



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA *Spirulina maxima* SOBRE DIABETES
EXPERIMENTAL**

TESIS

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

PRESENTA

OSCAR IVAN LUQUEÑO BOCARDO

MÉXICO, D.F.

2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Jesús Montiel Aguirre

VOCAL: Profesor: QFB. Ma. del Socorro Cecilia Reyna Rodríguez

SECRETARIO: Profesor: Dra. Patricia Victoria Torres Durán

1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Profesor: QFB. Luz María del Rocío Valdés Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 10 DEL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

ASESORA DEL TEMA: DRA. PATRICIA V. TORRES DURÁN

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

SUSTENTANTE: OSCAR IVAN LUQUEÑO BOCARDO

AGRADECIMIENTOS

PAPIIT218107 que sin su apoyo no se podría realizar este trabajo.

**Corporación Universitaria para el desarrollo de Internet,
A.C. (CUDI)**

A la Facultad de Química de la UNAM, en nombre de sus profesores y trabajadores, por permitirme pertenecer a esta excelente institución. También les agradezco por formarme tanto en el ramo académico como en la vida y la forma de ver al mundo con otros visión, una visión más analítica y crítica.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su apoyo y guía incondicional desde muy el principio de mi vida, y por lo que falta.

A mis hermanos (Martha, Alejandro y José Luis), por su apoyo, sobretodo en estos últimos años, y por sus criticas “constructivas”, que han servido para formar mi carácter y visión al mundo.

A la Dra. Patricia V. Torres, por permitirme trabajar bajo su tutela, y por sus enseñanzas en el trabajo experimental y en la vida.

Al Dr. Marco A. Juárez, por permitir mi estancia en este gran laboratorio que dirige.

A mis amigos en el laboratorio, Jesús M. Sámano, Johny, José Luis, David, Olivia, Jaky y Angélica, por que he aprendido de ustedes, y disfrutado su compañía en el Laboratorio 10, del Depto. De Bioquímica de la Facultad de Medicina.

También agradezco al grupo 1101, en especial a Joselyn, Mara, Omaha, Alfredo, Angélica, Lulú, Grecia, Antonioni, Palomeque, Karina, Alma, Nancy y al resto del grupo que por falta de espacio no podre mencionar, por que me permitieron tratar de transmitirles las clases de bioquímica. Les deseo buena suerte en el camino largo, duro e inclusive peligroso que decidieron emprender, la carrera de medicina.

A mis amigos de secundaria (Miguel, Ruben y Miguel), que me han acompañado desde ya más de 12 años.

A mis amigos Betty Solís, Aurora Márquez, Fabiola V, Ivan Aguilar, por su apoyo y compañía durante la preparatoria y aún después de ella.

Mis amigos de la facultad:

Nancy Montserrat, Roxana Hermoso, Alma Hernandez, Erika Hernandez, que tuve la fortuna de conocer durante la carrera. En especial a Nadia Vera, que me apoyo y también me regañó, me permitieron seguir adelante y llegar a donde estoy. Agradezco en gran medida a Alejandra L., que por su apoyo consejos y cariño me han conducido, y guiado inclusive en la oscuridad.

A los del búho: Víctor H, Karla A, Rodrigo J, Luis G, Nancy O, Erik H, Helena, Leslie, Mar S, Luis S, Oscar M, José C. P, Adriana M, Abraham S, Daniela G Alfaro. Que estuvieron y han están cerca desde el principio de la carrera en nuestra gloriosa facultad. Además por su apoyo y compañía durante las clases, las clases saltadas y las horas libres. Ya no los veo tanto pero los recuerdo muy a menudo.

A mis amigos Lorena, Fernando y Oscar, que agradezco a Dios y a las estrellas por conocerlos, pues, siempre han me ayudaron, aconsejaron y sobretodo mal aconsejado, en los buenos y malos momentos. Gracias por todos esos momentos de risas y carcajadas, que me han provocado, han alegrado mi vida y dado mi vida otro sentido.

Estoy decidido a no seguir aferrado tercamente a mis ideas, sino a abandonarlas tan pronto como encuentre razones plausibles para hacerlo así. Esto es tanto más cierto cuando que no tengo otro propósito que poner la verdad delante de mis ojos en la medida que mis fuerzas me lo permitan, y emplear el poco talento que me ha sido concedido en apartar al mundo de sus viejas supersticiones paganas, guiándolo por el sendero de la verdad y haciéndolo perseverar en ella.

Antoni van Leeuwenhoek

Muestra visión está limitada por lo que sabemos: pero sobretodo por nosotros mismos...

Hacia atrás no conduce a ninguna senda. Herman Hesse.

	INDICE
ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	6
3. HIPÓTESIS	7
4. ANTECEDENTES	8
4.1. Diabetes mellitus	8
4.1.1. Definición	8
4.1.2. Epidemiología. La diabetes en México	8
4.1.3. Clasificación	9
4.1.3.1. Diabetes Tipo 1	9
4.1.3.2. Diabetes Tipo 2	9
4.1.3.3. Otros tipos específicos	9
4.1.3.4. Diabetes gestacional	9
4.1.4. Factores de riesgo	9
4.1.4.1. Sobrepeso y obesidad	10
4.1.4.2. Herencia	10
4.1.4.3. Dieta	10
4.1.4.4. Estrés mental	11
4.1.4.5. Sedentarismo	11
4.1.5. Síntomas	11
4.1.6. Diagnóstico	12
4.1.7. Complicaciones	13
Enfermedad de los vasos sanguíneos de mediano y gran calibre	14
4.1.8. Tratamiento	16
4.1.8.1. Dieta	16
4.1.8.2. Ejercicio	16
4.1.8.3. Fármacos	17
4.2. Modelos animales de diabetes	17
4.2.1. Diabetes mellitus tipo 2 espontánea	18

4.2.2. Diabetes mellitus tipo 2 inducida	18
4.2.2.1. Modelos de DMT2 inducida quirúrgicamente	18
4.2.2.2. Modelos de DMT2 inducida químicamente	18
4.2.2.2.1. Estreptozotocina	19
4.2.2.2.1.1. Historia	19
4.2.2.2.1.2. Mecanismo de acción	20
4.2.2.2.1.3. Usos	21
4.3. Estrés oxidativo, radicales libres y diabetes mellitus	21
4.3.1. Introducción al metabolismo aerobio	21
4.3.2. Estrés oxidativo (EOx)	21
4.3.3. Los Radicales Libres	21
4.3.3.1. Fuentes de radicales libres	22
4.3.3.1.1. Fuentes exógenas	22
4.3.3.1.2. Fuentes endógenas	23
4.3.3.2. Clasificación de radicales libres	23
4.3.3.2.1. Especies de oxígeno reactivas (EORs)	24
4.3.3.2.2. Especies de nitrógeno (ENRs)	24
4.3.4. Daño biomoléculas como consecuencia del estrés oxidativo	24
4.3.4.1. Daño oxidativo a las proteínas	25
4.3.4.2. Daño oxidativo a los lípidos	25
4.3.4.3. Daño oxidativo a los carbohidratos	26
4.3.4.4. Daño oxidativo al ADN	26
4.3.5. Antioxidantes	26
4.3.5.1. Los antioxidantes fisiológicos más importantes	27
4.3.6. Estrés oxidativo y Diabetes mellitus	30
4.3.6.1. Generalidades	30
4.3.6.2. Fuentes de producción de radicales libres en la Diabetes	31
4.3.6.3. Reacciones consecuentes de la hiperglucemia	31
4.4. <i>Spirulina</i>	33
4.4.1. Generalidades	33

4.4.2. Historia	34
4.4.2.1. La <i>Spirulina</i> en el México antiguo	34
4.4.2.2. El comienzo de la investigación científica sobre la <i>Spirulina</i>	35
4.4.2.3. La producción de <i>Spirulina</i> en México. El caracol	36
4.4.3. Morfología	37
4.4.4. Distribución	38
4.4.5. Capacidad nutritiva	39
4.4.5.1. Proteínas	39
4.4.5.2. Lípidos	40
4.4.5.3. Carbohidratos	40
4.4.5.4. Pigmentos	40
4.4.5.5. Minerales y vitaminas	41
4.4.6. Usos	41
4.4.7. Toxicología	42
5. METODOLOGÍA	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7. CONCLUSIONES	73
8. ANEXOS	74
9. REFERENCIAS	82

INDICE DE TABLAS

4.1	Complicaciones de la DM	13
4.2	Principales especies de oxígeno reactivas	24
4.3	Clasificación de los AOX de acuerdo a su mecanismo de acción	27
4.4	Posibles mecanismos por los cuales la hiperglucemia puede generar la producción de RL y la peroxidación de lípidos	31
5.1	Etiquetas correspondientes a los tipos de dieta y al tratamiento	46
7.1	Efecto de <i>S. maxima</i> en suero	55
7.2	Efecto de la Sp sobre la concentración de lípidos plasmáticos	59
7.3	Efecto de la dieta con <i>S. maxima</i> sobre lipoperoxidación en plasma	65
7.4	Perfil de lípidos en hígado	65
7.5	Efecto antioxidante de <i>Spirulina</i> en hígado	67
7.6	Concentración de proteínas en hígado	71

INDICE DE FIGURAS

4.1	Estructura química de la estreptozotocina	19
4.2	Agentes exógenos que generan radicales libres	23
4.3	Estructura química del glutatión	29
4.4	Fragmento del códice Florentino	35
4.5	El caracol. En el Lago de Texcoco	37
4.6	Morfología de la <i>Spirulina platensis</i>	38
7.1	Efecto de la Sp en la glucemia de ratas diabéticas	54
7.2	Efecto de la Sp sobre la concentración de lípidos plasmáticos	57
7.3	Cuantificación de la actividad de ALT en suero. Cuantificación de la actividad de catalasa en suero	60
7.4	Efecto de la Sp sobre los niveles de SOD y la concentración de TBARS en suero	63
7.5	Cantidad de lípidos totales en hígado. Concentración de TAG en hígado	66
7.6	Concentración de CT en hígado	67
7.7	. Efecto de la Sp sobre la actividad enzimática de catalasa y SOD en hígado	68
7.8	Concentración de TBARS en hígado	70
7.9	Concentración de proteínas en hígado	71

ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGE	Productos finales de glicación avanzada (Advanced Glycation Endproducts, por sus siglas en inglés)
ALT	Alaninaaminotransferasa
AMPc	Adenoxina 5'-monofosfato cíclico
AOx	Antioxidantes
CAT	Catalasa
C-HDL	Colesterol de Lipoproteínas de alta densidad (HDL)
C-LDL	Colesterol de Lipoproteínas de baja densidad (LDL)
CT	Colesterol total
C-VLDL	Colesterol de Lipoproteínas de muy alta densidad (VLDL)
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
ENRs	Especies de nitrógeno reactivas
EORs	Especies de oxígeno reactivas
EOx	Estrés oxidativo
FPAP γ	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (high density lipopeotein, por sus siglas en inglés)
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (low density lipopeotein, por sus siglas en inglés)
LT	Lípidos totales
NAD ⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADH	Forma reducida del NAD ⁺
OMS	Organización Mundial de la Salud
RL	Radicales libres
SOD	Superóxido dismutasa

Sp	<i>Spirulina maxima</i>
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilglicerol
TBARS	Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (Thiobarbituric acid reactive, por sus siglas en inglés)
VLDL	Lipoproteínas de muy alta densidad (very low density lipopeotein, por sus siglas en inglés)

1. Introducción

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia de diabetes en el año 2000 fue de 171, 000,000 cifra que se incrementará a 366, 000,000 de personas afectadas para el 2030 **(76)**. Se estima que el 9% de las muertes en el mundo son provocadas por diabetes **(4)**. Una de las principales preocupaciones asociadas con la diabetes es el desarrollo de las complicaciones micro- y macrovasculares, que contribuyen enormemente a la morbilidad y mortalidad relacionada con esta enfermedad. En México, la DM en el 2005 fue la causa de más de 67,000 defunciones, lo que representa el 13.6% de todas las muertes registradas por la SSA **(68)**. Los factores de riesgo asociados a la DM son: obesidad y sobrepeso, herencia, dieta, estrés mental y sedentarismo. Son 3 los pilares fundamentales para el tratamiento de la DM: la dieta, el ejercicio y el uso de fármacos (insulina y agentes hipoglucemiantes orales). Cada uno de estos componentes interacciona con los otros al grado de que no se puede modificar uno sin afectar a los otros dos. Debido a la compleja interacción entre los múltiples genes susceptibles y entre los factores genéticos y ambientales que intervienen en el desarrollo de la diabetes, el análisis de esta enfermedad es difícil, los modelos animales de diabetes son muy útiles y ofrecen múltiples ventajas en la investigación **(62)**. La inducción de la DM se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales incluyendo los agentes químicos, como la estreptozotocina (STZ) **(26, 56, 66)**.

Existen cada vez más pruebas de que el estrés oxidativo (EOx) tiene un influencia importante en las complicaciones de la DM **(44)**. La oxidación de carbohidratos puede dar lugar a la formación de moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas. La glucosa una vez oxidada por los RL producidos por los metales de transición, puede combinarse con los grupos carbonilo de las proteínas **(61)**.

Las células han desarrollado mecanismos por los cuales contrarrestar la acción nociva de las especies oxidantes, basado en un sistema complejo de defensas AOx. La tercera línea de defensa son las vitaminas AOx A, C y E. Estas vitaminas donan un átomo de hidrógeno (H•) a los radicales intermedios formados por la interacción de las especies de oxígeno reactivo (EOR) con las biomoléculas. Los radicales de vitamina C y E formados se estabilizan por resonancia; no propagan el daño por radicales y son recicladas **(11)**.

Existen varias vías para explicar la patogénesis de las complicaciones de la diabetes. Estas vías incluyen la glicación (no enzimática y autooxidativa), alteraciones de la vía del sorbitol, alteraciones de los sistemas AOx, daño tisular producido por procesos de isquemia reperusión, procesos inflamatorios y alteraciones del metabolismo **(11)**.

La medicina tradicional mexicana ha ofrecido una gran cantidad de “remedios”, para una gran cantidad de enfermedades, entre ellas la diabetes. Parece irónico que en estos tiempos con los avances tecnológicos y la revolución en el diseño de fármacos, la ciencia vuelva la mirada a la herbolaria y a los productos naturales. Uno de estos casos es la *Spirulina* (Sp), la cual ha sido usada desde hace muchos siglos como alimento por animales y algunas poblaciones **(17)**.

La Sp es uno de los organismos más antiguos en el planeta. Era consumida por dos civilizaciones, separadas por cientos de años y miles de kilómetros, incluyéndola como parte importante de su dieta. Turpín la aisló por primera vez. Posteriormente cobro más atención por otras instituciones y países entre ellos México, iniciándose así la investigación de sus propiedades. Actualmente se sabe que la Sp pertenece a la familia *Oscillatoriaceae*, además de que contiene una gran cantidad de nutrientes y que no es tóxica para el consumo de animales y humanos. Es una de las formas de vida más antiguas que se desarrollan en aguas alcalinas de lagos volcánicos sobre la tierra, por los

últimos 3'500 millones de años aproximadamente **(40)**. La *Sp* tiene un crecimiento óptimo en aguas saladas, pero son muy pocas las especies que crecen en el mar por el bajo contenido de carbonatos. Estudios a corto, mediano o largo plazo en animales de laboratorio demuestran que no produce efectos indeseables **(17)**. La *Sp* es y ha sido empleada como fuente de colorantes y aditivos en las industrias farmacéuticas y alimentaría **(17)**. Se reportan “buenos resultados” en atletas alimentados diariamente con *Sp*. Además de resultados favorables en estudios en niños o infantes desnutridos **(18)**.

Se ha encontrado que la *Sp* tiene acción hipocolesterolémica en ratas y humanos **(57, 59)**, disminuye el riesgo de cáncer, modifica la flora intestinal, pérdida de peso, ayuda en casos de desnutrición, presenta actividad antitumoral además de prevenir la formación de hígado graso en ratones y ratas **(59)**.

Reportes previos muestran que un extracto de *Sp* tiene un efecto antioxidante inhibiendo la peroxidación de lípidos microsomales **(72, 73)**. La ficocianina presente en la *Sp*, es la responsable de su actividad antioxidante y antiinflamatoria, la ficocianina es estructuralmente similar a la bilirrubina. Estudios toxicológicos y nutricionales han demostrados que es adecuada para el uso como complemento alimenticio. Además, estudios previos realizados por el laboratorio muestran que en ratas, *S. maxima* previene el desarrollo de hígado graso inducido por una dieta rica en fructosa por una dosis i.p. de tetracloruro de carbono **(59)**.

2. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Caracterizar el efecto de la *Spirulina maxima* sobre la diabetes inducida en ratas

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Determinar el efecto antihiperlicemiantes de la *Spirulina* sobre la Diabetes inducida.
- 2) Determinar el efecto de la *Spirulina* sobre los lípidos plasmáticos en ratas diabéticas.
- 3) Caracterizar el efecto de la *Spirulina* sobre los lípidos hepáticos en ratas diabéticas.
- 4) Evaluar en plasma y en hígado los efectos antioxidantes de la *Spirulina* sobre la diabetes inducida por estreptozotocina.

3. HIPÓTESIS

La *Spirulina maxima* atenúa la hiperglucemia, ejercerá efectos hipolipemiantes y reducirá el daño del estrés oxidativo causado por la diabetes mellitus inducida por estreptozotocina.

4. ANTECEDENTES

4.1. Diabetes mellitus

4.1.1. Definición

El término diabetes proviene del griego δια-βήτης que significa: dia-, a través de; y bêtes, correr; se refiere a la denominación de diversos trastornos caracterizados por producción excesiva de orina **(23)**.

La DM es el desorden endocrino más común en la práctica clínica **(4, 30)**. La diabetes es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa de carácter heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, y que se caracteriza por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los carbohidratos, proteínas y lípidos **(49)**.

4.1.2. Epidemiología. La diabetes en México

En México la DM es más frecuente en mujeres (55%) que en varones (45%). Desde hace 5 años es la principal causa de muertes en mujeres y la segunda en varones **(59)**.

La Encuesta Nacional de Salud (ENSA) 2006 detectó una prevalencia de 7% en adultos mayores de 20 años observándose un incremento en individuos mayores a 50 años. Entre sujetos de 50 a 59 años se detectó una incidencia de 13.5% y a partir de la sexta década es de 19.2% siendo mayor en mujeres (21.3%) que en hombres (16.8%). Además, se ha sugerido que el 30% de los diabéticos ignoran tener la enfermedad.

En México, la DM en el 2005 fue la causa de más de 67,000 defunciones, lo que representa el 13.6% de todas las muertes registradas por la Secretaría de Salud en ese año, superando por poco a los infartos (53,188 defunciones,

10.8%), siendo cuatro veces superior a los accidentes de tránsito (15,742 defunciones, 3.2%) **(67)**. La DM es la principal causa de mortalidad en edad productiva (15 a 64 años) y en la edad postproductiva **(68)**.

4.1.3. Clasificación

De acuerdo a la NOM-015-SSA2-1994 la diabetes se clasifica de la siguiente forma con fines de diagnóstico y tratamiento **(49)**:

4.1.3.1. Diabetes Tipo 1

Es el tipo de diabetes en la cual hay una destrucción de las células beta del páncreas, con deficiencia absoluta de insulina.

4.1.3.2. Diabetes Tipo 2

Es el tipo de diabetes en la cual hay capacidad residual de secreción de insulina, pero sus niveles no superan la resistencia a la insulina, insuficiencia relativa de secreción de la insulina o cuando coexiste ambas posibilidades y aparece la hiperglucemia.

4.1.3.3. Otros tipos específicos

Causadas por un defecto genético en células β -pancreáticas; enfermedades pancreáticas, resistencia a la insulina determinada genéticamente; por efecto hormonales; inducida químicamente **(27)** o por infecciones **(49)**.

4.1.3.4. Diabetes gestacional

Consiste en la presencia de altos niveles de glucosa en sangre en cualquier momento del embarazo, en una persona que no tenga diabetes **(8)**.

