



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO ANTIOXIDANTE DEL COMPUESTO 3-FORMIL-2,4-DIHIDROXI-
5,6-DIMETIL BENZOATO DE SODIO SOBRE ISLOTES PANCREÁTICOS
DE RATA CON APOPTOSIS INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

NANCY MARÍA VIRIDIANA SÁNCHEZ LIRA



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Perla Carolina Castañeda López

VOCAL: **Profesor:** Martha Leticia Jiménez Pardo

SECRETARIO: **Profesor:** Lidya Sumiko Morimoto Martínez

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Omar Noel Medina Campos

2° SUPLENTE: **Profesor:** Ignacio Camacho Arroyo

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

ASESOR DEL TEMA:

LIDYA SUMIKO MORIMOTO MARTÍNEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

TONANTZIN CITLALI SOSA LARIOS

SUSTENTANTE:

NANCY MARÍA VIRIDIANA SÁNCHEZ LIRA

INDICE

1 Resumen	1
2 Introducción.....	3
2.1 El páncreas	3
2.2 Diabetes mellitus.....	4
2.3 Estrés oxidante	6
2.4 Apoptosis y necrosis	7
2.5 Estreptozotocina	11
2.6 Antioxidantes.....	13
3 Objetivo	18
4 Hipótesis.....	18
5 Metodología.....	18
5.1 Ensayo de DPPH	18
5.2 Aislamiento de islotes	19
5.3 Tratamiento de los islotes con el compuesto A4	20
5.4 Técnica histológica de microscopía electrónica	21
5.3 Técnica de TUNEL.....	22
6 Resultados	23
6.1 Captura del radical libre DPPH	23
6.2 Microscopía electrónica	25
6.3 Técnica de TUNEL.....	31
7 Discusión de resultados.....	33

8 Conclusión.....	36
9 Bibliografía	37

1 Resumen

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica multifactorial en la que ocurre la destrucción de las células beta pancreáticas, generando una disminución en la secreción de insulina. Como consecuencia se produce hiperglucemia que provoca estrés oxidante y la muerte de dichas células.

Se ha reportado el efecto de diversos antioxidantes que actúan como agentes protectores contra el daño por estrés oxidante, tal es el caso del resveratrol, el cual —debido a sus características estructurales— disminuye la producción de radicales libres en las células beta. De acuerdo con éstos antecedentes, y conociendo la estructura del compuesto 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de sodio (A4), se especuló que podía ser un compuesto antioxidante.

El objetivo de este trabajo fue la determinación de la actividad antioxidante del compuesto A4 en islotes pancreáticos de rata, a los que se les indujo estrés oxidante por el tratamiento con estreptozotocina (STZ).

Se utilizó el ensayo de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) para determinar la actividad antioxidante del compuesto estudiado y, después de confirmar que el compuesto tenía capacidad antioxidante, se realizaron pruebas *in vitro* con islotes pancreáticos de rata, tratados con el compuesto A4 a tres diferentes concentraciones (25, 50 y 100 μ M), y posteriormente se indujo apoptosis con STZ. En el análisis por microscopía electrónica, se observó que el compuesto presentaba protección contra el daño inducido, mientras iba en aumento su concentración, pues al realizar el análisis de las células de los islotes había disminución de la presencia de cuerpos apoptóticos, daño en las mitocondrias y retículo endoplásmico. Para corroborar estas observaciones se utilizó la técnica de TUNEL (terminal deoxy nucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, por sus siglas en inglés), para la detección de células con muerte celular. Se observó que, a mayor concentración del compuesto A4 en presencia de la STZ, había una disminución de núcleos apoptóticos.

De acuerdo con éstos resultados, podemos concluir que el compuesto 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de sodio, tiene un efecto protector en los islotes pancreáticos de rata contra el daño ocasionado por la STZ.

2 Introducción

2.1 El páncreas

El páncreas es una glándula alargada que tiene una cabeza, situada en la curvatura en la forma C del duodeno; un cuerpo y una cola, que se extienden a lo largo de la parte posterior del abdomen. Es una glándula mixta, la cual se divide tanto en páncreas exocrino como endocrino.

El páncreas exocrino está compuesto por células acinares que contienen enzimas digestivas, mientras que el componente endocrino está formado por los islotes de Langerhans, los cuales envían secreciones (hormonas) a los vasos sanguíneos locales, que a su vez las llevan al tejido “blanco” respectivo. En conjunto, los islotes representan aproximadamente el 1% del peso de la glándula (Figura 1).

Dentro de los islotes de Langerhans hay 4 tipos celulares diferentes: las células productoras de glucagon o alfa, que representan el 20%; las células productoras de somatostatina o delta, que representan entre 5 a 10%; las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor de 2% y las células productoras de insulina o beta, que representan el 70% (Olvera C. et. al., 2008).

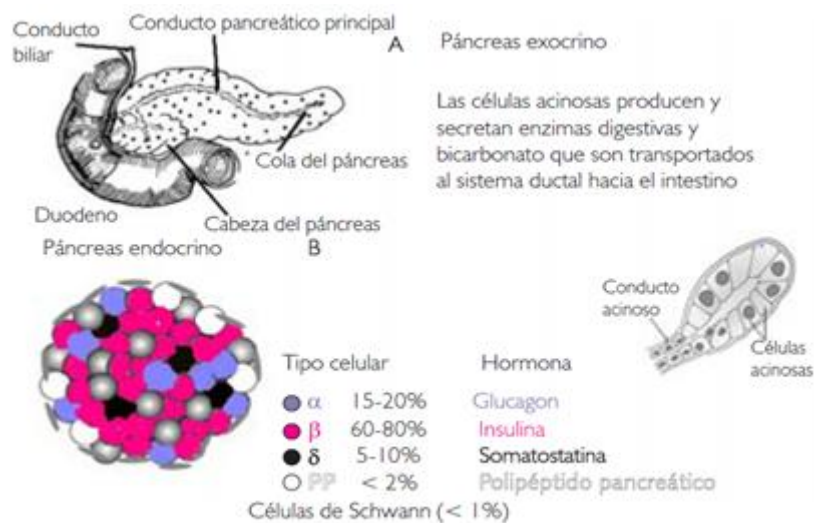


Figura 1. Partes del páncreas exocrino y endocrino y tipos celulares que componen al islote de Langerhans (Olvera C. et. al., 2008).

Una correcta función de las células beta, produce y secreta insulina de manera adecuada. La masa total de dichas células es importante para su función y se modifica bajo ciertas condiciones. Aumenta progresivamente durante los períodos fetal, neonatal y de crecimiento en la vida de un organismo, de esta manera alcanza una meseta durante la edad adulta y disminuye gradualmente con la edad (Ackermann A. et. al., 2007). Algunos factores que regulan el mecanismo de proliferación de las células beta son los factores de crecimiento (hormona de crecimiento, lactógenos, insulina, factores de crecimiento similares a la insulina), incretinas, proteínas del ciclo celular y factores de transcripción como PDX-1 (Ackermann A. et. al., 2007).

Sin embargo, se ha observado que la capacidad de proliferación de las células beta en humanos es muy restringida en comparación con los roedores (Parnaud G. et. al., 2007), debido a los resultados arrojados por los estudios de proliferación en humanos, se ha sugerido que no hay replicación de las células beta después de los primeros 30 años de vida (Perl S. et. al., 2010). Por lo que si llegase a disminuir progresivamente la masa de las células beta, entre un 70 u 80%, esto conllevaría a desarrollar diabetes mellitus tipo 1 (DM1), siendo ésta la primera manifestación de la enfermedad (Lazo de la Vega M. et. al., 2011).

2.2 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica multifactorial que se caracteriza por la deficiencia de insulina, de lo que se derivan altos niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia) que, si no es tratada a tiempo, puede convertirse en crónica y, de esa manera, causa en el organismo retinopatía, insuficiencia renal, neuropatías y enfermedades microvasculares (Robertson R. 2004).

Generalmente la DM se clasifica en diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

En la DM2 hay un incremento de glucosa en sangre (hiperglucemia), debido a que hay una disminución y deterioro progresivo de la masa de las células beta lo cual tiene como consecuencia una disminución en la secreción de insulina. Aunque en la DM1 también se presenta una disminución de la masa de dichas células, hay una diferencia esencial pues se presenta un ataque selectivo del sistema inmunitario contra estas células (Olvera C. et. al., 2008).

La DM1 presenta dos fases distintas: insulinitis, que es cuando la población mixta de leucocitos invade los islotes pancreáticos; y la diabetes manifiesta, que es cuando se pierde entre el 70-80% de las células beta y por lo tanto ya no hay producción de insulina suficiente para regular los niveles de glucosa en la sangre, dando lugar a la hiperglucemia (Mathis D. et. al., 2001).

Los individuos pueden tener insulinitis encubierta durante mucho tiempo (en los seres humanos se presenta durante años, mientras que en modelos de roedores se presenta durante algunos meses) antes de que finalmente progrese a diabetes manifiesta, pero se ha observado que algunas veces no lo hace.

Se ha propuesto que la muerte de las células beta por apoptosis posiblemente participa en la iniciación de la respuesta autoinmune, en particular en la presentación autoantigénica (Lazo de la Vega et. al., 2011, Mathis D. et. al., 2001).

El incremento de la apoptosis de las células beta se debe a que los islotes se encuentran entre los tejidos que tienen los niveles más bajos de defensas antioxidantes intrínsecas, por lo que las especies reactivas de oxígeno y los radicales libres que se producen durante el estrés oxidante juegan un papel muy importante en el daño a estas células (Robertson R. 2004, Olvera C. et. al., 2008).

2.3 Estrés oxidante

El oxígeno es un elemento indispensable para la vida pero, en determinadas circunstancias, puede afectar negativamente al cuerpo humano (Hussein A. 2011).

El consumo de oxígeno en el inherente crecimiento celular, conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuáles en concentraciones fisiológicas normales juegan un papel positivo en la producción de energía, fagocitosis, crecimiento celular y síntesis de compuestos (Hussein A. 2011, Kosanić M. et. al., 2011).

Sin embargo, cuando el organismo se encuentra en un estado de desequilibrio entre la producción de ERO y defensas antioxidantes se produce el llamado estrés oxidante (Halliwell B. 2007).

Las ERO incluyen radicales libres (RL), tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), radicales hidroxilo ($\cdot OH$) y especies como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singulete (1O_2), que no son radicales libres (Hussein A. 2011, Kosanić M. et. al., 2011).

Los RL son especies químicas con uno o más electrones desapareados químicamente muy inestables y reactivas dada su tendencia a atrapar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que los RL han conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede, se oxida y se convierte a su vez en un RL, iniciando una reacción en cadena (Rodríguez J. et. al., 2001).

