

Wendy Monserrat  
Carmen Sandoval

Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe  
(*Acacciella angustissima*) sobre los valores glucémicos en  
un modelo *in vivo* de ratas diabéticas.

2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE MEDICINA.

**Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe  
(*Acacciella angustissima*) sobre los valores  
glucémicos en un modelo *in vivo* de ratas  
diabéticas.**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN INVESTIGACIÓN MÉDICA CON  
LÍNEA TERMINAL EN BIOMEDICINA**

PRESENTA

I.B.Q WENDY MONSERRAT CARMEN SANDOVAL

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.,

NOVIEMBRE 2013.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Investigación Médica con Línea  
Terminal en Biomedicina

**Efecto del consumo de extracto de vainas de timbe (*Acaciella angustissima*) sobre los valores glucémicos en un modelo *in vivo* de ratas diabéticas.**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
**Maestra en Investigación Médica con Línea Terminal en Biomedicina**

**Presenta:**  
I.B.Q Wendy Monserrat Carmen Sandoval

**Dirigido por:**  
Dra. en C. Ana Angélica Feregrino Pérez

**SINDOCALES**

Dra. en C. Ana Angélica Feregrino Pérez  
Presidente

Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreira  
Secretario

Dr. en C. Ricardo Francisco Mercado Curiel  
Vocal

Dra. en C. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea  
Suplente

Dr. en C. Francisco Quintanilla Guerrero  
Suplente

Dr. Javier Ávila Morales  
Director de la Facultad de Medicina

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. en C. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Noviembre, 2013  
México.

## RESUMEN

En la actualidad las complicaciones crónicas de la Diabetes como la nefropatía diabética y la insuficiencia cardiaca, son las principales causas de mortalidad en México, las cuales están estrechamente relacionadas a procesos inflamatorios provenientes del aumento en el estrés oxidativo generado en la diabetes; sin embargo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden ser inactivadas por mecanismos de defensa natural o a través de compuestos antioxidantes presentes en diversos alimentos o fármacos, como el Timbe. Diversos estudios han demostrado las propiedades antioxidantes e hipoglucemiantes de la especie *Acacciella*, a la cual pertenece el Timbe; sin embargo, poco se sabe acerca del efecto que pudiera ejercer sobre algunas complicaciones como el daño renal. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue conocer el efecto hipoglucemiante del extracto metanólico del Timbe (*Acaciella angustissima*) en ratas (Wistar) con hiperglucemia inducida. Para ello, se determinó la concentración de taninos condensados, fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante a los extractos de Timbe, donde el extracto metanólico (EMA) presentó valores 5, 3, 8 y 1.2 veces mayores, respectivamente, comparados con el extracto acuoso (EAA). Para los estudios *in vivo* se trabajó con animales diabéticos inducidos con estreptozotocina 45 mg/kg (con  $\approx$ 250 mg/dl glucosa), los cuales se alimentaron con el EMA incorporada a la dieta a las concentraciones de 25, 50 y 100 mg/kg p.c., cuantificándose semanalmente glucosa sanguínea en ayuno. Al finalizar los tratamientos, se determinó la concentración de insulina, proteína en orina, así como el perfil lipídico (colesterol y triglicéridos totales, HDL y LDL) y la peroxidación lipídica. El consumo de EMA en el tratamiento más alto (100 mg/kg p.c.) produjo un efecto hipoglucemiante e hipolipidémico en ratas diabéticas y un decremento en los marcadores de daño renal como proteína en orina; además de colesterol total, LDL y triglicéridos. Asimismo, se observó que fue capaz de atenuar de manera significativa el aumento en el nivel de TBARS, logrando valores similares al control de ratas sanas. Estos resultados sugieren que el consumo de EMA regula los niveles de glucosa en ratas diabéticas, disminuyendo complicaciones como el daño renal, relacionados con un estado inflamatorio presente en la diabetes.

**(Palabras clave:** Diabetes, Estrés oxidativo, Antioxidantes, *Acacciella angustissima*, Hipoglucemiante, Daño renal, Extracto metanólico.)

## SUMMARY

Currently the chronic complications of diabetes such as diabetic nephropathy and heart failure are the main causes of death in Mexico, which are closely related to inflammatory processes from the increase in oxidative stress generated in diabetes, however, reactive oxygen species (ROS) can be inactivated by natural defense mechanisms or through antioxidant compounds present in various foods or drugs, such as Timbe. Several studies have demonstrated the antioxidant and hypoglycemic of the specie of *Acaciella*, which belongs Timbe, nevertheless, almost nothing is known about the effect it might have on some complications such as kidney damage. Therefore the objective of this study was to determine the hypoglycemic effect of methanol extract of Timbe (*Acaciella angustissima*) in rats (*Wistar*) with induced hyperglycemia. To do this, we determined the concentration of condensed tannins, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity of the extracts of Timbe, where the methanol extract (EMA) showed values 5, 3, 8 and 1.2 times, respectively, compared with the aqueous extract (EAA). For in vivo studies worked with streptozotocin-induced diabetic animals 45 mg / kg (with  $\approx$  250 mg / dl glucose), which were fed with the EMA added to the diet at the concentrations of 25, 50 and 100 mg / kg b.w., quantified weekly fasting blood glucose. At the end of treatments, the concentration of insulin, urine protein and lipid profile (total cholesterol and triglycerides, HDL and LDL) and lipid peroxidation. EMA consumption in the highest treatment (100 mg / kg b.w.) produced a hypoglycemic and hypolipidemic effects in diabetic rats and a decrease in markers of kidney damage such as protein in urine, in addition to total cholesterol, LDL and triglycerides. Also, it was observed that was able to significantly attenuate the increase in the level of TBARS, obtaining similar values to control healthy rats. These results suggest that the use of EMA controlling glucose levels in diabetic rats, reducing kidney damage associated with an inflammatory condition present in diabetes.

**(Key words:** Diabetes, Oxidative Stress, Antioxidants, *Acaciella angustissima*, Hypoglycemic, Kidney damage, Methanol extract.)

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios**

Por ser la luz que me guía y la fuente eterna de sabiduría, bendiciones y amor que me ha permitido concluir una nueva etapa de mi vida.

### **A mi padre**

Por ser un gran hombre y mi motivación a través de los años, el cual me ha enseñado por su ejemplo que la grandeza es para los grandes de espíritu y del cual estoy muy orgullosa de ser su hija. Eres la persona que nunca me dejo “tirar la toalla” por difícil que fuera la situación y que junto con mi madre me dio todo su apoyo, así como una motivación diaria para seguir adelante y porque hoy gracias a ti veo culminada esta etapa, no me queda más que decir mil gracias ¡Jefe te quiero mucho!

### **A mi madre**

Gracias por ser mi madre y amiga, por ser siempre fuerte y apoyarme en la adversidad y en mis decisiones. Me quedo sin palabras de pensarlo porque eres una mujer cautivadora a la cual admiro muchísimo por ser; inteligente, bella y amorosa, de la cual he recibido tanto amor, consejos y la propia vida, ¡Mami te quiero mucho!

### **A mi esposo**

Gracias por ser ese motor que día a día me impulsa a seguir y brindarme tu apoyo en este tiempo que llevamos juntos, por tu abrazo y por compartir conmigo momentos lindos y momentos difíciles que han marcado nuestra vida juntos, por cuidarme y hacerme sentir feliz cuando estoy triste y estresada, gracias de corazón “amor”.

### **A mí adorado hijo ángel**

Por darme la oportunidad de conocer a una persona tan especial como tú, que llena mi vida de amor y cariño, tú eres la bendición que Dios me concedió un día y por el cual luchare el resto de mi existencia para hacer de ti un buen hombre. A ti mi bebe hermoso te dedico esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Al H. Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la oportunidad y el apoyo económico brindado durante éstos dos años de esfuerzo colectivo.

Al Fondo Regional de Ciencia y Tecnología (FORDECYT) proyecto titulado sistema regional de investigación, innovación y desarrollo en biotecnología, farmacología y salud, número de registro 193512.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en la Maestría en Biomedicina.

Agradezco profundamente a mis hermanos Coco y Yonatan, por brindarme su apoyo a lo largo de mi vida, por todas las bromas y regaños que han ayudado a corregirme en todo momento, gracias por estar a mi lado.

A mis sobrinos que han ayudado a endulzarme la vida con tanta risa, por sus travesuras e inocencia, gracias Yoami por esos dibujos tan hermosos eres una niña muy inteligente y amable, gracias Tavin por hacerme reír con tu palabra tan peculiar de “tan solo soy un niño”, gracias Emiliano por mostrar tu inocencia con tan solo una mirada.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez le agradezco haber creído en mí aún en momentos adversos, por su apoyo personal y profesional, por brindarme sus conocimientos aun cuando tuviera su agenda ocupada. Gracias por sus clases, por su paciencia, por su apoyo, por las pláticas que tuvimos... pero sobre todo, por ser una buena amiga.

A mis sinodales, la Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea, el Dr. Ricardo Francisco Mercado Curiel, Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreira y el Dr. Francisco Quintanilla Guerrero, por las aportaciones a ésta tesis.

A la Dra. Consuelo Lomas Soria por su amabilidad, tiempo y paciencia que demostró a mí y a este proyecto, que sin su ayuda no hubiera sido posible. Gracias por estar conmigo.

Al Dr. Ramón Gerardo Guevara Gonzales por darnos la iniciativa en este proyecto y jamás abandonarnos en el proceso, gracias por la paciencia brindada y las aportaciones a ésta tesis.

Les agradezco a mis amigos por brindarme su apoyo incondicional. A Gloria, Nancy, Laliz, Victoria, Carlos duarte. Gracias porque de ustedes aprendí mucho☺.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iii</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1. Diabetes mellitus .....	3
2.1.1. Epidemiología .....	3
2.1.2. Clasificación.....	4
2.1.2.1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1).....	5
2.1.2.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2).....	5
2.1.3. Criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus .....	5
2.1.4. Causas de la diabetes mellitus .....	6
2.1.5. Insulina.....	7
2.1.6. Mecanismos de acción de la insulina.....	7
2.1.7. Complicaciones de la diabetes mellitus .....	8
2.1.7.1. Daños microvasculares .....	8
2.1.7.2. Daños macrovasculares .....	8
2.1.8. Diabetes y estrés oxidativo .....	9
2.1.9. Inflamación en la diabetes mellitus. ....	11
2.1.10. Estrategias para el tratamiento de la diabetes mellitus.....	13
2.1.10.1. Tratamiento no farmacológico. ....	13
2.1.10.2. Tratamiento farmacológico de la DM1 y la DM2.....	14

2.2. Compuestos bioactivos en plantas.....	14
2.2.1. Compuestos fenólicos en el género acacia.....	17
2.2.2. Timbe ( <i>Acacciella angustissima</i> ) y su capacidad antioxidante.....	19
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>20</b>
3.1 Materiales .....	20
3.1.1. Material biológico .....	20
3.1.2. Material químico.....	20
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Elaboración del extracto de vaina de timbe ( <i>Acacciella Angustissima</i> )....	21
3.2.2. Extracción de compuestos fenólicos.....	21
3.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos y determinación de la capacidad antioxidante.....	22
3.2.3.1. Cuantificación de fenoles totales .....	22
3.2.3.2. Cuantificación de taninos condensados .....	22
3.2.3.3. Cuantificación de flavonoides totales.....	23
3.2.3.4. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de timbe empleando la técnica de ABTS.....	23
3.2.3.5. Determinación de la capacidad antioxidante del timbe empleando la técnica de DPPH.....	24
3.3. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	25
3.3.1. Inducción de diabetes .....	25
3.3.2. Grupos de estudio.....	25
3.3.3. Determinaciones Semanales .....	26
3.3.3.1. Determinación de glucosa .....	26
3.3.3.2. Determinación de peso.....	27
3.3.3.3. Determinación de consumo de agua .....	27

3.3.3.4.	Determinación de consumo de alimento.....	27
3.3.4.	Sacrificio y obtención de muestras .....	27
3.3.5.	Determinaciones post- sacrificio .....	28
3.3.6.	Determinación de la concentración de insulina.....	28
3.3.7.	Determinación de perfil lipídico .....	28
3.3.8.	Recolección y determinación de proteína en orina .....	28
3.3.9.	Peso relativo de riñones en ratas diabéticas y sanas. ....	29
3.3.10.	Determinación de la depuración de creatinina.....	29
3.3.11.	Peroxidación lipídica.....	29
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>30</b>
4.1.	Evaluación <i>in vitro</i> del extracto de Timbe ( <i>Acacciella angustissima</i> ).....	30
4.1.1.	Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de Timbe ( <i>Acacciella angustissima</i> ).....	30
4.1.2.	Cuantificación de la capacidad antioxidante del extracto de Timbe ( <i>Acacciella angustissima</i> ).....	31
4.2.	Evaluación <i>in vivo</i> del extracto de Timbe ( <i>Acacciella angustissima</i> ) .....	32
4.2.1.	Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre los niveles de glucosa en sangre de ratas wistar sanas y diabéticas .....	32
4.2.2.	Efecto del consumo de vaina de Timbe sobre el peso corporal de ratas wistar sanas y diabéticas.....	34
4.2.3.	Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre el agua consumida en ratas wistar sanas y diabéticas.....	35
4.2.4.	Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la ingesta de alimento en ratas wistar sanas y diabéticas.....	37
4.2.5.	Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre los niveles de insulina sérica en ratas wistar sanas y diabéticas. ....	39

4.2.6. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre el perfil de lípidos en ratas wistar sanas y diabéticas. ....	40
4.2.7. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre el peso relativo de los riñones en ratas wistar sanas y diabéticas. ....	43
4.2.8. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la concentración de proteína en la orina de ratas wistar sanas y diabéticas. ....	44
4.2.9. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la depuración de creatinina en ratas wistar sanas y diabéticas. ....	46
4.2.10. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la peroxidación lipídica en ratas wistar sanas y diabéticas. ....	47
<b>5. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>50</b>
<b>6. REFERENCIAS. ....</b>	<b>52</b>
<b>7. ANEXOS. ....</b>	<b>59</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

### CUADRO

1. Principales diferencias entre Diabetes tipo 1 y tipo 2.....	4
2. Tipo de complicaciones presentes en la diabetes.....	9
3. Grupos experimentales para la evaluación del consumo de extracto de Timbe en ratas diabéticas. ....	26
4. Concentración de compuestos fenólicos en extractos de Timbe .....	30
5. Cuantificación de la capacidad antioxidante en extractos de Timbe.....	31
6. Concentración del perfil de lípidos de ratas wistar, sanas y diabéticas alimentadas con diferentes concentraciones del extracto de timbe. ....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

### FIGURA

1. Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). .....	10
2. Posibles mecanismos inducidos por la hiperglicemia, debido a la elevada producción de iones superóxido.....	11
3. Activación de NF-kB por diferentes agentes. ....	12
4. Estructura química del fenol.....	15
5. Rutas de síntesis de compuestos fenolicos .....	15
6. Ruta del ácido siquímico .....	16
7. Timbe (Acaciella angustissima).....	19
8. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la glucosa sanguínea incorporado a la dieta de ratas wistar.....	33
9. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre el peso corporal incorporado a la dieta de ratas wistar. ....	35
10. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la ingesta de agua en ratas wistar.....	36
11. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la ingesta de alimento en ratas wistar. ....	38
12. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la concentración de insulina sérica en ratas wistar .....	40
13. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre el peso relativo de los riñones en ratas wistar.....	44
14. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la concentración de proteína en orina de ratas wistar .....	45
15. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la depuración de creatinina en ratas wistar .....	47
16. Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la peroxidación lipídica en ratas wistar.....	49

17. Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario. .... 60

## 1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica degenerativa padecida por millones de personas y que en las últimas décadas ha mostrado un incremento progresivo de su incidencia y prevalencia en todo el mundo, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con este padecimiento, con cifra actual estimada en más de 347 millones de personas con diabetes, en donde de 5 a 10 % de la población puede agruparse en la DM tipo 1, la cual se manifiesta generalmente antes de los 40 años (Hernández-Ávila 2013).

En México representa un problema de salud pública que afecta a todas las clases sociales, principalmente a la población de bajos recursos económicos asentada en las áreas urbanas (Ávila-Curiel y col., 2007).

Las complicaciones crónicas de la diabetes como la nefropatía diabética y la insuficiencia cardíaca, son las principales causas de morbimortalidad en México y representan una sobrecarga para los sistemas de salud, sobre todo al considerar que el 40 % de las personas que padecen esta enfermedad son menores de 40 años, además plantea que 95% del tratamiento de un paciente diabético recae directamente en él (INEGI, 2007). En 2008 casi 3% de los egresos hospitalarios a nivel nacional fueron debidos a la DM (SSA, 2008) porcentaje similar al reportado en 2003, cuando se calculó que los costos directos e indirectos de la enfermedad fueron de 100 millones de dólares anuales (SSA, 2003).

