



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación de la capacidad hipoglucemiante y regeneradora de un compuesto a base de *Tecoma stans* y *Vaccinium myrtillus*

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA
ANGÉLICA JAZMÍN RAMÍREZ MENDIETA**

ASESORA: Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo
COASESOR: Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación de la capacidad hipoglucemiante y regeneradora de un compuesto a base de *Tecoma stans* y *Vaccinium myrtillus*.

Que presenta la pasante: **Ramírez Mendieta Angélica Jazmín**

Con número de cuenta: **414001716** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Enero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño:

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa, por brindarme salud, fortaleza y capacidad para culminar con éxito mis metas propuestas.

A mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida.

A todas las personas especiales que estuvieron conmigo en esta etapa, aportando a mi formación profesional y como ser humano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los todos docentes que con su enseñanza, apoyo, conocimiento, motivaron a desenvolverse como persona y profesional en mi amada Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a mi asesora de tesis, Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por su paciencia, sabiduría y por haberme guiado a lo largo de este trabajo; a mi coasesor, el Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate por su motivación e interés en mi trabajo y también por su enseñanza.

Quiero agradecer también al M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz por el apoyo, paciencia y enseñanza que me brindó durante la realización de la parte experimental de biología molecular; al Dr. Germán Isauro Garrido Fariña por el apoyo y conocimientos que me brindó durante la realización del análisis morfológico.

A los miembros que conforman el jurado, Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez, M. en C. Tais Nopal Guerrero, Dra. Dolores Molina Jasso y Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García por su interés en mi trabajo y tiempo brindado.

Agradezco a mis padres que han sabido guiarme a lo largo de mi vida y por brindarme el apoyo tanto económico como moral, por ser mi ejemplo de vida y por su amor incondicional.

A mi hermano por ser un gran amigo para mí, porque admiro su inteligencia y dedicación y es uno de los seres más importantes en mi vida.

A mi abuela por haberme cuidado desde la infancia, por todo su amor y bondad, estoy eternamente agradecida con ella.

A mi novio por ser el apoyo incondicional en mi vida, que muchas veces con su amor y palabras de aliento, me ayuda a cumplir mis objetivos.

A mis amigos por el apoyo emocional y brindarme su amistad en buenos y malos momentos.

La presente investigación, cuya responsable es la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, fue apoyada por el programa PIAPI-FESC convocatoria 2018.

“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos”

- Marie Curie (1867 – 1934)

ÍNDICE

1. RESUMEN	10
2. ABSTRACT.....	12
3. INTRODUCCIÓN	14
4. MARCO TEÓRICO.....	17
4.1 Páncreas.....	17
4.1.1 Páncreas exocrino.....	19
4.1.2 Páncreas endocrino.....	19
4.1.2.1 Célula β	20
4.1.2.1.1 Insulina.....	20
4.2 Diabetes mellitus.....	22
4.2.1 Diabetes mellitus tipo 1.....	22
4.2.2 Diabetes mellitus tipo 2.....	24
4.2.3 Desarrollo de la Diabetes mellitus tipo 1.....	24
4.2.4 Factores asociados a la destrucción de células β pancreáticas en Diabetes mellitus.....	26
4.2.5 Radicales libres.....	26
4.3 Plantas medicinales	27
4.3.1 Evolución de las plantas medicinales hipoglucemiantes.....	28
4.3.2 <i>Vaccinium myrtillus</i>	31
4.3.2.1 Taxonomía y características	33
4.3.2.2 Efecto hipoglucemiante	35
4.3.3 <i>Tecoma stans</i>	36
4.3.3.1 Taxonomía y características	38
4.3.3.2 Efecto hipoglucemiante	38
4.3.4 Compuestos fenólicos.....	40
4.3.5 Flavonoides.....	41
4.3.5.1 Apigeninas.....	42
4.3.5.2 Antocianinas.....	42

4.3.5.3 Prueba de Shinoda.....	43
4.4 El extracto (Thelzán 101).....	44
4.5 Liofilización.....	46
4.6 Modelos experimentales	47
4.6.1 Inducción de Diabetes mellitus con Estreptozotocina	48
4.7 Regeneración pancreática.....	49
4.7.1 Células madre pancreáticas.....	50
4.7.2 Nestinas.....	51
5. OBJETIVOS.....	52
5.1 Objetivo general.....	52
5.2 Objetivos particulares.....	52
6. HIPÓTESIS.....	53
7. METODOLOGÍA.....	54
7.1 Lavado y despirogenización del material	54
7.2 Liofilización del hipoglucemiante a base de <i>T. stans</i> y <i>V. myrtilus</i>	54
7.3 Prueba de identidad	55
7.4 Prueba de esterilidad	55
7.5 Prueba de eficacia	55
7.5.1 Formación de lotes.....	55
7.5.2 Inducción de diabetes mellitus a ratones macho cepa CD1.....	55
7.5.3 Tratamiento con Thelzán 101	56
7.5.4 Sacrificio y extracción de órganos.....	56
7.5.5 Diseño de iniciadores para nestinas.....	57
7.5.6 Preparación de oligonucleótidos.....	57
7.5.7 PCR de gradiente.....	57
7.5.8 Purificación de RNA de páncreas de ratón con el kit de Ambion® RiboPure™	58
7.5.9 Cuantificación de RNA.....	59
7.5.10 Síntesis de cDNA con transcriptasa inversa (M-MLV RT)	59
7.5.11 PCR de punto final.....	60
7.5.12 Electroforesis.....	60

7.5.13 Cuantificación indirecta de nestinas.....	60
7.5.14 Análisis morfológico.....	61
8. RESULTADOS.....	63
8.1 Producto liofilizado Thelzán 101.....	63
8.2 Prueba de identidad.....	64
8.3 Prueba de esterilidad.....	64
8.4 Prueba de eficacia.....	65
8.4.1 Inducción del estado diabético.....	66
8.4.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante de Thelzán 101.....	67
8.4.3 Determinación de la expresión de nestinas.....	68
8.4.3.1 Diseño de primers.....	68
8.4.3.2 PCR de punto final.....	69
8.4.3.3 Cuantificación indirecta de nestinas.....	69
8.4.4 Análisis morfológico.....	71
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
10. CONCLUSIONES.....	81
11. BIBLIOGRAFÍA.....	83
12. ANEXOS.....	93

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

·OONO	Peroxinitrilo
ADP	Adenosín difosfato
AHPA	Asociación Americana de Productos Herbarios
ANOVA	Análisis de varianza
AST	Agar Trypticasa de Soya
ATP	Adenosín trifosfato
BAD	(β - α - δ)
CAT	Catalasa
cDNA	DNA complementario
CICUAE	Comité Interdisciplinario del Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
CO	Ciclooxygenasa
dL	decilitros
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP's	Deoxinucleóido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EC	Enterocromafines
EMB	Eosina Azul de Metileno
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERN	Especies Reactivas de Nitrógeno

ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FLA	Fosfolipasa A
FNT- α	Factor de Necrosis Tumoral α
GAD65	Ácido glutámico descarboxilasa
GLUT-2	Transportador de glucosa 2
GM	Gangliósidos
H-E	Hematoxilina Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
HO·	Radical hidroxilo
IA-2	Antígeno de Insulinoma 2
IA-2B	Antígeno de Insulinoma 2B
ICA-69	Antígeno de los islotes pancreáticos
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IDT	Integrated DNA Technologies
IFN- γ	Interferón γ
IL-1 β	Interleucina 1 β
IMEPLAM	Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales

LO	Lipooxigenasa
MDA	Malondialdehido
mg	miligramos
mL	mililitros
mmHg	Milímetros de mercurio
MPO	Mieloperoxidasa
mRNA	RNA mensajero
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
ng	nanogramos
Ngn3	Neurogenina 3
NO	Monóxido de nitrógeno
NO ₂	Dióxido de nitrógeno
NOM	Norma Oficial Mexicana
O ₂	Anión superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	pares de bases
PBS	Solución Salina Amortiguada por Fosfatos
PCR	Reacción en Cadema de la Polimerasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa

PP	Polipéptido pancreático
PPAR γ	Receptor de peroxisoma proliferador activado γ
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
SOD	Superóxido dismutasa
STZ	Estreptozotocina
TBE	Tris Borato EDTA
Tm	Temperatura de fusión
Torr	Torricelli
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria
VIP	Polipéptido Intestinal Vasoactivo
W	watts
XO	Xantina oxidasa
μ L	microlitros

1. RESUMEN

La Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2) comparten como característica común la hiperglucemia, ya sea debido a una disminución y deterioro progresivo de la masa de células β en los islotes pancreáticos o a una disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización. Estudios realizados sobre la fisiopatología de la diabetes mellitus tanto tipo 1 como tipo 2 han evidenciado la importancia que tienen los radicales libres en la disfunción de las células β pancreáticas, sobre todo en la tipo 1, donde producen una citotoxicidad importante debido al ataque del sistema inmune. Dada la relación hipotética entre la diabetes y la inflamación, y el potencial de los flavonoides para proteger el cuerpo contra los radicales libres y otros compuestos pro-oxidativos, es probable que el consumo de flavonoides o alimentos ricos en flavonoides pueda reducir el riesgo de diabetes. El compuesto Thelzán 101 contiene el extracto de dos plantas utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes mellitus, una de las plantas es *Vaccinium myrtillus* (arándano) conocida por su efecto antioxidante atribuido a las antocianinas; la otra planta es *Tecoma stans* (tronadora) que presenta la función antioxidante, por su alto contenido de apigeninas. Tanto las antocianinas como las apigeninas son flavonoides. Para evaluar la capacidad hipoglucemiante y regeneradora del compuesto liofilizado Thelzán 101, se trabajó con ratones macho adultos jóvenes cepa CD1 inducidos con estreptozotocina (40 mg/kg), una vez diabetizados los ratones se sometieron a un tratamiento de 5 semanas con Thelzán 101 vía oral (51 mg/kg), terminado este periodo se sacrificaron los ratones y se determinó la presencia de nestinas y la cuantificación indirecta de la expresión de éstas en sus páncreas, así mismo se realizó un análisis morfológico para observar posibles cambios en hígado, riñón y páncreas. Se comprobó la actividad hipoglucemiante del compuesto Thelzán 101 debido a que los resultados obtenidos indican que los niveles de glucosa de los ratones del lote diabético con tratamiento (85.50 ± 10.09 mg/dL) no muestran diferencia significativa comparados con los niveles de glucosa del lote control (92.33 ± 14.05 mg/dL), mientras que los niveles de glucosa del lote de diabéticos (132.40 ± 8.26 mg/dL) comparado con los del lote control (92.33 ± 14.05 mg/dL) fueron significativamente diferentes, lo mismo ocurrió con el lote de diabéticos

(132.40 ± 8.26 mg/dL) comparado con el lote de diabéticos con tratamiento (85.50 ± 10.09 mg/dL). En cuanto a la actividad regeneradora del compuesto Thelzán 101 se confirmó la presencia de células que expresan nestinas en páncreas de ratón de los tres lotes pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de éstas en los lotes; control (81.58 ± 9.26 ng/5 μ L), diabéticos (86 ± 6.47 ng/5 μ L) y diabéticos con tratamiento (83.28 ± 8.08 ng/5 μ L), sin embargo, se cumple el comportamiento esperado tras una lesión provocada por la estreptozotocina. En el análisis morfológico, se encontró en páncreas diferencia en cuanto al tamaño y cantidad de islotes pancreáticos a favor de los animales diabéticos con tratamiento en relación con los diabéticos sin tratamiento, mientras que no hubo evidencia de daño en hígado y riñón.

Palabras clave: Diabetes mellitus, liofilización, antioxidantes, flavonoides, *Tecoma stans*, *Vaccinium myrtillus*, nestinas, regeneración pancreática.

2. ABSTRACT

Diabetes mellitus type 1 (DM1) and type 2 (DM2) share a common characteristic of hyperglycemia, either due to a decrease and progressive deterioration of the β cell mass in the pancreatic islets or to a decrease in the efficiency of the mechanisms of signaling. Studies on the pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus have shown the importance of free radicals in the dysfunction of pancreatic β cells, especially in type 1, where they produce important cytotoxicity due to the attack of the system immune. Given the hypothetical relationship between diabetes and inflammation and the potential of flavonoids to protect the body against free radicals and other pro-oxidative compounds, it is probably that consumption of flavonoids or flavonoid-rich foods may reduce the risk of diabetes. The compound Thelzán 101 contains the extract of two plants traditionally used for the treatment of diabetes mellitus, one of the plants is *Vaccinium myrtillus* (blueberry) known for its antioxidant effect attributed to anthocyanins; the other plant is *Tecoma stans* (tronadora) that It fulfills the antioxidant function, due to its high content of apigenins. Both anthocyanins and apigenins are flavonoids. To evaluate the hypoglycaemic and regenerative capacity of lyophilized compound Thelzán 101, we worked with young male mice strain CD1 induced with streptozotocin (40 mg / kg), once diabetized the mice underwent a treatment of 5 weeks with Thelzán 101 orally (51 mg / kg), after this period the mice were sacrificed and the presence of nestins was determined and the semi-quantification of the expression of these in the pancreas, likewise a morphological analysis was performed to observe possible changes in liver, kidney and pancreas . The hypoglycaemic activity of the compound Thelzán 101 was verified because the obtained results indicate that the glucose levels of the mice of the diabetic with treatment group (85.50 ± 10.09 mg/dL) show no significant difference compared with the glucose levels of the control group (92.33 ± 14.05 mg/dL), while the glucose levels of the diabetic group (132.40 ± 8.26 mg/dL) compared with those of the control group (92.33 ± 14.05 mg/dL) were significantly different, the same occurred with the group of diabetics (132.40 ± 8.26 mg/dL) compared to the group of diabetics with treatment (85.50 ± 10.09 mg / dL). Regarding the regenerative activity of the Thelzán 101 compound,

the presence of nestin expressing cells in mouse pancreas of all three groups was confirmed, but no statistically significant difference was found between the concentration of these in the control (81.58 ± 9.26 ng/5 μ L), diabetics (86 ± 6.47 ng/5 μ L) and diabetics with treatment group (83.28 ± 8.08 ng/5 μ L), however, the expected behavior after a lesion caused by streptozotocin is fulfilled. In the morphological analysis no evidence of liver and kidney damage was found, however, in the pancreas there was some difference in the size and number of islets of Langerhans between the three different groups.

Key words: Diabetes mellitus, lyophilization, antioxidants, flavonoids, *Tecoma stans*, *Vaccinium myrtillus*, nestin, pancreatic regeneration.

3. INTRODUCCIÓN

La diabetes es un conjunto de alteraciones metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia crónica, debida a un defecto en la secreción de insulina, a un defecto en la acción de ésta o a ambas. La hiperglucemia crónica presente en la diabetes está asociada con daños a largo plazo, disfunción y fallo de diferentes órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2010).

Según la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición) 2016, respecto a la historia de enfermedad crónica en adultos, el 9.4% refirieron tener un diagnóstico clínico previo de diabetes. Comparando con las encuestas previas, se observa un ligero aumento en la prevalencia con respecto a la ENSANUT 2012 (9.2%) y un mayor aumento con respecto a la ENSANUT 2006 (7%). La mayoría (87.8%) reportó recibir tratamiento médico para controlar su enfermedad; esta cifra es ligeramente mayor a la reportada en la ENSANUT 2012 (85%) y menor a la reportada en la ENSANUT 2006 (94.06%). En el último año, con el fin de valorar su control glicémico, el 15.2% se había medido la hemoglobina glicosilada, 4.7% la microalbuminuria y 20.9% tuvo revisión de pies. A pesar de que existe un ligero incremento en dichas prevalencias respecto a la ENSANUT 2012 (9.6, 4.8 y 14.6%, respectivamente), los resultados de esta encuesta muestran que la vigilancia médica y prevención de complicaciones especificados en la NOM-015-SSA2-2010 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus están aún lejos de alcanzarse.

Respecto a la Diabetes Mellitus tipo 1, según datos de la Federación Internacional de Diabetes 2016 (IDF), 542,000 niños viven con diabetes tipo 1 y 86,000 niños desarrollan diabetes tipo 1 cada año. Además, México se encuentra dentro de los 10 primeros países con el mayor número de niños de 0 a 14 años con Diabetes Mellitus tipo 1. Aún y cuando la diabetes tipo 1 es la menos común, todavía sigue aumentando en el mundo alrededor de 3% al año, particularmente entre los niños.

Hoy en día se están investigando nuevas terapias para la Diabetes Mellitus tipo 1, como son: la pramlintida que es un análogo sintético de la amilina y mejora la hiperglucemia postprandial; la insulina inhalada y el trasplante de células de islotes pancreáticos y al de células madre (Danne T. et al., 2007).

Actualmente, se ha descrito que el páncreas tiene la capacidad de responder a distintos tipos de daño celular con la proliferación de un grupo de células que son marcadas con nestina. Recientemente, se ha relacionado a este linaje celular con la posibilidad de comportarse como células madre pancreáticas. Estudios realizados por Rosenberg y Vinik en 1989, ya sugerían esta posibilidad (Olvera-Granados C. P. et al., 2008).

Cada vez son más los estudios que se encaminan a definir el funcionamiento de las células β usando marcadores para observar la expresión de algunos genes que normalmente expresa la célula β ; así mismo, definir los genes que se expresan ante situaciones de estrés. Es verdad que bajo condiciones normales, las células β tienen una baja capacidad de regeneración; sin embargo, tanto las células endocrinas como las exocrinas se pueden regenerar regulando la expresión de varios marcadores de proliferación, entre ellos un marcador llamado nestina que se expresa en respuesta a la lesión o pérdida celular (Olvera-Granados C. P. et al., 2008).

Distintos modelos experimentales han sido desarrollados para investigar la fisiopatología de la Diabetes Mellitus tipo 1 y también para observar la neogénesis que existe tras la lesión con este agente lesivo; uno de ellos es utilizando a la estreptozotocina (STZ), que es un modelo ampliamente utilizado en este campo de la investigación. La STZ es una molécula con una alta capacidad alquilante que fragmenta el DNA de la célula β y produce una gran cantidad de radicales libres, dando por resultado la necrosis de la célula β (Bouwens L, Rooman I., 2005). Según Olvera-Granados C. P. et al., la STZ tiene varios mecanismos lesivos, entre los que se encuentran la lesión al GLUT-2, ya que se une a este receptor para impedir el paso de glucosa al interior de la célula β y de esta manera provoca un déficit en la expresión de proinsulina.

Los medicamentos hipoglucemiantes son empleados para reducir la concentración de glucosa en la sangre, existiendo diversos medicamentos que se utilizan con este efecto en los pacientes diabéticos; sin embargo, algunos de estos medicamentos pueden presentar efectos

adversos importantes y llegan a producir otros problemas orgánicos en los pacientes que los utilizan (Ibarra Salas M. J., 2009).

Es por eso que la medicina tradicional derivada principalmente de plantas juega un papel importante en el manejo de la Diabetes Mellitus. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado el uso de tratamientos a base de plantas tradicionales para tratar la diabetes ya que son efectivos, no tóxicos, con mínimos o nulos efectos adversos y son considerados excelentes candidatos para la terapia oral (Chandran R. et al., 2016).

Lo que se pretende con este trabajo es, evaluar la capacidad hipoglucemiante y regeneradora de un extracto liofilizado a base de *Tecoma stans* y *Vaccinium myrtillus* en ratones macho de la cepa CD1, para así poder aportar a futuro una alternativa de terapia no invasiva como suele ser un trasplante de islotes para el tratamiento o control de la Diabetes Mellitus tipo 1.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Páncreas

El páncreas es el único órgano exocrino y endócrino localizado en la región retroperitoneal de la cavidad superior abdominal. En humanos, el páncreas se divide en cabeza, cuerpo y cola, la cabeza tiene contacto con la región duodenal del intestino y la cola con el bazo. En otros mamíferos, como perros y ratones, el páncreas es menos diferenciado y se observa como tejido rosa amorfo adyacente al mesenterio que corre a lo largo de la parte superior de la pared intestinal (Berger H. et al., 2008). Es una glándula mixta, contiene tejido exocrino conformado por células acinares productoras de enzimas digestivas; y también presenta un tejido endocrino compuesto por las células de los islotes pancreáticos, que producen hormonas que mantienen la homeostasis de la glucosa (Figura 1). En conjunto, los islotes representan alrededor de 1% del peso de la glándula (Olvera-Granados C. P. et al, 2008).

El páncreas es considerado como una glándula digestiva accesoria, alargada de derecha a izquierda y de abajo hacia arriba, angosta en sentido anteroposterior, con una concavidad posterior moldeada sobre la columna lumbar. Por otro lado el páncreas está adosado de forma transversal a la pared posterior prevertebral. La línea mediana deja un tercio de la glándula a la derecha, extremo que se relaciona con el duodeno, y dos tercios a la izquierda, que se relacionan con el bazo (Arenas G.M. et al., 2005).

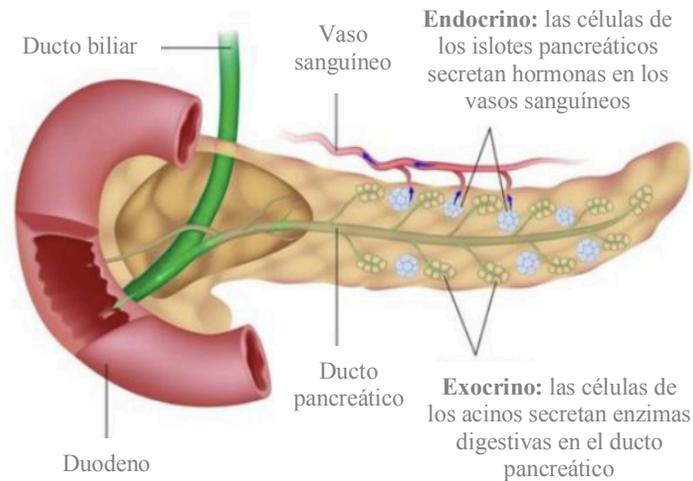


Figura 1. Estructura del páncreas. Modificado de Silvestre M. (2017).
[<https://www.merca2.es/celulas-beta-productoras-insulina/>]

El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos. Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad. El tejido endocrino adulto contiene cuatro tipos celulares diferentes, con mayor densidad en la zona de la cola. Estas células son: células productoras de insulina o β , que representan 70%; células productoras de glucagón o α , que representan 20%; las células productoras de somatostatina o δ , que representan entre 5 a 10%, y las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor de 2% (Figura 2). Existen algunos tipos celulares secundarios, las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP o células DI) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromafines). Estos grupos están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células β están en el interior del islote y el resto de los grupos celulares se encuentra en la periferia. La organización del aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD (β - α - δ) por su forma centrífuga de aporte vascular. Otro tipo celular, recientemente encontrado en la periferia del islote pancreático, es el parecido a las células de Schwann (oligodendrocitos), ocupan menos de 1% y se cree que podrían ser importantes en la regeneración pancreática (Olvera-Granados C. P. et al, 2008).

