y col., 2003). En el tejido muscular, la mejora de la sensibilidad a la insulina por la metformina puede ser explicada a través de distintos mecanismos, incluyendo el incremento en la actividad de cinasa de tirosina del receptor de insulina, aumento en la promoción de los transportadores GLUT4 y aumento en la síntesis de glucógeno. La metformina no presenta un efecto directo sobre la célula  $\beta$ , ya que ésta no estimula la secreción de insulina, por ello, la posibilidad de causar hipoglicemia es mínima. Otra característica consiste en que no produce aumento de peso (DeFronzo, 1999).

### **5.1.2 Sulfonilureas: Clorpropamida**

Las sulfonilureas estimulan la liberación de insulina a partir de las células  $\beta$  pancreáticas. El mecanismo comienza con la unión de la sulfonilurea al receptor en la célula  $\beta$ , que cierra un canal de potasio dependiente de ATP, disminuyendo el flujo de potasio y provocando la despolarización de la membrana plasmática. Esto produce el incremento del flujo de calcio en la célula que activa al sistema del

citoesqueleto, causando a su vez la translocación de los gránulos secretores a la superficie celular y la liberación de la insulina a través de exocitosis (Goodman,1996; DeFronzo, 1999).

La combinación de la metformina con la monoterapia de una sulfonilurea ha demostrado mejorar eficientemente el control glicémico (DeFronzo, 1999; Kirpichnikov y col., 2002). Dentro de los fármacos que poseen la combinación biguanidas-sulfonilureas se encuentra el Mellitrón.

### **5.1.3 Mellitron**

El Mellitron comercial consiste en tabletas compuestas de metformina (400 mg) y clorpropamida (125 mg). Es un hipoglucemiante oral sinérgico recomendado para diabetes no insulino dependiente, en especial cuando se asocia a obesidad. Se recomienda la administración de 1 a 3 tabletas al día dependiendo de los resultados de glucemia (Diccionario de especialidades farmacéuticas, 2003).

### **5.2 Plantas medicinales: la herbolaria mexicana**

La herbolaria se conoce como la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud (Huerta, 2002). Para grandes núcleos de la población mexicana, las plantas medicinales aún constituyen el recurso más conocido y accesible para el tratamiento de diversas afecciones. La información etnobotánica mundial reporta casi 800 plantas usadas en el control de la diabetes y aproximadamente 150 de estas existen en México. Sin embargo, dichos tratamientos se aplican empíricamente y sólo un número reducido de estas plantas ha sido estudiado. Algunas de las plantas estudiadas se citan en el Cuadro 2 y dentro de éstas se encuentra la chaya (Alarcón-Aguilara y col., 1998).

Cuadro 2. Plantas medicinales de uso intensivo en México para el tratamiento de la diabetes (Adaptado de Alarcón-Aguilara y col., 1998).

Nombre científico	Familia	Nombre Popular en México	Partes usadas	Preparación
<i>Opuntia streptacantha</i>	Cactaceae	Nopal	Tallo fresco	Jugo
<i>Tecoma stans</i>	Bignoniaceae	Tronadora	Flores	Decocción
<i>Cnidoscólus multilobus</i> (Lex.) L.M.	Euphorbiaceae	Chaya	Hojas	Decocción
<i>Euphorbia prostrata</i> Ait	Euphorbiaceae	Golondrina	Planta completa	Decocción
<i>Guazoma ulmifolia</i> Lam.	Sterculiaceae	Guacima	Hojas	Decocción
<i>Salvia officinalis</i> L. (Ort.) Epl	Labiatae	Salvia	Flores	Decocción
<i>Musa sapientum</i> L.	Musaceae	Plátano	Flores frescas	Decocción
<i>Rhizophora mangle</i> L.	Rizophoraceae	Mangle rojo	Tallo	Decocción
<i>Trigonella foenum-graceum</i> L.	Leguminosae	Fenogreco	Semillas	Decocción
<i>Tournefortia hirsutissima</i> L.	Boraginaceae	Lágrimas Pedro	Tallo	Decocción
<i>Turnera diffusa</i> Willd	Turneraceae	Damiana	Hojas	Decocción

## 6. LA CHAYA

### 6.1 Botánica

La Chaya es un arbusto que pertenece a la clasificación *Calayptosolen* del género *Cnidoscólus* de la familia *Euphorbiaceae*.

El conjunto de especies agrupadas en la taxonomía como chayas, quedan comprendidas dentro de la taxonomía *Cnidoscólus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst. ssp. *aconitifolius* (Breckon 1975). Estas plantas crecen hasta seis metros de altura, son de hojas lobuladas, savia lechosa y pequeñas flores blancas en la punta de las ramas en dicotomía.

Dentro de las subespecies de la chaya existe una amplia variación morfológica y fenológica. En la investigación realizada por Ross y Molina (2002), se identificaron cuatro variedades cultivadas de chaya, cuyas diferencias morfológicas fácilmente separables y bastante consistentes, resultaron suficientes para tal diferenciación, pero cuya taxonomía aún no es asignada (Figura 7).

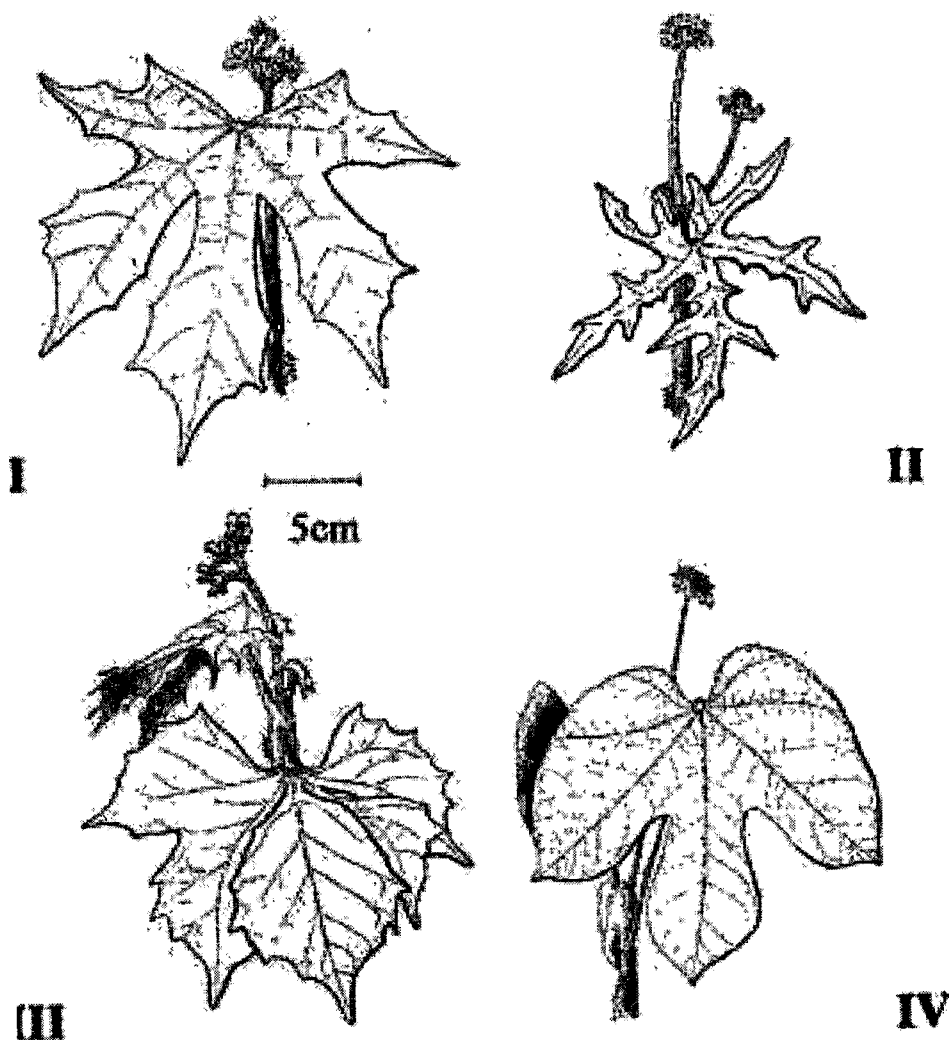


Figura 7. Cuatro variedades cultivables de chaya: Estrella I, Picuda II, Chayamansa III y Redonda IV (Ross y Molina, 2002).



## **6.2 Distribución**

Las subespecies de *Cnidosculus aconitifolius aconitifolius* tienen una amplia distribución. En forma silvestre crecen desde el sur de Texas a lo largo de la costa del Golfo de México, Guerrero, a través de Yucatán y Chiapas, Centroamérica, hasta el sur de Colombia. Recientemente, En tiempos recientes su cultivo se ha extendido a Cuba, Florida, Puebla, Morelos, y áreas urbanas y suburbanas por todo México y el suroeste de Estados Unidos.

## **6.3 Uso como alimento**

Análisis químicos han mostrado que las hojas de chaya tienen un alto contenido nutricional en comparación a otras hojas comestibles. Las hojas de chaya sobresalen por su alto contenido en vitamina C, actividad de provitamina A (principalmente  $\beta$  caroteno) y proteína (Ross y Molina, 2002). Los niveles de vitamina C son altos y resultan diez veces mayores comparados con los niveles encontrados en naranja o limón (Molina y col., 1997).

Sin embargo, resulta importante tener presente que las hojas cocinadas en agua hirviendo (aproximadamente 20 ml agua/hoja) alcanzan niveles no tóxicos de glucósidos cianogénicos ( $0.017 \pm 0.002$  mg HCN/g hoja) a los 15 minutos de cocción, coincidiendo con el tiempo tradicional para hervir el agua (Molina y col., 1997) y sólo así pueden consumirse sin riesgo.

## **6.4 Medicina: Usos**

La chaya ha sido y continúa siendo una importante planta medicinal en México. La gran expansión que ha tenido recientemente en distintas áreas probablemente se debe a su valor medicinal.

Los registros que existen sobre el uso tradicional de la chaya abarcan numerosas enfermedades como los problemas de riñón incluyendo disolución de cálculos, diabetes, obesidad, inflamación, desórdenes musculares, reumatismo, artritis, hemorroides, problemas visuales, problemas de encías.

Para el tratamiento de la diabetes, las hojas de chaya son preparadas y usadas de forma similar como normalmente son consumidas, con la precaución de ser hervidas cuando la administración es oral a través de infusiones o té (Ross y Molina, 2002).

### 6.5 Posible Efecto Antidiabético

Existen dos estudios publicados que han evaluado el potencial hipoglucémico de la chaya. El primero de ellos fue realizado por Kuti y Torres (1996), con conejos a los cuales se les indujo la diabetes con Streptozotocina (STZ). La variedad de hojas de chaya utilizadas fue *Cnidoscolus chayamansa*, cuyo extracto se preparó con 10 g de hojas en 1000 ml de agua a ebullición por 30 minutos hasta que el volumen se redujo al 90% (900 ml). Este té fue administrado *ad libitum* durante 6 horas (Cuadro 3). Los resultados obtenidos muestran la capacidad hipoglucemiante del té de chaya en base a la disminución del 26% de glucosa 6 horas después de iniciado el experimento.

Cuadro 3. Efecto del extracto de hojas de *Cnidoscolus chayamansa* sobre los niveles de glucosa sanguínea en conejos no diabéticos y diabéticos por inducción con estreptozotocina STZ (Kuti y Torres, 1996).

Tiempo (h)	Nivel de glucosa sanguínea (mg/dl±SEM )			
	No -diabéticos		Diabéticos	
	agua	"chaya"	Agua	"chaya"
0.0	87 ± 3.1	85 ± 2.5	112 ± 8.3	118 ± 13.2
1.0	86 ± 2.7	91 ± 3.9	138 ± 4.6	114 ± 7.3
2.0	87 ± 2.6	99 ± 4.3	143 ± 6.4	103 ± 8.7
3.0	87 ± 3.1	82 ± 1.6	139 ± 8.0	96 ± 9.3
4.0	88 ± 3.0	85 ± 2.1	153 ± 6.3	92 ± 5.8
5.0	87 ± 4.7	84 ± 4.2	158 ± 7.4	89 ± 3.6
6.0	87 ± 3.1	82 ± 2.7	162 ± 9.0	87 ± 2.7

Alarcón-Aguilara y col. (1998), realizaron un estudio para evaluar el efecto antihiperglucémico de 28 plantas mexicanas utilizadas como antidiabéticas, incluyendo la chaya *Cnidoscolus multilobus* (Cuadro 4). En este estudio el té fue

preparado con 40 g de hojas secas de chaya *Cnidoscolus multilobus* en 300 ml de agua a ebullición lenta. Se utilizaron conejos Nueva Zelanda, machos, adultos, normoglicémicos, para realizar la prueba de tolerancia a la glucosa mediante la administración subcutánea del carbohidrato (2 g/kg) y la administración intragástrica de agua ó del té (4 ml/kg de peso corporal) como tratamiento. Los niveles de glicemia fueron evaluados durante 300 minutos después de iniciada la prueba. El pico hiperglicémico alcanzado con el tratamiento del té de chaya *Cnidoscolus multilobus* fue superior al obtenido por el grupo control, registrando a su vez un desfase de 60 minutos. Debido a que el té de la chaya *Cnidoscolus multilobus* no mostró reducción en el pico hiperglicémico y a que el nivel de glicemia promedio obtenido durante la prueba fue mayor al mostrado por el grupo control, este estudio señala que el té de la chaya *Cnidoscolus multilobus* no posee efecto anti-hiperglicémico.