Frente a esta importante situación, actualmente se han desarrollado distintos fármacos orales que se utilizan para el tratamiento de la diabetes; no obstante, en muchos países en vías de desarrollo, la medicina herbolaria sigue teniendo un papel muy importante para la terapia hipoglucemiante, siendo la prevención de la enfermedad la mejor solución para esta situación (Hayes y col., 2007).

Ikarashi y col. En el 2011 señalan a la especie acacia como una buena opción para el tratamiento hipoglucemiante con el fin de mantener y reducir los niveles séricos de

glucosa y colesterol; así mismo, su consumo disminuye las complicaciones relacionadas con la enfermedad. Este último efecto se atribuye a los compuestos fenólicos, productos del metabolismo secundario de las plantas que se caracterizan por poseer al menos un grupo fenol en su estructura molecular, los cuales presentan una alta actividad antioxidante y podrían disminuir el estado de inflamación en órganos diana. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto en el consumo de extracto de vainas de timbe (*Acaciella angustissima*) sobre el valor glucémico en un modelo *in vivo* de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, el cual se logró por medio de la determinación del contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante *in vitro* del extracto de timbe. Mientras que para la evaluación *in vivo* se midió el efecto hipoglucemiante y antilipídémico de tres diferentes concentraciones del extracto de timbe, además de evaluar parámetros bioquímicos de daño renal y estrés oxidativo animales diabéticos.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Diabetes mellitus**

La diabetes mellitus es una enfermedad donde se altera el metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas. Se caracteriza por la presencia de hiperglucemia con valores de glucosa basales superiores a 126 mg/dl ó 7.0 mmol/l, como resultado de un deterioro en la secreción de insulina, en su acción o en ambos, de tendencia progresiva, crónica e irreversible. (American Diabetes Association (ADA), 2010; Islas y Revilla, 2005).

Algunas manifestaciones y síntomas más comunes del padecimiento son: poliuria (excreción excesiva de orina), polidipsia (sed excesiva), pérdida de peso, algunas veces polifagia (ingestión excesiva de alimentos), visión borrosa, disminución de la fuerza muscular, con menor frecuencia somnolencia, cefalea, entre otros (Braunwald y col., 1998).

#### **2.1.1. Epidemiología**

La DM es una de las principales enfermedades crónicas a nivel mundial, reportando una prevalencia en el año 2009, para todos los grupos de edad, de 2.8% para DM (WHO, 2009).

Datos recientes de la Organización Mundial de la Salud calculan que existen 347 millones de pacientes diabéticos alrededor del mundo, siendo los países de bajos y medios ingresos los más afectados (Hernández-Ávila 2013).

Por otra parte México ocupa el sexto lugar de personas con diabetes a nivel mundial con un número de diabéticos que fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones según datos de la Federación Mundial de Diabetes (FMD., 2010). Esta enfermedad afecta directamente a la población productiva mayor de 20 años, predominando en las mujeres con una relación de 11.7: 16.2 y una prevalencia nacional del 8 %. Se ha observado que dicha prevalencia incrementa con la edad, afectando al 20% de la población mayor de 50 años (INEGI., 2010).

### 2.1.2. Clasificación

Existen distintos tipos de DM siendo los más comunes la DM1 y la DM2, Los cuales muestran diferencias entre sí, y algunas de estas diferencias se mencionan en el cuadro 1 (Guyton, 1999).

**Cuadro 1 Principales diferencias entre Diabetes tipo 1 y tipo 2**

	<b>Diabetes Mellitus Tipo 1</b>	<b>Diabetes Mellitus Tipo 2</b>
<b>Edad de inicio</b>	<b>Antes de los 40 años</b>	<b>Después de los 40 años</b>
<b>Tendencia estacional</b>	<b>Otoño e invierno</b>	<b>Ninguna</b>
<b>Antecedentes familiares</b>	<b>Raro</b>	<b>Común</b>
<b>Inicio de síntomas</b>	<b>Aguda o subaguda</b>	<b>Lenta</b>
<b>Cetoacidosis metabólica</b>	<b>Frecuente</b>	<b>Rara</b>
<b>Obesidad</b>	<b>Rara</b>	<b>Común</b>
<b>Insulina</b>	<b>Disminuida o no existe</b>	<b>Variable</b>
<b>Receptores de insulina</b>	<b>Normales</b>	<b>Variable</b>
<b>Remisión clínica</b>	<b>Breve después del tratamiento</b>	<b>Puede ser prolongada</b>
<b>Objetivo de la dieta</b>	<b>Sincronizar la dosis de insulina y la dieta</b>	<b>Reducir de peso, mantener los niveles de glucosa normal y evitar síntomas</b>

(Modificada de Guyton, 1999)

Por otra parte la Organización Mundial de la Salud (OMS) las ha definido de la siguiente manera:

### **2.1.2.1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)**

Este tipo de diabetes anteriormente era conocida como diabetes insulino dependiente o de inicio en la infancia. Se caracteriza por una ausencia en la producción de insulina y es provocada por la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina. Los pacientes de DM1 dependen de inyecciones subcutáneas diarias de insulina para su supervivencia. Esto refleja la severidad de la deficiencia de la insulina, sin la cual, la lipólisis en tejido adiposo se activa incontroladamente, generando altos niveles de ácidos grasos libres los cuales son metabolizados a cuerpos cetónicos en el hígado. Así se produce la cetoacidosis diabética que conlleva al coma y a la muerte del paciente (Bupa's health, 2011; WHO, 2009).

### **2.1.2.2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)**

La DM2 fue conocida anteriormente como diabetes no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta (WHO, 2009). Este tipo de diabetes se da como resultado de una resistencia a la acción de la insulina (ADA, 2010).

En etapas avanzadas, la diabetes tipo 2 se asocia con un aumento en el deterioro de las células  $\beta$  pancreáticas (Bennett y Knowler, 2001) que resultan en una secreción insuficiente de insulina por lo que a largo plazo el paciente con diabetes tipo 2 podría presentar características clínicas similares a la DM1.

### **2.1.3. Criterios de diagnóstico para la diabetes mellitus**

La evolución clínica de la DM varía con el individuo y, en gran medida, depende del tiempo en que se establezca el diagnóstico y se proporcione al paciente el manejo integral del padecimiento (Arreola y Partida, 2005).

Para el diagnóstico de este padecimiento algunos investigadores se han basado en los siguientes criterios, los cuales serán descritos a continuación (WHO, 2009).

- La prueba de elección es la glucemia basal, la cual consiste en la determinación de la Glucemia al azar  $\geq 200$  mg/dl en presencia de síntomas de diabetes.
- Glucemia en ayuno (al menos durante 8 horas)  $\geq 100$  mg/dl.
- Glucemia  $\geq 200$  mg/dl a las dos horas de sobrecarga oral con 75g de glucosa disuelta en agua (2g/kg de peso sin superar los 75g)

En las dos últimas pruebas es necesario comprobar el diagnóstico con una nueva determinación de glucemia en ayuno o sobrecarga oral de glucosa. Cuando los niveles de glucemia de una persona se encuentran alterados pero no alcanzan las cifras diagnosticadas de DM se clasifican en glucemia basal alterada (GBA) con valores entre 100-125 mg/dl según la asociación americana de diabetes. Entran en la categoría de intolerancia a la glucosa (ITG) los pacientes que tienen niveles de 140-199 mg/dl a las dos horas de la prueba de tolerancia a la glucosa oral (ADA, 2010; WHO, 2009).

#### **2.1.4. Causas de la diabetes mellitus**

Los factores relacionados con la ocurrencia de diabetes son aquellos que incrementan (factores de riesgo) o reducen su presencia, En la diabetes, los principales factores de riesgo tienen que ver con la carga genética y con los estilos de vida, por lo tanto, el riesgo genético es necesario pero no suficiente para desarrollar diabetes. Una dieta rica en grasas saturadas y en azúcares simples, así como, el sedentarismo, son condiciones que caracterizan a la población moderna y que se relacionan estrechamente con la presencia de diabetes (Escobedo de la Peña, 2005).

Se ha calculado que más del 90 % de los casos de diabetes pueden atribuirse a estilos de vida de alto riesgo, de forma tal que la mayoría de los casos de diabetes son potencialmente prevenibles. La diabetes también se asocia con la obesidad y la hipertensión arterial (Escobedo de la Peña, 2005).

### **2.1.5. Insulina**

La insulina es una proteína encargada de regular los niveles de glucosa en sangre. Fue descubierta por Banting y Best en 1922 (Meyts, 2000) y su ausencia o resistencia a la misma es el factor causante de la DM. Además, la insulina desempeña un papel importante controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y el almacenaje de combustibles como el glucógeno y los triglicéridos inhibiendo la degradación de estos y estimulando la síntesis y degradación de proteínas. Así mismo, Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas (Flores y cols., 2005).

### **2.1.6. Mecanismos de acción de la insulina.**

El principal efecto de la insulina es regular el transporte de la glucosa, el cual se lleva a cabo por dos vías principales: la translocación del transportador de glucosa tipo 4 (Glut4) de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, por una vía que depende de la activación de PI3K (fosfoinositol 3-quinasa) y de la cinasa Akt (treonina quinasa). Evidencias recientes indican que el tráfico de Glut4 a la membrana plasmática depende de varios mecanismos entre los que se encuentra la participación de la AS160 (sustrato de Akt de 160 KDa). AS160 es una proteína que en su estado no fosfatado y activo regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4, inhibiendo la exocitosis basal del transportador. AS160 cuando es fosfatada por Akt, se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab del transportador GLUT4 a la membrana plasmática (Mc Carthy., 2007).

En el 2001 Saltiel describió una vía de transporte de glucosa independiente de PI3K en adipocitos, e involucra a la proteína Cbl y a las proteínas adaptadoras APS y CAP. La formación de un complejo proteico entre APS/CAP/Cbl, el cual permite la

fosforilación de ésta última proteína por el receptor de insulina. El complejo CAP/Cbl fosforilado se disocia del receptor de insulina y a través de CAP interactúa con la flotilina en microdominios de la membrana plasmática conocidos como balsas lipídicas (lipid rafts), en donde Cbl recluta al complejo proteico CrkII-C3G. C3G activa a la proteína TC10, proteína G pequeña, miembro de la familia de Rho, la cual al parecer lleva a la translocación de GLUT4 (McCarthy., 2007).

### **2.1.7. Complicaciones de la diabetes mellitus**

La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a largo plazo a lesiones que provocan disfunción y alteración de varios órganos, en especial ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (Mediavilla, 2002). Como se muestra en el cuadro 2, tales complicaciones están clasificadas como daños microvasculares y macrovasculares (Guzmán, 2003).

#### **2.1.7.1. Daños microvasculares**

Las consecuencias o daños microvasculares pueden ser definidas como un conjunto de problemas circulatorios causados por el daño provocado por la glicosilación proteica (aumento de glucosa en la sangre que se combina con las proteínas) en la pared de los vasos sanguíneos pequeños, esto altera las funciones de la capa interna de los vasos sanguíneos, produciendo retinopatías, gangrena en miembros inferiores y nefropatías, esta última representa un alto costo para su atención así como una alta tasa de mortalidad (Carrillo,2006; Palma, 2007).

#### **2.1.7.2. Daños macrovasculares**

Dentro de la DM las principales causas de muerte en el paciente diabético son las complicaciones o daños macrovasculares (Palma, 2007). Estos daños afectan

directamente a la pared de los grandes vasos por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, siendo éste el primer paso en la patogenia de la aterosclerosis. En la diabetes se da un gran estrés oxidativo caracterizado por el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las proteínas de la matriz extracelular sufren glicosilación, y las LDL se unen con más afinidad a las proteínas glicosiladas facilitando su oxidación por los ROS y su acumulación en la pared vascular. Además en la diabetes disminuye el óxido nítrico (NO), que tiene actividad antiaterogénica (García, 2009).

**Cuadro 2 Tipo de complicaciones presentes en la diabetes.**

COMPLICACIÓN	ÓRGANO	DIAGNOSTICO
Microvasculares	Retina	Retinopatía
	Glomérulos	Nefropatía
	Nervios	Neuropatía periférica.
Macrovasculares	Corazón	Aterosclerosis Infarto al miocardio
	Tejidos	Apoplejía Amputación

(Modificada de Ambriz, 2007).

### 2.1.8. Diabetes y estrés oxidativo

En el estudio de las causas implicadas en la aparición de las complicaciones macro y microvasculares, se ha demostrado que altos valores de glicemia conducen a un estrés oxidativo. Esto se debe a que la glucosa se autooxida y da lugar a la formación de  $\alpha$ -

cetoaldehídos, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), entre otras ROS (Figura 1) (Brownlee, 2001).

El incremento de los radicales libres, producidos por la hiperglicemia, inhibe a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que participa en la vía de la glucólisis. Este aumento conlleva a una acumulación de metabolitos río arriba de esta enzima, los cuales activan otras vías metabólicas (figura 2): a) vía de los azúcares polihidroxilados, b) vía de la hexosamina, c) producción de diacilglicerol (DAG), el cual a su vez activa a la proteína cinasa C (PKC), y d) síntesis de productos de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés), los cuales también estimulan a PKC. Por lo tanto, tratamientos que inhiben la actividad de la PKC evitaban el desarrollo de complicaciones en la diabetes. (Brownlee, 2001; Evans y col., 2002; Schultz y col., 2005; Yamagishi y col., 2007; Aronson, 2008).

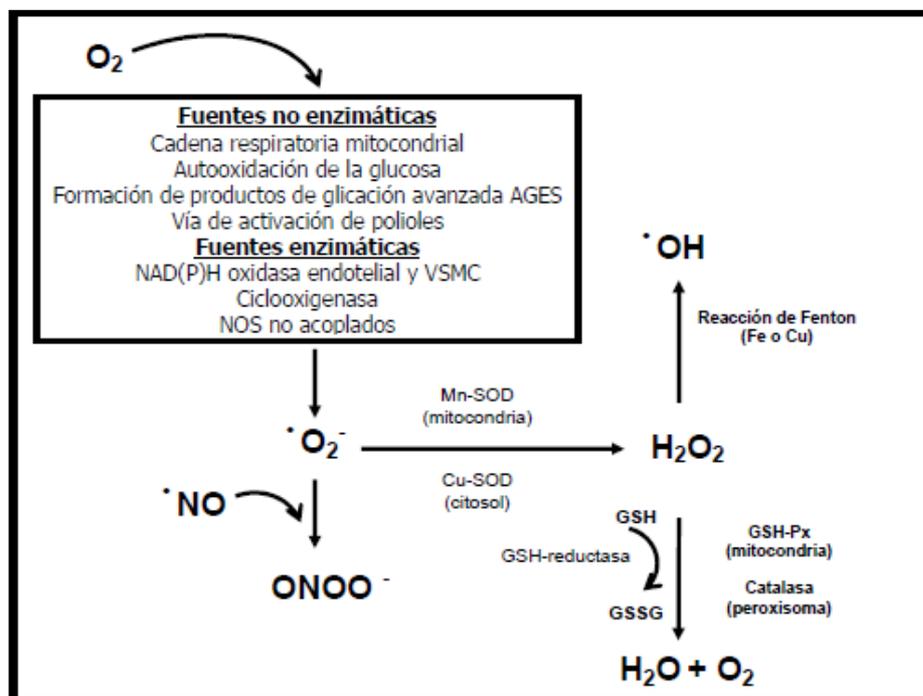


Figura 1 Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Schultz y col., 2005).

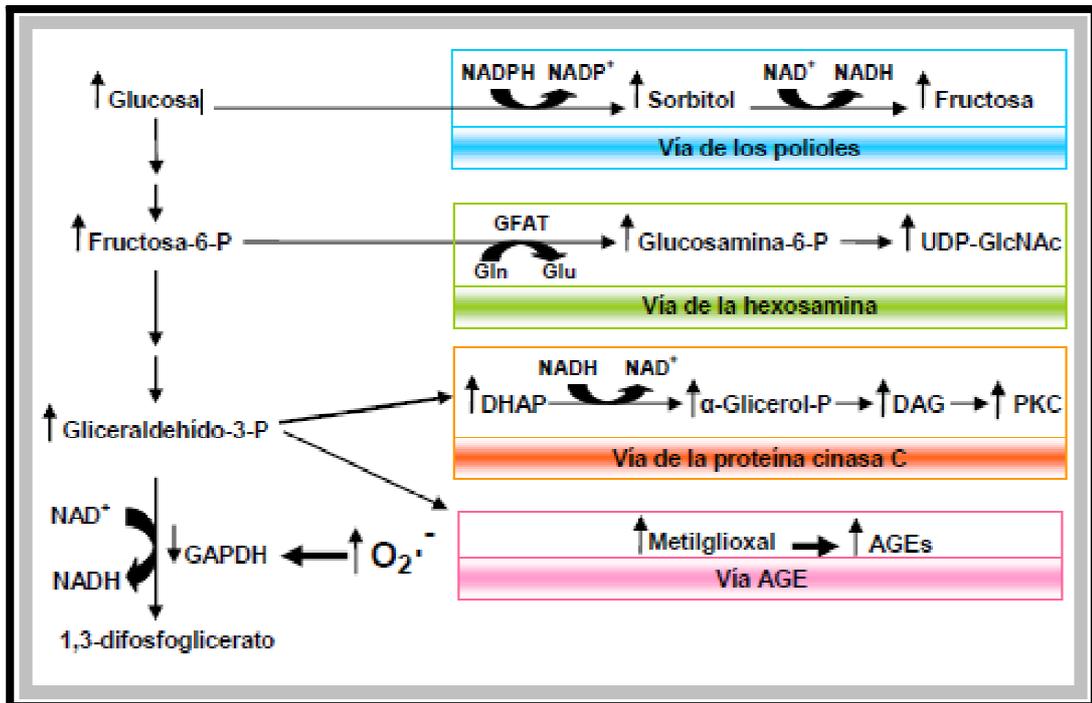


Figura 2 Posibles mecanismos inducidos por la hiperglicemia, debido a la elevada producción de iones superóxido. (Brownlee, 2001).