4.1.4. Factores de riesgo

Un factor de riesgo es un atributo o exposición de una persona, una población o el medio, que están asociados a la probabilidad de ocurrencia de un evento

(49). A continuación se describen los principales factores de riesgos asociados con la DM:

4.1.4.1. Sobrepeso y obesidad

El incremento del tejido adiposo está asociado al incremento de la liberación rápida de insulina y la reducción de la sensibilidad a la hormona, lo que origina resistencia a la insulina.

4.1.4.2. Herencia

Parece que la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 es hereditaria **(11)**. Está predisposición genética se relaciona con ciertos genes ubicados en el brazo corto del cromosoma 6, y con el principal antígeno de histocompatibilidad (HLA), en particular DR3 **(59)**. No se ha encontrado un patrón hereditario coherente en diabetes tipo 2 (DMT2), pero se sabe por ejemplo que el hermano de un paciente con diabetes presenta un 10% de probabilidad de desarrollar diabetes a los 50 años.

4.1.4.3. Dieta

Los ácidos grasos provenientes de la dieta pueden afectar la resistencia a la insulina independientemente de la obesidad, aunque el mecanismo no está aún claro. Se piensa que los efectos de los ácidos grasos de la dieta es mediada a través de la composición de los ácidos grasos de la membrana. Se ha mostrado que la composición de fosfolípidos en las membranas del músculo esquelético está directamente relacionada a la sensibilidad a la insulina en humanos. Un perfil específico de ácidos grasos puede influenciar la acción de la insulina a través de varios mecanismos potenciales, incluyendo alteraciones en la unión o afinidad del receptor de insulina e influencia en la permeabilidad a iones y señalización celular **(35)**. Algunos estudios muestran que una dieta, en un período de 3 meses, alta en grasas saturadas (18% de energía) disminuye la sensibilidad a la insulina comparada con una dieta alta

en grasas monosaturadas (21% de energía) **(75)**. Diferencias genéticas en la actividad enzimática pueden afectar la sensibilidad y composición de ácidos grasos. Las recomendaciones de la dieta para prevenir y manejar la DMT2 podrían enfocarse más en la calidad de las grasas y carbohidratos en la dieta que en la cantidad solamente, además del balance energético total **(35)**.

4.1.4.4. Estrés mental

El estrés mental provoca alteraciones crónicas en la concentración de cortisol. La elevación frecuente de esta hormona favorece el desarrollo de la obesidad **(57)**.

4.1.4.5. Sedentarismo

La inactividad física o sedentarismo además del consumo elevado de dietas ricas en carbohidratos y grasas induce fácilmente al sobrepeso y si no se controla, a la obesidad. La relación entre la obesidad y el sedentarismo se puede explicar de la siguiente forma: el incremento en la ingesta calórica, por comer durante el período de sedentarismo disminuye la velocidad catabólica y se inhibe la oxidación de los metabolitos, con descargas continuas de insulina, la cual induce la síntesis y al depósito de triacilglicérolos.

4.1.5. Síntomas

Los síntomas de la diabetes son despreciados frecuentemente por considerarlos inofensivos. Las altas concentraciones de glucosa son las causantes de las alteraciones en la homeostasis de la glucosa las cuales desencadenan produciendo los siguientes síntomas: emisión excesiva de orina (poliuria), aumento anormal de la necesidad de comer (polifagia), incremento de la sed (polidipsia), y pérdida de peso sin razón aparente, irritabilidad y visión borrosa **(8, 22, 49, 57)**

La presencia de elevadas cantidades de glucosa en sangre origina un incremento de este carbohidrato en el filtrado renal, que supera la capacidad de las células tubulares proximales de absorberla, ejerciendo un alto efecto osmótico en los compartimientos subsiguientes, incrementando el volumen intratubular y por lo tanto el de orina (poliuria). La pérdida exagerada de agua corporal, genera hipovolemia e hiperosmosis, que son percibidas por el hipotálamo, y en respuesta se secreta la hormona antidiurética induciendo a la polidipsia **(57)**.

4.1.6. Diagnóstico

En sangre la concentración de glucosa en ayuno se mantiene dentro de un intervalo muy estrecho (70 a 100 mg/dL).

De acuerdo a lo establecido por la Asociación Americana de Diabetes (ADA), los criterios para el diagnóstico de la DM son los siguientes **(2)**:

1. Una concentración de glucosa plasmática ocasional ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L), con signos y síntomas clásicos.
2. Una glucosa plasmática en ayuno ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L), en más de una ocasión. Se define ayuno como: “en una ausencia de ingesta calórica en un período mínimo de 8 horas previas.
3. Una curva anormal de tolerancia a la glucosa, en el que la concentración de glucosa sea ≥ 200 mg/dL a las 2 horas después de la ingesta oral de una carga estándar de glucosa. La prueba debe realizarse como lo indica la Organización Mundial de la Salud, utilizando una carga de glucosa que contenga el equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua **(8)**.

4.1.7. Complicaciones

Prácticamente todos los tejidos y órganos sufren una alteración bioquímica y estructural como consecuencia de la hiperglucemia (Tabla 4.1) **(22)**.

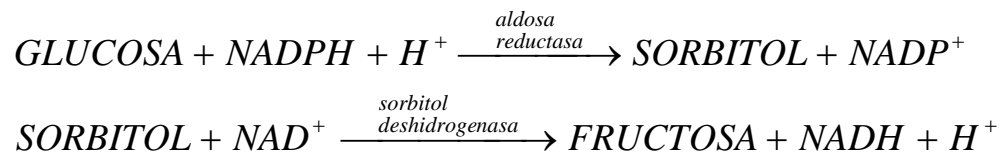
Tabla 4.1. Complicaciones de la DM (10)

Complicaciones agudas
<ul style="list-style-type: none">• Hipoglucemias (asociadas con el tratamiento con insulina o sulfonilureas)• Coma diabético (cetoacidosis, estado hiperosmolar)
Complicaciones crónicas
Microvasculares (afectan arteriolas de pequeño calibre)
<ul style="list-style-type: none">• Retinopatía• Neuropatía• Nefropatía
Macrovasculares (afectan grandes vasos y arterias de mediano calibre)
<ul style="list-style-type: none">• Enfermedad cardiovascular• Enfermedad cerebrovascular• Enfermedad vascular periférica
Mixtas
<ul style="list-style-type: none">• Neuropatía• Pie diabético

La formación de especies de oxígeno reactivas (EORs) está relacionada en la etiología y patogénesis de la DM y el desarrollo de sus complicaciones. La exposición prolongada a la hiperglucemia causa estrés oxidativo y reduce la capacidad del sistema endógeno de antioxidantes vía la producción **(16)** de azúcares reductores a través de dos mecanismos bioquímicos, los cuales originan muchas de las complicaciones de un paciente diabético:

La primera es la reacción de glicosilación no enzimática (glicación): los azúcares reductores pueden reaccionar fácilmente con lípidos y proteínas de manera proporcional a la hiperglucemia **(22)**. La fijación reversible de la glucosa a los grupos amino libres de las proteínas corporales, lo que induce cambios estructurales y funcionales, además, de incrementar la producción de ERO **(16)**. Un ejemplo de ello es una proteína ampliamente distribuida en el organismo, la hemoglobina, la cual se emplea en el diagnóstico y evaluación del control terapéutico **(22)**.

El segundo mecanismo, la vía del poliol, se lleva a cabo en el cristalino del ojo, aorta, riñones y nervios periféricos. Los tejidos de los órganos citados poseen una enzima, la aldosa reductasa **(22, 16)**.



La acumulación intracelular de sorbitol, que no difunde con facilidad por las membranas biológicas, y la fructosa crea un gradiente osmótico y una entrada excesiva de agua, produciendo quizá que se distiendan. Se ha observado que los fármacos que inhiben a la aldolasa reductasa previenen la formación de cataratas en animales de laboratorio con DM experimental **(22)**.

Otra consecuencia es que el sorbitol no permite la entrada de mioinositol a las células, clave en el metabolismo energético de los polioles **(22)**.

Enfermedad de los vasos sanguíneos de mediano y gran calibre

La DM incrementa el daño y la extensión de la aterosclerosis. Por lo que los infartos miocárdicos y cerebrales son complicaciones habituales de la enfermedad. La principal causa de muerte en adultos es la arteriopatía

coronaria aterosclerótica. Además hay compromiso de los vasos de las extremidades inferiores, produciendo dolor local por la mala circulación (claudicación intermitente). Es común la formación de úlceras y que se gangrenen dedos y pies, que requerirán amputación **(30)**.

1. Microangiopatía: se define como anomalías en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, cuyo signo más significativo es el engrosamiento de la membrana basal **(30)**.
 - a. Retinopatía: puede producir ceguera a causa de hemorragia vítrea por la proliferación de los vasos retinianos y maculopatía como resultado de la aparición de exudados de los vasos o edema que afecta la mácula **(8, 30)**.
 - b. Nefropatía que tiende a la insuficiencia renal. En la etapa precoz hay una hiperfusión renal, asociada con un incremento del caudal de filtrado glomerular, tamaño glomerular aumentado y una excreción patológica de pequeñas cantidades de albúmina en la orina (microalbuminuria). En la fase tardía, hay proteinuria creciente y un descenso de la función renal, que acaba ocasionando una insuficiencia renal **(30)**.
 - c. Neuropatía: puede ponerse en evidencia en forma de diarrea, hipotensión postural, impotencia, vejiga neurógena y úlceras neuropáticas de los pies debido a microangiopatía de los vasos sanguíneos nerviosos y a metabolismo anormal de la glucosa en las células nerviosas **(30)**.

La macroangiopatía (o aterosclerosis acelerada): da lugar a cardiopatía coronaria prematura. No se conoce el mecanismo exacto de la susceptibilidad aumentada a la aterosclerosis en los diabéticos; sin embargo, la

hiperlipidemias y el aumento de la concentración de glicoproteínas en el plasma pueden tener un papel en ello. La forma más frecuente de hiperlipidemias que se observa en la DM es la hipertrigliceridemia con aumento de la concentración de C-LDL y disminución de la concentración de C-HDL en el plasma.

4.1.8. Tratamiento

Son 3 los pilares fundamentales en el tratamiento de la DM: la dieta, el ejercicio y el uso de fármacos (insulina y agentes hipoglucemiantes orales). Cada uno de estos componentes interacciona con los otros al grado de que no se puede modificar uno sin afectar a los otros dos **(40)**.

4.1.8.1. Dieta

La dieta juega un papel crucial en la terapia de todos los individuos con DM. Desafortunadamente, la aceptación y apego a la dieta es poco común. La dieta está diseñada para ayudar a los pacientes a alcanzar las condiciones metabólicas y fisiológicas apropiadas, selecciona alimentos saludables tomando en cuenta las preferencias personales y culturales.

4.1.8.2. Ejercicio

El ejercicio es excelente para controlar el peso, incrementar el bienestar físico y psicológico, adquirir mayor capacidad para trabajar, mejorar la composición corporal, etc. Los diabéticos obtienen beneficios adicionales que incluyen mejoría a la tolerancia a la glucosa, elevación de la sensibilidad a la insulina, disminución de los factores de riesgo de aterosclerosis, descenso de la presión arterial y mejoría de la condición cardiovascular. En tanto que el ejercicio tiene beneficios indudables, el ejercicio vigoroso también presenta algunos riesgos, como incremento de la hiperglucemia con control deficiente, hipoglucemia o cetonemia, o muerte inesperada durante el ejercicio. Por tanto la seguridad durante la práctica del ejercicio es de importancia primordial en los diabéticos.

4.1.8.3. Fármacos

El uso de medicamentos en el tratamiento de la DM es frecuente. Entre los más empleados se encuentran: Biguanidas, Sulfonilureas, Tiazolidinedionas, Meglitinidas, Inhibidores de la α -Glucosidasa, además de la insulina. (Se muestran en el ANEXO I).

4.2. Modelos animales de diabetes

Debido a la compleja interacción entre los múltiples genes susceptibles y entre los factores genéticos y ambientales que intervienen en el desarrollo de la diabetes, el análisis de esta enfermedad es difícil, los modelos animales de diabetes son muy útiles y ofrecen múltiples ventajas en la investigación **(65)**. Los modelos experimentales son herramientas esenciales para comprender la patogénesis, complicaciones, y las influencias genéticas y ambientales que incrementan los riesgos de la diabetes además de la evaluación de varios agentes terapéuticos.

Muchos de los modelos disponibles se realizan en roedores por su pequeño tamaño, cortos períodos de generación, fácil disponibilidad y consideraciones económicas; sin embargo, se requieren modelos en otros animales por razones prácticas y fisiológicas con respecto a los humanos **(65)**.

Los modelos animales exhiben características similares como hiperglucemia, incluyendo los síntomas de la enfermedad en cada uno de ellos y las alteraciones metabólicas comúnmente observadas en pacientes diabéticos. Además exhiben muchas de las complicaciones de la diabetes en humanos **(65)**.

4.2.1. Diabetes mellitus tipo 2 espontánea

Estos modelos se pueden obtener de animales con una o varias mutaciones transmitidas de generación en generación o por selección del entrecruzamiento de animales no diabéticos por entrecruzamiento por varias generaciones. Las peculiaridades metabólicas resultan de un sólo gen defectuoso (recesivo o dominante) o por un origen poligénico. Los animales poligénicos representan más la condición humana por que solo algunos subtipos de diabetes tienen una causa definida (e.g. MODY) lo que es un sólo gen defectuosos lo que representa muy pocos casos **(65)**.

4.2.2. Diabetes mellitus tipo 2 inducida

La inducción de la DM se ha logrado por medio de diversas técnicas experimentales, tales como manipulaciones dietéticas o nutricionales o quirúrgicas, además del tratamiento con agentes químicos.

4.2.2.1. Modelos de DMT2 inducida quirúrgicamente

Consisten en una pancreotomía completa o parcial para la inducción de diabetes tipo 1 o tipo 2 respectivamente **(65)**.

4.2.2.2. Modelos de DMT2 inducida químicamente

Estos modelos son comunes en la aclaración del posible papel de los factores ambientales relacionados en la destrucción del páncreas endocrino y el subsecuente desarrollo de la diabetes, durante y después de la inducción **(26, 65)**. Los agentes más usados son el aloxana, y estreptozotocina (STZ) **(26, 55, 65)**, otros agentes son vacor, ditizona y 8-hidroxiquinolina.

La STZ como agente inductor de la DM en animales se explica a continuación.

4.2.2.2.1. Estreptozotocina

La STZ, 2-deoxi-2-[[[(metilnitrosoamino)carbonil]amino]-D-glucopiranososa, es un antibiótico *N*-metilnitrosamino (44), extraído de *Streptomyces achromogenes*(32, 44, 66). La STZ al igual que la aloxana, produce hiperglucemia por citotoxicidad directa sobre las células β pancreáticas de los Islotes de Langerhans (44, 54, 62).

La molécula de la STZ está constituida por una porción nitrosoarea interpuesta entre un grupo metilo y una porción deoxiglucosa (glucosalina) (44, 54, 65).

4.2.2.2.1.1. Historia

En los años 50 fue originalmente identificada como antibiótico. El fármaco se descubrió que era producido por una bacteria del suelo *Streptomyces achromogenes* en una muestra de suelo obtenida en los Rápidos Azules, Kansas, por la empresa farmacéutica Upjohn (ahora parte de Pfizer) (26, 55).

A mediados de los años 60 se descubrió su selectividad tóxica a las células β de los islotes pancreáticos, lo que lo sugiere en el empleo para modelos de DMT1 y en el tratamiento médico para el cáncer de las células β (55).

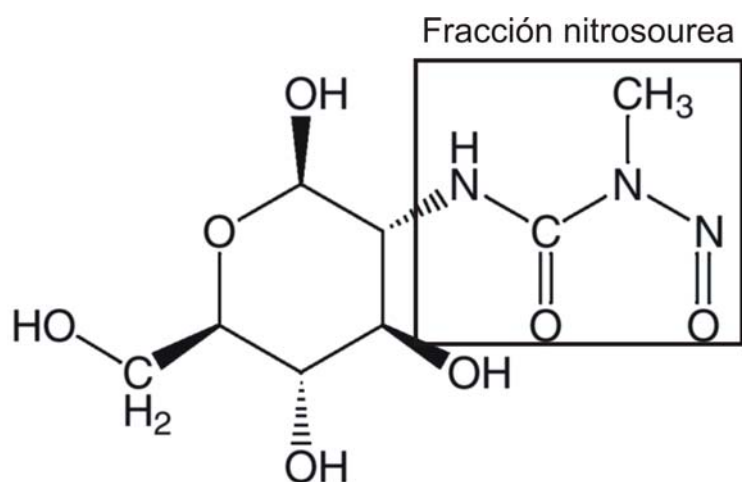


Figura 4.1. Estructura química de la estreptozotocina (54).

4.2.2.2.1.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de su citotoxicidad no ha sido aclarado completamente, sin embargo hay evidencias que la fracción de oxiglucosa facilita su transporte a través de las membranas **(65, 70)** con participación del principal transportador de glucosa (GLUT2) **(70)**.

La fracción nitrosourea es la responsable de la toxicidad a las células β pancreáticas **(65)**. Se sabe que el fármaco inhibe la síntesis de ADN, interfiere al igual que enzimas que participan en la gluconeogenesis **(54)**, además produce un incremento de la actividad de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa **(70)** que produce una disminución de NAD conduciendo a una falta de energía celular. Parte de su actividad se debe a la formación de iones metilcarbonio, que alquilan o se unen con algunas moléculas intracelulares incluyendo ácidos nucleicos, inhibiendo la síntesis de ADN **(54, 65, 70)**. La STZ produce tres fases en los niveles de azúcar en la sangre: un incremento inicial, alcanzando valores de 150-200 mg/dL después de 3h, posiblemente debido a la glucogenolisis o a un incremento de los ácidos grasos libres, secundarios a la reducción en la insulina circulante. Seis a ocho h después se presenta una profunda hipoglucemia resultado de una liberación endógena de insulina por la degeneración de las células β , y finalmente un estado diabético irreversible 24 h después de la inyección **(66)**. Además presenta algunas ventajas con respecto al ALX tales como vida media relativamente mayor, sostenimiento de la hiperglucemia por más tiempo y el desarrollo bien caracterizado de las complicaciones de la diabetes con pocas incidencias a cetosis así como mortalidad **(65)**.

La dosis para la inducción a la diabetes depende de la especie. Se ha observado una variación en la dosis de 25 a 200 mg/kg, aunque una sola dosis i.v. de 50 mg/kg reporta 100% de inducción en muchos animales. En

ratas la dosis para inducir diabetes puede ser de 35 a 65 mg/kg (iv o ip) **(65)**. Una dosis de 50 mg/kg de STZ produce una severa hiperglucemia sin cetosis y altas dosis (75-150 mg/kg) producen diabetes con cetosis **(32)**.

4.2.2.2.1.3. Usos

La STZ posee cuatro tipos distintos de actividad biológica: antibiótico, antitumoral, productor de cáncer y agente diabetogénico **(26, 32, 55, 65)**.

4.3. Estrés oxidativo, radicales libres y diabetes mellitus

4.3.1. Introducción al metabolismo aerobio

Los organismos aerobios emplean la oxidación de moléculas orgánicas para obtener energía y de esa forma subsistir. En células aeróbicas el oxígeno sirve como un aceptor de electrones en reacciones enzimáticas y no enzimáticas.

El oxígeno es esencial para la vida aeróbica, pero paradójicamente puede ser tóxico **(13)**. Existen cada vez más pruebas de que el estrés oxidativo (EOx) tiene un influencia importante en las complicaciones de la DM **(43)**.

4.3.2. Estrés oxidativo (EOx)

El EOx se define como un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de RL o especies reactivas con respecto a los antioxidantes (AOx) a favor de los primeros **(61)**.