Cuadro 4. Prueba de Tolerancia a la Glucosa en conejos sanos por administración gástrica de agua (control) y preparación de planta (té). Glicemia en mg/dl (media  $\pm$  SEM) (Alarcón-Aguilara y col., 1998).

Grupo	T=0	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min	Glicemia promedio
Control (n=18)	73.0 $\pm$ 2.1	189.5 $\pm$ 7.9	245.9 $\pm$ 5.3	219.9 $\pm$ 9.2	180.2 $\pm$ 10.2	152.3 $\pm$ 5.3	189.5 $\pm$ 7.3
<i>C. multilobus</i> (n=9)	71.8 $\pm$ 1.8	155.4 $\pm$ 3.5	251.9 $\pm$ 4.9	265.7 $\pm$ 9.1	235.2 $\pm$ 13.3	156.3 $\pm$ 14.7	204.5 $\pm$ 7.8

El amplio consumo empírico del té de chaya en nuestro país por los pacientes diabéticos para lograr el control glicémico hace necesario el estudio científico que valide el posible efecto antidiabético de la planta.

Los antecedentes científicos proporcionan información contradictoria acerca de la capacidad hipoglucemiante/antihiperglicémica de la chaya, lo cual podría atribuirse a las variedades de hoja utilizadas, al tiempo de corte de la hoja, a la concentración del té, al modelo experimental utilizado o al período de duración del tratamiento.

Esto lleva a plantear un estudio en el cual se incluyan diferentes variedades de hoja, considerando que la capacidad hipoglucémica pudiera estar asociada a la variedad. Así mismo, es de gran importancia considerar los efectos producidos por esta planta en un modelo de animales para la diabetes tipo II que nos permita sugerir un posible mecanismo de acción. Además, debido a que es común que el paciente diabético se someta a una terapia con fármacos hipoglucémicos combinada con el uso de plantas medicinales, resulta de suma importancia evaluar el efecto coadyuvante del té de chaya con un fármaco ampliamente utilizado como el Mellitrón.

## **HIPÓTESIS**

El té de chaya presenta capacidad hipoglucemiante y ésta pueda estar basada por una mejora en la cascada de transducción de señales de la insulina. Así mismo, dicho efecto puede verse influenciado por la variedad de la hoja utilizada y por la combinación de fármacos hipoglucemiantes.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Evaluar la capacidad hipoglucemiante y coadyuvante del té de chaya (*Cnidocolus aconitifolius ssp. aconitifolius* Breckon) en un modelo de diabetes tipo II.

### ESPECÍFICOS

- Comparar la capacidad hipoglucemiante de dos variedades del té de chaya sobre los niveles de glucosa sanguínea en condiciones de ayuno y con una carga de glucosa en ratas Zucker Fatty (ZF).
- Determinar el efecto combinado del té de chaya y un fármaco hipoglucemiante sobre los niveles de glucosa y triglicéridos en plasma de ratas ZF.
- Evaluar el efecto del té de chaya y fármaco sobre la expresión y actividad de proteínas participantes en la cascada de transducción de señales de la insulina en tejido muscular de ratas ZF.

## METODOLOGÍA

### 1. MATERIALES

#### 1.1 Biológicos

-**Animales.** Se usaron ratas macho obesas Zucker Fatty (fa/fa), de 4 semanas de edad, proporcionadas por Harlan-México. Los animales se aclimataron durante 6 semanas y se mantuvieron bajo ciclos de luz/obscuridad de 12 horas, con libre acceso al agua y comida estándar para roedor.

-**Las hojas de chaya** fueron obtenidas del banco de germoplasma del Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícola y Pecuaria (INIFAP) campus Celaya. En base en la información etnobotánica, las variedades Redonda (tres lóbulos) y Estrella (cinco lóbulos) de chaya *Cnidosculus aconitifolius ssp. aconitifolius* (Ross y Molina, 2002), fueron asignadas como chaya1 y chaya2, respectivamente.

#### 1.2 Químicos

-**Los anticuerpos Primarios** se obtuvieron de Santa Cruz biotechnology

- a) IRS-1, mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub>, 200µg/ml
- b) p-Tyr (pY99), mouse monoclonal IgG<sub>2b</sub>, 200µg/ml
- c) p-Akt1 (Ser 473)-R, rabbit polyclonal IgG, 200µg/ml
- d) Insulin Rβ, mouse monoclonal IgG<sub>1</sub>, 200µg/ml
- e) Actin, goat polyclonal IgG, 200µg/ml

-**Los anticuerpos Secundarios** se obtuvieron de Zymed

- f) HRP-Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Conjugate, 1.5 mg/ml
- g) HRP-Rabbit anti-Goat IgG (H+L) Conjugate, 1.5 mg/ml
- h) HRP-Goat anti-Mouse IgG (H+L) Conjugate, 1.5 mg/m.

-**Insulina.** Insulina Humana Humulin<sup>R</sup> R, Regular, (origen ADN recombinante), solución inyectable, 100UI/ml, acción rápida, marca Lilly.

-**Mellitrón** tabletas compuestas de metformina (400 mg) y clorpropamida (125 mg) marca JANSSEN-CILAG.

**-Otros**

- Pentobarbital sódico

- Reactivos para electroforesis marca Bio-rad

- Kit de quimioluminiscencia marca Roche Molecular Biochemicals

- Membranas-Inmuno-Blot<sup>TM</sup> PVDF para Protein Blotting (0.2mm)

-Tiras reactivas para la medición cuantitativa de la glucosa en sangre capilar fresca (Roche)



## 2. MÉTODOS

### 2.1 Preparación de té de chaya

Se pesaron 10 g de hojas frescas de chaya, se adicionó agua hasta 1L y se calentó a ebullición. Se dejó evaporar el agua hasta un volumen de 900ml, durante un periodo mínimo de 15 min. Una vez filtrado el té se conservó en refrigeración, atemperándolo antes de administrarlo a los animales diariamente *ad libitum*. Considerando el volumen promedio del té ingerido diariamente por animal, la dosis administrada se aproximó al 1% (gramos hoja/100 ml). Posteriormente se duplicó la cantidad de hojas (20 g) siguiendo el proceso citado para obtener el extracto acuoso, el cual fue administrado a la dosis aproximada del 2%.

### 2.2 Dosificación del Mellitrón

La dosificación del fármaco se consideró en base a los 400 mg de metformina como constituyente principal en el Mellitrón. La dosis inicial fue de 3 pastillas por día. Se consideró el volumen promedio de líquido diariamente ingerido por animal. Las tabletas se trituraron finamente. Inicialmente los 1200 mg/día equivalentes a 17 mg/kg de peso corporal del animal fueron incorporados directamente en el líquido (agua o té) en disolución y fueron administrados diariamente *ad libitum*. Posteriormente la dosis se triplicó y se administraron 56 mg/kg de peso corporal.

### 2.3 Tratamientos. Se diseñaron dos Fases de tratamiento.

**Fase1:** Los animales se dividieron en un grupo control, que recibió agua, y un grupo para cada variedad de té de chaya, que inicialmente se administró al 1% y posteriormente al 2%. El experimento inició a las 10 semanas de edad de los animales y tuvo una duración de 5 semanas, realizándose una Curva de Tolerancia a la Glucosa al final del período. Todos los tratamientos fueron administrados *ad libitum*.

**Fase2:** Como continuación de la fase 1, esta fase dio inicio a las 15 semanas de edad de los animales. Se establecieron 6 grupos: 1) Control (agua), 2) Mellitrón (56mg/kg) , 3) Té Chaya1 (2%), 4) Chaya1-Mellitrón, 5) Té Chaya2 (2%), 6)

Chaya2-Mellitron. La dosis inicial del fármaco fue de 17 mg/kg y posteriormente de 56 mg/kg. Los tratamientos fueron administrados durante 5 semanas *ad libitum*.

En cada una de las fases se registró semanalmente el peso corporal de los animales. Las determinaciones de los niveles de glucosa sanguínea se realizaron en condiciones de ayuno.

#### **2.4 Determinaciones de glucosa en sangre**

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal de las ratas en estado de ayuno y la medición de glucosa se realizó empleando un glucómetro Accutrend GC, cuyo rango de sensibilidad es de 20 a 600 mg/dl de glucosa. La medición de la prueba se realiza a través de bioamperometría, que mide la corriente generada por la reacción de la enzima glucosa-deshidrogenasa de la tira reactiva al convertir la glucosa de la muestra sanguínea en gluconolactona. El método tiene una precisión < 3% y una exactitud  $\pm 5\%$  respecto al método de la hexoquinasa (Roche Diagnostics).

#### **2.5 Determinación de triglicéridos en plasma**

La toma de muestra siguió el protocolo previamente mencionado. La muestra fue colectada en tubos eppendorff. Formado el coágulo, el plasma fue obtenido por centrifugación. La medición de los niveles de triglicéridos fue determinada por análisis enzimático-colorimétrico (Bayer).

#### **2.6 Curva de Tolerancia a la Glucosa**

En estado de ayuno, se administró por vía oral una solución de glucosa (4.9 g/kg por peso corporal) y se realizaron determinaciones de glucosa sanguínea a los tiempos 0, 5, 15, 60 y 120 minutos.

## **2.7 Sacrificio de animales y toma de muestras**

Al finalizar el tratamiento, los animales se dejaron en ayuno y se les determinó la glucosa sanguínea. Se sacrificaron bajo anestesia con Pentobarbital (90 mg/kg de peso corporal) por vía intraperitoneal. Se administró insulina Humulin R (10 U/kg) por vía cardiaca (Giorgino y col., 1992; Kim y col., 2000) y se extrajo rápidamente el tejido muscular a los tiempos 0, 3, 5 y 15 min. Se congelaron las muestras en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-74^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

## **2.8 Preparación de tejido muscular**

Cada muestra de tejido muscular se homogenizó usando un polytron a 15 unidades de velocidad durante 30 segundos en 2 ml de buffer (Hepes 50mM (pH 7.5), NaCl 105mM,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, NaF 10mM, EDTA 2mM, PMSF 2mM, leupeptina 5mg/ml, Nonidet p-40 (NP40) 1% y glicerol al 10%). Los tejidos lisados fueron solubilizados por agitación constante (30 rev/min) durante 40 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 36000 g a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue almacenado a  $-74^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

## **2.9 Cuantificación de Proteínas**

Se cuantificaron las proteínas totales del homogenizado del tejido muscular utilizando el método de Lowry y col. (1951), empleando una solución de seroalbúmina bovina (BSA) para realizar la curva estándar de referencia.

## **2.10 Western-Blot**

### **2.10.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE**

El extracto proteico fue mezclado volumen a volumen (1:1) con la solución digestora de muestra. Esta mezcla se incubó a  $60^{\circ}\text{C}$  en baño maría por 20 minutos. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida con SDS al 7%, a voltaje constante (120 volts) durante 100 min. Para verificar la electroforesis y visualizar las bandas de proteínas, los geles se tiñeron con Azul de Coomasie G-250 (Laemmli, 1970).