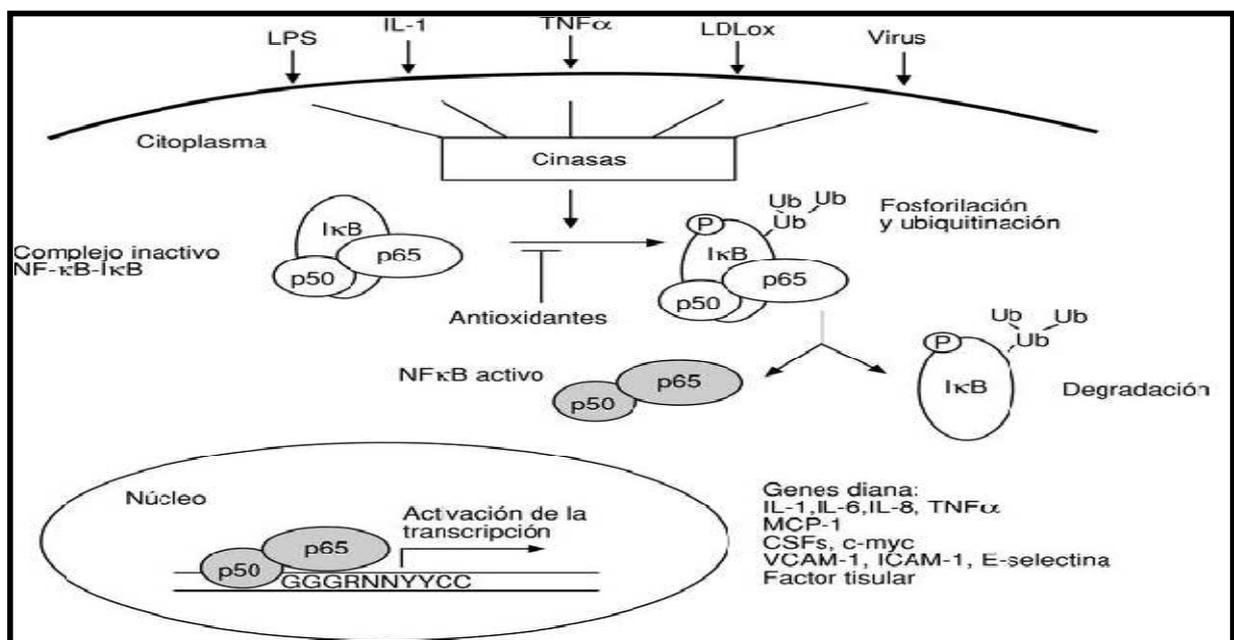
### 2.1.9. Inflamación en la diabetes mellitus.

Como se menciona anteriormente, la hiperglucemia característica de la DM es la principal responsable de múltiples complicaciones micro y macrovasculares a través de las cuatro rutas bioquímicas (ver figura 2) que incluyen la ruta del polirol, la vía de las hexosaminas, los AGEs y la activación de proteín cinasa C (PKC) (Flores y col., 2004).

La unión de los AGEs a su receptor (RAGE) expresado en células endoteliales o células musculares lisas de la pared vascular y a nivel renal, resulta en diferentes acciones, incluyendo la liberación de citocinas como el factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ) y la sobreexpresión de diversos genes como el factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B). Este último es una proteína dimérica que activa la expresión de muchos genes involucrados en procesos inflamatorios. En células no estimuladas, NF- $\kappa$ B se encuentra

retenido en el citoplasma por la interacción con su inhibidor IκB (Wautier y col., 2001; Cases y col., 2003).

En respuesta a varios estímulos, como las citocinas proinflamatorias, las especies reactivas de oxígeno y la hiperglicemia, IκB es fosforilado por el complejo de cinasas de IκB, denominadas IKK, dirigiendo a la ubiquitinización y una subsecuente degradación de IκB, lo que permite que NF-κB se transloque al núcleo, uniéndose a elementos específicos (sitios κB) y activando la transcripción de genes (Figura 3) (Kwok y col., 2001).



**Figura 3 Activación de NF-κB por diferentes agentes. (Martínez-González y col., 2001).**

Por otro lado, PPARγ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma), el cual se expresa principalmente en el tejido adiposo, riñón y en los vasos sanguíneos, e interfiere con el factor de transcripción NFκB inhibiendo su translocación al núcleo y su actividad (Stienstra y col., 2007). También evita la diferenciación de células mesangiales, inhibiendo la liberación de la citocina TNFα y disminuyendo así el estado inflamatorio (Guan y Breyer, 2001).

### **2.1.10. Estrategias para el tratamiento de la diabetes mellitus**

En lo que respecta al tratamiento de la diabetes, el objetivo de una terapia hipoglucemiante en pacientes con DM se basa en alcanzar la normoglucemia, por lo que el tratamiento para cada persona diabética debe ser personalizado dependiendo su necesidad.

#### **2.1.10.1. Tratamiento no farmacológico.**

El tratamiento no farmacológico de la DM comprende principalmente: un plan alimenticio, ejercicio y hábitos saludables; con el fin de reducir el peso en la DM2, lo que disminuye la glicemia, el perfil lipídico y la hipertensión arterial, incrementando la sensibilidad a la insulina, es decir reduce los factores de riesgo cardiovasculares (Amoroso y cols., 2007), por lo que este tratamiento se basa en 3 factores principales que son:

1. La educación del paciente en cuanto a la enfermedad: Este método se ofrece como tratamiento fundamental para la utilización de un sistema de información para el diabético.
2. Actividad física: ayuda a reducir los requerimientos de insulina, al hacer más efectivo el funcionamiento de los receptores de está, siendo también una manera de prevenir dicha enfermedad (Amoroso y cols., 2007).
3. Dieta: El control del tipo y la cantidad de alimentos a ingerir es la base para un tratamiento eficaz de diabetes. Esto debido a que gran parte de diabéticos tipo 2 degeneran su habilidad para la producción de insulina y una dieta adecuada facilita la efectividad de la insulina natural, en pacientes con diabetes tipo 1 la dieta tiene la misma importancia.

### **2.1.10.2. Tratamiento farmacológico de la DM1 y la DM2.**

En el tratamiento farmacológico todos los pacientes con DM1 son insulino dependientes para su supervivencia. El tratamiento con insulina debe ser iniciado tan pronto como se realice el diagnóstico para prevenir la descompensación metabólica y la cetoacidosis, usualmente dentro de las primeras 24 horas si se demuestra cetonuria (Amoroso y cols., 2007).

En el caso de la DM2 el tratamiento se realiza mediante la incorporación de agentes hipoglucemiantes que estimulan la liberación de una mayor cantidad de insulina y ayudan a reducir la resistencia ante la insulina. Sin embargo, en la elección del tratamiento hay que tener en cuenta el mecanismo de acción, eficacia, efectos secundarios, contraindicaciones, interacciones y costos (Amoroso y cols., 2007).

Al momento se conoce un sin número de compuestos bioactivos con propiedades hipoglucemiantes que han sido aisladas de especies vegetales y muchos pacientes diabéticos luego de diagnosticados, utilizan la medicina herbolaria sola o en combinación con la medicina convencional. Por ello desde una perspectiva etnofarmacológica, el tratamiento de la diabetes se encuentra en la interface de la biomedicina convencional y la tradicional (Cetto y col. 2005).

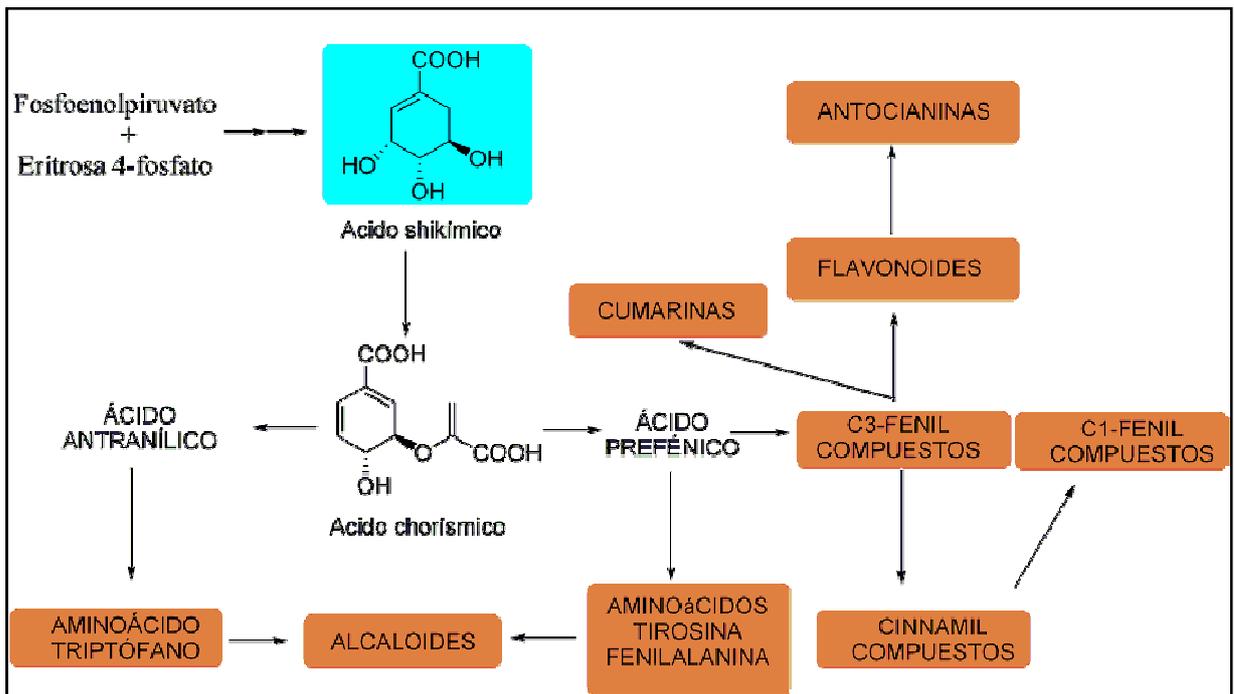
### **2.2. Compuestos bioactivos en plantas.**

Las plantas tienen la peculiaridad de sintetizar gran cantidad de compuestos bioactivos que contienen un grupo fenol, gracias al metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos reciben el nombre fenoles, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Fig. 4). A la fecha se han descrito más de 8.000 compuestos fenólicos distintos que, por sus propiedades antioxidantes, podrían ser utilizados para la elaboración de fármacos con acción hipoglucemiante como medida terapéutica en los pacientes diabéticos (Vázquez y col. 2005).



La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores.

La ruta del ácido siquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas (figura 6). A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos que derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales.



**Figura 6 Ruta del ácido siquímico**

En la actualidad existen antioxidantes sintéticos pero tienen la desventaja de ser altamente inestables bajo condiciones de trabajo y en ciertos casos ocasionan efectos adversos a la salud, con lo que se ha tratado de encontrar fuentes naturales entre los que destacan los siguientes compuestos: carotenoides, vitaminas C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y licopenos, entre otros (Boussaada, 2008).

Yoon en 2008 indicó que los polifenoles actúan como antioxidantes, pues tienen propiedades electro-donadoras lo que permite que actúen como terminadores de las cadenas de reacción de radicales libres, transformando especies reactivas de radicales

libres a productos no radicales más estables. Los antioxidantes se encuentran en cantidades variables en alimentos como frutas, vegetales, cereales, legumbres, nueces, hierbas comestibles, etc. y ayudan a prevenir enfermedades, por lo cual tienen importancia en la salud humana. Por otra parte también han llegado a tener un papel sobresaliente en otras áreas, como es la industria alimentaria pues es allí donde el deterioro oxidativo puede provocar olores y sabores rancios que disminuyen su calidad nutricional, promoviendo la producción de compuestos tóxicos (Gaviria, 2007; Vásquez, 2007). Por ello los antioxidantes en esta industria son sumamente importantes pues se utilizan como aditivos que ayudan a preservar los alimentos, su calidad nutricional y características físicas como colores y sabores (Iverson, 1995).

Los compuesto fenólicos además de proporcionar un elevado poder antioxidante disminuyendo el estrés oxidativo causado por los radicales libres, se les han atribuido propiedades hipoglucemiantes (Serrano y col., 2004). El mecanismo de acción hipoglucemiante de ciertas plantas con altos contenidos de compuestos fenólicos, como los flavonoides y los taninos, puede deberse a la potencialización de la secreción pancreática de insulina de las células  $\beta$  y/o debido a un transporte mejorado de la glucosa en la sangre. Otros mecanismos propuestos son la estimulación de la captación de glucosa por los tejidos periféricos, la inhibición de la producción de glucosa endógena o la activación de la gluconeógenesis en el hígado y los músculos. De esta manera, los compuestos fenolicos presentan un amplio espectro de actividades biológicas por lo que se han propuesto como una herramienta terapéutica para enfermedades crónicas como la diabetes (Burcelain y col., 1995).

### **2.2.1. Compuestos fenólicos en el género acacia**

Algunas especies de plantas menos estudiadas en nuestro país y que contienen compuestos fenólicos son las pertenecientes a la familia *Fabaceae*, formada por 700 géneros y 20,000 especies que se dividen en tres subfamilias: *Papilionoideae*, *Caesalpinioideae* y *Mimosoideae*. A esta última pertenecen el género de las acacias,

compuesta por 400 géneros y 2500 especies. Gracias a que México posee una gran diversidad en la flora, se han localizado 64 especies de acacias como son: *A. angustissima*, *A. cochliancantha*, *A. pennatula* y *A. macracantha*.

Martínez-Flores y col. En el 2002 reportaron la presencia de gran diversidad de componentes de importancia comercial en el género de las acacias, entre los que destacan los taninos, las catequinas y los flavonoides, los cuales presentan un amplio espectro de actividades biológicas que se han propuesto como una herramienta terapéutica para desórdenes crónicos como la diabetes debido a su actividad antiinflamatoria. A este respecto, se ha sugerido que los polifenoles inhiben la producción de enzimas proinflamatorias (Santangelo y col., 2007). Lo cual puede ayudar a mejorar las complicaciones de la diabetes y el estado inflamatorio presente en ella.

Dentro del género acacia, estudios de extractos macerados de la especie *A. pennatula* mostraron un alto contenido de fenoles totales y flavonoides, en donde los compuestos fenólicos encontrados en mayor concentración fueron el ácido gálico y la catequina. siendo esta especie una buena fuente natural de compuestos fenólicos, lo que le confiere propiedades antioxidantes en comparación con otros productos naturales como: los cereales, frutas y bayas (Feregrino-Pérez y col., 2011), haciendo de este género una importante fuente de compuestos antioxidantes.

Otras investigaciones realizadas en las especies *A. catechu* y *A. milanoxylon* mostraron resultados favorables en la utilización de modelos experimentales *in vivo*, en donde propusieron diversos mecanismos hipotéticos (figura 9) al obtener un efecto hipoglucemiante y antiobesigenico, atribuyendo estos resultados a las diversas acciones farmacológicas producto de los polifenoles contenidos en estas especies, por lo que proponen que esta especie muestra un amplio espectro terapéutico para la prevención de enfermedades como la diabetes y obesidad (Ikarashi y Col., 2011).

### 2.2.2. Timbe (*Acaciella angustissima*) y su capacidad antioxidante

El timbe (*Acaciella angustissima*), especie nativa del estado de Querétaro (Fig.7), ha sido poco estudiada alrededor del mundo, siendo utilizada principalmente por los pobladores como combustible vegetal, como forraje para el ganado y en la industria de las pieles como curtidor vegetal por su alto contenido de compuestos fenólicos. Estos compuestos fenólicos han sido estudiados en distintas partes de la especie siendo la vaina una de las partes con mayor contenido de estos, la cual presenta dos estadios de maduración, el primero de color verde y el segundo de color café. El último estadio se presenta en los meses de julio- noviembre, siendo este el más óptimo para los meses de recolección por su elevado contenido de compuestos fenólicos (Terrones-Rincón, 2006).



