



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL EXTRACTO BUTANÓLICO DE *Equisetum myriochaetum* EN
EL DESARROLLO DEL PÁNCREAS DE CRÍAS DE RATAS DIABÉTICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ANA LILIA MARTÍNEZ VALDÉS



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARÍA CRISTINA REVILLA MONSALVE
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

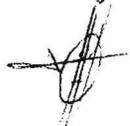
Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Efecto del extracto butanólico de Equisetum myriochaetum en el desarrollo del páncreas de crías de ratas diabéticas

realizado por **Martínez Valdés Ana Lilia** con número de cuenta **3-0219644-1** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Adolfo Andrade Cetto	
Propietario	Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar	
Propietario Tutora	Dra. María Cristina Revilla Monsalve	
Suplente	Dr. Ricardo Reyes Chilpa	
Suplente	M. en C. Miguel Ángel Palomino Garibay	

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "
 Ciudad Universitaria, D. F., a 03 de septiembre de 2012
 EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.
 MAG/mdm

HOJA DE DATOS

1. Datos del alumno

Martínez
Valdés
Ana Lilia
21 60 47 88
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30219644-1

2. Datos del tutor

Dra.
María Cristina
Revilla
Monsalve

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Adolfo
Andrade
Cetto

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Francisco Javier
Alarcón
Aguilar

5. Datos del sinodal 3

Dra.
María Cristina
Revilla
Monsalve

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Ricardo
Reyes
Chilpa

7. Datos del sinodal 5

M. en C.
Miguel Ángel
Palomino
Garibay

8. Datos del trabajo escrito

Efecto del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* en el desarrollo del páncreas de crías de ratas diabéticas
82 p
2013

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme crecer académicamente.

A la Facultad de Ciencias y a los profesores que en ella laboran, por enseñarme que los conocimientos y la experiencia se adquieren día a día.

Al Dr. Sergio Islas A por permitirme integrarme a su inigualable equipo de trabajo.

A la Dra. Cristina Revilla Monsalve por guiar cada paso académico, porque esta tesis es también el resultado de tu esfuerzo y constancia, gracias infinitamente por cada minuto dedicado a ella. Gracias por ser mentora y amiga.

Al MC Miguel Ángel Palomino Garibay por ser un ejemplo de lucha y constancia. Por tu invaluable amistad.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, por facilitar los medios necesarios para la obtención del extracto, por los comentarios y sugerencias recibidas.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar por enriquecer mi trabajo con sus comentarios, gracias por el tiempo invertido.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Ángeles R, Mine M, Ricardo G, Laura M, Alejandra M, Alberto A, Adriana H, Salma J, Luis, Laura A, Zaira J, Estela M, Remedios C, Ale, Dra. Norma O y Dr. Elsa C por hacer más ameno el recorrido.

A MC Liborio Morán Z, hermanito académico y gran amigo. Por todo lo que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio, y lo que nos falta.

A mis amigos y compañeros de aventuras. Blanca y Lizbeth E, Ana GG, Nayeli L, Guadalupe V, Celic C, Jimena Z, Diana F, Víctor S, Wendolin A, Anthan R, Fabián L y Hugo L.

A Ana y Salvador, con profundo agradecimiento, admiración y cariño.

A Cristina, Rocío, Fátima y Wendy.

A Salvador F y Emilio A.

A la familia Flores M y Alfaro M.

*A aquellos que se han ido pero guían mi camino y me iluminan con sus
recuerdos.*

A los amigos de la vida que han sido también mis hermanos.

A mis pequeños y fieles compañeros.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Diabetes mellitus (DM)	3
1.1.1 Clasificación de la diabetes mellitus	1
1.1.2 Diabetes mellitus tipo 1	4
1.1.3 Diabetes mellitus tipo 2	5
1.1.4 Otros tipos específicos de diabetes	5
1.1.5 Diabetes mellitus gestacional (DMG)	6
1.2 Prevalencia de diabetes	7
1.3 Páncreas	8
1.3.1 Desarrollo del páncreas	8
1.3.2 Fisiología del páncreas	11
1.3.3 Páncreas exocrino	11
1.3.4 Páncreas endocrino	12
1.3.5 Anatomía e histología del páncreas	14
1.4 Insulina	16
1.4.1 Síntesis de insulina	16
1.4.2 Secreción de insulina	17
1.4.3 Receptor de insulina	18
1.5. Páncreas en murinos	19
1.6 Animales de laboratorio como modelos experimentales	19
1.6.1 Modelos animales de diabetes	21
1.6.2 Modelos espontáneos	21
1.6.3 Animales genéticamente modificados	23
1.6.4 Inducción quirúrgica	23
1.6.5 Inducción viral	24
1.6.6 Inducción química	24
1.7 Aloxana	26
1.8 Estreptozotocina	27
1.8.1 Mecanismo de acción de la estreptozotocina	27
1.8.2 Selectividad de la célula β a la estreptozotocina	28
1.8.3 Mecanismo de acción de la STZ	28
Daño al DNA	28
Especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico	29
1.9 Tratamiento de la diabetes	29
1.9.1 Tratamiento no farmacológico	30
1.9.2 Tratamiento farmacológico	33
1.10 Medicina tradicional	34
1.10.1 <i>Equisetum myriochaetum</i> Schlecht & Cham	35
Descripción botánica	36
Distribución	36
Etnobotánica.	36
Farmacología.	37
Componentes químicos.	37
Toxicidad.	38
2. JUSTIFICACIÓN	38
3. HIPÓTESIS	39

4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo general	39
4.2 Objetivos particulares	40
5. MATERIAL Y MÉTODO	40
5.1 Colecta y preparación del extracto butanólico de <i>Equisetum myriochaetum</i>	40
5.2 Animales e inducción de diabetes experimental	41
5.3 Análisis estadístico	42
5.4 Diagrama de flujo	43
6. RESULTADOS	44
6.1. Glucosa	44
6.2 Peso	46
6.3 Número de fetos	48
6.4 Peso de fetos	49
6.5 Talla de fetos (cabeza-cuerpo-cola)	50
6.5 Reabsorciones y malformaciones	51
6.7 Peso de la placenta	52
6.8 Correlación entre peso fetal y peso placentario (Coeficiente de correlación de Pearson)	53
6.9 Resultados histológicos	56
6.10 Resultados inmunohistoquímicos	59
7. DISCUSIÓN	62
8. CONCLUSIONES	70
9. PERSPECTIVAS	70
10. REFERENCIAS	71
11. ANEXOS	79
11.1 Clasificación etiologica de la Diabetes mellitus	79
11.2 Inmunohistoquímica. Método de inmunohistoquímica de doble anticuerpo con peroxidasa.	80
11.3 Índice de abreviaturas	82

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa cuya prevalencia se ha incrementado en forma alarmante, convirtiéndose en una epidemia mundial. Actualmente existen diversos tratamientos farmacológicos para este padecimiento, con diferentes mecanismos de acción, que corrigen la hiperglucemia actuando sobre uno o más de los trastornos fisiopatológicos de la enfermedad.

Sin embargo, el 70 al 80 % de la población de los países en vías de desarrollo utiliza la medicina tradicional como alternativa terapéutica, ya sea por que la consideran más natural y con menos efectos adversos o porque es la única alternativa que tienen a su alcance. Por lo anterior necesario realizar estudios científicos controlados que demuestren su efectividad y la ausencia de efectos adversos graves.

Se ha reportado que 500 especies de plantas son utilizadas empíricamente para el control de la diabetes mellitus, entre ellas se encuentra *Equisetum myriochaetum*, comúnmente conocida como “cola de caballo”.

El efecto hipoglucemiante de *E. myriochaetum* ha sido demostrado en estudios agudos con modelos animales y en pacientes con diabetes mellitus de reciente diagnóstico, pero no existen reportes del efecto de su administración durante la gestación ni sobre la descendencia, y en particular, el desarrollo del páncreas de los fetos de las madres diabéticas.

Con el objetivo de demostrar el efecto de la administración diaria del extracto butanólico de *E. myriochaetum*, a partir del quinto día de gestación y durante 17 días, en el desarrollo embrionario y sobre la estructura y presencia de anticuerpos anti-insulina en el páncreas fetal de la descendencia, se utilizaron 28 ratas Sprague-Dawley gestantes. El quinto día de gestación 14 ratas se inyectaron intraperitonealmente (ip) con una dosis única de 50 mg/kg de STZ en amortiguador de acetatos 0.1M pH de 4.3 y 14 ratas se inyectaron (ip) con una dosis única de amortiguador. Se formaron 4 lotes, D: 7 ratas gestantes diabéticas a las que se les administró diariamente 1 ml de solución salina; DE: 7 ratas gestantes diabéticas a las que se les administró una dosis diaria de 6.0 mg/kg de extracto butanólico de *E. myriochaetum* diluido en 1 ml de solución salina; ND: 7 ratas gestantes no diabéticas a las cuales se les administró diariamente 1 ml de solución salina. NDE: 7 ratas gestantes no diabéticas a las cuales se les administró diariamente una dosis de 6.0 mg/kg del extracto butanólico de *E. myriochaetum* diluido en 1 ml de solución salina. Se determinaron los niveles de glucosa de las madres el día 8 y 21 de gestación y se pesaron cada tercer día. El día 21 de gestación todas las ratas fueron sacrificadas y se determinó el número de fetos, reabsorciones y malformaciones macroscópicas; se extirpó y pesó la placenta. Los fetos se pesaron y midieron; se les extirpó el páncreas, se fijó en formol amortiguado y se procesaron con técnicas histológicas (HE) y de inmunohistoquímica (Cocktail Antiratón-DAKO) para la determinación de anticuerpos anti-insulina.