Después de la electroforesis, el gel y la membrana de nitrocelulosa se trataron con una solución de electrotransferencia durante 10 min. La transferencia se realizó a 15 volts durante 18 min en una cámara de transferencia semiseca (BIO-RAD). La membrana se bloqueó en solución amortiguadora TBS 10% durante toda la noche a 4°C y se incubó con un primer anticuerpo (IR, IRS-1, pTyr y pAkt1) durante 3 horas, a temperatura ambiente. Se realizaron lavados con solución TTBS. Posteriormente, la membrana se incubó con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa diluido (1:1000) en solución de bloqueo por 45 minutos. Finalmente, la membrana se lavó con TTBS y se incubó con la solución sustrato del kit de quimioluminiscencia (Western blot Chemiluminescence Reagent Plus NEN™ Life Science Products), y se visualizó por autorradiografía cuando la membrana fue expuesta a una película fotográfica (Fuji medical x-ray film). El revelado de las placas se hizo con soluciones comerciales (Kodak).

Como control interno de la carga de proteína, se empleó un anticuerpo contra Actina.

### **2.10.2 Análisis Densitométrico**

Las bandas se cuantificaron por análisis de la intensidad máxima a través de un fotodocumentador mediante el software Kodak ID Image. Las bandas de IR, IRS-1 y Akt se ajustaron respecto a las de Actina.

### **2.11 Análisis estadístico**

La evaluación estadística de los datos se realizó utilizando el análisis de varianza seguido de la prueba de Fisher post hoc de comparaciones múltiples, así como Tukey. En todos los casos un  $\alpha$  de 0.5 fue usada para determinar la significancia. Los resultados son presentados como media  $\pm$  el Error Estándar de la Media (SEM).

## RESULTADOS

### 1. Fase 1: Tratamiento con el té de Chaya

El análisis de la relación entre la variedad morfológica y efecto hipoglucemiante del té de chaya se estudió en ratas Zucker Fatty (ZF). La concentración de chaya en el té administrado fue determinada en base al consumo diario del líquido. Esta fase de tratamiento dió inicio a las 10 semanas de edad de los animales y tuvo una duración de cinco semanas.

#### 1.1 Efecto del té de chaya sobre el peso corporal de las ratas ZF

Al inicio del experimento el peso de los animales fue de  $382 \pm 13$  g,  $398 \pm 8$  g y  $406 \pm 11$  g en los grupos control, chaya1 y chaya2, respectivamente, sin presentar diferencia significativa. Durante el tratamiento la ganancia de peso corporal de los animales tratados con el té de chaya fue similar al grupo control, sin presentar diferencia significativa, a excepción de la última determinación. Como lo muestra la figura 8, después de 30 días de tratamiento se registraron  $131 \pm 8$  g,  $162 \pm 10$  g y  $148 \pm 17$  g de incremento en los grupos control, chaya1 y chaya2, respectivamente, presentando diferencia estadística el grupo de chaya1 respecto al control.

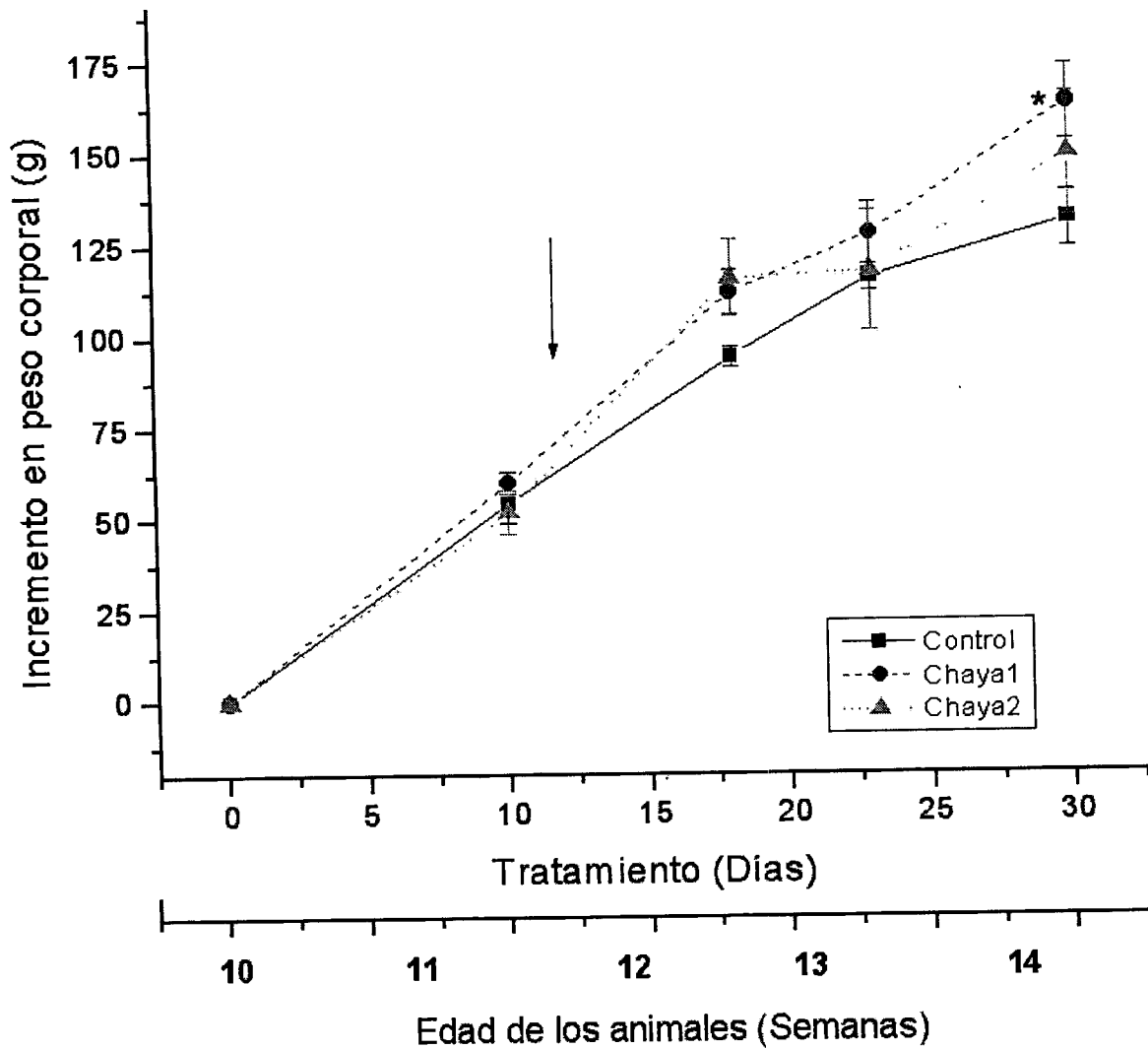


Figura 8. Incremento del peso corporal en las ratas ZF tratadas con té de chaya, administrado en agua de uso.

Los valores son presentados como media  $\pm$  SEM, n=4-5.

Tratamiento inicial chaya 1%, durante 11 días,  $\downarrow$  incremento a 2%, durante 24 días.

\*,  $p < 0.05$ , respecto al Control por el análisis estadístico de Fisher.

## **1.2 Efecto del té de chaya sobre la concentración de glucosa sanguínea en las ratas ZF**

La figura 9 muestra los niveles de glucosa sanguínea y el cuadro 5 el porcentaje de incremento de dicho parámetro en las ratas ZF durante el tratamiento con el té de chaya.

El experimento dio inicio a las 10 semanas de edad de los animales, los cuales presentaron niveles de normoglicemia entre los 97 y 108 mg/dl, no encontrándose diferencia significativa entre grupos.

Durante los 11 días de tratamiento inicial con el té de chaya al 1 %, se registró alrededor del 3 % de incremento de glucosa en los grupos control y tratado con chaya1. El grupo tratado con chaya2 presentó un 19 % de incremento estadísticamente significativo. Sin embargo, estos valores de glucemia se encuentran dentro del rango de normoglicemia del animal (90 a 135 mg/dl). No se observó efecto hipoglucémico a ésta concentración.

Durante las semanas 12 y 13 de edad de los animales, los tres grupos presentaron un incremento en los niveles de glucemia. En la semana 12, la glicemia ascendió en el grupo control a  $182 \pm 4$  mg/dl correspondiente a un incremento del 86 %. En los grupos tratados, los cuales ya habían iniciado con la doble concentración del té (2%), presentaron un incremento del 53 % ( $151 \pm 8$  mg/dl) y 20 % ( $130 \pm 8$  mg/dl) en los grupos tratados con chaya1 y chaya2 respectivamente. Ambos grupos fueron significativamente diferentes respecto al control.

Estos resultados nos indican que el tratamiento con chaya tiene la capacidad de prevenir el efecto hiperglicémico producido por la condición de resistencia a la insulina desarrollada en estos animales de manera genética.

En la semana 13, los niveles de glicemia de los tres grupos oscilaron entre 166 y 180 mg/dl sin presentar diferencia significativa. Posteriormente a partir de la semana 14, en los tres grupos disminuyeron los niveles de glicemia, finalizando esta fase con valores entre  $131 \pm 8$  y  $149 \pm 7$  mg/dl sin presentar diferencia significativa.

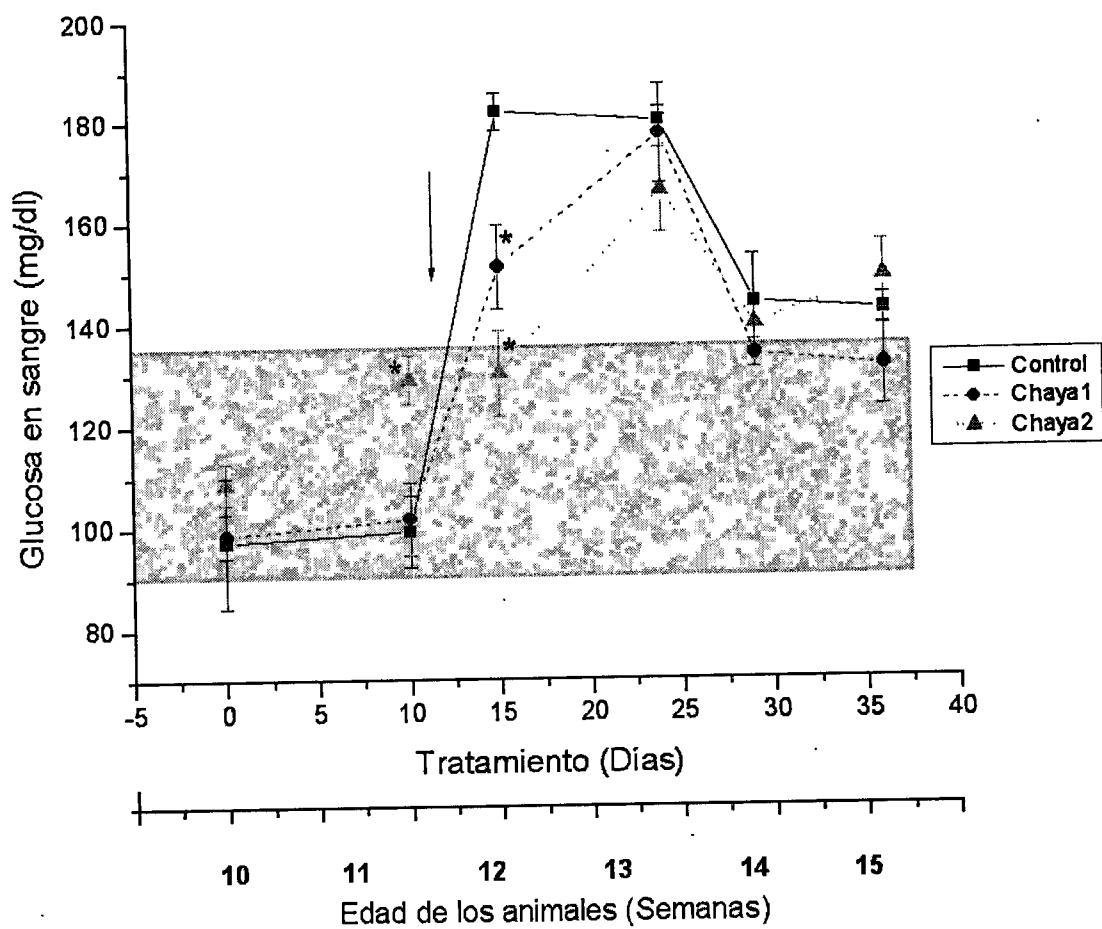


Figura 9. Determinación de glucosa en sangre en las ratas ZF con té de chaya, administrado en agua de uso.

Los valores son presentados como media  $\pm$  SEM, n=3-5.

Tratamiento inicial chaya 1%, durante 11 días,  $\downarrow$  incremento a 2%, durante 24 días.

■ El área sombreada representa el rango de normoglicemia de las ratas ZF (90-135 mg/dl).