**Figura 7 Timbe (*Acaciella angustissima*)**

Estudios previos de nuestro grupo de investigación (Vargas y col., 2010) han mostrado que *A. angustissima* presenta una actividad antioxidante importante. Esta actividad puede explicarse por el alto contenido de fenoles y flavonoides encontrados, dentro de los cuales destaca en mayor concentración el ácido protocatecuico, este último es un compuesto fenólico natural derivado del ácido benzoico con un fuerte efecto antioxidante, hasta 10 veces mayor en comparación con la vitamina E, presente en muchas plantas comestibles y medicinales. (Harini., y col., 2010),

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1. Material biológico**

- Se utilizaron ratas Wistar macho de peso entre 250–300g, compradas al laboratorio de Rismart ®, México.
- La vaina de Timbe fue recolectada del parque nacional el Cimatario por los meses de octubre y noviembre, mientras la vaina presentaba una coloración café lo cual indica una madurez óptima.

##### **3.1.2. Material químico**

- Para la inducción de la diabetes mellitus se utilizó el fármaco estreptozotocina (STZ) de la marca Sigma® (18883-66-4).
- Tiras reactivas para la determinación de glucosa en sangre, marca ACCUTREND ®.
- Kits para la determinación de triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL en suero, marca Sigma ® (MAK043 y MAK045).
- Kits para la determinación de insulina en suero, marca Millipore, EE.UU ® (EZHIASF-14K).
- Kits para la determinación de creatinina en orina y suero, marca Randox ® Laboratories (DICT-500).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Elaboración del extracto de vaina de timbe (*Acaciella Angustissima*).**

Los extractos se obtuvieron mediante maceración utilizando 50 g de vainas sin semillas las cuales previamente se trituraron para obtener partículas con un tamaño de 0.5 mm a 0.5  $\mu$ m aproximadamente y posteriormente se colocaron en remojo en 200 ml de metanol grado reactivo como solvente y diariamente el solvente era recolectado y refrigerado a 4°C, cambiándolo por metanol nuevo. Este proceso se realizó hasta que el metanol no presentaba una fuerte coloración (aproximadamente una semana). Al final todo el metanol recolectado se filtró para posteriormente concentrar la solución (rotoevaporandola), obteniendo 28 g de extracto total que se liofilizaron y almacenaron a 4°C en ausencia de luz. A este extracto se le realizaron las siguientes determinaciones: fenoles totales, taninos condensados, flavonoides y se evaluó su capacidad antioxidante. Posteriormente este extracto fue utilizado como tratamiento en la dieta del modelo *in vivo*.

### **3.2.2. Extracción de compuestos fenólicos.**

Para poder cuantificar el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en el extracto de timbe primero se realizó una extracción de dichos compuestos en metanol (extracto metanólico) o agua (extracto acuoso), de la siguiente manera:

En dos tubos de 15 ml se adicionaron 10 ml de metanol o agua respectivamente, así como un gramo de extracto de vainas de timbe (*Acaciella angustissima*) para cada uno, protegiéndolos de la luz y en agitación continua durante 24 horas. El material obtenido se centrifugó a 5000 RPM durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente se recuperaron los sobrenadantes, dividiendo en alícuotas de 2.5 ml cada una. Estas alícuotas se mantienen a 4°C y en ausencia de luz para su posterior uso.

### **3.2.3. Cuantificación de compuestos fenólicos y determinación de la capacidad antioxidante**

Las siguientes determinaciones realizadas para la evaluación de los extractos de timbe fueron llevadas a cabo en condiciones de poca luz y a temperatura bajas alrededor de 17°C dentro del laboratorio, con el fin de obtener datos veraces y evitar la degradación de los compuestos fenólicos.

#### **3.2.3.1. Cuantificación de fenoles totales**

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Para esta cuantificación, se tomo una alícuota del extracto de fenoles metanólico o acuoso (40 µl). Esta muestra y los puntos de la curva estándar de ácido gálico (0, 1, 2, 4,5, 8, 10, 16 y 20 µg) se llevaron a un volumen total de 500 µl, y posteriormente se mezclaron con 250 µl del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) y después se adicionaron 1250 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 %) y se dejó reposar en la obscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. El blanco utilizado para esta determinación se preparó utilizando reactivo de Folin-Ciocalteu y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia por duplicado a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto de la vaina timbe.

#### **3.2.3.2. Cuantificación de taninos condensados**

La cuantificación de taninos se realizó de acuerdo al método de la vainillina adaptado para el uso de microplaca, descrito por Feregrino-Pérez y col. (2008). Para esta cuantificación se tomo una alícuota del extracto de fenoles metanólico o acuoso (50 µl) equivalentes a 0.0125 g del extracto de la vaina. A esta muestra y los puntos de la curva estándar de (+) catequina (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mg/ml) se le agregaron 200 µl de la solución de vainillina al 0.5 % recién preparada (vainillina 1 % en metanol y HCl 8% en metanol en una relación 1:1). Posteriormente se preparará un blanco al cual se le

adicionarán 50 µl de metanol y 200 µl de HCl al 4 %. Para cuantificar los taninos condensados se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent). Los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de (+) catequina/g de extracto de vaina timbe.

### **3.2.3.3. Cuantificación de flavonoides totales**

La cuantificación de los flavonoides presentes en el extracto de timbe se realizó mediante el método de Liu y col. (2002). Para esta cuantificación se tomo una alícuota del extracto de fenoles metanólico o acuoso (50 µl) equivalentes a 0.0125 g del extracto de la vaina. A esta muestra, así como a los puntos de la curva estándar de rutina (0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mg/ml) se les adicionó 180 µl de agua destilada o metanol y 20 µl de solución 2-aminoetil-difenilborato al 1%, preparado con metanol, rutina y agua destilada para cada extracto. Posteriormente se midió la absorbancia a 404 nm con un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent). Los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de rutina/g de extracto de timbe.

### **3.2.3.4. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de timbe empleando la técnica de ABTS.**

La determinación se realizó en los extractos de timbe (acuoso y metanólico) siguiendo el ensayo de capacidad antioxidante en equivalentes de trolox (TEAC, por sus siglas en inglés) adaptado por lo descrito por Re y col. (1999) y Van Den Berg y col. (1999). La técnica consistió en mezclar ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-6 ácido sulfónico) al 7 mM y persulfato de potasio 2.45 mM en agua por 12 horas a una temperatura de 4°C para producir el radical ABTS<sup>•</sup>. Posteriormente la solución concentrada de ABTS<sup>•</sup> se diluye con un buffer de fosfatos salino (PBS), pH 7.4, hasta obtener una absorbancia final de  $0.7 \pm 0.02$  la cual se leyó en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) a una longitud de onda de 734 nm.

Después se adicionó el extracto de fenoles (10  $\mu$ l) equivalentes a 0.0025 g del extracto de la vaina. A esta muestra y la curva estándar de Trolox preparado con PBS (0, 10, 50, 100, 300, 500 y 800  $\mu$ M) se les adicionó 990  $\mu$ l de la dilución de ABTS dejándose incubar a temperatura ambiente por 6 minutos, el blanco se realizó usando solamente el radical ABTS $^{\bullet}$ . Transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a la misma longitud de onda y los resultados se expresarán como  $\mu$ M equivalentes de Trolox/g de extracto de Timbe.

### **3.2.3.5. Determinación de la capacidad antioxidante del timbe empleando la técnica de DPPH.**

La capacidad antioxidante determinada por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Fukomoto y Mazza (2000). Brevemente, se preparó el radical DPPH $^{*\bullet}$  (150  $\mu$ M) pesando en un matraz de 25 mL 1.5 miligramos de DPPH y se disolvió con 20.5 mL de metanol aforándose a 25 mL con agua destilada.

Posteriormente se adicionan 20  $\mu$ L del extracto de fenoles metanólico equivalentes a 0.005 g del extracto de la vaina. A esta muestra y a la curva estándar de Trolox (50, 100, 200, 300, 400, 500 y 800  $\mu$ M) se les agrego 230  $\mu$ L de solución DPPH. Para el blanco se colocaron 20  $\mu$ L de metanol y 230  $\mu$ L de etanol. La placa se leyó a una longitud de onda de 520 nm en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) a los 0, 4, 10, 30 y 90 minutos, para ver en qué tiempo la concentración de DPPH disminuye debido a la cesión de electrones de la especie antioxidante (extracto de timbe) .Los resultados se expresarán en  $\mu$ M equivalentes de Trolox /g de extracto de timbe.

### **3.3. ESTUDIOS *IN VIVO***

#### **3.3.1. Inducción de diabetes**

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron ratas Wistar macho de 250-300 g de peso, compradas al bioterio CINVESTAV, México. Los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación de por lo menos una semana a 25 °C, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con acceso libre a comida Zeigler (NIH-31 Rismart S.A. de C.V.) y agua, colocando cada rata en una jaula. Para la inducción de la diabetes, las ratas permanecieron 15 horas en ayuno y posteriormente se les inyectó una dosis única de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal, a una concentración de 45 mg/kg de peso corporal. Esta dosis ha sido descrita que produce diabetes tipo 1 (Afoloyan, 2011). Las ratas del grupo control (sanas) recibieron vía intraperitoneal solución salina. Cinco días después de la administración de STZ se cuantificó la glucosa sérica (ver sección 3.3.3.1) presente en sangre. Consideraron para el experimento animales con glucosa sanguínea en el rango de 180–250 mg/dl. Los animales se asignaron aleatoriamente para formar los grupos de experimentación.

#### **3.3.2. Grupos de estudio**

Se utilizaron un total de 30 ratas (24 diabéticas y 6 sanas), las cuales fueron divididas en 5 grupos de seis ratas cada uno. En el cuadro 3 se especifica la dosis recibida para cada grupo. En los grupos que se administró el extracto de Timbe este se incorporó en charolas con el alimento molido.

**Cuadro 3 Grupos experimentales para la evaluación del consumo de extracto de Timbe en ratas diabéticas.**

Grupos		Tratamientos (4 semanas)	Dosis de STZ al 7° día
Control sano		Ninguno	Buffer de citratos 0.1 M
Control diabético		Ninguno	45mg/kg p.c. de STZ en buffer de citratos 0.1 M
Tratamientos	25	25 mg extracto de timbe / kg p.c.	45mg/kg p.c. de STZ en buffer de citratos 0.1 M
	50	50 mg extracto de timbe/ kg p.c.	45mg/kg p.c. de STZ en buffer de citratos 0.1 M
	100	100 mg extracto de timbe / kg p.c.	45mg/kg p.c. de STZ en buffer de citratos 0.1 M

### 3.3.3. Determinaciones Semanales

Para la evaluación de los tratamientos se llevó a cabo un control semanal de los siguientes parámetros: glucosa sanguínea en ayuno, peso corporal, consumo de agua y consumo de alimento.

#### 3.3.3.1. Determinación de glucosa

La glucosa se cuantificó en muestras de sangre obtenidas de la vena caudal de las ratas (localizada en el extremo de la cola del animal), con un mínimo de 8 horas en estado de ayuno. Para ello se empleó un glucómetro marca ACCU CHEK, el cual tiene un rango de sensibilidad que va de 10-600 mg/dl (0.6-33.3 mmol/l) de glucosa, utilizando tiras reactivas de la marca Accutrend.

El glucómetro mide el poder reductor generado por la enzima glucosa deshidrogenasa, al metabolizar la glucosa a gluconolactona, indicando la concentración de glucosa en mg/dl.

### **3.3.3.2. Determinación de peso**

La determinación del peso se llevó a cabo cada tercer día por cuatro semanas pesando a cada rata de los grupos de estudio por medio de una canastilla tarada en una balanza granataria.

### **3.3.3.3. Determinación de consumo de agua**

El consumo de agua se midió cada tercer día por cuatro semanas por medio de una probeta graduada de 100 ml. en cada grupo de estudio, se aseguraron los dispensadores de agua para evitar fugas.

### **3.3.3.4. Determinación de consumo de alimento**

Para determinar el consumo de alimento de cada rata se colocaban diariamente 50 g de alimento a cada rata de los 5 grupos, y por las mañanas antes de cambiar de nuevo el alimento se pesaba para determinar cantidad ingerida.

### **3.3.4. Sacrificio y obtención de muestras**

El sacrificio se realizó al término de cuatro semanas, ya que en observaciones previas de nuestro grupo de estudio observamos que la concentración administrada de STZ afecta la sobrevivencia de las ratas, también se recolectó una muestra de orina de 12 horas y se sometieron a un ayuno de 8 h. Posteriormente, los animales se colocaron uno por uno en una guillotina para decapitación y ya una vez decapitados se tomó una muestra de sangre del cuerpo decapitado, por medio de un embudo colocado en los tubos previamente marcados, ésta se centrifugó 2500 RPM para la obtención de suero el cual se congeló y se almacenó a -20 °C para posteriores determinaciones bioquímicas. Después de obtener la sangre necesaria, se realizó una incisión en forma de "Y" al cuerpo de cada rata para remover los riñones y el páncreas, los cuales fueron pesados y seccionados en solución fisiológica conservando una porción en nitrógeno líquido

(para la evaluación de los parámetros bioquímicos de daño renal) y finalmente se almacenaron a -70 °C para su análisis posterior.

### **3.3.5. Determinaciones post- sacrificio**

Para la evaluación de los tratamientos una vez concluido el tiempo de exposición del extracto de timbe al modelo *in vivo* se realizaron las siguientes determinaciones: insulina, perfil lipídico, peroxidación lipídica, determinación de proteína, determinación de creatinina.

### **3.3.6. Determinación de la concentración de insulina.**

Los niveles de insulina fueron determinados en el suero de ratas diabéticas y sanas las cuales estaban en proceso de ayuno al momento del sacrificio y se llevo a cabo utilizando un kit comercial (Millipore, EE.UU. ® EZHIASF-14K)

### **3.3.7. Determinación de perfil lipídico**

La determinación del perfil lipídico se realizó por medio de kits comerciales de cuantificación (Sigma ® MAK043 y MAK045),siguiendo sus indicaciones para la cuantificación específica de triglicéridos, colesterol total, HDL, LDL, VLDL y finalmente, la concentración de LDL se determinó por medio de la fórmula de Friedewald, descrita por Rijks en 1995 (Ver Anexo 2).

### **3.3.8. Recolección y determinación de proteína en orina**

Las muestras de orina obtenidas recientemente se emplearon inmediatamente para la determinación de proteína, por el método descrito por Bradford (1951).

### **3.3.9. Peso relativo de riñones en ratas diabéticas y sanas.**

En el momento del sacrificio, se procedió a extraer órganos importantes como los riñones los cuales fueron limpiados con solución salina, cortados transversalmente y pesados en el mismo momento.

### **3.3.10. Determinación de la depuración de creatinina.**

A partir de las muestras de suero y orina se determinó creatinina mediante kits enzimáticos de la marca Randox ® Laboratories (DICT-500) y con estos datos se calculó la depuración de creatinina (Ver Anexo 3).

### **3.3.11. Peroxidación lipídica.**

Esta técnica de peroxidación de lípidos, es decir, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) se estimó por el método de Fraga et al. (1988) la cual se realizó a partir de las muestras patológicas de riñón utilizando aproximadamente 0.25 gr. de cada riñón, y se expresa como  $\mu\text{m/g}$  de tejido renal.

## **3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos se expresaran como la media  $\pm$  el error estándar (E.E.). La evaluación estadística de los datos *in vitro* se determinaron mediante el análisis de T-Student, mientras que para el modelo *in vivo* se utilizó análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95 %, y las diferencias de medias entre los tratamientos fueron determinadas aplicando la prueba de Tuckey. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico Graphpad prism 6.0 (paquete de demostración).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Evaluación *in vitro* del extracto de Timbe (*Acaciella angustissima*).

#### 4.1.1. Cuantificación de compuestos fenólicos del extracto de Timbe (*Acaciella angustissima*)

Como se observa en el cuadro 4, la cuantificación de fenoles totales del extracto de timbe mostro que el extracto metanólico presentaba 3.5 veces más concentración que el extracto acuoso, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Vargas y Munguía (2010), en los que se observan valores de  $127.19 \pm 5.28$  en mg eq. Ácido gálico/g de extracto de timbe para extractos metanólicos y  $59.09 \pm 0.69$  en mg eq. Ácido gálico/g de extracto de timbe para extractos acuosos. Estos valores muestran una disminución significativa de un extracto a otro al aplicar diversas técnicas de extracción.