Los resultados obtenidos demostraron que la administración diaria, durante 17 días, de 6.0 mg/kg del extracto butanólico de *E. myriochaetum* a ratas Sprague-Dawley gestantes con diabetes inducida con STZ, no favorece un aumento significativo del peso en ratas gestantes; no induce malformaciones macroscópicas; reduce el número de reabsorciones y eleva el número de fetos vivos al día 21 de gestación; no tiene efecto en el peso placentario de fetos de madres diabéticas; favorece el aumento de

peso y talla de los fetos de madres diabéticas, disminuye el retraso en el desarrollo del páncreas de fetos de madres diabéticas lo cual se ve reflejado en la organización histológica del islote pancreático, que presenta agrupaciones de células endocrinas en estructuras redondeadas tipo islote, así como agrupaciones irregulares de gran tamaño de células endocrinas asociadas al tejido acinar, ductos y vasos sanguíneos; y en la inmunopositividad a insulina en dichas estructuras.

1. ANTECEDENTES

1.1 Diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus es una enfermedad determinada genéticamente en la que el sujeto que la padece presenta trastornos metabólicos que se caracterizan por hiperglucemia crónica acompañada de alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas como consecuencia una deficiencia relativa o absoluta en la secreción de insulina y con grados variables de resistencia a ésta (1, 2, 3).

Estudios publicados en 2010 revelan que la prevalencia de diabetes en adultos entre 20 y 79 años era de 6.4% y afectaba a 285 millones, y se espera que para 2030 aumente a 7.7 % afectando a 439 millones de diabéticos. Entre 2010 y 2030 habrá un incremento del 69% en el número de adultos diabéticos en los países en vías de desarrollo y sólo un incremento del 20% en los países desarrollados (4).

1.1.1 Clasificación de la diabetes mellitus

La clasificación de la diabetes mellitus se basa principalmente en la etiología y características fisiopatológicas de la enfermedad e incluye la posibilidad de describir la etapa en la que se encuentra el paciente (3). Gran parte de los casos de diabetes mellitus pueden clasificarse en dos categorías; la primera de ellas, diabetes mellitus tipo 1 es autoinmune y se caracteriza por una deficiencia absoluta de la secreción de insulina, mientras que en la segunda categoría, diabetes mellitus tipo 2 presenta resistencia a la acción de la insulina y deficiencia en la secreción de la misma.

El grado de hiperglucemia puede cambiar con el tiempo y depende de la evolución de la enfermedad (Tabla1). El progreso de la diabetes mellitus puede causar glucemia alterada en ayuno (IFG) y/o alteraciones en el metabolismo de la glucosa (IGT) sin cumplir con los criterios para el diagnóstico de diabetes: en algunos individuos diabéticos el control de la glucemia puede lograrse reduciendo peso, ejercitándose y/o con la administración hipoglucemiantes. Por lo tanto, estos individuos no requieren insulina (NIR); otros pacientes presentan insuficiente secreción de insulina, por lo tanto requieren de insulina exógena para un control adecuado de la glucemia (DM-IRC), mientras que los pacientes con destrucción de células β requieren de insulina para sobrevivir (DM-IRS) (3).

Tabla 1. Tipos etiológicos de la diabetes (6).

Etapa \ Tipo	Normo-glucemia		Hiperglucemia		
	Regulación normal de la glucosa	Glucosa de ayuno alterada (GAA) o intolerancia a la glucosa (ITG)	Diabetes mellitus		
			Sin requerimiento de insulina (NIR)	Requerimiento de insulina para control (DM-IRC)	Requiere insulina para sobrevivir (DM-IRS)
DM1	← - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - →
DM2	← - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - →	
Otros tipos	← - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - →	
Diabetes gestacional	← - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - - →	

1.1.2 Diabetes mellitus tipo 1

Este tipo de diabetes afecta entre el 5 y 10% de la población diabética total y es ocasionada por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, que conlleva a una deficiencia absoluta de insulina.

La diabetes mellitus tipo 1 se asocia también a alelos polimórficos de los genes DQA y DQB del sistema HLA.

La diabetes mellitus tipo 1 se subdivide en dos categorías:

→ *Diabetes mellitus mediada por inmunidad.* Esta forma de diabetes aparece como resultado de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas. Los marcadores de destrucción autoinmune incluyen anticuerpos anti-insulina, anticuerpos anti descarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), anticuerpos anticélulas de islotes, anticuerpos tirosina fosfatasa IA-2 y IA-2 β ; algunas enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Graves, la tiroiditis de Hashimoto y la enfermedad de Addison, están asociadas a este tipo de diabetes (5, 6).

En esta forma de diabetes la tasa de destrucción de las células β es muy variable; es rápida en algunos pacientes, principalmente niños y adolescentes en quienes las primeras manifestaciones clínicas se presentan cuando la función de la célula β se ha perdido en un alto grado por lo cual es necesaria la insulino-terapia; y muestran cetoacidosis y leve hiperglucemia que rápidamente se puede cambiar a hiperglucemia severa; y lenta en otros, generalmente adultos que pueden mantener la función de las células β residuales lo suficiente para prevenir cetoacidosis durante algunos años, pero eventualmente requieren insulina exógena para sobrevivir (2).

→ *Diabetes mellitus idiopática*. Este tipo de diabetes es de etiología no conocida. Algunos de los pacientes con este tipo de diabetes pueden padecer de insulinopenia permanente y ser propensos a presentar cetoacidosis o episodios de cetoacidosis y grados variables de deficiencia de insulina entre episodios, pero no presentan autoinmunidad: este tipo de diabetes es heredada y se presenta con mayor frecuencia en poblaciones africanas y asiáticas (5).

1.1.3 Diabetes mellitus tipo 2

Esta forma de diabetes afecta entre el 90 y 95% de la población diabética mundial (6). Los pacientes con este padecimiento presentan resistencia a la insulina y deficiencia de insulina; estos individuos eventualmente necesitarán tratamiento de insulina para mantener niveles de glucosa controlados.

La mayoría de los pacientes con este tipo de diabetes son obesos, condición que ocasiona cierto grado de resistencia a la insulina. Rara vez se produce cetoacidosis.

En este tipo de diabetes la hiperglucemia se desarrolla gradualmente, por lo que con frecuencia la enfermedad no se diagnostica en las primeras etapas; sin embargo, estos pacientes son propensos a desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares.

El riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 aumenta con la edad, la obesidad y la falta de actividad física; y aumenta considerablemente en individuos cuyos familiares de primer orden presentan la enfermedad, así como en mujeres con antecedentes de diabetes gestacional. Esta enfermedad presenta predisposición genética, la cual depende del grupo étnico al que se pertenezca, se ha reportado que la diabetes tipo 2 es considerada epidemia entre los aborígenes de Australia y grupos de indios nativos Pima en Norteamérica (7, 8)

1.1.4 Otros tipos específicos de diabetes

Defectos genéticos en la célula β . Diversas formas de diabetes están asociadas con defectos monogénicos en la función de la célula β . Estas formas de diabetes se caracterizan por la aparición de hiperglucemia a edad temprana, generalmente antes de los 25 años, dichos individuos se conocen como MODY (maturity onset diabetes of the young, diabetes del adulto de inicio en la juventud) y se caracterizan por la alteración en la secreción de insulina con mínimo o ningún defecto en la acción de ésta. Esta condición se hereda de forma autosómica dominante.

En la actualidad se han identificado diversos defectos genéticos específicos en diferentes cromosomas y las formas más comunes se asocian a defectos en el factor de transcripción hepático denominado factor nuclear de hepatocitos 1 α (HNF-1 α)

(MODY3), factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF-4 α) (MODY1), factor 1 promotor de la insulina (IPF1) (MODY4) y factor nuclear de hepatocitos 3 β (HNF-3 β) (MODY5).

Una segunda forma de la enfermedad se asocia con mutaciones en el cromosoma 7p para el gen de la glucocinasa que dan como resultado una molécula de glucocinasa defectuosa. La glucocinasa convierte la glucosa a glucosa-6-fosfato, que a su vez estimula la secreción de insulina en la célula β ; debido al defecto en la molécula de la glucocinasa se incrementan los niveles plasmáticos de glucosa para obtener niveles de insulina normales (MODY2).

Mutaciones puntuales en el DNA mitocondrial están asociadas con el desarrollo de la enfermedad, la más común de estas mutaciones ocurre en la posición 3243 del gen de la leucina, que transcribe una Leu a una Ala (A-G), provocando diabetes mellitus asociada a sordera.

Algunas anomalías genéticas están relacionadas a la incapacidad de convertir la proinsulina a insulina con el subsiguiente desarrollo de una leve intolerancia a la glucosa, la cual se hereda en forma autosómica dominante. La producción de moléculas de insulina de estructura anormal también ha sido identificada en algunos individuos, y ocasiona alteraciones en la unión de la insulina a su receptor, los pacientes afectados muestran metabolismo de la glucosa normal o levemente alterado pero con concentraciones circundantes elevadas de insulina o del péptido C.

Algunas enfermedades del páncreas exocrino, por ejemplo la pancreatopatía fibrocalculosa, también denominada diabetes relacionada con desnutrición, pueden estar relacionadas con el desarrollo de diabetes mellitus. La diabetes mellitus se puede desarrollar también como consecuencia de padecimientos como pancreatitis, enfermedad neoplásica del páncreas, fibrosis quística, hemocromatosis y con pancreatectomía.