El aumento de estas moléculas en el organismo, provoca una unión con los electrones de otras macromoléculas, modificando la estructura de los lípidos de las membranas citoplasmáticas, proteínas del citoesqueleto y ácidos nucleicos, para producir aún más radicales libres, citotoxicidad y muerte celular (Olvera C. et. al., 2008).

El estrés oxidante en el páncreas se produce en condiciones diabéticas, ya que este comienza debido a la hiperglucemia, y es probable que esté involucrado en la progresión de la disfunción de la célula beta pancreática causando la muerte celular por apoptosis (Maritim A. et. al., 2003).

Debido a la baja expresión de enzimas antioxidantes tales como la catalasa y la glutatión peroxidasa, las células beta pancreáticas pueden ser bastante sensibles al ataque por especies reactivas de oxígeno (ERO) cuando están expuestas a estrés oxidante. Se han reportado varias vías por las cuales se producen ERO en las células: reacciones de glicosilación no enzimática, cadena de transporte de electrones en las mitocondrias y la vía de hexosamina (Kajimoto Y. et. al., 2004, Robertson R. 2004).

2.4 Apoptosis y necrosis

Como consecuencia del estrés oxidante se tiene muerte celular, ya sea por necrosis o apoptosis.

La necrosis se caracteriza por la pérdida de la organización del citoesqueleto, del tráfico vesicular y de los procesos biosintéticos y de generación de energía. Todo esto tiene como consecuencia la pérdida de la organización subcelular, hinchamiento y eventual ruptura de la membrana, con el consecuente vaciamiento del contenido intracelular al medio intersticial. El hecho de que el contenido celular esté fuera de la célula induce la activación de la respuesta inflamatoria como el efecto secundario a la exposición de antígenos intracelulares, lo cual suele producir un mayor grado de destrucción tisular (Konigsberg M. 2008).

La apoptosis puede estar provocada por una señal externa que actúa sobre un receptor de la membrana plasmática o mediante procesos internos, como una infección viral a diferencia de la necrosis (tabla 1), sus fragmentos son fagocitados

por macrófagos sin inducir respuesta inflamatoria (Konigsberg M. 2008, Nelson D. y Cox M. 2005).

	Apoptosis	Necrosis
DNA	Fragmentación internucleosomal	Degradación inespecífica
Núcleo	Marginación de la cromatina	Picnosis
Integridad de la membrana	Se preserva	Se pierde
Inflamación asociada	No hay	Asociada con frecuencia
Cambios de volumen celular	Se reduce, "encogimiento"	Aumento "hinchamiento" u "oncosis"
Fragmentación celular	Presente con la formación de "cuerpos apoptóticos"	No hay lisis celular
Activación de caspasas	Si	No
Fosfatidilserina en la membrana celular externa	Si	No
Estrés oxidativo asociado	Como elemento causal: NO, O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂	Como consecuencia de la muerte: peróxidos

Tabla 1 Diferencias entre necrosis y apoptosis (Konigsberg M. 2008).

Cuando hay apoptosis, una de las primeras manifestaciones morfológicas es la pérdida de la unión celular, así como cambios en la presencia de estructuras especializadas, como lo son las microvellosidades. Al mismo tiempo se observan cambios en la organización de la membrana citoplasmática y la aparición de condensación de la cromatina.

Conforme el proceso avanza se puede observar la aparición de fragmentación nuclear. También se presentan cambios en el retículo endoplásmico, en donde se observan fusiones con la membrana citoplasmática. (Figura 2)

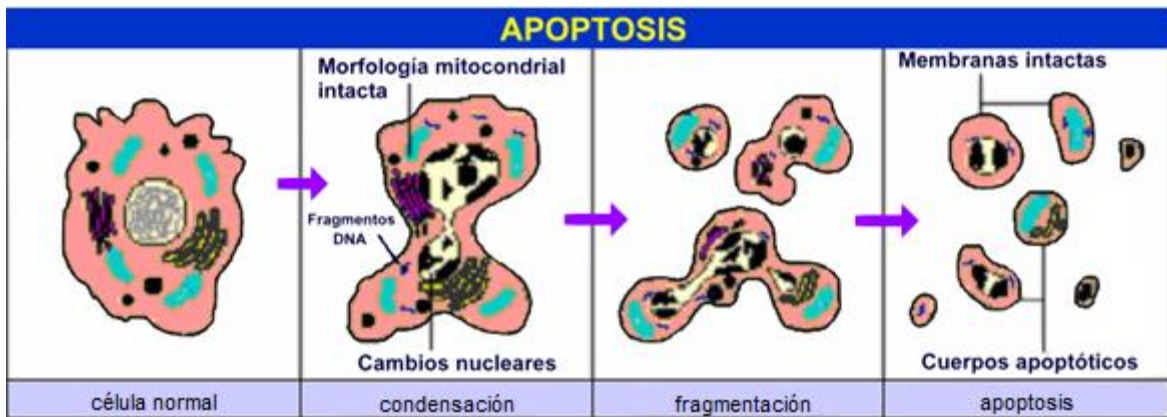


Figura 2. Imagen modificada de los cambios en las células debido a la muerte celular programada o apoptosis (Cascales M. 2003).

Para determinar estos cambios en la célula apoptótica se pueden utilizar tanto la microscopía de luz (campo claro, fluorescencia), como la microscopía electrónica.

Por medio de la microscopía de luz se pueden apreciar cambios en la organización celular, tales como la condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos, que son fragmentos celulares que se desprenden durante el proceso de muerte.

Para apreciar alteraciones celulares como cambios en microvellosidades, así como alteraciones mitocondriales o del retículo endoplásmico es necesario recurrir a la microscopía electrónica (Alfaro E. et. al., 2000).

Debido a que la degradación del DNA es una de las características más importantes de la apoptosis, se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula, en busca de esta degradación.

Uno de los métodos más utilizados es la técnica de TUNEL (por sus siglas en inglés, *TdT mediated dUTP biotin nick end labeling*) la cual por medio de la ruptura que hay por apoptosis en el DNA, el extremo 3'OH queda expuesto, por lo que por medio de la enzima desoxi nucleotidil transferasa terminal (TdT) facilita la incorporación de

desoxiuracilo trifosfato (dUTP) marcado con un fluoróforo (Figura 3), por lo que el daño ocasionado por apoptosis es detectado por microscopía de fluorescencia o confocal (Gavrieli Y. et. al., 1992).

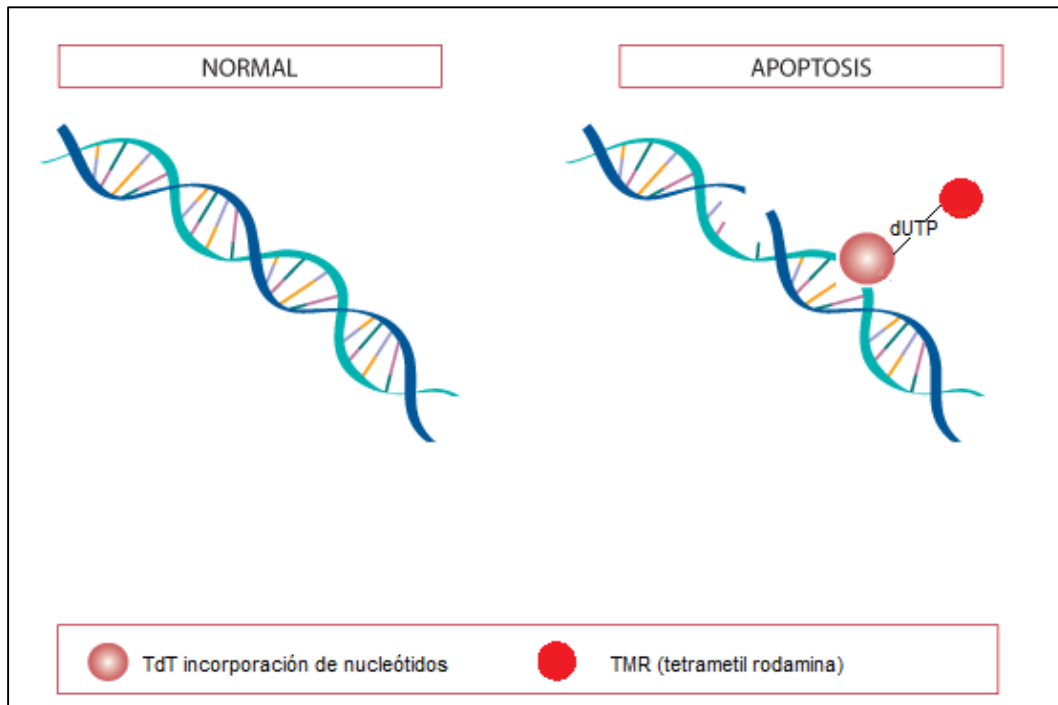


Figura 3. Representación gráfica de la técnica de TUNEL (por sus siglas en inglés *TdT mediated dUTP biotin nick end labeling*) (Bolmeson C. et. al., 2011)

Durante el proceso de apoptosis, muchas proteínas celulares sufren una ruptura o proteólisis, generalmente catalizada por proteínas con actividad enzimática denominadas caspasas. Todas las caspasas (cisteín-proteasas) tienen una cisteína en su centro activo y producen cortes en proteínas, justo detrás del aminoácido aspartato (Asp). Cuando se inicia el proceso de apoptosis, se activan las caspasas, se cortan proteínas y finalmente el DNA (Hengartner M. 2000).

Cuando una célula recibe una señal para la apoptosis, una consecuencia es el aumento de la permeabilidad de membrana mitocondrial externa que permite la salida del citocromo c normalmente confinado en el espacio intermembranal. El citocromo c liberado activa una de las enzimas proteolíticas (caspasas 3 y 9)

responsable de la degradación de proteínas durante la apoptosis (Hengartner M. 2000, Konigsberg M. 2008, Nelson D. y Cox M. 2005).

2.5 Estreptozotocina

Para estudiar la apoptosis que ocurre en diversas enfermedades, se han utilizado diversos compuestos en modelos experimentales. Se ha reportado que la estreptozotocina (STZ) induce DM en la rata (Skudelski T. 2012).

La STZ es un antibiótico de origen natural aislado de la cepa *Streptomyces chromogenes*, que es utilizado solo o en combinación con otros agentes antineoplásicos para el tratamiento de cáncer de páncreas, colorectal, gastrointestinal y de la corteza suprarrenal, (Vikram A. et. al., 2007). Además de su uso clínico, también se utiliza como agente inductor de DM1 en ratas de experimentación.