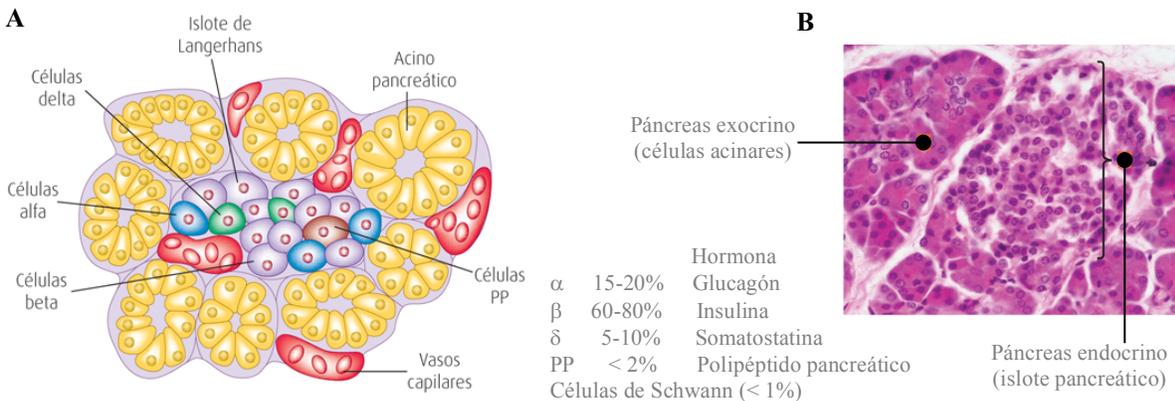


Figura 2. Representación de la anatomía e histología pancreática. **A)** Se observa la representación de un islote de Langerhans rodeado de células acinares, las células que conforman el islote de Langerhans se encuentran representadas con sus respectivos porcentajes y la hormona que secretan. **B)** Se observa la histología del páncreas exocrino (células acinares) y páncreas endocrino (islote de Langerhans), tinción H-E. Modificado de Sepúlveda Saavedra J. (2014) y Olvera-Granados C. P. et al. (2008).

4.1.1 Páncreas exocrino

A nivel exocrino el páncreas es una glándula tubuloacinar compuesta, que a diario produce alrededor de 1200 ml de un líquido rico en bicarbonato y proenzimas digestivas. Aproximadamente 40 a 50 células acinares forman un acino seroso cuya luz contiene 3 células centroacinares que dan inicio al sistema de conductos pancreáticos, y de esta manera conforman el páncreas exocrino. Cada célula acinar tiene forma de pirámide truncada cuya base descansa sobre la lámina basal que separa las células del tejido conectivo denso que rodea al páncreas. El núcleo de estas células es redondo e intensamente basófilo, presenta un aparato de Golgi como organelo predominante, del mismo modo, encontramos gránulos secretorios que reciben el nombre de gránulos de zimógeno, responsables de la producción de proenzimas digestivas en el páncreas (Arenas G.M. et al., 2005).

4.1.2 Páncreas endocrino

El componente principal del páncreas endocrino son los islotes pancreáticos, conformado por un conglomerado esférico, de alrededor de 3,000 células. El páncreas en su totalidad está constituido por aproximadamente 1,000 islotes con una mayor proporción de ellos en la cola del órgano. Se encuentran principalmente 4 tipos de células conformando el parénquima del

páncreas endocrino: las células β , células α , células δ , células PP (polipéptido pancreático). Estas células son similares mediante exámenes histológicos corrientes, por tal motivo que para poder identificarlas se deben utilizar métodos especiales. Resulta factible aplicarles exámenes de electrodensidad o micrográficas electrónicas, que ofrecen resultados precisos (Arenas G.M. et al., 2005).

En la mayoría de los mamíferos, las células β se encuentran reposando en el centro del islote y están rodeadas de una capa delgada de células α , δ y PP. Estas células periféricas son más pequeñas que las células β y también presentan granulaciones. El páncreas de un humano adulto de peso promedio (70 kg) contiene entre 300,000 y 1.5 millones de islotes y los ratones adultos tienen aproximadamente de 100 a 200 islotes (Kahn R. et al., 2005).

El páncreas endocrino, aunque constituye sólo el 1% del tejido pancreático, recibe entre el 5 y el 15% del flujo sanguíneo, lo que indica la enorme vascularización del componente endocrino. Con frecuencia cada célula β se encuentra rodeada por dos o más capilares, cuyo endotelio fenestrado facilita un intercambio rápido de metabolitos y hormonas entre la sangre y el espacio intracelular, por lo que hoy día se acepta que es esta vía la principal ruta de intercomunicación entre las células del islote (Brandan N.C. et al., 2011).

4.1.2.1 Célula β

Las células beta: Son productoras de insulina, cuya producción se inicia con la síntesis de preproinsulina en el retículo endoplasmático rugoso (RER) de las células beta, luego por segmentación enzimática de la preproinsulina en las cisternas del RER, ésta se convierte en proinsulina. La proinsulina, se agrupa en vesículas donde luego por auto escisión, se elimina un segmento de la molécula y se produce la insulina. La insulina es liberada al espacio extracelular cuando aumentan los niveles de glucosa, después de una comida rica en carbohidratos (Arenas G.M. et al., 2005).

4.1.2.1.1 Insulina

La insulina es una proteína formada por dos cadenas peptídicas A y B de 21 y 30 aminoácidos (aa) unidas, mediante enlaces covalentes, por dos puentes disulfuro, y un puente intracatenario, y es segregada por las células β del islote pancreático. Su importancia viene

determinada por el papel determinante de esta hormona en la homeostasis de la glucemia y su relación con la diabetes mellitus (Brandan N.C. et al., 2011).

El proceso de secreción de insulina está regulado mediante señales generadas por nutrientes, neurotransmisores y hormonas. Entre los nutrientes, la glucosa es el principal regulador fisiológico de la secreción de insulina. La glucosa penetra en la célula β mediante un transportador tipo GLUT 2, que permite la entrada rápida de la misma a concentraciones fisiológicas. En el interior de la célula sufre una fosforilación a glucosa-6-P mediante una glucoquinasa, esta enzima se considera el verdadero sensor de glucosa de la célula β , ya que su actividad es esencial para la estimulación de la secreción de insulina mediada por glucosa. La glucosa-6-P es el paso inicial del metabolismo de la glucosa, cuyo fin es la producción de ATP. El incremento en ATP/ADP cierra los canales de potasio dependientes de ATP, de forma que el potasio se acumula en el interior de la célula, lo que produce la despolarización de la membrana celular con lo que se abren sus canales de calcio y la entrada de dicho catión en la célula, el cual es esencial para la secreción de insulina (Figura 3) (Brandan N.C. et al., 2011).

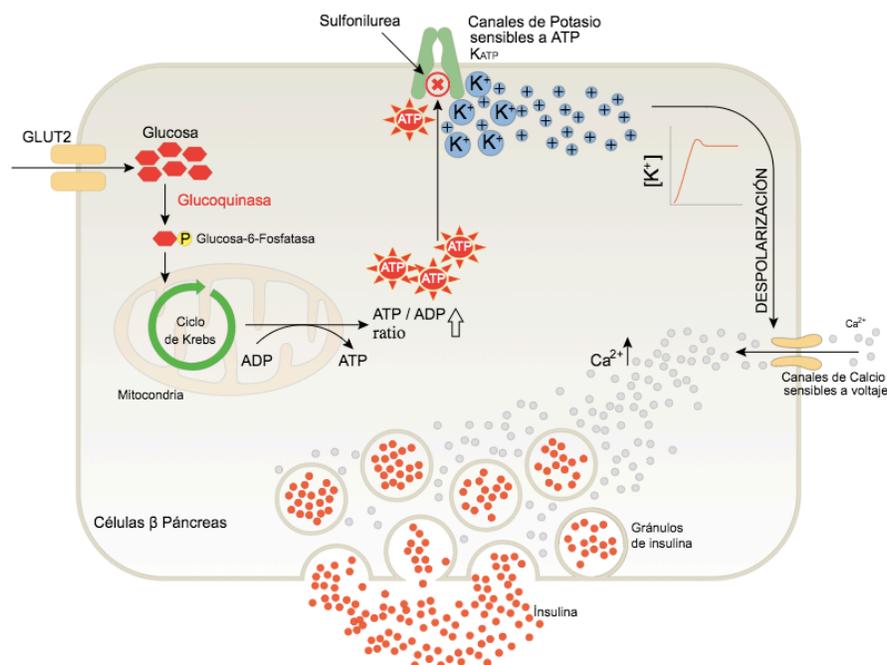


Figura 3. Proceso de secreción de insulina. Obtenida de https://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=islotes+pancre%C3%A1ticos&lang=2#

4.2 Diabetes mellitus

La diabetes se ha convertido en un problema mundial de salud en este nuevo siglo. Se caracteriza por elevados niveles de glucosa en sangre debido a complejos procesos que involucran defectos en la secreción de insulina causados por la destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas (diabetes mellitus de tipo 1), así como el desarrollo progresivo de resistencia a la insulina en el hígado y los tejidos periféricos asociada a la disminución en la secreción de la hormona por parte de las células β pancreáticas (Diabetes mellitus de tipo 2). Existen, además, otras formas frecuentes de diabetes como la gestacional (Bequer L. et al., 2016).

Según la OMS (2016), 422 millones de adultos en todo el mundo padecían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980. La prevalencia mundial (normalizada por edades) de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4,7% al 8,5% en la población adulta. Ello supone también un incremento en los factores de riesgo conexos, como el sobrepeso o la obesidad.

En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT 2016), el estado de diversas enfermedades crónicas, entre ellas la diabetes, en la población mexicana mayor de 20 años, se encontró que la prevalencia de diabetes en el país pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016, esto con base en un diagnóstico previo de la enfermedad.

4.2.1 Diabetes mellitus tipo 1

La Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y tipo 2 (DM2) comparten como característica común la hiperglucemia, ya sea debido a una disminución y deterioro progresivo de la masa de células β en los islotes pancreáticos o a una disminución en la eficacia de los mecanismos de señalización. En la Diabetes mellitus tipo 1 existe un daño a las células β pancreáticas por un ataque selectivo del sistema inmunitario que conlleva a la generación excesiva y prolongada de radicales libres (Olvera-Granados C. P. et al., 2008).

La DM1 se asocia con la infiltración de linfocitos T autorreactivos al páncreas, donde destruyen las células β productoras de insulina. Con el tiempo, la capacidad de estas células

de secretar insulina en respuesta a los niveles de glucosa disminuye, dando lugar a una evidente elevación en los niveles de glucosa en suero (Smith M. et al., 2017).

La DM tipo 1 afecta a millones de personas en todo el mundo y su incidencia y prevalencia continúan aumentando. El mecanismo que inicia el proceso de destrucción inmunológica progresiva e irreversible de las células β no está del todo comprendido. Una de las teorías es que existen autoanticuerpos dirigidos de forma específica contra distintos componentes de las células β , linfocitos T con una capacidad regulatoria disminuida o la implicación de algún virus del medio ambiente. Todo esto combinado con una pobre expresión de enzimas antioxidantes pancreáticas, que le confieren una baja resistencia contra insultos oxidativos. Entre los autoantígenos se encuentran la insulina, ácido glutámico descarboxilasa (GAD65), tirosín fosfato, antígeno de insulinoma (IA)-2 e IA-2 β , carboxipeptidasa H, antígeno de los islotes pancreáticos (ICA-69), gangliósidos GM, autoantígeno 38-kd y Sox-13. La gravedad en el desarrollo de la DM1 se relaciona directamente con el número de autoantígenos presentes por individuo (Olvera-Granados C. P. et al, 2008).

Cuando la capacidad para secretar insulina disminuye, se presenta la hiperglucemia, que puede propiciar la acumulación de radicales libres a través de la auto oxidación y de la glucosilación no enzimática de las proteínas. Por tanto, la generación de radicales libres a partir de las citocinas que se generan en el proceso autoinmune junto con la cronicidad de la enfermedad, hacen que el paciente diabético esté expuesto a un aumento del estrés oxidativo, ocasionando daños a biomoléculas como los lípidos, carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y macromoléculas del tejido conectivo, interfiriendo de esta manera con la función celular (Olvera-Granados C. P. et al, 2008).

Estos radicales libres juegan un papel importante en la aparición de las complicaciones secundarias de la diabetes mellitus, dañando riñones, ojos, vasos sanguíneos y nervios. Existe evidencia donde el estrés oxidativo está involucrado en una amplia gama de enfermedades y estados anormales del cuerpo, así como también, se ha demostrado que éste implica una disminución de los niveles de sustancias antioxidantes (por ejemplo, vitamina E, urato) y aumento de los niveles de los productos de oxidación (daño en el DNA) (Ramírez-Ortiz M.A. et al., 2016).

4.2.2 Diabetes mellitus tipo 2

Es el tipo más frecuente, del 90 a 95% de las personas con diabetes mellitus padecen de DM tipo 2. Patogénicamente, se caracteriza por la presencia de resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina defectuosa o ambas. En el momento del diagnóstico suele haber una mezcla de ambas alteraciones y, etiológicamente, lo característico es la multifactorialidad con ausencia de destrucción autoinmune de las células β (Tébar Massó F.J. y Escobar Jiménez F., 2009).

La diabetes mellitus tipo 2 es el resultado de la interacción entre una predisposición genética y factores de riesgo conductuales y ambientales. Aunque todavía no se ha identificado la base genética de la DM2, existen pruebas sólidas de que factores de riesgo tan modificables como la obesidad y la inactividad física son los principales determinantes no genéticos de la enfermedad (Tuomilehto J. et al., 2001).

La obesidad abdominal está presente en más de un 85% de los diabéticos tipo 2, siendo éstos precisamente los que coinciden, habitualmente, con el diagnóstico de síndrome metabólico y, por tanto, con la resistencia a la insulina como elemento fundamental en su patogenia. Estos componentes tienen una carga genética importante, pero sin el concurso de factores de medio ambiente, sobre todo, del sedentarismo, no se ponen en marcha los mecanismos que provocan la aparición clínica del cuadro (Tébar Massó F.J. y Escobar Jiménez F., 2009).

Aunque su diagnóstico se realiza normalmente en la edad adulta (más de 40 años), cada vez la edad de diagnóstico es menor, estando diagnosticándose ya en adolescentes y más raramente en niños con obesidades abdominales importantes y/o gran resistencia a la insulina (Tébar Massó F.J. y Escobar Jiménez F., 2009).

4.2.3 Desarrollo de la Diabetes mellitus tipo 1

Se ha encontrado que las células β desarrollan varias etapas de lesión antes de desarrollar la diabetes mellitus. Inicia con una hiperplasia de las células β por mecanismos aún no bien determinados, posteriormente se pierde la capacidad para secretar insulina, llevando a un estado de glucotoxicidad. Esta alteración permite que la célula β cambie su fenotipo por cambios en la expresión de proteínas como la del transportador GLUT2, la glicerol fosfato

deshidrogenasa y la piruvato descarboxilasa, que normalmente mantienen el grado de especialización de las células β . Así mismo, al haber glucotoxicidad y lipotoxicidad, los genes que se mantenían suprimidos por parte de la célula β comienzan a sintetizar enzimas como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), fructosa 1,6-bifosfatasa y lactato deshidrogenasa, que participan en la gluconeogénesis y en la producción de lactato, llevando a la célula a un estado oxidativo. Estos procesos estimulan la activación de genes apoptóticos y proapoptóticos, acompañado con un incremento en la expresión de c-myc y de la activación de NF- κ B. Una vez que las células β pierden la capacidad para regenerarse, al permanecer en un medio glucotóxico, comienzan a hipertrofiarse como mecanismo compensatorio a la resistencia a la insulina. Existe una infiltración de los islotes pancreáticos por células mononucleares del sistema inmune, en su mayoría macrófagos y linfocitos T. Las citocinas liberadas como la IL-1 β , FNT- α y del IFN- γ pueden actuar de manera individual o en combinación, al menos en células β *in vitro* de roedores y en humanos. Esta destrucción inducida por citocinas puede estar mediada por los intermediarios de las especies reactivas de oxígeno como el O₂, H₂O₂ y HO[•], y por parte de las especies reactivas de nitrógeno se encuentra el NO. No se tiene suficiente información de que las ERO sean mediadores inducidos por las citocinas; sin embargo, se tiene evidencia de que el NO actúa como mediador en el efecto destructivo por parte de las citocinas hacia las células β humanas y que las ERO participan en la producción de la peroxidación lipídica y de aldehído para la destrucción mediada por citocinas (Olvera-Granados C. P. et al. 2008).

Varias vías metabólicas han sido implicadas en la citotoxicidad, tanto en células que no son de los islotes como en células β pancreáticas. Después de la unión a receptores específicos celulares, las citocinas inician señales que incluyen la activación de proteasas, fosfolipasas, metabolismo del ácido araquidónico, la formación de ERO y de la producción de NO. Tanto las ERO como las ERN, solas o en combinación, se piensa que inactivan a las enzimas mitocondriales y citosólicas, llevando a un decremento en la fosforilación oxidativa y en la glucólisis, disminuyendo así los niveles de ATP, y provocando la incapacidad de síntesis y secreción de insulina. El daño mitocondrial y del DNA, además de la depleción de ATP y de la muerte de las células β , se cree son resultado de la producción en exceso de radicales libres. Se sabe que las células β pancreáticas son excepcionalmente vulnerables a la citotoxicidad

de las ERO por sus bajos niveles de enzimas antioxidantes (Olvera-Granados C. P. et al. 2008).

4.2.4 Factores asociados a la destrucción de células β pancreaticas en Diabetes mellitus

Durante la progresión de la Diabetes mellitus las células β se ven crónicamente atacadas por un infiltrado inflamatorio de tipo autoinmune (llamado insulinitis) con gran cantidad de productos entre los cuales se encuentran citocinas y derivados de la oxidación. Estos compuestos son dañinos para la célula β , y la obligan a montar mecanismos de defensa para contrarrestar el ataque inmunológico inespecífico. Sin embargo, y debido a la cronicidad de la inflamación, las células β terminan expresando moléculas que al ser activadas inducen apoptosis de manera específica, de la cual no pueden escapar y terminan por destruirse (Manrique M., Silva D. 2006).

Múltiples factores contribuyen a la muerte de las células β entre los cuales los más estudiados son los productos de la insulinitis que incluyen las citocinas proinflamatorias, el óxido nítrico, las especies reactivas derivadas del oxígeno y las moléculas desencadenantes de apoptosis Fas y FasL (Manrique M., Silva D. 2006).

4.2.5 Radicales libres

Se llaman radicales a las moléculas que poseen en su último orbital un electrón no apareado, son altamente reactivas y, en su afán por alcanzar su estabilidad, comienzan a fragmentar macromoléculas, produciendo así un daño a éstas. La formación de radicales libres se da de manera natural en múltiples procesos fisiológicos, el daño que pueden generar es cuando son superados o poco controlados por los sistemas antioxidantes (Olvera-Granados C. P. et al. 2008).

Los radicales libres son también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ERO), entre ellos destacan el radical hidroxilo (HO^\cdot), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^\cdot) y entre las especies reactivas de nitrógeno (ERN) se encuentra el NO, como el más representativo, o moléculas derivadas de éste como el peroxinitrito ($^\cdot\text{OONO}$) y el dióxido de nitrógeno (NO_2). Son moléculas que se forman cuando el oxígeno y el nitrógeno son

liberados de los procesos aeróbicos mitocondriales normales; sin embargo, cuando la capacidad antioxidante es rebasada, el aumento en estas moléculas 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 de esta manera producir aún más radicales libres, citotoxicidad, muerte celular y/o apoptosis (Olvera-Granados C. P. et al. 2008).

Estudios realizados sobre la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2 han evidenciado la importancia que tienen los radicales libres en la disfunción de las células β pancreáticas, sobre todo en la DM tipo 1, donde producen una citotoxicidad importante debido al ataque del sistema inmune. Las células T y los macrófagos infiltran los islotes y secretan citocinas como IL-1, IFN- γ y FNT- α , que a su vez inducen la secreción de NO, HO $^{\cdot}$, H $_2$ O $_2$ y O $_2$ que dañan a las células β (Olvera-Granados C. P. et al. 2008).

También se ha demostrado ampliamente que la hiperglucemia, tanto intra como extracelular, genera una mayor producción de radicales libres, principalmente de superóxido (O $_2^{\cdot-}$), y con ello se incrementa el daño por estrés oxidativo. El estrés oxidativo es el promotor del desarrollo de las múltiples complicaciones asociadas a la diabetes mellitus, así mismo el estrés oxidativo está involucrado con la apoptosis (muerte celular programada) de las células β pancreáticas de los islotes pancreáticos y la resistencia a la insulina, que se observan en la diabetes mellitus tipo 1 y la diabetes mellitus tipo 2, respectivamente. Los radicales O $_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno (H $_2$ O $_2$) e hidroxilo ($^{\cdot}$ OH) se producen excesivamente en la mitocondria cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta durante la fosforilación oxidativa. Estos radicales libres ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena del DNA (Acosta Altamirano G. et al., 2011).

4.3 Plantas medicinales

La fitoterapia se considera un enfoque complementario para tratar y prevenir enfermedades; aunque está bien fundada en la tradición médica, a menudo carece de la validación científica adecuada. La afirmación, a menudo repetida, de que los extractos de hierbas, aunque generalmente ejercen un amplio espectro de efectos, muestran menos efectos indeseables que

las sustancias activas únicas, es un cuento antiguo que se ha comprobado en solo unos pocos casos (Gravotto G. et al. 2010).

Las plantas han formado la base de los sistemas de medicina tradicional que existen desde hace miles de años. Incluso en los tiempos modernos, los sistemas basados en plantas continúan desempeñando un papel esencial en la atención de la salud. La OMS ha estimado que aproximadamente el 80% de la población mundial de países en desarrollo depende principalmente de medicamentos tradicionales (en su mayoría derivados de plantas) para su atención primaria de salud. Los productos a base de plantas también desempeñan un papel importante en la atención de salud para el 20% restante en los países en desarrollo, y también para los de los países industrializados (Galvez Ranilla L. et al., 2010).