La exposición a diversos fármacos o sustancias químicas están asociadas al desarrollo de diabetes, entre éstos se encuentran glucocorticoides, ácido nicotínico, diazóxido, fenitoína y pentamidina (Anexo 11.1).

1.1.5 Diabetes mellitus gestacional (DMG)

La diabetes mellitus gestacional se define como cualquier grado de intolerancia a la glucosa cuyo reconocimiento se presente durante el embarazo; este diagnóstico se aplica independientemente si se requiere o no insulina, si las anomalías continúan al finalizar el embarazo y no excluye la posibilidad de que dichas alteraciones se hayan presentado antes de la gestación (9, 10).

A nivel mundial aproximadamente el 7% de los embarazos se complican con diabetes gestacional pero la incidencia de éstos varía en un rango del 1 al 14%, de acuerdo con

la población de estudio y los criterios de diagnóstico. En México entre el 9.2 y el 13% de las mujeres embarazadas desarrollan diabetes gestacional (11).

1.2 Prevalencia de diabetes

La diabetes mellitus es considerada una epidemia mundial. Estudios recientes indican que en el 2010 la prevalencia de diabetes en adultos entre 20 y 79 años era del 6.4%, afectando a 285 millones y se prevee aumentará a 7.7 % para 2030, por lo que habrá 439 millones de diabéticos. Entre 2010 y 2030 habrá un incremento del 69% en el número de adultos diabéticos en los países en vías de desarrollo y solo un incremento del 20% en los países desarrollados, en los países en vías de desarrollo el incremento en el número de individuos diabéticos será en todos los grupos de edad, duplicándose en los individuos mayores de 60 años en contraste en los países desarrollados solo habrá un incremento del 38% que se espera sólo sea en los individuos mayores de 60 años, con ligera disminución en los grupos de menor edad (6).

Actualmente el mayor número de pacientes con diabetes es el grupo de 40-59 años pero para el 2030 habrá más individuos con diabetes en el grupo de 60-79 años. El incremento en la predicción en el número de pacientes con diabetes de 2010 a 2030 es de 54% con un crecimiento anual de 2.2% (6).

En la actualidad se sabe que la diabetes y las complicaciones derivadas de ésta son causantes de por lo menos 2.1% de muertes en países de mediano ingreso y de 2.8 en países de altos ingresos (12), la diabetes incrementa considerablemente el riesgo de presentar cardiopatías, enfermedades cerebro-vasculares, insuficiencia renal, y es la causa más frecuente de ceguera y amputación de miembros inferiores de origen no traumático (13, 14, 15).

En México, hasta la década de 1940 la diabetes mellitus era considerada una enfermedad poco frecuente al posicionarse como la 20^a. causa de mortalidad con una tasa de 4.2 por cada 100 000 habitantes. Los fenómenos migratorios y con ello la modificación acelerada de patrones de dieta, estilo de vida y actividad física, aunado a la susceptibilidad genética, impactó de forma importante en la prevalencia de sobrepeso y obesidad, aumentando los índices de prevalencia de diabetes mellitus (14). A partir de la década de 1970 la incidencia de la diabetes mellitus aumentó considerablemente al ocupar el 15^o lugar como causa de muerte, hacia 1980 alcanzó el 9^o lugar, en 1990 ocupó en el 4^o lugar y a partir del 2000 fue considerada la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres (13, 16). En 2010, en México, tenía el 10^o lugar con 6.8 millones de adultos diabéticos con edades entre 20 y 79 años y en 2030 se calcula que serán 11.9 millones los mexicanos diabéticos, ocupando el 8^o lugar a nivel mundial.

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006) reveló que la prevalencia de diabetes mellitus, previamente diagnosticada, era de 7.34% y ésta se incrementó a 14.42% por el diagnóstico realizado durante la encuesta, siendo mayor

la prevalencia en hombres (15.82%) que en mujeres (13.20%) y mayor en la zona urbana (15.48%) que en la rural (10.39%) (17). La diabetes mellitus es considerada la principal causa de muerte en México con una tasa de 89.9 por 100,000 habitantes en mujeres y de 86.1 por 100,000 habitantes en hombres y aproximadamente 71,000 defunciones al año. Representa un severo problema de salud pública al ser la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa, una de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de las instituciones de salud pública (aproximadamente 20%) (14, 18).

1.3 Páncreas

El páncreas es una glándula del aparato digestivo que está constituida por una parte exocrina, representada por los ductos y acinos, que sintetizan un gran número de enzimas necesarias para la digestión; y de una porción endocrina, representada por los islotes de Langerhans, que secretan hormonas esenciales para el metabolismo de los carbohidratos. Se sitúa retroperitonealmente comenzando en la porción media del duodeno y extendiéndose transversalmente por la pared posterior del abdomen hacia el bazo.

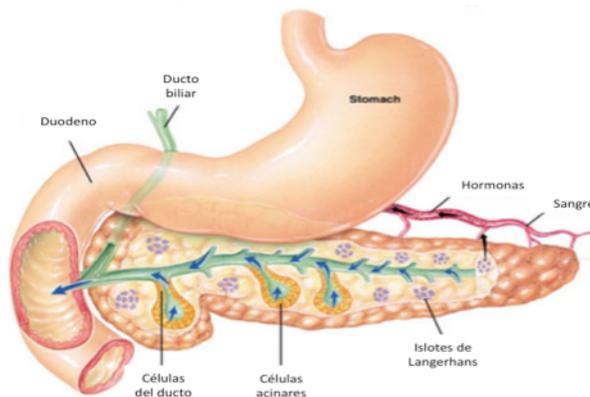


Figura 1. El páncreas se ubica en la porción media del duodeno y se extiende transversalmente por la pared posterior del abdomen.

1.3.1 Desarrollo del páncreas

El páncreas embrionario en murinos se forma a partir de una protuberancia ventral y una protuberancia dorsal en el epitelio del tubo digestivo primitivo (19), las cuales se fusionan durante la rotación del estómago y el intestino (Figura 2), el brote endodérmico dorsal formará gran parte del páncreas (cabeza, cuerpo y cola), mientras que el brote ventral originará la apófisis uncinada y parte de la cabeza del páncreas, dichos engrosamientos son visibles en el día E 9.0-9.5.

El desarrollo del páncreas es controlado por señales derivadas de estructuras mesodérmicas que entran en contacto con la región que lo originará. En etapas de desarrollo temprano, la notocorda se encuentra embebida en el endodermo dando

lugar a un estrecho contacto entre ambos tejidos y la placa neural. En este estado el endodermo pancreático dorsal está cerca de las aortas dorsal y el mesénquima dorsal y el endodermo pancreático ventral lateral es adyacente al septum transversum y el mesodermo cardiaco (20). El esbozo intestinal comienza a formarse, compuesto por un epitelio de una sola capa de células columnares y recubierto por una gruesa capa de mesodermo espláncnico a ambos lados, pero ninguno en la cara dorsal; las dos aortas dorsales se fusionan separando así la notocorda del endodermo.

El mesénquima empuja por el lado dorsal del intestino y los esbozos del páncreas dorsal inician su formación, la protuberancia ventral aparece poco después y se desarrolla de igual manera que el brote dorsal, aunque lleva un poco más de tiempo. El epitelio pancreático temprano puede considerarse como una lámina epitelial de células apicales muy plegada cuya superficie basal es continua con la del tubo digestivo (21). Alrededor del E 10.5-11.5 el epitelio pancreático se desarrolla hasta formar estructuras celulares altamente ramificadas conocidas como acinos y ductos y las primeras células protoendocrinas positivas a glucagon comienzan a diferenciarse, observándose como células individuales dispersas, a menudo integradas en los ductos (22). Entre el E 13.5-14.5 se produce una proliferación celular masiva de agrupaciones endocrinas y exocrinas conocida como transición secundaria en la que los acinos y ductos se hacen visibles y las células α y especialmente las células β se multiplican; en las siguientes 24 horas las primeras células δ comienzan a diferenciarse y hacia el E 18 se presentan las primeras células PP (21, 22).

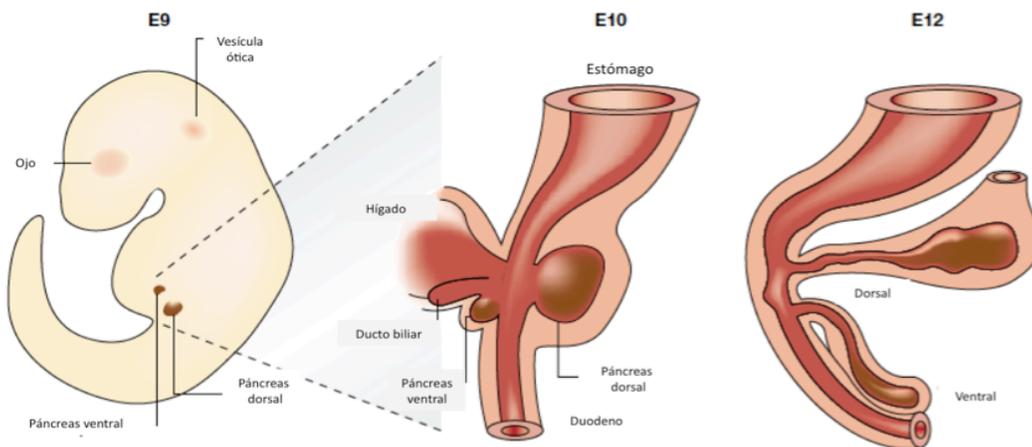


Figura 2. Desarrollo del páncreas en murinos (19).