4.3.3. Los Radicales Libres

Los RL son átomos o moléculas extremadamente reactivas debido a que en el orbital más externo de su estructura tienen uno o más electrones sin aparear **(74)**, por lo cual presentan una configuración espacial que les genera gran inestabilidad **(61)**. Esta inestabilidad les confiere una aidez física por la captura de un electrón de cualquier otra molécula en su entorno. De esta forma pueden establecer reacciones en cadena, en la cual, varios transportadores

que se oxidan y reducen secuencialmente; un RL modifica a una biomolécula después de transferir o capturar un electrón **(74)**.

El oxígeno (2 electrones desapareados), superóxido, radical hidroxilo y óxido nítrico (cada uno con un electrón desapareado) son ejemplos de RL. El peróxido de hidrógeno no es un radical libre por que todos sus electrones están apareados **(43)**. Su reactividad se debe a su tendencia de alcanzar su estabilidad electroquímica.

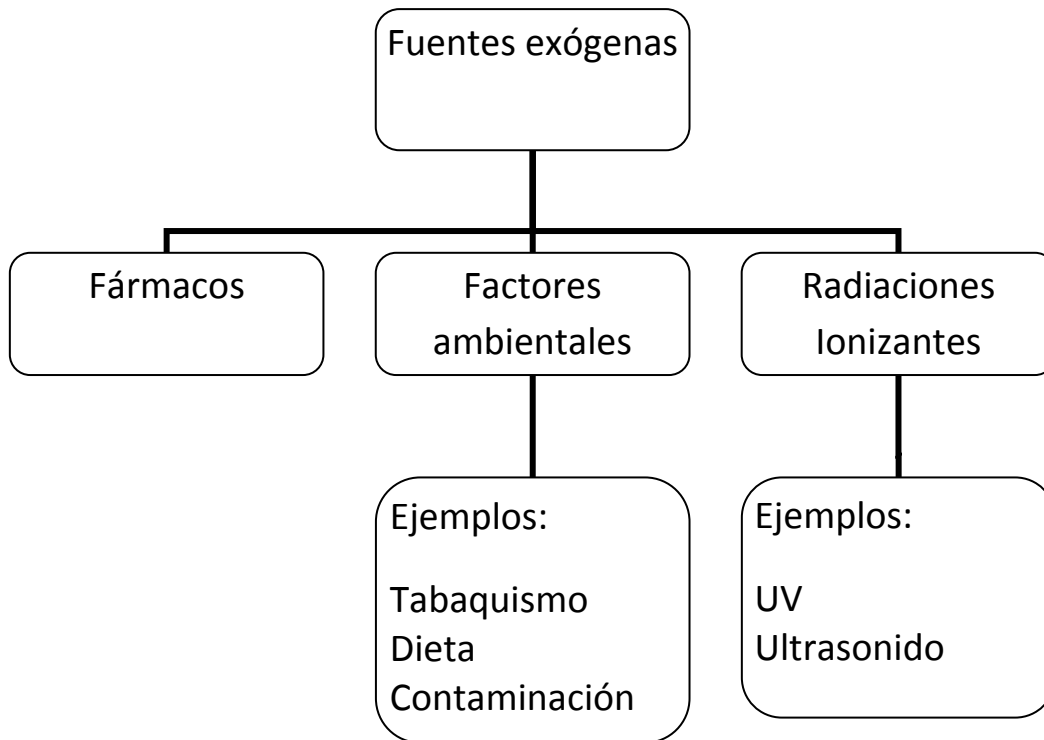
4.3.3.1. Fuentes de radicales libres

Los RL se forman por fuentes exógenas y endógenas **(74)**. Las estructuras subcelulares de generación de RL incluyen principalmente las mitocondrias, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, la citoplasmática y la del retículo endoplásmico como parte del metabolismo aeróbico ya que se generan de manera natural y continua en el metabolismo, la respiración, la fagocitosis, etc.

4.3.3.1.1. Fuentes exógenas

Algunos agentes, son RL, como el humo del tabaco, aceites muy oxidados, metales pesados, los cuales generan radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación, otros agentes son las radiaciones ionizantes. En la figura 4.1 se muestran ejemplos de fuentes exógenas de RL.

Figura 4.2: Agentes exógenos que generan RL.



4.3.3.1.2. Fuentes endógenas

Como ya se había mencionado anteriormente, los RL se forman dentro de los procesos metabólicos normales, algunas de las fuentes son: la cadena de transporte electrónico mitocondrial, autooxidación de pequeñas moléculas, reacción de Fenton-Haber-Weiss, sistemas de transporte electrónico del retículo endoplasmático y membrana nuclear, peroxisomas, enzimas como xantina oxidoreductasa, aldehído oxidasa, dihidroorotato deshidrogenasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan RL durante su ciclo catalítico, fagocitos activados, xantina oxidasa, hiperglucemia y otras enzimas (aldehído oxidasa, lipooxigenasa y ciclooxigenasa), etc.

4.3.3.2. Clasificación de radicales libres

Los RL pueden ser derivados de oxígeno: EOR (Especies de Oxígeno Reactivas) o de nitrógeno: ENR (Especies de Nitrógeno Reactivas).

4.3.3.2.1. Especies de oxígeno reactivas (EORs)

Las características que hacen del oxígeno ideal para la producción de energía aeróbica (abundancia atmosférica y una elevada afinidad por electrones) son su talón de Aquiles (13).

El oxígeno se encuentra normalmente en su forma más estable (O_2), en esta forma es solo moderadamente reactivo.

A continuación se muestran los principales especies de oxígeno reactivas.

Tabla 4.2: Principales especies de oxígeno reactivas.

RADICALES	
Anión superóxido	O_2^-
Radical hidroxilo	$\cdot OH$
Radical peróxido	$\cdot OOR$
Radical perhidroxilo	$\cdot OOH$
Radical alcóxido	$\cdot OR$
NO RADICAL	
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Ácido hipocloroso	$HOCl$
Ozono	O_3
Oxígeno singulete	$\uparrow O_2$

4.3.3.2.2. Especies de nitrógeno reactivas (ENRs)

Las especies de nitrógeno reactivas representan otra clase de RL a los cuales, en los últimos años, se les ha dado mucha importancia.

4.3.4. Daño biomoléculas como consecuencia del estrés oxidativo

La acción de los RL viene determinada, por una parte, por su reactividad química, y por otra parte, por la disponibilidad de un sustrato susceptible en la vecindad de donde se produce el RL. La acumulación de compuestos alterados por el resultado de la reacción del RL es a menudo la explicación de efectos a

largo plazo, los cuales son difícilmente demostrables como relación causa-efecto de la reacción de los RL.

4.3.4.1. Daño oxidativo a las proteínas

Todas las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman a las proteínas son susceptibles al ataque de los RL, principalmente por radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$). Sin embargo unos son mas susceptibles tales como tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina metionina y cisteína.

Como consecuencia, esta oxidación, conduce a un cambio conformacional de la proteína, que puede acompañarse de una fragmentación química, aumento en la susceptibilidad al ataque proteolítico y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

Uno de los radicales más reactivos a la estructura de las proteínas es el óxido nítrico.

4.3.4.2. Daño oxidativo a los lípidos

Los ácidos grasos que constituyen los triacilgliceroles o los fosfoacilgliceroles son atacados por moléculas reactivas, como el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$).

El RL extrae un átomo de hidrógeno unido a un átomo de carbono adyacente a un doble enlace provocando una ruptura homolítica. El $\text{OH}\cdot$ forma ahora una molécula de agua, mientras el ácido graso se transforma en un RL, presentando el electrón desapareado en el carbono al que se sustrajo el hidrógeno. Este nuevo radical busca estabilizar su estructura química tomando un electrón de una molécula próxima, generando una reacción en cadena. Los productos finales y estables de la lipoperoxidación son aldehídos, cetonas, ésteres y alcoholes.

Este proceso conduce a la alteración de las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular y a la muerte de la célula.

La lipoperoxidación se asocia a la etiología de enfermedades como la aterosclerosis, artritis reumatoide, enfisema pulmonar, envejecimiento pulmonar y a las complicaciones de la DM.

4.3.4.3. Daño oxidativo a los carbohidratos

La oxidación de carbohidratos puede dar lugar a la formación de moléculas capaces de reaccionar con los grupos carbonilo de las proteínas. La glucosa una vez oxidada por los RL producidos por los metales de transición, puede combinarse con los grupos carbonilo de las proteínas **(60)**.

4.3.4.4. Daño oxidativo al ADN

La importancia biológica de los ácidos nucleicos nos obliga a considerar como un efecto de gran repercusión el que se presenten modificaciones o deleciones de las bases de la molécula de ADN causadas por la presencia de RL. A semejanza de las proteínas parece existir una muy baja posibilidad del establecimiento de reacciones en cadena; sin embargo, el daño puede ser más, aunque sea muy limitada en extensión u localización. La interacción de RL con el ADN causa cambios conformacionales, alteraciones de bases y ruptura de una o de la doble cadena y pérdida de nucleótidos, eludiendo el sistema de reparación al presentar una mutación antes de la replicación. Esto conduce a la producción de genes mutados y por ende, de proteínas disfuncionales.

4.3.5. Antioxidantes

Las células han desarrollado mecanismos por los cuales contrarrestan la acción nociva de las especies oxidantes, basado en un sistema complejo de defensas AOx. Un antioxidante se define como aquella sustancia que en bajas

concentraciones en relación a un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de tal sustrato.

Al interactuar con el RL, el antioxidante cede un electrón y se oxida convirtiéndose en un RL débil no tóxico. Podemos dividir a los AOx en dos categorías: los endógenos, generados por el organismo, y los exógenos, proporcionados por la dieta.

Además los AOx se pueden clasificar por su mecanismo de acción en primarios y secundarios. Los AOx primarios actúan en la prevención de la formación de los RL, es decir en la fase de iniciación, y en la captura de los compuestos que propician su transformación en radicales más peligrosos; en este grupo también se encuentran los secuestradores de metales pesados como la ceruloplasmina o la transferrina. Los AOx secundarios actúan una vez formado el radical, evitan su propagación al cederle electrones y convertir a sí mismos en un radical menos reactivo y más fácil de eliminar.

Tabla 4.3: Clasificación de los AOx de acuerdo a su mecanismo de acción	
ANTIOXIDANTES PRIMARIOS	ANTIOXIDANTES SECUNDARIOS
Superóxidodismutasa (SOD)	Vitamina C
Glutación peroxidasa (GPx)	Vitamina E
Catalasa	Vitamina A y carotenos
Transferrina	Ácido úrico
Ceruloplasmina	Bilirrubinas
Albúmina	Albúmina
Metalotioneínas	Melatonina
Glutación S transferasa	Estrógenos
Ferritina	

4.3.5.1. Los antioxidantes fisiológicos más importantes

La primera línea de defensa frente al daño oxidativo es el secuestro o quelación de los iones metálicos activos, por medio de varias proteínas como

la transferrina y ferritina, las formas de transporte del hierro. La haptoglobina se une a la hemoglobina y disminuye la actividad prooxidante de ésta. La albúmina tiene un lugar de unión fuerte para el cobre e inhibe de forma efectiva las reacciones de oxidación catalizadas por el cobre en el plasma. La carnosina (β -alanil-L-histidina) y péptidos relacionados están presentes en el músculo y en el cerebro a concentraciones milimolares; son potentes quelantes del cobre y pueden tener un papel en la protección antioxidante intracelular.

A pesar de la quelación se consiguen formar EOR, por esta razón hay enzimas que entran en acción. Estas incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx).

La CAT se encuentra presente en los peroxisomas, inactiva el H_2O_2 . Presenta dos tipos de actividades: cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno para dar agua y oxígeno, y oxidación de dadores de hidrogeniones como el metanol, etanol, ácido fórmico o fenoles, con el consiguiente consumo de peróxidos:

La superóxido dismutasa (SOD) convierte el $O_2\cdot$ en el menos tóxico H_2O_2 . Forman un conjunto de enzimas que están presentes en todas las células que utilizan en su metabolismo el oxígeno, pero que faltan en las células anaerobias. Esto es así porque la función fisiológica de las superóxido dismutasas es la eliminación de los radicales superóxido producidos en las reacciones del metabolismo aerobio:

El glutatión (GSH) es un tripéptido γ -glutamilcisteinilglicina **(60)**, presente en concentraciones de 1-5mM en todas las células. El GSH se recicla por la GSH reductasa dependiente de NADPH. También hay una isoforma de GPx en las células epiteliales intestinales, que parece tener un papel en la detoxificación de los hidroxiperóxidos de la dieta. Se encuentra en forma reducida (GSH) u

oxidada (GSSG), sus principales funciones son: en el transporte de aminoácidos hacia el interior de las células mediante el ciclo de transferencia de residuos γ -glutamilo **(11)**.

El GSH también puede neutralizar directamente (en procesos no catalizados por la glutatión peroxidasa) los RL derivados del oxígeno **(11)**.

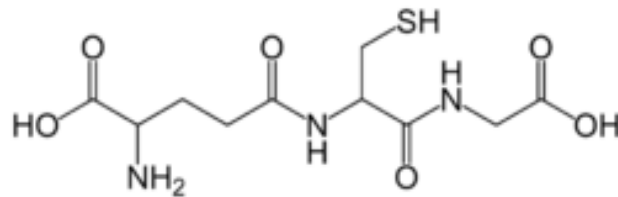


Figura 4.3. Estructura química del glutatión

La tercera línea de defensa son las vitaminas AOx, A, C y E. Estas vitaminas donan un átomo de hidrógeno ($H\bullet$) a los radicales intermedios formados por la interacción de las EOR con las biomoléculas. Los radicales de vitamina C y E formados se estabilizan por resonancia; no propagan el daño por radicales y son recicladas.

La vitamina C (ácido ascórbico) en fase acuosa, se caracteriza porque cede con facilidad dos electrones, dando lugar al deshidroascórbico. Este hecho es el que le proporciona sus características AOx.

La vitamina E (α y γ tocoferol) en fase lipídica. El α -tocoferol puede interaccionar directamente con los radicales peroxilo e hidroxilo. También puede neutralizar al radical superóxido. Al ser una estructura liposoluble, su principal función es la de la protección de las membranas biológicas frente a la oxidación. Inhibe la fase de propagación en la cadena de la lipoperoxidación, formándose el radical tocoferoxílico:

Los carotenoides son un conjunto de pigmentos aislados de plantas y algunos de ellos como el α , β o γ caroteno son precursores de la vitamina A. El más frecuente e importante es el β -caroteno. El β -caroteno posee actividad antioxidante. Sin embargo la vitamina A no posee esta actividad. El β -caroteno se ha descrito como el más importante neutralizador del oxígeno singlete aislado de la naturaleza.

4.3.6. Estrés oxidativo y Diabetes mellitus

4.3.6.1. Generalidades

La mayoría de los autores postulan el papel del EOx en el desarrollo de las complicaciones diabéticas debido al daño tisular que producen los RL.

Existen varias vías para explicar la patogénesis de las complicaciones de la diabetes. Estas vías incluyen la glicación (no enzimática y autooxidativa), alteraciones de la vía del sorbitol, alteraciones de los sistemas AOx, daño tisular producido por procesos de isquemia reperfusión, procesos inflamatorios y alteraciones del metabolismo.

Se ha detectado un aumento de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) en suero de pacientes diabéticos, aunque otros estudios sugieren que los niveles de lipoperoxidos en plasma están más relacionados con la hipertrigliceridemia que con la diabetes. En eritrocitos de pacientes diabéticos se ha observado un aumento de la lipoperoxidación, y este aumento se correlaciona directamente con los niveles de hemoglobina glicada lo cual sugiere que el daño oxidativo puede estar relacionado con la hiperglucemia *per se*. En un modelo experimental de diabetes, como son las ratas diabetizadas con STZ, se ha observado un aumento de la peroxidación lipídica en eritrocitos **(11)**.

4.3.6.2. Fuentes de producción de radicales libres en la Diabetes

Para que el EOx constituya un factor importante en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, se debe estimular la intensificación de dicho estrés (43). En la Tabla 4.4 se muestra los posibles mecanismos por lo que la hiperglucemia puede incrementar la formación de RL y peróxidos libres.

Tabla 4.4: Posibles mecanismos por los cuales la hiperglucemia puede generar la producción de RL y la peroxidación de lípidos (43).
1. Autooxidación directa de la glucosa o glicación
2. Inducción y activación de enzimas de la vía de la lipoxigenasa
3. Activación de las vías de glucosilación (enzimática)
4. Estimulación de la interacción del óxido nítrico con aniones superóxido para la producción de peroxinitrilo y radicales hidroxilo
5. Disminución de la actividad de los mecanismos de defensa AOx

4.3.6.3. Reacciones consecuentes de la hiperglucemia

La glucosa, como muchos otros sustratos, es propensa a la oxidación, incluso en condiciones fisiológicas. La glucosa, en su forma enodiol, puede autooxidarse en presencia de un metal de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+}), hasta formar un anión radical enodiol, que después es transformado en cetoaldehído, que puede generar radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que puede sufrir una fase de conversión a peróxido de hidrógeno y al final se transforma en un radical hidroxilo.

El exceso de glucosa iniciaría la *glicosilación no enzimática* de las proteínas, fundamental en muchas complicaciones diabéticas, como son la micro y macrovasculopatías, debidas a la producción de productos finales de glicación

avanzada (AGE Advanced Glycation Endproducts). Evidencias experimentales revelan la asociación entre EOX e hiperglucemia, mostrando la presencia en el plasma de sujetos diabéticos el incremento de TBARS e hidroperóxidos lipídicos, dos marcadores clásicos de la peroxidación lipídica.

El mecanismo molecular de la oxidación biológica de la glucosa fue identificado como "*Reacción de Maillard*". Esta reacción explica la modificación covalente no enzimática de las proteínas que acompaña al estado de hiperglucemia. Se produce la combinación del grupo aldehído de la glucosa con los grupos amino de las proteínas para formar la base de Schiff seguida del reordenamiento de Amadori para formar fructosa-lisina. Esta glicosilación reversible de los grupos amino, o *glicación*, sirve de base para la formación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c), reconocido marcador del control de la glucemia en la DM. El estadio final de la reacción de Maillard conlleva una oxidación irreversible o *glicoxidación* de la fructosa-lisina para producir los principales productos AGE. La formación de estos productos se correlaciona directamente con las complicaciones renales y vasculares de la DM. Modificaciones en la vida media de las proteínas extracelulares y cambios estructurales en los tejidos ricos en estas proteínas están asociadas al desarrollo de complicaciones en la diabetes, como cataratas, microangiopatía, aterosclerosis y nefropatía **(11)**.

La activación de la vía del poliol produce incremento del cociente NADH/NAD (pseudohipoxia hiperglucémica) y disminución del cociente NADPH/NADP, lo que constituye un estímulo de la vía de la ciclooxigenasa (activación de la síntesis de prostaglandinas) y depresión del ciclo redox del glutatión, respectivamente **(61)**.

El círculo vicioso que establece hiperglucemia, EOX y grado de glicación parece estar fundamentalmente mantenido por el estado de EOX existente. De ahí que en la última década haya cobrado importancia la terapéutica

antioxidante como preventiva o coadyuvante en el tratamiento de los procesos que conducen a incrementar dicho estrés. Los tratamientos recomendados no farmacológicos, como ya se ha referido antes, es el ejercicio, la dieta nutritiva y balanceada rica en antioxidantes y/o el consumo de suplementos o productos ricos en compuestos con poder antioxidante, como son las cianobacterias, entre estas se encuentra la *Spirulina sp.*

4.4. *Spirulina*

La medicina tradicional mexicana ha ofrecido una gran cantidad de “remedios”, para una gran cantidad de enfermedades, entre ellas la diabetes. Muchos pacientes una vez que han sido diagnosticados frecuentemente recurren al uso de plantas y remedios tradicionales (5).

Parece irónico que en estos tiempos con los avances tecnológicos y la revolución en el diseño de fármacos, la ciencia vuelva la mirada a la herbolaria y a los productos naturales. Uno de estos casos es la *Spirulina*, la cual ha sido usada desde hace muchos siglos como alimento por animales y algunas poblaciones (17).