La STZ es una D-glucopiranososa derivada de N-metil-N-nitrosourea (MNU). Tanto STZ como MNU son agentes alquilantes, altamente tóxicos y cancerígenos, pero solo la STZ es un diabetógeno, ya que, de acuerdo con las propiedades químicas que presenta (Figura 4), puede entrar a la célula beta por el transportador de glucosa Glut 2, teniendo como consecuencia la destrucción de la célula beta (Elsner M. et al., 2000).

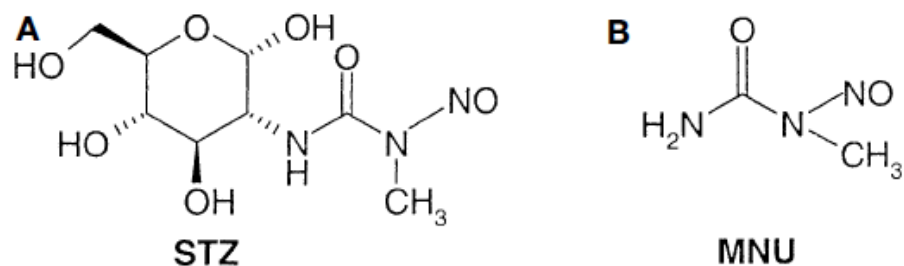


Figura 4. Estructuras químicas de los agentes alquilantes. **A**, Estreptozotocina (STZ) y **B**, N-metil-N-nitrosourea (MNU) (Elsner M. et al., 2000).

Estudios recientes han propuesto que una de las razones por las que se lleva a cabo la destrucción de las células beta es por la alquilación del DNA por el radical metilo $\bullet\text{CH}_3$ o el ión carbonio (CH_3^+) (Figura 5 [II]), los cuales son altamente reactivos y reaccionan con el grupo cetona de la guanina en la posición 6 para formar la 6-metilguanina. Estas alquilaciones son eliminadas por un proceso de escisión reparación en la que participa la enzima poli (ADP ribosa) sintetasa utilizando como sustrato a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD). Cuando hay un incremento de esta enzima, hay una disminución del sustrato, reduciendo el contenido de ATP y subsecuentemente la inhibición de la secreción y síntesis de la insulina (Szkudelski T. 2001, Szkudelski T. 2012, Elsner M. et al., 2000, Murata M. et al., 1999).

También se ha reportado que la STZ es un donador de óxido nítrico (NO), el cual es liberado cuando la STZ es metabolizada dentro de las células. Sin embargo, los resultados de varios experimentos indican que el “NO” no es la única molécula responsable del efecto citotóxico de STZ ya que también se generan ERO que contribuyen a la fragmentación de DNA.

Cabe mencionar que las consecuencias de la acción de la STZ sobre la mitocondria es la inhibición del ciclo de Krebs que conlleva a la disminución en el consumo de oxígeno en las mitocondrias, dando como resultado una disminución de ATP

provocando la muerte de las células beta pancreáticas (Figura 5 [I]) (Szkudelski T. 2001).

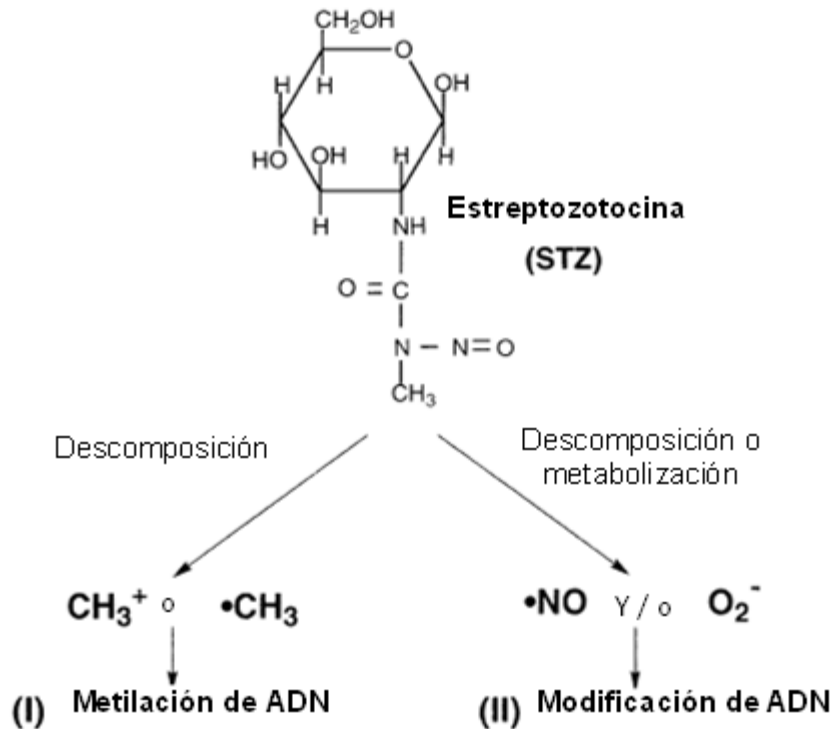


Figura 5. Mecanismos propuestos de la inducción de la toxicidad de STZ. Dos mecanismos tóxicos directos: (I) Metilación de DNA inducido por $\text{CH}_3\bullet$ o CH_3^+ y (II) modificación de DNA inducido por especies reactivas de oxígeno (O_2^-) u óxido nítrico (NO) de la STZ (Murata M. et. al., 1999).

2.6 Antioxidantes

Debido a que en la DM se genera estrés oxidante, hay producción de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ERO), por lo que si no existe un equilibrio entre éstos y los antioxidantes, moléculas que previenen o retardan la oxidación de otras moléculas, se genera apoptosis en la células beta pancreáticas (Palsamy P. et. al., 2010).

El sistema de defensa antioxidante en las células beta pancreáticas está constituido por compuestos de naturaleza enzimática (enzimas): superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa (Figura 6), las cuales están en una menor concentración en comparación con otros tejidos, por lo que éstas células son más susceptibles a sufrir daños por estrés oxidante (Robertson R. 2004, Kaneto H. et. al., 1999, Palsamy P. et. al., 2010).

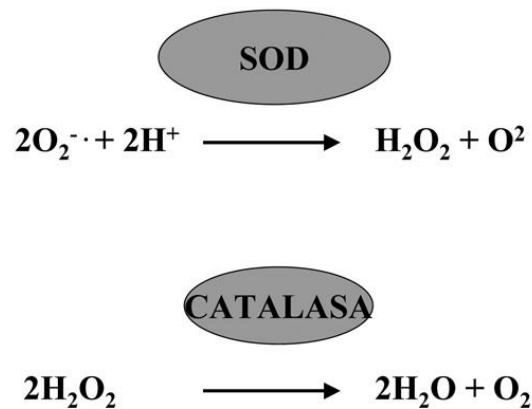


Figura 6. Reacciones de neutralización con enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD) y catalasa.

Se ha reportado que diversos frutos, especialmente los rojos, contienen compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes y por lo tanto disminuye el riesgo de desarrollar diversas enfermedades que son consecuencia del estrés oxidante.

Esto se sabe gracias a estudios realizados en Francia, en los que se observaba que, al ser un país consumidor de alimentos altos en grasa de origen animal, se esperaba que hubiera un incremento de enfermedades cardiovasculares en la población en comparación con los países mediterráneos que consumen una menor cantidad. Sin embargo, al realizar un consenso, se observó que la población francesa presentaba una tendencia similar a la de los demás países, por lo que a

este hecho se le llamó “paradoja francesa”, ya que se salía de los estándares que pensaban resultarían (Khanduja K. et. al., 2003).

Este hecho se asoció al consumo moderado de vino tinto, ya que contiene un compuesto fenólico, 3,5,4'-trihidroxiestilbeno también llamado resveratrol (Figura 7), el cual se observó que presenta actividad antioxidante.

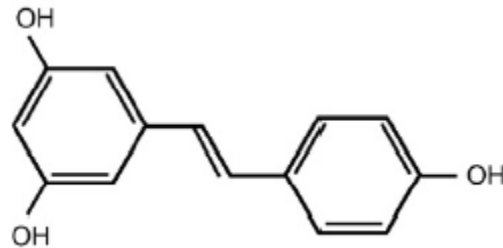


Figura 7. Estructura química de resveratrol (3, 5,4'-trihidroxiestilbeno) (Szkudelski T. 2007).

El resveratrol (RSV), además de encontrarse en el vino, se encuentra en la piel de las uvas rojas, manzanas, cacahuetes, moras y arándanos, y se ha demostrado en estudios *in vivo* e *in vitro* que tiene efectos protectores contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares, apoptosis, envejecimiento, etc. (Khanduja K. et. al., 2003, Szkudelski T. 2007, Zhang J. et. al., 2012, Su H. et. al., 2006, Catalgol B. et. al., 2012).

Cabe mencionar que el RSV presenta efectos anti-diabéticos, ya que se ha demostrado que disminuye los niveles de glucosa en sangre en modelos animales con DM1 y DM2; además disminuye la secreción de insulina en animales con hiperinsulinemia y se ha demostrado que el RSV en estudios *in vitro*, atenúa el daño oxidante en el tejido pancreático (Hussein A. 2011). Por lo tanto, el RSV puede ejercer acciones benéficas sobre las células beta pancreática en la diabetes, probablemente a través de sus acciones antioxidantes (Lee Y. et. al., 2012).

Al tener en cuenta los múltiples beneficios que proporcionan los antioxidantes de origen natural, se realizaron estudios por Perico en el 2011 en colaboración con la facultad de Química de la UNAM, en los que se observó que existen diversos compuestos provenientes de dos diferentes especies de líquenes, los cuales presentan actividad antioxidante.

Uno de los compuestos antes mencionado es el 3-metil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato, también llamado lobarielina (Figura 8), presenta actividad antioxidante, debido a que en su estructura posee un grupo formilo en el carbono 3 ubicado en posición orto a un par de grupos hidroxilo, los cuales tiene un efecto captor de radicales libres (Perico M. 2011).

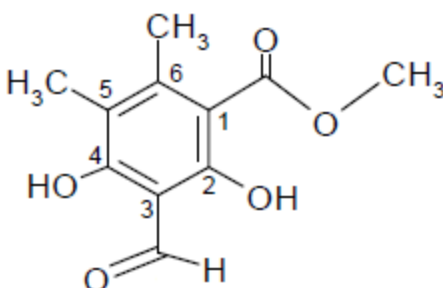


Figura 8. Estructura química de la lobarielina (3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato) (Perico M. 2011).

