



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

Evaluación del extracto etanólico de *Swietenia humilis* en el desarrollo
embrionario en ratas diabéticas

TESIS

Para obtener el título de BIÓLOGO

PRESENTA

Enrique Palma-Ríos

DIRECTORA DE TESIS:

Biol. **Gladys Chirino-Galindo**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres y a mi familia por estar conmigo y acompañarme en este largo y pesado viaje, por siempre creer en mi, sin su apoyo no estaría aquí.

A mi hermano y a mis primos por ser parte importante en mi vida.

A mis amigos, compañeros y a la gente que he conocido durante esta etapa. Ya que no todo lo que se aprende en la vida se aprende en las aulas.

A Matzielly López por acompañarme y presionarme para ser mejor persona, por ser mi compañera de vida y por estar conmigo en los mejores y sobre todo en los peores momentos. A mi hijo Diego por ser mi inspiración y mi mundo. Ustedes son mi razón para ser mejor.

A la Licenciada Gladys y el Dr. Palomar por ayudarme y brindarme su conocimiento, pero sobre todo por la paciencia y comprensión que han tenido conmigo.

A mi Universidad la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por permitirme ser parte de ella y formarme como profesionista pero más importante como ser humano.

Una decicatoria especial para mi abuela Julia Lira por hacer de mí una buena persona, por amarme y educarme. Aunque ya no estes conmigo, espero que todo tu amor y sabiduría me guien en la vida.

La vida esta plagada de dolor y sufrimiento, pero hay personas y momentos que hacen que valga la pena seguir viviendo.

ÍNDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCION.....	ii
CAPÍTULO 1. DIABETES MELLITUS (DM)	1
1.1 Clasificación de la DM.....	1
1.2 DM pregestacional	3
1.3 DM, Estrés oxidativo y embarazo.....	4
1.4 Inducción experimental de DM	8
CAPÍTULO 2. FLAVONOIDES, ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES	9
CAPÍTULO 3. <i>SWIETENIA HUMILIS</i>	10
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA.....	11
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	21
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN.....	37
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS	42

RESUMEN

La diabetes mellitus es la condición patológica que complica el embarazo con mayor frecuencia. Cuando la madre presenta diabetes antes de la gestación, existe una mayor incidencia de abortos espontáneos, mortalidad perinatal y malformaciones. La frecuencia de embarazos complicados con gestación previa es relativamente baja, pero los daños a la prole son considerables, a pesar de existir en algunos casos un buen control metabólico. Debido a que gran parte de la población utiliza herbolario para tratar éste y otros problemas de salud, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto etanólico de *Swietenia humilis* (caobilla o zopilote) en el desarrollo embrionario en ratas diabéticas. Se utilizaron 30 ratas hembra Wistar preñadas asignándose al azar en 6 grupos de 5 sujetos cada uno. El grupo control fue tratado con amortiguador de citratos 100mM, pH 4.5, el día 4 de gestación y a partir del día 5 hasta el 18 con solución salina. El segundo grupo fue tratado con una dosis única de estreptozotocina (STZ) 60mg/kg de peso, disuelta en amortiguador de citratos, el día 4 y a partir del día 5 hasta el 18 se les administró solución salina. Los grupos con tratamiento fueron tratados con la misma dosis de STZ y a partir del día 5 hasta el 18 se les administró el extracto de *S. humilis* dosis de 100 y 200 mg/kg de peso respectivamente. A los otros dos grupos, para verificar que el extracto no produce toxicidad, se les administró el amortiguador de citratos, en el día 4 y posteriormente del día 5 hasta el día 18 se les administraron respectivamente las dosis de 100 y 200 mg/kg de extracto de *S. humilis*. El día 19 de desarrollo se obtuvieron los fetos y posteriormente se les realizó un análisis morfológico grueso y de algunas partes corporales, se hizo un análisis histológico detallado. Se obtuvo sangre de las madres, de la cual se separó por centrifugación el suero para determinar la concentración de colesterol, glucosa y triglicéridos. Los datos obtenidos indican que el extracto de *S. humilis* es efectivo para reducir el porcentaje y severidad de las malformaciones producidas por la diabetes inducida por STZ en ratas preñadas, así como disminuir los niveles de colesterol, glucosa y triglicéridos en las madres en suero sanguíneo materno.

Palabras clave: *Swietenia humilis*, Diabetes mellitus, STZ, malformaciones, desarrollo embrionario.

INTRODUCCION

La diabetes es la cuarta causa de muerte en la mayoría de los países desarrollados, pero también es una nueva epidemia para los países en vías de desarrollo y aquellas naciones recientemente industrializadas. Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años. Debido a que a menudo resulta en incremento de la morbilidad, la diabetes es reconocida como un problema sanitario grave (Barba, 2018).

En México, la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de 10 años en el promedio de vida con respecto a la población abierta (Barba, 2018).

Para 2013, la carga económica de la diabetes se estimó en 362,859.82 millones de pesos, es decir 2.25% del PIB de ese mismo año. Este monto es mayor que el crecimiento real anual de la economía mexicana registrado por el INEGI al cierre del 2014 (2.1%), y no es una cifra menor si se le compara con el costo de otros problemas que también constituyen barreras al desarrollo económico como es la corrupción, cuyo costo se estima en 2% al 10% del PIB (Barraza-Llorens y cols., 2015).

El costo de la atención médica de las principales complicaciones de la DM 2 representa el mayor porcentaje (87%) de los costos directos.

Los costos indirectos de la DM 2 en México se estimaron en \$183,364.49 millones de pesos, que representaron el 1.14% del PIB del 2013 (figura III). La pérdida económica por muerte prematura es la que tiene mayor peso en estos costos (72.5%); mientras que los costos asociados a la pérdida de facultades para desempeñar un trabajo o alguna actividad que genere ingresos de manera temporal como incapacidad laboral o permanente, invalidez o de desempeñarlo en un estado que no es de completa salud (Barraza-Llorens y cols. 2015).

Dadas las condiciones que anteceden en el caso de las personas con diabetes, se puede agregar desde el punto de vista económico, que en pleno siglo XXI todavía existe una población socialmente desfavorecida, con escaso o nulo acceso a los servicios básicos y a la atención a la salud. Los debates éticos sobre equidad se suscitan tras observar como las

poblaciones privilegiadas enferman y mueren menos que los grupos poblacionales con alta vulnerabilidad y con marcadas diferencias en el nivel de vida (López y Avalos, 2013).

Estas iniquidades han aumentado a pesar del desarrollo de la ciencia y la tecnología, cuyos beneficios se concentran en un reducido grupo de países. Es tiempo de preguntarse por qué tales desarrollos no contribuyen efectivamente a reducir tales vulnerabilidades y diferencias.

En México, un problema de salud como la diabetes se puede atribuir, entre otros factores, a las condiciones socioeconómicas de las personas. Sin embargo, en las políticas de salud han predominado las soluciones centradas en el tratamiento de la enfermedad, sin incorporar adecuadamente intervenciones dirigidas a las "causas de las causas", tales como, las acciones sobre el entorno social (López y Avalos, 2013).

El desafío para la sociedad y los sistemas de salud es enorme, debido al costo económico y la pérdida de calidad de vida para los pacientes de diabetes y sus familias, así como por los cuantiosos recursos que requieren en el sistema público de salud para su atención (Hernández-Ávilaycols, 2013).

CAPÍTULO 1. DIABETES MELLITUS (DM)

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de trastornos metabólicos, caracterizados por hiperglucemia sostenida, debido a defectos en la secreción o acción de la insulina. Existen múltiples procesos fisiopatogénicos involucrados en su aparición, que varían desde la destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas hasta alteraciones que conducen a la resistencia a la acción de la insulina (Mediavilla-Bravo, 2015). La diabetes es una enfermedad crónica de causas múltiples. En su etapa inicial no produce síntomas, pero cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente, puede ocasionar complicaciones de salud graves, como infarto del corazón, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (Hernández-Ávilay cols.,2012).

Los síntomas que comúnmente se presentan por la elevación de glucosa en la sangre pueden ser:

- Sed excesiva (polidipsia)
- Hambre excesiva (polifagia)
- Necesidad de orinar continuamente (poliuria)
- Pérdida de peso sin motivo aparente
- Cansancio
- Visión borrosa
- Hormigueo de manos y pies
- Infecciones fúngicas

1.1 Clasificación de la DM

La DM ha sido recientemente reclasificada, y de acuerdo a su etiología se reconocen cuatro grupos principales (The Expert Committee, 1997, 2003; American Diabetes Association, 2004).

1. DM tipo 1 (DM1, antes conocida como diabetes insulino-dependiente o diabetes juvenil), en la cual el defecto aparente es la deficiencia de la secreción de insulina, causada

por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Representa entre el 5 y el 10 % de los casos. Por lo general se presenta en la etapa infantil o juvenil.

2. DM tipo 2 (DM2, antes llamada no insulino-dependiente o diabetes del adulto), al parecer no existe deficiencia en la producción de la hormona, sino que la respuesta de los tejidos a ella está disminuida, fenómeno conocido como resistencia periférica a la insulina. Representa entre el 90 y el 95 % de los casos y generalmente se presenta después de los 40 años de edad.

3. Otros tipos específicos. Un tercer grupo menor, que está formado por alteraciones diversas como endocrinopatías, alteraciones cromosómicas, diabetes inducida por fármacos o tóxicos y trastornos del páncreas exocrino, entre otras causas. En contraste con la diabetes primaria, la enfermedad es secundaria y es una complicación de otra enfermedad. Estos casos representan entre el 1 y 2 % del total.

4. Diabetes Mellitus Gestacional (DMG). Es el padecimiento que aparece a fines del segundo trimestre o inicios del tercer trimestre del embarazo de una mujer aparentemente sana, y se acompaña de síntomas característicos, como resistencia o deficiencia relativa de insulina, hiperglucemia de ayuno o intolerancia a la glucosa. Esto ocurre entre el 3 y 5 % de los embarazos.

La DMG tiene como característica el inicio durante la segunda mitad del embarazo de mujeres que previamente no habían sido diagnosticadas como diabéticas y puede o no remitir después del parto. La fisiopatología de esta afección está relacionada con hormonas placentarias, como: somatotropina coriónica placentaria, prolactina, cortisol y glucagón, que tienen efecto antagonista a la acción de la insulina, lo cual disminuye la tolerancia a la glucosa e incrementa la resistencia a esta hormona, por lo que pueden bloquearla parcialmente a partir de la vigésima cuarta semana de la gestación humana, por eso se dice que el embarazo es un estado diabetogénico. La gestación en mujeres previamente diabéticas es un suceso diferente: se considera embarazo de alto riesgo ya que las complicaciones que pueden llegar a sufrir la madre y los hijos son muy graves (Polanco cols.,2005).

1.2 DM pregestacional

La diabetes pregestacional o franca es aquella diabetes conocida previamente a la gestación, ya sea DM1, DM2 o intolerancia a los carbohidratos. Durante el embarazo normal se producen cambios metabólicos por un aumento de la resistencia a la insulina, probablemente debido al lactógeno placentario. Se produce una hiperinsulinemiacompensadora, a pesar de la cual, los niveles de glucemia posprandial aumentan de forma significativa a lo largo del embarazo. Hacia el tercer trimestre, la glucemia en ayunas desciende por aumento del consumo de glucosa por la placenta y el feto. En la paciente diabética pregestacional puede aparecer cetoacidosis, si no ajusta su dosis de insulina conforme suben los requerimientos de esta, particularmente en la DM1 (Contreras-Zúñiga y cols., 2008).

Las alteraciones en los hijos de madres diabéticas dependen de la gravedad de la diabetes, el grado de descontrol metabólico y el momento de la gestación en la que se inicia la diabetes. Cuando la madre es diabética antes de la gestación existe mayor incidencia de abortos espontáneos, mortalidad perinatal y malformaciones congénitas (Polanco y cols., 2005).

Numerosos estudios han demostrado una incidencia de abortos espontáneos en mujeres con DM de 2 a 3 veces superior a la de la población en general, y se ha observado una tasa de aborto espontáneo del 14-15%, pero esta se incrementa hasta un 32% en aquellas mujeres con una elevación sustancial de los niveles de HbA1c > 6% sobre la media (Contreras-Zúñiga y cols., 2008).

Las malformaciones congénitas son de 2 a 4 veces más frecuentes en mujeres gestantes con DM. Un pobre control metabólico en las primeras semanas de gestación se ha relacionado con la presencia de malformaciones. La mayor parte de las malformaciones congénitas en hijos de madres diabéticas ocurre entre la cuarta y séptima semanas de gestación, un periodo crítico en el desarrollo porque se producen procesos teratogénicos (Contreras-Zúñiga y cols., 2008).