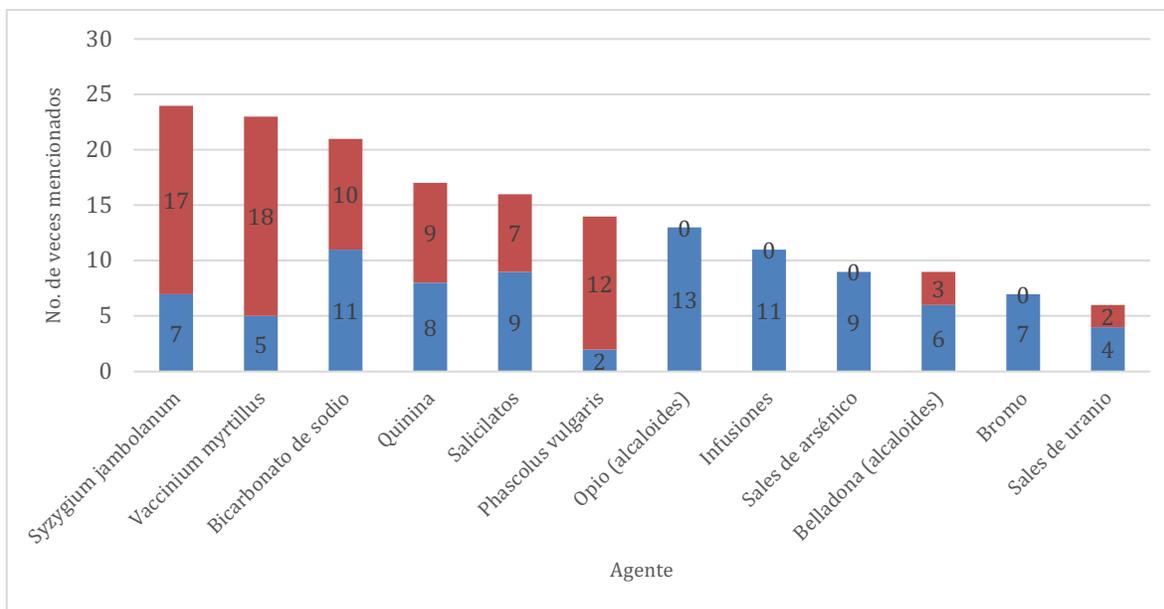
La forma de recolección y conservación de las plantas es de suma importancia para estudiar de manera correcta las plantas medicinales y sus efectos ya que las células vegetales, desde el momento de recolección, sufren un cierto número de transformaciones biológicas. Al momento de separar la parte aérea de la raíz, se provoca una interrupción del flujo alimenticio y de transpiración y las enzimas que contiene, y que antes favorecían la formación de materias activas, empiezan ahora a descomponerla. En el organismo vegetal, las anteriores reacciones de síntesis orgánica, comienzan a ser suplantadas por reacciones de degradación, y el producto experimenta una transformación química. Estas transformaciones se manifiestan con emisión de olor o alguna modificación de color. Una incorrecta recolección y desecación, aumenta la cantidad de productos de degradación, y finalmente se pierde la calidad de la planta (Ibarra Salas M. J., 2009).

4.3.1 Evolución de las plantas medicinales hipoglucemiantes

El descubrimiento de la insulina en 1921 fue uno de los grandes logros de la medicina moderna. Desde entonces, los pacientes que padecían de lo que hoy es conocido como diabetes mellitus tipo 1 podían ser tratados adecuadamente y enfrentar un ritmo de vida casi normal. Antes de esto, un diagnóstico de diabetes era una sentencia de muerte y la corta vida restante se caracterizaba como una calidad de vida miserable. El diagnóstico trajo consigo severas restricciones en la dieta que permitían consumir muy poca grasa y carne y evitar lo más posible los carbohidratos. En vista de todo esto, la búsqueda continua de un tratamiento

médico no fue sorprendente y, de hecho, la historia ha sido testigo de muchos intentos serios para mejorar los síntomas de la diabetes usando fármacos. La fuente dominante de remedios antes de 1900 era el reino de las plantas. Así, se estudiaron y se tomaron en cuenta las plantas antidiabéticas que eran usadas antes que la insulina fuera descubierta. También es importante notar que el interés en aplicar la fitoterapia para la diabetes nunca ha desaparecido y que hoy en día se le da cierta consideración (Helmstädter A., 2012).

El opio fue el remedio antidiabético de origen vegetal más extensamente utilizado en la historia. Era usado en la antigüedad y fue promovido por el famoso físico británico Thomas Willis (1621-1675) en el siglo XVII. Al final del siglo XIX, los expertos aún consideraban al opio como el tratamiento antidiabético más útil, basados en parte en evidencia experimental. Alrededor de 1900 la terapia con opio fue considerada como sub-óptima y muchas otras plantas y agentes fueron probados en ese entonces. Para identificar sistemáticamente las plantas medicinales más importantes en el tratamiento de la diabetes tradicional, se emprendió un estudio para determinar cuáles fármacos antidiabéticos eran más frecuentemente utilizados en Europa antes del descubrimiento de la insulina. En primer lugar, libros de texto y artículos de revisión publicados en la segunda mitad del siglo XIX y a principios del siglo XX fueron estudiados para ver qué tipo de farmacoterapia recomendaban. En segundo lugar, los medicamentos de patente y los productos comerciales vendidos como antidiabéticos fueron investigados en consideración a su composición a fin de explorar cuáles agentes eran utilizados y en qué grado. Uniendo ambos análisis, queda claro que sólo pocos agentes fueron mencionados simultáneamente en la literatura científica y recomendados como productos comerciales en décadas antes del descubrimiento de la insulina (Gráfica 1) (Helmstädter A., 2012).



Gráfica 1. Agentes antidiabéticos mencionados en literatura de revisión científica (azul) e incluidos en medicamentos antidiabéticos (rojo) antes del descubrimiento de la insulina. Modificado de Helmstädter A. (2012).

El estudio muestra que tres especies de plantas eran utilizadas mucho más a menudo como medicina popular antidiabética que las otras: *Syzygium cumini* (*syn. S. Jambolanum, Eugenia jambolana*), *Phaeseolus vulgaris* y *Vaccinium myrtillus* (Helmstädter A., 2012).

Investigaciones etnobotánicas realizadas en México, reportan que la población utiliza de manera empírica entre 150 y 269 especies de plantas para el control de la diabetes mellitus. Entre las plantas medicinales del noreste de México, se ha encontrado que algunas de éstas son utilizadas por las personas como antidiabéticas. *Opuntia streptacantha* y *Tecoma stans* son las plantas mexicanas más utilizadas como antidiabéticas y son también las plantas hipoglucemiantes más estudiadas. Además, es importante intensificar los estudios químicos y farmacológicos de las plantas con este efecto porque sólo pocos agentes hipoglicémicos han sido aislados y caracterizados químicamente (Ibarra Ma. de J. et al., 2009).

Los resultados obtenidos en el estudio que realizó Ibarra Ma. de J. et al. en el 2009 sobre el efecto hipoglucemiante de *T. stans*, se relacionan con trabajos de Lozoya (1980) y Lozoya y Mellado (1985), quienes reportaron efecto hipoglucémico después de la administración oral de infusión de *T. stans* en conejos y perros, respectivamente. Posteriormente, Bnouham

(2006) en un estudio de revisión sobre plantas medicinales con potencial actividad antidiabética menciona que *T. stans* disminuye significativamente el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa con respecto al grupo control (17.5%) o tolbutamida (14.3%) en conejos a los cuales se les administró gástricamente agua, tolbutamida o la preparación de la planta, sin embargo, mencionan que los resultados obtenidos no son exactamente comparables con otras investigaciones en donde se estudia el efecto hipoglucémico de esta planta debido a que existen variaciones en cuanto al modelo animal utilizado, vía de administración, dosis de la planta y el modo de preparación del extracto, pero a pesar de esto, se revela el efecto hipoglucemiante de *Tecoma stans* incluso en otros modelos animales.

4.3.2 *Vaccinium myrtillus*

Vaccinium myrtillus, mejor conocido como arándano, hace tiempo que se conoce en medicina como un remedio contra molestias gastrointestinales. Reportes de los efectos antidiabéticos del extracto de las hojas de *Vaccinium*, que tiene origen en la medicina popular de los Alpes Austriacos que datan del siglo XIX, rápidamente fueron trasladados a los libros de texto. Reportes de anécdotas sobre los efectos antidiabéticos de las hojas de *Vaccinium* datan del año 1892, cuando un farmacéutico de Colberg escribió una pequeña noticia acerca del monitoreo regular del contenido de glucosa en orina en un paciente. Después de que el paciente comenzó a tomar dos tazas de té de hojas de arándano, ya no se detectó excreción de glucosa. Entonces el farmacéutico comenzó a preparar y vender extracto de hojas de arándano. Uno de los primeros físicos conocidos por su interés en *Vaccinium* como terapia para la diabetes fue Rudolf Weil, inicialmente logró resultados positivos en un caso de diabetes usando té y deseaba que esta medicina en forma de preparación con una dosis equivalente estuviera al alcance de más pacientes. Ya en 1892, Weil se convenció de que los estudios clínicos con el producto sólo podían ser eficaces si se consumía una preparación estandarizada. Entonces, en cooperación con el farmacéutico Max Jasper, el propietario de una fábrica de químicos en Bernau cerca de Berlín, comenzaron a producir pastillas llamadas “*Pilulae Myrtilli Jasper*” siguiendo las indicaciones de Weil, específicamente utilizando hojas jóvenes cosechadas antes de que diera frutos. Cada pastilla contenía 0.12 g del extracto de las hojas. Weil probó estas pastillas en algunos pacientes y presentó los resultados de tres casos (Helmstädter A., 2012).

En 1908, el médico alemán Martin Kaufmann de Mannheim estudió una variedad de remedios antidiabéticos incluyendo *Vaccinium myrtillus* administrado como té y formulado en Pilulae Myrtili Jasper, observó una ligera reducción, prácticamente nula de los niveles de glucosa en orina y llamó a la terapia inofensiva pero útil (Helmstädter A., 2012).

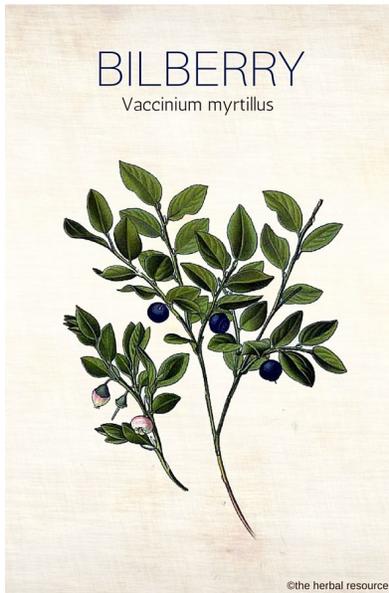


Figura 4. *Vaccinium myrtillus*.

Obtenida de The Herbal Resource [<https://www.herbal-supplement-resource.com/wp-content/uploads/2016/02/bilberry-medicinal-herb-img.jpg>]

La planta de arándano tiene fama de poseer propiedades antidiabéticas, y sus bayas y hojas (así como las de otras especies de *Vaccinium*) se han utilizado durante siglos para mejorar los síntomas de la diabetes (Gravotto G. et al. 2010). En una encuesta de 685 herbolarios italianos, el arándano ocupó el cuarto lugar en una lista de remedios herbales recomendados para mejorar el control glucémico (Wing-Kwan C. et al. 2011).

4.3.2.1 Taxonomía y características

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Vaccinium myrtillus*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Ericales
Familia:	Ericaceae
Subfamilia:	Vaccinioideae
Tribu:	Vaccinieae
Género:	<i>Vaccinium</i>
Especie:	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.

El arándano (*Vaccinium myrtillus* L.) es una de las fuentes naturales más ricas en antocianinas. Estos componentes polifenólicos le dan al arándano su color azul/negro y su alto contenido de antioxidantes, y se cree que son los bioactivos clave responsables de los tantos beneficios a la salud reportados de los arándanos y otras bayas. Aunque el arándano es conocido comúnmente por mejorar la visión, se ha reportado que baja los niveles de glucosa, por tener efectos anti-inflamatorios y de reducción de lípidos, así como mejorar la defensa antioxidante y disminuir el estrés oxidativo (Wing-Kwan C. et al. 2011).



Figura 5. *Vaccinium myrtillus*. Obtenida de Transylvanian Herb Garden
[<http://www.naturalherbs.ro/herbs/gyogynovenyek/european-blueberry-vaccinium-myrtillus/#>]

La planta de arándanos es un arbusto de bajo crecimiento nativo del norte de Europa, pero hoy en día también se encuentra en algunas partes de Norteamérica y Asia. El arándano también es conocido como mora azul europea, mirtilo, caramina o raspona. Pertenece a un gran género (*Vaccinium*) de plantas que también dan como fruto el arándano (*Vaccinium corymbosum*) y el arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*). El arándano a veces es llamado mora azul porque ambos tienen apariencia similar y son parientes cercanos, pero la verdadera mora azul es nativa de Estados Unidos. El arándano usualmente crece en brezales, prados y bosques de coníferas húmedos, y su crecimiento es favorecido por condiciones de sombra y humedad moderada. El arándano es una fruta pequeña (5-9 mm de diámetro), color negro azulado, con muchas semillas (Wing-Kwan C. et al. 2011).

El arándano es clasificado como una hierba de clase 1 por la Asociación Americana de Productos Herbarios (AHPA), lo que significa que puede ser consumida sin riesgo cuando se usa apropiadamente. No se ha reportado actividad mutagénica y no hay contraindicaciones citadas por su uso. El arándano es vendido fresco, congelado y deshidratado, así como en forma de conservas, jaleas y jugos, y cada vez más, en forma de concentrados líquidos o en polvo como suplementos alimenticios. El arándano contiene una variedad de compuestos fenólicos, incluidos los flavonoides (quercetina y catequinas), taninos, elagitaninos y ácidos fenólicos, pero las antocianinas hacen la mayor contribución en la mezcla fitoquímica. Estos compuestos fenólicos naturales son antioxidantes redox-activo y quelantes del hierro, y se encuentran en flores, frutas y vegetales de color rojo, azul y moradas. La ingesta dietética diaria habitual de antocianinas es de aproximadamente 200 mg. El arándano tiene alto contenido de antocianina comparado con otros tipos de bayas, como las fresas, el arándano rojo, los saucos, la cereza agria y la frambuesa. El contenido total de antocianina del arándano generalmente está en el rango de 300 - 700 mg/100 g de fruta fresca, aunque este rango varía con las condiciones de cultivo, crecimiento y el grado de madurez de la baya. Aparte de las antocianinas, 100 g de arándanos frescos contienen pequeñas cantidades de vitamina C (3 mg), quercetina (3 mg) y catequina (20 mg) (Wing-Kwan C. et al. 2011).

4.3.2.2 Efecto hipoglucemiante

Tradicionalmente, las hojas de arándano han sido utilizadas para controlar la glucosa en la sangre, lo que podría atribuirse a diversos compuestos fenólicos, siendo los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y estilbenos los más importantes. Por el contrario, las frutas no reducen la glucosa en la sangre, pero sus componentes pueden ayudar a mejorar la fuerza y la integridad de los vasos sanguíneos y reducir el daño que se asocia con la diabetes, entre otras enfermedades. Este efecto se debe a antocianinas que representan casi el 90% de los compuestos fenólicos totales. Además, los compuestos fenólicos podrían ser responsables del alto potencial antioxidante que se le atribuye al arándano. Además, el potencial antidiabético del arándano se puede atribuir a los elementos minerales presentes en él (Brasanac-Vukanovic S. et al., 2018).

En otros estudios se ha encontrado que *Vaccinium myrtillus* también es activador de PPAR γ . Algunos extractos de hojas, incluyendo *Tamarindus indica* y *Vaccinium myrtillus* inhiben la enzima α -amilasa más del 75%, así como la acarbosa (Helmstädter A., 2012).

El efecto hipoglucémico de *Vaccinium myrtillus* puede estar mediado en parte por la interferencia con la acción enzimática, especialmente la actividad α -glucosidasa, y también por los efectos sobre la secreción de insulina y el transporte de glucosa. Se encontró que las antocianinas que estimulan la secreción de insulina en cultivos de células β pancreáticas de roedores son las cianidinas y delphinidinas (las dos antocianinas principales en el arándano) las cuales muestran el mayor efecto entre las diferentes antocianinas probadas (Wing-Kwan C. et al. 2011).

En un estudio en animales con un extracto alcohólico en agua de hojas de arándano administradas a ratones diabéticos inducidos con estreptozotocina (3 g/kg/día durante 4 días), se observó una disminución significativa (26%) en la glucosa plasmática. La glucosa en sangre disminuyó significativamente (en 33% y 51%, respectivamente) después de la administración de un extracto rico en fenol (que contiene aproximadamente 287 mg/g de antocianina) y una fracción enriquecida en antocianina (que contiene aproximadamente 595

mg/g) de un extracto de *Vaccinium* a una dosis de 500 mg/kg a ratones diabéticos (Wing-Kwan C. et al. 2011).

4.3.3 *Tecoma stans*

Tecoma stans Juss. Ex Kunth (Bignoniaceae), popularmente conocida como “tronadora”, “huiztontli” o “huiztonxochitl” se utiliza en México y América Central para el control de la diabetes y desorden urinario (Aguilar-Santamaría L. et al. 2009). Esta planta perteneciente a la familia de las Bignoniáceas, está ampliamente distribuida en casi toda la República Mexicana (en particular en la región noreste), es un arbusto de 1 a 8 metros de altura. Su tallo es liso con ramas comprimidas, las hojas divididas en hojuelas y presenta flores en forma de trompetas agrupadas en racimos. Como se mencionó anteriormente, se utiliza especialmente para tratar la diabetes, además de padecimientos digestivos, epiteliales, respiratorios y trastornos ginecológicos (Ibarra Salas M. J., 2009).



Figura 6. *Tecoma stans*. Obtenida de Britton N.L. y Horne F.W.

[http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=342498&SID=0&mobile=0&code_category_taxon=9&size=1]

Se sabe que la tronadora tiene 54 usos medicinales diferentes y ésta contiene 56 componentes químicos, sin embargo, su aplicación medicinal ha sido enfocada siempre hacia la diabetes. Los alcaloides monoterpénicos, actidina, boschniakina, tecomanina, tecostatina y tecostidina se sabe que están contenidos en las hojas de la planta, así como los alcaloides tales como,

indol, eskatol y triptamina, los monoterpenos, aucubin, plantarenalósido, stanside, stansioside, alfa-stansioside, beta-stansioside y 5-deoxistansioside, los componentes bencílicos, ácidos cafeíco, paracumárico y ferúlico y el flavonoide ácido siríngico (Ramírez-Ortiz M.A. et al, 2016).



Figura 7. *Tecoma stans*. Obtenida de PIER (1999).
[http://uforest.org/Species/T/Tecoma_stans.php]

En un estudio realizado en el IMEPLAM en México en 1980, se ensayaron diferentes extractos de tronadora en ratas y conejos normales, así como en animales a los cuales se les extirpó parcialmente el páncreas y en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. Los resultados mostraron que el efecto hipoglucémico producido por esta planta fue poco evidente en los animales normales, mientras que en aquellos a los cuales se les indujo diabetes por diferentes procedimientos, la acción de *Tecoma stans* fue más evidente (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En cuanto al efecto producido en el hombre, existen varios reportes de finales del siglo pasado y principios del actual, resultado de los trabajos realizados en el Instituto Médico Nacional, que son observaciones de casos de individuos diabéticos, algunos en un estado de diabetes muy avanzado, en que, sin embargo, no se logró establecer la efectividad de los extractos (infusión y extracto fluido) como hipoglucémicos, pero sí se observó mejoría del estado general del paciente. García Colín en 1925 cita el caso de dos pacientes diabéticos que fueron tratados con infusiones de tronadora, en los que se logró desaparecer la glucosuria en el término de 2 a 3 meses, a pesar de que estos enfermos no se sometieron a una dieta constante y adecuada. En 1934 Acosta-Lagunes J. observa a 10 diabéticos sometidos a un régimen dietético modificado, registrando descensos de la glucosuria con la administración

de 30 gotas de extracto fluido de *Tecoma stans* como dosis diarias, aunque no indica si los efectos se deben al régimen dietético impuesto o al tratamiento (Citado en Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

4.3.3.1 Taxonomía y características

Tabla 2. Clasificación taxonómicas de *Tecoma stans*.

Dominio:	Eukaryota
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Bignoniaceae
Tribu:	Tecomeae
Género:	<i>Tecoma</i>
Especie:	<i>T. stans</i> (L.) JUSS. EX KUNTH

Tecoma stans es una planta originaria de América de uso frecuente y muy antiguo. Investigaciones químicas y farmacológicas recientes han hecho evidente la acción antidiabética de esta planta (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Como lo menciona Aguilar-Santamaría L. et al. (2009), se han publicado varios informes sobre la fitoquímica de *Tecoma stans* y los efectos hipoglucémicos en diferentes modelos animales cuando se administran en forma aguda.

4.3.3.2 Efecto hipogluceante

En la antigüedad se atribuía el efecto hipoglucémico de *Tecoma stans* a dos alcaloides denominados tecomina y tecostatina. Sin embargo, Costantino L. et al (2003) no lograron

observar el efecto hipoglucémico de cuatro alcaloides de *Tecoma stans* purificados en ratones db/db, incluidos tecomina y tecostatina. Con estos datos, Aguilar-Santamaría L. et al. (2009) asumen que el principal efecto antidiabético de *Tecoma stans* aún es controversial y que el modo de acción de este efecto no ha sido determinado previamente.

En el estudio realizado por Ramírez-Ortiz M.A. et al (2016), en el análisis fitoquímico preliminar de la hoja de tronadora se hace evidente la presencia de compuestos como saponinas, flavonoides, insaturaciones y carbohidratos, dichos compuestos presentan actividad antioxidante y antirradical. Los antioxidantes de fuentes naturales son la única alternativa a los antioxidantes sintéticos que actúan en contra de los radicales libres y éstos a su vez, son asociados a enfermedades crónico degenerativas como la diabetes mellitus. En su trabajo, demuestran que el posible mecanismo de acción de actividad hipoglucemiante evaluado en el extracto es a través de la inhibición enzimática y ésta se debe a los compuestos fenólicos. Al hablar de inhibición enzimática, hacen referencia a los inhibidores de α -amilasa que son también conocidos como bloqueadores de almidón debido a que contienen sustancias que impiden que el almidón de la dieta pueda ser absorbido por el cuerpo. El almidón es un carbohidrato complejo que no puede ser absorbido a menos que sea hidrolizado primero por la enzima amilasa digestiva y otras enzimas. Recientemente se ha demostrado que los compuestos fenólicos desempeñan un papel en la mediación de la inhibición de amilasa y por lo tanto tienen potencial para contribuir al tratamiento de la diabetes mellitus (McCue P. y Shetty K. 2004).