Genéticamente la diferenciación pancreática está regulada por diversos factores de transcripción e inicia al E 8.5-E9.0 con la activación de Pdx1 (Homeobox pancreático duodenal 1) y Ptf1a (factor de transcripción específico del páncreas 1a) al E9.5-10 y se expresan ampliamente en los progenitores de los tres tipos celulares (acinos, ductos e islotes). La expresión de Pdx1 es detectada inicialmente en las células progenitoras del páncreas localizadas en el endodermo y en dos regiones ventrolaterales de tubo digestivo primitivo (23), posteriormente se extiende a la región que originará el

páncreas, así como a la región del estómago y duodeno. En estados de desarrollo más avanzado Pdx1 comienza a restringir su expresión a la población celular que originará el tejido endocrino, al E 15.5 la expresión se restringe en su totalidad a las células precursoras β y después del nacimiento la expresión de éste se mantiene en las células β maduras localizadas en los islotes, así como en células epiteliales en la parte dorsal del estómago y en la mucosa del duodeno (22, 24). Por el contrario, Ptf1a restringe su expresión a células acinares a partir de E 16 (20).

Otros factores de transcripción participan en la diferenciación y proliferación de células endocrinas, entre ellos Ngn3 cuya expresión comienza en pequeñas cantidades a partir del día E 10.5 en los progenitores endocrinos del páncreas y se incrementa drásticamente a la mitad de la embriogénesis para disminuir hacia el nacimiento y desaparecer después de éste (22, 24), Pax4 se expresa en el páncreas temprano y en etapas neonatales su expresión se restringe a las células β (25), Arx es detectable alrededor de E 9.5 en el epitelio pancreático, al E14.5 se expresa en células α y β precursoras y posteriormente en células δ , mientras que en etapas postnatales se identifica únicamente en células α y δ maduras (26) (Figura 3, Tabla 2).

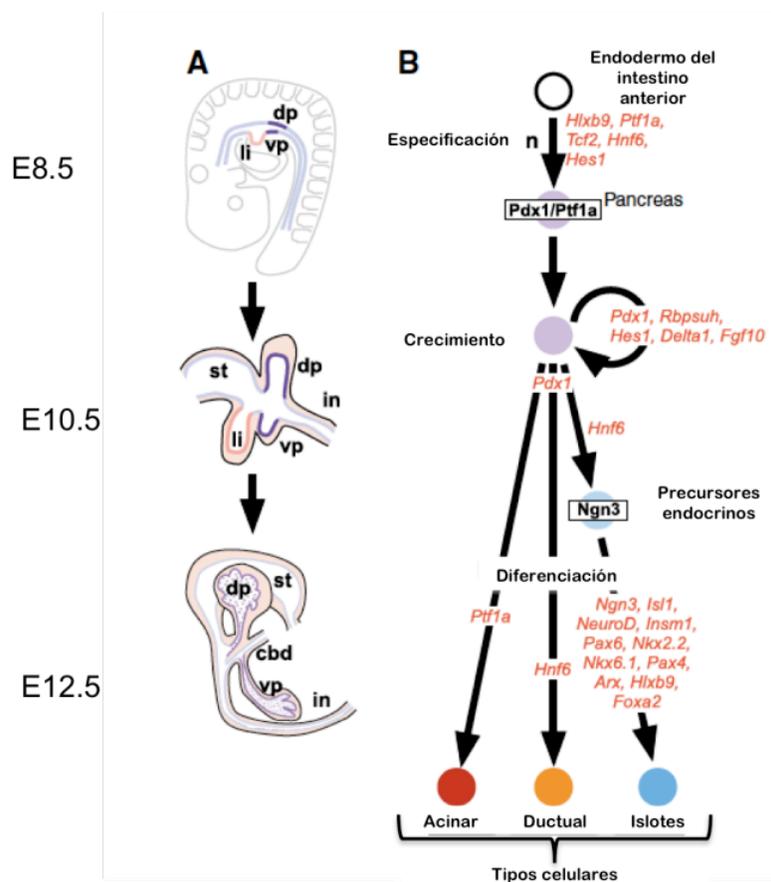


Figura 3. Factores de transcripción que participan en la diferenciación y desarrollo del páncreas (22).

Tabla 2. Factores de transcripción involucrados en el desarrollo pancreático (27)

Factor	Tipo	Detección	Expresión/papel	Fenotipos mutantes
Pdx 1	HD	8.5-8.75	Expresado en progenitores pancreáticos multipotentes, requerido para el desarrollo del linaje celular β y para el mantenimiento y crecimiento de primordios pancreáticos	Pdx -/- agenesis ventral y un arresto en el desarrollo del páncreas dorsal, intolerancia a la glucosa, incremento del mecanismo apoptótico de células β
Ngn3	bHLH	<9.5	Marcador celular progenitor endocrino que después de ser expresado en células de los islotes. Requerido para la formación de todas las células endocrinas y su mantenimiento	Ngn3 -/- ausencia de todas las células endocrinas pancreáticas y las células enteroendocrinas intestinales, dismorfogénesis acinar, hiperglucemia por una maduración celular β alterada
Ptf1a	bHLH	8.5-8-75	Expresado en células progenitoras multipotentes, promueve el destino celular ventral y mantiene el desarrollo acinar	Ptf1a -/- agénesis ventral promueve diferenciación intestinal, arresta desarrollo ventral y presenta una disminución en el desarrollo acinar y endocrino.
Pax4	HD	9.5	Expresado en progenitores que son restringidos a células β y δ , dependiente de la expresión de Ngn3. Promueve la distribución del destino celular β	Pax4 -/- pérdida de células β y δ , expansión de células α y ϵ
Arx	HD	<9.5	Expresado en células α y PP dependiente de la expresión de Ngn3, promueve la diferenciación de células α y PP y reprime la diferenciación de la células β y δ	Arx -/- pérdida de células α , aumento en el número de diferenciación celular β y δ
MafA	Zipper de leucina	<13.5	Activador específico de la transcripción del gen de la insulina, expresado exclusivamente en las células de insulina desde el estado 13.5 en adelante	MafA -/- no hay desarrollo de un fenotipo pancreático, desarrollo de intolerancia a glucosa postnatalmente
Isl1	HD	8.5	Expresado en mesénquima dorsal y en células endocrinas, requerido para el desarrollo epitelial y endocrino, requerido para el mantenimiento y apuración de la segunda ola de diferenciación endocrina	Isl1 -/- ausencia de mesenquima dorsal y una diferenciación aletarga de páncreas exocrino, falla en al diferenciación endocrina a partir de células epiteliales

1.3.2 Fisiología del páncreas

El páncreas es considerado un órgano doble debido a la organización y función de sus componentes endocrinos y exocrinos. La mayor parte del páncreas adulto se compone de tejido exocrino conformado por las células acinares que producen y secretan una amplia variedad de enzimas, y un epitelio ductal altamente ramificado que transporta dichas enzimas y bicarbonato hacia el intestino. En menor proporción se encuentra el tejido endocrino, el cual consiste en cinco tipos celulares que producen diversas hormonas que participan en la homeostasis de la glucosa y se organizan en agregados celulares llamados islotes de Langerhans (28).

1.3.3 Páncreas exocrino

Las células acinares del páncreas elaboran, almacenan y liberan un gran número de enzimas: amilasa pancreática, lipasa, ribonucleasas, desoxirribonucleasas y las proenzimas tripsinógeno, quimiotripsinógeno, procarboxipeptidasa y elastasa.

La actividad secretora del páncreas actúa en coordinación directa con el intestino tras la ingesta de alimentos; la presencia de alimento en el antro gástrico y el paso de los

productos ácidos de la digestión gástrica hacia el duodeno estimulan la liberación de dos hormonas intestinales, la secretina y la colecistocinina. La secretina es un pequeño péptido de 32 aminoácidos que es transportada por la sangre hasta el páncreas en donde estimula en las células centroacinares que conforman el epitelio de revestimiento de los conductos pancreáticos más pequeños la secreción de gran volumen de fluido que contiene una elevada concentración de bicarbonato, dicho fluido sirve para neutralizar el quimo ácido proveniente del estómago y proporciona un pH óptimo necesario para la actividad enzimática desencadenada por la acción de la colecistocinina; el contenido de bicarbonato del jugo pancreático es secretado con grandes cantidades de agua (28).

La colecistocinina es una hormona de 33 aminoácidos secretada en la mucosa del intestino y la parte superior del yeyuno después de la ingesta de alimento; la colescistocinina es liberada y transportada vía sanguínea hasta el páncreas, en donde se une a receptores específicos de las membranas basolaterales de las células acinares en las que induce la liberación de los zimógenos almacenados. Cuando su liberación es coordinada con la liberación de secretina tiene lugar a la secreción de un volumen considerable de jugo gástrico y de bicarbonato necesarios para la digestión de los alimentos.

La regulación nerviosa de la actividad exocrina del páncreas es mediada por las fibras parasimpáticas y simpáticas de la glándula. Las fibras vagales hacen sinapsis con las neuronas colinérgicas que se encuentran en el interior del páncreas y que inervan las células acinares y las células de los islotes. Los nervios simpáticos postganglionares de los plexos celíaco y mesentérico superior inervan los vasos sanguíneos pancreáticos; la secreción del jugo pancreático es estimulada por la actividad del nervio parasimpático e inhibida por la del nervio simpático (28).

1.3.4 Páncreas endocrino

El páncreas endocrino está representado por los islotes de Langerhans cuyos componentes celulares segregan una amplia variedad de hormonas implicadas en el control de los niveles de glucosa en sangre, fuente principal de energía para el metabolismo celular en el organismo. En el islote es posible distinguir cinco tipos celulares (Figura 4, Tabla 3):

Células α → células productoras de glucagon cuyo efecto es aumentar los niveles de glucosa al estimular dos procesos en las células hepáticas, la glucogenolisis que es la conversión de glucógeno en glucosa y la gluconeogénesis, que permite la transformación de ácidos grasos y aminoácidos en glucosa.