Los mecanismos etiopatogénicos de las malformaciones congénitas aún no se conocen con certeza. Puede ser que existan factores genéticos concomitantes que

predispongan a los embriones a padecer estas alteraciones o que sean los factores ambientales los que influyan en el desarrollo anormal. Lo más probable es que ambos interactúen. Se han considerado varios factores teratogénicos como posibles responsables de las malformaciones fetales. Estos posibles factores fetales son la insulina, la placenta, la hiperglucemia e incluso la transmisión materna de anticuerpos (Polanco y cols., 2005).

Las complicaciones que presentan los hijos de madres diabéticas no solo afectan durante el nacimiento si no que parece indicar que algunas enfermedades metabólicas del adulto, como la diabetes, pueden tener origen fetal. La hiperplasia de las células β e hiperinsulinismo que se observa en los fetos de madres diabéticas inducen cambios irreversibles en el páncreas, lo que ocasiona intolerancia a la glucosa, obesidad, e incluso diabetes tipo 2 (Arizmendi y cols., 2012).

Debido a que incluso el tratamiento insulínico y el adecuado control glicémico durante la gestación no garantizan la ausencia de dificultades durante el embarazo se han buscado otras alternativas, por ello es que recientemente se han buscado tratamientos complementarios al uso de insulina para revertir o evitar las malformaciones y defectos en los fetos de mujeres con este padecimiento (Nazer y cols., 2005).

1.3 DM, Estrés oxidativo y embarazo

El estrés oxidativo es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante de las células. La producción de especies reactivas de oxígeno se da constantemente en la mitocondria. Entre 2 a 5 % del oxígeno que entra en la cadena respiratoria se reduce de forma univalente y origina el radical superóxido. Las sustancias que participan en las reacciones de los sistemas de defensa antioxidante se inactivan o deterioran en determinadas situaciones. Este deterioro puede ser causado por alguna enfermedad crónica o transitoria o una situación que provoque incrementos sustanciales en la producción de oxidantes y prooxidantes. Entre estas patologías se encuentran la diabetes mellitus y el embarazo; aunque este último no es un estado patológico sino de adaptación metabólica (Fernández y cols., 2010).

En los pacientes que padecen de diabetes mellitus se producen cambios en los indicadores bioquímicos que evidencian una situación de estrés oxidativo: disminuyen las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E y se incrementa la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés), se incrementa la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación, hay menor capacidad antioxidante total del plasma y se daña el material genético (Clapés,2000).

La gestación es una situación que requiere de una adaptación metabólica especial. Durante la gestación la unidad feto placentaria se desarrolla a expensas de la madre. El feto no sintetiza glucosa por lo que existe una transferencia constante de este metabolito de la circulación materna a la fetal. La unidad feto placentaria consume hasta 50 % de la glucosa materna, por lo que si la madre padece diabetes le proporciona al feto un medio hiperglucémico, que estimulará su páncreas a una mayor secreción de insulina y en general a adaptaciones metabólicas para las cuales puede estar aún inmaduro (Fernández y cols., 2010).

Para la madre diabética, el embarazo puede generar serios trastornos que involucran también a su descendencia. Esto se debe a que en las primeras etapas de la gestación, cuando aún no se evidencian cambios en la sensibilidad frente a la insulina, el páncreas de la mujer embarazada produce una mayor cantidad de hormonas. La adaptación del tratamiento hipoglucemiante en la mujer embarazada diabética será difícil e imprescindible durante todo el embarazo. En el último tercio de la gestación además se produce una resistencia generalizada a la insulina. Estos cambios se acompañan de incremento en la actividad lipolítica del tejido adiposo, por lo que al hígado mayor cantidad de sustratos para la síntesis de triglicéridos, los que salen a la circulación asociados con las lipoproteínas de baja densidad (LDL). También se producen cambios en la lipasa lipoproteica (LPL), la cual disminuye su actividad y en la actividad de la lipasa hepática (HL), de cuya inactivación es responsable el incremento en la cantidad de estrógeno (Clapés,2000).

El incremento en los triglicéridos circulantes en el embarazo, potenciado también por la diabetes, hace que se incrementen la oxidación de las LDL, y otras fracciones lipídicas y productos derivados de la oxidación de los lípidos. Estos productos derivados de

la oxidación de los lípidos pueden afectar la integridad de la membrana celular y causar daños en el material genético y en órganos y sistemas que comprometen la vida de la madre y el feto. La modificación de las LDL por acetilación, oxidación o glicosilación disminuye la secreción de progesterona de los cultivos de placenta, por lo que se vincula con los daños que puede sufrir la unidad feto placentaria y por lo tanto podrá tener implicaciones negativas para el adecuado término del embarazo, pues la sangre materna está en contacto con los trofoblastos de la placenta por perder esta la cubierta endotelial de sus vellosidades. Se conoce que sustancias procedentes de la peroxidación lipídica (PL) inducen la formación de sustancias con actividad clastogénica y por lo tanto producen roturas cromosómicas(Clapés,2000).

Importantes anomalías congénitas ocurren en 8 a 12 % de las embarazadas complicadas con diabetes mellitus pregestacional (DMP). Las dismorfogénesis ocurren principalmente en las primeras 7 semanas después de la concepción. En general es importante considerar que tanto la diabetes como la gestación pueden producir estrés oxidativo. La interacción de estas situaciones de adaptación metabólica pudiera estar relacionada con algunas de las complicaciones que aparecen durante la gestación en las mujeres con diabetes pregestacional como son: preeclampsia, alteraciones de la placenta y malformaciones en la descendencia (Nazer y cols.,2005).

Varios estudios han aportado evidencias de que la glucosa puede causar efectos embriotóxicos a través de la generación de ERO o a través de la liberación o catabolismo del AA, prostaglandinas (PG) o mio-inositol (Clapés,2000).

La etiología de los defectos al nacer relacionados con la diabetes es multifactorial. Se ha demostrado que otros factores embriotóxicos, además de la glucosa y los cuerpos cetónicos existen en el suero de los pacientes diabéticos. La regulación de los niveles de glucosa en sangre en el período pregestacional disminuye el número de complicaciones en el embarazo de la mujer diabética; sin embargo, estas siguen teniendo entre 2 y 5 % mayor de riesgo que las embarazadas que no padecen de diabetes. Esto sugiere que otros factores o sustancias que se encuentran al nivel sistémico en estas mujeres contribuyen a las dismorfogénesis (Clapés,2000).

Las malformaciones que en estudios clínicos y experimentales se han encontrado como más frecuentes en diabetes son las derivadas de defectos de cierre del tubo neural.

Los efectos negativos principales encontrados en diabetes experimental son:

- Retardo en el crecimiento fetal
- Reabsorciones
- Alta incidencia de malformaciones

En mujeres embarazadas la diabetes causa:

- Alta incidencia en trastornos de la concepción como la inadecuada implantación y los abortos espontáneos
- Macrosomías
- Malformaciones congénitas
- Muerte fetal intrauterina

Se han postulado diversos mecanismos causantes de los efectos teratogénicos de la diabetes y que están relacionados con el estrés oxidativo:

- Glicosilación de proteínas
- Acumulación intracelular de productos de la vía del poliol como sorbitol, lo que altera la diferenciación celular
- Disminución del *mio*-inositol, compuesto precursor del fosfatidil inositol (PI), que está implicado en el mecanismo de señales de la célula
- Alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico, en particular en la síntesis de prostaglandinas.

Debido a que tanto el embarazo como la diabetes pueden producir estrés oxidativo, y la relación que existe entre estas condiciones, se han investigado los beneficios y el papel que juegan los antioxidantes en la disminución de patologías gestacionales y enfermedades crónicas o degenerativas (García y García, 2009).

1.4 Inducción experimental de DM

El uso de agentes químicos para la producción de diabetes permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren durante y después de la inducción del estado diabético (Ramos y Méndez, 1994). Existen varias clases de agentes químicos, los primeros son sustancias con citotoxicidad específica que destruyen a las células β del páncreas y causan un estado de deficiencia primaria a la insulina. El segundo grupo lo constituyen agentes que actúan sobre las células β pero no las destruyen. Una tercera clase incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitan al páncreas y como consecuencia producen diabetes (Ramos y Méndez, 1994).

Los agentes químicos más utilizados son la aloxana y la estreptozotocina (STZ). Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células β , e inducen estados alterados similares a la diabetes o síndromes hiperglucémicos reversibles, se define la dosis diabetogénica como la que produce la alteración en el 80% de individuos, sin causar la muerte (Ramos y Méndez, 1994).

La STZ es un fármaco usado para inducir diabetes mellitus tipo 1 y 2. La STZ entra en la célula β a través de un transportador de glucosa (GLUT2) y causa daño al DNA por alquilación de las cadenas de este ácido, también induce la activación de un proceso llamado poliADP-ribosilación, que induce el agotamiento celular de NAD^+ y ATP que llevara la célula a la apoptosis (Bequer y cols., 2015).

La STZ es un derivado de la nitrosourea, fue aislado de la actinobacteria *Streptomyces achromogenes*, presenta actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro. Se trata de un potente agente alquilante que interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucocinasa, e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA. En este sentido, la STZ actúa como un caballo de Troya, ya que su molécula consta esencialmente de glucosa ligada a un fragmento reactivo de nitrosourea, y como tal es internalizada a través de los transportadores celulares de glucosa. Una vez dentro, el fragmento de nitrosourea es liberado y ejerce su actividad tóxica. Dado que las células β pancreáticas son más activas que las demás en la captación de glucosa (tienen que monitorizar continuamente sus niveles plasmáticos), también resultan más sensibles al efecto tóxico de la STZ (Arias-Díaz y Balibrea, 2007).

CAPÍTULO 2. FLAVONOIDES, ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C₆-C₃-C₆, los cuales pueden formar o no un tercer anillo (Martínez-Florez y cols., 2002) (Figura 1).

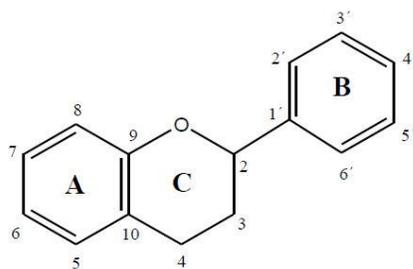


Figura 1. Estructura básica del esqueleto flavonólico (tomado de Martínez-Florez y cols., 2002).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, lo que les confiere propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, es decir, gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la diabetes o el cáncer (Chong, 2011).

CAPÍTULO 3. *SWIETENIA HUMILIS*

Es una especie arbórea de la familia Meliaceae (meliáceas), sus nombres comunes son muy diversos: caoba de la costa del Pacífico, caoba del Pacífico, caoba de Honduras, caobilla, cóbano, gateado, venadillo y zapatón. Tiene una altura media de 15-20m, crece en altitudes desde los 200 hasta los 1500 msnm, en las áreas de manglar y bosques tropicales y caducifolios, así como asociado a plantaciones en los estados de Guerrero, Michoacán, Colima, Sinaloa y Chiapas, donde los árboles se encuentran como individuos aislados. El fruto del árbol es una cápsula lisa ovoide, de color café grisáceo, de 8-20 cm de longitud y de 10-12 cm de diámetro, las semillas se emplean en prácticas médicas populares en forma de decocción o infusión (Ovalle, 2016). A las semillas de *S. humilis* se les han atribuido diversos efectos benéficos para la salud, de ahí su uso como alternativa natural para diversas patologías. En estudios fitoquímicos cualitativos como el de Reynoso-Orozco y cols. (2017) se muestra la presencia de alcaloides, terpenoides, antraquinonas, flavonoides, saponinas, además del contenido de metabolitos secundarios, reportaron también un alto contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales, el extracto no mostró un efecto hipoglucemiante. Por otro lado en base a los estudios realizados por Lobato (2016) se demostró que la semilla de *S. humilis* tiene presencia de alcaloides, saponinas y flavonoides, y comprobó que el extracto de semillas de *S. humilis* tiene un efecto antioxidante, además de presentar un efecto hipoglucemiante. Por otro lado, Flores y cols. (2017) también demostraron un efecto antioxidante del extracto etanólico de la semilla de *S. humilis* aunque este tuvo una capacidad baja. Ovalle (2016) menciona que la semilla es un candidato idóneo para el desarrollo de fitomedicamentos seguros para tratar la diabetes mellitus y sus complicaciones. Por lo cual se considera como una buena alternativa para el tratamiento de la diabetes, aunque aún faltaría investigación para dictaminar si es gracias al conjunto de metabolitos que se encuentran presentes en la semilla o a alguna sustancia en específico.

CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA

JUSTIFICACION

La Diabetes Mellitus ha ido en aumento, según datos de la OMS en el año 2018 442 millones de adultos en el mundo padecían diabetes, es decir, 1 de cada 11 personas tiene diabetes en el mundo. De acuerdo a la Federación Internacional de la Diabetes (FID) se estima que 1 de cada 6 nacimientos están siendo afectados por hiperglicemia en el embarazo y el 84% de estos es por diabetes gestacional. La DM es la condición patológica que con mayor frecuencia complica el embarazo y que posteriormente tiene influencia en el futuro tanto de la mujer como de su hijo, ya que incluso el tratamiento insulínico y el adecuado control glicémico durante la gestación no garantizan la ausencia de dificultades durante el embarazo, por lo cual es que recientemente se han buscado alternativas o tratamientos complementarios al uso de insulina para revertir o evitar las malformaciones y defectos en los fetos de mujeres con este padecimiento. Una de esas opciones es el uso de la semilla de *S.humilis* la cual se usa comúnmente en la medicina tradicional y se le atribuyen propiedades astringentes, antitumoral, hipoglucemiante y anticancerígenas (Vázquez, 2011). El propósito de este trabajo fue utilizar el extracto etanólico de *S.humilis* con el fin de encontrar una alternativa segura que reduzca los problemas causados por la DM presente en la gestación.

ANTECEDENTES

Polanco y cols.(2005) investigaron el efecto de la diabetes materna en el desarrollo de ratas y humanos, y encontraron diferentes problemas tanto en la gestación, como en el nacimiento e incluso en la vida adulta de los organismos.

Lobato (2016) evaluó la actividad farmacológica del extracto de la semilla de *S.humilis* en un modelo de diabetes en ratón demostrando un efecto genoprotector, hipoglucemiante, así como una baja actividad antioxidante del extracto.

Reynoso-Orozco y cols.(2017) realizaron la caracterización fisicoquímica de la semilla de *S.humilis*, reportaron que la semilla contiene saponinas, isoflavonas, flavonoides y un alto contenido de lípidos proteínas y minerales, lo que demuestra que la semilla tiene un efecto farmacológico.

HIPOTESIS

Ya que a la semilla de *S.humilis* tiene un alto contenido de saponinas, isoflavonas y flavonoides, además de su uso tradicional como un auxiliar en el tratamiento de la diabetes mellitus, se espera que el extracto etanólico de esta planta tenga un efecto farmacológico en el desarrollo embrionario en ratas diabéticas preñadas.

OBJETIVO GENERAL

Valorar el efecto del extracto etanólico de *S.humilis* en el desarrollo embrionario en ratas diabéticas preñadas.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en suero de ratas diabéticas preñadas tratadas con el extracto etanólico de *S.humilis*.

Identificar alteraciones del desarrollo embrionario mediante la determinación de parámetros morfológicos en fetos de ratas tratadas con STZ.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso se realizó en dos etapas; en la primera se obtuvo el extracto vegetal y se realizaron las pruebas fitoquímicas; y en la segunda se realizó el experimento propiamente dicho en ratas preñadas.

Colecta y tratamiento de las semillas

Se obtuvo 1kg de semillas de *S.humilisen* el mercado de Sonora de la Ciudad de México, y se llevaron al laboratorio de metabolismo de diabetes mellitus de la FES Iztacala. Las semillas se pelaron y secaron a la sombra durante 15 días, transcurrido el tiempo se pesaron; se obtuvieron 300 g de semillas deshidratadas.

Obtención del extracto

Una vez secas las semillas, se sometieron a maceración, de acuerdo con el método descrito por Angulo-Escalante y colaboradores en 2009. Se molieron los 300g de semillas deshidratadas en una licuadora comercial. Del pulverizado obtenido se pesaron 150 y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2 L. Se adicionaron 1.5 L de etanol/agua (7:3, v:v) y se mantuvieron en reposo, en ausencia de luz, y a temperatura ambiente por una semana. El macerado se filtró con papel filtro Whatman No5, y se evaporó en un rotavapor Buchi a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 50°C.

Análisis Fitoquímico

Prueba de determinación de alcaloides: Una porción del extracto se disolvió en ácido clorhídrico diluido, se agitó y se filtró, hasta que el filtrado se volvió transparente. Al filtrado se le agregó una gota del reactivo de Mayer, un cambio de color indicaría la presencia de alcaloides, se observa que no hubo cambio de color en la reacción (Fig. 2), indicando que el extracto no contiene alcaloides.

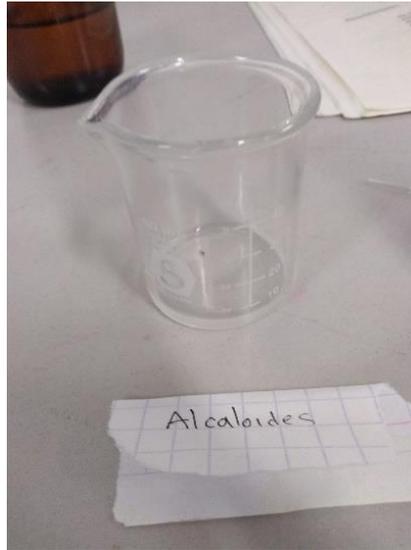


Figura 2. Prueba incolora indicando un resultado negativo a la presencia de alcaloides en el extracto.

Determinación de Saponinas: Se disolvió una porción del extracto en un tubo de ensayo con agua caliente y se agitó vigorosamente. La presencia de espuma estable por algunos minutos determino la presencia de saponinas. Se observa la presencia de espuma indicando la presencia de saponinas (Fig. 3).



Figura 3. Prueba con espuma, indicando la presencia de saponinas en el extracto.

Determinación de Triterpenos: Se disolvió una porción del extracto en 1.0 mL de cloroformo, se agregó 1.0 mL de anhídrido acético por las paredes del tubo, y se dejó reposar, posteriormente se le añadieron dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, en el cual la aparición de colores rosa, rojo, verde o púrpura determina la presencia de triterpenos. Se observa la aparición de un color rojizo indicando la presencia de triterpenos en el extracto (Fig. 4).

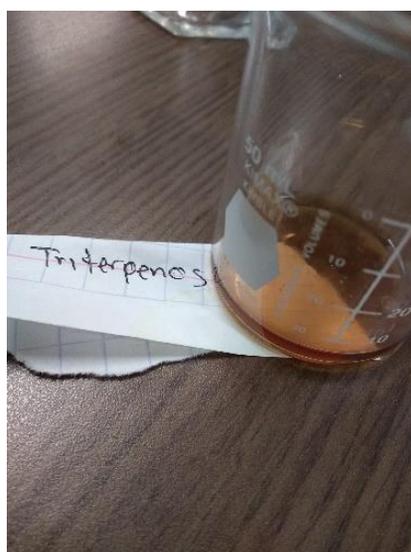


Figura 4. El extracto tomo una coloración rojiza indicando la presencia de triterpenos.

Determinación de Flavonoides: Una porción del extracto se disolvió en etanol y se le agregaron unas gotas de hidróxido de sodio diluido, la aparición de colores amarillo al rojo azulado se considera positiva. Se observa la aparición de un color amarillento indicando la presencia de flavonoides (Fig. 5).



Figura 5. Prueba con coloración amarillenta, demostrando presencia de flavonoides.

Prueba Biológica en animales

Se obtuvieron 30 ratas hembras, sanas, de la cepa Wistar, de 10-11 semanas de edad, con un peso de 250-300g, del Bioterio General de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala en el cual se mantuvieron en condiciones ambientales (temperatura, humedad, etc) controladas, con agua y alimentación *ad libitum* (nutricubos Enviro S2018). Las hembras fueron alojadas con ratas macho fértiles toda la noche, con la finalidad de promover el coito. Para determinar si la fertilización fue efectiva, se realizó un frotis vaginal en la cual la presencia de espermatozoides determinó el día 0 de gestación.

Las ratas preñadas se asignaron al azar en 6 grupos de 5 cada uno. El grupo control fue tratado con una inyección i.p. de amortiguador de citratos 100mM, pH 4.5 en el día 4 de gestación, y a partir del día 5 hasta el día 18 del sacrificio se les administró solución salina por vía intragástrica. El segundo grupo fue tratado con una dosis única de STZ 60mg/kg de peso en amortiguador de citratos en el día 4 de gestación por vía i.p., y a partir del día 5 hasta el día 18 se les administró solución salina por vía intragástrica. Los dos grupos con tratamiento fueron tratados i.p. con STZ 60 mg/kg en amortiguador de citratos en el día 4 de gestación y a partir del día 5 hasta el día 18 se les administró el extracto de *S.humilis* en dosis de 100 y 200 mg/kg por vía intragástrica, respectivamente. A los dos últimos grupos se les administró amortiguador de citratos i.p. en el día 4 de gestación, posteriormente para verificar que el extracto no producía ningún tipo de toxicidad, desde el día 5 hasta el día 18 se les administraron respectivamente las dosis de 100 y 200 mg/kg de extracto, igualmente por vía intragástrica.

Sacrificio y obtención de muestras

Las hembras fueron sacrificadas en el día 19 de gestación por sobredosis de pentobarbital sódico (50mg/kg i.p.), una vez anestesiadas se obtuvo la mayor cantidad de sangre por punción cardíaca, y se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajeron los dos cuernos uterinos con los ovarios mediante laparotomía, y fueron colocados en solución salina en frío. Los cuernos uterinos se abrieron longitudinalmente, y se obtuvieron los fetos,

los cuales se contaron, se pesaron en una balanza semi analítica, se midieron con una regleta Vernier y fueron fijados en solución Bouin.

Pruebas bioquímicas

La sangre se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm para la obtención de suero, el cual se congeló a -20°C, para posteriormente realizarla determinación de los siguientes parámetros, que se llevaron a cabo con ayuda de estuches comerciales: glucosa (Spinreact 1001150), colesterol total (EliTech CHSL-5505), y triglicéridos (EliTech TGML-5414), respectivamente, de acuerdo a los instructivos insertos en los estuches. Las reacciones de color fueron monitoreadas en un espectrofotómetro Jenway 6305 (glucosa) o en un lector de microplacas SunriseTecan (colesterol y triglicéridos).

Observación de fetos y determinación de Malformaciones

Dos días después de fijados, los fetos fueron recuperados y se enjuagaron con agua corriente, se transfirieron a alcohol al 70% y fueron analizados mediante cortes gruesos a nivel cefálico y torácico, por la técnica de Wilson, modificada por Barrow y Taylor (1969) para posteriormente ser observados al microscopio estereoscópico Leica L2, y se tomaron fotografías.

Preparación y observación de cortes histológicos

La tercera parte de los fetos extraídos en día 19 de cada grupo fue almacenada en formol durante una semana para realizarles las técnicas histológicas correspondientes. Una vez transcurrido el tiempo se enjuagaron con agua corriente y se pasaron a alcohol al 70% para su preparación; posteriormente se extrajo el hígado, cerebro y corazón de algunos fetos de cada uno de los grupos experimentales.

Los órganos fueron sometidos a deshidratación, para lo cual se pusieron en alcoholes graduales desde 70%, 80%, 90%, 96% y absoluto durante 30 minutos cada uno. Después se realizó el aclaramiento, para lo cual se pasaron a una mezcla de alcohol absoluto con alcohol amílico (1:1) durante 30 minutos y finalizando el tiempo establecido se hicieron 2 cambios de alcohol amílico de 30 minutos cada uno. Para la imbibición, las muestras fueron transferidas a una mezcla de alcohol amílico con parafina (1:1) a 56° C durante 30 minutos, terminado ese tiempo se hicieron dos cambios de Parafina durante 30 minutos y por último, se incluyeron en cubos de aluminio, y se dejaron enfriar.

Los cubos de parafina posteriormente fueron cortados en un microtomo de rotación Leica RM2125 RTS a 5-6 μm , y las secciones se colectaron y colocaron en portaobjetos gelatinizados. Las laminillas se tiñeron por la técnica de tinción H y E de rutina. Al término se observaron en el microscopio óptico Leica DM500, y tomar fotos con una cámara digital Leica EC3 acoplada al microscopio. Las fotografías se analizaron con el software Las EZ Leica.

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos realizados se llevaron a cabo considerando la NOM-062-ZOO-1999; el Proyecto fue evaluado y aprobado por el personal académico del bioterio de la FES Iztacala.