En otro estudio, realizado por Corral Salvadó A. et al (2002), se identificaron flavonoides presentes en las hojas secas y el extracto de *Tecoma stans* por cromatografía en capa delgada, y se encontró en ambos casos la presencia de apigenina, a la cual se le atribuye los efectos hipogluceminas de esta planta.

Por otra parte, estudios reportan que los compuestos activos de la tronadora son los alcaloides, pero su papel en las propiedades antidiabéticas de esta planta sigue siendo controversial. No obstante, estos resultados sugieren que la captación de glucosa en los tejidos es uno de los mecanismos por los cuales *Tecoma stans* ejerce su efecto antidiabético. La posibilidad de que las propiedades antidiabéticas de *Tecoma stans* fueran debidas al efecto de secreción de insulina ha sido descartada, sin embargo, Aguilar-Santamaría et al. (2009),

reportaron la actividad inhibidora de la enzima α -glucosidasa en extractos acuosos de esta planta. Asimismo, la actividad hipoglucemiante de *Tecoma stans* ha sido confirmada en modelos animales (Ramírez-Ortiz M.A. et al, 2016).

4.3.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas, con más de 8000 estructuras fenólicas que van desde moléculas simples como ácidos fenólicos hasta sustancias altamente polimerizadas como los taninos. Se sabe que la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que les permiten actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y secuestradores de O_2 . Una amplia variedad de compuestos fenólicos puede ayudar a proteger los sistemas celulares del daño oxidativo. El consumo incrementado de plantas naturalmente ricas en compuestos fenólicos podría estar asociado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y obesidad. Además de los efectos beneficiosos para la salud humana, los compuestos fenólicos presentes en los tejidos de las plantas toman parte activa en la protección de estas contra infecciones bacterianas y fúngicas, radiación UV, daño físico, entre otros (Brasanac-Vukanovic S. et al., 2018).

El consumo de compuestos fenólicos se asocia con un menor riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas. Pueden inhibir las actividades de α -glucosidasa y α -amilasa, que son las enzimas clave responsables de la digestión de carbohidratos de la dieta a glucosa. Los polifenoles intervienen en la modulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos, disminuyen la hiperglucemia, la dislipidemia y la resistencia a la insulina, estimulan la secreción de insulina, mejoran la función de las células β , metabolizan el tejido adiposo y alivian el estrés oxidativo, las vías de señalización sensibles al estrés y los procesos inflamatorios. Estos compuestos también pueden prevenir el desarrollo de complicaciones a largo plazo de la diabetes, que incluyen enfermedad cardiovascular, neuropatía, nefropatía y retinopatía (Brasanac-Vukanovic S. et al., 2018).

4.3.5 Flavonoides

Los flavonoides, un grupo que representa el 60% de todos los polifenoles naturales, están presentes en todas las partes de las plantas, especialmente en las flores y las hojas (Madunic J. et al., 2018).

Estructuralmente, los flavonoides consisten de dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por una cadena de 3 carbonos que forma un anillo heterocíclico oxigenado (anillo C). Hay seis subclases de flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas basadas en las diferencias de la estructura genérica del anillo C, grupos funcionales en los anillos y la posición en la que el anillo B está unido al anillo C. Dentro de cada subclase, los compuestos individuales se caracterizan por patrones específicos de hidroxilación y conjugación. Los flavonoides tienen la capacidad de eliminar radicales libres y quelar metales. Dada la relación hipotética entre la diabetes y la inflamación y el potencial de los flavonoides para proteger el cuerpo contra los radicales libres y otros compuestos prooxidativos, es probable que el consumo de flavonoides o alimentos ricos en flavonoides puede reducir el riesgo de diabetes (Vinayagam R. y Xu B., 2015).

A pesar de que usualmente se asegura que los flavonoides están libres de toxicidad y efectos secundarios, lo que permite sus amplios usos terapéuticos, son necesarias otras investigaciones que profundicen en este sentido tomando en cuenta que las estrategias de mercado, seguidas por los fabricantes de concentrados de flavonoides, consisten en exagerar sus efectos no tóxicos, la mayoría de los cuales no están sustentados por ensayos clínicos regulados, y recomiendan dosis que pueden sobrepasar a las adquiridas a través de una típica dieta vegetariana, conduciendo a la generación de ERO y daño posterior al DNA (Pérez Trueba G., 2003).

Existen factores que influyen en que los flavonoides se comporten como antioxidantes y prooxidantes, por ejemplo, las condiciones del ensayo, la concentración efectiva que se alcance en el sitio donde la ERO es formada; la estabilidad del radical del flavonoide formado al donar un átomo de hidrógeno al radical atacante, la lipofilidad para ser captados por la membrana y el pH del medio (Pérez Trueba G., 2003).

4.3.5.1 Apigeninas

Una variedad de efectos biológicos de la apigenina *in vitro* e *in vivo* se relacionan principalmente con sus efectos antioxidantes y su papel en la eliminación de radicales libres (Madunic J. et al., 2018).

Se sabe que el mecanismo mediante el cual las apigeninas ejercen su actividad antioxidante es inhibiendo la lipoxigenasa y reduciendo la peroxidación lipídica (Bezáková L. et al., 2007), lo cual es un mecanismo en el que se produce toxicidad por parte de los radicales libres a los organelos y a las enzimas unidas a membranas, y la medición de MDA (malondialdehído), producto final de la peroxidación lipídica, ha sido ampliamente usado para detectar lesión celular por radicales libres (Olvera-Granados C. P. et al. 2008).

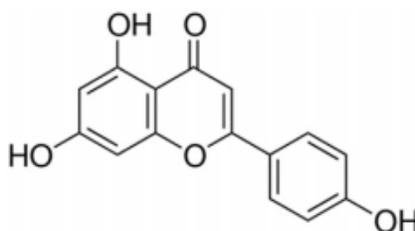


Figura 8. Estructura química de la apigenina.

Obtenido de Madunic J. et al., (2018).

4.3.5.2 Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos* para flores y *kyanosa* para azul) son compuestos de flavonoides polifenoles solubles en agua. La molécula de antocianina consiste en un "núcleo" de antocianidina con una mitad de azúcar unido. El azúcar se puede unir en varias posiciones, y puede ser glucosa, galactosa, xilosa, arabinosa o ramnosa. Las antocianinas también varían en el número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo unidos a la estructura central de antocianidina. Las antocianidinas más comunes en la naturaleza son la cianidina, la delphinidina, la petunidina, la peonidina, la pelargonidina y la malvidina, pero estas se encuentran muy raramente en su forma aglicona (no glucídico) (Wing-Kwan C. et al., 2011).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3

carbonos. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Garzón G.A., 2008).

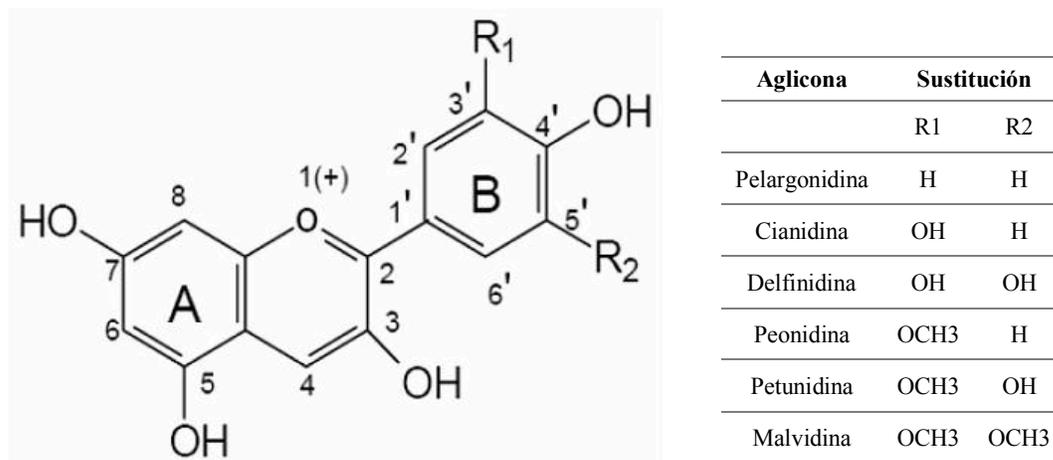


Figura 9. Estructura química de la antocianina. Se observa en la tabla el nombre de la antocianina con respecto a los sustituyentes. Modificado de Garzón G.A. (2008).

Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Garzón G.A., 2008). Además de sus efectos antioxidantes, se ha informado que las antocianinas estabilizan el DNA, modifican la expresión génica de los adipocitos, mejoran la secreción y la sensibilidad de la insulina y tienen efectos antiapoptóticos, antiinflamatorios y antibacterianos (Wing-Kwan C. et al., 2011).

También se encontró que las antocianinas estimulan la secreción de insulina en cultivos de células β pancreáticas de roedores, donde las cianidinas y delfinidinas (las antocianinas principales en el arándano) mostraron el mayor efecto entre las diferentes antocianinas probadas (Wing-Kwan C. et al., 2011).

4.3.5.3 Prueba de Shinoda

La prueba de Shinoda es un método de identificación de flavonoides en donde los flavonoides

con el núcleo benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, entre otras) producen coloraciones de amarillas a rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado. Aunque no se conoce el mecanismo de esta prueba, es muy utilizada para reconocer esta clase de compuestos (Rengifo Penadillos R.A., 2013).

4.4 El extracto (Thelzán 101)

El compuesto Thelzán 101 es un fitofármaco desarrollado por los laboratorios Thelzán de México S.A de C.V., el cual está constituido por dos plantas que en medicina tradicional se emplean para el tratamiento de la Diabetes mellitus; *Tecoma stans* y *Vaccinium myrtillus* (Moreno Patrón M.A., 2008).

Tecoma stans pertenece a la familia Bignoniaceae, conocido vulgarmente como tronadora, saúco amarillo, corneta amarilla, flor amarilla, se le atribuye en la medicina popular propiedades diuréticas, vermífugas, estomacales, antisifilíticas e hipoglucemiantes (De la Paz Naranjo J. et al., 2003). En un estudio realizado por Ibarra Salas M. J. (2009) en el extracto etanólico de esta planta se encontraron alcaloides, coumarinas, flavonoides, sesquiterpenlactonas, esteroides, metilesteroides, saponinas, quinonas e insaturaciones. Según De la Paz Naranjo J. et al (2003), la disminución de la glicemia en los roedores estudiados tras la administración del extracto, permitió sustentar científicamente la hipótesis de que las hojas de *Tecoma stans* son de utilidad para tratar la diabetes, cuyo uso tradicional ha sido reportado en Cuba, México, Estados Unidos, Guatemala y la India.

La otra planta que constituye al extracto es *Vaccinium myrtillus*, es una planta medicinal que pertenece a la familia Ericaceae. Se encuentra en las montañas y los bosques de Europa y el norte de Estados Unidos. Esta planta se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades, como fiebre, tos, cálculos renales, trastornos intestinales y hepáticos, y estomatitis. Los estudios farmacológicos han demostrado que es un tratamiento efectivo para los trastornos oculares como la retinopatía y los trastornos vasculares, también hay evidencia de la actividad antidiabética e hipoglucemiante (Asgary S. et al., 2015). Las hojas del arándano contienen sustancias que reducen el contenido de glucosa en sangre, por lo que productos derivados de éstas son usadas por personas diabéticas

para reducir su necesidad de medicamentos orales o de insulina, sin embargo, según Albarrán Cornejo M. E. (2007), en las personas diabéticas el consumo de los mismos debe acompañarse de un tratamiento hipoglucemiante.

Al compuesto se le han realizado varios estudios tales como cristalografía, espectroscopía por infrarrojo, espectrometría de masas y cromatografía de líquidos, las últimas 3 para elucidar su naturaleza estructural (Figura 10) (Moreno Patrón M.A., 2008).

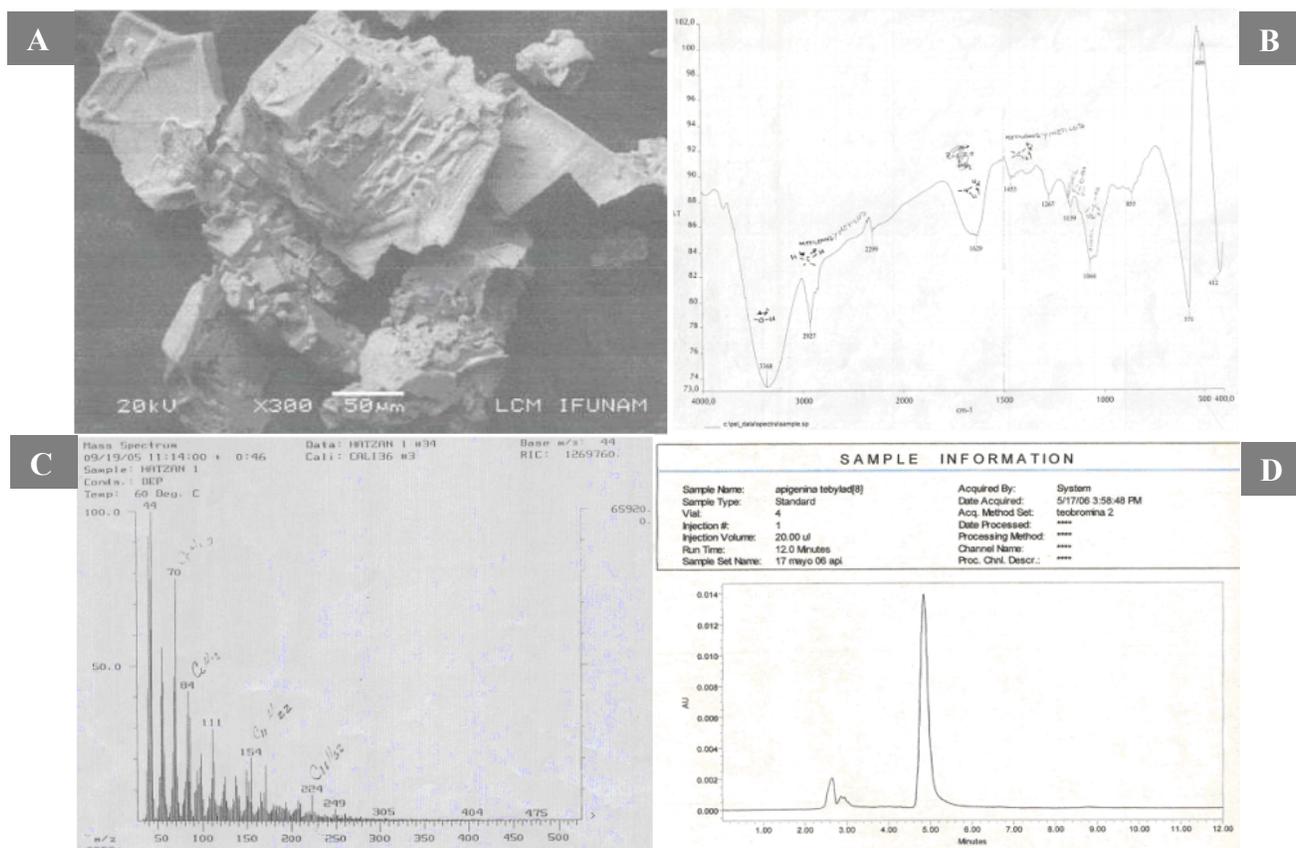


Figura 10. A. Cristalografía; B. Espectroscopía por infrarrojo; C. Espectrometría de masas; D. Cromatografía de líquidos. Modificada de Moreno Patrón M.A. (2008).

Mediante dichos estudios se ha podido localizar que el principio activo que le confiere la característica de agente hipoglucemiante es la apigenina (Moreno Patrón M.A., 2008).

4.5 Liofilización

La liofilización es un proceso de secado utilizado en la industria de los alimentos, farmacéutica y biotecnológica, con el fin de estabilizar y conservar los productos, reduciendo las pérdidas de compuestos lábiles y aquellos responsables del sabor y aroma. El proceso consiste en una congelación previa y la sublimación directa del hielo a presión subatmosférica (Cortés M. et al., 2015).

El cambio de fase de sólido a gas o sublimación, debe realizarse en condiciones de presión y temperatura menores a las del punto triple (punto en el que conviven los tres estados de la materia), ya que por debajo de éste no existe la fase líquida. En el caso del agua el punto triple se encuentra a 4,58 Torr y 0,008 °C. Por ejemplo si se tiene agua congelada, al calentarla a una presión menor a la de dicho punto el hielo sublima (Parzanese M., 2010)

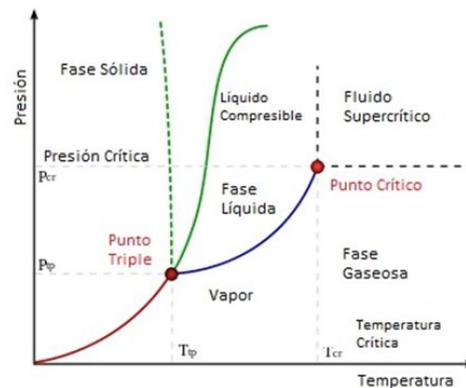


Figura 11. Diagrama de fases del agua.

Obtenido de Castro González L. et al. (2016)

El proceso de liofilización consta de tres etapas: Congelación, secado primario y secundario. La congelación debe ser muy rápida con el objeto de obtener un producto con cristales de hielo pequeños, teniendo presente la temperatura eutéctica del producto a liofilizar (Orrego Alzate C.E., 2008). El punto eutéctico es la temperatura más baja en la cual la fase sólida y líquida del material pueden coexistir (Providean VIRATEC). Por lo general, la mayoría de las soluciones o muestras biológicas tienen una temperatura eutéctica de -10 a -25°C (FreeZone® 4.5 Liter Freeze Dry Systems, 2007).

Antes de comenzar el proceso, es fundamental el acondicionamiento de la materia prima, ya que los productos liofilizados no pueden ser manipulados una vez completado el proceso. La segunda etapa se lleva a cabo en congeladores independientes (separados del equipo liofilizador) o en el mismo equipo. El objetivo es congelar el agua libre del producto. Para ello se trabaja a temperaturas entre -20 y -40°C . La tercera etapa del proceso consiste en la desecación primaria del producto, por sublimación del solvente congelado (agua en la mayoría de los casos), al inicio de esta tercera etapa, el hielo sublima desde la superficie del producto y a medida que avanza el proceso, el nivel de sublimación retrocede dentro de él, teniendo entonces que pasar el vapor por capas ya secas para salir del producto. Este vapor, se recoge en la superficie del condensador, el cual debe tener suficiente capacidad de enfriamiento para condensarlo todo, a una temperatura inferior a la del producto. La cuarta y última etapa del proceso de liofilización, se trata de la desecación secundaria del producto por medio de desorción. Esta consiste en evaporar el agua no congelable, o agua ligada, que se encuentra en los alimentos; logrando que el porcentaje de humedad final sea menor al 2% (Parzanese M., 2010).

4.6 Modelos experimentales

En el campo de la endocrinología, los biomodelos experimentales son ampliamente utilizados para analizar la etiología, patogénesis, fisiología y posibles terapéuticas de los trastornos endocrinos, entre los que se encuentran la diabetes mellitus (Flores C. et al, 2006).

A pesar de que en la última década ha habido una ‘explosión’ de información científica sobre los factores genéticos y ambientales que desencadenan los mecanismos bioquímicos involucrados en la diabetes mellitus, así como sobre las complicaciones y los tratamientos, es mucho lo que aún queda por dilucidarse. En este sentido, los modelos animales desempeñan un papel fundamental en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos y en la evaluación de las estrategias de diagnóstico y tratamiento que limiten el desarrollo de la enfermedad y sus complicaciones. Existen numerosos modelos biológicos en animales que reproducen varias de las manifestaciones clínicas de la diabetes humana mediante diversos métodos, entre los cuales se destaca la inducción química con estreptozotocina en roedores (Bequer L. et al, 2016).

Una ventaja en cuanto al estudio de la Diabetes mellitus utilizando modelos animales es que permiten la investigación de cambios metabólicos y patológicos de los islotes pancreáticos juntos en el mismo animal, además, se sabe que las células T autorreactivas están presentes tanto en humanos como en modelos animales de diabetes autoinmune como el ratón (Mullen Y., 2017)

A pesar de lo dicho anteriormente, Bequer L. et al (2016) menciona que ningún modelo experimental recrea totalmente las particularidades de la enfermedad en humanos, es por eso por lo que es necesario trabajar en su caracterización para que los resultados obtenidos sean lo más valioso posible.

4.6.1 Inducción de Diabetes mellitus con Estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ) [2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosourea) 1-D-glucopiranososa] es un antibiótico de amplio espectro, su fórmula molecular es $C_8H_{15}N_3O_7$ y su peso molecular es de 265.2206 g/mol (Figura 12) (Ibarra Salas M. J., 2009). Se aisló inicialmente de *Streptomyces achromogenes*, bacteria gram-positiva, en 1960, con propiedades diabetogénicas no descritas hasta 1963 (Rakieten et al., 1963). Esta acción fue caracterizada por Junod et al. (1969) basados en trabajos anteriores (Junod et al., 1967) que muestran que los efectos diabetogénicos se deben a la destrucción selectiva de las células β de los islotes pancreáticos. Como resultado de esta acción, los animales experimentan deficiencia de insulina, hiperglucemia, polidipsia y poliuria, los cuales son característicos de la diabetes mellitus tipo 1 en humanos (Kolb, 1987).

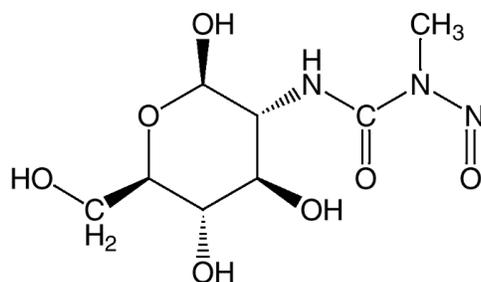


Figura 12. Estructura química de la estreptozotocina.

Obtenida de https://en.m.wikipedia.org/wiki/File:Streptozotocin_Structure_NTP.png

Según Furman B. (2015), la estreptozotocina es un antibiótico que causa la destrucción de las células β pancreáticas y es ampliamente utilizado experimentalmente para producir

modelos de diabetes mellitus tipo 1, siguiendo un protocolo que emplea la administración de dosis bajas repetidas de STZ para provocar diabetes en los ratones, su creciente popularidad se debe a que la patología resultante se asemeja a la DM1 en humanos (inflamación crónica de los islotes pancreáticos, insulinitis y deficiencia de insulina). Wu K. y Huan Y. (2007), también mencionan que la administración de dosis bajas repetidas de STZ es utilizado ampliamente para provocar modelos animales de DM1.