Células β → células productoras de insulina, cuya función principal es la homeostasis de la glucosa, pero también desempeña un papel fundamental en el metabolismo de aminoácidos, ácidos grasos, cetoácidos y lipoproteínas. La insulina favorece la utilización de la glucosa y frena su producción endógena; en el tejido muscular y adiposo estimula el transporte de glucosa a través de la membrana y aumenta la

oxidación de la glucosa en hígado, en donde el transporte de glucosa es independiente de insulina, favorece la oxidación de glucosa y su depósito como glucógeno.

Células δ \rightarrow células productoras de somatostatina, hormona que regula la actividad secretora de los componentes celulares endocrinos. La somatostatina inhibe la secreción de glucagon, insulina y polipéptido pancreático, así como la secreción de hormona del crecimiento en la hipófisis anterior.

Células PP \rightarrow secretan la hormona denominada polipéptido pancreático, que inhibe la secreción exocrina del páncreas y atenúa la liberación de HCl en las células parietales del estómago.

Células ϵ \rightarrow representan la principal fuente de grelina durante la vida fetal. El número de células ϵ aumenta durante el desarrollo fetal y cerca del nacimiento es posible localizarlas en la periferia de los islotes en desarrollo; en el páncreas humano y murino de recién nacidos y adultos se observan células ϵ en las zonas marginales de los islotes (29).

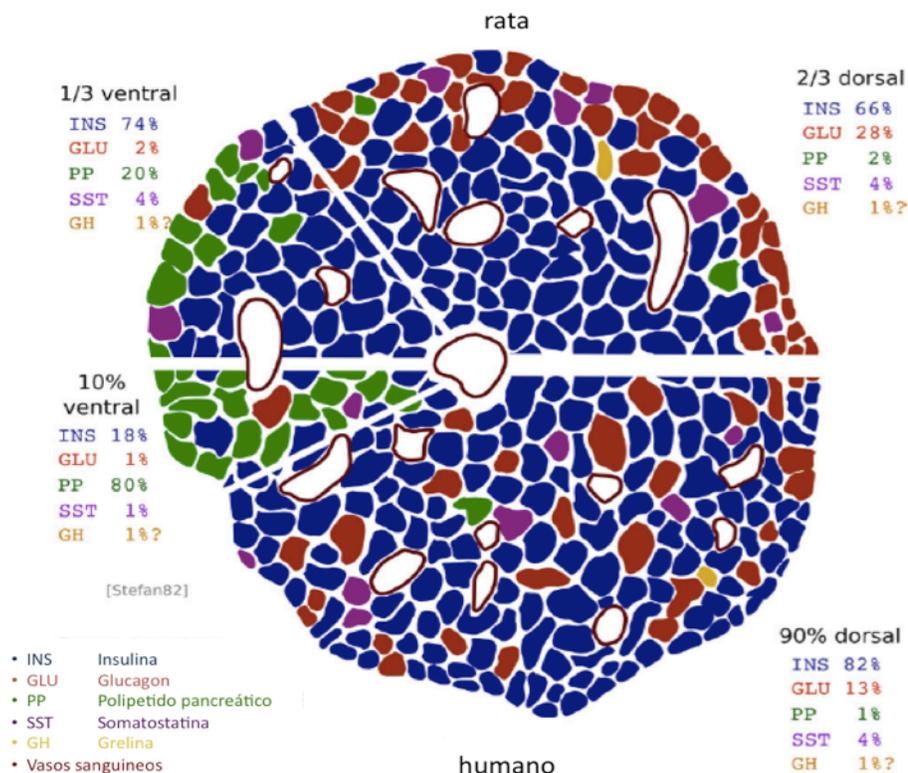


Figura 4. Conformación del islote de Langerhans en humanos y ratas (30).

Tabla 3. Células y hormonas del islote de Langerhans y su porcentaje total en páncreas humano y murino (30, 31).

Célula	% total en		Localización	Estructura de los gránulos	Hormona y peso molecular (Da)	Función
	Humanos	Ratas				
α	13	28	Periferia del islote	Diámetro de 250 nm, gránulo de centro denso	Glucagon, 3500	Aumenta niveles de glucosa sanguínea
β	82	66	Concentrada en el centro del islote	Diámetro de 300 nm, gránulo de centro denso	Insulina, 6000	Reduce los niveles de glucosa sanguínea
δ	4	4	Dispersa por todo el islote	Diámetro de 350 nm, gránulo homogéneo electrolúcido	Somatostatina, 1640	Inhibe la liberación hormonal del páncreas endocrino y enzimas del páncreas exocrino Regula el tono del músculo liso y motilidad del intestino, controla la secreción de iones y agua en las células epiteliales intestinales
PP	1	2	Dispersa por todo el islote	Diámetro de 180 nm	Polipéptido pancreático, 4200	Inhibe la secreción exocrina del páncreas
ϵ	1	1	Periferia del islote	Diámetro de 300 nm	Grelina, 3314	Estimula la producción del HCl en las células parietales del estómago

Los islotes tienen una fina red vascular y están dotados de un sistema venoso tipo portal orientado desde las células α , β y δ .

En la etapa embrionaria, la fusión del conducto ventral con la parte distal del conducto dorsal forman el conducto pancreático principal (conducto de Wirsung) y la parte proximal del conducto dorsal se convierte en un conducto accesorio pequeño (conducto de Santorini) por lo general con su apertura en el propio duodeno (28).

1.3.5 Anatomía e histología del páncreas

El páncreas es considerado una glándula mixta del sistema digestivo con actividad endocrina y exocrina; es posible distinguir tres regiones: cabeza, cuerpo y cola, la cabeza se ubica sobre la curva del duodeno en forma de C, el cuerpo se extiende horizontalmente por detrás del estómago y la cola se extiende hacia el bazo. Está recubierto por una capa de tejido conectivo laxo rico en células mesoteliales que divide a la glándula en lóbulos separados por finos tabiques.

El tejido exocrino representa del 95-99% de la masa pancreática total y contiene dos estructuras bien definidas, los acinos y los ductos. La mayor parte del páncreas es tejido exocrino con una disposición acinar compuesta, es decir, los componentes celulares liberan sus secreciones en conductos microscópicos dentro de cada unidad, dichos conductos se hayan ramificados y se unen para formar conductos mayores que

desembocan en el conducto pancreático principal que se extiende a lo largo de toda la glándula desde la cola hasta al cabeza y se vacía en el duodeno.

El acino pancreático es redondeado con 4-8 células epiteliales cúbicas o piramidales dispuestas en una capa única en torno a una luz cuyo tamaño varía con el estado fisiológico del órgano, es pequeña cuando la glándula está en reposo y se dilata durante la secreción activa, presentan núcleo esférico con un nucleolo prominente y agrupaciones periféricas de cromatina (21).

El citoplasma basal de las células es basófilo debido a la elevada concentración de ribonucleoproteínas; el aparato de Golgi varía en tamaño en las diferentes etapas del ciclo secretor, se observan cisternas paralelas del retículo endoplásmico rugoso con abundantes ribosomas en el citoplasma circundante; entre estas cisternas es posible observar mitocondrias con numerosos gránulos en la matriz y algunas gotas de lípidos y lisosomas (31).

El citoplasma apical está repleto de gránulos de secreción que contiene precursores de las enzimas digestivas pancreáticas denominados zimógenos, que son más abundantes en estado de ayuno y disminuyen considerablemente tras la liberación de éstos para inducir la digestión de los alimentos, cuando disminuye la concentración de gránulos el aparato de Golgi aumenta su tamaño mientras se están formando nuevos gránulos de secreción (31).

En la unión de los acinos y los conductos se localizan células centroacinares cúbicas y ricas en mitocondrias que secretan diversos componentes no enzimáticos del jugo pancreático, principalmente sodio y bicarbonato. Las células centroacinares se continúan con el epitelio de revestimiento de los delgados conductos intercalares que drenan el acino, estos finos conductos convergen formando conductos intralobulares de mayor tamaño que son, a su vez, ramas de los conductos interlobulares situados en los tabiques del tejido conjuntivo que separa los lobulillos; los conductos interlobulares se unen al conducto pancreático principal que comienza en la cola del páncreas y recorre longitudinalmente toda la glándula, aumentando su diámetro a medida que se le van uniendo más conductos interlobulares y finalmente desemboca en el duodeno (27).

Los acinos y conductos intercalares se recubren con un delicado tejido laxo que se vuelve más grueso en torno a los grandes ductos. Los conductos intralobulares se encuentran revestidos por epitelio simple plano, los conductos interlobulares están revestidos por células epiteliales cúbicas y en el conducto principal es posible observar pequeñas y numerosas células caliciformes.

El tejido endocrino constituye entre el 1-5% del páncreas y está representado por agregados celulares esféricos denominados islotes de Langerhans, conformados por células epiteliales dispuestas en cordones entre los cuales se dispone una fina red de vasos sanguíneos; la organización del aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BADA (β - α - δ) por su forma centrífuga de

aporte vascular (32). Las células de los islotes están delimitadas por una delgada capa de tejido conectivo que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad, mientras que los islotes están separados del tejido exocrino circundante por una fina cápsula de fibras reticulares. En los murinos, la organización de los islotes es muy evidente, encontrando así las células β al centro del islote y los tipos celulares α , β , δ , ϵ y PP en la periferia del mismo. Las células de los islotes están delimitadas por una delgada capa de tejido conectivo que se continúa en el interior de los islotes.