Análisis estadístico de los resultados paramétricos

Los resultados obtenidos de tamaño de camada, peso, talla y parámetros bioquímico-clínicos se analizaron mediante ANOVA simple, seguido de prueba de Tukey cuando fue necesario; en Excel para Windows 2010.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

Análisis Fitoquímico

Se realizaron pruebas cualitativas con el propósito de verificar la presencia de algunos metabolitos secundarios en el extracto, las pruebas fueron asociadas a la detección de metabolitos como alcaloides, saponinas, triterpenos y flavonoides en el extracto, las pruebas se realizaron basándose en el Manual de Introducción al análisis de productos naturales publicado por Barba en 1997.

Metabolito Secundario	Resultado
Alcaloides	-
Saponinas	+
Triterpenos	+
Flavonoides	+

Figura 6. Tabla con resultados del análisis fitoquímico del extracto de *S. humilis*, mostrando presencia (+) o ausencia (-) de metabolitos en el extracto.

Efecto del extracto de *S. humilis* en el desarrollo embrionario de la rata

El día del sacrificio, se determinó el tamaño de camada simplemente contando los fetos de cada hembra.

Se midió la longitud y peso de cada uno de los fetos de cada camada extraídos, se obtuvieron los promedios correspondientes a peso y talla de cada grupo. En la figura 7 se puede observar que, en promedio, el peso de los fetos del grupo diabético tratado sólo con STZ es mucho menor que los demás grupos, contrario a los que se le suministró el extracto, ya que estos manejaron un peso más cercano al presentado por el grupo control. Por otro lado, las ratas preñadas que fueron tratadas sólo con el extracto en dosis de 100 y 200

mg/kg presentaron un peso incluso mayor al del grupo control. Cabe resaltar, que en base al análisis estadístico si se mostró una diferencia significativa con respecto al peso entre los grupos.

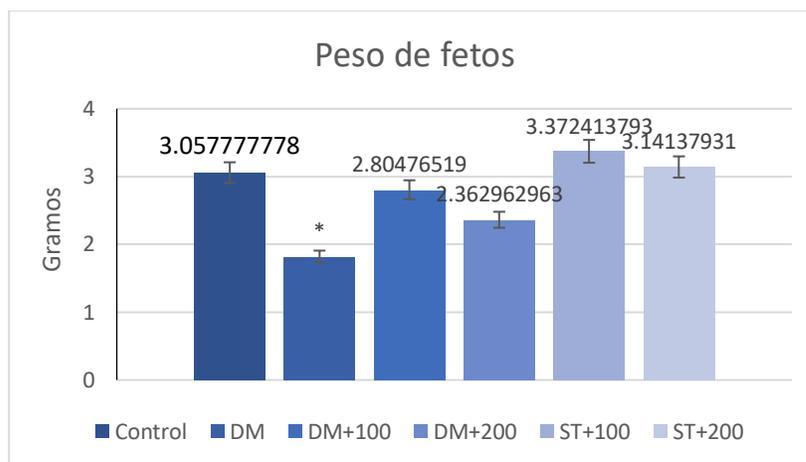


Figura 7. Peso de los fetos obtenidos de ratas preñadas de grupos control (control), control diabético (DM*), diabéticas con tratamiento de 100mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200mg/kg (DM+200), control con tratamiento de 100mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200mg/kg (ST+200). Promedio \pm D.E. de 10-15 fetos. * $P < \pm 0.05$ con respecto al grupo control.

Con respecto a la longitud, se observó igualmente que el grupo diabético tratado sólo con STZ presentó una longitud menor en comparación con los demás grupos (figura 8), cabe resaltar, que nuevamente el grupo control presentó una longitud mayor. En base al análisis estadístico, no se registró una diferencia significativa entre la longitud de los fetos.

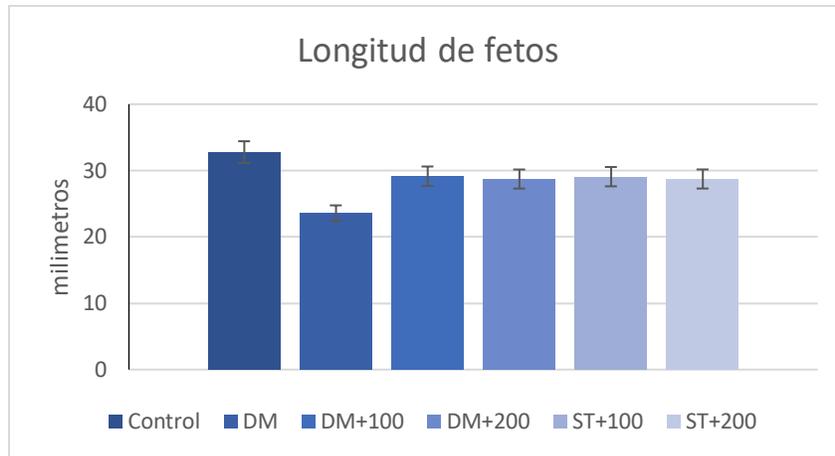


Figura 8. Talla en milímetros, de los fetos obtenidos de ratas preñadas de grupos control (control), control diabético (DM), diabéticas con tratamiento de 100mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200mg/kg (DM+200), control con tratamiento de 100mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200mg/kg (ST+200). Promedio \pm D.E. de 10-15 fetos. No se encontró diferencia significativa entre grupos.

El tamaño de camada en las ratas tratadas con STZ fue estadísticamente menor que en los demás grupos. Los fetos obtenidos de las madres diabéticas presentaron malformaciones y un mayor número de reabsorciones (Tabla 1). En cuanto a las malformaciones, las 5 ratas diabéticas (grupo DM), las crías presentaron un promedio del 39 ± 3 % de malformaciones por camada. Entre las malformaciones que se obtuvieron, se encuentran hidramnios (afección que ocurre cuando se acumula mucho líquido amniótico durante el embarazo) con 8 crías, seguido de exencefalia (malformación en la cual el cerebro está situado fuera del cráneo) con 4 y finalmente protrusión de lengua en 3 crías (Ver figura 8). Por otra parte, las reabsorciones se presentaron mayormente en el grupo DM (Todas las ratas preñadas de este grupo presentaron reabsorciones) con un promedio de 3.8 reabsorciones por rata, también se observaron reabsorciones en los grupos DM+100 mg/kg y en el ST+200 mg/kg (en ambos sólo se presentaron en una rata) con un promedio de 0.4 reabsorciones por rata.

Tabla 1. Tamaño de camada y porcentaje de reabsorciones y malformaciones en ratas preñadas y tratadas con STZ y extracto de *S. humilis*. Promedio \pm D.E. de al menos cinco camadas por grupo *P < 0.05 con respecto al control.

	Tamaño de camada (# de fetos)	Porcentaje de reabsorciones	Porcentaje de malformaciones
Control	9.0 \pm 1.0	0.0	0.0
DM	7.0 \pm 1.5	44.5 \pm 2.2*	39.5 \pm 3.02*
DM+100	8.4 \pm 0.5	5.0	0.0
DM+200	9.6 \pm 2.0	0.0	0.0
ST+100	11.8 \pm 1.2	0.0	0.0
ST+200	11.0 \pm 1.4	2.0	0.0



Figura 9. Se muestra un feto de grupo control con peso y talla normales, un feto de grupo DM con exencefalia, un feto de grupo DM con exencefalia y protrusión de lengua, y un feto de grupo ST+100 con peso y talla normal.

Parámetros bioquímico-clínicos en suero de rata tratada con STZ y extracto de *S. humilis*

Se obtuvo sangre de las ratas preñadas de cada grupo mediante punción cardiaca para la realización de pruebas bioquímico clínicas en las cuales se midieron glucosa, colesterol y triglicéridos. En la figura 9 se pueden observar los promedios de glucosa en sangre materna; el grupo diabético mostró una mayor cantidad de glucosa comparada tanto con el grupo control, como con los demás grupos, los grupos diabéticos a los que se les administró tratamiento tuvieron menores concentraciones de glucosa, siendo el tratamiento de 100mg/kg de extracto, el que mostró mejores resultados al disminuir más la concentración de glucosa en suero materno, pero es de destacar que aunque los disminuyó, aún es más elevado que el grupo control; por lo cual se podría indicar que el extracto etanólico de *S. humilis* tiene un efecto hipoglucemiante en ratas. Cabe resaltar, que los grupos a los que sólo se les administró el tratamiento, también mostraron niveles más altos de glucosa que el control, lo cual podría deberse a los cambios propios de la gestación. Es importante resaltar que el análisis estadístico si mostró diferencias significativas.

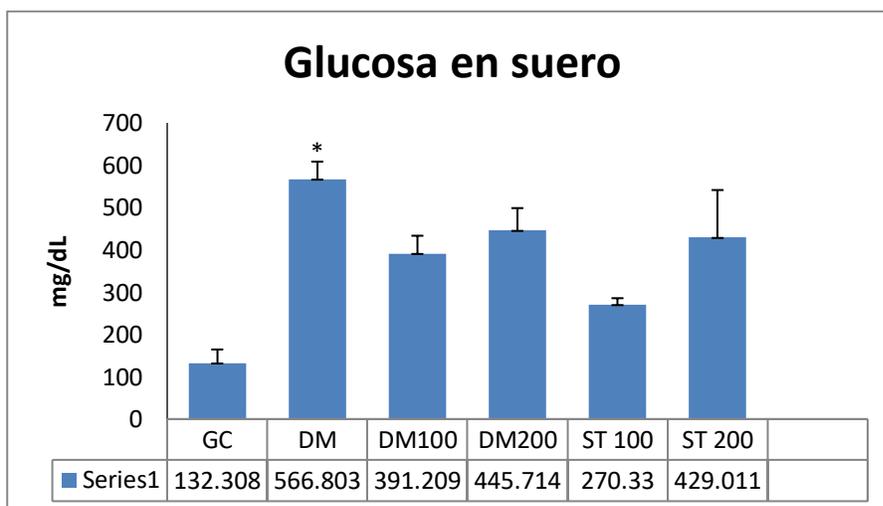


Figura 10. Glucosa en sueromaterno de ratas preñadas, de los grupos control (GC), Control diabético (DM*),diabéticas con tratamiento de 100mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200*), control con tratamiento de 100 mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200 mg/kg (ST+200). P< 0.05 con respecto al grupo control (*).

Con respecto a la concentración de colesterol en suero sanguíneo de ratas preñadas, como se observa en la figura 10, el Grupo Diabético mostró niveles más altos en comparación a los demás tratamientos, el grupo con tratamiento en dosis de 100mg/kg redujo los niveles de colesterol manteniéndolos en rangos normales, mientras que la dosis de 200mg/kg los elevó aún más que al Grupo Diabético, por otro lado los grupos a los que solo se le administró tratamiento mostraron niveles normales de colesterol en ratas, aunque nuevamente el grupo de 200 mg/kg tuvo concentraciones más elevadas. Por lo cual se podría indicar que el tratamiento de 100 mg/kg de extracto etanólico de *S.humilises* el que mostró mejores resultados ya que pudo disminuir los niveles de colesterol, ya que los conserva dentro de un rango normal. Cabe resaltar, que en el análisis estadístico si se mostró diferencias significativas en los datos obtenidos.

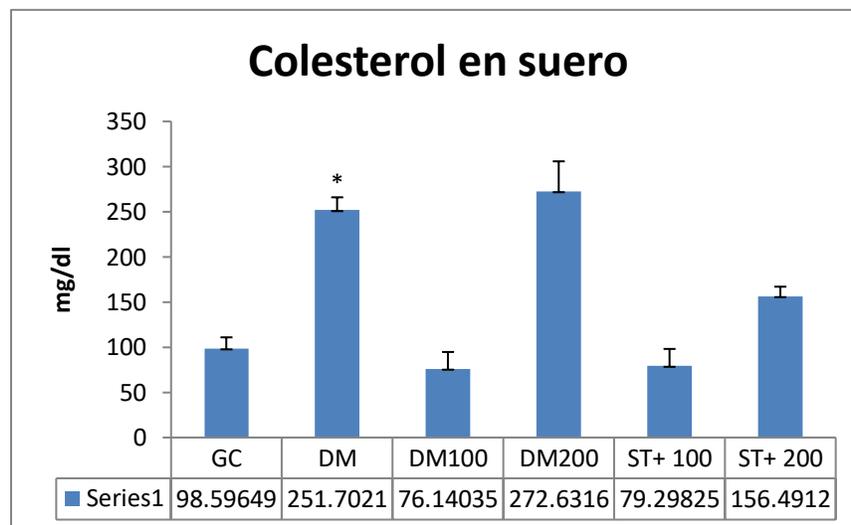


Figura 11. Colesterol en suero materno de ratas gestantes, de los grupos control (GC), Control diabético (DM), diabéticas con tratamiento de 100mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200*), control con

tratamiento de 100 mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200 mg/kg (ST+200). * $P \pm 0.05$ con respecto al grupo control.