4.4.1. Generalidades

Se denominan algas a un grupo de organismos fotosintéticos no vasculares que contienen clorofila y poseen estructuras reproductoras simples, que se caracterizan por vivir en un medio acuático o con alta humedad (19). Por su tamaño pueden ser microscópicas (microalgas o cianobacterias) o macroalgas. En la actualidad se han estudiado diversos usos de estas, siendo 400 especies estudiadas como las microalgas o cianobacterias que conforman la base de la cadena alimenticia. Se han iniciado estudio para la obtención de nutrimentos a partir de la biomasa de estos microorganismos con alto contenido de proteínas (15). En el campo energético, algunas algas empiezan a considerarse para la producción de biocombustibles (19).

4.4.2. Historia

4.4.2.1. La *Spirulina* en el México antiguo

Los aztecas una de las civilizaciones más desarrolladas de la América precolombina, antiguos pobladores de México-Tenochtitlán, mantenían una dieta a base de maíz (80% de la dieta **(50)**), jitomate, chile, chayote, jícama, cebolla, chía, amaranto, hueva de mosco, fruta, aves y alga *Spirulina*, entre otros alimentos **(15, 33)**. La *Spirulina* tuvo un papel muy importante para asegurar una alimentación suficiente, correcta y equilibrada **(50)**.

Algunos conquistadores españoles compilaron debidamente todos los animales, plantas y alimentos que encontraron en los nuevos territorios conquistados, tales como: Bernal Díaz del Castillo, el fraile franciscano Bernardino de Sahagún **(18)**, Francisco Hernández y el fraile Toribio de Benavente **(53)**, quienes describieron la recolección por los Aztecas, en cierta épocas del año y en algunos sitios del lago de Texcoco de un lodo muy fino de color azul, el que consistía principalmente de la cianobacteria *S. maxima*, que llamaban “tecuitlatl” (excremento de piedra en náhuatl, sin embargo esto no implica un sentido negativo) nombre que probablemente se sustituyó por el “cocolín”, el cual ponían a secar al sol y comían en pequeñas cantidades con tortilla o lo usaban para condimentar el maíz **(53)**.

El tecuitlatl no fue mencionado a finales del siglo XVI, posteriormente no se menciona nada acerca de este producto, se cree que se debe a la pérdida de las tradiciones posiblemente por los profundos cambios políticos, sociales y religiosos causados por la conquista española **(18)**.



Figura 4.4. Fragmento del Códice Florentino. El Tecuítlatl (9). “... los pobres y los campesinos de los bordes de la laguna recogían sobre el agua misma una sustancia flotante *tecuítlatl* un poco parecida al queso y que exprimían para hacer pan...” (64)

4.4.2.2. El comienzo de la investigación científica sobre la *Spirulina*

Se aisló por primera vez por Turpin in 1872. En 1931, Rich, identificó la *Spirulina platensis* (Arthrospira), como un constituyente del fitoplankton en los lagos del Rift Valley del Este de África (18).

Dangeard describió en 1940 en la revista de la Sociedad Linneana de Bordeaux, una investigación sobre el dihé, consumido por los nativos de la África Ecuatorial Francesa lo que hoy se conoce como la República de Chad. Casi 25 años más tarde, J. Leonard un botánico perteneciente a la expedición belga Trans-Sahara, redescubrió el dihé y realizó el primer análisis del contenido proteico de la *Spirulina*, obteniendo un valor de cercano al 50% de peso seco (17).

Hasta el año de 1967, se observó que la *Spirulina* crecía en grandes cantidades en los tanques de evaporación de la industria Sosa Texcoco, S.A. **(53)**.

En 1976, investigadores de la Oficina de Investigación Científica y Tecnológica Ultramarina de Paris (ORSTOM, por sus siglas en francés), realizaron un estudio sobre los valores nutricionales del dihé para los Kanebouns. A los integrantes del Instituto Francés del Petróleo, le llamó la atención que los kanembous son personas con buen estado físico, sanos, altos y sobre todo, grandes corredores. Esto le hizo interesarse por el aprovechamiento de esta cianobacteria, por que realizaron un nuevo análisis proteico en el cual se obtuvo un rango de 62 a 68% del peso seco, sorprendiendo aún más que el estudio realizado por Leonard era desestimado **(18)**.

4.4.2.3. La producción de *Spirulina* en México

El caracol es un evaporador solar gigante de hélice espiral un embalse de agua formado por un sedimento del Lago de Texcoco, de unos 3.200 m de diámetro y un área superficial de 900 ha (9000000m²) **(24)**, creado el auxilio de investigadores de la UNAM y asistencia técnica de Imperial Chemical Industries. El caracol servía para la evaporación solar de las aguas altamente saladas del lago, parte de un proceso industrial para la elaboración de álcalis **(14)**.

En el año de 1967 se observó que la *Spirulina* se recolectaba en grandes cantidades en los tanques de evaporación **(53)**, por lo que se iniciaron estudios sobre esta cianobacteria. En el mismo año se celebró en México el VII Congreso Mundial del Petróleo, en el cual la empresa entró en contactos con técnicos del Instituto Francés del Petróleo que estudiaban entonces el aprovechamiento en el África Central del Alga *Spirulina*. Por ese motivo en 1973 **(6)** se desarrolló la instalación de una planta piloto semi-industrial con

una capacidad de producción de una tonelada diaria de biomasa deshidratada (6, 52).

Posteriormente se planeaba llegar a una producción de cinco toneladas diarias de Sp. Sin embargo estos planes no pudieron llevarse al cabo debido a que la planta fue abandonada al cerrarse en 1990 la industria madre que la cobijaba (6, 21, 52).

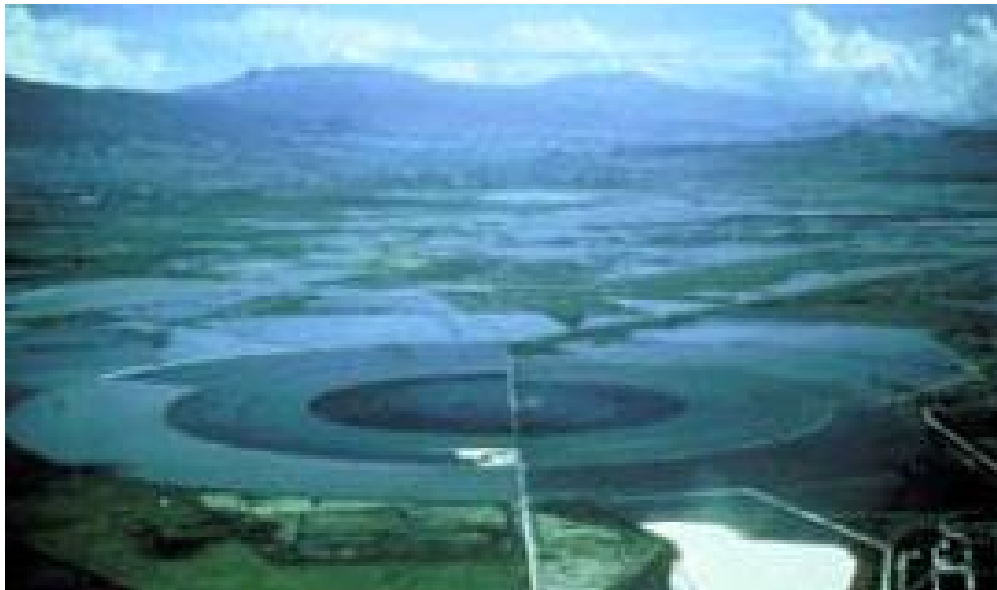


Figura 4.5. El caracol. En el lago de Texcoco (42).

4.4.3. Morfología

La *Spirulina*, es una cianobacteria (azul-verde), cuya clasificación taxonómica es la siguiente:

- Reino: *vegetal*
- Subgénero: *Protofitos*
- Subdivisión: *Sehizophyta*
- Orden: *Nostocales*
- Familia: *Oscillatoriaceae*
- Género: *Spirulina*
- Especie: *maxima*
- Otros nombres: Tecuitlatl (15, 18, 19), cocolín, acuítlatl (25), azoquítl (25), amomoxtlí (25), *Oscillatoria pseudoplatensis* (52), *Artospira*

maxima (18, 52) siendo el más actual y conocido *Spirulina maxima* (18).

La *Spirulina* es una cianobacteria, de filamento helicoidal (configuración que le da su nombre); su cadena espiral tiene de 5 o 6 torsiones. Tiene un largo de 200-300 μ m y un ancho de 5-10 μ m (15).

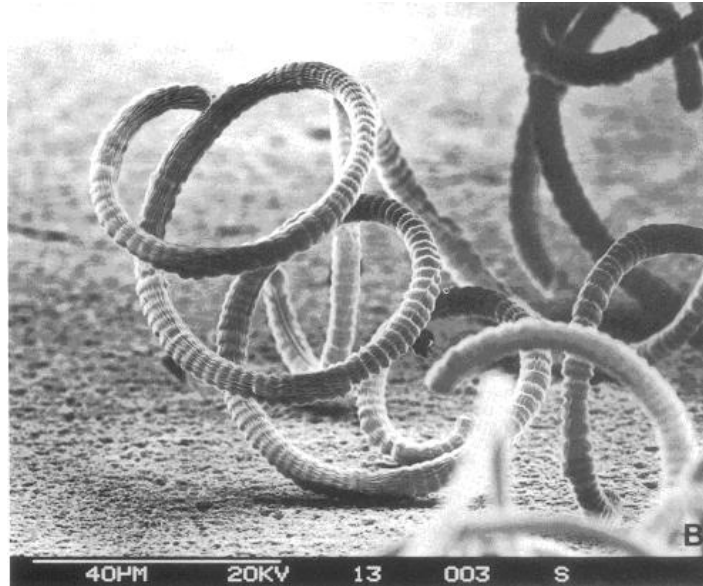


Figura 4.6. Morfología de la *Spirulina platensis*. (18).

Es una de las formas de vida más antiguas que se desarrollan en aguas alcalinas de lagos volcánicos sobre la tierra, por los últimos 3' 500 millones de años aproximadamente (39).

4.4.4. Distribución

La *Spirulina* tiene un crecimiento óptimo en aguas saladas, pero son muy pocas las especies que crecen en el mar por el bajo contenido de carbonatos y elevadas concentraciones de calcio y magnesio que inhiben su crecimiento; crece en forma natural en lagos alcalinos con altas concentraciones de sales minerales compuestas por bicarbonatos y carbonatos de sodio (18, 19, 53). Al parecer posee la capacidad de adaptación a muchos hábitats y colonizar

ambientes en los que otros microorganismos tendrían problemas para sobrevivir.

Se encuentra como *S. platensis* población normal en lagos alcalinos de África y *S maxima* se desarrolla en el lago de Texcoco

La *Spirulina spp* (*Arthrospira spp*) se desarrolla en forma natural en numerosos lugares, aparte de los ya mencionado anteriormente, como en lagos de África, principalmente en Kenia, Etiopía, Egipto, Sudán, Argelia, Congo, Zaire y Zambia. Se la encuentra además en Asia tropical y subtropical (India, Myanmar, Pakistán, Sri Lanka, China, Tailandia y Rusia), en América (Perú, Uruguay, California) y en Europa (España, Francia, Hungría y Azerbaijón) **(53)**.

Su cultivo en sistemas artificiales cerrados se desarrollo en Japón, Tailandia, China, Taiwán, Israel, USA, Cuba, Brasil, Colombia y Perú **(19)**.

4.4.5. Capacidad nutritiva

Los cronistas españoles y ecologistas actuales confirman la presencia de una abundante población de aves en lagos que contienen *Spirulina*, especialmente cuando la cianobacteria es más abundante **(18, 70)**.

El análisis químico proximal (ANEXO II) proximal muestra que contiene un alto contenido proteínico. La composición del medio de cultivo influye determinantemente en los nutrientes **(15)**.

4.4.5.1. Proteínas

Spirulina maxima, posee un contenido de proteínas que oscila entre 60-70% en materia seca **(15, 58, 70)**. Las proteínas que contiene, muestra una composición de aminoácidos muy semejante a la yema de huevo, considerado el aminograma tipo por la FAO **(15)**.

4.4.5.2. Lípidos

El contenido en grasa de la *Sp*, es sólo del 5%, se ha reportado que el 75.7% son ácidos grasos y del total los ácidos grasos esenciales insaturados se encuentran en un promedio de 62.16%, siendo los más abundantes el linoleico y el linolenico **(19)**.

Otros autores reportan un contenido de 3-6.5% de ácidos grasos **(53)**. Una descripción más detallada sobre el contenido de ácidos grasos que contiene la *Spirulina* se puede ver en el ANEXO IV.

4.4.5.3. Carbohidratos

La *Sp* contiene entre 10-15% de carbohidratos; siendo la ramnosa uno de los que se encuentran en mayor cantidad **(19)**. En el ANEXO V, se presentan los carbohidratos presentes en la *Sp* y los porcentajes en los que se encuentran.

4.4.5.4. Pigmentos

Entre los pigmentos contenidos por la *Sp* se encuentran **(20, 31, 53, 58)**:

- Clorofila (A y B en una porción de 3:1) 7.5 g/kg masa seca
- Ficobilinas:
 - C-ficocianina
 - C-ficoeritrina
 - Alocianina
- Carotenos (4 g/kg de masa seca)
 - β -caroteno (26%)
 - Equinona (7%)
 - Mixoxantofila (24%)
 - β -caroteno-5,6-epóxido (5%)
 - Criptoxantina (23%)
 - Zeaxantina (9%)

4.4.5.5. Minerales y vitaminas

La *Sp* contiene una gran cantidad de vitaminas y minerales, entre ellos Mg, Se, Vitamina C, B12, E, además de una pequeña porción de ácidos nucleicos (3%) **(25, 31, 53, 58)**. Para una descripción más completa de las minerales y vitaminas que contiene ver el ANEXO V.

4.4.6. Usos

La *Spirulina* es y ha sido empleada como fuente de colorantes y aditivos en las industrias farmacéuticas y alimentación **(17)**.

Se reportan “buenos resultados” en atletas alimentados diariamente con *Spirulina*. Además de resultados favorables en estudios en niños o infantes desnutridos **(18)**.

Se ha encontrado que la *Spirulina* tiene acción hipocolesterolémica en ratas y humanos **(56, 58)**, disminuye el riesgo de cáncer, modifica la flora intestinal, pérdida de peso, ayuda en casos de desnutrición, presenta actividad antitumoral además de prevenir la formación de hígado graso en ratones y ratas **(58)**.

Reportes previos muestran que un extracto de *Sp* es un potente recolector de radicales libre (radicales hidroxilo y peróxido), además inhibe la peroxidación de lípidos microsomales **(71, 69)**.

La ficocianina presenta actividad antioxidante y antiinflamatoria **(38)**, la ficocianina es estructuralmente similar a la bilirrubina. Nagaoka et al. mostró la primera evidencia de que la ficocianina de *S. platensis* es una proteína con propiedades hipocolesterolémicas.

Además, estudios previos realizados por el laboratorio muestran que en ratas, *S. maxima* previene el desarrollo de hígado graso inducido por una dieta rica en fructosa por una dosis i.p. de tetracloruro de carbono **(58)**.

En la ANEXO VI, se muestra un resumen de una revisión reciente realizada por Chamorro et al **(17)**.

4.4.7. Toxicología

Estudios a corto, mediano o largo plazo en animales de laboratorio demuestran que no produce efectos indeseables **(17)**. Estudios toxicológicos y nutricionales han demostrado que es adecuada para el uso como complemento alimenticio.

Actualmente son muchas las publicaciones que han mostrado tener efectos benéficos, sin embargo, falta mucho para elucidar las propiedades completas de este microorganismo.

5. METODOLOGÍA

5.1. MATERIAL

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

- Ratas cepa Wistar, macho, con un peso de 150-200 g, provistas por el Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM.

REACTIVOS

- 2, 4-tert-butil-4-metilfenol (BHT), Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo).
- Ácido cítrico, Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo).
- Ácido clorhídrico (HCl), Merck (México).
- Ácido etilen diamino tetracético (EDTA), Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo).
- Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4), Merck (México).
- Ácido tiobarbitúrico (ATB), Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo.)
- Azul de Coomassie G-250 (Pierce Chem).
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3), J.T. Baker (México).
- Citrato de sodio, Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo).
- Cloroformo, Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo).
- Cloruro de hidroxilamina. Merck (Darmstadt, Alemania).
- Estreptozotocina (STZ), Sigma Chemical, Co (St. Louis Mo.)
- Metanol.EMD (Canadá).
- Nitroazul de tetrazolio (NBT).
- Paquete enzimático para la determinación de Colesterol total (CT), Jass.
- Paquete enzimático para la determinación de glucosa, Spinreact.
- Paquete enzimático para la determinación de la alanina amino transferasa (ALT), Jass.
- Paquete enzimático para la determinación de Triacilgliceroles (TAG), Jass.
- *Spirulina maxima* deshidratada, "Spirulina Mexicana, S.A. de C.V." (México, D.F.).
- Tetraetoxipropano (TEP), Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo.).
- Tris, Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo).
- Triton 10-X, Sigma Chemical, Co. (St. Louis, Mo).

MATERIALES DIVERSOS

- Bebederos con punta de acero inoxidable
- Cajas de polietileno con reja

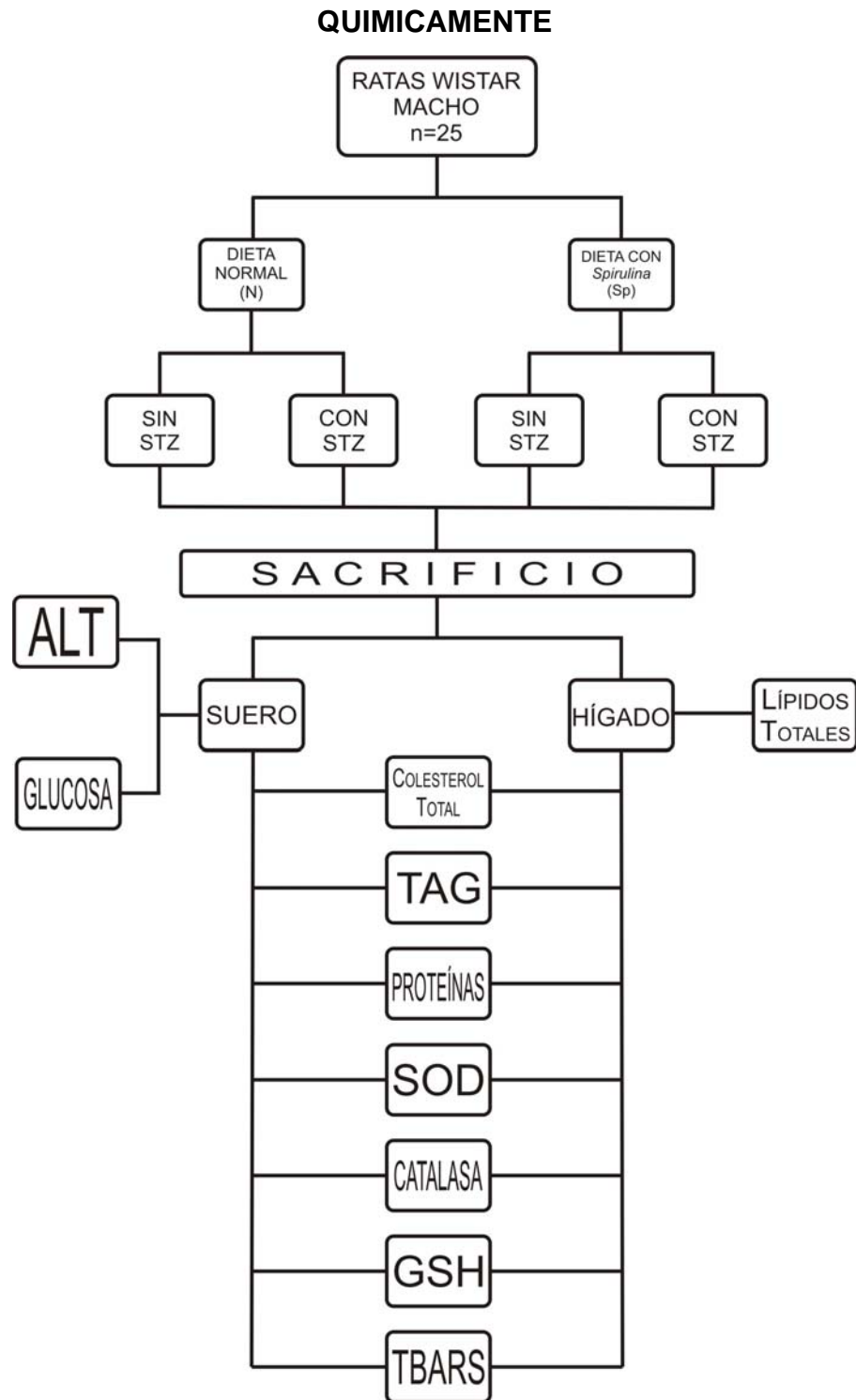
- Jeringas de 1mL
- Tiras reactivas para la determinación de glucosa (Accutrend, Roche)
- Celdas de cuarzo de 0.5 mL y 1 mL
- Pipetas Pasteur.
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon 50 mL

EQUIPO

- Balanza analítica (Sartorius)
- Balanza granataria (ADAM)
- Centrifuga Centra-MP4R, IEC.
- Espectrofotómetro DU-640, BECKMAN.
- Glucómetro (Accutrend, Roche)
- Homogenizador PT 10-35, POLYTRON.
- Micropipetas.