Al tener como antecedente este estudio, se sintetizó un compuesto llamado 3-metil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de sodio, también llamado compuesto A4 (sintetizado en la facultad de Química UNAM por el Doctor Gustavo Alberto García de la Mora y colaboradores), el cual presenta el grupo formilo y los hidroxilos en las

mismas posiciones que la lobarielina, por lo tanto se especuló que podía presentar actividad antioxidante (Figura 9).

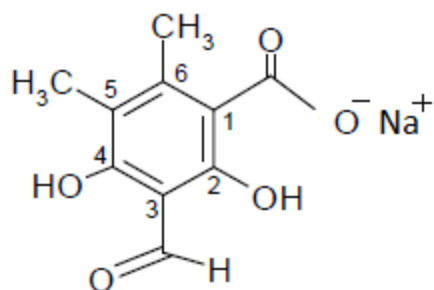


Figura 9. Estructura química del compuesto A4 (3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de sodio).

3 Objetivo

Determinar la actividad antioxidante del compuesto 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de sodio (A4) en islotes pancreáticos de rata a los que se les indujo estrés oxidante por el tratamiento con estreptozotocina (STZ).

4 Hipótesis

El compuesto 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de sodio (A4), debido a su estructura, tiene un efecto protector en los islotes pancreáticos de rata ante el daño ocasionado por el compuesto de estreptozotocina (STZ).

5 Metodología

5.1 Ensayo de DPPH

Los compuestos RSV y A4 se disolvieron en 1 ml de metanol, conservándolos en hielo debido a la volatilidad del disolvente.

Después se prepararon soluciones stock de ambos compuestos para después en una placa de cultivo de 96 pozos, colocar 20 μ L de RSV a una concentración de 50 μ M y 20 μ L de cada una de las concentraciones del compuesto A4: 25, 50 y 100 μ M por duplicado.

Enseguida se colocó el 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) (100 μ M) y se registró la absorbancia al tiempo 0, 30, 60 y 120 minutos a una longitud de onda de 517nm. La capacidad antioxidante se midió como porcentaje de captura del DPPH.

5.2 Aislamiento de islotes

Se trabajó con ratas macho Wistar de entre 180 y 200 g a las que se les dio eutanasia con una sobredosis de pentobarbital. Después se realizó una incisión a lo largo de la línea media abdominal y enseguida se localizó el colédoco realizando una pequeña incisión para que posteriormente el páncreas se insuflara con ayuda de una cánula introduciendo 10 ml de solución Hanks' adicionado con glucosa y BSA. Después se extrajo el páncreas ya insuflado, desprendiéndolo poco a poco del intestino, estómago y bazo para que posteriormente se realizara la técnica de digestión con colagenasa (Morimoto S. et al. 2001), que consiste en colocar el páncreas en un vaso de precipitado de 5 ml con 3 mg de colagenasa y con ayuda de unas tijeras pequeñas, cortar el páncreas, y enseguida ponerlo en un matraz de plástico, dando de 5 a 10 golpes (sacudiendo el matraz como forma mecánica de disgregación), para después colocarlo en un baño con agitación constante a 37°C por 7 minutos.

Pasado este tiempo, se observó la consistencia de la mezcla, y se dieron de 5 a 10 golpes, y enseguida se dejó por 4 minutos en un baño de agitación constante a 37°C.

Se observó la consistencia y se detuvo la digestión añadiendo solución fría (Hanks' adicionado con glucosa y BSA), y colocando el contenido en un tubo cónico de 50 mL, realizando el primer lavado con solución fría y llevándolo a una centrifuga a 1000 rpm durante 3 minutos, este procedimiento se realizó 2 veces.

Al término del segundo lavado, la solución se pasó por una malla y el tejido digerido se transfirió a un nuevo tubo falcon de 15 mL, centrifugándolo a 1200 rpm por 5 minutos; esto se realizó para que se formara una pastilla.

Al término del tercer lavado, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 3 ml de una solución de ficoll al 27%, se agitó hasta que se re-suspendiera la pastilla y se realizó un gradiente de ficoll de 23%, 20% y 11% y enseguida se centrifugó a 2100 rpm por 15 minutos.

Se tomaron los islotes entre las concentraciones de 23% y 20% con ayuda de una pipeta de transferencia de 3ml. Se enjuagaron con solución Hanks´ y después de centrifugarlos por 5 min a 800 rpm, se colocaron en una caja Petri bajo un microscopio estereoscópico para recuperarlos y contabilizarlos.

Después dentro de una campana de flujo laminar, se depositaron en una caja de cultivo de 6 pozos y se agregó 1 mL de solución Hanks´ y 10 µL de suero fetal bovino y 10 µL de penicilina/estreptomicina por pozo. Se incubaron en condiciones de CO₂ (5%) y temperatura (37°C) controladas.

5.3 Tratamiento de los islotes con el compuesto A4

Después de 24 horas de incubación, los islotes se transfirieron a una placa de cultivo de 6 pozos. En cada pozo se colocaron 50 islotes con solución Hanks´ (adicionado con suero fetal bovino y penicilina / estreptomicina).

Para conocer las concentraciones que se utilizarían del compuesto A4, se realizó una prueba en la que se propusieron tres diferentes concentraciones (25, 50 y 100µM), las cuales se basaron en estudios reportados por Khanduja en el 2003 y Szkudelski en el 2007, realizando los siguientes tratamientos:

Pozo	C	1	2	3	4	5
Compuesto						
Resveratrol	-	-	50µM	-	-	-
Compuesto A4	-	-	-	25µM	50µM	100µM
STZ	-	0.5mM	0.5mM	0.5mM	0.5mM	0.5mM

Tabla 2. Tratamientos aplicados a los islotes pancreáticos. C representa al control, el signo (-) ausencia del compuesto. Se muestra en cada caso, la concentración de cada compuesto por tratamiento.

En la tabla 2 se muestran los diferentes tratamientos aplicados a 50 islotes pancreáticos por cada pozo. Los compuestos resveratrol y A4 se aplicaron a los pozos correspondientes y se dejaron actuar por 1 hora. Después se adicionó la estreptozotocina (STZ) por 1 hora a los pozos correspondientes.

Transcurrido este tiempo se retiró el medio y se agregó 1.0 mL de paraformaldehído a los islotes en cada pozo y se almacenaron a 4°C.

Posteriormente los islotes se prepararon para realizar la técnica histológica de microscopía electrónica. Otros islotes con el mismo tratamiento se emplearon para realizar la técnica de TUNEL y observarlos por medio de microscopía confocal.

5.4 Técnica histológica de microscopía electrónica

Los islotes se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en buffer de cacodilatos (pH 7.2, 0.15 M), por 3 horas a 4°C. Enseguida se realizó un lavado con buffer de cacodilatos (0.15 M, pH 7.2) por 10 minutos.

Se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% en buffer de cacodilatos por 45 minutos a temperatura ambiente, y terminado este tiempo, se realizaron dos lavados, de 10 minutos cada uno, con buffer de cacodilatos.

Se deshidrataron los islotes con diluciones de etanol, de manera gradual, exponiéndolos durante 20 minutos a diferentes concentraciones (50, 70, 80 96 y 100 %).

Para desplazar el alcohol de los islotes, se adicionó óxido de propileno durante 20 minutos. Después, los islotes se colocaron en óxido de propileno absoluto/ resina epon (Embed-812) durante 12 horas.

Para realizar la infiltración, se colocaron los islotes en resina epon (Embed-812) pura durante 2 horas.

Se colocaron nuevamente en resina epon (Embed-812) durante 12 horas, a una temperatura de 65°C.

Una vez polimerizada la resina, se realizaron cortes de aproximadamente 60 nm, con ayuda de un ultramicrotomo, los cuales fueron montados en portaobjetos y posteriormente teñidos con azul de toluidina para observar la presencia de islotes y el grado de condensación de la cromatina, ya que la característica principal del colorante es teñir selectivamente componentes ácidos de los tejidos, tales como sulfatos y radicales fosfatos incorporados en el DNA y ARN de las células.

Luego, se realizaron cortes de 1µm de espesor, los cuales se depositaron en redes de cobre para después contrastarlos con tetraóxido de osmio.

Finalmente, estas preparaciones fueron observadas con ayuda de un microscopio electrónico de transmisión, en el que se buscaba analizar la integridad de las células dependiendo del tratamiento a los cuáles fueron expuestos los islotes pancreáticos.

5.3 Técnica de TUNEL

Se obtuvieron otros islotes para realizar esta técnica, a los que se les aplicó el mismo tratamiento que se muestra en la tabla 2.

Posteriormente se colocaron 10 islotes por cada pozo en una caja de cultivo de 96 pozos.

Después se lavaron con una solución de PBS al 1%, 3 veces durante 1 minuto cada lavado.

Posteriormente se retiró el PBS de cada pozo e inmediatamente se colocó paraformaldehído al 2% por 1 hora, teniendo cuidado en cada paso para no dejar que los islotes se secan.

Se realizaron 3 lavados con PBS, durante 5 minutos cada uno y enseguida se colocó la solución permeabilizadora por 1 hora.

Para el control positivo, los islotes se trataron con DNasa I durante 15 minutos a 37°C.

Se realizaron 2 lavados con PBS, 5 minutos cada lavado y enseguida se colocaron en los pozos los reactivos correspondientes para la reacción de TUNEL, protegiendo la caja de cultivo de la luz con papel aluminio e incubándola durante 1 hora a 37°C.

Se realizaron 2 lavados con PBS, 5 minutos cada lavado y enseguida los islotes fueron colocados en portaobjetos con solución de montaje DAPI para después observarlos con un microscopio confocal.

6 Resultados

6.1 Captura del radical libre DPPH

Por estudios previos (Khanduja K. et. al., 2003; Konrad R. et. al., 2001; Szkudelzki T. et. al., 2008) se sabe que el resveratrol, debido a sus propiedades estructurales, tiene una alta capacidad antioxidante. Esto se pudo demostrar gracias a la realización de diversos ensayos, uno de ellos fue el de DPPH. Teniendo como referencia éstos resultados, se eligió el resveratrol como control positivo, para la evaluación de la capacidad antioxidante del compuesto A4.

Sabiendo que el DPPH es un compuesto colorido que presenta un máximo de absorción a 517nm, las muestras se analizaron por espectrofotometría y se tomaron las absorbancias a cinco diferentes tiempos: 0,30, 60, 90 y 120 minutos (Sharma O. et. al., 2009).

Para calcular el porcentaje de captura se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Captura del radical libre DPPH} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Donde A_0 es la absorbancia tomada al tiempo cero y A_1 es la absorbancia tomada ya sea al tiempo 30, 60 o 120 (Hussein A. 2011, Kosanić M. et. al., 2011), obteniendo como resultados el gráfico de la figura 10, en el que se observa que hay una diferencia significativa en el porcentaje de captura del radical DPPH, entre el RSV y el compuesto A4 a una concentración de $50\mu\text{M}$ en los tiempos 90 y 120 minutos.