\*,  $p < 0.05$ , respecto al Control por el análisis estadístico de Fisher.



Cuadro 5. Porcentaje de incremento de glucosa en sangre de las ratas ZF tratadas con té de chaya.

DIAS TRATAMIENTO	0	10	15	24	29	36	
	valor inicial			valor final			
	(mg/dl)			(mg/dl)			
CONTROL	97 ± 13	2	86	85	48	46	142 ± 3
CHAYA1	99 ± 4	3	53*	80	35	33	131 ± 8
CHAYA2	109 ± 4	19*	20*	52	28	37	149 ± 7

\*,  $p < 0.05$ , por el análisis estadístico de Fisher.

### 1.3 Efecto del té de chaya sobre la Curva de Tolerancia a la Glucosa en las ratas ZF

En la figura 10 se muestra la Curva de Tolerancia a la Glucosa (CTG) en ratas ZF tratadas con el té de chaya durante 34 días. Los valores iniciales de glucosa sanguínea fueron de  $149 \pm 8$  mg/dl,  $126 \pm 8$  mg/dl y  $141 \pm 2$  mg/dl en los grupos control, chaya1 y chaya2 respectivamente. Se observó que el grupo control presentó su pico máximo de glucosa sanguínea ( $457 \pm 15$  mg/dl) a los 15 minutos de la administración oral de la glucosa (4.9 g/kg). Estos niveles corresponden a un incremento del 208%, alcanzando al final de los 120 minutos de monitoreo un incremento del 136% con respecto a sus valores iniciales.

Los grupos tratados con el té de chaya presentaron su pico máximo de glucosa sanguínea a los 30 minutos ( $462 \pm 2$  mg/dl) y 60 minutos ( $446 \pm 15$  mg/dl), correspondientes a un incremento del 264% y 214% para chaya1 y 2 respectivamente. Al final del monitoreo se observó un incremento del 214% y 160% con para chaya1 y 2 respecto a sus valores iniciales y no se encontró diferencia estadística con el control.

En base a los resultados se observa un desfase del pico hiperglicémico por efecto del tratamiento con ambas chayas. Los tiempos 30 y 60 min en los que se registró este pico hiperglicémico por la chaya1 y chaya2 fueron significativamente diferentes respecto al control. Los niveles de glucosa registrados por los tres grupos como pico hiperglicémico no fueron diferentes estadísticamente.

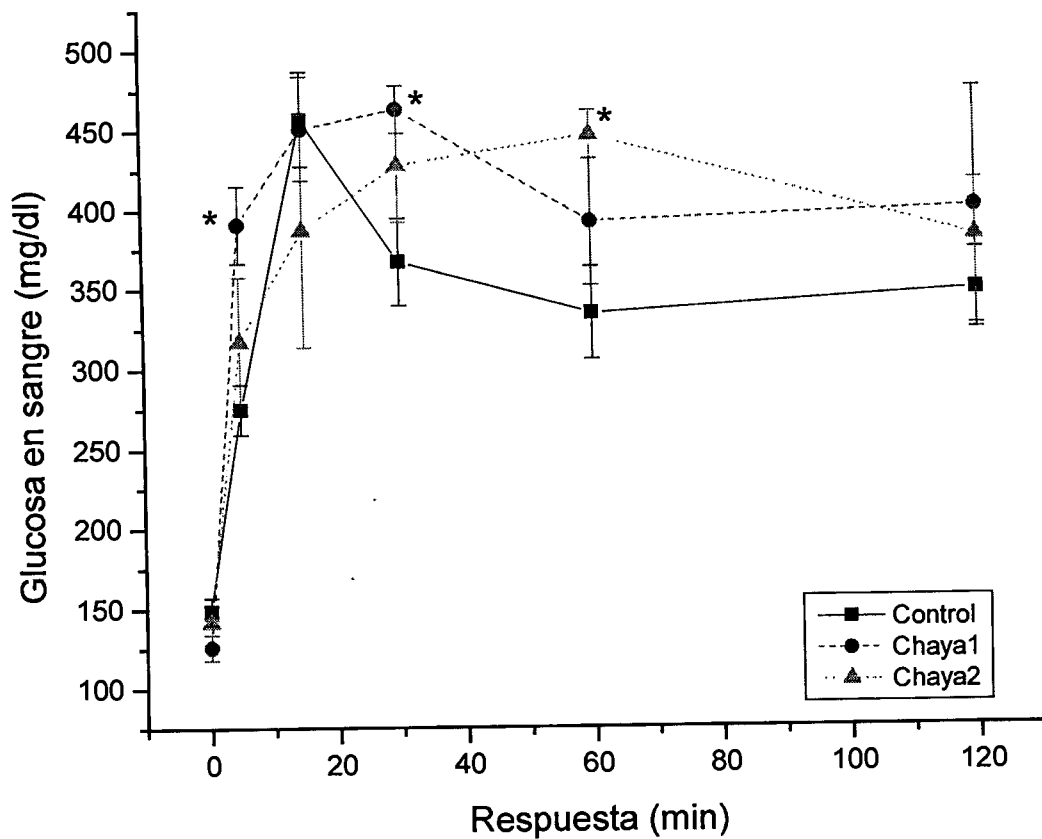


Figura 10. Curva de Tolerancia a la Glucosa en ratas ZF a los 34 días del tratamiento con té de chaya 2%.

Los valores son presentados como media  $\pm$  SEM, n=3.

Intubación por vía oral de Glucosa: 4.9 g/kg.

\*,  $p < 0.05$ , respecto al Control por el análisis estadístico de Fisher.

## **2. Fase 2: Tratamiento Chaya-Mellitrón**

Para evaluar el efecto coadyuvante de la Chaya con el fármaco Mellitrón, el fármaco (metformina-clorpropamida) se incorporó al té de chaya al 2% y se administró como agua de uso. Los animales se trataron durante 5 semanas, dando inicio a las 15 semanas de edad.

La terapia con metformina inicia con una dosis simple de 500 mg/día (7 mg/kg) y se incrementa bisemanalmente en 500 mg. Se ha observado que el efecto hipoglucémico constante se logra a una dosis de 2000 mg/día, (28.6 mg/kg) y la máxima dosis sugerida en humanos es de 2550 mg/día (36.4 mg/kg). Concentraciones más altas pueden generar efectos adversos como acidosis láctica (DeFronzo, 1999, Kirpichnikov y col., 2002).

### **2.1 Efecto coadyuvante del té de Chaya - Mellitrón sobre el peso corporal de las ratas ZF**

En la figura 11 se presenta el incremento de peso corporal con el té de Chaya-Mellitrón. Durante los primeros 13 días se administró una dosis simple de Mellitrón de 17 mg/kg de peso corporal. Posteriormente, a partir del día 14 se incrementó la dosis a 56 mg/kg. A lo largo del tratamiento, la ganancia de peso obtenida por los diferentes grupos fue similar, observándose que la administración del fármaco no afectó el crecimiento de los animales. Al término de ésta fase, se observó una ganancia de peso alrededor de  $52 \pm 6$  g hasta  $64 \pm 23$  g en los grupos, con excepción del grupo tratado con el té de chaya2, el cual registró una ganancia de peso mayor ( $91 \pm 18$  g) significativa respecto al control. Particularmente, el grupo chaya2 registró un mayor incremento de peso corporal durante los 21 y 28 días de tratamiento, presentando diferencia significativa respecto al control.

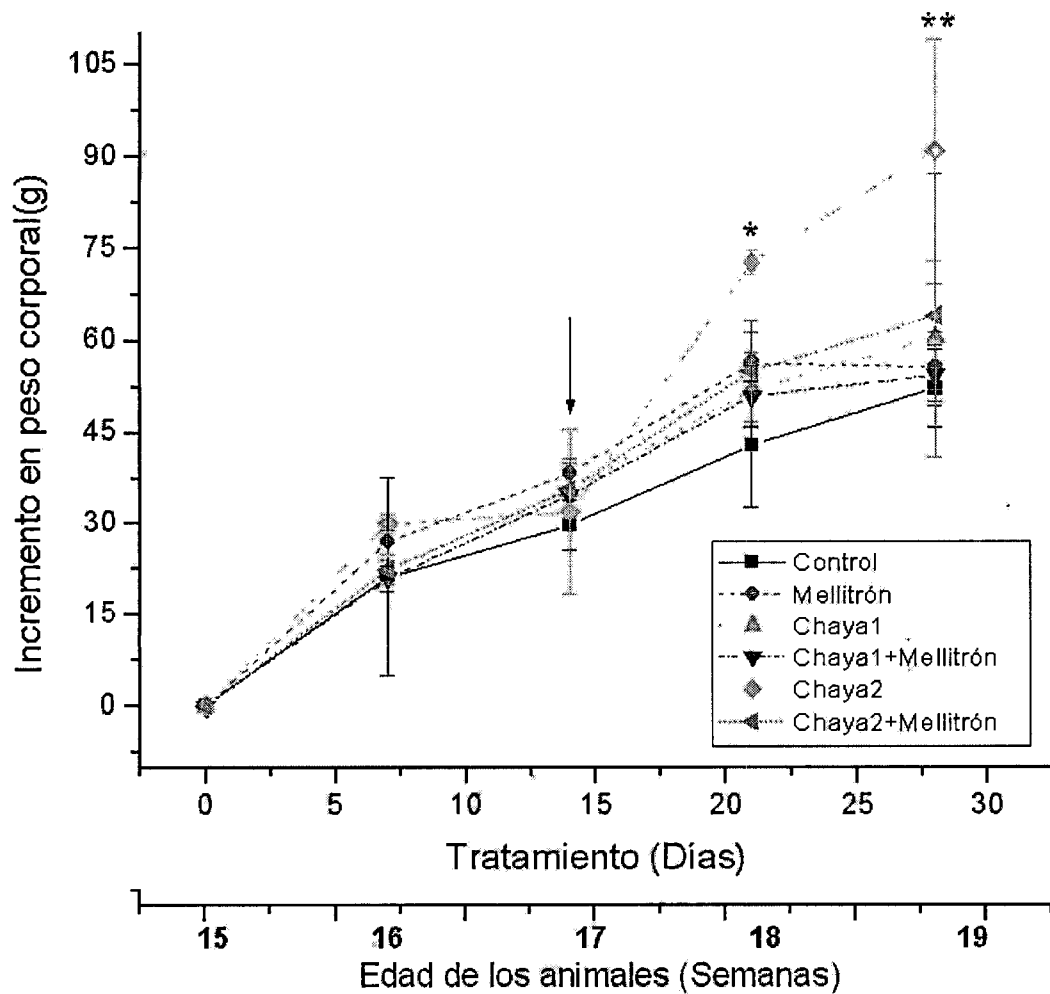


Figura 11. Incremento del peso corporal en las ratas ZF tratadas con té de Chaya – Mellitrón, administrado en agua de uso.

Los valores son presentados como media  $\pm$  SEM, n=2-4

Tratamiento inicial Chaya 2%- Mellitrón (17 mg/kg de peso corporal), durante 13 días,

↓ incremento Mellitrón (56 mg/kg de peso corporal), durante 18 días.

\*\* $, p < 0.01$  \* $, p < 0.05$ , respecto al Control por el análisis estadístico de Fisher

## **2.2 Efecto coadyuvante del té de Chaya- Mellitrón sobre la concentración de glucosa sanguínea en las ratas ZF**

La fase 2 inició con la subdivisión de los grupos provenientes de la fase 1. Cada grupo se subdividió en dos grupos, de tal forma que la mitad de los animales recibieron el tratamiento original (agua, chaya1 o chaya2), y la otra mitad el tratamiento+Mellitrón. Los niveles de glicemia iniciales oscilaron entre 135 y 162 mg/dl, la mayoría por encima del rango de normoglicemia, sin existir diferencia significativa entre los seis grupos. Al finalizar los 13 primeros días de la dosis de 17 mg/kg de Mellitrón de peso corporal, el grupo chaya1-Mellitrón presentó una reducción del 20% en los niveles de glucosa sanguínea, los cuales fueron significativamente diferentes con respecto al grupo control. Una vez que la dosis de Mellitrón se incrementó a 56 mg/kg, nuevamente se encontró que el grupo chaya1-Mellitrón registró una disminución del 27% ( $110 \pm 7$  mg/dl) al segundo día de tratamiento, siendo significativamente diferente al grupo control ( $132 \pm 3$  mg/dl). Por otro lado, durante el curso de esta misma fase, el grupo tratado con el té de chaya2-Mellitrón produjo una disminución continua en los niveles de glicemia, que aunque no fueron significativamente diferentes respecto al grupo control, denotan una mayor tendencia en la disminución de este parámetro (Figura 12) .