Con el objetivo de determinar la dosis de STZ ideal para inducir rápidamente y con mayor rendimiento diabetes experimental en ratas, se realizó una curva dosis-respuesta de STZ-glucemia durante 7 días a las siguientes concentraciones: 35,45 y 60 mg/kg de peso. Seleccionándose para la realización del experimento principal 60mg/kg.

Diagrama 1. DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE *Spirulina maxima* EN RATAS CON DIABETES INDUCIDA



5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

- a) Aclimatación. Con el propósito de que las ratas (macho cepa Wistar de 150-200 g), se adecuaran a la dieta y al “habitat”, un total de 25 animales se distribuyeron de la forma como se indica la tabla 6.1. Los grupos se alimentaron por 5 días con dietas purificadas correspondientes, en raciones de 20 g/rata/día (tabla 6.1). La *Spirulina* se incluyó en las dietas en forma deshidratada en una cantidad de 5% de *Spirulina*. El agua se les suministró *ad libitum*. Se mantuvieron en períodos de 12 h luz-oscuridad y en jaulas con tres ratas, (a excepción de la jaula N+STZ-B que fueron 4 ratas) cada una colocada en forma aleatoria. Al quinto día de la aclimatación, se realizó el tratamiento con STZ.

TABLA 5.1.
ETIQUETAS CORRESPONDIENTES A LOS TIPOS DE
DIETA Y AL TRATAMIENTO

Dieta y tratamiento	Subgrupo	Número de animales
N	A	3
	B	3
Sp	A	3
	B	3
N+STZ	A	3
	B	3
Sp+STZ	A	3
	B	4

N = dieta normal, Sp = dieta purificada con *Spirulina maxima* deshidratada, N+STZ = dieta normal y tratadas con STZ, Sp+STZ = Dieta purificada con *S. maxima* y tratadas con STZ. . A y B se refieren a la etiqueta de la jaula.

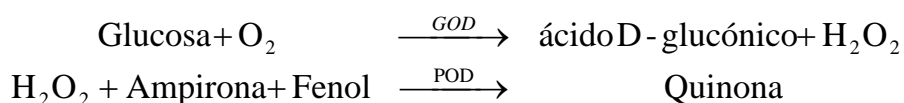
b) Inducción de la Diabetes. A los grupos Sp+STZ y N+STZ se administró por vía intraperitoneal una sola dosis de 60 mg/kg de peso corporal de STZ disuelta en amortiguador de citrato pH 4.5, como vehículo. Los dos grupos restantes (Sp y N), se les administró, por la misma vía, el vehículo.

Durante 21 días después del desafío se les continuó alimentando con la dieta correspondiente al igual que agua *ad libitum*.

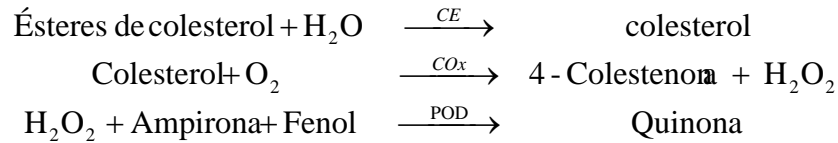
i) **Determinación de glucosa por tiras reactivas.** Cada tercer día después del desafío, se les retiró el alimento durante 6 horas aproximadamente; posteriormente al ayuno, se determinó a cada rata la glicemia a través de tiras reactivas, realizando un pequeño corte en la cola del animal.

c) **Obtención del material biológico.** Después de 21 días posteriores a la inducción a la diabetes, las ratas se sometieron a ayuno de 12 h mínimo, previo al sacrificio. Los animales se pesaron y se determinó por última vez la glicemia por medio de tiras reactivas. Posteriormente se sacrificaron por decapitación; simultáneamente se recolectó la sangre en tubos con heparina. Obtenida esta se centrifugó a 3,150xg durante 15 min para obtener el suero. El hígado se disecó, se determinó el peso total y se almacenó a -78 °C hasta su análisis.

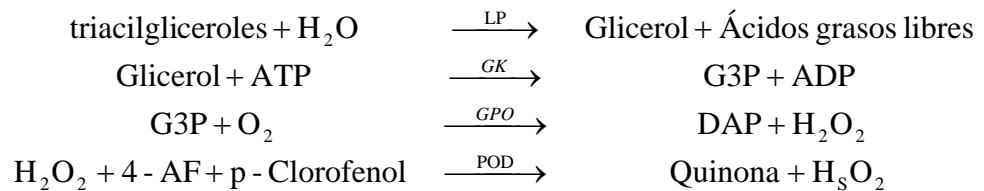
d) **Determinación colorimétrica de glucosa.** Esta determinación se realizó por medio del paquete enzimático (SPINREACT), por el método GOD-POD.



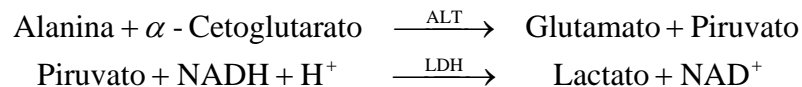
e) **Determinación de Colesterol Total (CT).** Se empleó el paquete comercial Jass.



f) **Determinación colorimétrica de Triacilgliceroles (TAG).** Para esta cuantificación se utilizó el paquete comercial Jas.

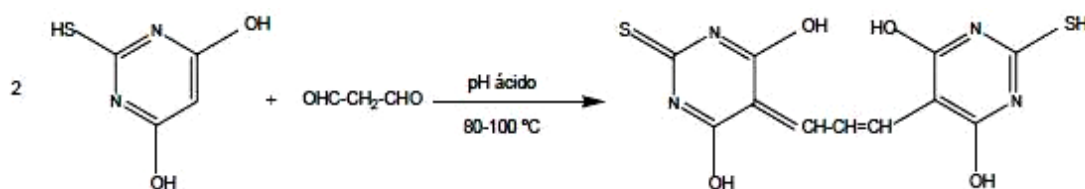


g) **Determinación cinético-enzimática Alanina aminotransferasa (ALT).** Para ello se empleó el paquete comercial Jas.



h) **Lipoperoxidación (TBARS).** Para la determinación se colocó una alícuota de 150 μL de suero en seguida se le agregó 150 μL de HCl 0.6 N y 1 mL de TBA 0.12M en tris(hidroximetil-aminometano) 0.026 M. Se llevó a baño María a ebullición por 10 min, los TBARS se determinaron a una longitud de onda de 535 nm. Se elaboró una curva estándar con 2.2 – 22 μg de tetraetoxipropano (TEP) que equivalen a 0.72 – 7.2 μg de malondialdehído (MDA), bajo las mismas condiciones de experimentación. Los resultados de la muestra son interpolados en la

curva de TEP y es reportada en concentración de MDA. La determinación de sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico reacciona mayoritariamente con compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas), entre las principales sustancias con las que reacciona es el MDA, el aldehído más abundante que se produce en la lipoperoxidación. El MDA reacciona con el TBA para producir un compuesto de color rojizo detectado por espectrofotometría. El TEP se utiliza como patrón ya que su hidrólisis ácida produce MDA en una reacción equimolar (28).



- i) **Determinación de SOD:** Por el método de Kono o reducción de NBT, se colocó 25 µL de muestra, 25 µL de Tritón – X100, 0.6%, 25 µL de EDTA 0.1M, carbonato de sodio 50mM. Se incuba la muestra a 37°C por 10 min, se coloca hidrocloreuro de hidroxilamina 20 mM se mide absorbancia a 560 nm y se mide cambio de absorbancia cada minuto durante 5 min.
- j) **Determinación de catalasa:** Por el método de Aebi, o reducción de H₂O₂, se coloca 10 µL de la muestra, 635 µL de amortiguador de fosfatos, 335 µL de H₂O₂ 0.03 M. Se mide absorbancia a 240 nm cada minuto durante 5 min.
- k) **Determinación de proteínas. Método de Bradford (azul de Coomassie G).** La concentración de proteína en las muestras se determinan utilizando el método de Bradford, en el cual se elaboró una curva de calibración con albúmina bovina (BSA) (1 mg/ml), cada

concentración se realizó por duplicado. Para la determinación de proteínas, se colocó 5 μ L de suero, se afora con agua bidestilada hasta 100 μ l y se agrega 2.5 mL de reactivo de Bradford, cada muestra por duplicado, se agitan las muestras en vortex y se mantienen en oscuridad por 10 min. Se mide absorbancia a 595 nm en celdas de 1 mL de plástico.

Con los resultados de absorbancia de la curva patrón se realizó un promedio con los duplicados, posteriormente se trazó una gráfica de Absorbancia. vs Concentración y a partir de está se realizó una regresión lineal. Los resultados de absorbancia por la muestra fueron interpolados en la curva de albúmina para la determinación de la concentración de proteína.

- l) **Preparación de tejido.** Un porción de hígado, de aproximadamente 0.5-1.0 g de peso, se homogenizó en amortiguador de fosfatos (NaHPO_4) 0.02M pH 7.2 (1:4, p/v, tejido/amortiguador), en un homogenizador (POLYTRON) a velocidad media durante 3 min.

- m) **Extracción de lípidos de hígado:** Por el método de Folch, El producto homogenizado se coloca en un embudo de separación con 20 mL de mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ (3:1, v/v). Para cada muestra se hacen tres extracciones con la mezcla. Las fases se separan con centrifugación a 2500 rpm por 5 min y la fase orgánica se colecta en viales con tapa de teflón. Sin evaporar la tercera extracción se colectan 20 mL para ser lavado con 10 mL de agua destilada. La fase clorofórmica se trata con sulfato de sodio anhídrido para eliminar las trazas de humedad. El extracto se lleva a la sequedad a 40°C bajo corriente de N_2 . La cantidad de lípidos totales se determina gravimétricamente Al extracto orgánico se determino CT, TAG, TBARS por los métodos anteriormente dicho.

n) **Determinación de la concentración de proteínas en hígado.** Una alícuota de 30 μL de homogenizado se diluyeron con 70 μL de agua destilada. De esta última disolución se tomaron 30 μL para el ensayo. El procedimiento de cuantificación se describió anteriormente en el inciso h.

o) **Análisis estadístico.**

Las pruebas estadísticas se realizaron considerando un intervalo de confianza del 95%, de los datos obtenidos de la población estudiada mediante el uso de los programas estadísticos siguientes:

- SPSS 10.0 for Windows, standard version. Copyright© SPSS Inc., 1989-1999.
- GraphPad Prism Version 4.0. Copyright© GraphPad Software Incorporated, 1994-1996.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EFFECTO DE *Spirulina maxima* SOBRE LA GLUCEMIA

En la figura 7.1 (A) y (B) se presenta la gráfica de la concentración de glucosa en sangre en los animales tratados. Como se puede apreciar la concentración de glucosa del grupo N+STZ es muy superior a 187 mg/dL (intervalo de referencia (IR) en ratas Sprague Dawley 82-187 mg/dL) **(69)** esto mostró que la STZ actúa como agente diabetogénico **(3, 41, 65, 66, 70)**. Lo que resulta más evidente al compararlo con su grupo control (N).

Los resultados muestran claramente una mejoría sustancial en la glucemia en los animales con DM experimental y alimentados con *Spirulina* (Sp y Sp+STZ), al compararlo con el grupo N+STZ. La glucemia del grupo N+STZ es casi siete veces mayor que el grupo N y poco más de 5 veces mayor que los grupos Sp y Sp+STZ.

El grupo Sp+STZ no supera el valor superior del IR, este grupo presenta una diferencia significativa con el grupo N+STZ. En la determinación de glucosa por ambos métodos (tiras reactivas y kit enzimático).

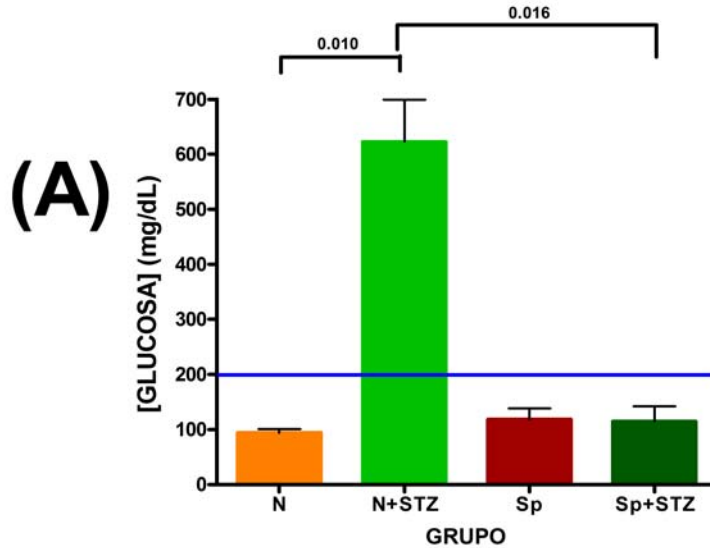
El efecto antihiper glucemiante de la Sp observado en el presente estudio ha sido comprobado por autores como Lima Araujo y Hoyosomada **(34, 45)** en ratas tratadas con aloxana, además también se ha observado en humanos en estudios realizados por Parik, Mani e Iyer **(30, 51)**.

Varias teorías validan el potencial antihiper glucémico de *Spirulina*. Una de estas teorías atribuye este efecto a su contenido de fibra. La viscosidad de la fibra se ha propuesto como el principal mecanismo. La evidencia sugiere que la capacidad de la fibra para formar geles disminuye el rango de absorción de glucosa, consecuentemente mejorando el nivel de glucemia. Otra teoría sugiere el papel de las proteínas de la Sp. Las proteínas de la dieta por sí

mismas estimulan la secreción de insulina. Así la ingestión de proteínas de la Sp tiene un efecto secretagogo de la insulina resultando en la reducción de la glucemia postprandial **(30)**. Sin embargo esta teoría es poco factible para explicar este fenómeno antihiper glucémico en este estudio, ya que la STZ destruye las células β productoras de la insulina.

Un grupo de investigadores observaron que extractos de Sp, hojas de diversas plantas, y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) presentan antígenos similares a la insulina detectado por Western blot después de SDS-PAGE. La posición de las bandas sugiere que los materiales teñidos tienen el mismo peso molecular que la insulina bovina. Esta teoría podría ser fácilmente aceptada si al purificar estos compuestos se realiza un estudio de actividad farmacológica **(41)**.

CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO (KIT ENZIMÁTICO)



CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN SUERO (TIRAS REACTIVAS)

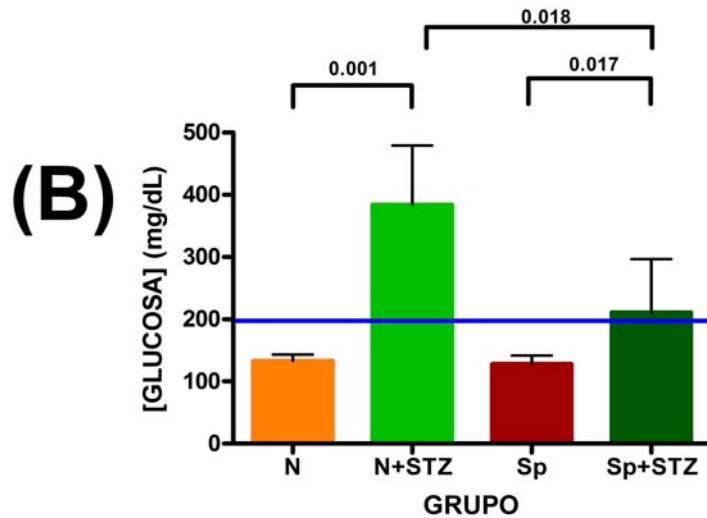


FIGURA 7.1. Efecto de la Sp en la glucemia de ratas diabéticas. (A) Determinación de la glucemia por medio de un kit enzimático Spinreact. (B) Determinación de glucemia por medio de tiras reactivas. Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

TABLA 7.1. Efecto de <i>S. maxima</i> en suero.				
GRUPO	[GLUCOSA] (TIRAS REACTIVAS) (mg/dL)	[GLUCOSA] (KIT ENZIMÁTICO) (mg/dL)	[TAG] (mg/dL)	[CT] (mg/dL)
N	133.3±10.13	93.72±7.284	46.50±10.11	43.39±5.06
Sp	128.7±13.38	118.1±19.96	36.33±8.22	37.44±8.51
N+STZ	384.4±94.37	622.4±76.95	61.58±20.29	48.36±12.51
Sp+STZ	211.0±85.78	114.5±27.81	32.90±16.47	37.25±7.45

Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

La Tabla 7.1 y la figura 7.2 muestran los resultados del perfil de lípidos en sangre. Los TAG y CT en sangre se encuentran dentro del intervalo de referencia para ambos analitos en todos los grupos; sin embargo existe una diferencia significativa entre N+STZ y Sp+STZ en TAG. Además en CT presenta incrementos de 11 y 30% con respecto a los mismos grupos. Los animales alimentados con *Spirulina* presentan valores más bajos que sus contrapartes (N y N+STZ). Se han reportado que fracción soluble de *Spirulina*, reduce los niveles de colesterol, TAG y C-LDL, en suero y en hígado de ratas (12, 39). En la tabla 7.1, se observa un incremento del 32 y 82% en TAG del grupo N+STZ con respecto a los grupos N y Sp+STZ respectivamente. Además en CT presenta incrementos de 11 y 30% con respecto a los mismos grupos. Los animales alimentados con Sp presentan valores más bajos que sus contrapartes (N y N+STZ).

Se ha reportado que la dieta con *Spirulina* en pacientes con DM resulta en la reducción de los índices aterogénicos (51, 72, 73). Estos resultados indican el efecto benéfico de la alimentación con *Spirulina* en la prevención de las complicaciones secundarias en la DM tipo 2. La función reductora se puede

atribuir a su capacidad de incrementar la actividad de la enzima lipoproteínlipasa **(36)** disminuyendo las concentraciones de lípidos en suero. Los resultados obtenidos para las determinaciones de TAG y CT, figura 7.2 (A) y (B) respectivamente, muestran una diferencia significativa entre los grupos N+STZ y Sp+STZ.