La STZ es un compuesto de color amarillo pálido, contiene un grupo nitroso el cual actúa como donador de óxido nítrico en los islotes de las células del páncreas. Causa alquilación del DNA y rompimiento de las células pancreáticas, por lo tanto, Ibarra Salas M. J. (2009) afirma que la estreptozotocina como otras nitrosoureas, actúa como un agente alquilante. La vida media plasmática es breve y el fármaco es excretado en la orina como metabolito. Este fármaco destruye de forma selectiva las células β de los islotes del páncreas y causa diabetes en los animales, sin embargo, no se observa diabetes en el ser humano, pero puede producirse una leve intolerancia a la glucosa como el resultado de su uso (Ibarra Salas M. J., 2009).

Entre los fármacos conocidos que inducen la diabetes experimentalmente, la estreptozotocina es el más utilizado por su mayor estabilidad y efectividad con respecto a otros. Se emplea, además, como antineoplásico por su acción citotóxica altamente selectiva para las células β de los islotes pancreáticos. La sensibilidad al fármaco puede variar según la cepa, el sexo, la edad, el estado nutricional y, por supuesto, la especie animal, es por eso que el momento, la dosis y la vía de administración resultan determinantes para el tipo de diabetes que se desea inducir (Bequer L. et al. 2016).

4.7 Regeneración pancreática

El tratamiento estándar para la diabetes mellitus tipo 1 se basa en la administración de insulina acompañado de un riguroso control de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, la insulinoterapia difícilmente es capaz de conseguir un buen control glucémico, estando frecuentemente asociada a episodios de hipoglucemia severa, ya que la insulina exógena no es capaz de simular la fisiología de la secreción de insulina por parte de las células β (Barajas M. 2011).

Actualmente, se han propuesto alternativas para la obtención de células β para sustituir la escasez de este linaje celular a partir de células madre embrionarias o de células madre de tejido adulto como páncreas, hígado, sistema nervioso central, médula ósea, y adipocitos, así como también de las células madre del mesénquima (Olvera-Granados C. P. et al. 2008).

La generación de nuevas células β puede ocurrir a partir de células indiferenciadas (neogénesis), de células ya diferenciadas que se convierten en otro tipo celular (transdiferenciación) y de la replicación de las propias células β remanentes (proliferación) (Bequer L. et al 2016). También, Khan R. et al (2005) mencionan la posibilidad de la existencia de células precursoras endócrinas, las células madre pancreáticas, con la capacidad de diferenciarse en islotes funcionales. Barajas M. (2011) menciona que la diabetes mellitus tipo 1 es una de las enfermedades que más podrían beneficiarse con intervenciones de la medicina regenerativa, debido principalmente a que el origen de la enfermedad se encuentra en la alteración de un único tipo celular, la célula β productora de insulina.

4.7.1 Células madre pancreáticas

Las células madre tienen la capacidad de reproducirse por sí solas a lo largo de la vida del organismo y generar células diferenciadas multilinaje. También se cree que las células madre mantienen un fenotipo indiferenciado o embrionario, para dividirse muy lentamente y asimétricamente, produciendo células hijas que pueden diferenciarse. Si las células madre pancreáticas en verdad existen en el páncreas maduro, aún no han sido identificadas histológicamente. En estudios morfológicos de los islotes pancreáticos no se encontró indicio de células indiferenciadas o de lo contrario, algún tipo de célula distinguible. Sin embargo, hay creciente evidencia de que las células madre o células precursoras se localizan en el epitelio ductal. Una serie de estudios muestran que cultivando el epitelio ductal puede resultar en una expansión de células β . En adición, genes de la familia Notch son expresados en células del ducto pancreático. Los genes Notch han sido implicados en la regulación del balance entre la proliferación celular y la diferenciación, entonces la disrupción de la señalización de Notch conduce a la diferenciación endocrina acelerada, ramificación pancreática interrumpida y diferenciación exócrina.

Es posible que las células madre pancreáticas se encuentren dentro de los islotes mismos. Recientemente se encontró que el gen nestina estaba expresado en un pequeño número de células dentro de los islotes de ratones juveniles postnatales. Nestina, una proteína filamentosa intermedia, ha sido llamada marcador de células madre neuronales porque es expresada en células del sistema nervioso central que son capaces de diferenciarse en varios linajes celulares neuronales. Es posible que las células madre pancreáticas emerjan después de la diferenciación de las células endocrinas pancreáticas comprometidas (Kahn R. et al., 2005).

El descubrimiento de las células madre pancreáticas de tejido adulto pueden tener implicaciones significativas para la terapia de reemplazo basado en células para la diabetes mellitus tipo 1. La nestina, un marcador de células precursoras neuronales, ha sido sugerida como posible marcador de células progenitoras del islote de Langerhans (Street C. N. et al., 2004).

4.7.2 Nestinas

La nestina fue descrita originalmente como un marcador de células madre en cerebro, específicamente en la cara ventricular en cerebros de mamíferos. Es una proteína de filamento intermedio clase cuatro que se encuentra intracelularmente en muchos tejidos como músculo cardíaco, testículos, dientes, hígado y médula ósea, y se ha visto que regula la expresión de células diferenciadas en estos tejidos. Este marcador es expresado transitoriamente en diferentes tipos celulares del tejido embrionario y del tejido adulto, jugando un papel trascendental en la proliferación y migración de las células progenitoras.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad hipoglucemiante y regeneradora de Thelzán 101, un extracto liofilizado a base de *Tecoma stans* y *Vaccinium myrtillus* en ratones macho adultos jóvenes de la cepa CD1, mediante la realización de técnicas de biología molecular y análisis morfológico de páncreas, riñón e hígado para demostrar la eficacia del fitofármaco en cuestión.

5.2 Objetivos particulares

- Realizar envasado de un fitofármaco hipoglucemiante utilizando la liofilización como método de eliminación del etanol contenido en el extracto, además de realizar pruebas de eficacia, identidad y esterilidad para asegurar la calidad del producto.
- Inducir diabetes en ratones macho adultos jóvenes cepa CD1 administrando dosis bajas repetidas de estreptozotocina vía intraperitoneal para un posterior tratamiento con el fitofármaco liofilizado y así desarrollar las técnicas necesarias para comprobar su eficacia.
- Realizar la determinación de nestinas mediante PCR de punto final y el análisis semi-cuantitativo para evaluar la capacidad regeneradora de las células β del páncreas.

6. HIPÓTESIS

Si el fitofármaco liofilizado a base de *Tecoma stans* y *Vaccinium myrtillus* tiene capacidad hipoglucemiante y regeneradora de células β pancreáticas, se obtendrán valores decrecientes de glucosa después de la administración del tratamiento en los ratones diabéticos con tratamiento respecto a los ratones diabéticos sin tratamiento, se evidenciará la presencia de nestinas en los páncreas de ratones, presentando mayor expresión en diabéticos sin tratamiento a comparación de los diabéticos con tratamiento y se observará a través de microscopía óptica cambios morfológicos que indiquen regeneración pancreática, así como pocos o nulos cambios en la estructura microscópica del hígado y riñón.

7. METODOLOGÍA

7.1 Lavado y despirogenización del material

Se lavó el material con jabón y agua corriente, luego se sumergió durante 20 minutos en detergente Extrán neutro sin fosfatos al 2%, se pasó a una charola con agua corriente, enseguida a una charola con agua destilada y se repitió el lavado con agua destilada, luego se sumergió en una charola con solución salina inyectable. Todo el material se secó con acetona pura y en condiciones de esterilidad se envolvió en papel aluminio, los frascos, viales y pinzas se esterilizaron durante 3 horas en el horno Pasteur a 200°C (no rebasar +/- 5°C), los tapones, retapas y pipetas se esterilizaron en autoclave durante 3 ciclos seguidos de 30 minutos a 15 lb y 121°C.

7.2 Liofilización del hipoglucemiante a base de *T. stans* y *V. myrtilus*

La liofilización se llevó a cabo de acuerdo a la metodología del liofilizador modelo LABCONCO® LYPH-LOCK R 12. En primer lugar se colocaron 3.5 mL del extracto en cada vial en condiciones de esterilidad y haciendo uso de protección personal, luego los viales se resguardaron en refrigeración a -5°C y, después de 24 horas se pasaron a un congelador a -20°C por 48 horas. Después se introdujeron los viales congelados a la cámara de desecación a condiciones de 0.01°C y 4.5 mmHg y el equipo se programó para romper el vacío y aumentar la temperatura lentamente, una vez terminados los ciclos programados se colocaron los tapones a presión evitando cualquier entrada de humedad. Los viales se sacaron de la cámara de desecación y se colocaron las retapas manualmente con ayuda de una engrapadora especial, posteriormente se almacenaron los viales a temperatura ambiente para su etiquetado.

7.3 Prueba de identidad

Se realizó la identificación de flavonoides en el extracto etanólico y en el producto liofilizado con la prueba de Shinoda. Se colocó 1 mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo y 1 mg del extracto liofilizado disuelto en 1 mL de agua inyectable en otro tubo de ensayo. Se utilizaron 2 tubos blanco, a uno se le agregó 1 mL de etanol al 70% y al otro 1 mL de agua inyectable. Posteriormente se agregó magnesio y de 3 a 5 gotas de HCl concentrado a los cuatro tubos y se observó el cambio de color.

7.4 Prueba de esterilidad

Para realizar la prueba de esterilidad se utilizaron placas de AST (Agar Tripticasa de Soya), SDA (Agar Dextrosa Sabouraud), EMB (Eosina Azul de Metileno), Agar Sangre, Agar MacConkey y un tubo con 9 mL de agua estéril. Se realizó una suspensión 1:10 del extracto liofilizado en el tubo con agua estéril, todo en condiciones de esterilidad. De la suspensión se tomaron 0.01 mL con ayuda de un asa bacteriológica negra (1/100) y se sembró en las diferentes placas de agar, se incubaron en la estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas. Finalmente se verificó que no hubiera crecimiento en las placas de agar.

7.5 Prueba de eficacia

7.5.1 Formación de lotes

Se formaron tres lotes, cada uno con 6 ratones macho adultos jóvenes cepa CD1, mediante el método de la curva Culebra Japonesa, los lotes formados fueron lote control, lote diabético sin tratamiento y lote diabético con tratamiento. Los ratones se resguardaron en un cubículo de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la UIM FES-Cuautitlán campo 4 con condiciones controladas de humedad ($55 \pm 5\%$), temperatura ($24 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y acceso libre a agua y comida. El protocolo fue aprobado por el CICUAE (Comité Interdisciplinario del Cuidado y Uso de Animales de Experimentación) de FES-Cuautitlán.

7.5.2 Inducción de diabetes mellitus a ratones macho cepa CD1

Se retiró el alimento a los ratones 4 horas antes de la experimentación. Se pesaron 4 mg de estreptozotocina (STZ) en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se protegió de la luz con papel

aluminio. Se preparó buffer de citratos 50 mM y se agregó 1 mL al tubo eppendorf con la estreptozotocina para obtener una concentración final de 4 mg/mL. Debido a la rápida degradación de STZ, después de llevar a cabo la disolución en el buffer, esta solución se inyectó inmediatamente después de prepararla. Se administró una dosis de 40 mg/kg de peso de estreptozotocina vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos a los lotes diabético sin tratamiento y diabético con tratamiento, tomando como referencia el protocolo básico 1 de Furman, B.L. (2015). Al lote control se le administró un volumen equivalente de buffer de citratos. Después de cada administración se regresaron los ratones a sus jaulas teniendo nuevamente acceso libre al alimento y a una solución de sacarosa al 10% en lugar de agua. Al sexto día se reemplazó la sacarosa al 10% por agua. La hiperglucemia se confirmó cuantificando los niveles de glucosa al tiempo cero (inicio de la inducción) y una semana después de finalizar la administración de STZ, y con la realización de la prueba t de Student para los niveles de glucosa obtenidos. La cuantificación de glucosa se realizó con el glucómetro Accutrend Plus de Roche® el cual utiliza tiras reactivas Accutrend Glucose.

7.5.3 Tratamiento con Thelzán 101

El extracto hipoglucemiante liofilizado (7.37 mg por vial) se rehidrató con 3 mL de agua inyectable y se administró una dosis de 51 mg/kg vía oral durante 5 semanas al lote diabético con tratamiento. Se cuantificaron los niveles de glucosa en la sangre obtenida por medio de un corte en el extremo de la cola y colocando unas gotas sobre las tiras reactivas Accutrend Glucose, en las semanas 2 y 5 de tratamiento. Al lote control y diabético sin tratamiento no se les administró hipoglucemiante. Para comprobar el efecto hipoglucemiante del extracto liofilizado, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($p > 0.05$) entre los niveles de glucosa de cada lote.

7.5.4 Sacrificio y extracción de órganos

El sacrificio de los ratones se realizó mediante dislocación cervical y se procedió a la extracción de órganos, se obtuvieron el hígado, riñón y páncreas de cada ratón de cada lote y se depositaron en tubos estériles con soluciones específicas para el tipo de estudio que se realizaría posteriormente, los órganos se repartieron de la siguiente manera: hígado, riñón y páncreas de 4 ratones por lote se colocaron juntos en tubos cónicos estériles de 50 mL con paraformaldehído al 4% en PBS y se resguardaron a 4°C, y los órganos de los 2 ratones

restantes se repartieron de la siguiente manera: hígado y riñón juntos en tubos cónicos estériles de 50 mL con paraformaldehído al 4% en PBS, mientras que el páncreas se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL libres de RNAsas y DNAsas y se resguardaron a -20°C para su posterior utilización en el estudio molecular.

7.5.5 Diseño de iniciadores para nestinas

Los iniciadores necesarios para realizar la amplificación del gen nestina se diseñaron con la herramienta bioinformática Primer 3, la secuencia que se utilizó para el diseño se obtuvo de GenBank NM_016701.3 “Mus musculus nestin (Nes), mRNA” conformada por 6143 pares de bases (pb). El diseño de los iniciadores se realizó considerando características específicas como la longitud del fragmento a amplificar (200 a 300 pb), la temperatura de fusión (T_m) considerada como óptima entre 55 y 65°C , la longitud (18 a 20 pb) y el % de GC (40-60%), una vez obtenidos varios pares de iniciadores se procedió a analizarlos con la herramienta bioinformática OligoAnalyzer 3.1 teniendo en cuenta principalmente la similitud de T_m entre ambos oligonucleótidos y la cantidad de estructuras secundarias que se pudieran formar pero sin afectar la amplificación. Finalmente se mandaron sintetizar los oligonucleótidos a IDT (Integrated DNA Technologies).

7.5.6 Preparación de oligonucleótidos

La preparación de los oligonucleótidos para nestina se realizó siguiendo las instrucciones de la hoja técnica proporcionada por IDT, con el fin de obtener una concentración de $100\ \mu\text{M}$ se agregaron $289\ \mu\text{L}$ de agua inyectable al tubo, de esa solución se tomaron $10\ \mu\text{L}$ y se aforó a $100\ \mu\text{L}$ con agua inyectable para obtener una concentración de $10\ \mu\text{M}$, de esta solución se prepararon 10 alícuotas de $10\ \mu\text{L}$ cada una en tubos Eppendorf de $0.6\ \text{mL}$. Todas las alícuotas debidamente identificadas, se congelaron para su posterior utilización. Se realizó el mismo proceso para ambos oligonucleótidos, forward (NEST1_F) y reverse (NEST1_R).

7.5.7 PCR de gradiente

Para la realización de la PCR de gradiente se utilizó una muestra congelada de páncreas de ratón del cual se extrajo el RNA con el kit de Ambion® RiboPure™. Se cuantificó la muestra de RNA en un espectrofotómetro de luz Vis/UV (Jenway, Genova) y se procedió a convertir el RNA en cDNA con la transcriptasa inversa M-MLV RT (Invitrogen). Luego se preparó la

mezcla de reacción para la PCR de gradiente la cual contiene por cada reacción 13 μL de agua inyectable, 2 μL de buffer 10x, 1.2 μL de MgCl_2 25 mM, 0.4 μL de dNTP's 10 mM, 1 μL de iniciador forward (NEST1_F) 10 μM , 1 μL de iniciador reverse (NEST1_R) 10 μM , 0.4 μL de Taq polimerasa 5U/ μL y 2 μL de la muestra. Luego se procedió a establecer las condiciones de PCR en el termociclador de gradiente Mastercycler® gradient de Eppendorf Scientific, se programó una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos que incluyen: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación en la cual al tubo 1 se le programó una temperatura de 55°C, al tubo 2 una temperatura de 56°C, al tubo 3 una temperatura de 58°C y el tubo 4 una temperatura de 53°C, pero en este tubo se utilizó un control de β -actina de perro, cada uno durante 30 segundos; la polimerización con una temperatura de 72°C durante 30 segundos, y para terminar, se estableció la polimerización final a 72°C durante 15 minutos.

7.5.8 Purificación de RNA de páncreas de ratón con el kit de Ambion®

RiboPure™

La purificación de RNA de páncreas de ratón se realizó con el kit de Ambion® RiboPure™. Utilizando en todos los pasos material libre de RNAsas. Antes de comenzar se preparó el buffer de lisis con β -mercaptoetanol 1% (10 μL de β -mercaptoetanol por cada mL de buffer de lisis). Se procedió a pesar el páncreas (60 a 80 mg) y se colocó en un tubo de fondo redondo previamente colocado en hielo, luego se adicionaron 600 μL del buffer de lisis preparado previamente utilizando puntas y pipetas libres de RNAsas, se homogeneizó la muestra utilizando un sonicador a 30-40 w de potencia durante menos de 10 segundos y se centrifugó a 2750 rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego, se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un tubo nuevo y libre de RNAsas, se agregaron 600 μL de etanol 70% y se mezcló cuidadosamente por agitación para dispersar cualquier precipitado que se hubiera formado. Se transfirieron 600 μL de la muestra al tubo de centrifugado incluyendo cualquier remanente del precipitado y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se retiró el tubo de la centrifuga y se eliminó el flujo y el tubo colector, se añadieron 500 μL de buffer de lavado 2 con etanol al tubo de centrifugado y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se retiró el tubo de la centrifuga, se eliminó el flujo y se reinsertó el tubo de centrifugado en el mismo tubo colector, se agregaron

nuevamente 500 μL de buffer de lavado 2 con etanol al tubo de centrifugado y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se retiró el tubo de la centrífuga, se eliminó el flujo y se reinsertó el tubo de centrifugado en el mismo tubo colector, se centrifugó el tubo de centrifugado a 12000 rpm durante 1 minuto para secar la membrana con el RNA unido, luego se desechó el tubo colector y el tubo de centrifugado se insertó dentro de un tubo recolector y se agregaron 100 μL de agua libre de RNAsas justo en el centro del tubo de centrifugado y se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 12500 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente, se retiró el tubo de la centrífuga y se almacenó el RNA purificado a -74°C .

7.5.9 Cuantificación de RNA

La cuantificación de RNA se realizó en el espectrofotómetro de luz Vis/UV (Jenway, Genova), se preparó una dilución 1:50 colocando 196 μL de Tris-HCl 10 mM y 4 μL de muestra de RNA en un tubo eppendorf de 200 μL , luego se agitaron en el vórtex y se colocó en hielo. Antes de cuantificar se calibró el equipo con 200 μL de Tris-HCl, para esto se presionó el botón [CaL]. Ya calibrado el equipo se procedió a cuantificar la muestra de RNA colocando 200 μL de la dilución 1:50 en el detector, el valor de concentración que arroja el equipo se multiplicó por el factor de dilución (50) para obtener la concentración real.

7.5.10 Síntesis de cDNA con transcriptasa inversa (M-MLV RT)

La síntesis de cDNA se realizó con la transcriptasa inversa M-MLV RT (Invitrogen). Primeramente se agregó en un tubo libre de nucleasas 1 μL de Oligo dT, 1 μL de mix dNTP's 10 mM y 12 μL de agua inyectable estéril, estas cantidades se multiplicaron por el número de muestras que se iban a trabajar, luego la mezcla total se dividió en la cantidad de tubos según el número de muestras a procesar y a cada tubo se le agregó 2 μg de muestra de RNA total. Luego se programó el termociclador TC-3000 de TECHNE® a 65°C para calentar la mezcla durante 5 minutos, pasado este tiempo se pausó el termociclador y los tubos se colocaron en hielo, se agregó 4 μL de buffer de primera hebra al 5x y 2 μL de DTT 0.1 M y se mezclaron por pipeteo, se agitaron en el vórtex y se les dio un ciclo en la mini centrífuga para bajar el contenido. Después se colocaron los tubos en el termociclador y se programó una temperatura de incubación a 37°C durante 2 minutos, transcurrido este tiempo se pausó y se colocó en hielo, a cada tubo con muestra se le agregó 1 μL de M-MLV RT y se mezclaron

por pipeteo suavemente, luego se programó de nuevo una temperatura de incubación a 37°C, esta vez durante 50 minutos. Por último se programó una temperatura de 70°C durante 15 minutos para inactivar a la enzima.

7.5.11 PCR de punto final

Para la realización de la PCR de punto final (RT-PCR) se utilizaron 6 páncreas de ratón (2 ratones por lote) a los cuales se extrajo el RNA con el kit de Ambion® RiboPure™, luego el RNA se convirtió en cDNA con transcriptasa inversa M-MLV RT como se explicó anteriormente. Para la PCR se preparó la mezcla de reacción que consta de 13 µL de agua inyectable, 2 µL de buffer 10x, 1.2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.4 µL de dNTP's 10 mM, 0.5 µL de primer forward (NEST1_F) 10 µM, 0.5 µL de primer reverse (NEST1_R) 10 µM, 0.4 µL de Taq polimerasa 5U/µL y 2 µL de la muestra. Después, se programó en el termociclador TC-3000 de TECHNE®; una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos que incluyen: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 55°C durante 30 segundos y polimerización con una temperatura de 72°C durante 30 segundos, y para terminar, se estableció la polimerización final a 72°C durante 15 minutos.

7.5.12 Electroforesis

Se realizó la electroforesis de las muestras amplificadas por PCR de punto final, para esto; se preparó el gel de agarosa al 1.5%, los pozos se cargaron con GelRed®, 2 µL de buffer de carga y 8 µL de muestra, el buffer de corrida que se utilizó fue TBE (Tris-Borato-EDTA) y se corrió a 60 v durante 1 hora.