## **2.3 Efecto coadyuvante del té de Chaya - Mellitrón sobre los triglicéridos**

Niveles elevados de triglicéridos (TG) en plasma están relacionados con el estado de la resistencia a la insulina, razón por la cual se determinó su concentración en los animales tratados con chaya y/o Mellitrón.

Los resultados muestran que los animales de los grupos chaya1 y 2 registraron una disminución estadísticamente significativa en los niveles de triglicéridos en un 30% y 40%, respectivamente, comparados con el grupo control de tratamiento.

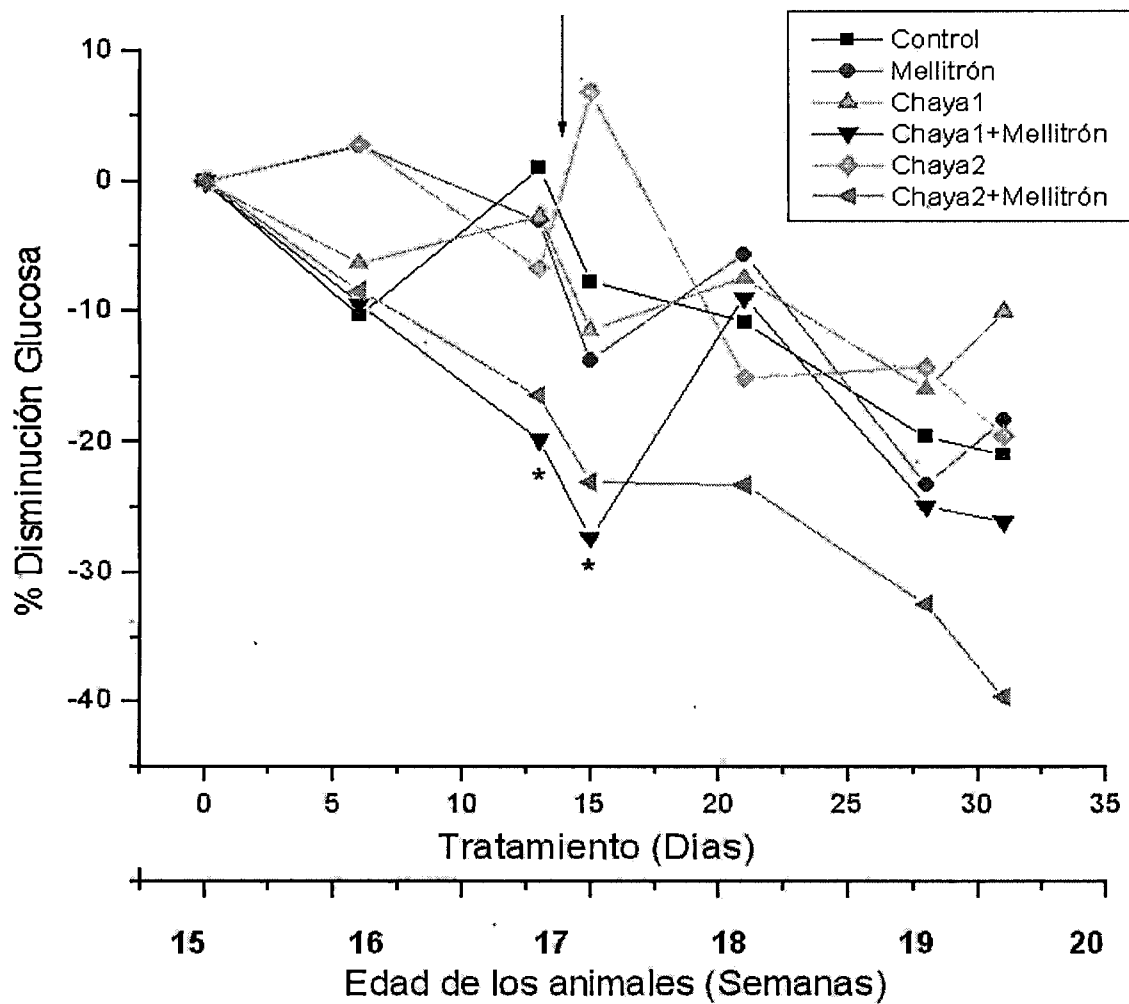


Figura 12. Disminución de glucosa sanguínea en porcentaje en ratas ZF tratadas con té de chaya -Mellitrón durante 31 días.

Tratamiento inicial Chaya 2%- Mellitrón (17 mg/kg de peso corporal), durante 13 días,  
 ↓ incremento Mellitrón (56 mg/kg de peso corporal), durante 18 días.

\*\* $p < 0.01$ , con respecto al Control por el análisis estadístico de Fisher.

La sola administración de Mellitrón produjo una disminución en los niveles de triglicéridos del 58%, mientras que la combinación del té de chaya1-Mellitrón únicamente causó una disminución del 23%, comparados con el control agua y chaya1, respectivamente, ambos fueron diferentes estadísticamente respecto al control agua. Así mismo, la disminución en los niveles de triglicéridos presente en los animales tratados con la chaya2-Mellitrón no superó lo logrado por el Mellitrón y no fue estadísticamente diferente de los niveles obtenidos únicamente con el té de chaya2. Cabe recordar que para este estudio se emplearon los animales provenientes de la fase 1. Por lo que, en realidad, los animales de los grupos control, chaya1 y chaya2 se mantuvieron bajo 10 semanas de tratamiento. Por otro lado, los grupos a los que se adicionó el Mellitrón, estuvieron durante 5 semanas bajo dicho tratamiento. (Figura 13)

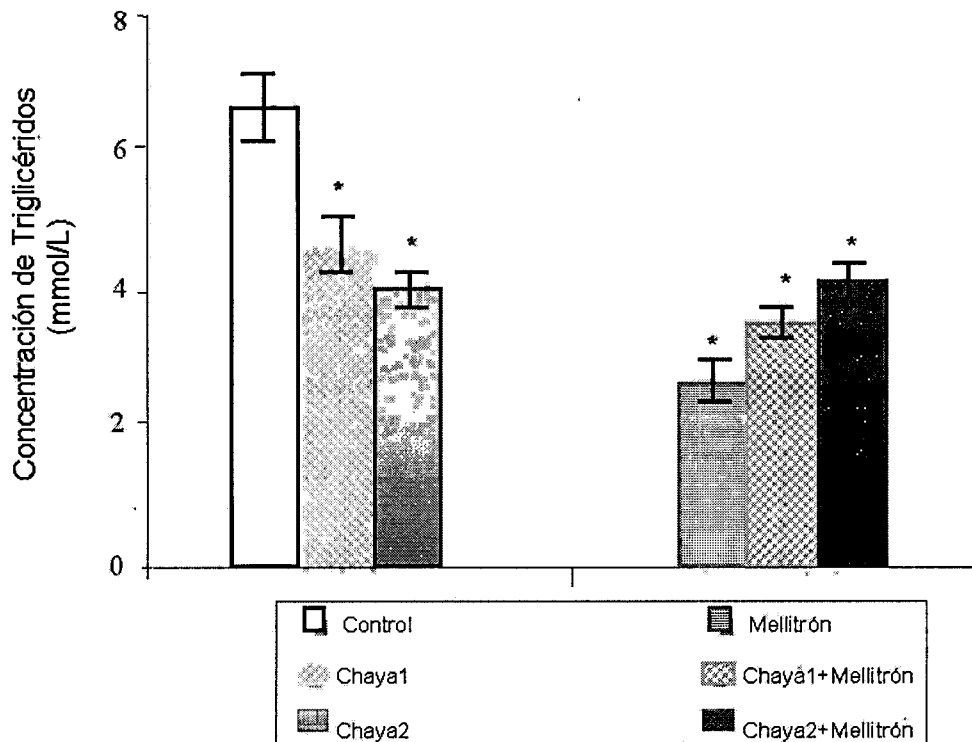


Figura 13. Determinación de triglicéridos en ratas ZF tratadas con Mellitrón (56 mg/kg).

Los valores son presentados como media, n=2-4

\*,  $p < 0.05$ , con respecto al Control por el análisis estadístico de Fisher.

## **2.4 Efecto coadyuvante del té de Chaya – Mellitrón sobre proteínas de la cascada de señalización de la insulina**

Para observar si el tratamiento del té de chaya, así como el té+Mellitrón causaron una mejora en la expresión y activación de proteínas participantes en la cascada de la insulina, se analizaron IR, IRS-1, Akt1, en el tejido muscular. Este tejido es insulinoresistente y se ha reportado que existe una disminución en la activación de dichas proteínas en las ratas Zucker Fatty. El tratamiento elegido para este análisis fue el té de Chaya1+Mellitrón, debido a que presentó una disminución significativa en el monitoreo de la glucemia de la fase 2, aunado a la disminución significativa que produjo en los niveles de triglicéridos en plasma. Así mismo, los grupos controles correspondientes fueron incluidos.

### **2.4.1 Proteína IR**

Particularmente, se evaluó la expresión de IR e IRS-1 que son las primeras proteínas participantes en la señalización de la insulina. Para este análisis, el tejido muscular esquelético fue aislado sin previa estimulación externa con insulina. Al tejido fue homogenizado e inmunoprecipitado con anticuerpo anti-IR. En la figura 14 se puede observar la expresión de la proteína IR en el músculo esquelético de ratas Zucker obesas de los diferentes tratamientos control, Mellitrón, chaya1 y chaya1-Mellitrón. Los resultados muestran que no hubo diferencia estadística significativa para los tratamientos chaya1 y/o Mellitrón comparado con el control.



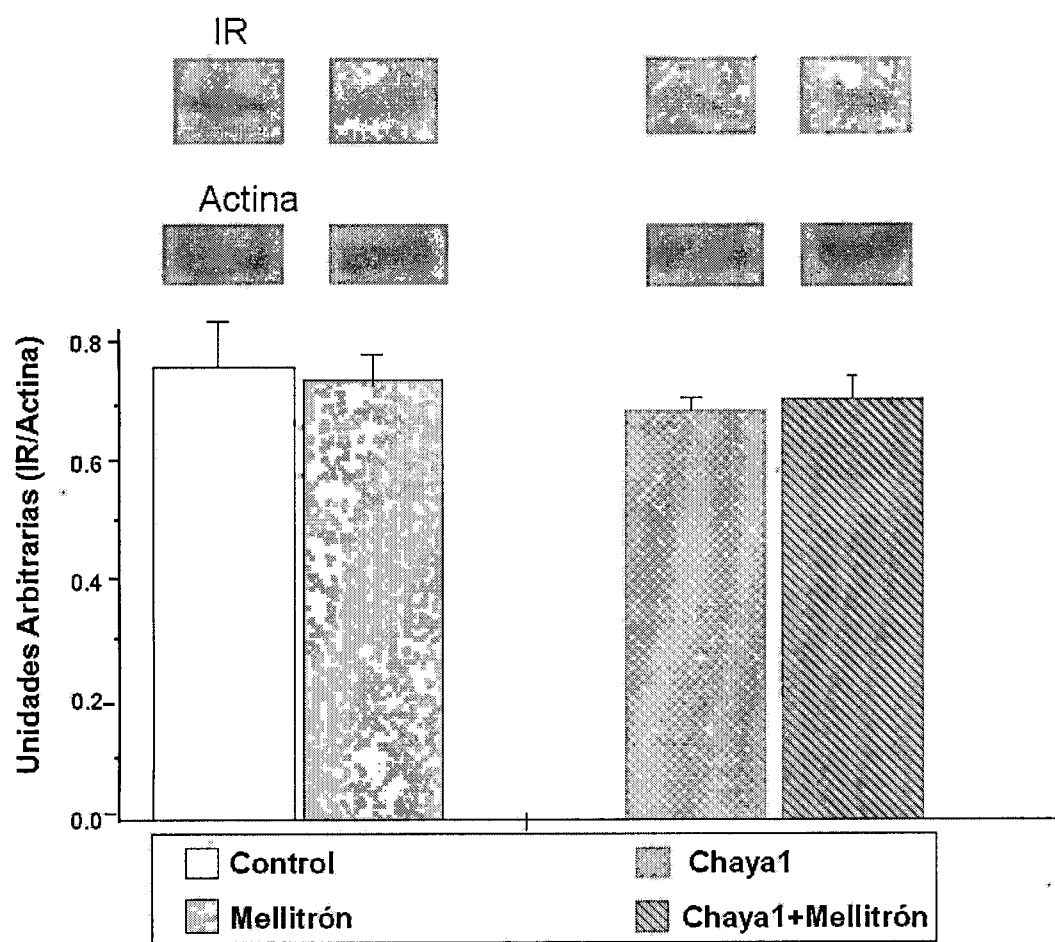


Figura 14. Expresión de la proteína IR en músculo esquelético en ratas ZF. En la parte superior de la figura se muestra un Western-Blot representativo de la expresión de IR.