Por otro lado, los niveles de triglicéridos del grupo diabético también son mayores en comparación con los demás grupos, como se puede observar en la figura 12, mientras que los grupos diabéticos con tratamiento de 100 y 200 redujeron los niveles, cabe resaltar, que los grupos DM, DM+200 y ST+200 muestran niveles altos, esto podría deberse a la dosis de 200 mg/kg del extracto ya que las dosis de 100 mg/kg tanto el grupo DM+100 como el ST+100 presentaron buenos resultados, manteniendo los rangos en un estatus óptimo aunque aun así ligeramente más altos que el grupo control. Por lo cual se podría indicar que nuevamente el tratamiento de 100 mg/kg de extracto etanólico de *S.humilis* obtuvo mejores resultados debido a que disminuyó los niveles de triglicéridos en suero sanguíneo manteniéndolos en un estatus normal. Cabe resaltar que estadísticamente los resultados mostraron una diferencia significativa entre ellos.

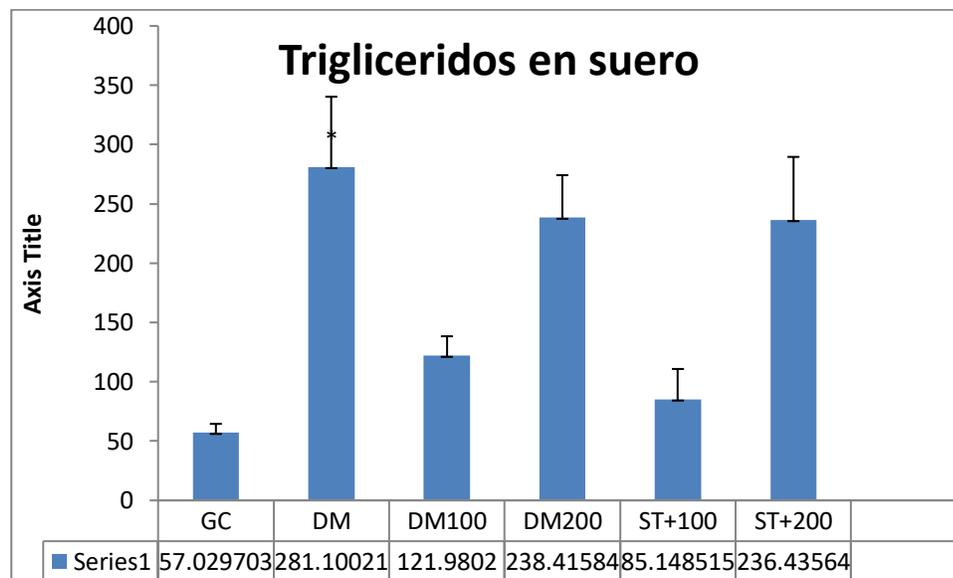


Figura 12. Triglicéridos en suero materno de ratas preñadas, de los grupos control (GC), Control diabético (DM), diabéticas con tratamiento de 100mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200*), control con tratamiento de 100 mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200 mg/kg (ST+200). * $P \pm 0.05$ con respecto al grupo control (*).

Determinación morfológica e histológica del efecto del extracto de *S.humilis*

Para el estudio morfológico se realizaron los cortes morfológicos, como se describieron anteriormente. En la figura 13 se muestran los cortes de paladar de los diferentes grupos. En los cortes del grupo control se puede observar el paladar intacto, en buenas condiciones, sin embargo, en los demás grupos igualmente se observan paladares sin afecciones aparentes.

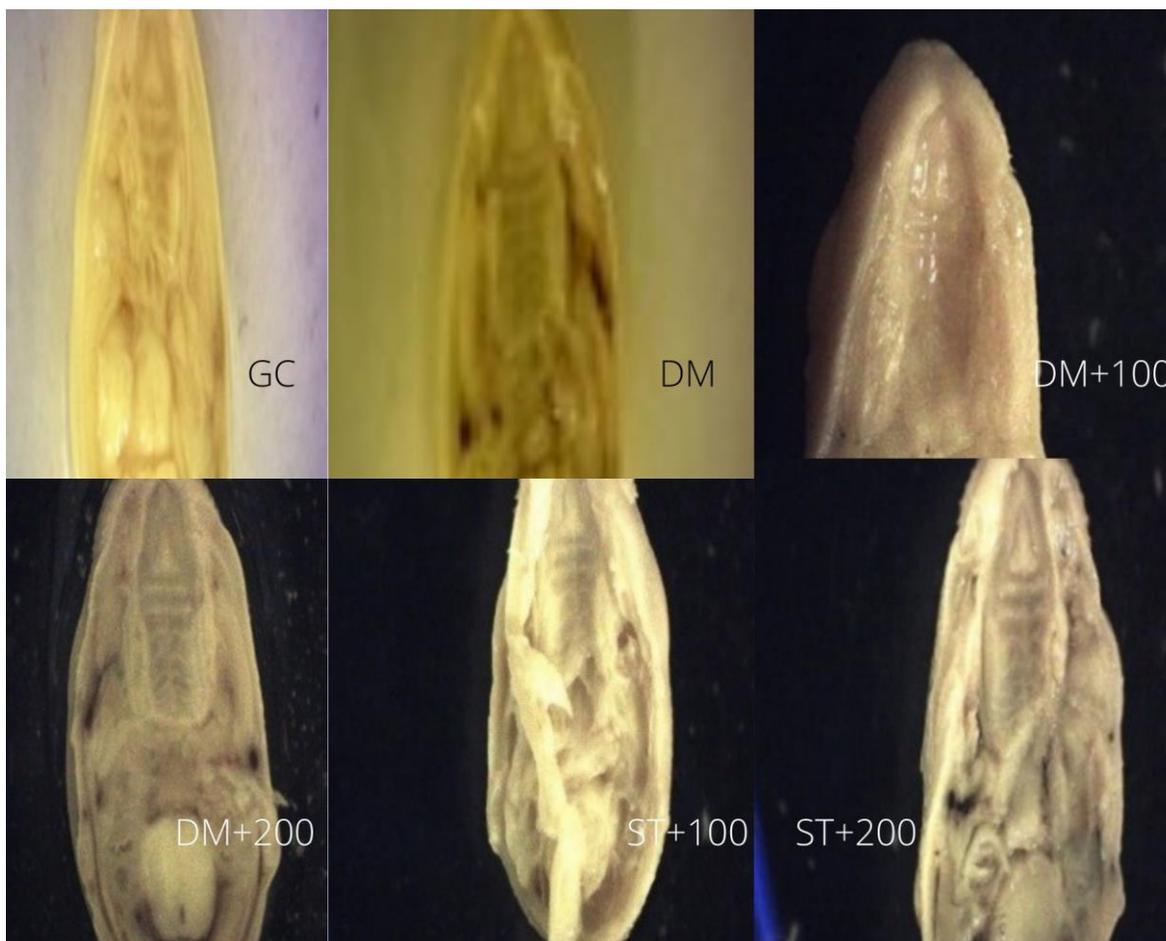


Figura 13. Daño morfológico en paladar entre los diferentes grupos, grupo control (GC), grupo control diabetico (DM), diabéticas con tratamiento de 100 mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200), control con tratamiento de 100mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200 mg/kg (ST+200).

En la figura 14 se muestran los cortes morfológicos de la zona de los ojos, donde se puede observar que el grupo control no tiene daños aparentes, mientras que el grupo DM se observan daños en esta zona, sin embargo, en los grupos DM+100, DM+200, ST+100 y ST+200 al igual que el grupo control no presentan daños, por lo cual podríamos indicar que el extracto en ambas dosis ayudo a prevenir los daños causados en los ojos por la diabetes.

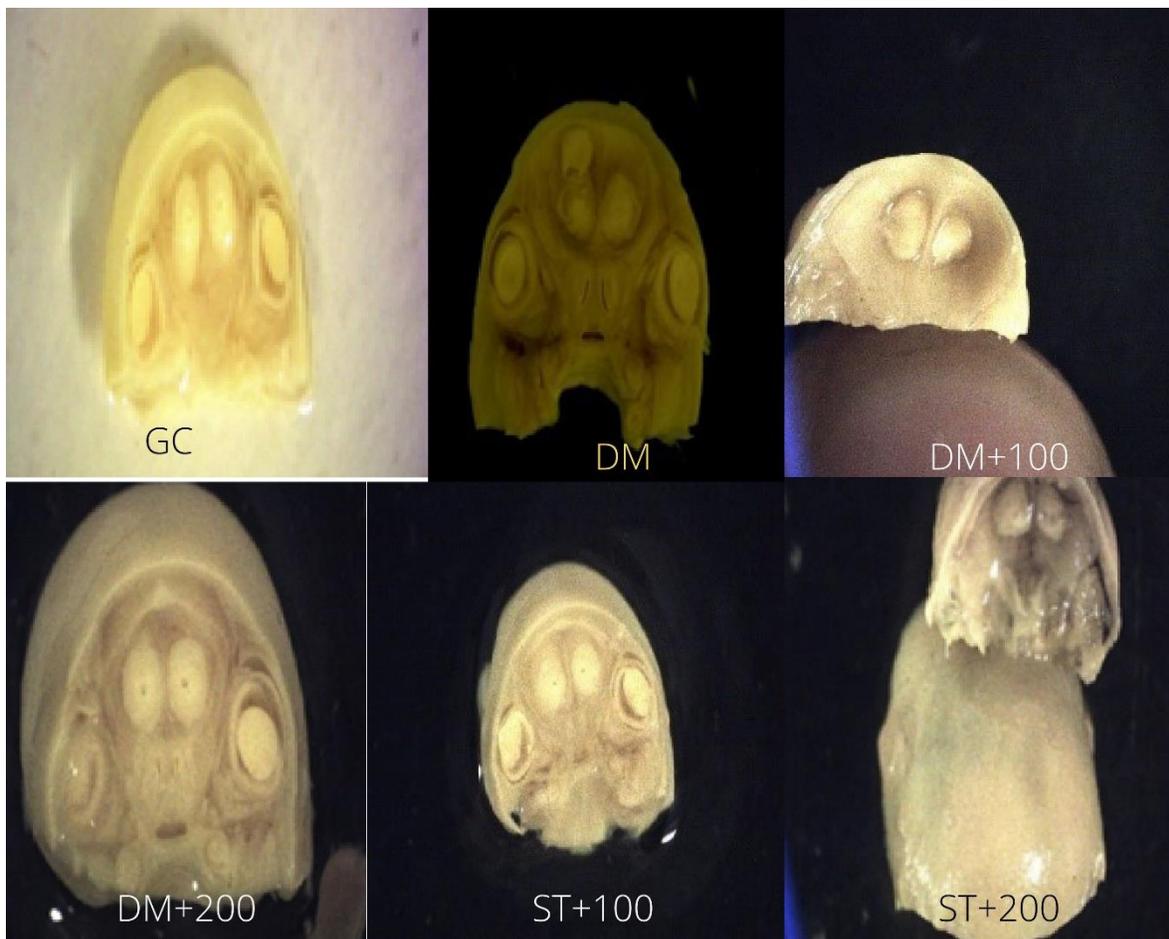


Figura 14. Daño morfológico en ojos entre los diferentes grupos, grupo control (GC), grupo control diabetico (DM), diabéticas con tratamiento de 100 mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200), control con tratamiento de 100mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200 mg/ kg (ST+200).

En la figura 15 se puede observar los cortes de la zona del corazón y pulmones, donde se muestra que el grupo control mostro corazón y pulmones en buen estado, sin daños aparentes, mientras que en el grupo DM se observan daños tanto en la zona del corazón como en los pulmones, por otro lado, los grupos DM+100 y DM+200 se observan sin daños aparentes, mientras que los grupos ST+100 y ST+200 se observan ligeros daños en la zona, esto puede deberse a algún defecto durante la gestación.