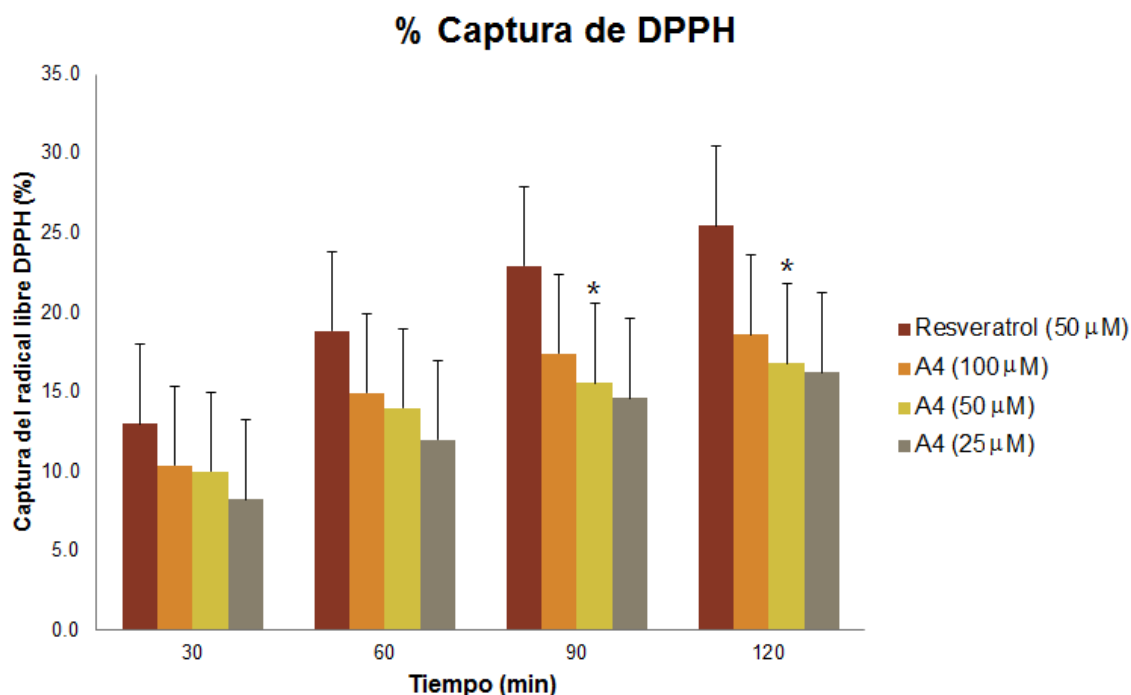


Figura 10. Curva temporal del porcentaje de captura del radical libre DPPH de los compuestos de resveratrol (RSV) $50\mu\text{M}$ y A4 a 25, 50 y $100\mu\text{M}$. Cada barra representa el promedio del porcentaje de captura del radical libre DPPH \pm E.S. * $p < 0.05$ comparado con RSV, $n=3$ experimentos independientes.

6.2 Microscopía electrónica

De acuerdo con lo observado anteriormente, se corroboró por medio de estudios *in vitro* en islotes pancreáticos de rata, si el compuesto A4 presentaba los mismos resultados que se observaron en el ensayo de DPPH, es decir: una considerable capacidad antioxidante. Después de la exposición de los islotes al compuesto A4, se trataron con STZ para inducir apoptosis, para lo cual se realizó la estandarización del tiempo de exposición a dicho compuesto a una concentración de 0.5 mM por 30, 60 y 120 minutos (Konrad R. et. al., 2001).

Para saber el tiempo adecuado, se observó la ultra estructura de los islotes mediante microscopía electrónica, pero primero se realizaron cortes de aproximadamente 60 μ m (semifinos) y se tiñeron con azul de toluidina para observar si había presencia de islotes y además el grado de condensación de la cromatina.

En la figura 11 se muestra que el tiempo de exposición con STZ fue directamente proporcional con el grado de condensación de la cromatina.

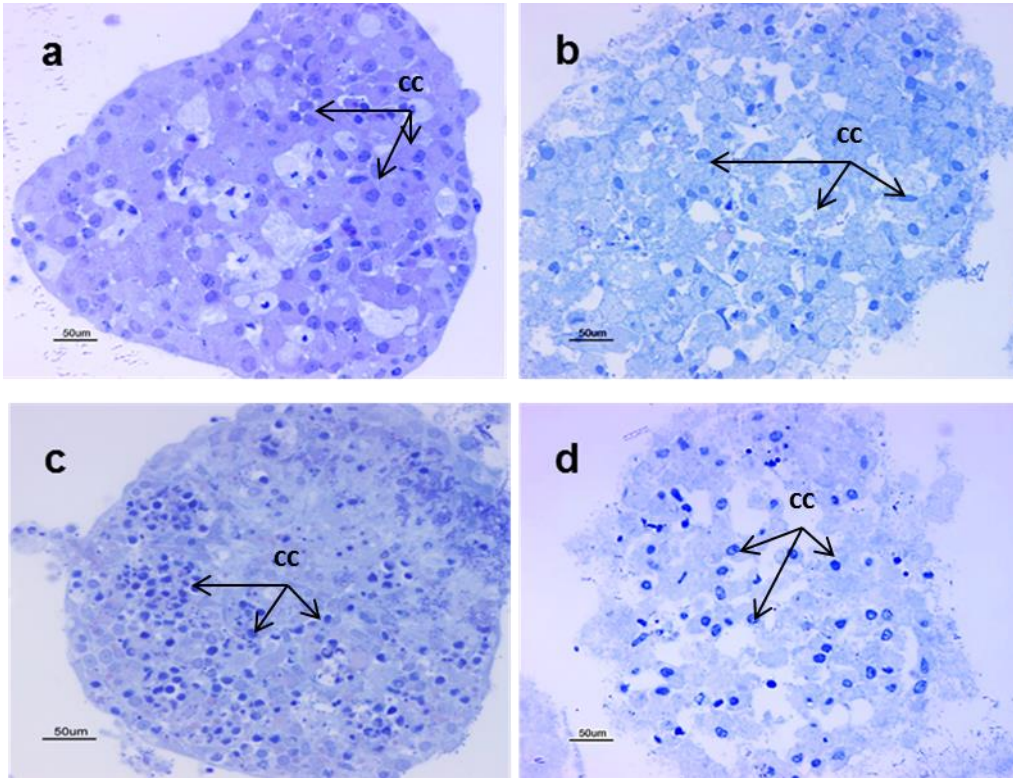


Figura 11. Fotografía representativa de islotes con estreptozotocina con diferentes tiempos de exposición (30, 60 y 120 min) observados en microscopio de luz. (a) Control, (b) estreptozotocina 30 min. , (c) estreptozotocina 60 min. , (d) estreptozotocina 120 min. Condensación de la cromatina (cc).

Después, de la misma muestra, se realizaron cortes de $1\mu\text{m}$ para examinar las células de los islotes por medio de microscopía electrónica. Se observó que en las células beta a los 30 minutos de tratamiento con STZ, había condensación de la cromatina (Figura 12 b), a los 60 minutos se observó que, además de la condensación de cromatina había presencia de cuerpos apoptóticos (Figura 12c) y a los 120 minutos se observó condensación de la cromatina y destrucción del citoplasma (Figura 12d).

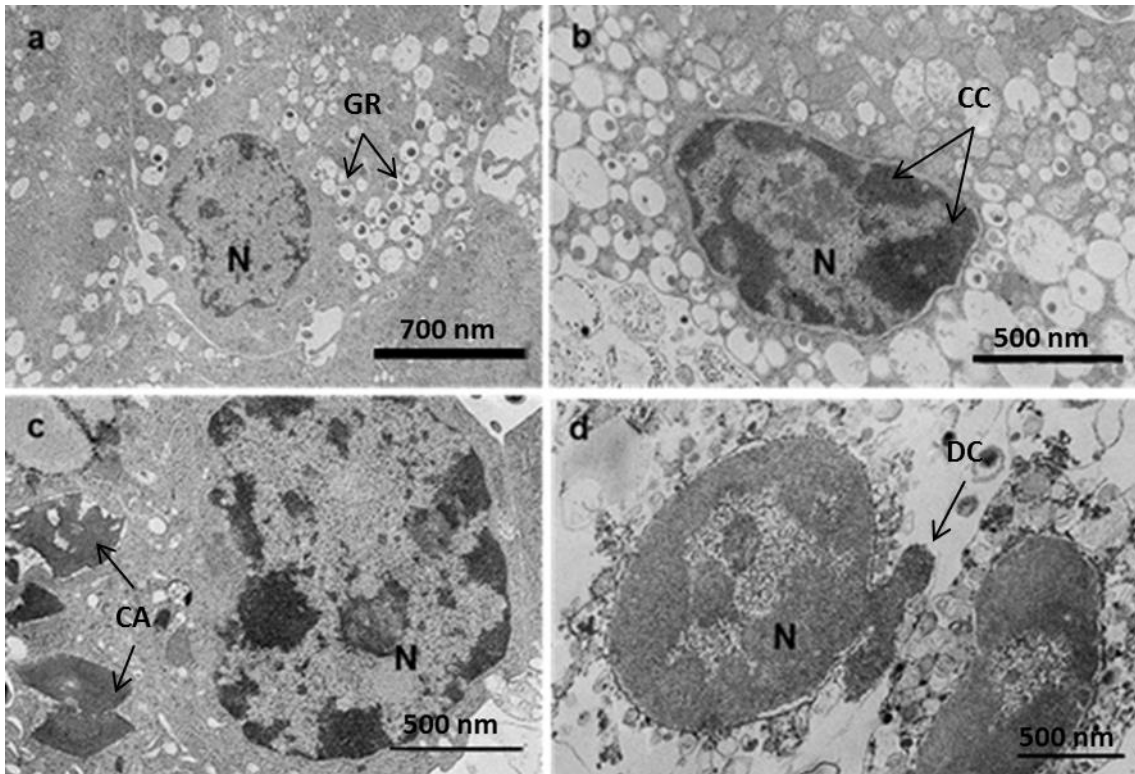


Figura 12. Fotografía representativa de células de islotes tratados con estreptozotocina durante diferentes tiempos de exposición (30, 60 y 120min) observados en microscopio electrónico. (a) control, (b) estreptozotocina 30 min., (c) estreptozotocina 60 min., (d) estreptozotocina 120 min. N (núcleo), GR (gránulos de secreción), CA (cuerpos apoptóticos), CC (condensación de la cromatina), DC (degradación de la cromatina).