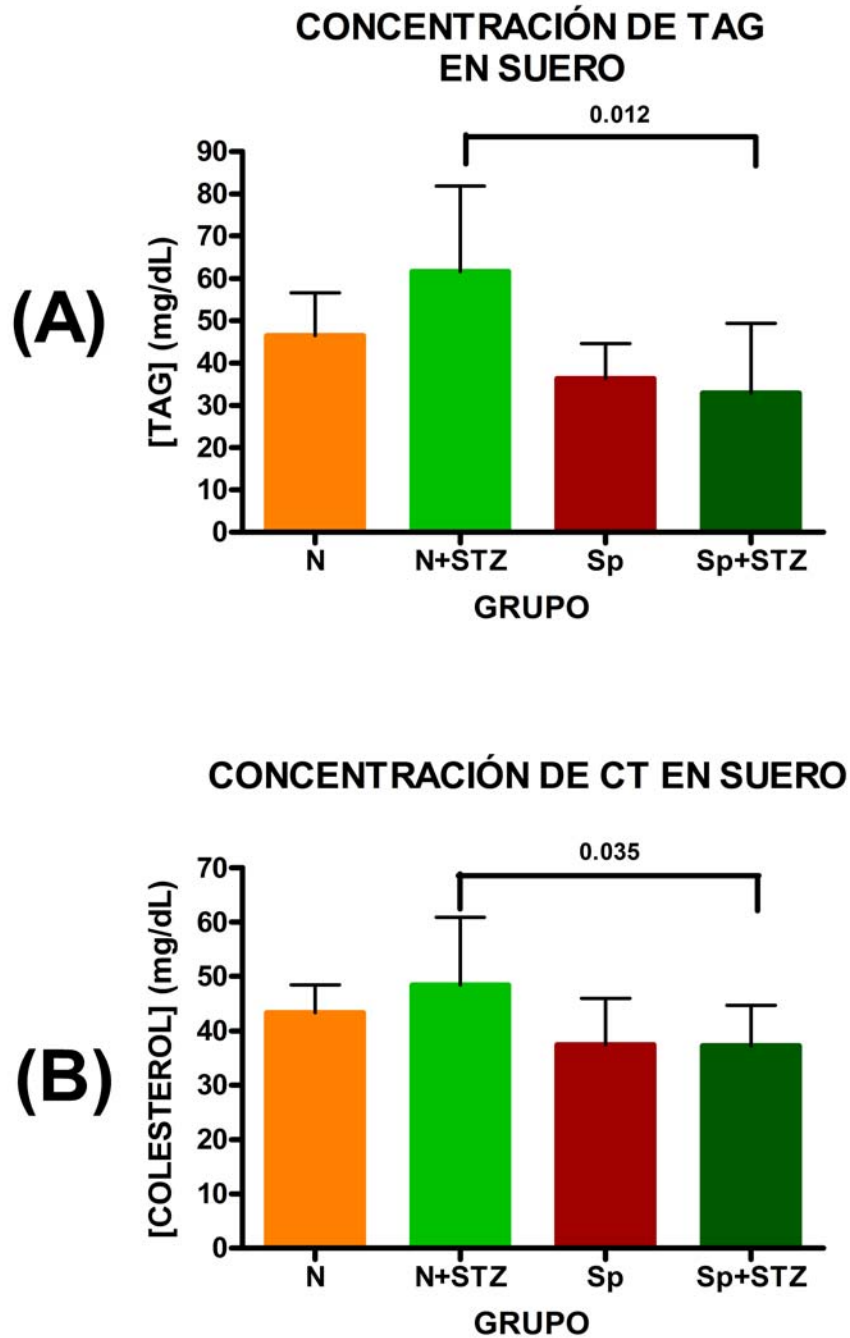


FIGURA 7.2. Efecto de la Sp sobre la concentración de lípidos plasmáticos. (A) Concentración de TAG en suero. (B) Concentración de CT en suero. Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

EFEECTO DE *Spirulina* SOBRE ALT EN RATAS DIABETIZADAS

En la figura 7.3 (A) se muestra la gráfica de la actividad de ALT en suero y los resultados se muestran en la tabla 7.2. La actividad de ALT determinada para el grupo N+STZ es claramente mucho mayor que los otros grupos es 90% mayor. Se observó una diferencia significativa del grupo N+STZ con su control N; además se observa también una diferencia significativa entre N+STZ y Sp+STZ. Los resultados de este parámetro se encuentran contenidos en la tabla 7.2 y en la figura 7.3 (A). Nos muestran que los niveles de esta enzima se encuentran dentro de los niveles de referencia **(69)**. Ninguno de ellos muestra daño hepático, sin embargo, entre los grupo N, Sp y Sp+STZ, se puede apreciar que no hay una diferencia notoria, comprobada por el análisis estadístico correspondiente; pero si existe diferencia entre N+STZ y su control, N, además, de la diferencia significativa que se presenta entre N+STZ y Sp+STZ, se podría afirmar que la Sp ofrece un efecto hepatoprotector, es decir, la STZ origina RL sólo unas cuantas horas después de la administración, por lo que el daño por EOx en el hígado es originado principalmente por la hiperglucemia **(63)**, como se puede observar al comparar al grupo de ratas diabéticas alimentadas con Sp y su control sin Sp, N+STZ **(72, 73)**. Además, la actividad de esta enzima se estudio 30 días posteriores al desafío con STZ, lo que explicaría que los niveles de esta enzima se encuentren en el intervalo de referencia, indicando que ya no existe una liberación masiva de la enzima por muerte celular. Debe comentarse que esta enzima se encuentra en todas las células, incluyendo a las de los islotes β pancreáticos, y que la muerte de estas células también produciría incremento en su actividad plasmática.

TABLA 7.2. Efecto de la dieta con <i>S. maxima</i> sobre la actividad enzimática en suero			
GRUPO	ACTIVIDAD DE ALT (U ALT/L)	ACTIVIDAD DE CATALASA (K/mL suero)	ACTIVIDAD DE SOD U SOD/mL SUERO
N	25.81±7.35	2.17±0.77	1.92±0.06
Sp	22.99±5.92	2.70±0.84	1.93±0.02
N+STZ	49.03±18.22	0.49±0.21	1.79±0.15
Sp+STZ	23.87±10.95	2.49±0.60	1.93±0.02

Valores en mg/dL ± desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

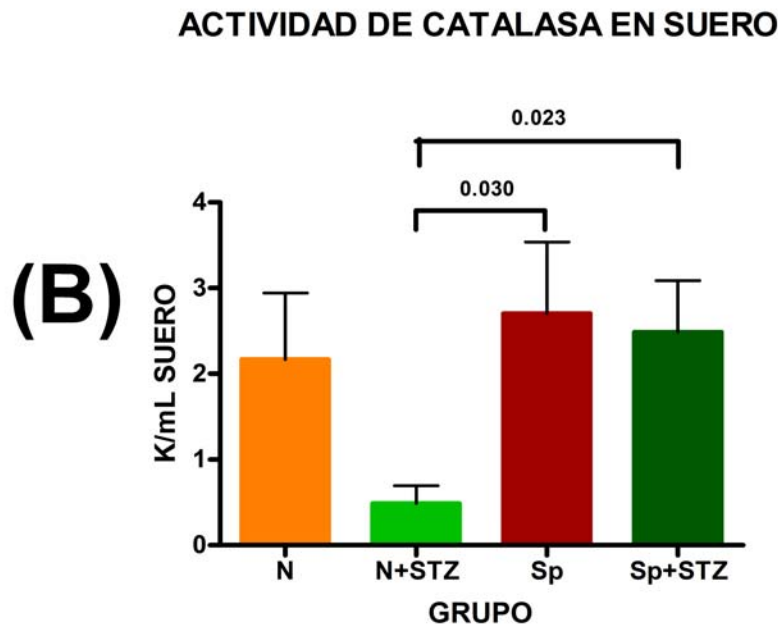
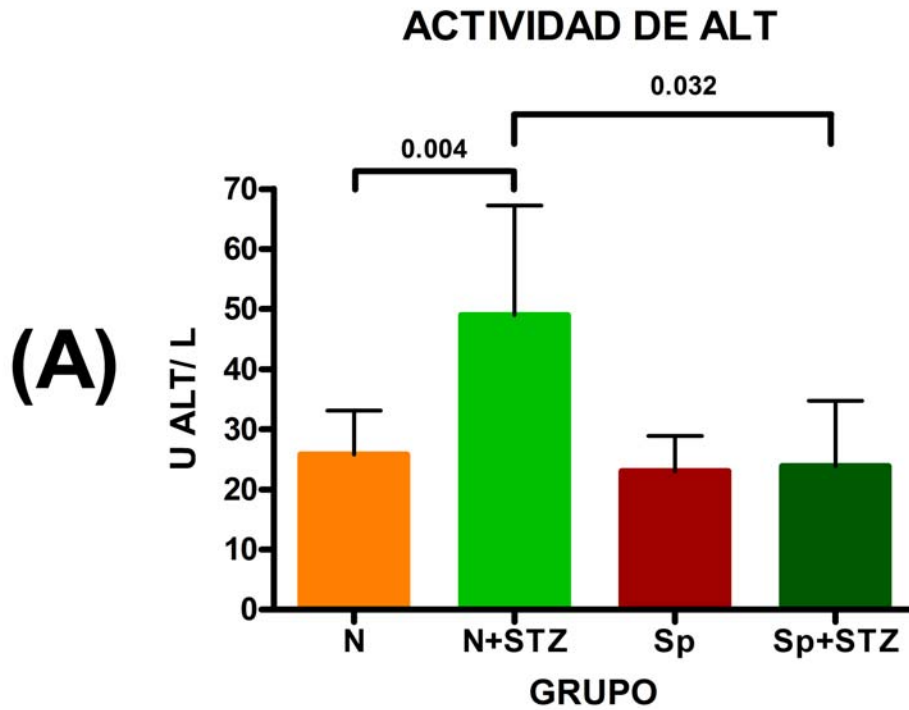


FIGURA 7.3. (A) Cuantificación de la actividad de ALT en suero. (B) Cuantificación de la actividad de catalasa en suero. Efecto de la Sp en la actividad enzimática de ALT (alanin amino transferasa) y catalasa. Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

BIOMARCADORES DE ESTRÉS DE OXIDATIVO

En la actualidad se ha incrementado la evidencia tanto en estudios clínicos como experimentales que sugieren que el EOX juega un papel importante en el desarrollo de las complicaciones de la DM **(47)**.

Catalasa (CAT)

La figura 7.3 (B) presenta la gráfica de la actividad de catalasa en suero, y en la Tabla 7.2, se muestran los resultados. Como se puede apreciar los niveles de catalasa difieren con la dieta suministrada. Los grupos alimentados con *Spirulina*, Sp y Sp+STZ, son mayores a sus contrapartes N y N+STZ, respectivamente. Sp+STZ es poco inferior a su control, Sp. En la Tabla 7.2, se puede apreciar que N+STZ es aproximadamente 4 veces menor que el resto de los grupos evaluados. Existe una diferencia significativa entre N+STZ y Sp+STZ ($p < 0.05$).

Superoxido dismutasa (SOD)

Con respecto a la actividad de SOD en plasma. La Tabla 7.2 muestra los resultados obtenidos para esta evaluación y en la Figura 7.4 (A), se muestra la gráfica correspondiente. El análisis estadístico, nos permite apreciar que existe una diferencia significativa entre N+STZ y Sp+STZ en donde la menor actividad se encontró en el grupo N+STZ.

Se ha visto que tratamientos combinados con vitamina C, E y β -caroteno, durante cuatro semanas no invierten o normalizan los niveles de actividad de catalasa **(48)**.

La disminución en la actividad de las enzimas de defensa antioxidante pudo haber sido causado por el incremento de las EOR, numerosos reportes sobre el tema señalan que cuando estas especies se acumulan contribuyen a la reducción de la actividad enzimática antioxidante. Los resultados que se

obtuvieron de la actividad de la enzima SOD (figura 7.4 (A) y tabla 7.2), nos muestran que no hay cambios considerables entre los grupo, solamente se puede apreciar que el N+STZ es inferior al resto de los grupos incluyendo su control, además, el análisis estadístico revela que existe una diferencia significativa entre los grupos N+STZ y Sp+STZ.

El análisis de los reportes previos sobre la actividad de esta enzima en diabetes experimental no son contundentes, no permiten apreciar si existen diferencias con el género, especie de los animales empleados, o la duración de la diabetes **(47)**.

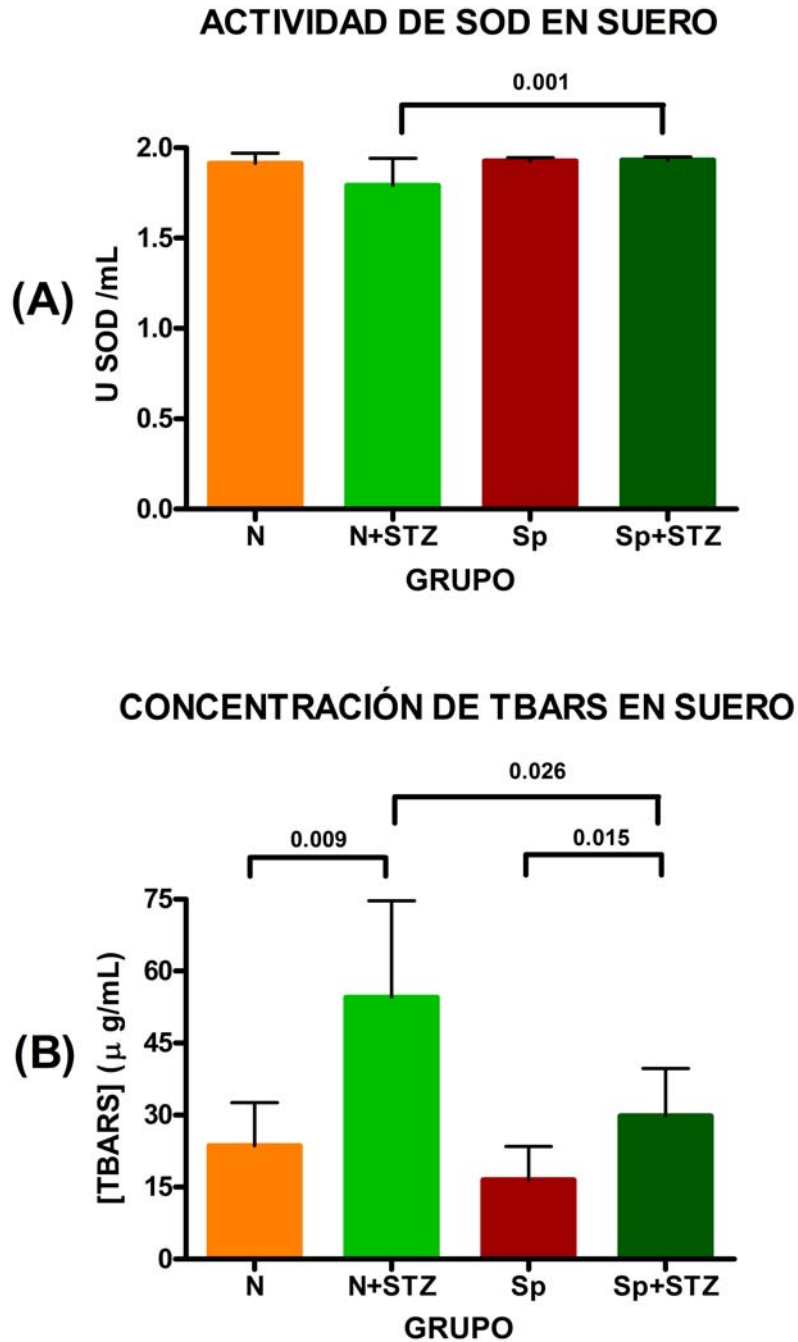


FIGURA 7.4. (A) Efecto de la Sp sobre los niveles de SOD (superóxido dismutasa) y la concentración de TBARS en suero (B). Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

Liperoxidación (TBARS)

La inducción de diabetes en roedores con STZ presenta incrementos en TBARS, siendo una evidencia indirecta de la producción de RL **(1, 47)**.

La determinación TBARS, que se presenta en la figura 7.4 (B) y los resultados en la Tabla 7.3, muestra que la concentración de TBARS en suero, el grupo N+STZ presenta un incremento del 231% y 183% con respecto a los grupos N y Sp+STZ. Además este grupo presenta una diferencia significativa con Sp+STZ. Los valores de TBARS fueron significativamente superiores en animales diabéticos al compararlos con los sanos.

Frecuentemente se ha observado que la acumulación de TBARS puede revertirse por tratamiento combinados entre vitamina C, E y β -caroteno **(48)**.

La ficocianina, un antioxidante importante que constituye la *Spirulina* inhibe el incremento de lipoperóxidos *in vitro* e *in vivo* en ratas. La ficocianina en concentración de 200 mM inhibe aproximadamente 95% de radicales peroxilo que inducen la liperoxidación. La ficocianina nativa y reducida inhibe la liperoxidación en la misma extensión **(29)**.

TABLA 7.3. Efecto de la dieta con <i>S. maxima</i> sobre lipoperoxidación en plasma.	
GRUPO	[TBARs] (µg/mL suero)
N	23.67±8.90
Sp	16.52±6.92
N+STZ	54.62±20.06
Sp+STZ	29.83±9.91

Valores en mg/dL ± desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

EFECTO DE *Spirulina maxima* EN EL HÍGADO DE RATAS DIABETIZADAS

Lípidos totales

En la figura 7.5 (A), se presentan los resultados de la cuantificación de lípidos totales en hígado.

TABLA 7.4. Perfil de lípidos en hígado.			
GRUPO	LÍPIDOS TOTALES (mgLT/g hígado)	[TAG] (µgTAG/mg hígado)	[COLESTEROL TOTAL] (µgCT/mg hígado)
N	49.04±12.98	12.50±5.86	30.17±15.92
Sp	51.63±15.47	15.96±7.14	38.33±11.41
N+STZ	56.84±13.49	12.84±5.16	26.99±9.67
Sp+STZ	55.42±3.36	21.56±8.8	34.44±9.89

Valores en mg/dL ± desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

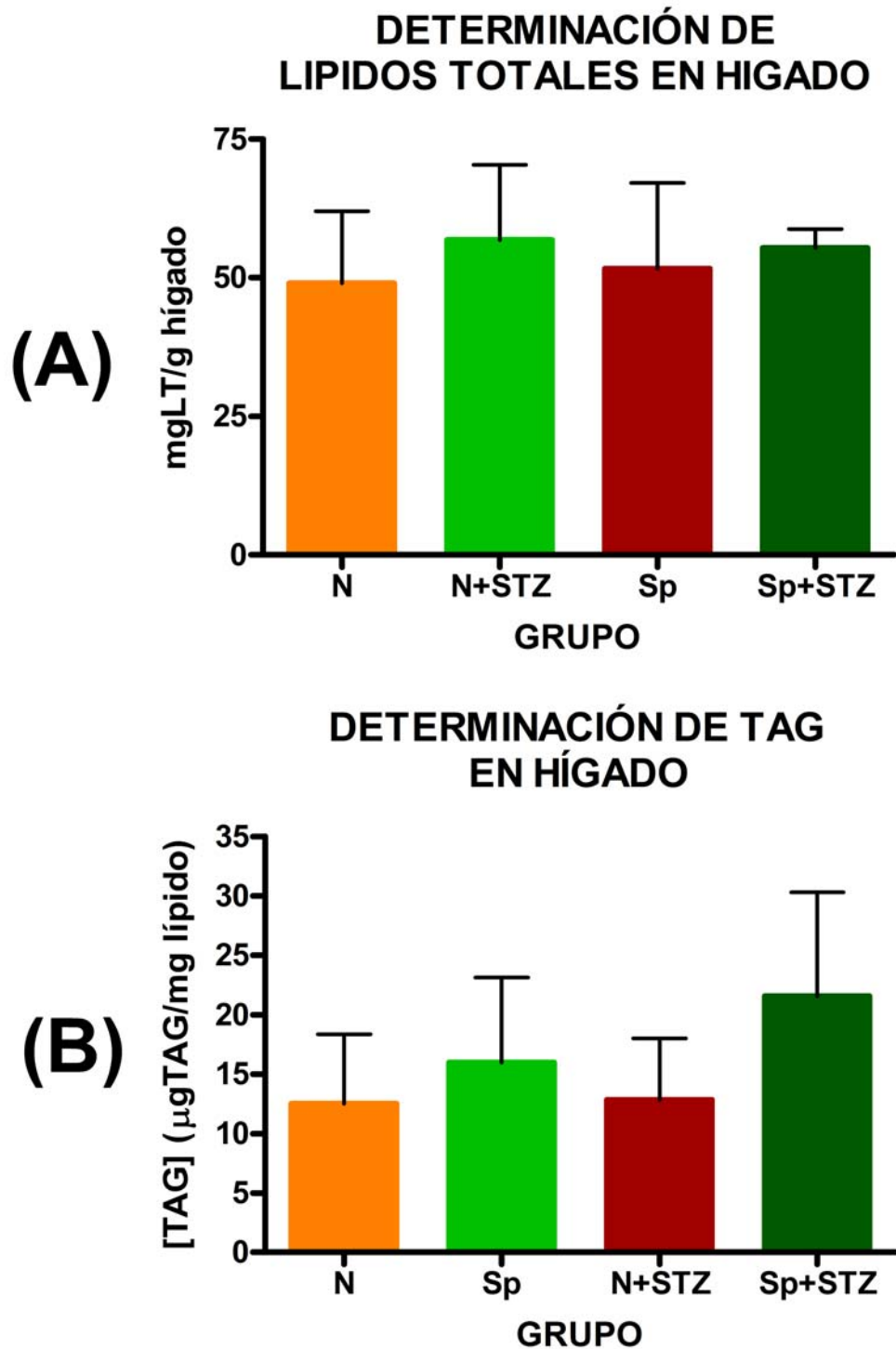


FIGURA 7.5. (A) Cantidad de lípidos totales en hígado. (B) Concentración de TAG en hígado. Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL TOTAL EN HÍGADO