Cada barra está presentada como la media  $\pm$  SEM, n= 2-3.

Control: agua

Mellitrón: agua+ Mellitrón (56 mg/kg)

Chaya1: té al 2%

Chaya1+ Mellitrón: té al 2% + Mellitrón (56 mg/kg)

\*,  $p < 0.05$ , con respecto al Control por el análisis estadístico de Tukey.

### 2.4.2 Proteína IRS-1

La figura 15 muestra la expresión de la proteína IRS-1 en ratas Zucker obesas para los grupos control, control-Mellitrón, chaya1 y chaya1-Mellitrón. Similar al caso de IR, no se presentó diferencia estadística significativa en la expresión de esta proteína para ninguno de los tratamientos comparados con el control.

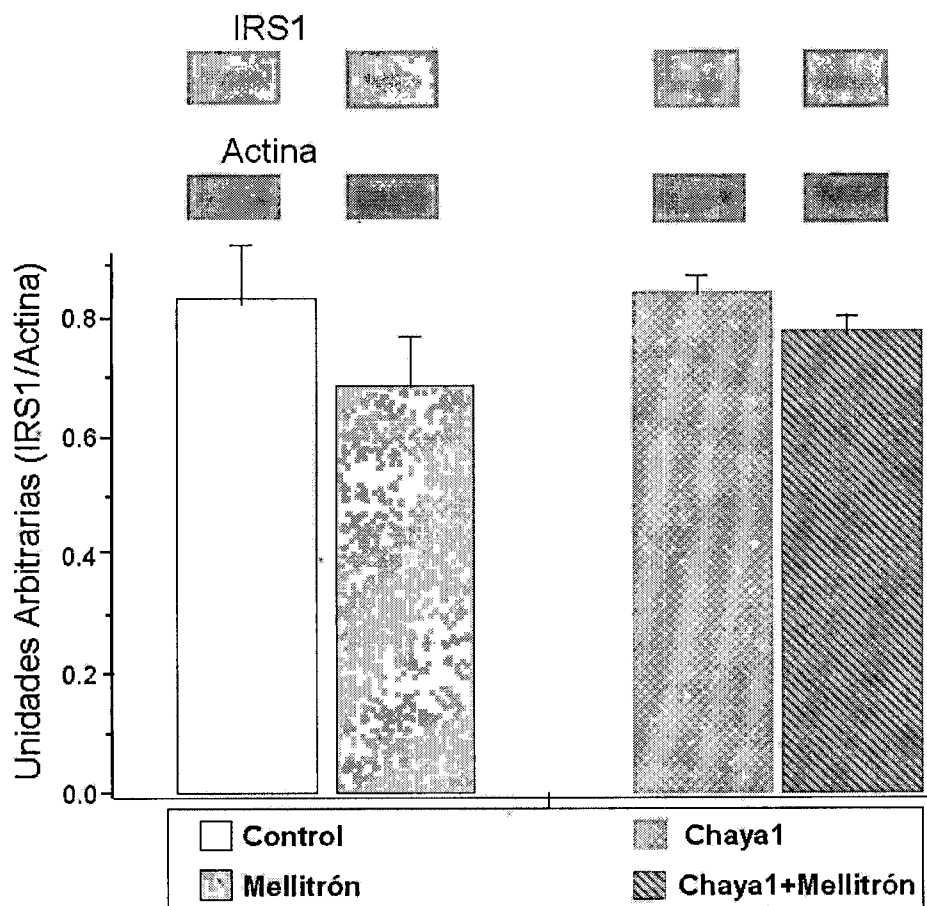


Figura 15. Expresión de IRS-1 en músculo esquelético de ratas ZF. En la parte superior de la figura se muestra un Western-Blot representativo de la expresión de IRS1.

Cada barra está presentada como la media  $\pm$  SEM, n= 2-3.

Control: agua

Mellitrón: agua+ Mellitrón (56 mg/kg)

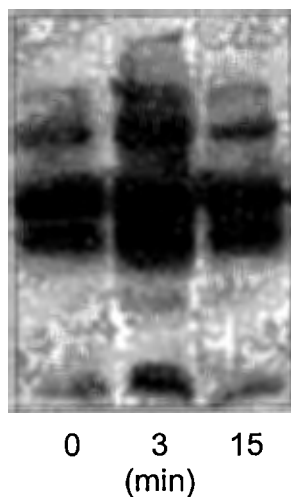
Chaya1: té al 2%

Chaya1+ Mellitrón:té al 2% + Mellitrón (56 mg/kg)

\*,  $p < 0.05$ , con respecto al Control por el análisis estadístico de Tukey.

### 2.4.3 Proteína p-AKT

La actividad de Akt está determinada por su fosforilación en residuos de serina. Dicha fosforilación depende directamente de las fosforilaciones en residuos de tirosina en algunas de las proteínas río arriba de la cascada de transducción de señales de la insulina. Por lo tanto, primero se evaluó el tiempo en el cual se muestra la máxima fosforilación de las proteínas en residuos de tirosina (p-Tyr) después de la estimulación externa con insulina. Para tal motivo, los animales se anestesiaron y posteriormente se les inyectó insulina (10 U/kg) vía punción cardiaca y se procedió a la toma de muestra de músculo a los 0, 3 y 15 minutos. En base a estos resultados se observó un nivel mayor de fosforilación de p-Tyr a los 3 minutos (figura 16).



#### CONTROLES

Figura 16. La figura muestra un Western-Blot representativo de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, estimuladas con insulina en músculo esquelético de ratas ZF a diferentes tiempos.

Tomando en cuenta que a los 3 minutos posteriores del estímulo con insulina se observó el mayor número de fosforilaciones en residuos p-Tyr, se infiere que una mayor cantidad de las proteínas IR e IRS-1 han sido fosforiladas en dichos residuos y con ello activadas, lo cual conduce a la activación río abajo de la proteína Akt

dentro de la vía de señalización de la insulina. Considerando lo anterior, las muestras de tejido muscular extraídas a los 3 minutos fueron usadas para el análisis de la actividad de Akt.

En la figura 17 se muestra la actividad de la proteína p-Akt en el músculo esquelético de las ratas Zucker obesas bajo los diferentes tratamientos. Como se puede observar, no se registró diferencia de actividad en los grupos tratados comparados con el grupo control.

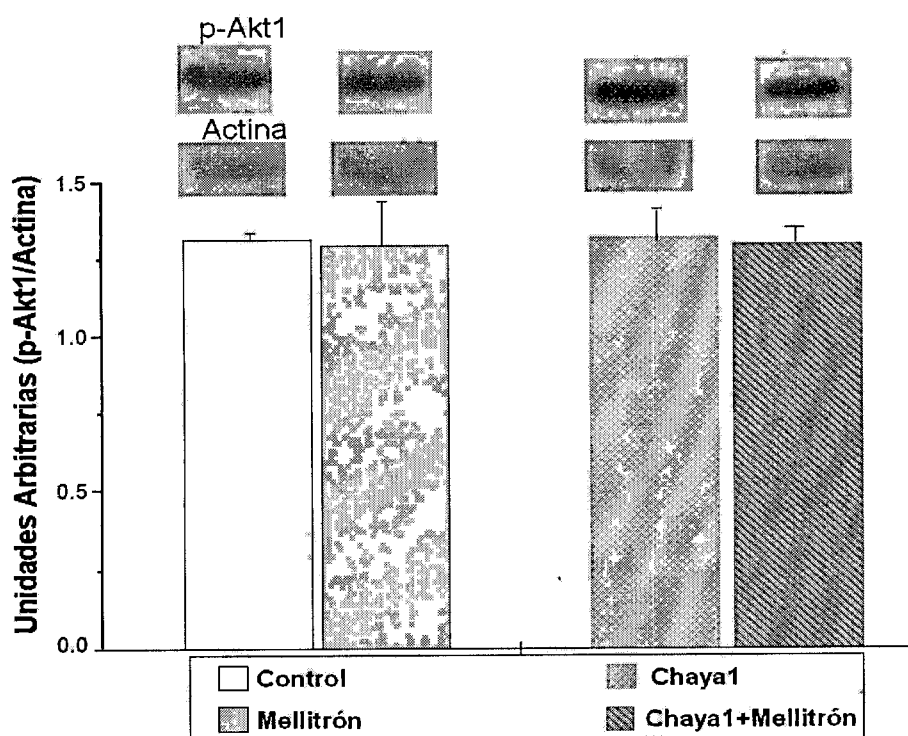


Figura 17. Actividad de p-Akt 1 en músculo esquelético de ratas ZF.

En la parte superior de la figura se muestra un Western-Blot representativo de la actividad de Akt1.

Cada barra está presentada como la media  $\pm$  SEM, n = 2-3.

Control: agua

Mellitrón: agua+ Mellitrón (56 mg/kg)

Chaya1: té al 2%

Chaya1+ Mellitrón: té al 2% + Mellitrón (56 mg/kg)

\*,  $p < 0.05$ , con respecto al Control por el análisis estadístico de Tukey.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este proyecto muestran que durante la Fase I el té de chaya 1 (trilobulada) afectó el peso corporal de los animales después de 5 semanas de tratamiento, no así para el caso de la chaya 2 (pentalobulada). Estos resultados podrían atribuirse a la composición proximal de la hoja, ya que estudios realizados por Ventura y col. (2004) demuestran que el té de la chaya trilobulada contiene mayor concentración de ciertos nutrientes, lo cual podría influir en un mayor aporte energético y como consecuencia una mayor ganancia de peso en los animales. Sin embargo, otros factores no considerados en el presente estudio pudieran afectar el peso de estos animales.

La determinación del nivel de glucemia en sangre bajo la condición de ayuno fue el parámetro indicador del desarrollo de la diabetes tipo II y del efecto del tratamiento sobre esta patología. Los resultados obtenidos con el tratamiento *ad libitum* del té de chaya al 1% durante 11 días, demostraron que esta concentración no fue suficiente para producir un efecto hipoglucémico en las ratas Zucker obesas, contrario al estudio realizado por Kuti y Torres (1996) en conejos diabéticos inducidos con STZ.

Esta diferencia puede atribuirse a las diferentes variedades de hoja utilizadas en ambos estudios, así como al modelo experimental empleado. En el presente se emplearon las ratas Zucker obesas, representativas de la diabetes tipo II por la insulinoresistencia que desarrollan, a diferencia de los conejos tratados con STZ, en los cuales el fármaco al destruir parcial ó totalmente las células  $\beta$  del páncreas genera una baja o nula producción de insulina, manifestando entoces deficiencia en la secreción de la hormona. Por lo tanto, se puede sugerir que en los conejos tratados con STZ la chaya pudiera actuar como estimulador de la secreción de la insulina en las células  $\beta$  funcionales, compensando de esta forma la deficiencia secretora. Asimismo, la chaya pudiera actuar de forma similar en las ratas Zucker. Sin embargo, en estos animales hiperinsulinémicos un incremento en la secreción de insulina no causaría mayor efecto, ya que la mayor alteración de estos animales

está a nivel de la cascada de transducción de la insulina en tejidos dependientes de esta hormona.

Las ratas Zucker mostraron hiperglicemia (en estado de ayuno) después de la semana 12 (180 mg/dl). La hiperglicemia en ayuno presentada por los animales concuerda con lo reportado por otros autores, donde animales de 12 semanas y 13 semanas de edad mostraron niveles 176 mg/dl y 188 mg/dl respectivamente (Pederson y col. 1998; Qu y col. 1999).

Es importante señalar que el efecto hipoglucémico causado por el té al 2% sólo se observó durante el inicio del tratamiento, lo que coincidió con el periodo de desarrollo de hiperglicemia en los animales, por lo que se puede sugerir que la chaya produce una resistencia a dicho estado. Una vez estabilizados los niveles de glucosa, los animales tratados con chaya muestran un comportamiento similar al control, por lo tanto el animal parece presentar una tolerancia a la acción de la chaya.