De acuerdo con lo observado, el tiempo de elección de exposición con STZ fue de 60 minutos, debido a que a 30 minutos, en general, no se observaba gran daño por apoptosis y a 120 minutos no solo se observaba destrucción de la cromatina, sino también destrucción del citoplasma.

Teniendo como resultado lo anterior, el siguiente paso fue analizar el efecto protector del compuesto A4 (figura 13 y 14), a las concentraciones propuestas en el ensayo de DPPH.

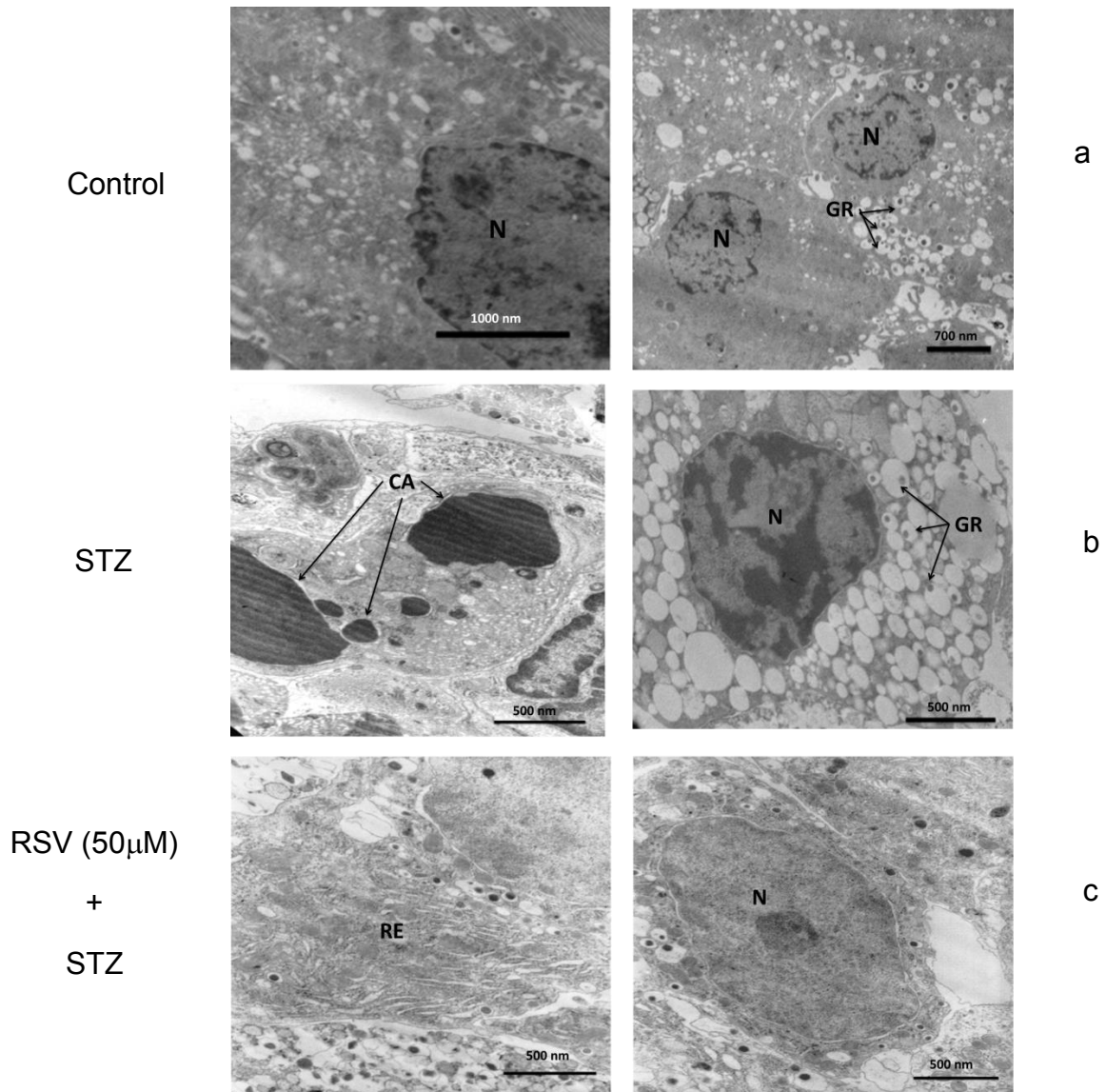
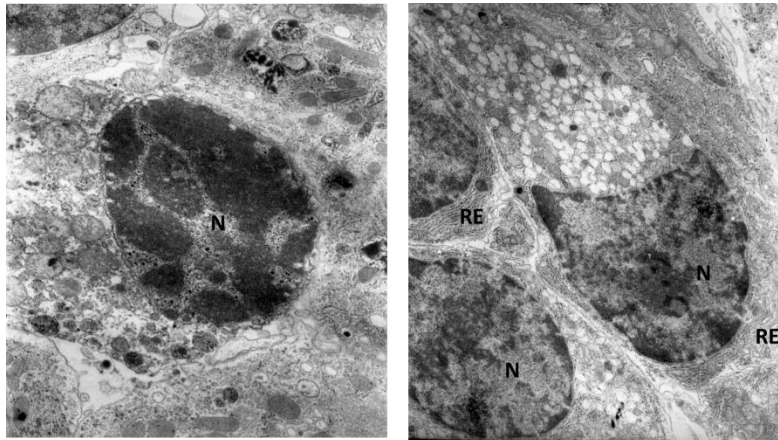


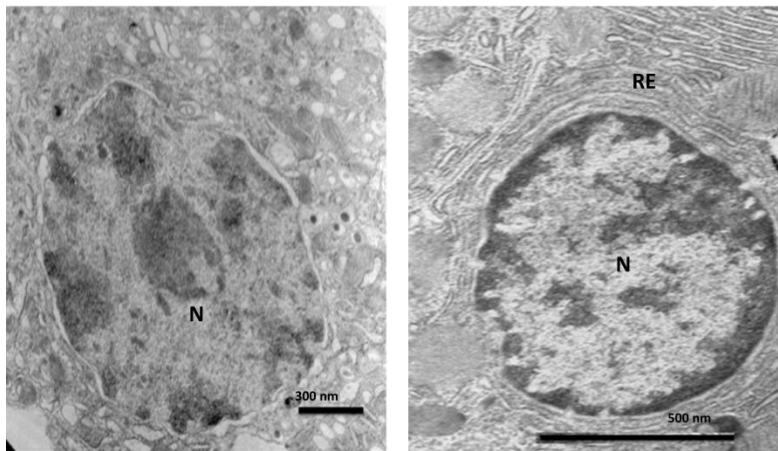
Figura 13. Figura representativa de células de islotes pancreáticos en dos diferentes campos. Estreptozotocina (STZ), resveratrol (RSV), núcleo (N), gránulos de secreción (GR), retículo endoplásmico (RE), cuerpos apoptóticos (CA).

A4 (25 μ M)
+
STZ



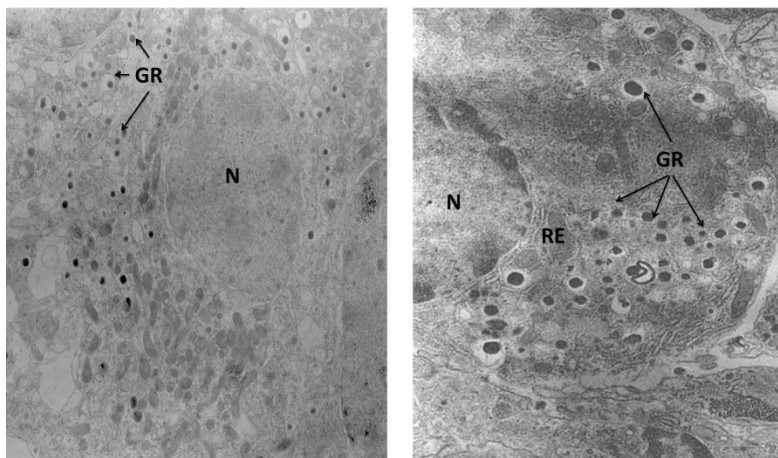
a

A4 (50 μ M)
+
STZ



b

A4 (100 μ M)
+
STZ



c

Figura 14. Figura representativa de células de islotes pancreáticos en dos diferentes campos. Estreptozotocina (STZ), resveratrol (RSV), núcleo (N), gránulos de secreción (GR), retículo endoplásmico (RE).

En las figuras 13 y 14, se muestran las diferencias ultra estructurales que presentan las células de los islotes pancreáticos observadas al microscopio electrónico. Al comparar el daño celular que ocasionó el compuesto de STZ en los islotes tratados con RSV (Figura 13c) y los islotes tratados con las diferentes concentraciones del compuesto A4 (Figura 14 a, b y c) es menor comparándolos con los islotes tratados sólo con STZ (Figura 13b), ya que en éstos últimos se observa un aumento en la formación de cuerpos apoptóticos.

En las figuras 14 a, b y c (tratadas con A4), se observó un menor número de células que presentaban apoptosis por efecto de la STZ; sin embargo, a mayor concentración del compuesto A4, se observó un mayor efecto protector. A una concentración de 25 μ M (Figura 14a) las células de los islotes pancreáticos mostraron una mayor condensación de la cromatina con respecto a las tratadas con una concentración de 50 y 100 μ M (Figura 14b y 14c). La concentración de 100 μ M del compuesto A4 (Figura 14c) mostró un mayor efecto protector ya que fue donde se observó el menor número de imágenes de condensación de la cromatina.

Otra de las características de la muerte celular por apoptosis se observó en las preparaciones disminución de los gránulos de secreción en las células del islote, tal y como puede observarse en las figuras 13b y 14a. Al observar las células de la figura 14c nos percatamos de que en comparación con las figuras antes mencionadas, ésta presenta un mayor número de gránulos de secreción, lo que indica que el daño inducido por STZ es prevenido o atenuado por el compuesto A4 a una concentración de 100 μ M.

Debido a lo observado, podemos considerar que hay una relación inversamente proporcional en cuanto a la muerte celular programada o apoptosis con respecto a la concentración del compuesto A4.

Sin embargo, cabe mencionar que, para complementar los resultados antes obtenidos, debíamos realizar otra técnica.

6.3 Técnica de TUNEL

Para complementar la evaluación morfológica antes mencionada, se realizó la técnica de TUNEL (Alfaro E. et. al., 2000), en la que con ayuda del microscopio confocal se obtuvieron las fotografías mostradas en la figuras 15 y 16, observando que hay tres diferentes imágenes de un islote representativo de cada tratamiento; uno con DAPI (color azul), reacción de TUNEL (color rojo) y la unión (merge) de DAPI y la reacción de TUNEL.