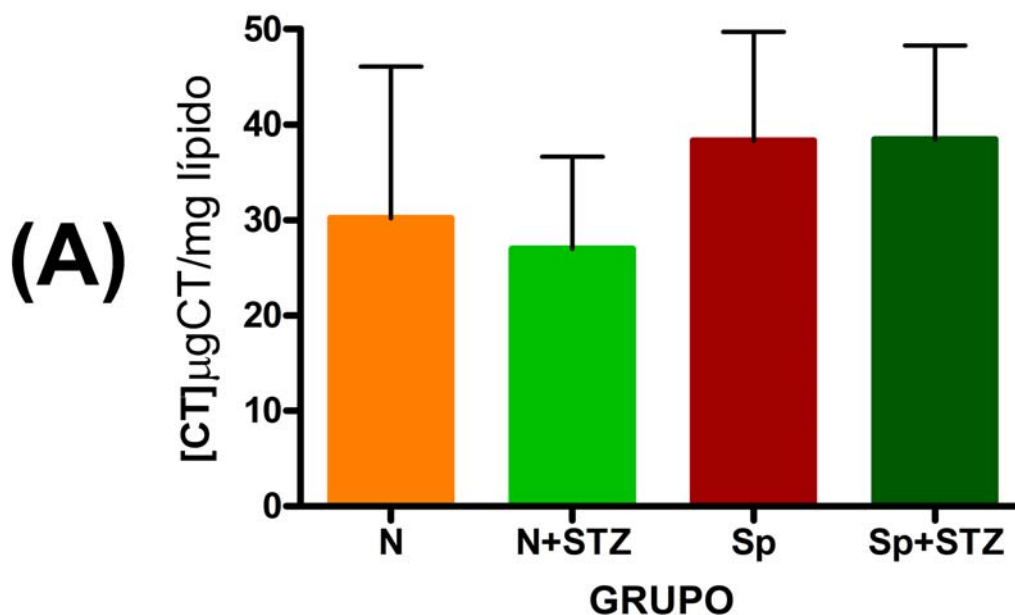


FIGURA 7.6. Concentración de CT en hígado. Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

GRUPO	CATALASA (ACTIVIDAD SOD)	SOD (U SOD/mg PROTEÍNA)	[TBARS] (pgTBARS/mg LÍPIDO)
N	16.19 \pm 6.03	4.12 \pm 0.29	264.9 \pm 125.0
Sp	7.16 \pm 5.86	4.06 \pm 0.36	185.8 \pm 75.9
N+STZ	12.17 \pm 4.01	2.97 \pm 0.16	341.2 \pm 58.6
Sp+STZ	10.58 \pm 6.03	3.43 \pm 0.27	334.9 \pm 47.8

Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

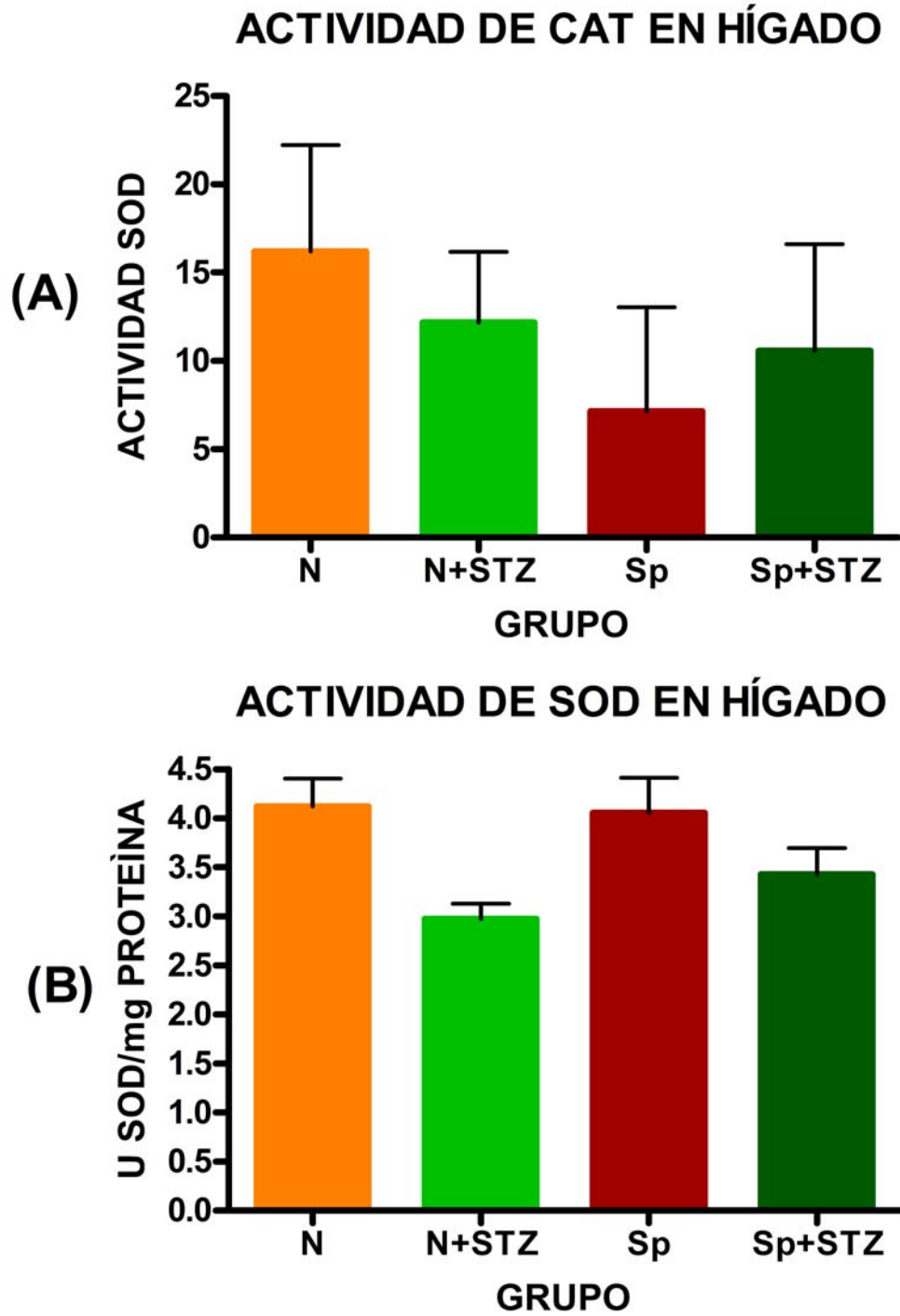


FIGURA 7.7. Efecto de la Sp sobre la actividad enzimática de (A) catalasa y (B) SOD en hígado. Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

CAT

Se muestra en la figura 7.7 (A) los resultados obtenidos durante la evaluación de la actividad de catalasa en hígado. En esta gráfica se puede apreciar que los niveles de catalasa es más activa en los animales alimentados con la dieta normal, que los animales alimentados con Sp.

SOD

Los niveles de SOD en hígado (Tabla 7.5 y Figura 7.7 (B)) muestran valores más elevados en los grupos controles que en los grupos con DM experimental, a pesar de ello el nivel de SOD en hígado es ligeramente mayor en el grupo tratado con STZ y alimentado con Sp comparado con el grupo N+STZ. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas en relación a este parámetro, pero se puede observar que la alimentación con Sp mejora los niveles de SOD en el hígado. Como se ya había mencionado anteriormente, las revisiones de los estudios que tocan este tópico hablan de patrones de actividad de SOD erráticos **(47)**. Hay estudios que muestran la disminución de la actividad de SOD en hígado por la tercera y cuarta semana **(7, 46)** después de la inducción de diabetes; pero es normal o elevada 8 semanas después del tratamiento **(37, 48)**.

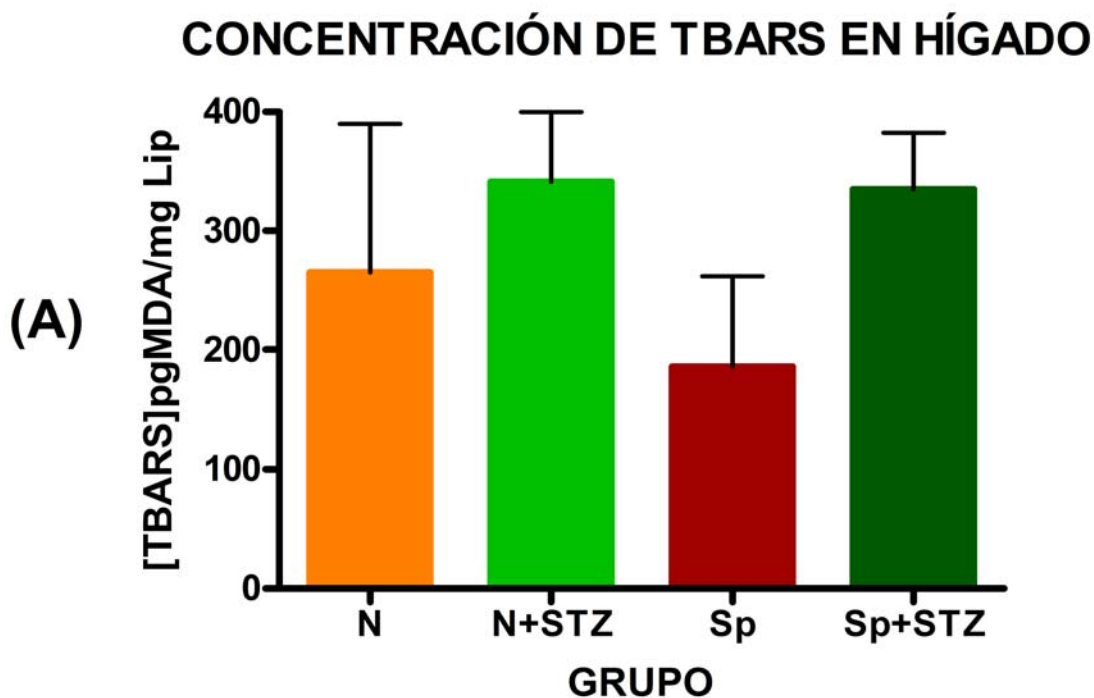


FIGURA 7.8. Concentración de TBARS en hígado. Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

En la evaluación de la concentración de TBARS en hígado, presentados en la figura 7.8, no se aprecian cambios en los niveles de TBARS entre los grupos de prueba (Sp+STZ y N+STZ). La concentración de estas especies es menor en los controles (N y Sp).

Es muy conocido el aumento de lipoperóxidos en muchos órganos en condiciones de diabetes (27, 41), en la figura 7.9 se aprecia un incremento de la concentración de TBARS en hígado en los grupos tratados con STZ. Sin embargo no se observa ninguna diferencia notable o significativa con los controles. Por esto se podría explicar el que no se haya observado efecto de la actividad en SOD en este estudio, ya que se realizó el sacrificio de las ratas

cuatro semanas después del tratamiento con STZ, quizás para apreciar si existe efecto sobre la actividad de SOD, se debe prolongar el tiempo entre la inducción de la diabetes y el sacrificio.

TABLA 7.6. Concentración de proteínas en hígado		
GRUPO	PROTEÍNAS (μg PROT/mg TEJIDO)	[PROTEÍNAS] (mg PROT/mL homogenado)
N	95.6 \pm 8.2	19.1 \pm 1.6
Sp	99.1 \pm 13.0	18.8 \pm 2.6
N+STZ	127.3 \pm 6.4	25.5 \pm 1.3
Sp+STZ	107.6 \pm 14.6	21.5 \pm 2.9

Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

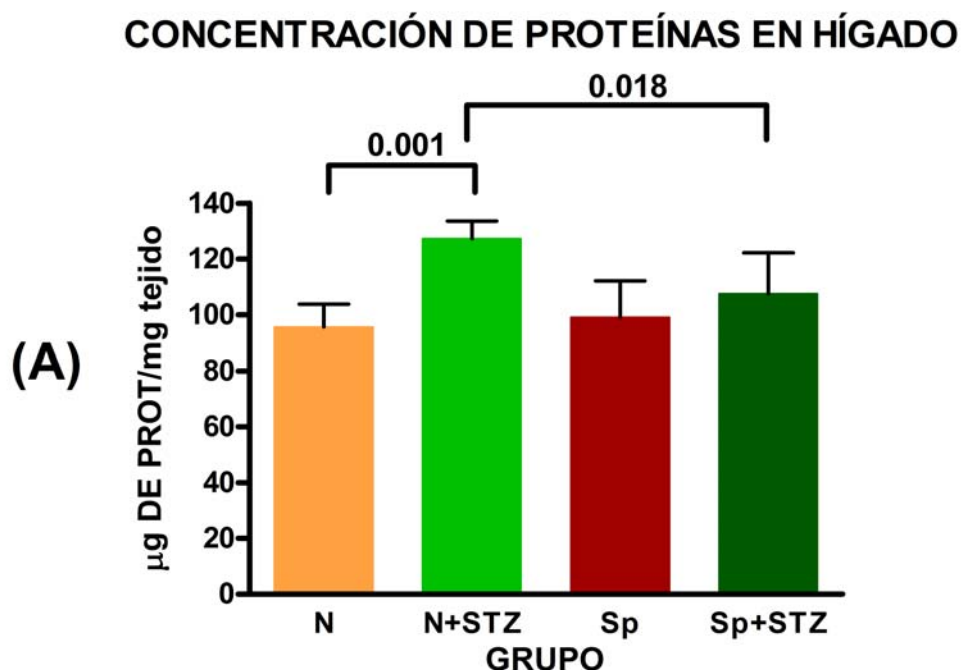


FIGURA 7.9. Concentración de proteínas en hígado. (μg de Proteína/mg de Tejido). Valores en mg/dL \pm desviación estándar. N: grupo de ratas alimentadas con dieta sin *Spirulina*. Sp: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina*, N+STZ grupo de ratas alimentadas sin *Spirulina* y diabetizadas con STZ y Sp+STZ: grupo de ratas alimentadas con *Spirulina* y tratadas con STZ.

Se ha reportado que la administración de STZ induce daño en el hígado **(41)**. Se sabe que el daño producido por la STZ sólo aparece poco después de la administración **(32, 41)**. El daño principal al hígado se debe principalmente al EOX que se produce por la hiperglucemia, similar al que se encuentra en pacientes diabéticos **(41)**; este daño es evidenciado por el incremento en el contenido de proteínas en hígado y los niveles de ALT (figura 7.3, A), que corresponden al aumento de tejido fibroso y por lo tanto de la cantidad de proteínas. Los resultados obtenidos en este trabajo experimental (figura 7.9 y tabla 7.6), muestran que las ratas diabéticas alimentadas con Sp, disminuyen el contenido hepático de proteínas, mostrando una diferencia significativa entre este grupo y el N+STZ.

7. CONCLUSIONES

La alimentación con una dieta Sp deshidratada (5%) presenta un efecto antihiper glucemiante en ratas tratadas con STZ.

La suplementación con *Spirulina maxima* presenta efectos antihiper glucemiantes de ratas diabéticas, además, atenúa el daño hepático por la STZ de un efecto hepatoprotector, al disminuir los niveles de ALT en suero y la concentración de proteínas en hígado.

La alimentación con *Spirulina* incrementa los niveles de las principales enzimas antioxidantes y disminuye de forma significativa la concentración de TBARS en suero de ratas diabéticas.

8. ANEXOS

ANEXO I. Fármacos empleados en el tratamiento de la DM

Biguanidas

La metformina es un ejemplo de este tipo de fármacos. Aumentan la utilización y captación de glucosa por el músculo esquelético (reduciendo, por tanto, la insulinoresistencia) y disminuyen la síntesis hepática de glucosa (gluconeogénesis). La metformina, además de disminuir la glucemia, también disminuye las lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad. Los efectos adversos más frecuentes son trastornos digestivos dependientes de la dosis (anorexia, diarrea, náuseas). La metformina no estimula el apetito y resulta, por tanto, útil en la mayoría de los pacientes que son obesos y no responden al tratamiento exclusivamente dietético.

Sulfonilureas

Las primeras de uso clínico fueron tolbutamida y clorpropamida. La clorpropamida puede provocar hipoglucemias graves, sobre todo en ancianos en quienes la función renal se ve disminuida. Tolbutamida, sin embargo, sigue siendo útil. Las denominadas sulfonilureas de segunda generación (glibenclamida, glipicida, etc.). Las sulfonilureas ejercen su acción principal sobre las células β , donde estimulan la secreción de insulina y reducen, por tanto, la glucosa plasmática. Existen receptores de alta afinidad por las sulfonilureas en los canales de K_{ATP} de la membrana plasmática de las células β y la unión a ellos de diversas sulfonilureas estimula con una potencia similar la liberación de insulina. El acontecimiento adverso más frecuente suele ser la hipoglucemia, que puede ser intensa y prolongada. Las sulfonilureas requieren células β funcionales, por lo que son útiles en las fases iniciales de la DM2.

Tiazolidinedionas

Las tiazolidinedionas (o glitazonas) como la rosiglitazona y pioglitazona reducen la glucemia sin originar, aparentemente, una hepatotoxicidad significativa. El efecto de las tiazolidinedionas sobre la glucemia es de comienzo lento y su efecto máximo no se consigue hasta después de 1 a 2 meses de tratamiento. Reducen la síntesis hepática de glucosa y aumentan la captación de glucosa por el músculo, favoreciendo así la eficacia de la insulina endógena y disminuyendo la cantidad de insulina exógena necesaria para mantener un nivel de glucemia adecuado. Las tiazolidinedionas se unen a un receptor nuclear denominado receptor activado por el proliferador de peroxisomas γ (PPAR $_{\gamma}$), que forma un complejo con el receptor X de retinoides. El PPAR $_{\gamma}$ está presente sobre todo en el tejido adiposo, aunque también aparece en músculo e hígado; incrementa la lipogenia y estimula la captación de ácidos grasos y glucosa. Los efectos adversos más importantes de rosiglitazona y pioglitazona son el aumento de peso y la retención de líquidos.

Meglitinidas

Estos fármacos como la repaglinida y la nateglinida actúan al igual que las sulfonilureas, bloqueando el receptor de sulfonilureas de los canales de K_{ATP} de la membrana de las células β pancreáticas. Nateglinida desplaza a la glibenclamida de sus lugares específicos de unión. Es mucho menos potente que la mayoría de las sulfonilureas, con excepción de la tolbutamida. Estos fármacos se administran inmediatamente antes de las comidas para reducir el aumento posprandial de la glucemia en los diabéticos tipo 2 insuficientemente controlados con dieta y ejercicio. Una de las posibles ventajas es que podrían causar un

menor aumento de peso que las sulfonilureas convencionales. Más adelante, al progresar la enfermedad, pueden combinarse con otros fármacos orales, como metformina o tiazolidinedionas.