1.4 Insulina

La insulina es miembro de una familia de péptidos denominada factores del crecimiento insulinoides (insulina like growth factors, IGF) e incluye IGF I y II y siete miembros de la familia de péptidos relaxina, los miembros del grupo comparten similitudes estructurales y se sabe que derivaron de un gen de insulina ancestral a lo largo de la evolución de vertebrados (33).

La insulina es un polipéptido de peso molecular 5800 D constituido por dos cadenas de aminoácidos unidas por dos puentes de disulfuro, la cadena A tiene 21 aminoácidos y la cadena B está conformada por 30 aminoácidos, y se encarga de controlar la captación, utilización y almacenamiento de nutrimentos celulares. Sus efectos incluyen acciones anabólicas y catabólicas, entre las primeras se incluye la estimulación y almacenamiento intracelular de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos; por otro lado, bloquea procesos catabólicos como la desintegración de glucógeno, grasa y proteína (34).

Regula la concentración de glucosa en sangre al incrementar su absorción en músculo y tejido adiposo e inhibir de la producción de glucosa hepática por medio de la glucogenólisis; estimula el crecimiento y diferenciación celular, promueve el almacenamiento intracelular de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos en el adipocito, hígado y músculo al estimular la lipogénesis, la síntesis de proteínas y glucógeno y bloqueando procesos catabólicos como la desintegración de glucógeno, grasa y proteína (34, 35).

1.4.1 Síntesis de insulina

La insulina se sintetiza en las células β del islote pancreático a partir de un precursor de cadena única de 110 aminoácidos llamado preproinsulina que se caracteriza por presentar una secuencia de 24 aminoácidos hidrófobos fijos al amino terminal N de la cadena B; esta característica funciona como secuencia señal permitiendo la translocación de la cadena a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso, el péptido señal N-terminal se desdobra con rapidez hasta formar la proinsulina que se pliega y forma enlaces disulfuro; la proinsulina se transporta en vesículas hacia el aparato de Golgi, donde se transforma en gránulos secretorios junto con las enzimas que se encargan de su conversión en insulina (34, 36).

producción de CO_2 y NADH y FADH_2 ; el NADH y el FADH_2 actúan como donadores de electrones en la fosforilación oxidativa y en la síntesis de ATP (34).

El incremento de ATP en la célula β da lugar al cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP provocando la despolarización de la membrana y activando los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, permitiendo la entrada de Ca^{2+} desde el exterior. En condiciones normales de glucemia se produce un patrón de actividad eléctrica en la célula β de manera que se generan oscilaciones del potencial de membrana entre un valor de despolarización (fase activa), y una fase de repolarización. El incremento de Ca^{2+} en el citoplasma es la señal que desencadena la secreción de insulina (37).

La insulina es secretada por las células β hacia la vena porta, en donde circula en la sangre como el monómero libre, en mamíferos se secretan aproximadamente 40 μg (IU) de insulina por hora, alcanzando una concentración de la hormona en la sangre portal de 2 a 4 ng/ml y de 0.5 ng/ml en circulación periférica. La vida media de la insulina en plasma es de unos 5 a 6 min en sujetos normales y en pacientes con diabetes controlada (34, 37).

La inactivación de la insulina ocurre principalmente en hígado, riñones y músculo. En el hígado cerca del 50% de la insulina proveniente de la vena porta se destruye mientras que en los riñones, después de ser filtrada en los glomérulos, es reabsorbida en los túbulos contorneados; algunos tejidos periféricos como la grasa también inactivan a la insulina.

1.4.3 Receptor de insulina

La insulina existente en la circulación alcanza los tejidos blanco en donde interactúa con su receptor. El receptor de insulina (IR) es una glicoproteína tetramérica con propiedades tirosina quinasa compuesta por dos subunidades α (135 kDa) y dos subunidades β (95 kDa) unidas entre sí por enlaces disulfuro, las subunidades α son extracelulares y contienen zonas ricas en residuos de cisteína implicadas en la unión con la insulina, las subunidades β son transmembranales y contienen residuos de serina, treonina y tirosina susceptibles de ser fosforilados y que son responsables de la actividad tirosina quinasa (38, 39).

La insulina se une a las regiones específicas de la subunidad α dando lugar a un cambio configuracional que ocasiona la autofosforilación de los residuos específicos de tirosina en la región intracelular de las subunidades β a través de un mecanismo de transfosforilación; la autofosforilación de residuos de tirosina provoca que la actividad quinasa del IR fosforile una serie de receptores de insulina tales como IRS-1, -2, -3 y -4 que funcionan como puentes para la fosforilación de otras proteínas, entre las que se encuentran SHC (linfocitos T) y GAB-1 y proteínas con dominios SH2 (Src Homology 2) y dominios PH. Las proteínas SHC permiten la activación de proteínas con dominios SH2 iniciándose así la cascada de fosforilaciones de la ruta de transducción de señal de las MAPquinasas que regulan la síntesis de DNA (35).

La insulina entra a las células por medio de endocitosis, en el interior forma una unidad citoplasmática insulina-receptor denominada receptosoma que se liga al aparato de Golgi y posteriormente forma un lisosoma. En el proceso, la insulina desencadena su acción fisiológica y posteriormente es degradada por proteólisis, el receptor queda libre de insulina y es devuelto a la membrana celular (38).

1.5 Páncreas en murinos

Al igual que en otros mamíferos en murinos el páncreas está compuesto por dos tipos de tejido, el tejido acinar o exocrino y los Islotes de Langerhans o tejido endocrino.

El páncreas en murinos es un órgano con patrón lobular que en la edad adulta llega a pesar 1.5 g. Los lóbulos son de diferente tamaño y forma y están unidos por tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, conductos excretores y ductos.

Los acinos están constituidos por una sola capa de células epiteliales piramidales sobre una membrana basal que converge hacia la membrana plasmática; las células acinares muestran gránulos basófilos hacia la luz del acino mientras que la región más alejada de ésta muestra gránulos eosinófilos, los núcleos son redondos y contienen numerosos gránulos de cromatina y uno o dos nucleolos, las figuras mitóticas son raras (40).

El tejido exocrino es un compartimento multienzimático en el que cada célula acinar es responsable de la secreción de varias enzimas diferentes entre las que se pueden encontrar amilasa, lipasa, ribonucleasas, desoxirribonucleasas y tripsinógeno.

Se han observado importantes diferencias entre las células que componen los acinos cercanos a los islotes de Langerhans (tejido peninsular) y las células de los acinos que se localizan a una distancia mayor de los islotes (tejido teleinsular). El tejido peninsular presenta células de mayor tamaño grandes y contienen mayor abundancia de gránulos de cimógeno, por el contrario las células de los acinos teleinsular son menos abundantes (41).

Los islotes de Langerhans son de forma irregular y poco numerosos. El tejido endocrino es considerado como una unidad multihormonal compuesto de cinco tipos de células involucradas en la secreción de por lo menos una hormona: el glucagon (células α), insulina (células β), somatostatina (células δ), polipéptido pancreático (células PP células) y grelina (células ϵ).

1.6 Animales de laboratorio como modelos experimentales

Los animales como modelos experimentales han sido ampliamente utilizados. Los primeros registros de esta práctica datan de la Grecia Antigua, cuando Aristóteles e Hipócrates los utilizaron para dilucidar la estructura y funcionamiento del cuerpo humano mediante la disección de animales. Posteriormente los romanos utilizaron

cerdos, monos y perros para llevar a cabo diversos experimentos sobre fisiología, cuyos resultados fueron las bases en la práctica médica por varios siglos; durante mucho tiempo la experimentación con animales pudo ser llevada a cabo sin problemas de índole moral. En el siglo XVII René Descartes afirmó que los sistemas vivos pueden ser entendidos por medio de principios mecánicos y que la diferencia entre el hombre y los animales es que los primeros tienen una mente que funge como requisito para el conocimiento y en consecuencia para la capacidad de sentir dolor, bajo este precepto los animales no pueden pensar y se pueden considerar como máquinas. El desarrollo de disciplinas biomédicas como farmacología, toxicología e inmunología provocó un incremento en el uso de animales en el siglo XX. En la década de 1980 la utilización de animales disminuyó debido al establecimiento de legislaciones estrictas sobre su uso y el desarrollo de comités de ética para su utilización, en las últimas dos décadas los grandes avances en materia de manipulación genética permitieron la mejora de los modelos animales utilizados. Se estima que actualmente se utilizan de 75 a 100 millones de animales al año en investigación; las áreas con mayor número de animales destinados a investigación son: prueba de medicamentos, creación de vacunas y cáncer (42, 43). Las ratas y ratones son los modelos animales más utilizados.

El empleo de animales de laboratorio como modelos experimentales ha permitido grandes avances en la investigación de diversas enfermedades humanas. La cura de diversos padecimientos, el tratamiento de ciertas enfermedades y el alargamiento de la esperanza de vida con el consecuente aumento en la calidad de ésta ha sido posible gracias a la creación de vacunas, la elaboración de medicamentos, el desarrollo de los trasplantes de órganos, así como una amplia variedad de técnicas quirúrgicas y de traumatología que fueron desarrolladas en modelos animales (44).