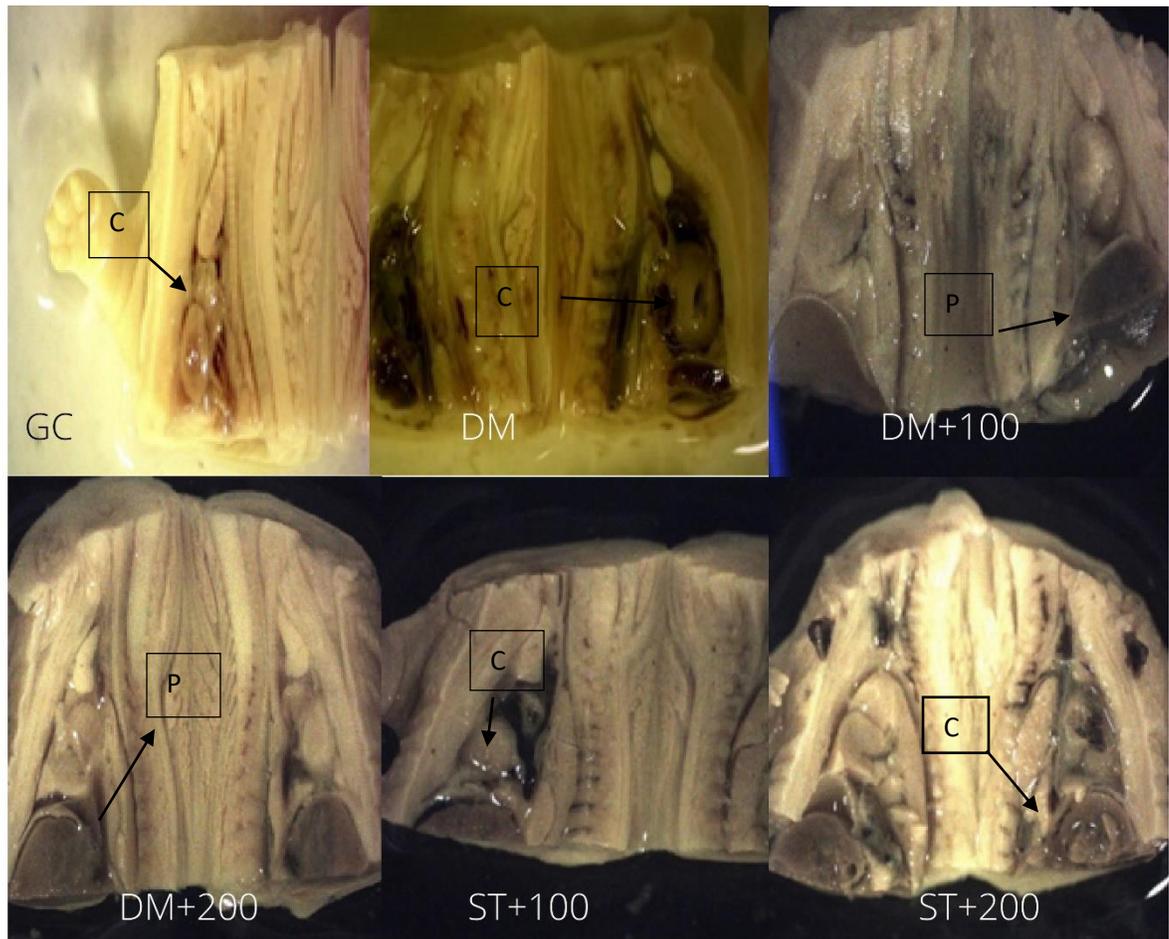


Figura 15. Daño morfológico, señalando corazón y pulmones (C y P) entre los diferentes grupos, grupo control (GC), grupo control diabetico (DM), diabéticas con tratamiento de 100 mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200), control con tratamiento de 100mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200 mg/ kg (ST+200).

Finalmente, en la figura 16 se pueden observar los cortes de hígado, donde se muestra que los grupos control, DM+100, DM+200, ST+100 y ST+200 muestran hígados aparentemente sanos y sin daños aparentes, a diferencia del grupo DM donde se muestran daños causados en el hígado, probable grado de esteatosis (daños causados por hígado graso), mostrando una posible protección del extracto en ambas dosis ante los daños causados por la diabetes. El porcentaje de malformaciones encontrado para los fetos es del 0.58%.

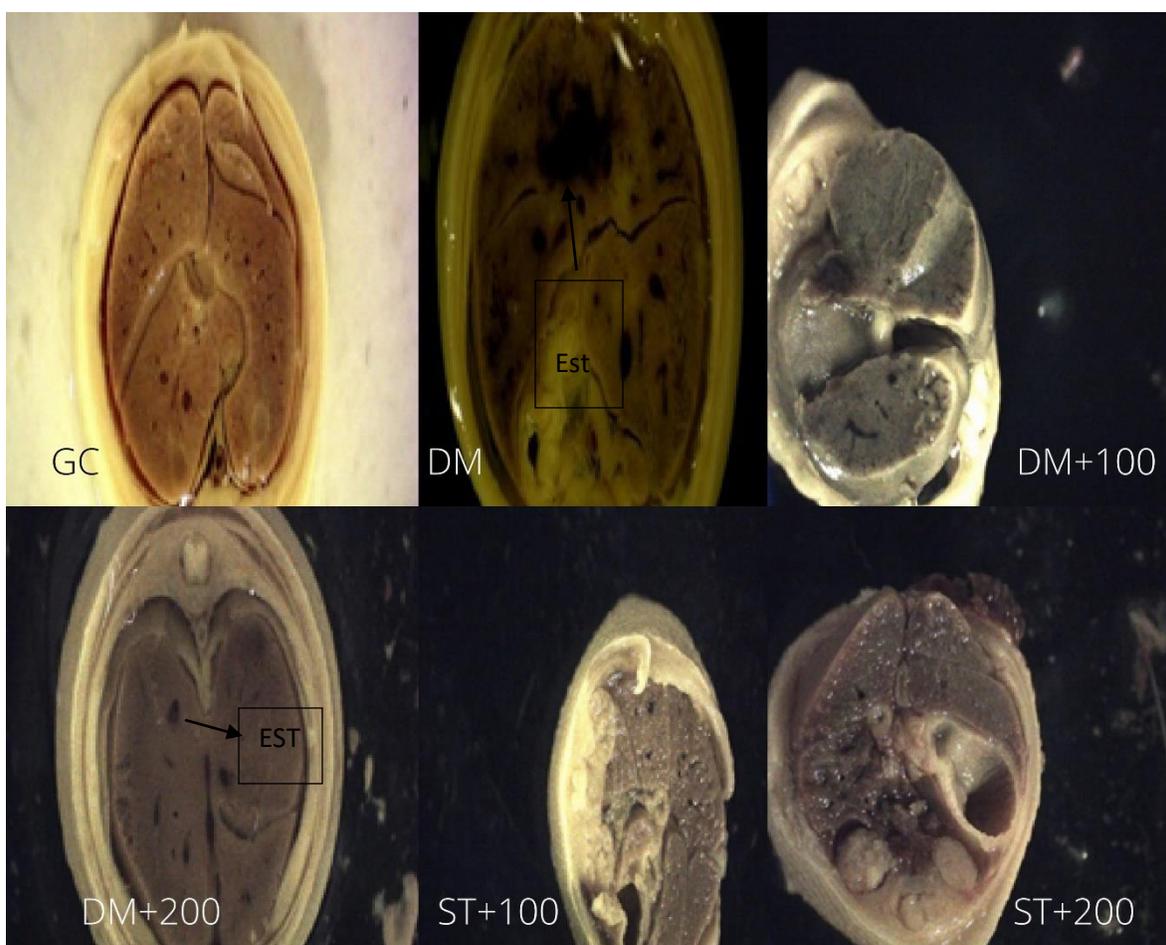


Figura 16. Daño morfológico en hígado entre los diferentes grupos, grupo control (GC), grupo control diabetico (DM), diabéticas con tratamiento de 100 mg/kg (DM+100), diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200), control con tratamiento de 100mg/kg (ST+100) y control con tratamiento de 200 mg/ kg (ST+200).Se señalan los daños causados por probable hígado graso (EST).Análisis

realizado por la técnica de Wilson modificada por Barrow y Taylor (1969), con un porcentaje de malformaciones en fetos del 0.58%.

Posteriormente, se realizaron las preparaciones de los cortes histológicos de corazón, cerebro e hígado de cada grupo. En la figura 16 se observan las imágenes obtenidas de las laminillas ya teñidas. En los cortes de grupos control de cerebro se puede observar, que tanto el grupo control, como a los grupos a los que sólo se les administró tratamiento, presentan condiciones normales, se observan neuronas y células de la glía de apariencia normal, en cambio los grupos con DM se observa menor número de neuronas y células de la glía, así como una mayor cantidad de edema provocado por la hiperglucemia, siendo más notorio en el grupo diabético sin tratamiento.

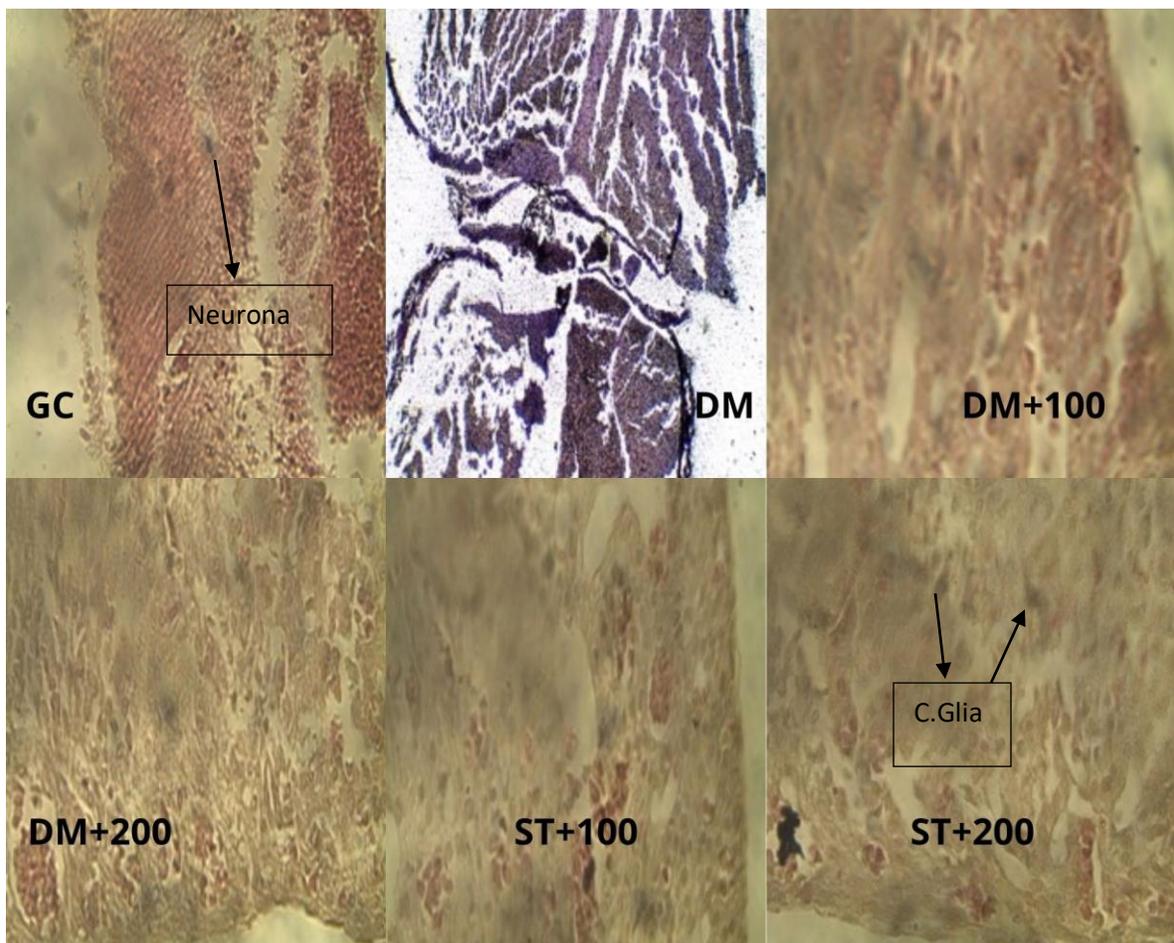


Figura 17. Cortes histológicos de cerebro de fetos de rata teñidos mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina, del grupo control (GC), se muestran neuronas y células de la glía de apariencia normal así como tejido conectivo, todo en apariencia normal. Control diabético (DM), donde se muestra disminución de células de la glía (C.Glia) y axones así como presencia de edema. Diabéticas con tratamiento de 100 mg/kg (DM+100), muestran menor número de axones y células de la glia pese a tratamiento. Diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200), presenta al igual que el otro grupo un menor número de neuronas y células de la glía pese a tratamiento. Control con tratamiento de 100 mg/kg (ST+100), se observan neuronas y células de la glía en apariencia normal. Control con tratamiento de 200 mg/kg (ST+200), se observa tejido conectivo, células de la glía y neuronas (Neuronas) de apariencia normal.