Inhibidores de la α -Glucosidasa

Los inhibidores de la α -glucosidasa disminuyen la hiperglucemia posprandial. La α -glucosidasa es un conjunto de enzimas que se encuentran en las células epiteliales intestinales que incluyen glucoamilasas, sucrasas, maltasas y dextranasas. La prolongación de la absorción intestinal de carbohidratos resulta en una leve respuesta insulínica, que mantiene la hiperglucemia posprandial bajo control. Este tipo de fármacos debe ser consumido antes de los alimentos; teóricamente, son más benéficos en pacientes con niveles moderados de DM y no son aprobados para el uso de DM1. La acarbosa es un oligosacárido que tiene una alta afinidad por la α -glucosidasa, con una absorción muy lenta y se le ha relacionado con raros casos de hepatotoxicidad. El miglitol es otro tipo de inhibidor de la α -glucosidasa que parece inhibir a las sucrasas y maltasas en un mayor grado que la acarbosa. Los efectos secundarios más comunes por la administración de este tipo de fármacos son alteraciones gastrointestinales, los cuales pueden ser minimizados al comenzar a tratar al paciente con bajas dosis.

Insulina

La insulina se presenta como una inyección para aplicarse en forma subcutánea. La insulina que se usa puede ser de vacuno, cerdo, vacuno y cerdo combinado, o humano. La insulina humana se elabora usando técnicas de ingeniería genética a partir de la bacteria *E. coli* (Humulin) o de una levadura (Novolin). El 60% de la insulina que se usa es de origen humano.

La cantidad de insulina que se requiere depende del régimen alimenticio, del ejercicio físico que se haga y de otro tipo de medicamentos que se tomen, y puede cambiar con el tiempo.

El principal efecto adverso de la insulina es la hipoglucemia. Es frecuente, y cuando es intensa puede provocar daño cerebral.

ANEXO II. Análisis proximal de *Spirulina sp* (15).

Referencia	Durand-Chastell, 1980	Sautier-Tremolier, 1975	Vermorel, et al. 1975	Narashima et al. 1982	Miller 1968
Proteína cruda	60-71%	55.5-73.7%	59.2-80.7%	58.5%	65%
Fibra cruda	0.1-0.9%	-	-	5%	.
Lípidos	6-7%	10.05%-12.7%	-	6.5%	2%
Carbohidratos	13-16%	17.4-21.9%	-	8.5%	20%
Energía Kcal/g	-	-	4.96-5.53%	-	-
Canizas	6.4-9%	3.8-7.4%	4.95-10.52%	9%	-
Humedad	4-7%	0.8-7%	6.84-9.19%	6.5%	-

ANEXO III. Aminograma de la *Spirulina maxima* (15).

Aminoácidos esenciales	Durand-Chastell		Patrón FAO-OMS
	Mínimo	Máximo	g/16g N2
Fenilalanina	2.77	3.95	6.08
Isoleucina	3.69	4.13	4.00
Leucina	5.56	5.80	7.04
Lisina	2.96	4.00	5.44
Metionina	1.59	2.17	-
Treonina	3.18	4.17	4.00
Triptófano	0.82	1.13	0.96
Valina	4.20	6.00	4.96

ANEXO III. Aminograma de la *Spirulina maxima* (15). (Continuación)

Aminoácidos no esenciales	Durand-Chastell		Patrón FAO-OMS
	Mínimo	Máximo	g/16gN
Alanina	4.97	5.82	-
Arginina	4.46	5.98	-
Ác. Aspártico	5.97	6.43	-
Cisteina	0.56	0.67	-
Glicina	3.17	3.46	-
Ác. Glutámico	8.29	8.94	-
Histidina	0.89	1.08	-
Prolina	2.68	2.97	-
Serina	3.18	4.00	-

ANEXO IV. Contenido de ácidos grasos en la *Spirulina* (53).

Ácido graso	%
Ácido mirístico	0.23
Ácido palmítico	44,6-54,1
Ácido palmitóleco	1,26
Ácido γ -linoleico	11-31
Ácido oleico	1-15,5
Otros	20,88

ANEXO V. Composición de Carbohidratos en Sp (53)

Glicerol	7,4
Glucosa	7,5
Ramnosa	17,1
Fucosa	3,3
Ribosa	8,1
Xilosa	4,5
Manosa	1,9
Galactosa	8,2
D-Glucosamina	2,12
No identificados	2,6

ANEXO VI. Contenido de minerales en la *Spirulina* reportado por diferentes autores.

Componente	% (mg/100g) (15)	% (53)
Calcio	0.65	0,1-0,4
Fósforo	8.90	0,3-0,7
Hierro	5.9	0,03-0,05
Sodio	1.00	0,45-0,5
Potasio	0.48	1-14
Magnesio	1.52	0,1-0,2
Manganeso	2.60	0,005
Molibdeno	0.15	-
Selenio	0.25	-
Zinc	1.8	0,003
Cobre	-	0,0012
Cromo	-	0,28mg

ANEXO VII

Estudios recientes sobre efectos farmacológicos de alga *Spirulina* (17)

Efecto	Modelo	Resumen de resultados
1. Antialérgico	Rata	La inoculación intraperitoneal inhibió varios tipos de reacciones alérgicas. <i>In vitro</i> previno la producción de tNF-alfa por macrófagos peritoneales. Resultados similares se obtuvieron con la proveniente de otra fuente.
2. Antianémico	Rata	Sola o en combinación con gluten de trigo, aumentó el contenido de hierro y hemoglobina durante la primera semana de la gestación y en la lactación.
3. Anticancerígeno	Células	Siete administraciones intravenosas de 100 m g de Ca-SP cada una, obtenido del alga, causaron marcada disminución de tumor pulmonar colonizado con células B16-B6.
	Ratón	Redujo el citocromo P450 hepático, inducción de la glutation-S-transferasa hepática; sin embargo, la actividad de la glutation-S-transferasa extrahepática, no presentó cambios. Aumentó el tiempo de sobrevivida de ratones BALB/c inoculados con el linfosarcoma L517BY
4. Anticoagulante	Cofactor heparina	Un polisacárido aislado del alga aumentó en más de mil veces la actividad antitrombina del cofactor II de la heparina.
	Fibroblastos	El mismo polisacárido incrementó la producción de activador del plasminógeno, en una línea celular de fibroblastos humanos.
5. Antigenotóxico	Células	Extractos acuosos y orgánicos inhibieron la frecuencia de micronúcleos en células meióticas de <i>Tradescantia</i> , inducida por la hidrazida maleico.
6. Antihepatotóxico	Rata	La <i>Spirulina</i> , el extracto oleoso y la fracción del alga exenta de grasa previnieron el hígado graso inducido por tetracloruro de carbono. La ficocianina, proveniente del alga, protegió contra la hepatotoxicidad producida por tetracloruro de carbono y pulegona.
7. Antiinflamatorio	Ratón	La ficocianina, obtenida de <i>Spirulina</i> , redujo la inflamación producida por peróxidoLa ficocianina, obtenida de la cianobacteria, mostró actividad antiinflamatoria en cinco modelos experimentales.
	Ratón y rata	
	Ratón	Extractos de ficocianina obtenidos de <i>Spirulina</i> inhibieron el edema en oído y las concentraciones de LTB ₄ inducidos por ácido araquidónico.

**ANEXO VII Estudios recientes sobre efectos farmacológicos de alga *Spirulina* (17)
(Continuación)**

	Rata	La ficocianina, obtenida de <i>Spirulina</i> , redujo la actividad de la mieloperoxidasa e inhibió la infiltración celular inflamatoria y el daño en colon.
8. Antiparasitario	Ratón	En ratones inoculados con <i>Plasmodium chabaudi</i> no se observó efectos en la parasitemia pero tampoco desarrollaron recrudescencia.
9. Antitóxico	Rata	Redujo la toxicidad del plomo sobre testículos, peso corporal y diámetro tubular.
10. Antiviral	Células humanas	Un extracto acuoso inhibió en 50 % la producción de HIV-1 en líneas de células humanas, células mononucleares y células de Laangerhans
	Virus	El Ca-Spirulan inhibió la replicación de HIV-1 y HSV-1 en líneas de células humanas.El reemplazo del ion Ca por iones de Na y K en la molécula de Ca-SP, conservó su actividad antiviral.
11. Cardiovascular	Anillos aórticos	Administrada durante dos semanas, al 5% en la dieta, mostró efectos sobre las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio en anillos de aorta.Administrada durante seis semanas,al 5% en la dieta, previno los efectos vasomotores de una dieta rica en fructosa (60%) en anillos de aorta de rata.El extracto alcohólico aumentó la síntesis de NO por el endotelio y de un prostanoide vasoconstrictor por células no endoteliales.
12. Hipoglicemiante	Rata	El extracto metanólico causó disminución del área bajo la curva de glucosa en animales diabéticos, sugiriendo efecto hipoglicemiante. Sin embargo, el extracto diclorometanólico produjo efecto hiperglicemiante en normales y diabéticos, mostrando la existencia de principios antagónicos en el alga.
13. Hipolipidémico	Rata	Disminución del colesterol hepático incrementado por el tetracloruro de carbono.
14. Inmunoestimulante	Ratón	La incorporación a la dieta de ratones normales mejoró la respuesta de anticuerpos a eritrocitos de carnero. La administración simultánea oral con un antígeno, incrementó la respuesta de IgA en intestino.

ANEXO VII Estudios recientes sobre efectos farmacológicos de alga *Spirulina* (17)
(Continuación)

	Pollo	La administración de un extracto a cultivos de macrófagos peritoneales de pollo aumentó su capacidad fagocítica. La incorporación a la dieta de pollos, mejoró su respuesta secundaria de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero, la respuesta mitogénica a PHA, la actividad fagocítica de macrófagos y la actividad NK.
	Gatos	La adición de extracto a cultivos de macrófagos de gato aumentó su capacidad fagocítica.

9. REFERENCIAS

1. Abdel M, et al. Possible protective effect of melatonin and/or desferrioxamine against streptozotocin-induced hypoglycaemia in mice. *Pharmacol Res.* 41(5):533-537 (2000).
2. American Diabetes Association: <http://www.diabetes.org/recently-diagnosed.jsp>
3. Anderson T, et al. Correlation with extend of depression of pancreatic islet nicotinamide adenine dinucleotido. *J Clin Invest.* 54:672-77 (1974).
4. Andrade A, et al. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants in the treatment of type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol.* 116:27-32 (2008).
5. Andrade A. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 99:325-348 (2005).
6. Anónimo. Sosa Texcoco S.A. de C.V. 1991.
7. Arangno M, et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Res.* 26(11/12):467-1474 (1999).
8. Asociación Americana de Diabetes (ADA), Página Web: <https://www.diabetes.org/espanol/todo-sobre-la-diabetes/sintomas.jsp>. Acceso Febrero 2009.
9. Aztecs at mexicolore, página web, <http://www.mexicolore.co.uk/index.php?one=azt&two=fac&id=121&typ=req> (acceso, 26 de octubre del 2008).
10. Bate KJ, et al. Preventing complications of diabetes. *Med J. Aust.* 179(9):498-503 (2003).
11. Baynes J, et al. Bioquímica médica, 2ª edición. *Elsevier*, España, 2006.
12. Ble-Castillo J, et al. *Arthrospira maxima* prevents the acute fatty liver induced by the administration of simvastatin, ethanol and a hypercholesterolemic diet to mice. *Life Sci.* 70(22): 2665-2673 (2002).
13. Bowler R, et al. Oxidative stress in allergic respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol.* Sep;110(3):349-56 (2002).

14. Bucay B. Apuntes de historia de la química en México. *Ingenierías* Volumen VI- Número 18, 26-36(2003).
15. Casado T. Estudio de las propiedades nutricionales y antimutagenicas del alga *Spirulina maxima* utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo experimental. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM: México 1999.
16. Cemek M, et al. Antihyperglycemic and antioxidative potencial of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nat Med.* 62:284-293 (2008).
17. Chamorro G, et al. Actualización en la farmacología de Spirulina (Arthrospira), un alimento no convencional. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 52(3):232-240 (2002).
18. Ciferri O. Spirulina, the Edible Microorganism. *Microbiol Rev.* 47:551-578 (1982).
19. Cortez A. Parámetros productivos de conejos nueva Zelanda blanco en la etapa de engorda con la inclusión de la dieta de diferentes niveles de *Spirulina maxima* y *Ascophyllum nodosum*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Veterinaria, UNAM. México. 2005.
20. Dagnelie P, et al. Vitamin B-12 from algae appears not to be bioavailable. *Am J Clin Nutr.* 53:695-7 (1991).
21. De Lara R. et al. La importancia de la Spirulina en la alimentación acuícola. 13-16.
22. Diabetes. Página web: <http://es.wikipedia.org/wiki/Diabetes>. Acceso junio 2009.
23. Diccionario enciclopédico de Laboratorio clínico. *Editorial Panamericana.* Argentina (1991).
24. El caracol de Texcoco. Página web: [http://es.wikipedia.org/wiki/El_Caracol_\(México\)](http://es.wikipedia.org/wiki/El_Caracol_(México)) (acceso octubre 2008).
25. Escamilla M, et al. Los alimentos fermentados que comían nuestros bisabuelos prehispánicos. *Ciencias.* abril- junio: 75-84 (2007).
26. Esquivel J. Actividad antidiabética y toxicidad del extracto acuoso percolado de Tamarindos indica Linn (TiL) en ratones. Tesis de Licenciatura. México (2007).
27. Feillet C, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental diabetes. *Clin Chim Acta.* 284:31-43 (1999).

28. García G. Estudio de la evolución de la fracción lípida de productos destinados a la alimentación infantil durante el almacenamiento. Tesis doctoral. Facultad de Valencia. Valencia (2007).
29. García M. Evaluación de la variante polimórfica A45T del gen Neura D1/BETA2 en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano y tardío. Tesis de Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Química, México (2008.)
30. Gershwin M, et al. Spirulina in human nutrition and health. *CRC Press. USA.* (2008).
31. Harman J, et al. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica Vol. I. 9ª Edición. McGraw-Hill interamericana (1998).
32. Herr R, et al. Isolation and characterization of streptozotocin. *Antibiot Annu.* 60;7:263-40 (1959).
33. History of Spirulina. Página web: <http://malnutritionzero.online.fr/sub2.htm> (acceso Octubre 2008).
34. Hoyosomada Y. et al. Effects of water-soluble and water-insoluble fractions of Spirulina en serum lipids components and glucose tolerance in rat. *J Jp Sci Nitr Foo Sci.* 44:273-277 (1991).
35. Hu F. et al. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types off at and carbohydrate. *Diabetologia.* 44:805-817 (2001).
36. Iwata K, et al. Effects of Spirulina platensis on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 36(2):165-171 (1990).
37. Jang Y, et al. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol Res.* 42(4):361-371 (2000).
38. Karkos P, et al. Spirulina in clinical practice. Evidence based human applications. *Evid Based Complement Alternat Med.* Sep 14 (2008).
39. Khan Z. et al. Nutritional and therapeutic potancial of Spirulina. *Curr Pharm Biotechnol.* 6:373-379 (2005).
40. Koda-Kimble M, et al. Applied therapeutics. The clinical use of drugs, 8a edición, *Ed. Lippincott Williams y Wilkins*, Estados Unidos, 2005, pp 50-7, 50-73, 50-76, 50-78.
41. Kume E, et al. Hepatic changes in the acute phase of streptozotocin (SZ)-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Patho.* 55:467-480 (2004).
42. La química en México un poco de historia científica. Sitio Web: http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/072/htm/sec_5.htm.
43. LeRoith, D, et al. Diabetes mellitus, Fundamentos y Clínica. *McGraw Hill*, México (2000).
44. Lewis R. Dictionary of toxicology. *Lewis publishers.* USA (1998).

45. Lima K, et al. Efeitos de diferentes extractos de *Spirulina* sobre os parámetros glicemicos de ratos normais e diabéticos. III simposio Latino Americano de Ciencia de Alimentos. Campinas Brazil, 16 al 19 de noviembre (1999).
46. Maritim A, et al. Effects of melatonin on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Inter J Toxicol.* 18:161-166 (1999).
47. Maritim A, et al. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biocheml Mol Toxicol.* 17(1):24-38 (2003).
48. Mekinova D, et al. Effect of intake of exogenous vitamins C, E and β -carotene on the antioxidative status in kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nahrung.* 39:257-261 (1995).
49. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus.
50. Paniagua J, et al. Crónica Azteca: El tecuitlatl, concentrado de algas spirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los aztecas. Página web: [www.spiralspring.com/h_Textos/Cronica%20 azteca.pdf](http://www.spiralspring.com/h_Textos/Cronica%20azteca.pdf) (2004).
51. Parik P, et al. Evidence for oxidative stress in essential hypertension: perspective for antioxidant therapy. *J Cardiovasc Risk.* 4(4):193-199(2001).
52. Ramírez L, et al. Conocimientos acerca del alga *Spirulina* (*Arthrospira*). *Interciencia.* 31 (2006).
53. Ramírez L, et al. Uso tradicional y actual de *Spirulina sp.* (*Arthrospira*). *Interciencia.* Página web: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-18442006000900008&script=sci_arttext. (2006)
54. Redpoll. Drug Bank: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00428>
55. Rees D, et al. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 22:359-70 (2005).
56. Riss J, et al. Phycobiliprotein C-phycoecianin from *Spirulina paltensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidative expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J. Agric Food Chem.* 55, 7962-7967 (2007).
57. Rodríguez A. Evaluación del polimorfismo T130I del gen HNF-4[alfa] como factor de riesgo de diabetes mellitus tipo 2 de inicio temprano en alumnos de la Facultad de Química de la UNAM. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Química, México (2006).
58. Rodríguez A, et al. *Spirulina maxima* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sci.* 69:1029-1037 (2001).
59. Rodríguez R, et al. Guía de farmacología y terapéutica. *Mc Graw Hill.* México, (2007).
60. Rogmanoli, M. Mecanismos de producción de radicales libres en la diabetes: importancia de la xantina oxidasa e implicación del factor nuclear-KB.

- Universidad de Valencia, Facultad de Ciencias de la actividad física y el deporte (tesis de doctorado). (2007).
61. Rosado J. Relación del envejecimiento y la diabetes mellitus tipo 2 con el estrés oxidativo y el proceso inflamatorio crónico. Tesis Maestría (Maestría en Ciencias Biológicas)-UNAM. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México (2007).
 62. Sax I, et al. Diccionario de química y productos químicos. Ediciones omega. España (1993).
 63. Seven A, et al. Effects of Vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin diabetic rats: investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J*. 45(4):703-710 (2004).
 64. Soutelle J. La vida cotidiana de los aztecas en vísperas de la conquista. Fondo de cultura económica. 16ª edición (2006).
 65. Srinivasan K, et al. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. *Indian J Med Res*. 125:451-472 (2007).
 66. Srivastava L, et al. Diabetogenic action of streptozotocin. *TIPS* (1982).
 67. SSA, 2008, Secretaría de Salud, México, Página Web, <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/mortalidad.htm>, (acceso: Mayo, 2008).
 68. SSA, 2008, Secretaría de Salud, México, Página Web, http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/tabs/m_009.xls, (acceso: Mayo, 2008).
 69. Suckow M. The laboratory rat. *ELSEVIER*. USA, (2006).
 70. Takada J, et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. *Metabolism*. 56:997-984 (2007).
 71. Torres P, et al. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *J Ethnopharmacol*. 64(2):141-7 (1999).
 72. Torres P, et al. Protective Effect of *Arthrospira maxima* on fatty acid composition in fatty liver. *Arch Med Res*. 37:479-483 (2006).
 73. Torres P, et al. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in a open sample of Mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis*. 6:33 (2007).
 74. Velázquez M, et al. El envejecimiento y los RL. *Ciencias*. 75:36-43 (2004).
 75. Vessby B, et al. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU study. *Diabetologia*. 44:312-319 (2001).
 76. WHO, 2008, World Health Organization. Página web: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/, (acceso: Mayo, 2008).