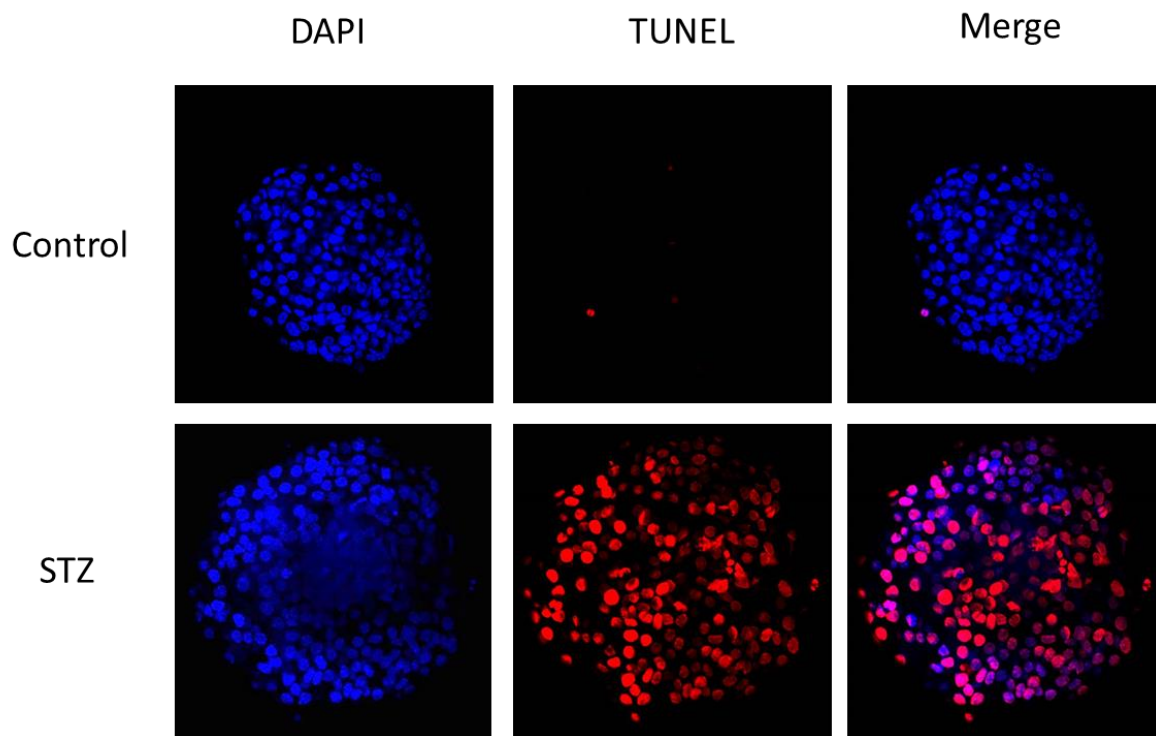


Figura 15. Fotografía representativa de islotes pancreáticos control y tratados con estreptozotocina (STZ). Puede observarse que el tratamiento con STZ induce daño al DNA, de la mayoría de las células del islote (núcleos en rojo).

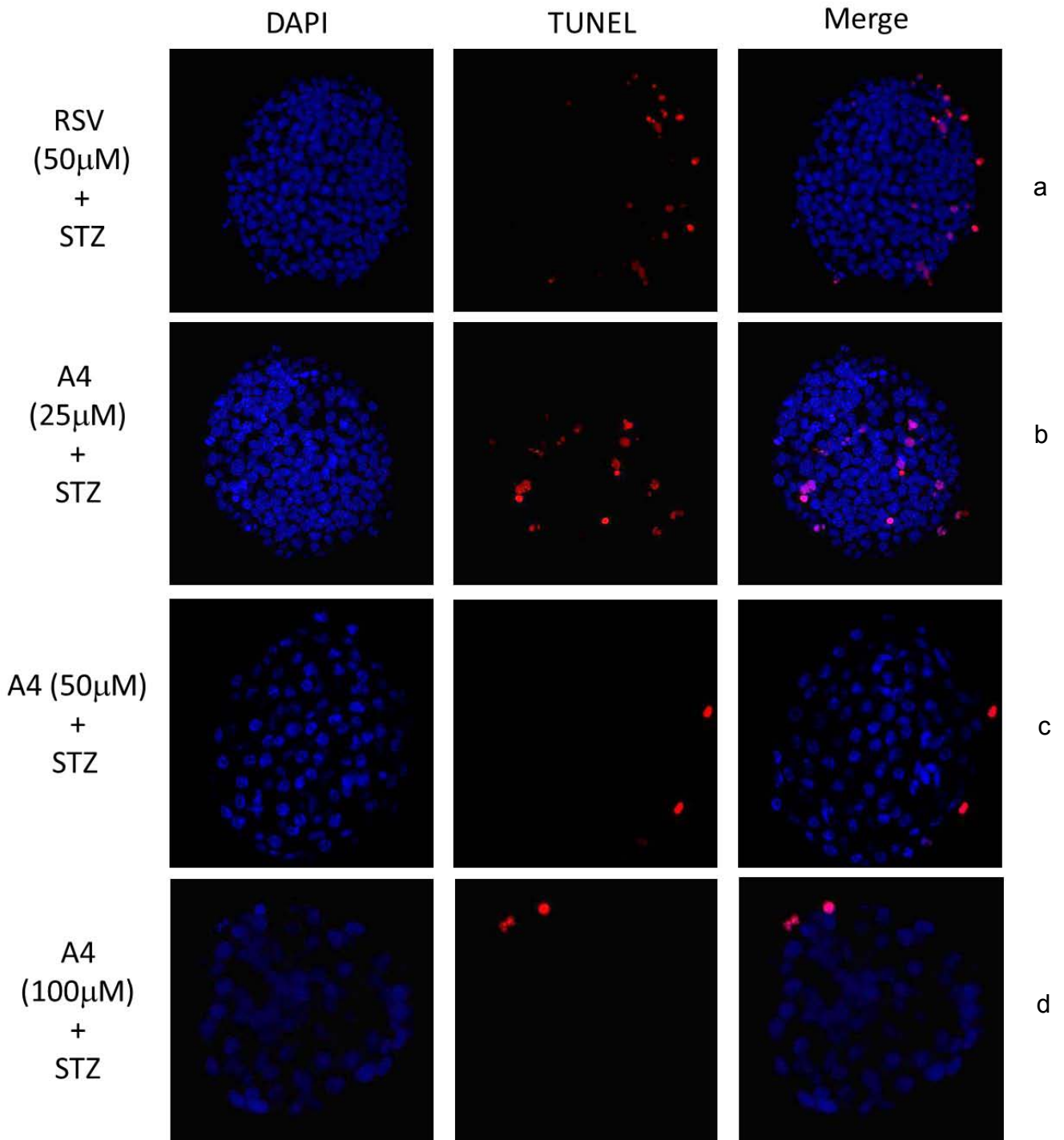


Figura 16. Fotografía representativa de islotes pancreáticos tratados con resveratrol (RSV) 50 μ M (a), compuesto A4, 25 μ M (b), 50 μ M (c) y 100 μ M (d), más estreptozotocina (STZ) 0.5mM en todos los casos.

Con la reacción de TUNEL observamos que la fluorescencia (color rojo) emitida es directamente proporcional al número de células apoptóticas. La fluorescencia en azul (tinción con DAPI) nos muestra los núcleos de todas las células del islote.

Al analizar las diferentes muestras tratadas con el compuesto A4, se observa que —al incrementar la concentración del compuesto (figura 16 b, c y d) — la cantidad de células apoptóticas disminuye al igual que el ensayo de DPPH y la técnica de microscopía electrónica.

7 Discusión de resultados

La diabetes mellitus es una condición en la que existen niveles elevados de estrés oxidante. En la DM1 hay una disminución de la masa de las células beta, ya que la defensa antioxidante de éstas es muy débil (Lenzen S. 2008) aumentando la susceptibilidad al estrés oxidante producido por la hiperglicemia, lo que conlleva a la muerte celular por apoptosis.

Diferentes estudios han demostrado que la suplementación con agentes antioxidantes reduce el daño por estrés oxidante en las células beta, lo que resulta en una disminución de las complicaciones de la diabetes (Rani A. et. al., 2014).

Debido a la necesidad de aumentar la actividad antioxidante en estas células, se han estudiado las propiedades antioxidantes de diversos compuestos fenólicos, tal es el caso de los compuestos como miricetina, quercetina, fisetina, catequina (Khanduja K. et. al., 2003) y el resveratrol (RSV) que se encuentra en los frutos rojos como las uvas, arándanos y otros (Szkudelski T. 2007, Zhang J. et. al., 2012, Su H. et. al., 2006, Catalgol B. et. al., 2012).

Se ha observado que en las células beta, el RSV aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, protegiéndolas del daño ocasionado por radicales hidroxilo (OH •), radical superóxido (O₂^{•-}), oxígeno singulete (¹O₂), y óxido de nitrógeno (NO •) (Hussein M. 2011).

En estudios realizados por Szkudelski y colaboradores, se ha observado que en ratas tratadas con estreptozotocina (STZ), los cambios degenerativos de las células beta son revertidos por el resveratrol (RVS) y existe una disminución de la apoptosis de dichas células, relacionado con el bloqueo de la actividad de la caspasa-3, y esto se debe principalmente a la inhibición de la escisión de PARP (Szkudelski T. et. al., 2014).

Las propiedades antioxidantes que presenta el compuesto de RSV (3,5,4'-trihidroxistilbeno) se deben a su estructura química, ya que presenta una fuerte actividad de captura de radicales libres, debido a la presencia de un doble enlace conjugado, que hace que los electrones se deslocalicen (Hussein M. 2011).

Debido a estos antecedentes, y al creciente interés por la identificación de compuestos naturales con propiedades antioxidantes, el grupo de Perico y colaboradores en el 2011 encontrando diferentes especies de líquenes contenían compuestos que, debido a su estructura presentaban actividad antioxidante, tal es el caso de la lobarielina, la cual presenta dobles enlaces conjugados y además un grupo formilo en posición orto a un grupo hidroxilo lo cual es clave para el efecto de captura de radicales libres (Perico L. 2011).

En el presente trabajo, nos enfocamos en la estructura de la lobarielina, por lo que se sintetizó un compuesto llamado A4, que presenta características estructurales similares, lo que nos llevó a pensar que era un posible compuesto antioxidante.