7.5.13 Cuantificación indirecta de nestinas

Para realizar la cuantificación indirecta de nestinas se utilizó el software del fotodocumentador SmartView Pro-1100. En primer lugar, se cargó la imagen del gel de agarosa realizado previamente, dando click en “Analysis”, se seleccionó la imagen y se dio click en “Open”. Una vez abierta la imagen a analizar, se procedió a cortarla seleccionando la opción “Crop” y “√” para confirmar, también se ajustó el brillo y el contraste. Luego se continuó el análisis dando click en “Next Step” y se seleccionó la opción “Gel Negative” el

cual se utiliza para electroforesis de DNA en gel, luego se seleccionó “Add Lane” para agregar ocho carriles nuevos. Luego se seleccionó la opción “Next Step” para seguir con el análisis. Se seleccionó la opción “Auto Find” para que el software permitiera ajustar el nivel de sensibilidad de acuerdo a las necesidades del estudio, en este caso se seleccionó nivel de sensibilidad 4, al dar click en OK los picos se tornan de color rojo. En los casos en los cuales las bandas en el gel no se distinguían muy bien, se tuvieron que agregar los picos manualmente dando click en la opción “Add Peak”, se seleccionó el área deseada y luego “√”, los picos se colorearon de rojo. Es importante saber que sólo los picos que estén en rojo se analizarán. Para continuar con el análisis del siguiente carril se seleccionó el botón “Next Lane”, se verificó que el número de picos en rojo correspondieran al número de bandas en el gel y así se continuó con los 6 carriles restantes. Una vez que se verificaron los 8 carriles, se dio click en el botón “Next Step” y el software automáticamente abrió una ventana con una pestaña de densidad y otra de peso molecular, en el apartado de densidad apareció una tabla donde se enlistaron los segmentos de cada carril con su respectivo valor de densidad y concentración, se tuvieron que colocar dos valores de concentración conocidos del marcador de peso molecular utilizado (anexo A) y automáticamente se calculó la concentración de los segmentos restantes.

7.5.14 Análisis morfológico

Se realizó el análisis histológico de páncreas, riñón e hígado de los ratones de los tres lotes. Los órganos se mantuvieron en paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C, esta solución sirvió para fijar los órganos y conservar su estructura. Se aplicó el método de inclusión en parafina de rutina asistido por microondas, se procedió a deshidratar las muestras sumergiéndolas en soluciones de concentraciones crecientes de alcohol etílico, se radiaron durante 2 minutos y se permitió el intercambio de soluciones durante 13 minutos para cada concentración. (70% dos veces, 80% una vez, 90% dos veces, 96% dos veces y 100% dos veces), luego se realizó la aclaración de las muestras sumergiéndolas en la mezcla xileno-cloroformo durante 2 horas, se realizó la infiltración sumergiendo las muestras consecutivamente en dos baños de parafina a 55° C, durante 60 min cada uno y finalmente se incluyeron las piezas. Los cortes se realizaron a 4 µm de grosor con un microtomo de la marca Leica y se montaron en portaobjetos con albúmina de Meyer la cual funciona como sustancia adherente. Luego se

procedió a teñir las laminillas con la técnica de hematoxilina-eosina, en primer lugar se tuvieron que desparafinar e hidratar, seguido de un enjuague con agua destilada, luego se tiñeron con hematoxilina de Heidenhain durante 10 minutos, se lavaron con agua corriente por 5 minutos y se lavaron rápidamente en alcohol ácido para diferenciar, luego se sumergieron en carbonato de litio durante 1 minuto y se lavaron en agua corriente hasta que viraron a color azul, se enjuagaron con agua destilada y se tiñeron con eosina acuosa por 15 minutos, se lavaron con agua corriente y se deshidrataron en etanol al 96% en dos pasos, luego se deshidrataron en etanol absoluto igualmente en dos pasos y se aclararon con xileno en dos pasos de 5 minutos cada uno, finalmente se cubrieron con medio de montaje sintético. Las laminillas se observaron en el microscopio óptico Carl Zeiss con una cámara Canon EOS integrada.

8. RESULTADOS

8.1 Producto liofilizado Thelzán 101

Con el fin de cumplir con la norma correspondiente se realizó el proceso de etiquetado y empaque (NOM-072-SSA1-2012 “Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios”). Es importante señalar que la etiqueta contiene todos los datos solicitados por la norma. Se muestran fotografías de diferentes ángulos de las etiquetas y el empaque.



Figura 13. Producto liofilizado terminado, etiquetado y empackado. A. Envase colectivo. **B.** Envase secundario. **C.** Producto liofilizado contenido en el frasco vial etiquetado (envase primario).

8.2 Prueba de identidad

Para identificar la presencia de flavonoides en el extracto y en el producto liofilizado se realizó la prueba de Shinoda. La evidencia de un color de amarillo a rojizo indica un resultado positivo para flavonoides (Rengifo Penadillos R.A., 2013). La determinación se realizó en el extracto y en el liofilizado, en ambos casos la prueba resultó positiva.

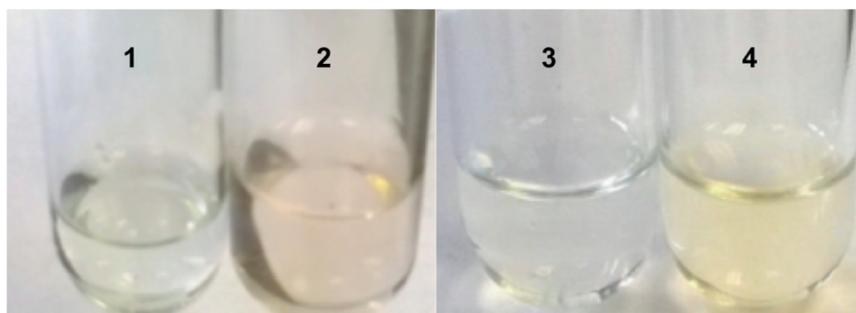


Figura 14. Resultados de la prueba de Shinoda realizada al extracto y al liofilizado. Se utilizó etanol al 70% como blanco para el extracto (1) y agua inyectable como blanco para el liofilizado (3). En el extracto se observa un color rojizo (2) y en el liofilizado un color amarillo (4), ambos indican un resultado positivo a flavonoides.

8.3 Prueba de esterilidad

Con el fin de descartar la presencia de cualquier microorganismo contaminante que pudiese poner en riesgo la salud del sujeto de estudio y la eficacia del hipoglucemiante, se realizó una prueba de esterilidad al producto liofilizado, en los cinco medios de cultivo utilizados no se detectó crecimiento alguno de hongos y/o bacterias lo que se traduce en que se cuenta con un producto final libre de microorganismos (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la prueba de esterilidad realizada al extracto liofilizado.

Medio de cultivo	Resultado
<i>AST</i>	Sin crecimiento
<i>EMB</i>	Sin crecimiento
<i>Sangre</i>	Sin crecimiento
<i>SDA</i>	Sin crecimiento
<i>MacConkey</i>	Sin crecimiento

8.4 Prueba de eficacia

Con el propósito de tener un mejor control de los datos y un seguimiento más organizado de la evolución de cada uno de los ratones en experimentación, se realizó el registro del peso, los niveles de glucosa en sangre durante las diferentes fases del experimento (antes y después de diabetizar y al final del tratamiento con Thelzán 101) y la dosis de estreptozotocina administrada.

Tabla 4. Registro de parámetros medidos en ratones macho cepa CD1 de los grupos control, diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento.

LOTE	ID ratón	Peso (g)	Glucosa (mg/dL) [antes de diabetizar]	mL de STZ	Glucosa (mg/dL) [después de diabetizar/1º día de tratamiento con Thelzán 101]	Glucosa (mg/dL) [al 11º día de tratamiento con Thelzán 101]	Glucosa (mg/dL) [al final del tratamiento con Thelzán 101]
Control	21	37.9	83	-	116	99	76
	22	39.1	145	-	100	124	104
	20	39.5	129	-	138	95	90
	6	41	76	-	130	97	84
	14	41.6	126	-	119	118	114
	15	43.4	151	-	71	120	86
Diabéticos sin tratamiento	10	36.8	111	0.18	127	137	136
	24	38.7	145	0.19	156	139	119
	18	40.7	122	0.2	127	147	138
	33	42.3	109	0.21	125	140	139
	12	43	147	0.22	159	139	130
	13	43.3	129	0.22	131	† □	† □
Diabéticos con tratamiento	7	36	130	0.18	141	79	79
	8	40	142	0.2	143	95	69
	5	39.7	139	0.2	145	131	92
	17	40.3	116	0.2	138	108	96
	3	43	100	0.22	121	89	85
	1	36.9	111	0.18	122	120	92

*La cruz significa que el ratón murió antes de concluir el experimento.

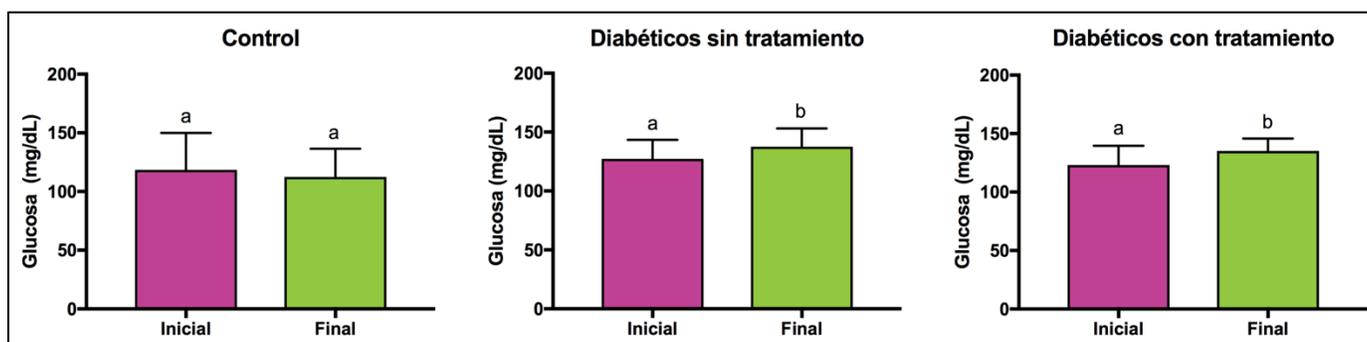
8.4.1 Inducción del estado diabético

Se realizó la medición de los niveles de glucosa (mg/dL) en los tres grupos de animales antes y después de diabetizar con estreptozotocina (STZ). Se obtuvo el promedio y la desviación estándar y se realizó la prueba t de Student ($p > 0.05$). Aunque en el grupo control no se administró STZ, sin embargo se realizaron las mismas determinaciones. En este grupo no se encontró diferencia significativa entre el valor inicial de glucosa (118.33 ± 31.60 mg/dL) y el valor al final de la diabetización (122.33 ± 24.04 mg/dL) ya que no se administró STZ. En los grupos de diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento si hubo diferencia significativa entre el valor de glucosa inicial (127.2 ± 16.33 y 123 ± 16.6) y el valor final (137.5 ± 15.64 y 135 ± 10.7), respectivamente (tabla 5 y figura 15). Estos resultados permiten señalar que los ratones experimentales mostraron un estado diabético después del tratamiento con STZ.

Tabla 5. Efecto de la STZ en ratones macho cepa CD1.

Lote	Niveles de Glucosa antes de diabetizar (mg/dL)	Niveles de Glucosa después de diabetizar (mg/dL)
Control	118.33 ± 31.60	122.33 ± 24.04
Diabéticos sin tratamiento	127.2 ± 16.33	137.5 ± 15.64
Diabéticos con tratamiento	123.0 ± 16.66	135.0 ± 10.71

Los datos representan la media \pm SD (n=6), $p > 0.05$.



Figur 15. Niveles de glucosa (mg/dL) en ratones macho cepa CD1 de los grupos control, diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento. Las gráficas muestran el nivel de glucosa antes y después de inducir el estado diabético con STZ. Se observa diferencia significativa (letras diferentes) en los grupos diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento, mientras que en el grupo control no hay diferencia significativa debido a que no hubo administración de STZ. Los datos representan la media \pm SD (n=6), $p > 0.05$.

8.4.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante de Thelzán 101

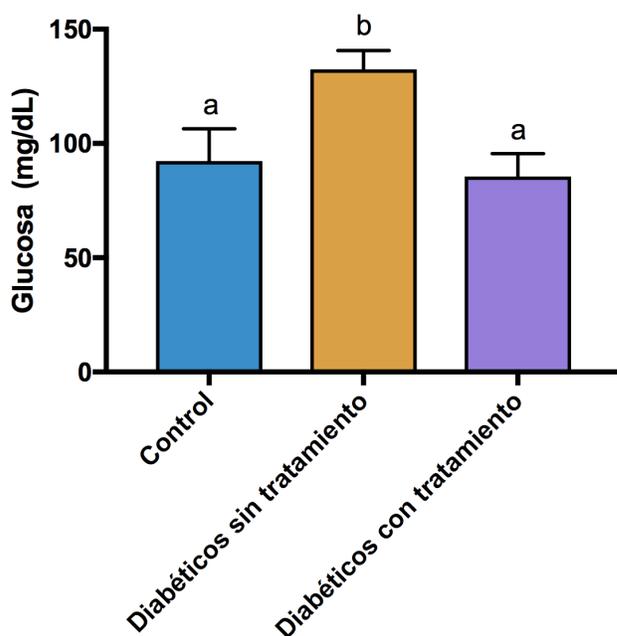
Con el propósito de evaluar el efecto hipoglucemiante del extracto liofilizado Thelzán 101, se administró una dosis de 51 mg/kg a los ratones ya en estado diabético y se midieron los niveles de glucosa en el transcurso de 5 semanas. En la Tabla 6 se muestran los niveles de glucosa (mg/dL) inicial en sangre, es decir, los niveles de glucosa antes de inducir el estado diabético a los ratones; y se muestran los niveles de glucosa (mg/dL) en los días 1, 11 y 35 de tratamiento con Thelzán 101. Los datos se representan como la media \pm SD ($n = 6$, en la mayoría de los casos, excepto en los días 11 y 35 de tratamiento en el lote de diabéticos sin tratamiento, donde $n = 5$). Se realizó un estudio ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple de Tukey y los resultados indican que hay diferencia significativa entre los niveles de glucosa de los lotes control y diabéticos sin tratamiento; y entre diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento, mientras que no hay diferencia significativa entre los niveles de glucosa del lote control y los diabéticos con tratamiento (Gráfica 2).

Tabla 6. Efecto del extracto liofilizado a base de *Tecoma stans* y *Vaccinium myrtillus* en ratones macho cepa CD1.

Lote	Glucosa inicial en sangre (mg/dL)	Glucosa en sangre después de diabetizar con STZ / inicio de tratamiento con Thelzán 101		
		Día 1 (mg/dL)	Día 11 (mg/dL)	Día 35 (mg/dL)
Control*	118.33 \pm 31.60	122.33 \pm 24.04	108.83 \pm 13.17	92.33 \pm 14.05
Diabéticos sin tratamiento	127.17 \pm 16.33	137.5 \pm 15.64	140.40 \pm 3.85**	132.40 \pm 8.26**
Diabéticos con tratamiento	123.0 \pm 16.66	135.0 \pm 10.71	103.67 \pm 19.65	85.50 \pm 10.09

Los datos representan la media \pm SD ($n=6$ y ** $n=5$).

*El lote control no fue sometido a tratamiento alguno (STZ y Thelzán 101).



Gráfica 2. Niveles de glucosa al día 35 de tratamiento en los diferentes grupos experimentales. Se muestra la media \pm SD de los niveles de glucosa (mg/dL) obtenidos en cada uno de los grupos experimentales al final del tratamiento con Thelzán 101. (b) muestra diferencia estadísticamente significativa con respecto a (a). Tukey $p < 0.05$

8.4.3 Determinación de la expresión de nestinas

Con el fin de evaluar la capacidad regeneradora del producto liofilizado Thelzán 101, se determinó la presencia de RNAm de nestina en páncreas por medio de una reacción de retrotranscripción seguida de una PCR de punto final. Para esto se comenzó con el diseño de los iniciadores que permitieran amplificar un fragmento del gen de nestina (230 pb). Al realizar la PCR de punto final se obtuvieron resultados satisfactorios que corroboran la presencia del gen de nestina, indicando su expresión en los páncreas de los ratones de los tres grupos experimentales.

8.4.3.1 Diseño de primers

Forward \rightarrow 5'- AGG AAC CAA AAG AGG CAG GT - 3' (NEST1_F)

Reverse \rightarrow 5'- CTT GGG ACC AGG GAC TGT TA - 3' (NEST1_R)

8.4.3.2 PCR de punto final

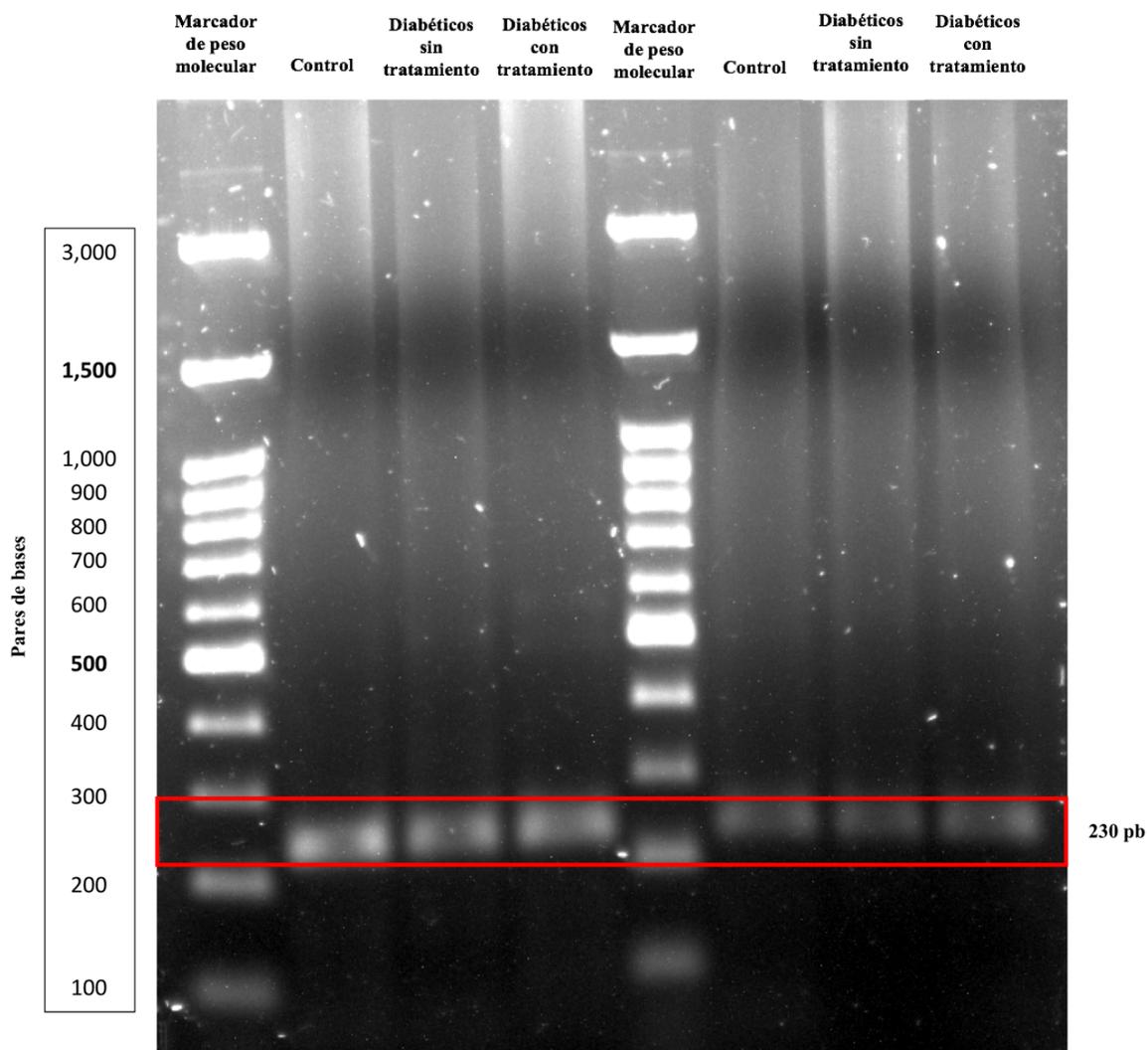


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación de PCR de punto final. Se observan las bandas correspondientes al marcador de peso molecular y su equivalencia en pares de bases. Se observan además 6 bandas alineadas en forma horizontal dentro del recuadro rojo, estas bandas corresponden al amplificado del gen de nestina (230 pb) en páncreas de ratón de los diferentes lotes (control, diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento).

8.4.3.3 Cuantificación indirecta de nestinas

Para determinar el nivel de expresión de nestinas en los páncreas de ratón se realizó una doble cuantificación del mismo gel obtenido en la PCR de punto final, los resultados muestran la concentración de la expresión de nestinas de dos ratones del grupo control, dos del grupo de diabéticos sin tratamiento y dos del grupo de diabéticos con tratamiento, este procedimiento

se realizó con el software del fotodocumentador SmartView Pro-1100. El valor final de concentración en ng/5 μ L resulta del promedio de la cuatro cuantificaciones (Tabla 7). La cuantificación completa se puede ver en Anexo A.

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($p > 0.05$) entre los valores obtenidos en la cuantificación, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de nestinas del lote control (81.58 ± 9.26 ng/5 μ L), lote de diabéticos sin tratamiento (86 ± 6.47 ng/5 μ L) y lote de diabéticos con tratamiento (83.28 ± 8.08 ng/5 μ L) (Gráfica 3).