Los resultados derivados de la curva de tolerancia a la glucosa por vía oral, muestran que los niveles de glucosa alcanzados en el pico hiperglicémico fueron superiores al 200% respecto a los valores iniciales, además de presentar un desfaseamiento. Con esto se resume que a las 15 semanas de vida los animales ya mostraban hiperglicemia en ayuno, presentando la pérdida de la primer fase de secreción de la insulina. Lo anterior, a su vez originó un desfaseamiento en la secreción de la hormona y producto de ello es la intolerancia a la glucosa observada a través de la hiperglicemia postprandial, la cual se mantuvo arriba del 150% dos horas después de iniciada la prueba.

Los resultados obtenidos en esta prueba son similares a los de Alarcón-Aguilar y col. (1998). Estos autores realizaron una curva de tolerancia a la glucosa en conejos normoglicémicos mediante la administración subcutánea del carbohidrato e intragástrica del té de chaya *Cnidioscolus multilobus* (4 ml/kg de peso corporal). Sus resultados muestran que dicho tratamiento no disminuyó el pico hiperglicémico,

obteniendo además desfasamiento en el tiempo en que se alcanzó dicho punto y, en promedio, el nivel de glicemia fue mayor al obtenido por el grupo control que recibió agua. Sin embargo, debido a que en nuestro estudio la glucosa fue administrada por vía gástrica se puede sugerir que la chaya no tiene efectos en la disminución de la absorción de glucosa a nivel gastrointestinal, ni mejora la respuesta a insulina confirmada por las determinaciones en ayuno.

Continuando con la Fase II del proyecto en la cual se evaluó el efecto coadyuvante del té de chaya con el fármaco Mellitrón, se encontró que después de cinco semanas de tratamiento los animales presentaron un adecuado crecimiento. Sin embargo, el que la chaya pentalobulada haya producido una ganancia de peso significativamente mayor en estos animales, pudiera deberse a otros factores no considerados en el presente estudio.

El tratamiento combinado de chaya con Mellitrón fue el que indujo una mayor respuesta en los niveles de glucosa en sangre en los animales comparado con los tratamientos con fármaco o té de forma independiente.

La acción del Mellitrón, cuyo constituyente principal es la Metformina, produce una mejora en la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos en condiciones de insulinoresistencia e hiperglicemia, esto trae como consecuencia una disminución de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, dicho efecto no se observó en este estudio, sugiriendo que la dosis administrada del fármaco distribuida a lo largo del día en el agua de consumo, no fue suficiente para ejercer su acción hipoglucémica. De tal forma que es importante considerar la vía y la dosis administrada en este tipo de estudios.

En el siguiente parámetro estudiado, el té de ambos tipos de chayas redujo significativamente los niveles los triglicéridos en plasma, de aunque dicho efecto fue superado por el fármaco Mellitrón. A este respecto, la Metformina puede disminuir el proceso de lipólisis en el tejido adiposo, mejorando los niveles de glicemia en sangre. Debido a que el tratamiento combinado de la chaya con

Mellitrón mostró un efecto similar al logrado únicamente con el tratamiento del té y, no superó el efecto logrado por el tratamiento único del Mellitrón, se sugiere que la chaya puede alterar la acción del Mellitrón, mediante la modificación de su actividad antilipolítica.

Al extrapolar estos resultados con el tratamiento en humanos obesos insulinoresistentes, es posible inferir que el paciente que se encuentra bajo la terapia del Mellitrón no presentará mayor ventaja en adicionar a su terapia farmacológica la ingesta del té de chaya para el control de los triglicéridos en plasma.

La disminución de los niveles de triglicéridos correlacionan con una mejora en la respuesta a la insulina, la cual no sólo regula el transporte de glucosa, sino también el metabolismo de otros componentes. En base a lo anterior se decidió evaluar el efecto del té de chaya sobre una mejora de la respuesta a insulina, mediante la determinación de algunas proteínas que participan en la cascada de señalización en el tejido muscular *in vivo*. Los resultados del presente estudio muestran que el tratamiento con el té de la chaya trilobulada no incrementa la expresión de las proteínas IR, IRS-1 y la actividad de Akt, no se vio incrementada al comparadas con el grupo control. Por lo tanto, la administración *ad libitum* del té durante 10 semanas no produjo un efecto compensatorio sobre el incremento en la expresión de estas proteínas frente al estado insulinoresistente. Asimismo, se observó que el tratamiento con Mellitrón tampoco incrementó la expresión de éstas proteínas, y que el efecto coadyuvante del té con éste fármaco de igual forma no ejerció efecto alguno. Es posible que el Mellitrón no tenga la capacidad de incrementar la expresión de IR e IRS-1, ya que la literatura reporta que la Metformina, el constituyente principal, puede incrementar la actividad cinasa de IR pero no su expresión en el tejido muscular (DeFronzo, 1999; Kirpichnikov y col., 2002 ). Cabe añadir que Akt es regulada a nivel de expresión y activación por otras vías, a través de factores de crecimiento, del factor de necrosis tumoral o de forma independiente por la fibronectina, las cuales activan diferentes procesos, tales como el



crecimiento, proliferación, supervivencia y apoptosis celulares (Cheng y col., 2002), las cuales no fueron evaluadas en el presente estudio.

En base a los resultados del presente estudio se sugiere que la baja respuesta de los animales ante el tratamiento de la chaya pudiera deberse a que a través de la administración *ad libitum* del té, los compuestos responsables de la actividad "anti-diabética" de las hojas no alcanzaron. Lo anterior trajo como consecuencia una baja estimulación a nivel periférico en el aumento de la captación de glucosa por el músculo y la supresión del proceso de gluconeogénesis en hígado que, no mejoró la sensibilidad en los tejidos periféricos.

Por otro lado, para descartar la problemática del método de administración, se sugiere el empleo de cánulas para la realización de estudios científicos que caractericen los mecanismos de acción de ésta y otras plantas, tal y como lo reportan Andrade-Cetto y Wiedenfeld (2001) y Kamalakkanan y col. (2003). Lo anterior asegurará que la dosis sea depositada directamente en la cavidad gástrica y, posterior a su absorción, se pueda alcanzar la concentración farmacológica efectiva.

## CONCLUSIONES

El té de chaya de las dos variedades de hojas utilizadas, trilobulada (chaya1) y pentalobulada (chaya2) administrado *ad libitum* a una concentración del 2%, causó un incremento de peso en las ratas Zucker obesas después de cinco semanas de tratamiento con respecto al grupo que recibió solamente agua.

El tratamiento al 1% con el té de chaya trilobulada y pentalobulada no produjo efecto hipoglucémico en las ratas Zucker obesas durante 11 días de tratamiento. La administración del té al 2% disminuyó el estado hiperglicémico en un 17% y 28% para la chaya trilobulada y pentalobulada, respectivamente, sólo al inicio del tratamiento.

En la curva de tolerancia a la glucosa, después de 35 días de tratamiento con el té (11 días al 1% y 24 días al 2%) ambas hojas de chaya no presentaron efecto antihiperglicémico.

El tratamiento combinado de té de chaya trilobulada-Mellitrón (17 mg/kg) produjo un efecto hipoglucémico del 20% después de 13 días de este tratamiento. Asimismo, sólo se presentó una disminución del 27% en los niveles de glucosa después de dos días del incremento en la concentración del Mellitrón (56 mg/kg).

El tratamiento combinado del té de chaya pentalobulada – Mellitrón, mostró una tendencia no estadísticamente significativa en la disminución en los niveles de glucosa en sangre.

Los tés de chaya trilobulada y pentalobulada, así como el Mellitrón, produjeron un decremento significativo en los niveles de triglicéridos en un 30%, 40% y 58% respectivamente, comparados con el grupo control. El tratamiento combinado de ambos tés de chaya y Mellitrón durante cinco semanas no alcanzaron el efecto antilipolítico observado para el Mellitrón.

En el músculo esquelético insulinoresistente de las ratas Zucker obesas, el té de chaya trilobulada, el Mellitrón y la combinación de chaya trilobulada - Mellitrón no incrementaron la expresión de las proteínas IR e IRS-1 en la cascada de transducción de señales de la insulina.

La máxima fosforilación en los residuos de tirosina del músculo esquelético abdominal se produjo a los 3 minutos de la punción cardíaca con insulina (10 U/kg).

Asimismo, el té de chaya trilobulada, Mellitrón y la combinación de chaya trilobulada - Mellitrón no incrementaron la actividad de Akt.

Los resultados derivados del presente estudio indican que el té de chaya a la concentración del 2% modula particularmente la hiperglicemia a corto plazo, sin producir actividad antihiperglicémica. A largo plazo, el té de chaya no modifica la expresión de proteínas que participan en la cascada de transducción de señales de la insulina (IR, IRS-1 y Akt). Sin embargo, el té de chaya sí disminuye los niveles de triglicéridos, lo que puede conducir a la mejora del estado insulinoresistente propio de este modelo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón-Aguilara, F.J., Roman-Ramos, R., Pérez-Gutiérrez, S., Aguilar-Conteras, A., Contreras-Weber, C.C. y Flores-Saenz, J.L. 1998.** Study of anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *Journal of Ethnopharmacology*:61:101-110.
- Andrade-Cetto, A. and Wiedenfeld, H. 2001.** Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* :78:145-149.
- Bray, G. 1977.** The Zucker-fatty rat: a review. *Federation Proc.*:36:148-153.
- Cheng, J.Q., Jiang, X., Fraser, M., Li, M., Dan, H. C. Sun, M. and Tsang, B.K. 2002.** Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug Resistance Updates*:5:131-146.
- Cruz, M., Velasco, E. y Kumate, J. 2001.** Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa. *Gac. Méd. Méx.*:137:135-146.
- DeFronzo, R. A. 1999.** Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.*:131: 281 – 303.
- Diccionario de especialidades farmacéuticas. 2003.** 49 ed. Thomson PLM. México. [www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/9347.htm](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm/mex/productos/9347.htm)
- Furnsinn, C., Komjati, M., Madsen, O.D., Schenider, B. And Waldhausl, W. 1991.** Lifelong sequential changes in glucose tolerance and insulin secretion in genetically obese Zucker rats (fa/fa) fed a diabetogenic diet. *Endocrinology*:128(2):1093-9.

- Galetic, I., Andjelkovic, M., Meier, R., Brodbeck, D., Park, J. and Hemmings, B. 1999.** Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase. Significance for diabetes and cancer. *Pharmacol. Ther.*:82:409-425.
- Ganong, W. 1994.** Fisiología Médica. 9na. Ed. Manual Moderno, México D.F.:359-375.
- Gastaldelli, A., Miyazaki, Y., Pettiti, M., Buzzigoli, E., Mahankali, S. Ferrannini, E. and DeFronzo, R.A. 2004.** Separate contribution of diabetes, total fat mass, and fat topography to glucose production, gluconeogenesis and glycogenolysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*:89(9):3914-21.
- Giannarelli, R., Aragona, M., Coppelli, A. And Del Prato., S. 2003.** Reducing insulin resistance with metformin:the evidance today. *Diabetes Metab.*:29:6S28-35.
- Giorgino, F., Chen, J.H. and Smith, R.J. 1992.** Changes in Tyrosine Phosphorylation of Insulin Receptors and a 170,000 Molecular Weight Nonreceptor Protein in Vivo in Skeletal Muscle of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Effects of Insulin and Glucose. *Endocrinology*:130:1433-1444.
- Goodman. 1996.** Las bases químicas de la terapéutica. 9na. ed. Mc Graw Hill Interamericana, México:1581-1607.
- Goldstein, B. 2002.** Insulin Resistance as the Core Deferct in Type 2 Diabetes Mellitus. *Am. J. Cardiol.*:90 (suppl):3G-10G.

- Guglielmo, G.M., Drake, P.G., Baass, P.C., Authier, F., Posner, B. I. and Bergeron, J.M. 1998.** Insulin receptor internalization and signalling. *Mol. and Cell. Biochem.*: 182:59-63.
- Guyton, A.C. and Hall, J.E. 2001.** Décima ed. Mc Graw Hill Interamericana, México: 967-973, 1063-1078.
- Huerta, C. 2002.** [www. conabio. gob. mx/institucion /conabio\\_ espanol /doctos/huerta.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/huerta.html).
- Ionescu, E., Sauter, J. and Jeanrenaud, B. 1985.** Abnormal oral glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. *Am. J. Physiol.* :248: E500-E506.
- Kahn, B.B., 1998.** Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to Compensate for Insulin Resistance. *Cell.*:92:593-594.
- Kamalakkanan, N., Rajadurai, M., and Prince, S.M. 2003.** Effect of Aegle marmelos Fruits on Normal and Streptozotocin-Diabetic Wistar Rats. *Journal of Medicinal Food*:6:93-97.
- Kawa, J.M., Przybylski, R. and Taylor, C.G. 2003.** Urinary chiro-inositol and myo-inositol excretion is elevated in the diabetic db/db mouse and streptozotocin diabetic rat. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*:228:907-914.
- Kim, Y.B., Peroni, O.D., Franke, T.F. and Kahn, B.B. 2000.** Divergent Regulation of Akt1 and Akt2 Isoforms in Insulin Target Tissues of Obese Zucker Rats. *Diabetes*:49:847-856.