**Cuadro 4 Concentración de compuestos fenólicos en extractos de Timbe**

Parámetros	Timbe Metanólico	Timbe Acuoso
FENOLES TOTALES <sup>1</sup>	$121.75 \pm 2.46^a$	$36.68 \pm 0.70^b$
FLAVONOIDES TOTALES <sup>2</sup>	$4.60 \pm 0.14^a$	$0.310 \pm 0.009^b$
TANINOS CONDENSADOS <sup>3</sup>	$0.616 \pm 0.008^a$	$0.170 \pm 0.04^b$

Los valores representan la media de la concentración  $\pm$  EE (n=6). Los valores a, b medios dentro de una fila con distinto superíndice son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ; mediante la prueba t-student).

**1** Expresados en mg eq. Ácido gálico/g de extracto de timbe.

**2** Expresados en mg eq. Rutina/ g de extracto de timbe.

**3** Expresados en mg eq. (+)Catequina/ g de extracto de timbe.

Al igual que en lo mostrado en la cuantificación de fenoles totales, la cuantificación de flavonoides y taninos mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los extractos metanólicos y el acuoso. Siendo 4 veces mayor el contenido de taninos y 15 veces mayor el contenido de flavonoides, lo que puede asociarse como ya se menciona

anteriormente al proceso durante la elaboración del extracto con el metanol o bien a la manipulación de las técnicas.

#### 4.1.2. Cuantificación de la capacidad antioxidante del extracto de Timbe (*Acaciella angustissima*)

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en comprobar cómo un agente induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto utilizado como estándar o bien la muestra de estudio. En el Cuadro 5 se muestra la capacidad antioxidante determinada por el método de ABTS Y DPPH para una mayor exactitud en resultados para los extractos metanólico y acuoso del timbe.

**Cuadro 5 Cuantificación de la capacidad antioxidante en extractos de Timbe.**

Método De Cuantificación	Timbe metanólico <sup>1</sup>	Timbe acuoso <sup>2</sup>
ABTS	70.34±13.96 <sup>a</sup>	15.88±1.94 <sup>b</sup>
DPPH	349.1±1.03	ND

Los valores representan la media de la concentración ± E.E. a y b, indican diferencia estadística significativa entre diferentes extractos para cada parámetro (tukey, p<0.05), ND= No determinado.

1 Expresada en mg eq. Trolox/g de extracto de timbe.

2 Expresado como IC<sub>50</sub> (µg/ml).

Los resultados obtenidos para la determinación de la capacidad antioxidante por el método de ABTS fueron los esperados según el contenido de compuestos fenólicos, en donde obtuvimos 5 veces mayor actividad antioxidante en el extracto metanólico en comparación con el acuoso, respectivamente. Mientras que de la misma manera los valores obtenidos para el método de DPPH muestran una alta capacidad antioxidante para el extracto metanólico con 349.1 ± 1.03 (Cuadro 6), la determinación en el extracto acuoso no se realizó por la metodología implicada pero inferimos que dicha capacidad

antioxidante sería menor por los resultados obtenidos en el contenido de compuestos fenólicos, por lo que sugerimos que el extracto metanólico es el mejor método de extracción, para la obtención de polifenoles y por lo consiguiente para la actividad antioxidante. Nuestro estudio concuerda con lo obtenido por Feregrino y col. en el 2011 para otro género de acacias (*Acacia pennatula*) en donde mostraban una capacidad antioxidante similar a los resultados obtenidos en este estudio, para la misma especie.

La capacidad antioxidante *in vitro* es utilizada como una prueba preliminar para evaluar aquellos compuestos que tengan la propiedad de donar electrones y/o protones a radicales libres inhibiendo los procesos oxidativos y en base a los resultados anteriores fue posible demostrar que el extracto de timbe puede ser una fuente potencial de compuestos antioxidantes. Estos resultados sugieren que esta actividad podría inactivar los radicales generados en un organismo en estado de hiperglucemia.

## **4.2. Evaluación *in vivo* del extracto de Timbe (*Acacciella angustissima*)**

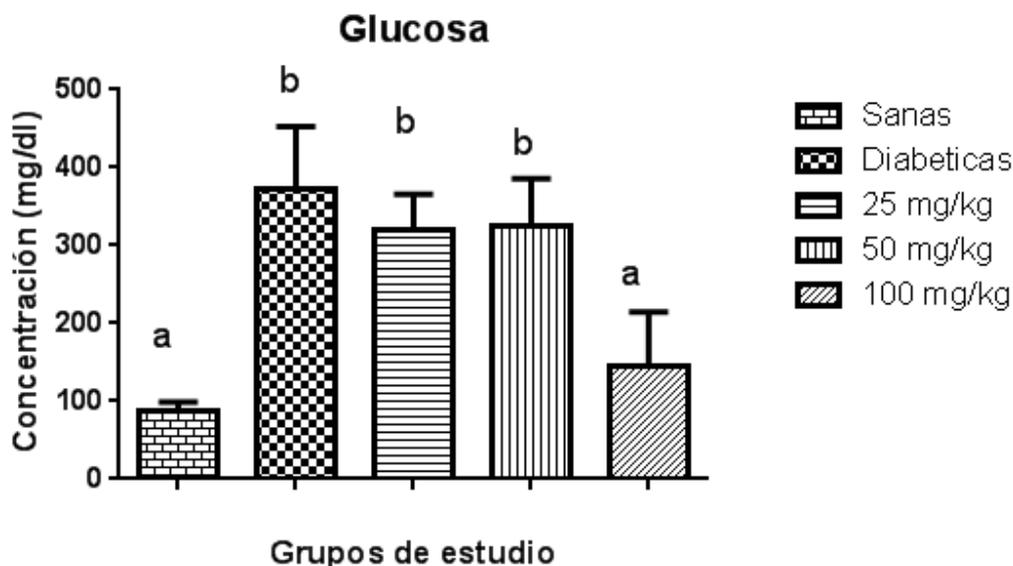
### **4.2.1. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre los niveles de glucosa en sangre de ratas wistar sanas y diabéticas.**

En la inducción de diabetes por estreptozotocina se ha informado que este fármaco causa un déficit de antioxidantes y un incremento de estrés oxidativo, lo que origina daño y destrucción parcial de las células  $\beta$  pancreáticas, produciendo como consecuencia una disminución de insulina que genera una baja incorporación de glucosa en los tejidos periféricos, tales como el tejido adiposo y músculo, así como un aumento de la glucosa sanguínea, lo que lleva al desarrollo de una condición diabética (Afoloyan y cols., 2011), por lo tanto la diabetes presentada en los animales experimentales de este estudio es parecida a una diabetes de tipo 1.

En la figura 8 se puede observar el efecto que tiene la alimentación diaria del extracto de timbe incorporado en la dieta sobre los niveles de glucosa sanguínea en ayuno de

ratas Wistar sanas y diabéticas a lo largo del experimento. En el caso del tratamiento de 100 mg/kg de p.c. se observa una disminución en la concentración de los niveles de glucosa de hasta un 39 %. Por lo tanto, la alimentación con el extracto de timbe mantiene cierto control de la enfermedad, ya que a pesar de que para algunos grupos la disminución de la glicemia no es estadísticamente significativa, la diabetes no avanza como en el caso del grupo control. Estos resultados son muy similares a lo reportado por *Ikarashi y cols.*, en donde mostraron que la especie acacia mostraba un importante efecto hipoglucemiante, lo cual es consistente al obtener resultados semejantes con nuestro estudio.

Esto puede deberse en gran parte al contenido de compuestos bioactivos como el ácido protocatecuico un compuesto fenólico, encontrado en gran proporción para esta especie en estudios previos y al cual se le ha atribuido un efecto hipoglucemiante importante (Harini- pugalendi., 2011).



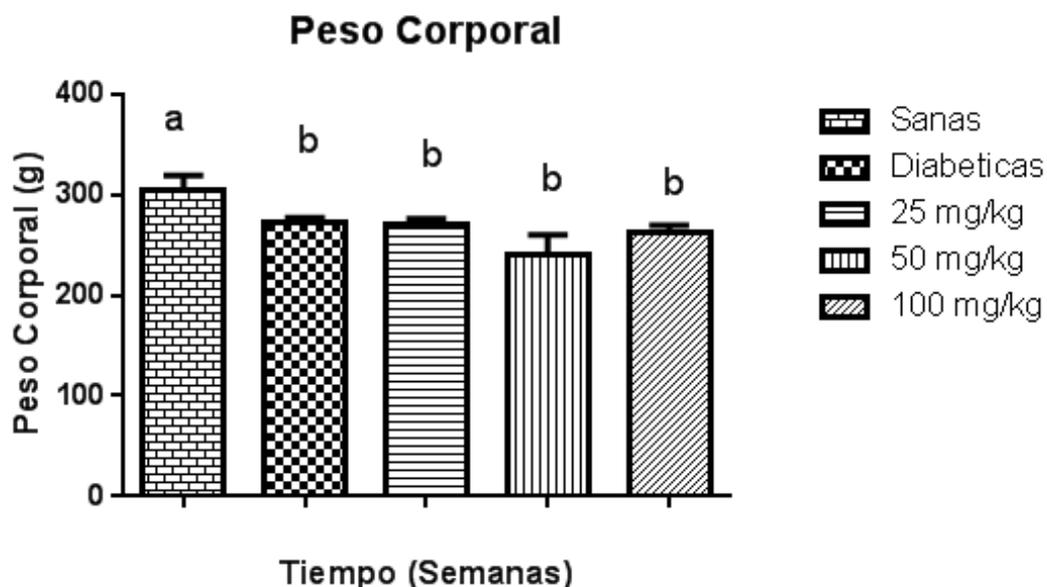
**Figura 8 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la glucosa sanguínea incorporado a la dieta de ratas wistar.** Los valores se presentan como media de la concentración de glucosa en sangre  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

Se ha reportado que los compuestos fenólicos pueden regular gluconeogénesis en animales diabéticos, al disminuir la actividad hepática de las enzimas glucosa 6-fosfatasa y fructosa 1,6-bifosfatasa (Pari y col., 2003), cuya función es obtener glucosa a partir de precursores no glucosídicos como los aminoácidos, lactato, piruvato y glicerol (Mathews, 1998). Así mismo, compuestos fenólicos tales como ácido gálico, catequina, ácido siríngico, ácido cafeico, clorogénico y vainillina (Guzmán y col., 2004), ayudan a la sensibilización de la insulina, por lo que se incorpora glucosa a tejidos dependientes de esta hormona y puede verse reflejado en una disminución de glucosa en sangre. Además, estos compuestos intervienen como antioxidantes naturales, contribuyendo con su acción protectora sobre el estrés oxidativo (Tsimidou, 1998).

#### **4.2.2. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre el peso corporal de ratas wistar sanas y diabéticas.**

En las alteraciones metabólicas propias de la diabetes interviene también la secreción sin oposición de hormonas de contrarregulación como (glucagón, catecolaminas, hormona de crecimiento y adrenalina) que aceleran la condición catabólica. La baja asimilación de la glucosa por los tejidos muscular y adiposo produce una disminución de los depósitos de glucógeno y lípidos respectivamente, además en el hígado la gluconeogenesis se incrementa para compensar las necesidades de glucosa en aminoácidos provenientes del músculo, todas estas alteraciones generan una pérdida de peso durante la diabetes tipo uno (Guyton, 1999).

Los resultados obtenidos en la medición del peso corporal en las cuatro semanas de tratamiento se presentan en la Figura 9 en la cual se observa que respecto al control diabético no hubo ninguna diferencia significativa en los grupos tratados con el extracto de timbe (25,50 y 100 mg/kg p.c.).



**Figura 9 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre el peso corporal incorporado a la dieta de ratas wistar.**

Los valores se presentan como la media del peso corporal  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

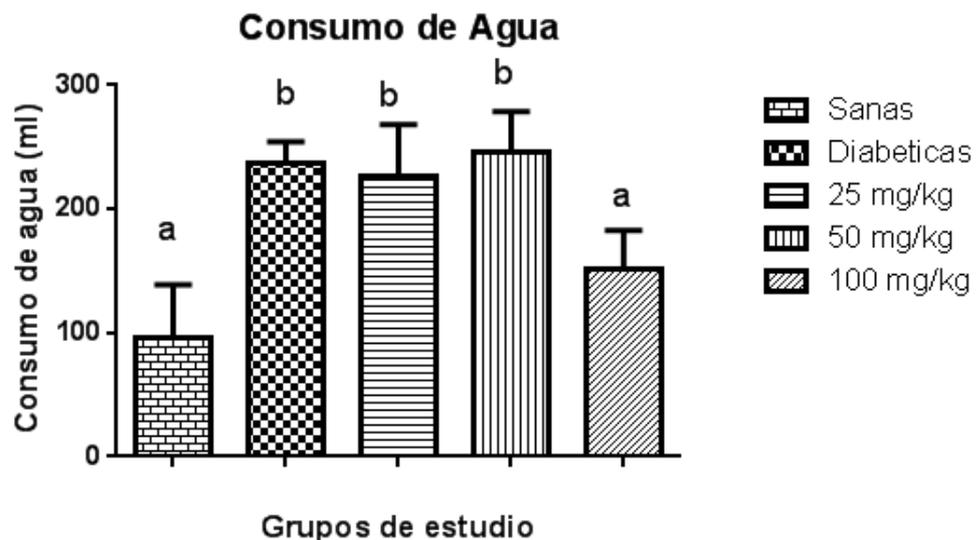
A pesar de que estos valores no fueron estadísticamente significativos como se menciona anteriormente, si tienen relevancia fisiológica, ya que el grupo alimentado con el extracto de timbe a 100 mg/kg presentó un peso promedio de 287 g en la primer semana y después de 4 semanas, su peso corporal fue de 273 g, corroborando que el extracto de timbe incorporado a esta concentración, ayuda a que esta no evolucione. Con estos resultados se puede sugerir que algunos componentes del EMA pudieran estar regulando la incorporación de glucosa a los tejidos.

#### **4.2.3. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre el agua consumida en ratas wistar sanas y diabéticas.**

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza, entre otros síntomas, por polidipsia (sed excesiva) (Braunwald y col., 1998). El exceso de glucosa en la sangre necesita de

la excreción de cantidades elevadas de agua, vía urinaria, para eliminar la glucosa disuelta en el organismo (King, 1991). Debido a esto hay una deshidratación ocasionada por el arrastre de líquido, como consecuencia, el consumo de agua en los animales diabéticos se hace evidente (Federación Mexicana de Diabetes, 2003). Por lo que, en el presente experimento se determinó el consumo de agua como un indicador de la evaluación del control de la enfermedad.

Los resultados de la medición de consumo de agua se presentan en la Figura 10, en los que se observa que desde la segunda semana de tratamiento, el consumo de agua por el grupo control diabético fue significativamente superior a algunos de los grupos (50,100 mg/kg) tratados con el extracto de timbe en un porcentaje alrededor de 36.5 %, sin embargo, los grupos de 25 y 50 mg/kg no presentaron un consumo de agua similar al del 100 mg, el cual presentaba los valores más bajos de agua, comparables desde la segunda semana con el grupo control sano ( $p < 0.05$ ). Este comportamiento se sigue presentando a lo largo del experimento y persiste hasta el final de la cuarta semana, lo que nos indica que la dieta con el extracto de timbe a alta concentraciones es más eficiente lo que conlleva a regular esta alteración de la enfermedad.

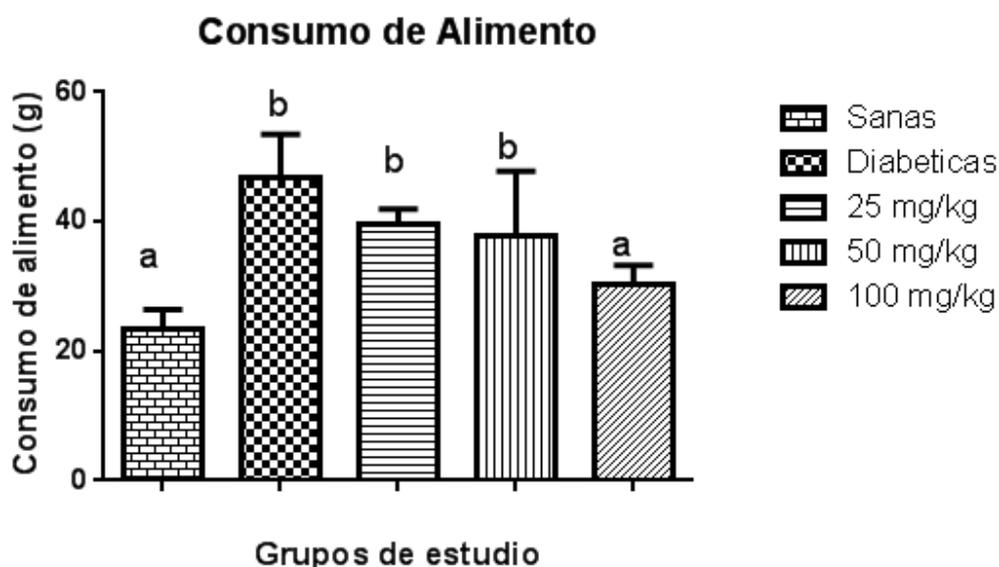


**Figura 10 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la ingesta de agua en ratas wistar.** Los valores se presentan como la media de la concentración en la ingesta de agua  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

#### **4.2.4. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la ingesta de alimento en ratas wistar sanas y diabéticas.**

Otra característica importante en la diabetes es la polifagia, es decir, un incremento en el consumo de alimento. La figura 11 corresponde a la cantidad promedio (g) de alimento consumido semanalmente por los grupos de estudio. A este respecto, se observó que los animales diabéticos consumieron mayor cantidad de alimento (50 %) que los animales sanos. Por otro lado, los grupos diabéticos tratados con el extracto de timbe consumieron una cantidad menor de alimento (hasta un 24 % menos) durante las semanas de tratamiento, con respecto al control diabético, sin embargo a partir de la tercer semana los grupos de 25 y 50 mg/ kg no mostraron un ninguna diferencia con este grupo diabético, siendo el grupo de 100 mg/kg el más significativo de todos los tratamientos, ya que se mantuvo desde la primera semana.