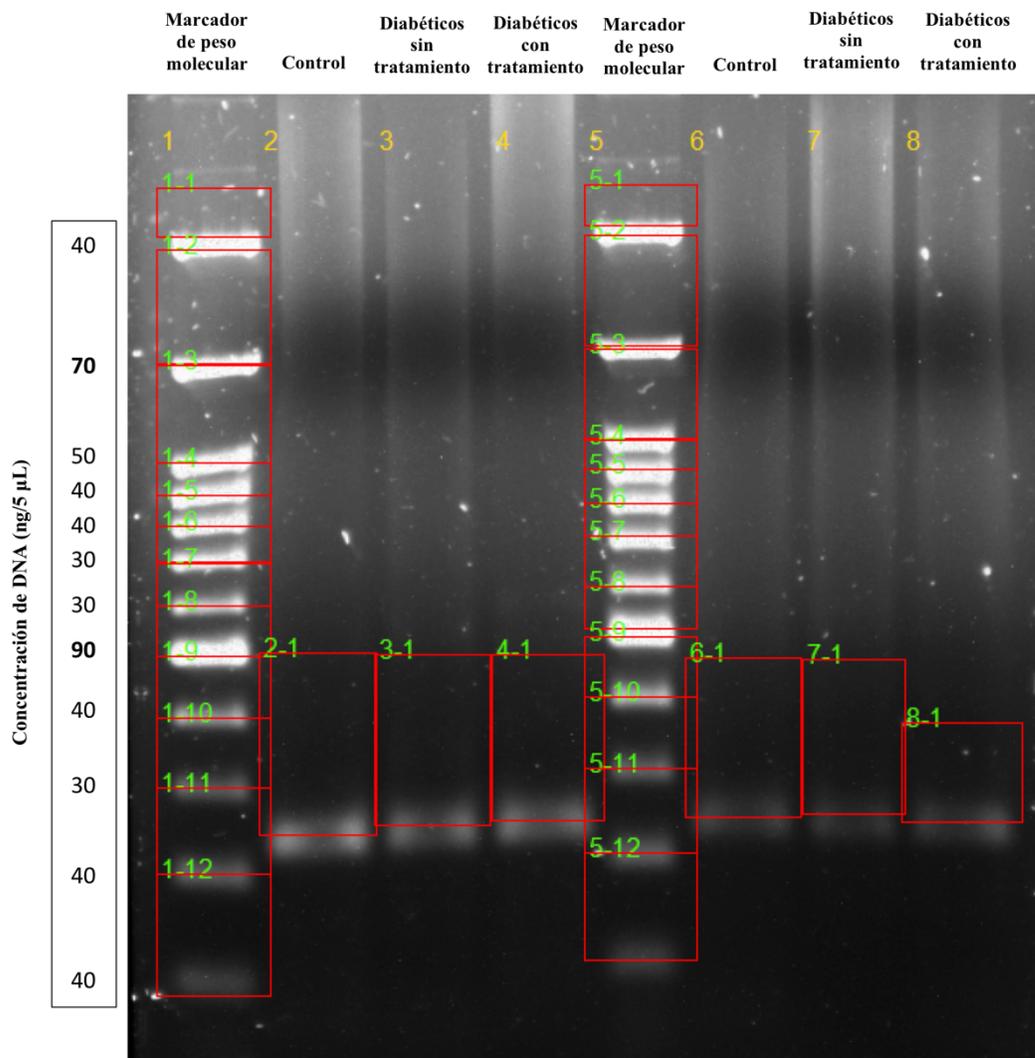
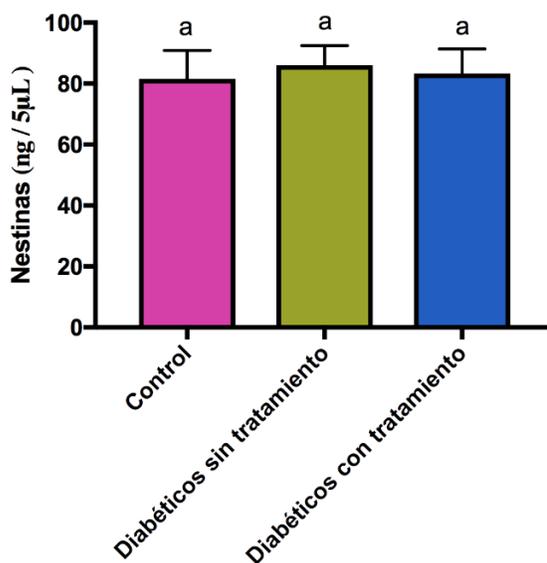


Figura 17. Análisis cuantitativo de nestinas con el software del fotodocumentador SmartView Pro-1100. Se observan las bandas del marcador de peso molecular en el carril 1 y 5 y la concentración de DNA (ng / 5 μ L) equivalente para cada banda de lado izquierdo del gel, las bandas que muestran

el amplificado del gen de nestina en páncreas de ratón del lote control (carril 2 y 6), lote de diabéticos sin tratamiento (carril 3 y 7) y lote de diabéticos con tratamiento (carril 4 y 8).

Tabla 7. Cuantificación indirecta de la expresión de nestinas en páncreas de ratón.

	Lote Control (ng/5μL)	Diabéticos sin tratamiento (ng/5μL)	Diabéticos con tratamiento (ng/5μL)
	69.348	77.731	75.77
	83.643	85.844	77.774
	81.579	86.942	86.306
	91.745	93.497	93.273
Media \pm SD	81.58 \pm 9.26	86 \pm 6.47	83.28 \pm 8.08



Gráfica 3. Cuantificación de la expresión de nestinas (ng/5 μ L). Los resultados muestran la media \pm SD de la cuantificación de nestinas (ng/5 μ L) del lote control, diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento, no se observan diferencias estadísticamente significativas.

8.4.4 Análisis morfológico

Con el fin de detectar posibles cambios morfológicos en páncreas, riñón e hígado de los ratones en experimentación, se realizó el análisis morfológico en cortes teñidos con hematoxilina-eosina, se observaron las laminillas en el microscopio óptico y las evidencias encontradas demuestran la capacidad regeneradora del producto liofilizado Thelzán 101, ya que se observa un aumento en la cantidad de islotes pancreáticos de los ratones diabéticos con tratamiento comparado con los diabéticos sin tratamiento. En cuanto a hígado y riñón no

se encontró ningún cambio morfológico entre los diferentes lotes experimentales, lo que indica que tanto la STZ como Thelzán 101 no inducen daños en estos órganos.

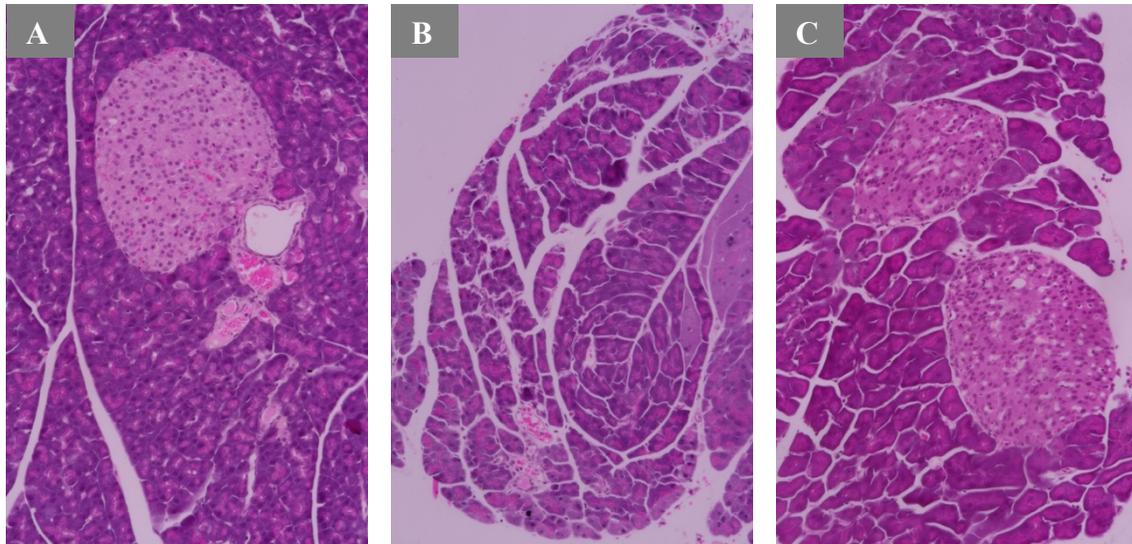


Figura 18. Páncreas de ratón macho cepa CD1, tinción H-E, 200x. **A. Lote control**, se aprecian islotes pancreáticos en cantidad y tamaño normal con celularidad normal rodeados de acinos pancreáticos, **B. Lote de diabéticos sin tratamiento**, existe una reducción en la cantidad y tamaño de los islotes pancreáticos mientras que los acinos pancreáticos mantienen su apariencia normal y **C. Lote de diabéticos con tratamiento**, se observa regeneración de las células β puesto que hay recuperación del número y tamaño de los islotes pancreáticos, los cuales se encuentran rodeados de acinos pancreáticos con apariencia normal.

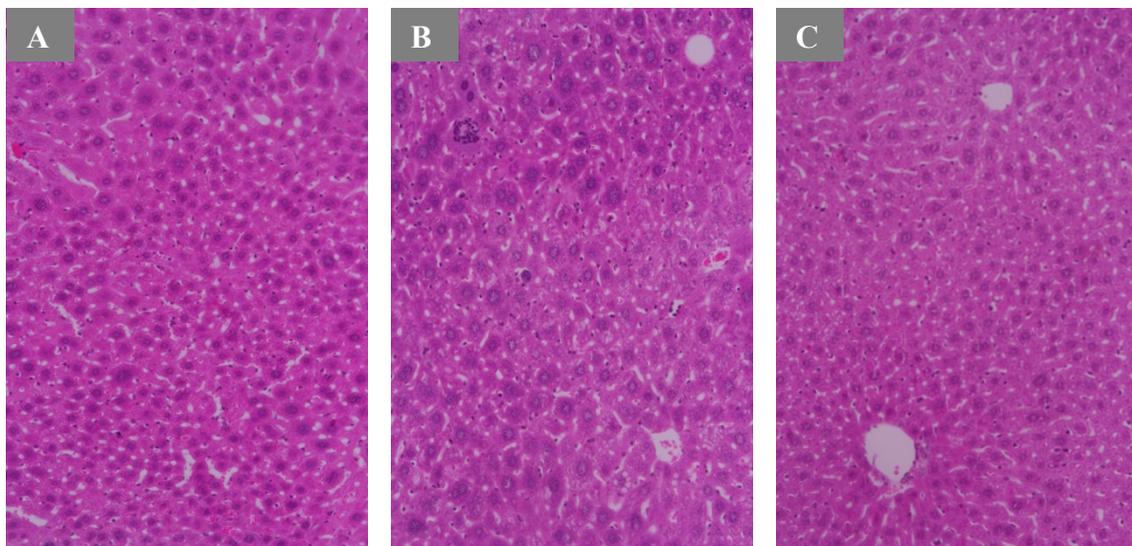


Figura 19. Hígado de ratón macho cepa CD1, tinción H-E, 200x. **A. Lote control**, **B. Lote de diabéticos sin tratamiento**, **C. Lote de diabéticos con tratamiento**. La apariencia histológica del

hígado en tres animales correspondientes a los diferentes lotes experimentales es idéntica y corresponde con su apariencia normal. La presencia de una infiltración de linfocitos se considera normal.

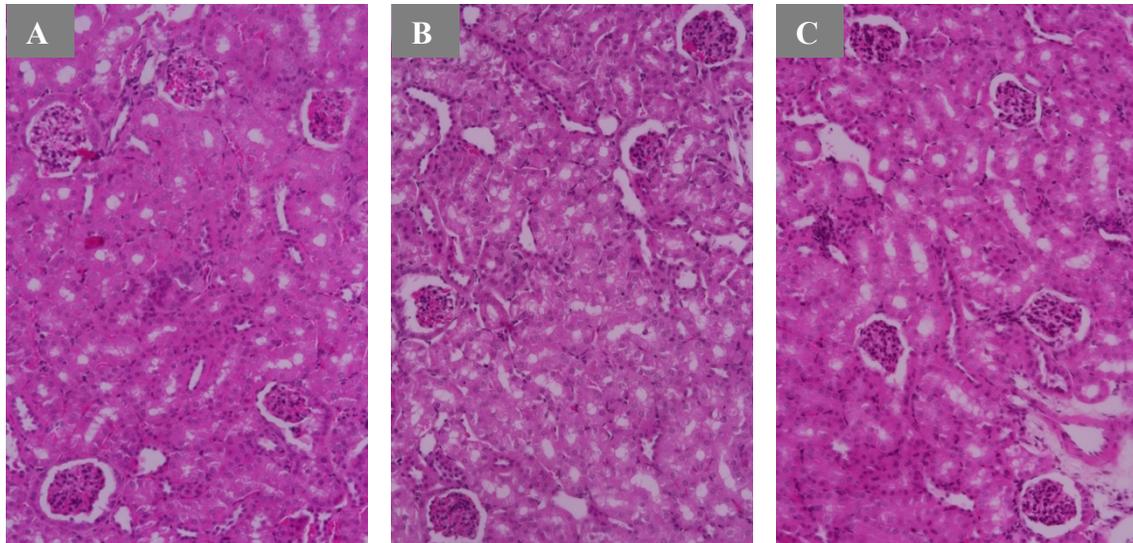


Figura 20. Riñón de ratón macho cepa CD1, tinción H-E, 200x. A. Lote control, B. Lote de diabéticos sin tratamiento, C. Lote de diabéticos con tratamiento. La apariencia histológica del riñón en tres animales correspondientes a los diferentes lotes experimentales es idéntica y corresponde a la apariencia normal de este órgano.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El principio de la liofilización se basa en el desecado de determinados materiales por medio de la sublimación del agua contenida en éstos. En primer lugar se congela el producto y se remueve el hielo aplicando calor en condiciones de vacío, de esta forma el hielo sublima evitando el paso por la fase líquida. Esta técnica nos proporciona un efectivo sistema de preservación de elementos biológicos como; células, enzimas, vacunas, virus, levaduras, sueros, algas, frutas, vegetales y alimentos en general. Todos estos materiales contienen sustancias volátiles o termosensibles y lo más importante es que no se ven afectadas por este proceso, ya que se trabaja a temperaturas y presiones reducidas. Este método no altera la estructura fisicoquímica del producto y admite su conservación sin cadena de frío, ya que su bajo porcentaje de humedad permite obtener un producto con elevada estabilidad (Parzanese M., 2010). Adicionalmente, se han publicado estudios en donde se demostró que la liofilización es capaz de preservar mejor la calidad de las plantas medicinales estudiadas, incluida su actividad antioxidante, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, azúcares, tocoferoles, clorofilas y contenido de licopeno (Pinela J. et al., 2011).

La mayoría de las veces el proceso de liofilización de un producto fitoquímico se utiliza como método de conservación del extracto o del principio activo, en este trabajo se utilizó principalmente como método de eliminación del etanol en el extracto Thelzán 101. Este proceso resultó satisfactorio, siguiendo la metodología y aplicando las buenas prácticas de fabricación de manera correcta para garantizar la integridad del compuesto activo que le da la capacidad hipoglucemiante al extracto.

De acuerdo a la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), la prueba de esterilidad se aplica a todos los productos biológicos, medicamentos, material de curación, material quirúrgico, productos oftálmicos, dispositivos médicos, entre otros, con la finalidad de investigar la presencia de microorganismos contaminantes en sustancias, preparaciones, o dispositivos médicos que requieren ser estériles. (FEUM, 2016). En la prueba de esterilidad

realizada al producto terminado, se utilizaron cinco medios de cultivo: para microorganismos aerobios (AST; Agar Soya Trypticaseína) y anaerobios facultativos y estrictos (EMB; Eosina Azul de Metileno), medio selectivo y diferencial para bacterias gram negativas (Agar Sangre, para evaluar la capacidad de hemólisis de los microorganismos; Agar MacConkey, que es un medio selectivo y diferencial para bacterias Gram negativas, y SDA (Agar Dextrosa Sabouraud), medio enriquecido para el crecimiento de hongos). En ninguna de las placas hubo crecimiento lo que indica que el producto está libre de microorganismos por las medidas de control de calidad que se tomaron al momento del envasado.

Para realizar la prueba de eficacia del producto liofilizado Thelzán 101, se trabajó con modelos experimentales que en este caso fue el ratón. La inducción de diabetes mellitus se logró administrando una dosis de 40 mg/kg de peso por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos a ratones macho cepa CD1, se optó por trabajar con ratones macho debido a que los ratones hembra son menos sensibles a la STZ (Furman, B.L., 2015). Este compuesto fragmenta el DNA de la célula β y produce una gran cantidad de radicales libres, dando como resultado la necrosis de esta estirpe celular (Olvera-Granados C. P. et al. 2008). Aunque se ha reportado que cifras iguales o superiores a 243 mg/dL de glucosa en ayuno sugieren la presencia de diabetes mellitus en ratones (Han B. et al. 2008), se consideró que los ratones lograron ser diabetizados debido a la diferencia estadísticamente significativa entre los valores de glucosa inicial y final en el lote de diabéticos sin tratamiento (inicial: 127.2 ± 16.33 , final: 137.5 ± 15.64), así como en el lote de diabéticos con tratamiento (inicial: 123 ± 16.66 , final: 135 ± 10.71) (Tabla 5 y Figura 15).

Los resultados presentados en la Tabla 6 indican que el compuesto liofilizado cumple con la función de agente hipoglucemiante puesto que los niveles de glucosa entre los lotes control y diabéticos sin tratamiento, y diabéticos sin tratamiento contra diabéticos con tratamiento tienen diferencias estadísticamente significativas, mientras que el lote control y diabéticos con tratamiento no tienen diferencias estadísticamente significativas. A pesar de las varias propuestas de los posibles efectos antidiabéticos de las dos plantas contenidas en Thelzán 101, en este trabajo se corrobora la participación de los flavonoides, identificados mediante la prueba de Shinoda (Figura 14). Se sabe que la apigenina es la flavona derivada de los

flavonoides de mayor concentración en el extracto debido a datos publicados en la tesis de Moreno Patrón M.A. (2008) donde menciona que se realizaron distintas pruebas para identificar el principio activo del extracto (Figura 10), en este trabajo no se realizó ninguna otra prueba para la identificación de apigeninas.

Según un estudio realizado por Corral Salvadó A. et al (2002), se identificaron flavonoides presentes en las hojas secas y el extracto de *Tecoma stans* por cromatografía en capa delgada, y se encontró en ambos casos la presencia de apigenina, a la cual se le atribuye los efectos hipoglucemiantes de esta planta. Por otra parte, no existen estudios reportados acerca de la presencia de apigeninas en *Vaccinium myrtillus* pero sí de antocianinas, que de igual manera son flavonoides. Sin embargo, en el extracto Thelzán 101 sólo se ha identificado la presencia de apigeninas pero no de antocianinas, esto puede deberse a que la concentración de compuestos fenólicos en extractos de plantas depende principalmente de la polaridad de los solventes utilizados en el proceso de extracción, del hábitat biológico y las condiciones de crecimiento de las diferentes plantas, así como de la naturaleza de las uniones que los compuestos fenólicos pueden formar con otros componentes de la planta, como carbohidratos y proteínas (Brasanac-Vukanovic S. et al., 2018).

En la literatura consultada se encontraron pocos indicios de que las apigeninas sean las responsables del efecto hipoglucemiante en estas dos plantas, es importante no olvidar que las apigeninas son derivados de los flavonoides. Se cree que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres. Otra teoría atribuye la acción antioxidante a la inhibición de oxidasas, como la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO), evitando la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, también se ha podido determinar que inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A (FLA), al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD) (Pérez Trueba G., 2003).

Aunque se ha demostrado que las apigeninas ejercen su mecanismo de acción antioxidante inhibiendo la actividad de la lipoxigenasa con lo que reducen la peroxidación de los lípidos (Bezáková L. et al., 2007), no es posible señalar el mecanismo de acción por el cual los flavonoides presentes en el extracto ejercieron su acción hipoglucemiante, debido a que sería necesario medir la actividad de las enzimas o los productos involucrados en los distintos mecanismos de acción antioxidante de los flavonoides, por ejemplo para corroborar el mecanismo de acción antioxidante de las apigeninas o incluso la presencia de éstas en el producto, sería necesario realizar la medición de MDA (malondialdehído), producto final de la peroxidación lipídica, el cual ha sido ampliamente usado para detectar lesión celular por radicales libres (Olvera-Granados C. P. et al., 2008).

A pesar de lo señalado anteriormente, Ramírez-Ortiz M.A. (2016) menciona que la influencia de los compuestos antioxidantes en la capacidad de eliminación de radicales libres está íntimamente relacionada con la facilidad en la donación de hidrógenos y corrobora que los extractos etanólicos y acuosos de hoja de tronadora, entre otros; son una fuente natural de antioxidantes (compuestos fenólicos y/o flavonoides) que pueden conservar la función de las células β previniendo la diabetes inducida por la formación de ROS.

Hasta hace pocos años se encontró que el tejido pancreático muestra cierta capacidad de regeneración, sin embargo, Rosenberg y Vinik en 1989, ya sugerían esta posibilidad. En distintos ensayos realizados con agentes lesivos pancreáticos se muestra cierta capacidad de regeneración de las células de los islotes pancreáticos (Olvera-Granados C. P. et al. 2008). Actualmente, el campo de la investigación experimental ha identificado una población pancreática con características de células madre. Esta población de células positivas a nestina se expresa bajo ciertas condiciones especiales y abre la posibilidad de desarrollar técnicas para la obtención de nuevas células β que pudieran regenerar el tejido dañado (Olvera-Granados C. P. et al. 2008). Las nestinas se consideran un marcador de regeneración importante de tal manera que si consideramos los hallazgos reportados por la PCR de punto final se puede señalar que existe la expresión de nestinas en los páncreas de ratón de los tres lotes (Figura 16). Para conocer el significado del comportamiento de dicha expresión, se realizó la cuantificación relativa de las nestinas presentes con el software del

fotodocumentador SmartView Pro-1100 (Figura 17), a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al realizar el análisis de varianza (ANOVA) de una vía $p > 0.05$ y la prueba de comparación múltiple de Tukey entre los tres lotes. Los resultados reflejan que hay mayor expresión de nestinas en el lote de diabéticos sin tratamiento (86 ± 6.47 ng/5 μ L) y tal expresión disminuye en el lote de diabéticos con tratamiento (83.28 ± 8.08 ng/5 μ L) pero sin alcanzar el valor de expresión del lote control (81.58 ± 9.26 ng/5 μ L), esto corrobora lo que mencionan Olvera-Granados C. P. et al. (2008), que cuando existe una lesión en el páncreas, es cuando hay mayor expresión de nestinas tal como es el caso del lote de diabéticos sin tratamiento, y al administrar Thelzán 101 al lote de diabéticos con tratamiento se cree que el daño disminuye gracias a la capacidad regeneradora de este producto y por consecuencia disminuye la expresión de nestinas pero no tanto como para llegar al nivel de expresión de nestinas del lote control que se podría tomar como un nivel basal, ya que según Olvera-Granados C. P. et al. (2008), este marcador es expresado transitoriamente en diferentes tipos celulares del tejido embrionario y del tejido adulto.