- Kirpichnikov, D., McFarlane, S. and Sowers, J. 2002.** Metformin: An Update. *Ann. Intern. Med.*:137: 25-33.
- Krook, A., Roth, R., Jian, X., Zierath, J. and Wallberg, H. 1998.** Insulin-stimulated Akt Kinase Activity Is Reduced in Skeletal Muscle From NIDDM Subjects. *Diabetes*:47:1281-1286.
- Krook, A., Bjornholm, M., Galuska, D., Jiang, X. J., Fahlman, R., Myesrs, M. G., Wallberg-Harriksson, H. and Zierath, J. R. 2000.** Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes*:49:284-292.
- Kuhlmann, J., Newmann-Haefelin, C., Belz, U., Kalish, J., Juretschke, H.P., Stein, M., Kleinschmidt, E., Kramer, W. and Herling, A.W. 2003.** Intramyocellular Lipid and Insulin Resistance. A longitudinal in vivo H-Spectroscopy study in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Diabetes*: 52:138-144.
- Kuri, M.P. 2001.** La Diabetes en México. Investigación y Desarrollo. *Periodismo de Ciencia y Tecnología*: 20: 1-15.
- Kuti, J.O. and Torres, E. 1996.** Potential nutritional and health benefits of tree spinach. *ASHS Press.*: 516-520.
- Laemmli .1970.** *Nature* :277: 680.
- Le Roith, D. and Zick, Y. 2001.** Recent Advances in Our Understanding of Insulin Action and Insulin Resistance. *Diabetes Care*:24:588-597.

- Li, G., Mobbs, C.V. and Scarpace, P.J. 2003.** Central Pro-opiomelanocortin Gene Delivery Results in Hypophagia, Reduced Visceral Adiposity, and Improved Insulin Sensitivity in Genetically Obese Zucker Rats. *Diabetes* :52:1951–1957.
- Lienhard, G.E., Slot, J.W., James, D.E. and Mueckler, M.M. 1992.** How cells absorb glucose. *Sci Am.* :266:86-91.
- Liu, Y.Q., Jetton, T.L. and Leahy, J.L. 2002.**  $\beta$  cell Adaptation to Insulin Resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle in islets of nondiabetic Zucker Fatty Rats. *The Journal of Biological Chemistry*:277:39163-39168.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Mathews, C.K. y Holde, V.K.E.1998.** Bioquímica. 2da. ed. Mc Graw Hill Interamericana, España:158, 911-912.
- Molina, A., Curley, L.M. and Bressani, R. 1997.** Redescubriendo el valor nutritivo de la chaya (*Cnidoscolus acontifolius*; Euphorbiaceae). *Ciencia en Acción*:3:1-4.
- Mueckler, M. 1990.** Family of Glucose-Transporter Genes. Implications for Glucose Homeostasis and Diabetes. *Diabetes*:39:6-11.
- Pedersen, O., Kahn, C.R. and Kahn, B.B. 1992.** Divergent Regulation of the Glut 1 and Glut 4 Glucose Transporters in Isolated Adipocytes from Zucker Rats. *J. Clin. Invest.*:89:1964-1973.



- Pederson, R.A., White, H.A., Schlenzing, D., Pauly, R.P., McIntosh, C.H. and Demuth, H.U. 1998.** Improved Oral Glucose Tolerance in Zucker Fatty Rats by Oral Administration of the Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Isoleucine Thiazolidine. *Diabetes*:47:1253-1258.
- Petersen, K.F. and Shulman, G.I. 2002.** Pathogenesis of Skeletal Muscle Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Am. J. Cardiollogy*:90(suppl):11G-18G.
- Peterson, R., Shaw, W., Neel, M., Little, L. and Eichberg, J. 1990.** Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *ILAR Journal*.: 32:3.
- Pick, A., Clark, J., Kubstrup, C., Levisetti, M., Pugh, W., Bonner-Weir, S. and Polonsky, S. 1998.** Role of Apoptosis in Failure of  $\beta$ -Cell Mass Compensation for Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Defects in the Male Zucker Diabetic Fatty Rat. *Diabetes*:47:358-364.
- Qu, X., Seale, J.P. and Donnelly, R. 1999.** Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats- effects of feeding. *Journal of Endocrinology*: 162: 207-214.
- Robbins, S.L. 1985.** Pathologic Basis of Disease. 3rd ed. Saunders, U.S.A. 912-985.
- Roche, E. 2003.** Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *Ars. Pharmaceutica*.:44:313-332.

- Rodríguez, S.J. 2004.** Guía Mexicana de la Diabetes. Federación Mexicana de la Diabetes. *Grupo Roche Syntex de México*:3-4.
- Ross, I. J. and Molina, C.A. 2002.** The ethnobotany of chaya (*Cnidoscolus acontifolius ssp. acontifolius* Breckon): a nutritious maya vegetable. *Economyc Botany*::56:350-365.
- Saengsirisuwan, V., Kinnick, V.T., Schmit, M.B. and Henriksen, E.J. 2001.** Interactions of exercise training and lipoic acid on skeletal muscle glucose transport in obese Zucker rats. *J Appl Physiol*::91: 145–153.
- Sanger, F. 1959.** Chemistry of Insulin. *Science*:129:p1340-1344, [www.prolune.org/images/insulin.gif](http://www.prolune.org/images/insulin.gif).
- Sanger. 2003.** Signal transduction insulin. Sanger institute, [www.sanger.ac.uk/PostGenomics/signaltransduction/insulin/gfx/pathways/glut4](http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/signaltransduction/insulin/gfx/pathways/glut4)
- Song, S., Andrikopoulos, S., Fillips, C., Thornburn, A., Khan, D. and Proietto, J. 2001.** Mechanism of fat-induced hepatic gluconenesis: effect of metformin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*::281:E275-E282.
- Stolar, M.W. 2002.** Insulin resistance, diabetes, and adipocyte. *Am. J. Health Syst. Pharm*::59(S):3-8.
- Storz, P., Döpler, H., Werning, A., Pfizenmaier, K. and Müller, G. 1999.** Cross-talk mechanisms in the development of insulin resistance of skeletal muscle cells. *Eur. J. Biochem*::266:17-25.

**Szayna, M., Doyle, M., Betkey, J., Holloway, H., Spencer, R., Greig, N. and Egan, J. 2000.** Excendin-4 Decelerates Food Intake, Weight Gain, and Fat Deposition in Zucker Rats. *Endocrinology*:141:1936-1941.

**Ventura, R.I. 2004 .** Evaluación Nutritional y Nutracéutica de la hija de Chaya (*Cnidocolus chayamansa*). Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Programa de Posgrado en alimentos del Centro de la República. Para obtener el grado de Maestría: 7, 12, 16-20, 49-56, 78-79.

**Virkamäki, A., Ueki K., and Kahn, C.R., 1999.** Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.*:103: 931-943.

**White, M.F. and Kahn, C.R. 1994.** The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.*:269:1-4.

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

## ANEXOS

### 1. Glucosa al 70% para la prueba de tolerancia a la glucosa

Glucosa 70 g

Aforar con agua destilada a 100 ml

### 2. Buffer para Homogenizar las muestras

para 20 ml

Hepes	50 mM	2.0 ml
NaCl	150 mM	2.0 ml
NaPP	10 mM	2.0 ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> **	2 mM	200 µl
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	2.0 ml
CaCl <sub>2</sub> *	1 mM	800 µl
NaF	10 mM	2.0 ml
EDTA	2 mM	2.0 ml
PMSF	2 mM	600 µl
Leupeptina	5 µg/dL	50.0 µl
NP <sub>40</sub>	1%	200 µl
Glicerol	10%	2.0 ml
Agua destilada		4.15 ml

\* Prepararlo con bastante agitación, y adicionarlo gota a gota

\*\* Adicionarlo en este orden ya que este reactivo es un inhibidor

NOTA: para hacer este reactivo se debe realizar en este orden y agregar los reactivos gota a gota para que no haya precipitado, cuando esto ocurra, este buffer ya no servirá. El buffer para homogenización se debe realizar el día que se va a usar. Todos los reactivos deben estar en hielo mientras se prepara el buffer.

### 3. Técnica de cuantificación de proteínas por el Método de Lowry

#### A. Curva de Calibración

- **Solución Stock 1mg/ml de albúmina**

Albúmina                    10 mg

Aforar con 10 ml de agua destilada

- **Solución A**

NaHCO<sub>3</sub>                    10 g

NaOH                        2.0 g

Tartrato de Na            0.134 g

Tartrato de K             0.179 g

Aforar con agua destilada a 50.0 ml

- **Solución B**

CuSO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O            0.5 g

Aforar con agua destilada a 100 ml

- **Solución C**

50 partes de A más 1 parte de reactivo B

Nota: debe prepararse al momento de usarse

- **Reactivo de Folin**

Diluir el reactivo de Folin 1:1

Mezclar de 5 – 15 segundos

Nota: debe prepararse el día que se va a usar

#### 4. Soluciones para Electroforesis

##### A. Gel separador al 7%

	Para 15 ml
Acrilamida 30% - bis ( 0.938%)	3.50 ml
Tris 3M – HCl 1M – SDS 0.3%	5.00 ml
Glicerol 79.5% (v/v)	2.00 ml
Agua	4.53 ml
Persulfato de amonio 10% <sup>1</sup>	50.0 $\mu$ l
Temed concentrado 4° C	5.00 $\mu$ l

##### B. Gel de condensación

	Para 5 ml
Acrilamida 30% - bis ( 0.938%)	0.60 ml
Tris 3M – HCl 1M – SDS 0.3%	1.50 ml
Agua	3.90 ml
Persulfato de amonio 10% <sup>1</sup>	40.0 $\mu$ l
Temed concentrado 4° C	4.00 $\mu$ l

<sup>1</sup> Indica que este reactivo debe estar congelado y usarlo inmediatamente después de que se descongela.

##### C. Buffer Inferior

Tris (0.2 M)	24.23 g / L
HCl ajustar hasta un pH = 8.9	
Aforar a 1 litro con agua destilada	

##### D. Buffer Superior

Tris 0.1 M	12.10 g
Tricina 0.1 M	17.76 g
SDS 0.1 %	01.00 g
Aforar a 1 litro con agua destilada	

### **E. Solución Digestora para muestras**

SDS 10%	2.5 g
Glicerol 30%	7.5 ml
Tris 100 mM ph = 6.8	2.5 ml
Mercaptoetano 4% <sup>2</sup>	1.0 ml
Azul de Bromofenol 0.02%	0.005 g
Aforar a 25 ml con agua destilada	

### **5. Buffer de transferencia ( pH = 8.3 )**

Tris	3.0 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml
SDS	1.0 g
Aforar a 1 litro con agua destilada	

### **6. Tinción de Membranas con azul de Coomasie**

Azul de Coomasie	0.2%
Ácido acético	7 ml por cada 100 ml

Aforar a 100 ml con metanol al 50%

Tiempo de tinción aproximado 3 minutos

### **A. Desteñir las membranas**

Metanol	80 ml
Ácido acético	10 ml

Aforar con agua destilada a 100 ml

Nota: dejar las membranas con esta solución de 3 - 5 minutos





- Proteína IR
  - Primer anticuerpo 0.5  $\mu$ l por cada 2 ml
  - Segundo anticuerpo (anti-ratón) 1.0  $\mu$ l por cada 2 ml
  
- Proteína Actina
  - Primer anticuerpo 0.2  $\mu$ l por cada 2 ml
  - Segundo anticuerpo (anti-cabra) 1.0  $\mu$ l por cada 2 ml

Nota: los anticuerpos se aforan con la solución de TBS

#### **F. Solución de Quimioluminiscencia**

Reactivo A 15  $\mu$ l por cada 1.5 ml

Reactivo B 1485  $\mu$ l por cada 1.5 ml

Nota: Este reactivo se debe proteger de la luz