Con los resultados obtenidos en este estudio se pudiera sugerir que los niveles de insulina en nuestros tratamientos en especial el de 100 mg/kg han aumentado, mejorando así la expresión de péptidos anorexigénicos. La insulina inhibe la expresión de péptidos orexigénicos, encargados de inducir el hambre, además estimula la expresión de los anorexigénicos, los cuales provocan una sensación de saciedad (Milagro y col., 2002). Por lo tanto, si se incrementan los niveles de insulina, también se ve reflejado en una disminución en los niveles de glucosa, por lo que los resultados de estos grupos corroboran lo mencionado anteriormente.



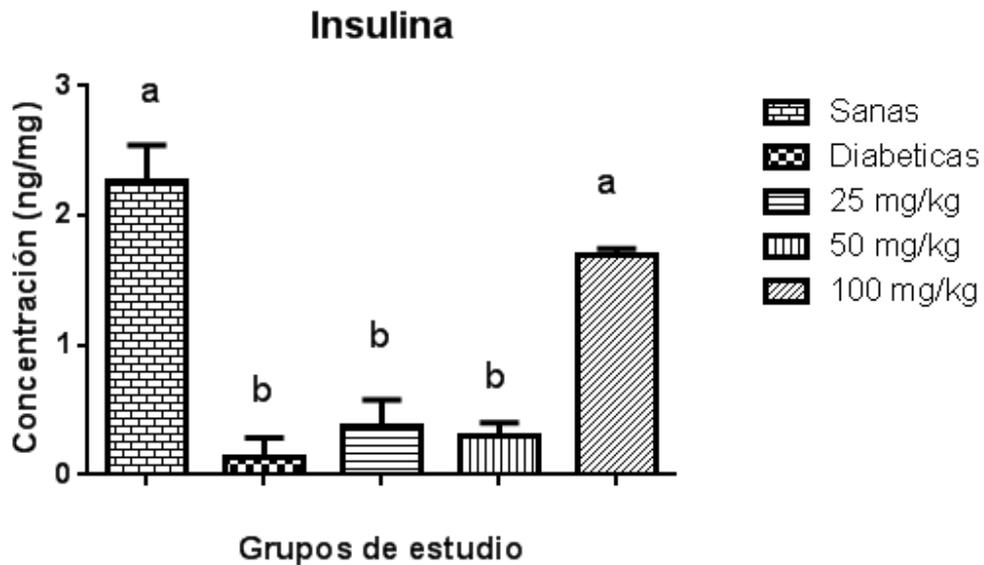
**Figura 11 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la ingesta de alimento en ratas wistar.** Los valores se presentan como la media de la concentración de la ingesta de alimento  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

Un control adecuado de la diabetes es importante, ya que los cambios que ocurren en etapas tempranas pueden ser reversibles. Con el fin de disminuir el número de complicaciones de la diabetes y retrasar su desarrollo, se ha recomendado el uso de componentes biológicos activos presentes en plantas. Los principios activos biológicos más importantes para este propósito son vitaminas y minerales, proteínas, polisacáridos, lectinas, saponinas y flavonoides. Según datos científicos dentro de las plantas más empleadas con este fin se encuentran ginseng, ginkgo, eleuterococo, anamú, uva, eucalipto, peibrinca, garra del diablo, mandarina, toronja, limón, naranja, romero, agrimonia, caléndula y avena. (Vázquez y col. 2005).

#### **4.2.5. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre los niveles de insulina sérica en ratas wistar sanas y diabéticas.**

Como se hablo anteriormente en la sección (4.3.1) La inducción de diabetes por estreptozotocina llega a causar un déficit de antioxidantes y un incremento de estrés oxidativo, originando de esta manera un daño y destrucción parcial de las células  $\beta$  pancreáticas, produciendo así una disminución de insulina que genera una baja incorporación de glucosa en los tejidos periféricos, lo que lleva al desarrollo de una condición diabética (Afoloyan y cols., 2011), comparable con la diabetes tipo 1.

Los resultados obtenidos en nuestros grupos de estudio se muestran a continuación, de los cuales se puede observar para el control diabético una reducción en la concentración de insulina en comparación con el control sano (figura 12). Sin embargo la administración de EMA en la concentración más alta (100 mg/kg) restauró significativamente los niveles de las ratas diabéticas cerca de lo normal. Estos resultados son similares a lo reportado por afoloyan et al., lo cual es consistente al obtener resultados semejantes en la diabetes inducida con STZ a ratas wistar macho. Estos resultados sugieren que el EMA posee una actividad hipoglucemiante que puede ser atribuida a la regeneración de células  $\beta$  pancreáticas o bien a la hipersecreción de insulina en las células  $\beta$  ya existentes.



**Figura 12 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la concentración de insulina sérica en ratas wistar sanas y diabéticas.** Los valores se presentan como la concentración de insulina  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

#### 4.2.6. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre el perfil de lípidos en ratas wistar sanas y diabéticas.

Además de los trastornos del metabolismo de la glucosa que caracterizan la diabetes mellitus, esta se ha relacionado estrechamente con anomalías de lípidos en plasma que incluyen la reducción de lipoproteínas de alta densidad (HDL), predominio de lipoproteínas de baja densidad (LDL) pequeñas y densas y elevados niveles de triglicéridos VLDL (ADA, 2003).

Estas alteraciones están asociadas con el incremento en el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, lo cual es una de las principales causas de muerte en los pacientes diabéticos (Ronald y col., 2004). Además en estos pacientes suelen

asociarse cambios en el patrón de los lípidos séricos que constituyen un riesgo importante desde el punto de vista vascular.

El daño vascular aterosclerótico es la complicación más común en los diabéticos. La enfermedad coronaria y la enfermedad cerebrovascular ocurren en el diabético en una frecuencia de 2 a 3 veces mayor que en aquellas personas que no padecen esta enfermedad. Estudios epidemiológicos destacan de manera especial que la frecuencia de insuficiencia arterial periférica es de 20 a 40 veces superior en los diabéticos en relación con las personas no diabéticas. Por lo tanto, los trastornos cardiovasculares en el diabético es no sólo mayor que en las personas no diabéticas, sino que además resulta más letal, sobre todo si se presenta acompañada de hipertensión arterial y albuminuria (Illnait, 1997).

La hipertrigliceridemia es la dislipidemia más frecuente en la diabetes. Es bien conocido que en la diabetes mellitus tipo 1, la deficiencia aguda de insulina produce un aumento rápido de la movilización de ácidos grasos desde los tejidos periféricos hacia el hígado, y determina un aumento de la formación y liberación de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL) en este órgano. Al mantenerse el déficit de insulina, se inhibe la síntesis de triglicéridos hepáticos y la formación y liberación de VLDL. Por otro lado, existe una deficiencia de la depuración de triglicéridos plasmáticos, bien por disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa (LpL), enzima estimulada por insulina, o por una posible modificación estructural de las VLDL (que las hace menos susceptibles a la acción de la enzima), incrementando la concentración plasmática de esta lipoproteína (Illnait, 1997).

En el cuadro 6 se muestra el perfil lipídico correspondiente a la ingesta de extracto de vaina de timbe en nuestros grupos de experimentación. En cuanto a los niveles de triglicéridos podemos observar que existe un incremento significativo en el grupo de ratas diabéticas control (222 mg/dl) comparado con el grupo de ratas sanas (78 mg/dl), como era de esperarse. Este estudio concordó con lo propuesto por Akthar y col. (2006) los cuales reportaron a otras especies de plantas como *Cathranthus Coccinia* y

*Cordifolia Roseus*, con un efecto hipolipemiente, semejante a lo obtenido en este estudio.

**Cuadro 6 Concentración del perfil de lípidos de ratas wistar, sanas y diabéticas alimentadas con diferentes concentraciones del extracto de timbe.**

Determinaciones	Sanas	Diabéticas	25 mg/Kg	50 mg/Kg	100 mg/Kg
CT	65.6 ± 4.0 <sup>a</sup>	104.2 ± 2.1 <sup>b</sup>	84.1 ± 4.4 <sup>b</sup>	74.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	69.9 ± 2.8 <sup>a</sup>
TG	78.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	222.4 ± 4.8 <sup>b</sup>	184.1 ± 3.6 <sup>b</sup>	189.1 ± 4.3 <sup>b</sup>	84.5 ± 2.1 <sup>a</sup>
HDL	59.4 ± 6.3 <sup>a</sup>	27.9 ± 2.3 <sup>b</sup>	26.8 ± 1.9 <sup>b</sup>	28.3 ± 3.7 <sup>b</sup>	54.2 ± 1.8 <sup>a</sup>
LDL	15.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	51.9 ± 4.3 <sup>b</sup>	30.5 ± 4.3 <sup>b</sup>	47.8 ± 3.9 <sup>b</sup>	17.6 ± 3.9 <sup>a</sup>
VLDL	18.5±0.8 <sup>a</sup>	40.6±1.4 <sup>b</sup>	39.4±1.6 <sup>b</sup>	35.7±0.6 <sup>b</sup>	22.9±0.5 <sup>a</sup>

Los valores se presentan como la media de la concentración (mg/dl) en suero sanguíneo ± E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey. TC= Colesterol total, TG= Triglicéridos, HDL=Lipoproteínas de alta densidad, LDL= Lipoproteínas de baja densidad.

Con respecto a los niveles de triglicéridos el grupo tratado con 100 mg/kg p.c. disminuyó la concentración al 63 % significativamente, respecto al control diabético, no siendo así para los demás grupos (25 y 50 mg/kg). Se puede decir que a altas concentraciones del extracto existe una regulación de los niveles de triglicéridos, siendo la concentración más alta la mejor para esta enfermedad. En este mismo contexto, podemos observar una tendencia similar a la disminución en los niveles de VLDL, por lo que en este estudio, la disminución de los niveles de VLDL y triglicéridos en sangre sugiere una protección a nivel vascular.

En cuanto al colesterol total (cuadro 6), al igual que los triglicéridos, el grupo de ratas sanas presenta una menor concentración de colesterol (65.6± 4.0 mg/dl), comparada con el grupo de ratas diabéticas control (104.2± 2.1 mg/dl). Se observa que las dietas con el extracto disminuyen el colesterol total, siendo la concentración de 100 mg/kg del la que presentó una menor reducción de este parámetro, casi alcanzando los niveles del grupo de ratas sanas.

La hipercolesterolemia en el paciente diabético podría deberse a un incremento en la síntesis de colesterol independiente de insulina, por aumento de VLDL circulante que

aporta el 20 % del colesterol total y por disminución del catabolismo de LDL, lo cual explicaría una disminución de colesterol en la ratas tratadas con frijol.

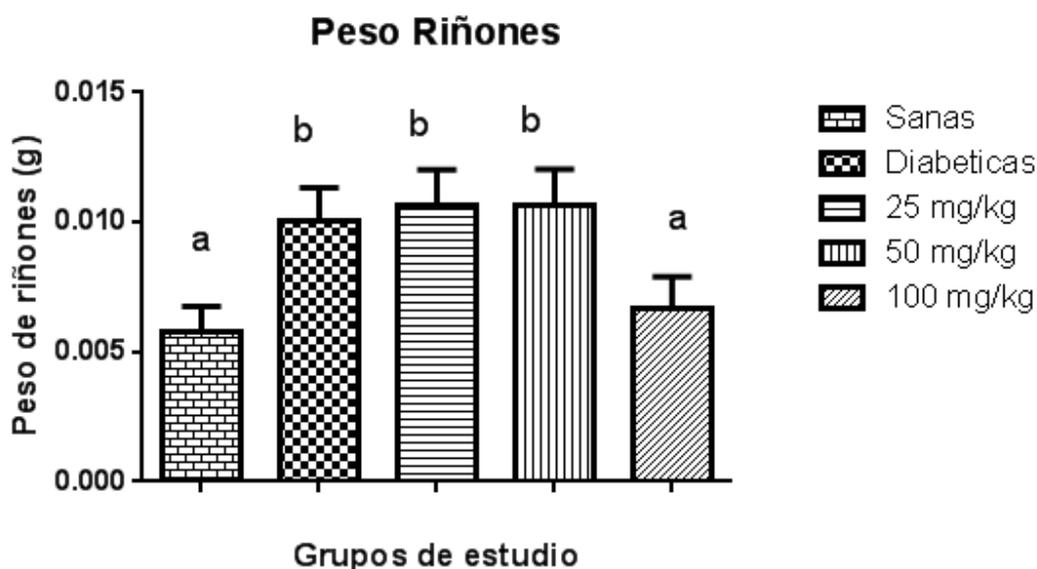
Un parámetro de riesgo cardiovascular, son los niveles elevados de LDL en sangre. Por lo que en el cuadro 6 se puede observar que las ratas sanas presentan niveles bajos de LDL ( $15.5 \pm 1.4$  mg/dl) comparada con las ratas diabéticas control ( $51.9 \pm 4.3$  mg/dl) las cuales presentan aproximadamente 3 veces más concentración de LDL, incrementando el riesgo cardiovascular.

#### **4.2.7. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre el peso relativo de los riñones en ratas wistar sanas y diabéticas.**

Una de las complicaciones propias de la diabetes es la nefropatía diabética, en donde una de las características más comunes es la hipertrofia de los riñones.

Debido a que se mantiene elevada el azúcar en la sangre existe una mayor filtración de los riñones, debido a que hay un aumento del flujo de sangre y éstos se hacen más grandes. Por ello en este experimento se tomó en cuenta el peso de los riñones como un indicador del control de esta complicación.

En la Figura 13 se puede observar que el peso relativo de los riñones de las ratas diabéticas (0.010) fue mayor comparado con el de las ratas sanas (0.007) ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, los grupos de ratas diabéticas a los que se les incorporó el extracto (25 y 50 mg/kg) en su dieta, no mostraron ninguna diferencia con respecto al peso de los riñones del control diabético, siendo estadísticamente significativo para la concentración más alta (100mg/kg). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Yamabe y col., (2007), quienes observaron que en ratas Wistar macho diabéticas inducidas con estreptozotocina existe un aumento en el peso de los riñones respecto a las ratas sanas, y que la administración intragástrica de polifenoles extraídos de *Corni fructus* (20 mg/kg P.C.) a ratas diabéticas disminuye significativamente el peso de los riñones, sugiriendo que estas fracciones mejoran los cambios renales y la hipertrofia.



**Figura 13 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre el peso relativo de los riñones en ratas wistar sanas y diabéticas.** Los valores se presentan como el peso relativo de los riñones (peso de ambos riñones/peso corporal)  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

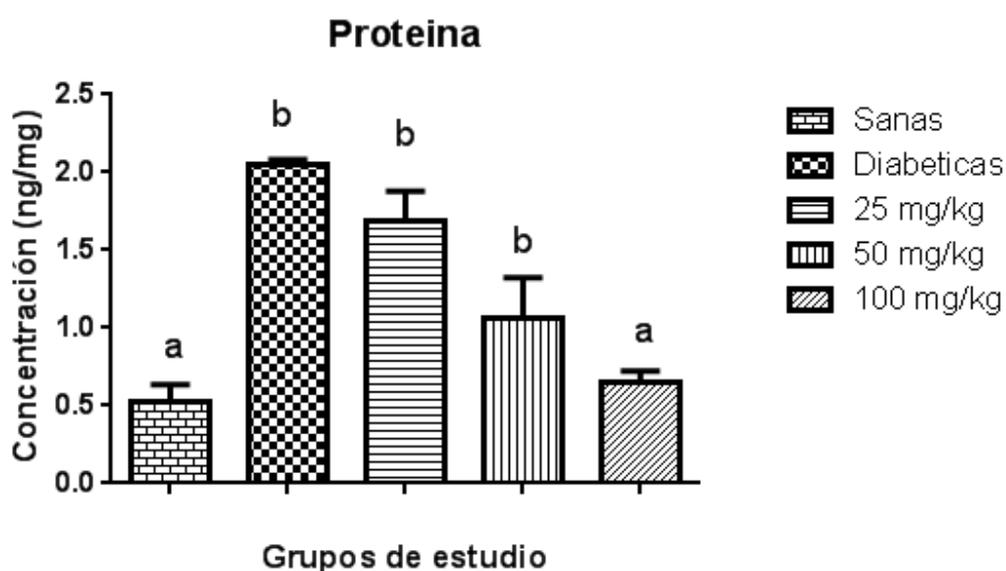
#### 4.2.8. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la concentración de proteína en la orina de ratas wistar sanas y diabéticas.