En los cortes de la figura 18, se puede observar que en el grupo control de corazón, parte del miocardio presenta una apariencia normal, células con sus núcleos y tejido muscular, todo de apariencia normal, al igual que a los grupos que se trataron únicamente con el tratamiento de *S.humilis* en dosis de 100 y 200 mg/kg, en cambio en los grupos con DM se observa lo que podría ser depósitos de lípidos y colesterol en todos los grupos aunque hayan sido tratados con el extracto de *S.humilis*, lo que más adelante hubiera desencadenado ciertas cardiopatías asociadas con la diabetes, como miocardiopatías, hipertensión arterial y problemas en el nacimiento, cabe resaltar que en el grupo diabético con dosis de 100 mg/kg son menos evidentes.

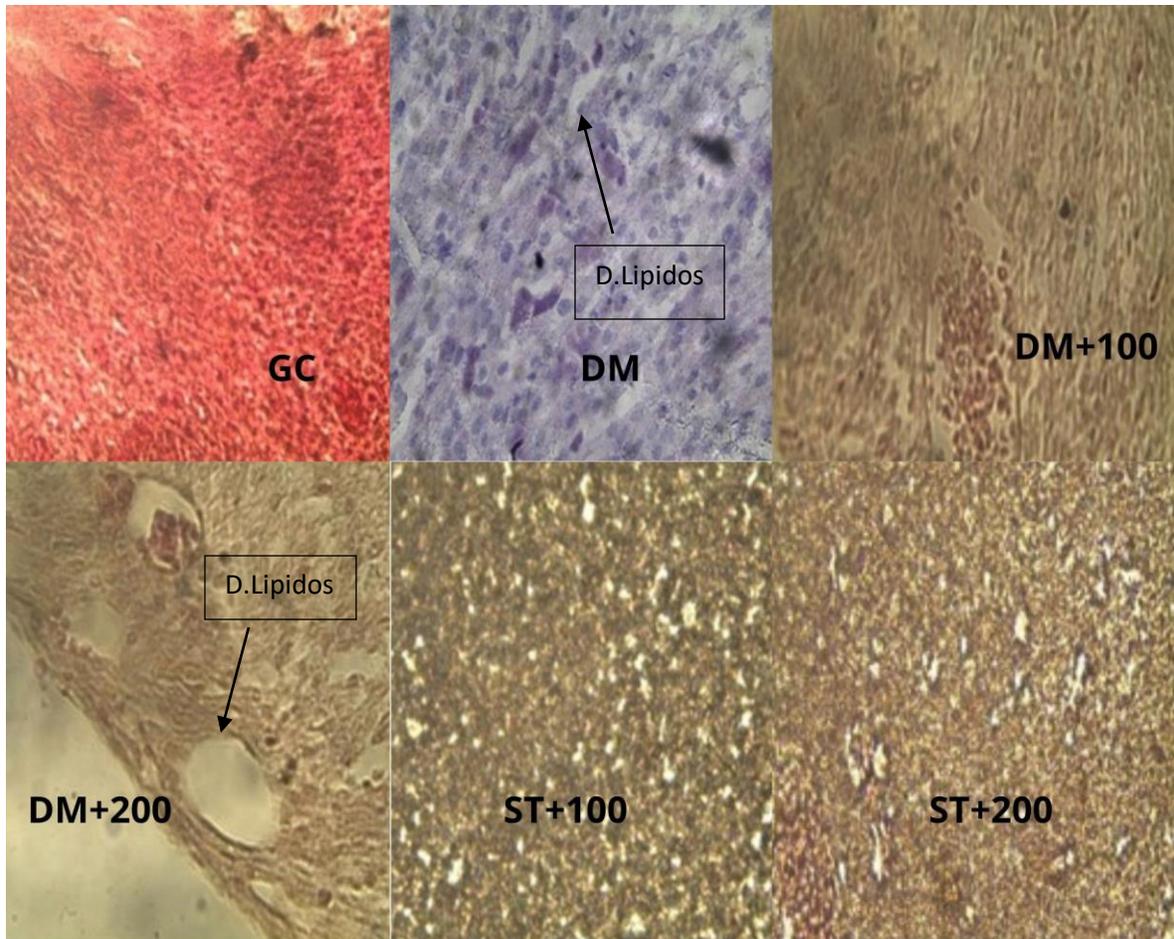


Figura18. Cortes histológicos de corazón de fetos de rata teñidos mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina del grupo control (GC), donde se muestra parte del miocardio, además de células y parte del tejido muscular, todo de apariencia normal. Control diabético (DM), donde se muestra parte del miocardio con depósitos de lípidos y colesterol(D.lipidos). Diabéticas con tratamiento de 100 mg/kg (DM+100), igualmente muestran depósitos de lípidos y colesterol pese al tratamiento. Diabéticas con tratamiento de 200 mg/kg (DM+200), nuevamente muestran depósitos de lípidos y colesterol pese al tratamiento. Control con tratamiento de 100 mg/kg (ST+100), muestra parte del miocardio con tejido muscular y células de apariencia normal. Control con tratamiento de 200 mg/kg (ST+200), muestra parte del miocardio y tejido muscular, todo con apariencia normal.

En la figura 19 se observan los cortes de hígado, tanto el grupo control, como a los que sólo se les administró el tratamiento presentan condiciones normales, se observan hepatocitos nucleados y teñidos, todo en apariencia normal, por otra parte los grupos de

DM y DM más extracto de 100 y 200 mg/kg se podría indicar tejido graso, esto debido a una probable esteatosis, lo que podría desencadenar en un futuro un funcionamiento inadecuado del hígado, pudiendo provocar hígado graso o cáncer de hígado, cabe resaltar que al igual que con los otros órganos en el grupo de DM+100 mg/kg el posible daño es menor en comparación con el grupo de DM+200 mg/kg.

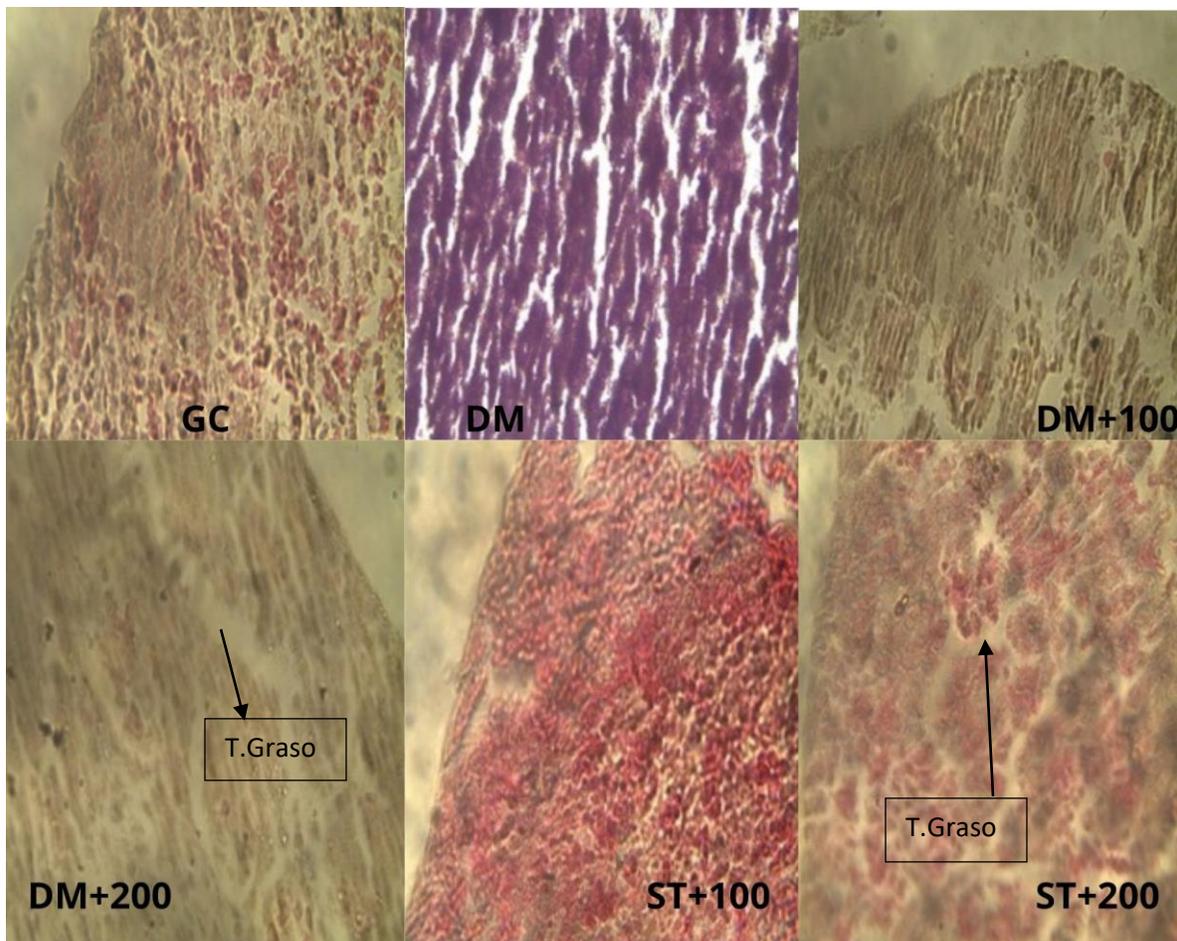


Figura 19. Cortes histológicos de hígado de fetos de rata teñidos mediante la técnica de Hematoxilina y Eosina del grupo control (GC), donde se muestran células y tejido de apariencia normal. Control diabético (DM), donde se muestra parte del hígado con tejido graso(T.Graso), común en pacientes diabéticos. Diabéticas con tratamiento de 100 mg/kg (DM+100), igualmente muestra parte del hígado con tejido graso pese al tratamiento. Diabéticas con

tratamiento de 200 mg/kg (DM+200), nuevamente muestran tejido graso pese al tratamiento. Control con tratamiento de 100 mg/kg (ST+100), muestra parte las células y el tejido de apariencia normal. Control con tratamiento de 200 mg/kg (ST+200), muestra parte del tejido y células de apariencia normal.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La semilla de *S.humilis* se ha usado durante años como remedio natural contra la diabetes por su efecto hipoglucemiante, esto debido a su composición fitoquímica, ya que mediante su análisis se demostró presencia de saponinas, triterpenos y flavonoides, como lo menciona Lobato en 2016. Debido a la presencia de Flavonoides en la semilla se pudo atribuir un efecto antioxidante, ya que es una de las características de este compuesto. Según lo reportado por autores como Lobato en 2016 y Flores y cols. en 2017, los cuales midieron el efecto antioxidante mediante el método de DPPH, y demostraron que la semilla de *S.humilis* presenta actividad antioxidante, aunque ésta es baja.

Al igual que en los humanos, la diabetes materna afecta al desarrollo de los fetos de rata, ya que produce un aumento en la frecuencia de reabsorciones, disminución del número de crías por camada, disminución en su peso y talla y aumento en la frecuencia de malformaciones congénitas (Palomino y cols., 1998). De manera similar, en nuestro trabajo, las ratas diabéticas presentaron las mismas características, en comparación con las ratas a las que se les administro el tratamiento, ya que se observaron cifras en cuanto a talla y peso más cercanas a las del grupo control, e incluso los grupos a los que solo se les administro tratamiento en dosis de 100 y 200 tuvieron un peso mayor a los del grupo control. Este aumento de peso concuerda con lo publicado por Reynoso-Orozco y cols. (2017), en el cual menciona también un aumento de peso en sus ratas, que podría deberse al alto contenido de proteínas lípidos carbohidratos y minerales que contiene la semilla de *S.humilis*. Cabe resaltar, que únicamente en el peso hubo una diferencia estadística de los datos.

En cuanto a la morfología de los fetos obtenidos, se pudo observar un posible efecto protector ya que los grupos a los que se les administró el tratamiento ninguno presentó malformaciones, ni cambios en su morfología, concordando con el efecto protector que presenta Lobato en 2016, sólo los fetos del grupo diabético presentaron malformaciones como hidramnios, exencefalia y protrusión de lengua, todas estas anomalías están asociadas a la diabetes como lo describe Clapés (2000). Los hijos de madres diabéticas no sólo son afectados en apariencia, sino también morfológicamente, ya que en base al estudio morfológico realizado en cortes de paladar, corazón, pulmones e hígado sólo se encontraron daños igualmente en el grupo diabético presentando cierto grado de esteatosis, lo que

concuera también con las complicaciones en el hígado que se producen mayormente en pacientes con diabetes tal como lo publican Ramos-Molina y cols.(2017), que mencionan que cerca del 30 al 40% de pacientes con diabetes desarrollan hígado graso. Al contrario de lo observado en los demás grupos donde todos los órganos lucen con una apariencia normal. En cuanto al estudio histológico, se observaron cambios a nivel estructural en los grupos, ya que tanto el grupo control, como los grupos a los que sólo se le administraron las dosis de 100 y 200 mg/kg de extracto se observaron estructuras normales en comparación con los grupos diabéticos, ya que tanto en corazón, como en hígado se observaron depósitos de lípidos y colesterol tanto en hígado, como en corazón lo cual podría desencadenar en un futuro complicaciones en ambos órganos, todas asociadas a la diabetes. Como mencionan Polancoy cols. (2005), los hijos de madres diabéticas tienen mayor tendencia a desarrollar problemas, algunas enfermedades metabólicas del adulto, como la diabetes, pueden tener origen fetal. La hiperplasia de las células β e hiperinsulinismo que se observa en los fetos de madres diabéticas inducen cambios irreversibles en el páncreas, lo que ocasiona intolerancia a la glucosa, obesidad, e incluso diabetes tipo 2.