Por lo que para medir la capacidad antioxidante del compuesto A4, utilizamos un método muy conocido que se basa en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), el cual es una molécula que contiene un radical libre estable con un color púrpura, que es transformado a un compuesto estable de color amarillo por la reacción con un antioxidante, que puede donar un electrón al DPPH (Hussein M. 2011, Sharma O. et. al., 2009, Molyneux P. 2004).

Por este método, se encontró que el compuesto objeto de estudio (A4) presenta una actividad antioxidante, aunque en menor grado que el RSV (Szkudelski T. 2007). Lo anterior fue observado utilizando la misma concentración de ambos compuestos

(50 μ M), sin embargo a una concentración de 100 μ M, el A4 presenta una actividad antioxidante similar estadísticamente a la del RSV.

Una vez corroborada la capacidad antioxidante del A4 por medio del ensayo de DPPH, debíamos observar su actividad *in vitro* en cultivos de islotes pancreáticos de rata; tratadas con STZ, ya que este fármaco es ampliamente utilizado para inducir diabetes en animales de experimentación; debido a su estructura, es introducido a las células beta pancreáticas por medio del transportador de glucosa Glut 2, metabolizándose e incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (Szkudelski T., 2001, Szkudelski T. 2012, Chen F. et. al., 2013), lo cual trae como consecuencia la muerte celular por apoptosis o necrosis.

En estudios realizados por Morimoto S. y colaboradores en 2005, se observó que la STZ a dosis bajas induce apoptosis temprana de las células beta pancreáticas sin que llegue a desarrollarse necrosis.

Para observar el efecto del compuesto A4, se probaron diferentes concentraciones 25, 50 y 100 μ M sobre islotes pancreáticos que posteriormente fueron tratados con STZ.

Los islotes de los diferentes tratamientos se incluyeron en una resina plástica y se realizaron cortes ultra delgados para posteriormente, analizar su ultra estructura por medio de microscopía electrónica.

Por medio de esta técnica se identificaron como células apoptóticas a aquellas que presentaron condensación de la cromatina, daño mitocondrial y de retículo endoplásmico (principales características de la muerte por apoptosis) (Gavrieli Y. et. al., 1992). Se observó que, al aumentar la concentración del compuesto A4, el número de células que mostraron el daño característico de la apoptosis, fue menor que en los islotes que no fueron tratados con este compuesto.

Esto indica que el compuesto A4, podría estar funcionando como captador de radicales libres (por ejemplo, óxido nítrico) producidos dentro de la célula beta pancreática cuando la STZ es metabolizada (Szkudelski T. 2001), el A4 estaría

disminuyendo el estrés oxidante que causa la apoptosis de las células beta conforme aumenta la concentración del compuesto.

Para corroborar los resultados obtenidos se utilizó la técnica de TUNEL, con la que se detectan los núcleos de las células apoptóticas. Con ayuda de un microscopio confocal, que al aumentar la concentración del A4 hay una disminución del número de núcleos apoptóticos. Con estos resultados podemos decir que el compuesto A4 puede disminuir la ruptura del DNA que se da en el proceso de apoptosis.

El efecto antioxidante mostrado por el compuesto A4 a la concentración más baja (25µM) en comparación con el RSV, es mucho menor; sin embargo a una concentración de 100µM presenta efectos similares al RSV. Estos resultados apoyan y confirman que los cambios degenerativos de las células beta inducidos por el tratamiento con STZ son revertidos por el resveratrol reportado por Szkudelski y colaboradores en 2014.

8 Conclusión

El compuesto 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de sodio, presentó una actividad antioxidante que protegió a las células beta pancreáticas contra el daño por apoptosis producido por la estreptozotocina.

9 Bibliografía

- Ackermann A., Gannon M., «Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion.» *J Mol Endocrinol* 38 (2007): 193-206.
- Alfaro E., García C., Dueñas A. «Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones.» *Rev. Inst. Nat. Cancerol.* 46 (2000): 275-280.
- Barry Hallivell, John M.C. Gutteridge. «Free radicals in biology and medicine.» 2007.
- Bolmeson C., Cilio C., Edlund A., Eliasson L., Esguerra J., Gupta S., Holmberg D., Kalis M., Khoo N., Mayans S., Speidel D., Tormo-Badia N., Wendt A., «Beta-cell specific deletion of Dicer1 leads to defective insulin secretion and diabetes mellitus.» *PLoS ONE* 6 (2011): 1-13.
- Cascales M. «Bases moleculares de la apoptosis.» *Anal. Real Acad. Nat. Farm.*, 69 (2003): 36-64.
- Catalgol B., Batirel S., Taga Y., Ozer N. «Resveratrol: French paradox revisited.» *Front Pharmacol* 3 (2012): 1-18.
- Chen F., Xiong H., Wang J., Ding X., Shu G., «Antidiabetic effect of total flavonoids from *Sanguis draxonis* in type 2 diabetic rats.» *J Ethnopharmacol* 149 (2013): 729-736.
- Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R., Lenzen S. «Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin.» *Diabetologia* 43 (2000): 1528-1533.
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. «Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.» *J Cell Biol.* 119 (1992): 493-501.

- Halliwell B. «Biochemistry of oxidative stress.» *Biochem Soc Trans* 35 (2007): 1147-1150.
- Hengartner M. «The biochemistry of apoptosis.» *Nature* 407 (2000): 770-776.
- Hussein MA. «A Convenient mechanism for the free radical scavenging activity of Resveratrol.» *International Journal of Phytomedicine* 3 (2011): 459-469.
- Kajimoto Y., Kaneto H. «Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction.» *Ann N Y Acad Sci* 1011 (2004): 168-176.
- Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa J., Matsuoka T., Fujitani Y., Umayahara Y., Hanafusa T., Matsuzawa Y., Yamasaki Y., Hori M.,. «Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity.» *Diabetes* 48 (1999): 2398-2406.
- Khanduja K., Bhardwaj A.,. «Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids.» *Indian J Biochem Biophys* 40 (2003): 416-422.
- Konigsberg M. «Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas.» El manual moderno, 2008.
- Konrad R., Mikolaenko I., Tolar J., Liu K., Kudlow J.,. «The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase.» *Biochem J* 356 (2001): 31-41.
- Kosanić M., Ranković B., Vukojević J.,. «Antioxidant properties of some lichen species.» *J Food Sci Technol* 48 (2011): 584–590.
- Lazo de la Vega M., Fernandez C.,. «Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes.» En *Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy*, de David Wagner, 93-116. InTech, 2011.

- Lee Y., Kim J., Lee E., Ahn Y., Song K., Yoon K., Kim H., Park C., Li G., Liu Z., Ko S., «Chronic resveratrol treatment protects pancreatic islets against oxidative stress in db/db mice.» *PLoS One* 7 (2012): 1-8.
- Lenzen S. «Oxidative stress: the vulnerable beta-cell.» *Biochem Soc Trans* 36 (2008): 343-347.
- Lenzen S. «The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes.» *Diabetología* 51 (2008): 216–226.
- Maritim A., Sanders R., Watkins J., «Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review.» *J Biochem Mol Toxicol* 17 (2003): 24-38.
- Mathis D., Vence L., Benoist C., «beta-Cell death during progression to diabetes.» *Nature* 414 (2001): 792-798.
- Molyneux P. «The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant.» *Songklanakarin J Sci Technol* 26 (2004): 211-219.
- Morimoto S., Fernandez-Mejia C., Romero-Navarro G., Morales-Peza N., Díaz-Sánchez V., «Testosterone effect on insulin content, messenger ribonucleic acid levels, promoter activity, and secretion in the rat.» *Endocrinology* 142 (2001): 1442-1447.
- Murata M., Takahashi A., Saito I., Kawanishi S., «Site-specific DNA methylation and apoptosis: induction by diabetogenic streptozotocin.» *Biochem Pharmacol* 57 (1999): 881-887.
- Nelson, David L, y Michael M Cox. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Omega, 2005.
- Olvera C., Leo G., Hernández H. « Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración?» *Bol Med Hosp Infant Mex* 65 (2008): 306-324.

- Palsamy P., Sivakumar S., Subramanian S., «Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats.» *Chem Biol Interact.* 186 (2010): 200-210.
- Parnaud G., Bosco D., Berney T., Pattou F., Kerr-Conte J., Donath M., Bruun C., Mandrup-Poulsen T., Billestrup N., Halban P., «Proliferation of sorted human and rat beta cells.» *Diabetologia* 51 (2007): 91-100.
- Perico L. «Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Labariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad.» Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia, 2011.
- Perl S., Kushner J., Buchholz B., Meeker A., Stein G., Hsieh M., Kirby M., Pechhold S., Liu E., Harlan D., Tisdale J. «Significant Human β -Cell Turnover Is Limited to the First Three Decades of Life as Determined by in Vivo Thymidine Analog Incorporation and Radiocarbon Dating.» *J Clin Endocrinol Metab* 10 (2010): 234-239.
- Rani A., Mythili S., «Study on Total Antioxidant Status in Relation to Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus.» *J Clin Diagn Res* 8 (2014): 108-110.
- Robertson R. «Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in Diabetes.» *J. Biol. Chem.* 279 (2004): 42351-42354.
- Rodríguez J., Menéndez J., Trujillo Yoel., «Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo .» *Rev Cubana Med Milit* 30 (2001): 36-44.
- Sharma O., Bhat T., «DPPH antioxidant assay revisited.» *Food Chem.* 113 (2009): 1202-1205.
- Su H., Hung L., Chen J., «Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats.» *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290 (2006): E1339-E1346.

- Szkudelski T. «Resveratrol-induced inhibition of insulin secretion from rat pancreatic islets: evidence for pivotal role of metabolic disturbances.» *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293 (2007): E901-E907.
- Szkudelski T. «Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental mode.» *Exp Biol Med (Maywood)* 237 (2012): 481-490.
- Szkudelski T. «The insulin-suppressive effect of resveratrol - an in vitro and in vivo phenomenon.» *Life Sci* 13 (2008): 430-435.
- Szkudelski T. «The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas.» *Physiol Res* 50 (2001): 536-546.
- Szkudelski T., Szkudelska K., «Resveratrol and diabetes: from animal to human studies.» *Biochim Biophys Acta* 1852 (2014): 1-10.
- Vikram A., Tripathi d., Ramarao P., Jena G., «Evaluation of streptozotocin genotoxicity in rats from different ages using the micronucleus assay.» *Regul Toxicol Pharmacol* 49 (2007): 238-244.
- Zhang J, Chen L, Zheng J, Zeng T, Li H, Xiao H, Deng X, Hu X. «The protective effect of resveratrol on islet insulin secretion and morphology in mice on a high-fat diet.» *Diabetes Res Clin Pract.* 97 (2012): 474-482.