La albúmina es una proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo, siendo la principal proteína de la sangre; posee una carga negativa, lo que impide su filtración glomerular a la orina ya que la membrana basal del glomérulo renal también posee carga negativa. La hiperglicemia puede alterar la permeabilidad del glomérulo renal disminuyendo su carga negativa permitiendo así el paso de las proteínas (Bazari, 2007), estos cambios conllevan a una enfermedad secundaria conocida como nefropatía diabética la cual es la causa la causa más común de insuficiencia renal crónica (Atlas de la diabetes, 2002).

Un examen de proteína urinaria mide la cantidad de proteínas, como albúmina, que se encuentra en una muestra de orina y esto se ha utilizado como referencia para evaluar daño renal. Por lo cual uno de los parámetros que se tomó en cuenta para evaluar el daño renal fue la presencia de albúmina en la orina.

Los resultados de la evaluación de proteína en orina se presentan en la Figura 14 y mostraron que los animales alimentados con las mas alta concentraciones tuvieron los niveles de proteína en orina 64% menor que el Control Diabético, de igual forma la concentración de 25 mg/kg no mostro ninguna diferencia significativa aunque mostro una disminución del 34% respecto a las ratas diabéticas sin tratamiento.

Así, estos resultados pudieran sugerir asociado un efecto protector sobre daño renal asociado al consumo de este extracto.

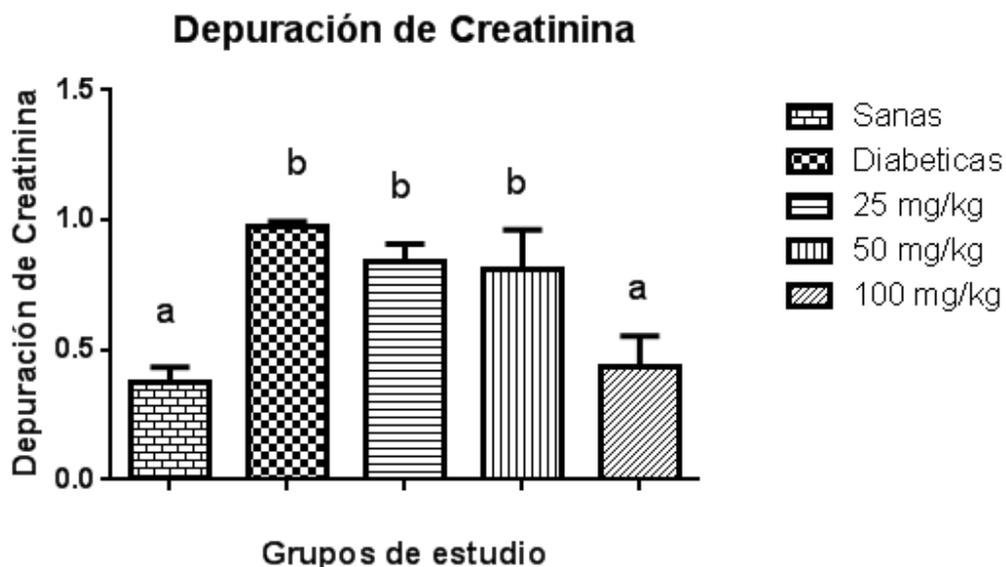


**Figura 14 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la concentración de proteína en orina de ratas wistar sanas y diabéticas.** Los valores se presentan como la concentración de proteína  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

#### **4.2.9. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la depuración de creatinina en ratas wistar sanas y diabéticas.**

La creatinina es un compuesto generado a partir de la degradación de la creatina que es un nutriente útil para los músculos. Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que usualmente es producida por el cuerpo en una tasa muy constante (dependiendo de la masa de los músculos), y normalmente filtrada por los riñones y excretada en la orina (Bazari, 2007). La medición de la creatinina es la manera más simple de monitorizar la correcta función de los riñones. El examen de depuración de creatinina compara el nivel de creatinina en la orina con el nivel en la sangre y es una medida de la rapidez con la cual los riñones remueven la creatinina de la sangre, niveles por debajo de los establecidos en los humanos indican una afectación renal (Fierro, 2009).

Los resultados para la evaluación de depuración de creatinina presentados en la Figura 15, mostraron que los animales tratados con el extracto a la más alta concentración tuvieron niveles de depuración estadísticamente significativos con un 34%, superior al Control Diabético lo cual concuerda con los resultados de la evaluación de proteína en orina en la que se observó que los animales que consumieron el extracto a esta concentración presentaron los niveles más altos comparables con las ratas sanas lo que sugiere que el consumo de este extracto tuvo un efecto protector sobre la función renal. Estos resultados coinciden con los de Ortega (2010), quien encontró que el consumo de frijol ejerce un efecto protector sobre daño renal en ratas diabéticas disminuyendo los niveles de albúmina en orina.



**Figura 15 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la depuración de creatinina en ratas wistar sanas y diabéticas.** Los valores se presentan como la concentración en la depuración de creatinina  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

Por otro lado se observo que los grupos tratados con las concentraciones de 25 y 50 mg/kg no mostraron niveles significativos con las ratas del control diabético, mostrando valores semejantes a este grupo control, lo que concuerda con la evaluación de proteína en orina para estos grupos, lo que pudiera indicar que el efecto de este extracto en las ratas diabéticas es dosis dependiente.

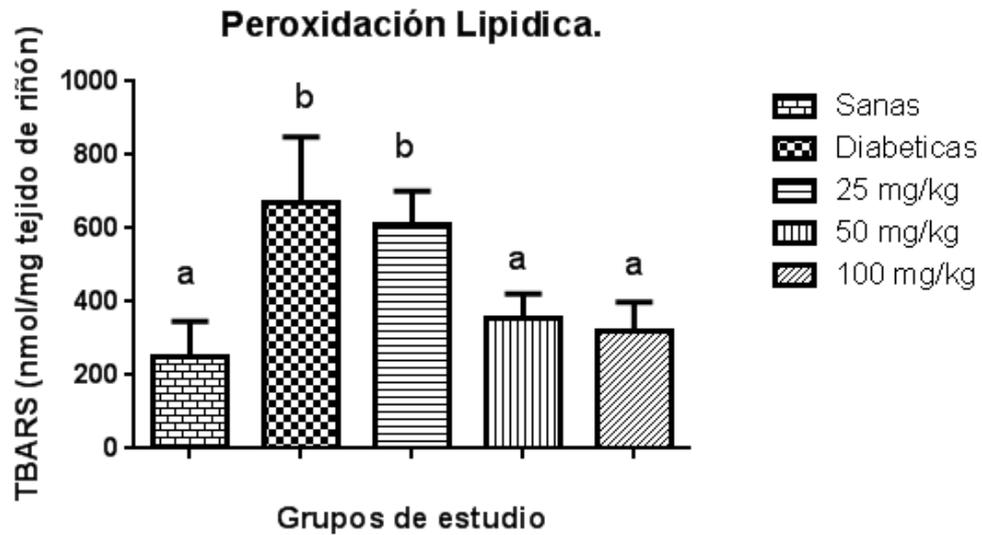
#### **4.2.10. Efecto del consumo de extracto de vaina de Timbe sobre la peroxidación lipídica en ratas wistar sanas y diabéticas.**

Se ha demostrado que el aumento en el daño oxidativo a biomoléculas, la insuficiente capacidad de reparación de las lesiones producidas y la disminución en el nivel y actividad de enzimas y antioxidantes exógenos, son factores que contribuyen en la etiopatogenia de enfermedades como diabetes y sus complicaciones, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedades del sistema inmune e inflamación, entre otras (Beristan-Pérez y col., 2006).

El ensayo llamado "TBARs" (sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico) siempre se ha considerado como un buen "marcador analítico" de estrés oxidativo que resulta de una peroxidación lipídica intensiva de las membranas biológicas (Jin et al., 2008). Este mecanismo es en gran parte debido al aumento del estrés oxidativo y de la pobre producción de antioxidantes y al aumento en la peroxidación lipídica en los tejidos de las personas diabéticas. Las altas concentraciones de peróxidos de lípidos puede propagar el daño oxidativo por el aumento del peróxido y los radicales hidroxilo, contribuyendo al deterioro funcional de diversos órganos (Ravi et al., 2004).

En nuestro estudio la figura 16 revela que las ratas del control diabético mostraron un aumento ( $P < 0,05$ ) en las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en comparación con las ratas sanas. Los tratamientos con dosis de 50 y 100 mg/Kg fueron capaces de atenuar de manera significativa ( $P < 0,05$ ) este aumento en el nivel de TBARS, comparados con el control diabético, logrando valores similares al control de ratas sanas. Con lo que sugerimos que la administración del extracto de timbe potencializa la disminución de los niveles de TBARS, por acción de los compuestos bioactivos de esta planta, a los que se les atribuyen los principios antioxidantes que producen tales respuestas.

Esto es esperable ya que en ensayos donde se emplee este modelo, la administración de extractos y/o compuestos con posible actividad antioxidante lograra atenuar este fenómeno. Una observación similar a nuestros resultados fue lo reportado en la administración de un extracto de *punica granatum* (Bagri et al., 2009) en donde de acuerdo al autor el extracto puede ser eficaz en la corrección de la hiperglicemia y en la prevención de complicaciones de la diabetes.



**Figura 16 Efecto del consumo de extracto de vaina de timbe a diferentes concentraciones, sobre la peroxidación lipídica en ratas wistar sanas y diabéticas.** Los valores se presentan como los niveles de TBARS  $\pm$  E.E. Letras diferentes a y b indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ), analizados con la prueba de tuckey.

## 5. CONCLUSIONES.

El extracto metanólico (EMA) mostró un mayor contenido de compuestos bioactivos como fenoles totales, taninos condensados y flavonoides totales respecto al extracto acuoso (EAA), teniendo de la misma forma una alta capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) en este extracto, lo que nos sugiere que el metanol extrae mejor los compuestos bioactivos presentes en esta especie, en comparación del agua, por lo que se presenta una mayor disociación en este tipo de extractos.

En los estudio *in vivo* el extracto incorporado a la dieta de ratas diabéticas como tratamiento fue el EMA, el cual a su vez mostró el mayor efecto antidiabético a la concentración de 100 mg/kg p.c., al disminuir los niveles de glucosa, siendo tal efecto dosis-dependiente. Este efecto antidiabético parece estar relacionado al contenido de compuestos bioactivos, ya que el EMA mostró mayor cantidad que el EAA.

La disminución de triglicéridos observada en los animales diabéticos puede ser atribuida al efecto hipoglucémico producido por el EMA. La regulación de estos parámetros está en función de la evolución de la enfermedad.

La incorporación de EMA a la dieta de ratas diabéticas, a partir de 50 y 100 mg/kg p.c. disminuye los niveles de colesterol séricos, independientemente del control de los niveles de glucosa. Por lo que el consumo de este extracto puede ser una alternativa para disminuir el riesgo cardiovascular asociado a diabetes.

Los parámetros empleados para la evaluación de daño renal fueron significativos solamente para la concentración más alta (100 mg/kg P.C.). En esta concentración se observó que el consumo de EMA incorporado a la dieta disminuye los niveles de microalbúmina en orina. Este efecto está relacionado con una menor concentración sérica de creatinina.

La incorporación del extracto (EMA) a la concentración de 50 y 100 mg/kg P.C. disminuye el estrés oxidativo del riñón obteniendo concentraciones bajas de TBARS, casi comparables con el control sano.

El consumo de Timbe (*Acacciella angustissima*) como extracto, posiblemente puede ser utilizado en la dieta como coadyuvante en personas diabéticas, aunque también podría ser empleado en personas sanas por disminuir los picos glucémicos producidos por alta ingesta de glucosa, produciendo efectos hipoglucemiantes, hipolipídemicos y por ende antiinflamatorios que ayudarían a prevenir y disminuir el riesgo de progresar a otras complicaciones como daños cardiovasculares y nefropatía.

## 6. REFERENCIAS.

- ADA. American Diabetes Association. 2003.** Management of dyslipidemia in adults with diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 26 (Suppl. 1): S83-S86.
- Afoloyan, A. J., Sunmonu, T. O. 2011.** *Artemisa afra*. Jacq. Ameliorates oxidative stress in the pancreas of estroptozotocina- induced diabetic wistar rats. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 75 (11), 2083-2086.
- Akhtar, M. A., Rashid, M., Wahed, M. I, I., Islam, M. R., Shaheen, S. H., Islam, A., Amran, M.S., Ahmed, M. 2007.** Comparison of Long-term Antihyperglycemic and Hypolipidemic Effects Between *Coccinia cordifolia* and *Catharanthus roseus* In Alloxan-induced Diabetic Rats. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences.* 2(1), 29–34.
- Ambriz T. 2007.** “Evaluación del efecto del Frijol (*Phaseolus vulgaris*) y del chilacayote (*Cucúrbita ficifolia*) sobre los niveles de la proteína  $\text{tgf-}\beta_1$  relacionada con la alteración renal en ratas diabéticas. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Amoroso, A., Torres, H. 2007.** Insulino resistencia, prediabetes, diabetes y riesgo cardiovascular. Riobamba. IESS. p.p 344.
- Aronson, D. 2008.** Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv. Cardiol.* 45:1-16.
- Arreola Ortíz, J. F., Partida Hernández, G. 2005.** Diabetes Mellitus. “Etiopatogenia, cuadro clínico y diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1”. Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección II. Cap. 5. p. p. 109-119.
- Atlas de la diabetes. Ian, N. Scobie, M. D. 2002.** Medway maritime hospital. 2ª edición. The encyclopedia. 7-31.
- Ávalos- García, A., Pérez- Urria Carril E., 2009.** Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología).* Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Avila-Curiel, A., Shamah-Levy, T., Galindo-Gómez, C., Cuevas-Nasu, L., Moreno-Macías, H. Chávez-Villasana, A. 2007.** Diabetes mellitus within low socioeconomic strata in México City: a relevant problem. *Rev. Invest. Clin.* 59:246-55.
- Bagri, P., Ali, M., Aeri, V., Bhowmik, M., Sultana, S. 2009.** Antidiabetic effect of *punica granate* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and

antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and chemical toxicology*. 47,50-54.

**Bazari, H. 2007.** Approach to the patient with renal disease. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Saunders Elsevier; 2007: chap 115.

**Bennett, P. H., Knowler, W. C. 2001.** Joslin's Diabetes Mellitus. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and glucose metabolism. 13th edition. C. Ronald Kahn and Gordon C. Weir; eds. Lea & Febiger. Philadelphia. 19:331-339.

**Boussaada, O. 2008.** Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* of *Evax pygmaea* (*Asteraceae*) growing wild in Tunisia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:1289–1296.

**Braunwald E., Fauci A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L. y Jameson, J. L. 1998.** Principios de medicina interna Harrison. 15a edición. Editorial Mc. Graw Hill. p. p. 2467-2487.

**Bupa's published health information team** Type 1 diabetes. Revisado el día 10 de octubre del 2011 en la página web: [http://hcd2.bupa.co.uk/fact\\_sheets/html/diabetes1.html#2](http://hcd2.bupa.co.uk/fact_sheets/html/diabetes1.html#2)

**Burcelain R, Eddouks M, Maury J, Kande J, Assan R, Girard J., 1995.** Excessive glucose production rather than insulin resistance accounts for hypoglycemia in recents diabetic rats. *Diabetologia*.38:283–90.

**Braunwald, E., Fauci, A. S., Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L. 1998.** Principios de medicina interna Harrison. 15ª edición. Editorial Mc. Graw-Hill. p. p. 2467-2487.

**Brownlee, M. 2001.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414: 813-820.

**Cardador-Martínez A., Castaño-Tostado E. and Loarca-Piña, G. 2002.** Antimutagenic activity of natural phenolic compounds present in common beans against aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food Add Cont.* 19: 62-69.

**Carrillo J. y Bear R. 2004.** Biomarcadores, inflamación, estrés oxidativo, lípidos y aterotrombosis. *Atherosclerosis: Un proceso inflamatorio*. *Arc Card Méx.* 74, Supl. 2: S379-S384.