Diversas consideraciones de tipo ético hacen imposible la realización de protocolos de investigación en seres humanos, algunas Pautas Éticas Internacionales señalan que la investigación en ellos debe atenerse a principios científicos basados en experimentos con modelos animales que proporcionen la información necesaria para diseñar pruebas en humanos (45, 46). Sin embargo la extrapolación de resultados obtenidos en pruebas con modelos animales hacia el ser humano conlleva cierto riesgo y éstos se incrementan de acuerdo con las variables estudiadas, debido a que el desarrollo de ciertas patologías no ocurren de manera natural en los animales de laboratorio, sino que es necesario inducirlos por métodos hormonales, terapéuticos, virales o que pueden alterar directa o indirectamente otras funciones del organismo, sin embargo las grandes similitudes neurológicas, bioquímicas y farmacológicas entre los humanos y los modelos animales han hecho que éstos sean ampliamente utilizados y que, en combinación con otros métodos como cultivos celulares y estudios clínicos en pacientes, los resultados arrojen grandes aportaciones al conocimiento de las patologías humanas (47, 48).

En México el uso de animales para experimentación está regulado en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) en el apartado de Salud Animal publicada en Agosto de 1999 en el diario oficial de la federación. Esta Norma tiene por objeto establecer y uniformar las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los

animales de laboratorio que deben cumplir las personas físicas o morales relacionadas en todos los campos con este tipo de animales; la vigilancia del cumplimiento de los parámetros establecidos en la Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, así como a los Gobiernos de los Estados y del Distrito Federal (49).

1.6.1 Modelos animales de diabetes

Algunos factores como heterogeneidad genética, mayor esperanza de vida, amplia diversidad de estilos de vida, inaccesibilidad a tejidos y órganos, y algunas consideraciones de tipo ético, hacen poco posible el estudio experimental de la diabetes en humanos por lo cual ha sido necesario recurrir al empleo de modelos animales. Esta práctica ha brindado un amplio avance en el conocimiento de la enfermedad, sin embargo debe de considerarse que cada cepa animal es un modelo único de diabetes que equivale a varias copias de un solo individuo, razón por la cual los resultados obtenidos no se pueden extrapolar directamente a una población humana heterogénea (Tabla 4)(50).

Según el mecanismo de producción los modelos de diabetes mellitus tipo 2 pueden dividirse en espontáneos e inducidos.

1.6.2 Modelos espontáneos

En este tipo de modelos los animales son obtenidos mediante cruces endogámicos, acción que favorece la estabilidad genética de la estirpe. Los animales pueden originarse por dos vías: pueden ser descendientes de animales a los que se les ha detectado diabetes espontánea en el sentido estricto, o bien proceder de una serie de cruces selectivos, favoreciendo un rasgo fenotípico de la enfermedad. Esta clasificación no es espontánea en el sentido estricto pues en ocasiones se requieren ciertas restricciones adicionales, por ejemplo dietéticas, para obtener la condición diabética.

Tabla 4. Principales modelos animales de diabetes (48, 51-54).

Modelo	Causa	Característica	Tipo de diabetes
Ratón Lep/ob	Mutación en el gen estructural de la leptina.	Marcada obesidad e hiperfagia Obesidad, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina, hiperglicemia e hiperplasia de células β pancreáticas.	1
Ratón Lep/db	Mutación en el gen receptor de la leptina.	Hiperglucemia correlacionada con atrofia de los islotes de Langerhans y necrosis celular pancreática.	1
Rata Zucker	Defectos en el receptor de la leptina Obesidad y resistencia a la insulina causada por defectos genéticos en la transcripción de la célula β .	El macho se caracteriza por hiperinsulinemia e hiperglicemia a las 6-7 semanas de edad y niveles de glucosa de hasta 500 mg/dl y niveles bajos de insulina, la hembra requiere una dieta alta en grasa para desarrollar diabetes.	2
Rata Goto-Kakizaki	Disfunción de células β debido a herencia poligénica.	Rata no obesa, Presentan anomalías en los islotes páncreaticos y consiguiente deficiencia en la secreción de hormonas	2
Rata obeso New Zealand	Modelo de obesidad, intolerancia a la glucosa y síndrome metabólico de naturaleza poligénica.	Insensibilidad periférica y hepática a la leptina, resistencia a la insulina, alteración en la secreción de insulina, hipercolesterolemia e hipertensión	2
Rata JCR:LA-cp	Presentan síndrome metabólico y enfermedad micro y macrovascular	El estado prediabético presenta obesidad abdominal, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y daño vascular asociado a aterosclerosis, vasculopatía, y cardiopatía isquémica.	
Rata Otsuka Long-Evans Tokushima obesa con síndrome metabólico y nefropatía diabética (OLETF)	Obtenidas mediante reproducción selectiva de ratas Long-Evans con características diabéticas.	Hiperfagia con obesidad, hiperlipidemia, resistencia a la insulina, glucosuria; animales propensos a lesiones glomerulares	2
Mono rhesus <i>Macaca mulata</i>	En una dieta <i>ad libitum</i> llegan a desarrollar sobrepeso y obesidad que desencadenan cambios bioquímicos y fisiopatológicos característicos de la diabetes.	Trastornos metabólicos	2
Jerbo <i>Psammomys obesus</i>	Debido a la dieta desarrolla hiperglucemia e hiperinsulinemia. Resistencia a la insulina causada por la sobreexpresión de la proteína quinasa C.	Hiperglucemia e hiperinsulinemia en respuesta a la resistencia a la insulina Apoptosis de células β	2
Ratas albino <i>Sabra</i>	Dieta alta en grasas	Desarrollan relativa hiperinsulinemia, normoglucemia, obesidad e hipertrigliceridemia.	2
Ratas Torii	Obtenidas mediante cruces endogámicos en la cepa Sprague-Dawley	Los machos desarrollan numerosas complicaciones oculares tales como cataratas, retinopatía, glaucoma neovascular y neuropatía óptica	2
Rata Cohen	Disfunción de células β y consiguiente reducción de la secreción de insulina	Desarrollan retinopatía, nefropatía, reducción de la fertilidad y degeneración testicular.	2
Ratones KK y KKAy	Los ratones KK desarrollan diabetes espontánea en su hábitat natural. La cepa KKAy fue desarrollada mediante cruces selectivos de ratones KK	Obesidad moderada, hiperglucemia, hiperlipidemia, resistencia a la insulina y complicaciones renales	2
Ratón C57BL/6j	Animales susceptibles a desarrollar diabetes con una dieta alta en grasas	Alteraciones del sistema nervioso autónomo y en el funcionamiento de la célula β , expresión de la proteína desacoplante 2 de los adipositos. Obesidad e hipertensión	2
Otros modelos de Diabetes tipo 2	Ratas, ratones y perros sometidos a obesidad inducida por dieta	La elevada ingesta de alimentos produce cambios drásticos en el metabolismo que favorece la aparición de Diabetes	2
Ratas BB	Tres genes involucrados en al condición diabética de los ratones BB Lyp (linfopenia) autosómico recesivo que induce a la ausencia de células T periféricas, el segundo gen es el MHC que induce susceptibilidad a la insulinitis y a la diabetes y el tercero, iddm3 que confiere resistencia a la diabetes	Marcada hipoinsulinemia, hiperglucemia (20-30 mmol/L), glucosuria, pérdida de peso, polidipsia, poliuria y cetoacidosis. Infiltración mononuclear celular del islote pancreático y destrucción de las células β	1
Rata Long-Evans Tokushima Lean (LETL)	Condición diabética dada por la segregación de al menos 2 genes recesivos	Hipoinsulinemia, hiperglucemia (20-30 mmol/L), glucosuria, pérdida de peso, polidipsia, poliuria y cetoacidosis.	1
Ratones diabéticos no obesos (NOD)	Existen más de 17 loci en al menos 5 cromosomas diferentes	Insulinitis, hipoinsulinemia, hiperglucemia, glucosuria, polidipsia, poliuria y cetoacidosis.	1

1.6.3 Animales genéticamente modificados

La manipulación genética y la generación de animales *knockout* representan importantes herramientas que utilizadas correctamente pueden brindarnos importantes conocimientos sobre la patología de la diabetes mellitus. La manipulación genética se basa en la introducción o exclusión de material genético funcional en la línea germinal de un animal cambiando así las características genéticas de un organismo y las de su progenie.

Existen dos grandes estrategias para obtener animales transgénicos: la transgénesis aditiva y la transgénesis dirigida. La transgénesis aditiva tiene como fundamento la introducción de un transgén en el pronúcleo de embriones en fase de una célula. La transgénesis sustitutiva conlleva una modificación mucho más selectiva de la información genética al incorporarla en un lugar predeterminado del genoma utilizando un sistema de recombinación homóloga que consiste en el intercambio de fragmentos homólogos de DNA durante el alineamiento de los cromosomas en la meiosis. Para llevar a cabo este tipo de transgénesis es necesario utilizar líneas celulares pluripotentes que pueden ser transformadas en cultivo y posteriormente incorporadas al embrión por medio de microinyecciones (55).

La tecnología de transgénesis sustitutiva ha dado lugar a la formación de animales knock-out, en los cuales se ha logrado la eliminación total de un gen al incluir un fragmento de información genética que bloquea la transcripción o la traducción de determinado gen, y los animales knock-in en quienes se colocan proteínas concretas en un lugar específico bajo el control de una determinada secuencia reguladora endógena (55, 56).

1.6.4 Inducción quirúrgica

En los primeros modelos animales de diabetes se utilizaron perros pancreatécotomizados, acción que permitió dilucidar la importancia del páncreas en el desarrollo de la diabetes. En 1682 Brunner advirtió que la remoción parcial de páncreas en perros producía poliuria y sed, en 1915 Carlson y Ginsburg comprueban que al transfundir sangre de perros sanos a perros diabéticos pancreatécotomizados éstos disminuían sustancialmente la hiperglucemia y glucosuria y en 1930 Houssay y Bascotti reportaron que la pancreatécotomía total en caninos producía diabetes (57).