Con respecto a las muestras de suero sanguíneo de las madres, se evaluaron los niveles de glucosa, triglicéridos y colesterol. Los niveles de glucosa de los grupos con tratamiento de 100 y 200 mg/kg disminuyeron en comparación con los grupos diabéticos, lo cual demostraría un efecto hipoglucemiante del extracto. La semilla de *S.humilis* se ha usado durante años como remedio contra la diabetes, esto debido a su contenido de metabolitos secundarios como los flavonoides, lo cual se explica por la habilidad de interactuar con los radicales libres y acoplarse a ellos, como lo menciona Lobato en 2016 en su estudio, aunque actualmente no se sabe si son los flavonoides o una interacción con otros metabolitos secundarios los responsables de dicho efecto. Comparando con lo realizado en otros trabajos como el de Lobato en 2016, su extracto presentó también un efecto hipoglucemiante, aunque cabe resaltar, que las concentraciones usadas en su trabajo fueron mayores, por otro lado lo publicado por Reynoso-Orozco y cols. (2017), fue contrario ya que el indica que el extracto de *S.humilis* no tiene ningún efecto hipoglucemiante, el efecto hipoglucemiante aún se encuentra en discusión por lo cual sería importante seguir con investigaciones con respecto a este efecto. La concentración del extracto que mostro mayor efectividad fue el de 100 mg/kg.

En cuanto a los niveles de triglicéridos nuevamente el extracto de 100 mg/kg fue el más efectivo, pues causó disminución de los niveles de triglicéridos en las ratas diabéticas en tratamiento a niveles normales, al igual que lo presentado por Lobato en 2016, donde también presento este efecto. Con respecto a los niveles de colesterol igualmente bajaron los grupos a los que se les administró tratamiento a niveles normales. Igualmente, la dosis de 100 mg/kg fue la que presentó mejores resultados. La dislipidemia es la elevación anormal de concentración de grasas en la sangre (colesterol, triglicéridos, colesterol HDL y LDL), este trastorno es un padecimiento común en pacientes diabéticos. En caso de mal control metabólico, los pacientes con DM1 pueden presentar incremento en triglicéridos plasmáticos, debido al aumento en la producción de lipoproteína de muy baja densidad (verylow-densitylipoprotein-VLDL), promovida por la mayor concentración de ácidos grasos libres circulantes, secundario a la deficiencia relativa de insulina. Estos pacientes también presentan niveles de colesterol de la lipoproteína de baja densidad (low-densitylipoprotein-cLDL) elevados comparados con individuos no diabéticos y con pacientes con DM1 con buen control metabólico, sobre todo las mujeres (Pollak y cols.2007). Como lo menciona Villalta (2017) los pacientes con niveles altos de triglicéridos y colesterol tienen mayor probabilidad de desarrollar afecciones cardiovasculares, cerebrales, vasculares, pancreatitis. En la actualidad, como menciona Pollak y cols. (2007) dos tercios de los pacientes portadores de DM fallecen por enfermedad coronaria, cerebrovasculares o por una complicación asociada a enfermedad vascular periférica.

Por estas razones, es importante para los pacientes diabéticos tener un adecuado control metabólico para así evitar más complicaciones. En el presente estudio se pudo observar que el extracto etanólico de *S.humilis* causo una ganancia de peso en fetos de madres diabéticas, así como un efecto protector ante las malformaciones provocadas por la diabetes mellitus, y se redujo el daño interno en los órganos de fetos de madres diabéticas, lo que como se mencionó antes, podría reducir los problemas que se desarrollarán en la etapa adulta, así como un mejor control de los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en las madres, pese a que el extracto presentó un poder antioxidante bajo tuvo un buen efecto en lo antes mencionado.

Por lo antes discutido se puede comentar que el extracto etanólico de *S.humilis* es una fuente viable de metabolitos secundarios de uso farmacológico. Aunque sería recomendable seguir con investigaciones para verificar, cómo actúa cada metabolito secundario presente en la semilla contra los efectos nocivos que el estado de diabetes provocado por STZ presenta en el desarrollo.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

En base a lo anterior podemos deducir que:

1. El extracto etanólico de *S.humilismetabolitos* tiene presencia de metabolitossecundarios, como alcaloides, saponinas, triterpenos y flavonoides.
2. El extracto etanólico de *S.humilis* en dosis de 100 o 200 mg/kg no es tóxico en embriones de rata.
3. El extracto etanólico de *S.humilis* en dosis de 100 mg/kg fue más efectivo ya que arrojó mejores promedios de peso y talla en el embrión.
4. El extracto etanólico de *S.humilis* revierte las malformaciones producidas por diabetes inducida con STZ en ratas gestantes.
5. El extracto etanólico de *S.humilis* disminuyó los daños internos provocados por diabetes inducida con STZ en los embriones
6. El extracto etanólico de *S.humilis* en concentración de 100 mg/kg disminuyó los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos

REFERENCIAS

American Diabetes Association. (2004). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 27 (suppl 1): s5-s10.

Angulo-Escalante, M.A.; Armenta-Reyes, E.; García-Estrada, R.S.; Carrillo-Fasio, J.A.; Salazar-Villa, E.; Valdéz-Torres, J.B. (2009). Extractos de la semilla *Swietenia humilis* Zucc. con actividad antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.; Fr.) Vuill. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27(2): 84-92.

Arias-Díaz, J.; Balibrea, J. (2007). Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutr. Hosp.* (2): 160-168.

Arizmendi, J.; Carmona, P.V.; Colmenares, A.; Gómez, H.T.; Palomo, T. (2012). Diabetes gestacional y complicaciones neonatales. *Rev. Fac. Med. Hosp Mil.* 20: 50-60.

Bequer, L.; Gómez, T.; Molina, J.L.; Artilles, D.; Bermúdez, R.; Clapés, S. (2015). Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Biomédica Rev. Inst. Nac. Salud.* 36: 42-46.

Barraza-Lloréns, M.; Guajardo-Barrón, V.; Picó, J.; García, R.; Hernández, C.; Mora, F.; Athié, J.; Crable, E.; Urtiz, A. (2015). Carga económica de la diabetes mellitus en México, 2013. Funsalud, México; disponible en: <https://funsalud.org.mx/wp-content/uploads/2019/11/Carga-Economica-Diabetes-en-Mexico-2013.pdf>.

Barba, C.J.M. (1997). Introducción al análisis de los productos naturales: Laboratorio de fitoquímica. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México. DF. 216 pp.

Barba, E.J.R. (2018). Diabetes: ¿epidemia o pandemia? *Rev. Latinoam. Patol. Clín.* 65(4): 211-221.

Barrow, M.; Taylor, W. (1969) A rapid method for detecting malformations in rat fetuses. *J. Morphol.* 127: 291-306.

Chong, T.R.G. (2011). Alimentos ricos en flavonoides y sus beneficios para la salud. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional de San Martín Tarapoto. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Tarapoto. Perú.

Contreras-Zúñiga, E.; Arango, L.G.; Zuluaga-Martínez, S.X.; Ocampo, V. (2008). Diabetes y embarazo. *Rev. Colomb. Ginecol. Obstet.* 59 (1): 38-45.

Clapés, H.S. (2000). Diabetes mellitus, estrés oxidativo y embarazo. *Rev. Cub. Invest. Bioméd.* 19 (1): 191-195.

Flores L.Z.Y.; Campos D.A.P.; Gutierrez G.Y.; Salas, O.E.; Cuéllar, C.A.; Delgado, R.L. (2017). Potencial antioxidante de la semilla de *Swietenia humilis* Zuccarini. *Rev. Cub. Farm.* 51: 1-8.

Fernández, R.T.; Clapés, H.S.; Suarez, R.G.; Casanueva, C.K.; Armas, C.D.I.; Tormo, M.C.; Sáez, G.T.; Egaña, M.E.; Rojo D.D. (2010). Marcadores de estrés oxidativo en embarazadas diabéticas. *Rev. Cub. Invest. Bioméd.* 29 (4): 417-427.

García G. D., García D.R. (2009). Avances en la patogénesis de la embriopatía diabética. *Rev. méd. Chile.* 137:1627-1635.

Hernández-Ávila M., Gutierrez J.P. & Reynoso-Noverón, N. (2012). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pú. Méx.* 55(Supl. 2):S129-S136.

Lobato T.J.G (2016). Evaluación de la actividad farmacológica de *Swietenia humilis* Zuccen un modelo de diabetes en ratón. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Industrial. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México. 51 pp.

López R.M.C, Avalos G.M.I. (2013). Diabetes mellitus hacia una perspectiva social. *Rev. Cub. Salud Pub.* 39: 331-345.

Mediavilla-Bravo. J. (2015). Guías clínicas: Diabetes mellitus. Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria. (1): 2-5, disponible en: https://2016.jornadasdiabetes.com/docs/Guia_Diabetes_Semergen.pdf

Martínez-Florez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J.M; Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *NutrHosp.* 17: 271-278.

Nazer H.J., Garcia H.M., Cifuentes. O.L. (2005). Malformaciones congénitas en hijos de madres con diabetes gestacional. *Rev. Méd. Chile.* 133: 547-554.

Ovalle, M.B. (2016). Estudios fitoquímicos y farmacológicos de *Swietenia humilis* Zucc (Meliaceae): Una fuente potencial de fitofármacos para el tratamiento de la Diabetes mellitus. Tesis para obtener el grado de Doctor, Programa de maestría y doctorado en ciencias químicas. Universidad Nacional Autónoma de México. 178 pp.

Pollak, F.; Arteaga, A.; Serrano, V. (2007). Dislipidemia y diabetes mellitus tipo 2. *Rev. ALAD*. 15: 17-21.

Polanco P.A.C., Revilla M.M.C., Palomino G.M.A., Islas A.S. (2005). Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecol. Obste. Méx.* 73 (10): 544-452.

Palomino, G.M.A.; Revilla, M.M.C.; Cardenas, S.A.; Polanco, P.A.C.; Islas, A.S.A. (1998). Efecto de la diabetes inducida sobre la reproducción y el desarrollo. *Rev Ginecol. Obstet. Méx.* 66 (10): 403-406.

Ramos-Molina, B.; Macias-Gonzalez, M.; Tinahones, F.J. (2017). Hígado graso no alcohólico y diabetes tipo 2: epidemiología, fenotipo y fisiopatología del paciente con diabetes e hígado graso no alcohólico. *Endocrinol. Diab. Nutr. Supl.* 1(2): 16-20.

Ramos, R.H.; Méndez, J.D. (1994). Diabetes mellitus experimental. *Ciencia Veterinaria*. 6: 347-363.

Reynoso-Orozco R.; Elizondo-García O.F. Bañuelos-Pineda, Ramos-Ibarra, M.L.; Noa-Pérez, M.; Jiménez-Plascencia, C.; Puebla-Pérez. (2017). Caracterización Físicoquímica y Fitoquímica de la Semilla de *Swietenia humilis* Zucc (caoba) y su Efecto Sobre la Concentración de Glucosa Sanguínea en el Modelo de Diabetes Inducida con Estreptozotocina en Ratas. *Majorensis*. 13: 1-10.

The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. (1997). Report of the expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 20, 1183-1197.

The Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. (2003). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 26(suppl 1): s5-s20.

Vázquez A.B.A. (2011). Estudio Etnobotánico de la flora medicinal utilizada en el control de la diabetes tipo 2 en la comunidad de Agua de Perro, Municipio de Acapulco de Juárez, Guerrero, México. Tesis para obtener el grado de Maestra en Biología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. Ciudad de México.

Villalta, D.; Briceño, Y.; Miranda, T.; Abbate, M.; Hernández, G.; Paolim N. (2017). Dislipidemia en Diabetes Mellitus Tipo 1: Características y factores de riesgo asociados en

pacientes del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, Mérida, Venezuela.
Rev.Venez.Endocrinol.Metab. 15: 6-10.