Existe un trabajo de tesis en el cual se comprueba la capacidad regeneradora del Thelzán 101 mediante la aplicación de distintas técnicas de tinción para la identificación específica de las células β . En dicho trabajo se compara el grupo control con el grupo tratado con el extracto, los resultados muestran que hay mayor cantidad de células β pancreáticas en el grupo tratado que en el grupo control, por lo que Moreno Patrón M.A. (2008), concluye que hay una modificación estructural de las células β pancreáticas lo que da como resultado una mayor cantidad de estas células, y con esto comprueba la hipótesis de que el compuesto Thelzán 101 posee la capacidad de inducir la proliferación de las células β pancreáticas.

Aunque los resultados obtenidos en este trabajo aportan más evidencias de la capacidad regeneradora de Thelzán 101, aún hay un largo camino por recorrer para llegar a la total certeza de esta función y más aún conocer el mecanismo de acción. Hasta ahora varios reportes han demostrado que la diferenciación de células madre embrionarias a células productoras de insulina puede ser posible seleccionando las células nestina positivas (Wei R. et al., 2013). Asimismo se ha demostrado que las células nestina-positiva aisladas de islotes pancreáticos de humano y rata adultos se pueden expandir y diferenciar en fenotipos

pancreáticos endocrino, exocrino y hepático *in vitro*, lo cual indica que son células madre de tejidos multipotentes (Ling Z. et al., 2005).

Se dice que la nestina es un marcador de células madre pancreáticas y se ha demostrado en varios estudios. Por ejemplo, Ling Z. et al. (2005) demostraron que las células nestina positivas, aisladas del páncreas fetal humano tienen gran potencial proliferativo. Estas células se pueden traspasar más de 16 veces *in vitro*. Para determinar si las células nestinas positivas se podían diferenciar en células pancreáticas endocrinas, fueron inducidas a diferenciación después de la exposición a un medio sin suero suplementado con una mezcla de factores de crecimiento. Los resultados revelaron que se detectó la expresión de mRNA de los marcadores de células pancreáticas endocrinas como insulina, glucagón y PDX-1, mientras que la expresión de los marcadores de células progenitoras pancreáticas como la nestina y Ngn3 desaparecieron después de la inducción. Estos resultados indican que las células pancreáticas nestina positivas poseen características de células madre.

El análisis morfológico del páncreas (Figura 18) ayudó a confirmar la capacidad regeneradora del compuesto liofilizado Thelzán 101 ya que se observaron las características celulares normales de este órgano en los animales diabéticos con tratamiento. Por otra parte, el análisis morfológico del hígado (Figura 19) y riñón (Figura 20) ayudó a descartar la posibilidad de que Thelzán 101 pueda inducir algún efecto nocivo o dañino, como; un posible agrandamiento de núcleos, hepatoesteatosis o la infiltración de linfocitos en el caso del hígado; y en el caso del riñón, corpúsculos renales muy angostos, esclerosis del glomérulo o necrosis (masas eosinofílicas en los túbulos y núcleos reducidos).

Desde hace no mucho, existe una terapia prometedora para la diabetes mellitus tipo 1, se trata del trasplante de islotes pancreáticos, sin embargo, existen algunos obstáculos que ponen en duda su eficacia, por ejemplo, el limitado número de células donantes disponibles, el difícil proceso de aislamiento de los islotes y el costo del procedimiento (Hsin-Yang L. et al., 2010), es por eso que se han buscado nuevas alternativas de terapia, como por ejemplo la regeneración de células β , en este trabajo se buscó que esta regeneración fuese provocada por un compuesto a base de plantas medicinales, la cual fue puesta a prueba dando resultados

satisfactorios, sin embargo, queda por realizar estudios que describan el o los mecanismos de acción de Thelzán 101.

10. CONCLUSIONES

- a) El fitofármaco hipoglucemiante liofilizado resultó libre de microorganismos debido a las medidas de higiene y equipo de protección que se utilizó al momento del envasado, así mismo, el etiquetado y empaque del mismo se realizó siguiendo los lineamientos de la NOM-072-SSA1-2012 “Etiquetado de medicamentos y de remedios herbolarios”

- b) Se indujo diabetes tipo 1 en los ratones macho de la cepa CD1 con la aplicación repetida de estreptozotocina; sus valores de glucosa alcanzaron una concentración promedio de 137.5 ± 15.64 y 135 ± 10.7 mg/dL para el lote de diabéticos sin tratamiento y diabéticos con tratamiento respectivamente, en comparación con los animales del lote control que tuvieron cifras de 122.33 ± 24.04 mg/dL. El grupo de animales diabéticos que fueron tratados con el fitofármaco mostraron una disminución del nivel promedio de glucosa que fue de 85.50 ± 10.09 mg/dL, lo cual mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (92.33 ± 14.05 mg/dL), comprobando así la capacidad hipoglucemiante del producto liofilizado.

- c) La determinación de mRNA de nestina en páncreas de ratón mediante PCR de punto final puso en evidencia la capacidad regeneradora de células β pancreáticas del producto liofilizado Thelzán 101; en relación a la cuantificación indirecta del mRNA de nestina en páncreas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales aún cuando el lote control tuvo 81.58 ± 9.26 ng/5 μ L, el lote diabéticos sin tratamiento mostró 86 ± 6.47 ng/5 μ L y los diabéticos con tratamiento 83.28 ± 8.08 ng/5 μ L, posiblemente debido a la sensibilidad del procedimiento de cuantificación empleado.

- d) El análisis morfológico de páncreas, comprobó la capacidad regeneradora de células β pancreáticas del compuesto liofilizado Thelzán 101 debido al aumento en la cantidad de islotes pancreáticos de los ratones diabéticos con tratamiento comparado con los diabéticos sin tratamiento observados al finalizar el tratamiento, en cuanto al análisis morfológico del riñón e hígado no se detectó ningún cambio entre los diferentes lotes experimentales, lo que indica que tanto la STZ como Thelzán 101 no inducen daños en estos órganos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta Altamirano G., Frías de León M.G., Reyes-Montes M.R., Vargas Hernández V. y Suárez Cuenca J.A. (2011). “Radicales libres y mecanismos de daño tisular en la diabetes mellitus” *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 54(3), 46-53.
2. Adedayo, O., Ganiyu, O., Funmi, P., Tech, M., Sunday, I., & Opeyemi., B. (2015). “Antioxidant properties of phenolics constituents from different varieties of *Corchorus spp*”. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 10(3), 278-287. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2014.11.005>.
3. Aguilar-Santamaría L., Ramírez G., Alegría-Reyes P.N. y Herrera-Arellano A. (2009). “Antidiabetic activities of *Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth*” *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 284–288.
4. Aguilera Ortiz M, Reza Vargas MC, Chew Madinaveitia RG, Meza Velázquez JA. (2011). “Propiedades funcionales de las antocianinas”. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 13(2), 16-22.
5. Albarrán Cornejo M.E. (2007). “Efecto modulador de los frutos de arándano (*Vaccinium myrtillus*) y zarzamora (*Rubis fruticosis*) sobre biomarcadores de estrés oxidativo en ratas Wistar y diabéticas inducidas con estreptozotocina” (Tesis de Maestría) Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
6. American Diabetes Association, (2010). “Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus”. *Diabetes Care*. 33, 62–69. DOI: 10.2337/dc10-S062.
7. Arenas G.M., Arévalo M.J., Rocha A.J. y Acosta M.E. (2005). “Aspectos embriológicos y morfológicos del páncreas”. Universidad de Magdalena. *Revista de*

- la Facultad de Ciencias de Salud, 2(2), 130-134.
8. Asgary S., RafeianKopaei M., Sahebkar A., Shamsi F y Goli-malekabadi N. (2015). “Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of *Vaccinium myrtillus* fruit in experimentally induced diabetes (antidiabetic effect of *Vaccinium myrtillus* fruit)”. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(3), 764-768. DOI: 10.1002/jsfa.7144
 9. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana UNAM. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Tronadora&id=7502>
 10. Barajas M. (2011). “Estrategias de terapia celular para el tratamiento de la diabetes tipo 1: dónde estamos y qué podemos esperar” *Avances en diabetología*, 27(4), 115-127.
 11. Bequer L., Gómez T., Molina J.L., Artilles D., Bermúdez R. y Clapés S. (2016). “Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes”. *Biomédica*, 36, 230-238. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2686>
 12. Berger H., Warshaw A., Büchler M., Kozarek R., Lerch M., Neoptolemos J., Shiratori K. y Whitcomb D. (2008). “The pancreas: an integrated textbook of basic science, medicine and surgery” 2nd ed. Blackwell publishing. UK.
 13. Bezáková L., Grančai D., Obložinský M., Vanko M., Holková I., Paulíková I., Garaj V y Gáplovský M. (2007). “Effect of flavonoids and cunarine from *Cynara cardunculus* L. on lipoxygenase activity” *Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae*, (54), 48-52.
 14. Bnouham M., A. Ziyat y H. Mekhfi. (2006). “Medicinal plants with potential antidiabetic activity –A review of ten years of herbal medicine research”,

International Journal of Diabetes and Metabolism, 14, 1-25.

15. Bouwens L., Rooman I., (2005). "Regulation of pancreatic beta-cells mass". *Physiological Reviews*, 85(4), 1255-1270. DOI: 10.1152/physrev.00025.2004.
16. Brandan N.C., Llanos I.C., Miño C.A. y Rodríguez A. (2011). "Hormonas pancreáticas" Universidad Nacional del Nordeste. Argentina.
17. Brasanac-Vukanovic S., Mutic J., Stankovic D.M., Arsic I., Blagojevic N., Vukasinovic-Pesic V. y Tadic V.M. (2018). "Wild bilberry /*Vaccinium myrtillus* L., Ericaceae) from Montenegro as a source of antioxidants for use in the production of nutraceuticals". *Molecules*, 23, 1864. DOI: 10.3390/molecules23081864.
18. Chandran R., Parimelazhagan T., Shanmugam S., Thankarajan S., (2016). "Antidiabetic activity of *Syzygium calophyllifolium* in Streptozotocin-Nicotinamide induced Type-2 diabetic rats". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 82, 547-554. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.05.036.
19. Corral Salvadó A., Jimenez Rivero G. y De la Paz Naranjo J. (2002). "Droga cruda y extracto fluido de *Tecoma stans* L." La Habana, Cuba.
20. Cortés M., Herrera E. y Rodríguez E. (2015). "Optimización experimental del proceso de liofilización de Uchuva adicionada con componentes activos por impregnación al vacío" *Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 22(1), 47-56. DOI: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v22n1a06>.
21. Costantino, L., Raimondi, L., Pirisino, R., Brunetti, T., Pessotto, P., Giannessi, F., Lins, A.P., Barlocco, D., Antolini, L., El-Abady, S.A., (2003). "Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids". *Farmaco*, 58, 781-785.
22. Danne T., Lange K., Kordonouri O. (2007). "New developments in the treatment of type 1 diabetes in children". *Archives of Disease in Childhood*, 92(11), 1015-1019. DOI: 10.1136/adc.2006.094904.

23. De la Paz Naranjo J., Corral Salvadó A., Rivero Jiménez G., Fernández Menéndez M. y Pérez Santoya P. (2003). “Efecto hipoglucemiante del extracto fluido de *Tecoma stans* Linn en roedores” *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 13-17.
24. ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2016). Disponible en: http://transparencia.insp.mx/2017/auditorias-insp/12701_Resultados_Encuesta_ENSANUT_MC2016.pdf
25. FEUM. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2016). “Métodos generales de análisis 0381. Esterilidad”
26. Flores C., Márquez Y., López Ortega et al. (2006). “Caracterización de la Diabetes mellitus experimental inducida con estreptozotocina en ratones nmri” [versión electrónica]. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 12(1), 13-18.
27. FreeZone® 4.5 Liter Freeze Dry Systems (2007). Labconco Corporation. Disponible en: https://toolik.alaska.edu/edc/equipment/equipment_manuals/Freeze_Dryer_Labconco_45L.pdf
28. Furman, B.L. (2015). “Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats”. *Current Protocols in Pharmacology*, 70(5). DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s70
29. Galvez Ranilla L., Kwon Y., Apostolidis E. y Shetty K. (2010). “Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America” *Bioresource Technology*, 101(12), 4676-4689.
30. Garzón G.A. (2008). “Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión” *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
31. Gravotto G., Boffa L., Genzini L. y Garella D. (2010) “Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants” *Journal of Clinical Pharmacy and*

Therapeutics, 35, 11-48. DOI: 10.1111/j.1365-2710.2009.01096.x

32. Gutiérrez JP., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Villalpando-Hernández S., Franco A, Cuevas- Nasu L., Romero-Martínez M., Hernández-Ávila M. (2012). “Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012”. Resultados Nacionales. Cuernavaca, Morelos, México.
33. Han B., Hao C., Tchekneva E., Wang Y., Lee C., Ebraim B., Harris R., Kern T., Wasserman D., Breyer M. y Qi Z. (2008) “Markers of glycemc control in the mouse: Comparision of six hours and overweight fasted blood glucose to HbA1c” American journal of Physiological Endocrinology Metabol, 295(4), 981-986.
34. Helmstädter A. (2012). “Antidiabetic medicinal plants – Between phytotherapy and lead structure research” [versión electrónica] Pharmacy in History, 54(4), 99-108.
35. Hsin-Yang L., Yi-Jen C., Shih-Jen C., Chung-Lan K., Ling-Ming T., Wen-Liang L., Chia-Ming C., Der-Ming y., Hung-Hai K., Nae-Fang T., Chen-Yi L., Shih-Hwa C. y Yuh-Lih C. (2010). “Induction of insulin-producing cells derived from endometrial mesenchymal stem-like cells”. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 335(3), 817–829
36. Ibarra Ma. De J., Cantú P., Verde M., y Oranday A. (2009) “Caracterización fitoquímica y efecto hipoglucemiante de *Tecoma stans* y su relación con la presencia de cromo como factor de tolerancia a la glucosa” Información Tecnológica, 20(5), 55-65.
37. Ibarra Salas M. J. (2009). “Efecto hipoglucemiante de *Tecoma stans* y *Eriobotrya japonica* y su relación con la presencia del cromo como factor de tolerancia a la glucosa” (tesis doctoral). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
38. International Diabetes Federation (IDF). Atlas de la Diabetes. (2015). 7o ed.

39. Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E. y Renold, A.E. (1967). "Studies of the diabetogenic action of streptozotocin". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 126(1), 201-205.
40. Junod, A., Lambert, A.E., Stauffacher, W. y Renold, A.E. (1969). "Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response". The Journal of Clinical Investigation, 48(11), 2129- 2139.
41. Kahn R., Weir G.C., King G.L., Jacobson A.M., Moses A.C. y Smith R.J. (2005). "Joslin's Diabetes mellitus". Lippincott Williams & Wilkins. 14th ed. USA.
42. Kolb, H. (1987). "Mouse models of insulin dependent diabetes: Low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice". Diabetes Metabolism, 3(3), 751-778.
43. Ling Z., Tian-Pei H., Jiang H., Yi-Nan L., Yong-Hua W. y Ling-Song L. (2005). "Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cell". World Journal of Gastroenterology, 11(19), 2906-2911.
44. Lozoya M. (1980). "Tronadora (*Tecoma stans* L. H.B.K.)", Medicina tradicional (México), 3, 5-9.
45. Lozoya M. y C. Mellado. (1985). "Is the Tecoma stans infusion an antidiabetic remedy?" Journal of Ethnopharmacology, 14(1), 1-9.
46. Madunic J., Vrhovac Madunic I., Gajski C., Popic J. y Garaj-Vrhovac V. (2018). "Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties". Cancer letters, 413, 11-22.
47. Manrique M. y Silva D. (2006) "Apoptosis de las células beta del páncreas durante la Diabetes de tipo 1". Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, 54(3), 181-190.

48. McCue, P., & Shetty, K. (2004). "Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro". *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(1), 101-106 .
49. Moreno Patrón M.A. (2008). "Evaluación del efecto tóxico en hepatocitos producido por el compuesto Thelzán 101, así como su capacidad hipoglucemiante y regeneradora de células β pancreáticas en un modelo experimental de ratas macho sanas" (Tesis de Licenciatura) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
50. Mullen Y. (2017). "Development of the nonobese diabetic mouse and contribution of animal models for understanding type 1 diabetes" Department of Translational Research and Cellular Therapeutics, Diabetes & Metabolism Research Institute. *Pancreas*, 46(4), 455-466. DOI: 10.1097/MPA.0000000000000828
51. Olvera-Granados C. P., Leo-Amador G. E., Hernández-Montiel H. L. (2008). "Pancreas and β cells: Differentiation mechanisms, morphogenesis and endocrine cellular specification. Regeneration?" *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 65(4), 306-324.
52. Organización Mundial de la Salud. (2016) "Informe mundial sobre la diabetes". Resumen de orientación.
53. Orrego Alzate C.E. (2008). "Congelación y liofilización de alimentos" Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7837/1/9789584444363.pdf>
54. Parzanese M., (2010). "Liofilización de alimentos" Tecnologías para la Industria Alimentaria. Alimentos Argentinos. Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf
55. Pérez Trueba G. (2003). "Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes" Instituto de

- Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón” Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 22(1), 48-57.
56. PIER (1999). “*Tecoma stans*”. Pacific Island Ecosystem at Risk (PIER), Institute of Pacific Islands Forestry. USA.
57. Pinela J., Barros L., Carvalho A.M. y Ferreira I. (2011). “Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae)” Food and Chemical Toxicology, 49(11), 2983-2989.
58. Providean VIRATEC. (s.f.) “Liofilización”. TECNOVAX. Tecnología en sanidad animal. México.
59. Rakieten, N., Rakieten, M.L. y Nadkarni, M.V. (1963). “Studies on the diabetogenic action of streptozotocin”. Cancer Chemotherapy Reports, 29(1), 91-98.
60. Ramírez-Ortiz M.A., Rodríguez-Carmona O.Y., Hernández-Rodríguez O.S., Chel-Guerrero L. y Aguilar-Méndez M.A. (2016). “Estudio de la actividad hipoglucemiante y antioxidante de tronadora, raíz de wereque y raíz de nopal” Ed. Alimentos Funcionales de Hoy. Barcelona, España: OmniaScience. Pp. 143-180.
61. Rengifo Penadillos R.A. (2013). “Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos”. Universidad Nacional de Trujillo Perú. Revista Farmaciencia, 1(2).
62. Rosenberg L., Vinik A. (1989). “Induction of endocrine cell differentiation: a new approach to management of diabetes”. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 114(1), 75-83.
63. Sepúlveda Saavedra J. (2014) “Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular”. 2ed. McGraw-Hill. México.

64. Silvestre M. (2017). “Importancia de las células beta pancreáticas” Bloomberg. Disponible en: <https://www.merca2.es/celulas-beta-productoras-insulina/>
65. Smith M., Simmons K., Cambier J. (2017). “B cells in type 1 diabetes mellitus and diabetic kidney disease”. *Nature Reviews Nephrology*, 13(11), 712-720. DOI: 10.1038/nrneph.2017.138.
66. Street C. N., Lakey J.R.T., Seeberger K., Helms L., Rajotte R.V., Shapiro A.M.J. y Korbitt G.S. (2004). “Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker”. *Journal of Endocrinology*, 180(2), 213–225.
67. Tébar Massó F.J. y Escobar Jiménez F. (2009) “La diabetes mellitus en la práctica clínica” Buenos Aires: Argentina. Editorial Médica Panamericana.
68. Tuomilehto J., Lindström J., Eriksson J., Valle T., Hämäläinen H., Ilanne-Parikka P., Keinänen-Kiukaanniemi S., Laakso M., Louheranta A., Rastas M., Salminen V. y Aunola S. (2001). “Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance” *The New England Journal of Medicine*. 344:1343-1350. DOI: 10.1056/NEJM200105033441801
69. Vinayagam R. y Xu B. (2015). “Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review”. *Nutrition & Metabolism*, 12(60), DOI: 10.1186/s12986-015-0057-7
70. Wei R., Yang J., Hou W., Liu G., Gao M., Zhang L., Wang H., Mao G., Gao H., Chen G. y Hong T. (2013). “Insulin-Producing Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells: Comparison of Definitive Endoderm- and Nestin-Positive Progenitor-Based Differentiation Strategies”. *PLoS ONE*, 8(8). DOI: 10.1371/journal.pone.0072513
71. Wing-Kwan C., M. Cheung S., W. Lau R.A. y F. Benzie I.F., (2011). “Bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*)” Cap. 4. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical*

Aspects. 2nd edition. Disponible en:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92770/#ch4_96

72. Wu K. y Huan Y. (2006) “Diabetic atherosclerosis mouse models” *Atherosclerosis*, 191(2), 241-249. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2006.08.030

12. ANEXOS

Anexo A. Cuantificación indirecta de nestinas en software del fotodocumentador SmartView Pro-1100.

	L1 Density	L1 Concentration	L2 Density	L2 Concentration	L3 Density	L3 Concentration	L4 Density	L4 Concentration	L5 Density	L5 Concentration	L6 Density	L6 Concentration	L7 Density	L7 Concentration	L8 Density	L8 Concentration
Segment 01	56080	90.066	358803	69.348	260521	77.731	286157	75.77	93492	92.654	164641	83.643	118374	85.844	82145	77.774
Segment 02	463764	70							478310	69.232						
Segment 03	345379	76.705							330095	77.525						
Segment 04	33926	94.233							27590	94.581						
Segment 05	33551	94.248							24110	94.785						
Segment 06	60565	92.726							45485	93.575						
Segment 07	111614	89.85							89659	91.09						
Segment 08	108237	90							73688	91.985						
Segment 09	189942	85.402							150238	87.68						
Segment 10	170631	86.521							156701	87.309						
Segment 11	137986	89.037							145653	88.12						
Segment 12	200976	84.823							190231	85.908						

	L1 Density	L1 Concentration	L2 Density	L2 Concentration	L3 Density	L3 Concentration	L4 Density	L4 Concentration	L5 Density	L5 Concentration	L6 Density	L6 Concentration	L7 Density	L7 Concentration	L8 Density	L8 Concentration
Segment 01	68745	93.04	247255	81.579	163713	86.942	173630	86.306	60977	93.538	88909	91.745	61616	93.497	65112	93.273
Segment 02	427592	70							474101	67.014						
Segment 03	346044	75.236							336549	75.845						
Segment 04	32899	95.341							24261	95.896						
Segment 05	32152	95.389							23345	95.955						
Segment 06	64485	93.313							45480	94.533						
Segment 07	116067	90.001							91057	91.607						
Segment 08	116089	90							77986	92.446						
Segment 09	188349	85.361							149747	87.839						
Segment 10	131295	89.024							122193	89.608						
Segment 11	112840	90.209							110136	90.382						
Segment 12	143311	88.252							142703	88.291						