**Cases A., Bragulat E., Serradell M., Vera M., De la Sierra A. and Escolar G. 2003.** Disfunción endotelial en la insuficiencia renal crónica. *Nefrología*. 23 Suplemento 4:42-51.

**Cetto, A.A.a.M.H., Mexican plants with 38 hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes.** *Journal of Ethnopharmacology*, 2005: p. 99:p.325--348.

- Escobedo de la Peña, J., Rico Verdín, B. 1996.** Incidencia y letalidad de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus en México. *Salud Pública Mex.* 38:236-242.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M. 2002.** Stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23:599–622.
- Federación Mexicana de Diabetes. 2003.** Control total de la diabetes para el médico tratante. Editorial Intersistemas, S. A. de C. V. México, D. F.
- Feregrino-Pérez A. A., Torres-pacheco I., Vargas- Hernández M., Munguia-Fragoso P. 2011.** Antioxidant and antimutagenic activities of acacia pennatula pods. *Journal scientific & Industrial research.* 70: 859-864.
- Fierro, J. A. 2009.** Diabetic nephropathy: physiopathology, diagnosis, clinical progressing and epidemiology. *Rev Med Clin Condes.* 20(5): 639 – 650.
- Flores, S. E., Machorro, L. 2005.** Diabetes Mellitus. Epidemiología molecular en la diabetes mellitus y sus complicaciones. 3ª ed. Ed. McGraw-Hill. Pp. 35-69.
- Fraga, C.G., Leibovitz, B.E., Tappel, A.L. 1988.** Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Radic. Biol. Med.* 4, 155–161.
- García, V. A.** Revisado el día 11 de agosto de 2012 en la página web: [http://www.uam.es/personal\\_pdi/medicina/algvilla/db/macroangio.html](http://www.uam.es/personal_pdi/medicina/algvilla/db/macroangio.html).
- Gaviria, C. 2007.** Actividad antioxidante de los compuestos metanólicos de *Attalea butyracea*. *Scientia Technica* 33:297-298.
- Guan Y. y Breyer M. D. 2001.** Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease. *Kidney Int.* 60:14-30.
- Guyton, A. 1999.** Tratado de fisiología médica. “Insulina, glucagón y diabetes mellitus.”, 8ª edición. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. 78:1063-1077.
- Guyton, H. 2001.** Tratado de fisiología médica. Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana. 10ª edición. Ed. Mc Graw Hill Interamericana.
- Guzmán, N., Madrigal, B.E. 2003.** Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica.* 28: 14-23
- Harini R., Pugalendi K.V., 2010.** Antihyperglycemic effect of protocatechuic acid on streptozotocin-diabetic rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 21:79-91.

- Hayes, M. G., Pluzhnikov, A., Miyake, K., Sun, Y., Ng, M. C., Roe, C. A., Below, J.E., Nicolae, R. I., Konkashbaev, A., Bell, G. I., Cox, N. J., Hanis, C. L. 2007.** Identification of type 2 diabetes genes in Mexican Americans through genome-wide association studies. *Diabetes*. 56:3033-3044
- Hernandez A.M., Gutierrez, J.P., Reynoso, N.N. 2013.** Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública Mex.*2:SI29-SI36.
- Hong, Y.J., Barrett D.M., Mitchell ,A.E. 2004.** Liquid chromatography/mass spectrometry investigation of the impact of thermal processing and storage on peach procyanidins. *J Agric Food Chem* 52:2366–2371.
- Illnait, P. J. 1997.** La dislipidemia en el paciente diabético. Parte I: Bioquímica patológica. *Rev. Cubana Med. Gen. Integr.* 13:372-377.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía.** Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes. Datos nacionales. Revisado el día 29 de enero del 2012 en la página web: [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../2010/diabetes0.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../2010/diabetes0.doc)
- Islas, S., Revilla, M. C. 2005.** Diabetes Mellitus. “Diabetes Mellitus: concepto y nueva clasificación”. Tercera Edición. Edit. McGraw- Hill. Cap. 1: 3-20.
- King, S. S. 1991.** Líquidos corporales y análisis de orina. Función y enfermedades del riñón. Ed. El manual moderno. México, D.F. 23-25.
- Kwok B. H. B., Koh B., Ndubuisi M. I., Eloffson M. and Crews C. M. 2001.** The antiinflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits I $\kappa$ B kinase. *Chem Biol.* 8: 759–766.
- Liu, M., Li, X. Q., Weber, C. 2002.** Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2926-2930.
- Martínez-Flórez S. 2002.** Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria.* 17:271-278.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E. 2002.** Bioquímica, “Metabolismo de los hidratos de carbono II: Biosíntesis”. 2ª edición. Edit, McGraw-Hill. Interamericana. 16:615-617, 626.
- Mediavilla-Bravo, J.J. 2002.** La diabetes mellitus tipo 2. *Med Integral.* 39:25-35.
- Meyts P.D. 2000.** Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bio Essays.* 26:1351-1356.

- McCarthy A. M., Elmendorf JS 2007.** GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J Med Res* 125:373- 388.
- Milagro, F., Marques-Lopes, I. 2002.** Sistema nervioso y obesidad. *An. Sist. Sanit. Navar.* 1:41-52.
- Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.** Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de animales de laboratorio.
- Organización Mundial de la Salud.** Revisado el día 29 de enero de 2012 en la página web:  
[http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world\\_diabetes\\_day/es/index.html](http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_diabetes_day/es/index.html).
- Palma G. J. 2007.** La diabetes mellitus entendida como una enfermedad cardiovascular de origen metabólico. *Diabetol Cardiol.* 7:12H-19H.
- Pari, L., Venkateswara, S. 2003.** Effect of an aqueous extracto of *Phaseolus vulgaris* on plasma insulin and hepatic key enzymes of glucosa metabolism in experimental diabetes. *Pharmazie.* 58:916-925.
- Ravi, K., Ramachandran, B., Subramanian, S. 2004.** Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin- induced diabetes in rats. *Life Sci.* 75 (22), 2717-2731.
- Ronald, M., Krauss, M. 2004.** Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care.* 27:1496–1504.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
- Santangelo, C., Vari, R., Schazzocchio, B., Benedetto, R., Filesì, C., Masella, R. 2007.** Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. *Ann. Ist. Super Sanità.* 43:394-405.
- Schultz, J., Harris, A., Rychly, D., Ergul A. 2005.** Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic Science to clinical practice. *Rev. Bio. Central.* p. p. 1-11.
- Secretaría de Salud,** Dirección General de Evaluación del Desempeño, Dirección General de Información en Salud, Subsecretaría de Innovación y Calidad.2004. *Salud: México* 2003. p. p. 46-47.
- Secretaría de Salud. 2008.** *Boletín de información estadística 2008.* México: SSA. Revisado en INEGI 2008.

- Secretaría de Salud 2003.** *Mensaje del doctor Julio Frenk Mora, Secretario de Salud, en la inauguración del 15° Congreso Nacional de la Federación Mexicana de Diabetes.* Documento revisado el 28 de septiembre de 2010 de: [http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala\\_noticias/discursos/2003-03-20-FEDERACION-MEXICANA-DE-DIABETES.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala_noticias/discursos/2003-03-20-FEDERACION-MEXICANA-DE-DIABETES.html).
- Serrano, J., Goñi, I. 2004.** Papel del frijol negro *Phaseolus vulgaris* en el estado nutricional de la población guatemalteca. ALAN 54:1.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela, R. M. 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299, 152-178.
- Stienstra R., Duval C., Muller M., Kersten S. 2007.** PPARs, Obesity and inflammation. *PPAR Res.* 23:5974-5978.
- Terrones-Rincón R. 2006.** Arbustivas Nativas de uso multiple en Guanajuato Libro técnico No.1. INIFAP. 1:1-99.
- Tsimidou, M. 1998.** Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Ital. J. Food Sci.* 2:99-116.
- Van Der Berg, R., Haenen, G. R. M., Van Der Berg, H. B. A. 1999.** Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66, 511-517.
- Vargas H.M., Munguia F.P.2010.** “Estudio genético y evaluación de las capacidades antioxidantes y antifúngicas de dos especies arbustivas de Querétaro”. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Vásquez, A. 2007.** Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *alvia sochensis*, *Bidens reptons* y *Montanoa ovalifolia*. *Scientia et Technica.* 33:205-207.
- Vázquez Vega, B., Meza Molina, L. M., Islas Andrade, S. 2005.** Diabetes Mellitus. “Nefropatía diabética”. Tercera Edición. Edit. McGraw-Hill. Sección VII. Cap. 19. p. p. 330-347.
- Wautier M. P., Chappey O., Corde S., Stern D. M., Schmidt A. M. y Wautier J. L. 2001.** Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol.* 280: E685-694.
- World Health Organization (WHO). 2009.** Screening for type 2 diabetes. Report of a World Health Organization and Internacional Diabetes Federation Meeting, WHO/NMH/MNC/0.31.

**Yamagishi, S., Fukami, K., Ueda, S., Okuda, S. 2007.** Molecular mechanism of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr. Drug. Targets.* 8:952-959.

**Yoon M.R. 2008.** Antioxidative and antimutagenic activities of 70% Ethanolic Extracts from Four Fungal Mycelia-Fermented Specialty Rices. *Journal of Clinical and biochemical Nutrition.* 43:118–125.

## 7. ANEXOS

### **Anexo 1. Metabolismo de plantas.**

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones, a estas moléculas se les denomina metabolitos primarios.

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales) (Fig. 17)

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.

Es importante destacar que también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc.

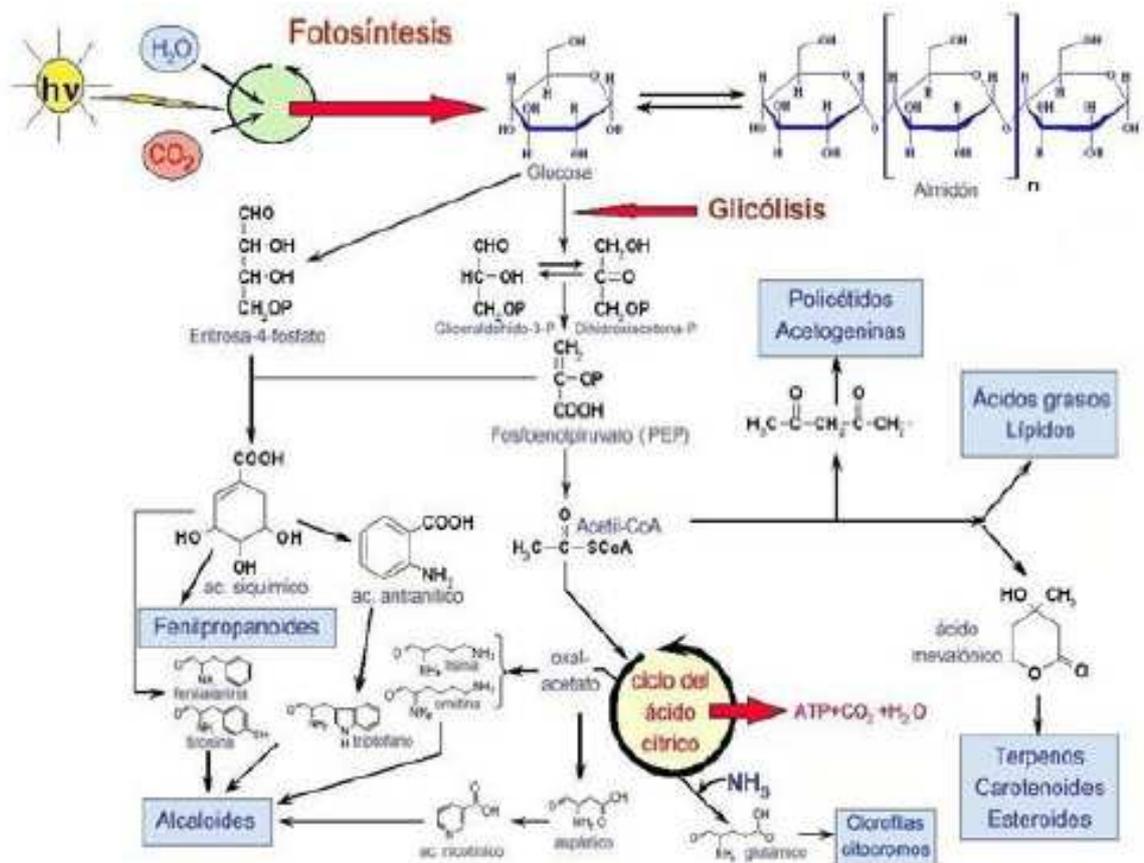


Figura 17 Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, fenilpropanoides y terpenos) en el metabolismo primario.

## **Anexo 2. Determinación de perfil lipídico**

### **Determinación de triglicéridos**

Los triglicéridos se determinaron a partir de la hidrólisis enzimática con lipasas mediante un kit enzimático marca Randox, el cual emplea un método colorimétrico. Este análisis se basa las siguientes reacciones. Los triglicéridos presentes en la muestra dan lugar a glicerol por medio de hidrólisis enzimática con lipasas. El glicerol formado se convierte a glicerol-3-fosfato por acción de la enzima glicerol cinasa, éste, al estar en presencia de oxígeno y por la enzima glicerol fosfato oxidasa produce el compuesto dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con el 4 aminofenazona y el 4-clorofenol, y mediante la enzima peroxidasa se produce el compuesto colorido quinoneimina (indicador) el cual, finalmente, se lee en un lector de ELISA Turnable Versamax a 546 nm. En donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de triglicéridos en suero sanguíneo, ésta se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de triglicéridos (mg/dL)} = \frac{\text{Abs de la muestra} * 200}{\text{Abs del estándar}}$$

### **Determinación de colesterol total**

La concentración de colesterol total en sangre se evaluó mediante un kit de la marca Randox, en donde los esteres de colesterol de las muestras se hidrolizaron por medio de la colesterol esterasa, produciendo colesterol libre el cual en presencia de oxígeno y por acción de la colesterol esterasa formó el colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno, este último en presencia de a 4- aminoantipirina y fenol, mediante la enzima peroxidada, dieron lugar al compuesto colorido quinoneimina, que fue leído en un lector de ELISA Turnable Versamax a una longitud de onda de 546 nm. En donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de colesterol en suero sanguíneo, la cual se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{Abs de la muestra} * 200}{\text{Abs del estándar}}$$

### **Determinación de HDL (lipoproteína de alta densidad)**

La concentración de colesterol HDL en suero sanguíneo se cuantificó mediante un kit de la marca Randox. Donde se siguió la siguiente metodología.

Primero se llevó a cabo una precipitación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL y VLDL) y de las fracciones de quilomicrones presentes en la muestra, por medio del ácido fosfotúngstico en presencia de iones de magnesio.

Posteriormente las muestras se centrifugaron y se obtuvo el sobrenadante, donde se encuentra la fracción HDL, éste, se hidrolizó por medio de la enzima colesterol esterasa, produciendo colesterol libre el cual en presencia de oxígeno y con la enzima colesterol esterasa produce el colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno. La 4-aminoantipirina y el fenol en presencia del peróxido de hidrógeno formado y por acción de la enzima peroxidasa dieron lugar a un compuesto colorido (quinoneimina) que fue leído a una longitud de onda de 546 nm en un lector de ELISA Turnable Versamax. La concentración de colesterol es proporcional a la coloración producida y se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de HDL (mg/dL)} = \frac{\text{Abs de la muestra} * 150}{\text{Abs del estándar}}$$

### **Determinación de LDL y VLDL (lipoproteínas de baja densidad)**

La concentración de las proteínas de baja densidad LDL, no son valores analíticos si no que se determinan matemáticamente mediante la fórmula de Friedewald.

$$\text{Concentración de LDL (mg/dL)} = \text{colesterol total} - \text{VLDL} - \text{HDL}$$

A su vez, la concentración de VLDL, se determina empleando la siguiente fórmula, solo si la concentración de triglicéridos tiene un valor igual o inferior a 400 mg/dL.

$$\text{Concentración de VLDL (mg/dL)} = \frac{\text{concentración de triglicéridos (mg/dL)}}{5}$$

### Anexo 3. Determinación de la concentración de creatinina.

Los cálculos se realizan mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Creatinina suero (mg/dL)} = \frac{(\text{A2-A1 de la muestra})}{(\text{A2-A1 del Patrón})} \times \text{Concentración Patrón (mg/dl)}$$

$$\text{Creatinina orina (mg/24 horas)} = \frac{* \text{ mg/dl} \times \text{volumen urinario (en mL)}}{100}$$

$$\text{Depuración (ml/minuto)} = \frac{U}{S} \times VM$$

Donde:

U= creatinina en la orina (mg/dl)

S= creatinina en el suero (mg/dl)

VM= Volumen minuto (Vol. Urinario de 24 h (ml), dividido por 1440), estos minutos equivalentes a 24 horas.