La pancreatécotomía puede ser parcial si se requiere generar un estado similar al provocado por la diabetes tipo 2; o total para obtener un modelo de diabetes mellitus tipo 1. En la actualidad este modelo es poco utilizado y su empleo se ha limitado al estudio de trasplantes de islotes o páncreas, así como para el estudio de los factores implicados en la regeneración de los islotes (58).

1.6.5 Inducción viral

Algunos agentes patógenos como los virus son capaces de generar estados diabéticos en animales de experimentación cuya susceptibilidad a ser infectados está relacionada con la edad, el sexo y la carga genética, la patogénesis del síndrome provocado es similar a la diabetes tipo 1 y es considerado moderado y transitorio, debido a que solo una porción de los islotes de Langerhans está afectado (57).

Diversos mecanismo de acción se han propuesto para describir el efecto de los virus en el desarrollo de la diabetes; se ha reportado que algunos virus destruyen directamente las células β pancreáticas por lo cual se han clasificado como agentes citolíticos y por otro lado evidencias clínicas y experimentales sugieren que la diabetes se desencadena como respuesta a mecanismos autoinmunes (Tabla 5).

1.6.6 Inducción química

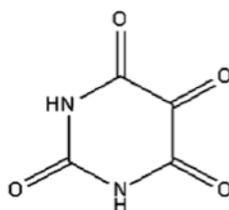
Diversos agentes químicos son utilizados en la investigación para inducir diabetes. Entre los más utilizados se encuentran la aloxana y la estreptozotocina (STZ), que actúan destruyendo selectivamente las células β pancreáticas. Otros compuestos tales como el ácido caprónico, los derivados del ácido ascórbico, el α -dipiridil, el ácido 5-hidroxisseudoúrico, el ácido picrolónico y los derivados de la aloxana, así como nitrosoureas tales como la fotemustina, clomesone y procarbazine inducen estados hiperglucémicos por diversos mecanismos de acción.

Tabla 5. Virus utilizados en la inducción de diabetes mellitus 1 (52, 59).

Virus	Hospedero	Características	Factores genéticos involucrados	
Virus de RNA				
Picornaviridae Coxsackie B	Humanos	Aislado de páncreas de pacientes con DM1	No determinado	
	Murinos	Destrucción citolítica de las células β	+	
	Primates no humanos	Desarrollo de transitorio de Diabetes	+	
	Ratón	Agente citolítico con alta afinidad a los receptores de la célula β produciendo degranulación	+	
	Encefalomiocarditis (EMC)	Hámster	Causa encefalitis, necrosis de las células β e infiltración severa	+
		Ratón	Agente citolítico	+
Ganado			No determinado	
Retroviridae Retrovirus	Humanos	De naturaleza autoinmune, provoca la necrosis del tejido endocrino	No determinado	
	Ratón	Desarrollo de insulinitis y DM1 en ratones no obesos	+	
Togaviridae Rubéola	Hámster y conejo	Posible asociación con DM1 autoinmune	No determinado	
	Humanos	Posible asociación con DM1 autoinmune congénita al aumentar la frecuencia de alelos HLA-DR3	+	
	Diarrea viral bovina	Ganado	Respuesta autoinmune que causa la necrosis de células β	No determinado
Paramyxoviridae Virus de las Paperas	Humanos	Autoinmunidad	+	
Reoviridae Rotavirus	Humanos	-	No determinado	
Reovirus	Ratón	Posible asociación con autoinmunidad y diabetes	+	
Virus de DNA				
Parvoviridae Virus Kilham de la Rata	Rata	Desarrollo de autoinmunidad específica celular que induce DM1 y provoca la necrosis de células β	+	
Herpesviridae Citomegalovirus	Humano	Autoinmune	No determinado	
	Degú		No determinado	
Virus Epstein –Barr	Humano	-	No determinado	

1.7 Aloxana

La aloxana (2,4,5,6-tetraoxipirimidina; 5,6-dioxiuracil) (Figura 6) fue descrita por primera vez por Brugnatelli en 1818 como resultado de la oxidación del ácido úrico, años más tarde se demostró que su administración en conejos produce una necrosis de los islotes pancreáticos. La aloxana puede administrarse por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. La dosis requerida para inducir diabetes depende de la especie animal, la vía de administración y el estado nutricional. La dosis más frecuente en ratas es de 65 mg / kg de peso (BW) por vía intravenosa, cuando el fármaco se administra subcutánea e intraperitonealmente se requieren dosis 2-3 veces mayores (60).



Aloxana

Figura 6. Estructura química de la aloxana (60).

Se ha demostrado que una dosis única de aloxana provoca un aumento repentino de la secreción de insulina en la presencia o ausencia de glucosa, sin embargo este fenómeno es de corta duración y es seguido por la supresión completa de la respuesta de los islotes a la glucosa, incluso cuando las concentraciones de dicha glucosa son altas.

Los efectos causados por la aloxana pueden describirse en cuatro fases. La primera se caracteriza por hipoglucemia transitoria que inicia pocos minutos después de la inyección y puede extenderse hasta por 30 minutos. Esta hipoglucemia es debida a una estimulación transitoria de la secreción de insulina, la fosforilación de la glucosa se bloquea debido a la inhibición de la glucoquinasa por lo que hay una reducción temporal del consumo y la mayor disponibilidad de ATP, las alteraciones morfológicas en la célula β son mínimas durante esta fase; la segunda fase comienza después de 1 hora de haber administrado el fármaco y se caracteriza por un aumento de la concentración sanguínea de glucosa y una disminución en la insulina plasmática, durante esta fase las células β sufren evidentes cambios morfológicos como vacuolización intracelular, dilatación del retículo endoplasmático rugoso, disminución del volumen del aparato de Golgi, la reducción de gránulos secretores y aumento del volumen mitocondrial; la tercera fase ocurre de 4 a 8 horas después de la inyección de aloxana y se caracteriza por una severa hipoglucemia debida a la estimulación de la secreción de insulina. En esta fase pueden ocurrir convulsiones y generalmente se tiene que administrar glucosa para evitar la muerte, cuando el glucógeno almacenado en el hígado se ha agotado, además de los cambios morfológicos que se observan en la célula β durante la segunda fase se suman núcleos picnóticos; la cuarta y última fase

está representada por hiperglucemia permanente, los cambios morfológicos evidencian degranulación y atrofia de la célula (60).

1.8 Estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ, 2-deoxi-2-(3-(metil-3-nitrosourea)-D glucopiranososa) es sintetizada por el hongo *Streptomyces achromogenes* y es ampliamente utilizada para inducir diversos grados de diabetes (60). Diversos estudios han demostrado que la estreptozotocina es un agente diabetogénico en diversas especies animales. A una dosis única de 30 mg/kg administrada vía intravenosa es capaz de provocar diabetes moderada en perros adultos (61); en ratas Wistar a una dosis ip única de 50 mg/kg genera una diabetes estable durante al menos 20 días después de la administración, provocando niveles de glucosa en sangre superiores a 300 mg/dL (62); mientras que en ratas SD al administrar una dosis ip de 60 mg/kg se inicia un proceso autoinmune que resulta en la destrucción de las células β en los islotes de Langerhans y desencadena la aparición de diabetes en los 2-4 días posteriores (63, 64, 65).

La acción de la estreptozotocina en la célula β se caracteriza por alteraciones en la concentración de insulina y glucosa en la sangre. Dos horas después de la inyección se puede reconocer hiperglucemia con disminución de las concentraciones de insulina en sangre. Cerca de seis horas más tarde, se produce la hipoglucemia con altos niveles de insulina en la sangre. Por último, se desarrolla hiperglucemia a la vez que disminuyen los niveles de insulina, los cambios sufridos en las concentraciones de insulina y glucosa reflejan las alteraciones en la función de las células β .

1.8.1 Mecanismo de acción de la estreptozotocina

Los efectos de la estreptozotocina en la homeostasis de la glucosa puede dividirse en tres fases (66)

- **Primera fase.** Inicia 1 h después de la administración de la toxina con el incremento de glucosa en sangre y una disminución en la insulina plasmática, esta fase hiperglucémica dura aproximadamente 2 a 4 horas y es causada por la inhibición de la secreción de insulina que conduce a hipoinsulinemia; en esta fase las células β muestran vacuolización, dilatación del retículo endoplásmico rugoso, disminución del aparato de Golgi, reducción de los gránulos secretores de insulina y mitocondrias hinchadas.

- **Segunda fase.** Corresponde a una hipoglucemia y ocurre 4 a 8 h después de la inyección de STZ y dura varias horas. El estado transitorio de hipoglucemia es producido por el exceso de insulina en circulación como respuesta a la fase previa de hiperglucemia, en esta fase los depósitos de glucógeno se agotan por lo que pueden presentarse convulsiones y ser mortal si no se administra una carga de glucosa. Aunados a los cambios morfológicos en la célula β pancreática presentados en la primera fase, se pueden distinguir núcleos picnóticos; estos cambios son irreversibles.

- **Tercera fase.** Corresponde a una hiperglucemia permanente y comienza 12 a 48 horas después de aplicar la inyección y se caracteriza por la pérdida total de gránulos secretores de insulina en la célula β , el resto de las células pancreáticas permanecen intactas, lo que demuestra el carácter selectivo de la acción tóxica de la STZ a las células β .

1.8.2 Selectividad de la célula β a la estreptozotocina

Debido a sus propiedades químicas específicas, la estreptozotocina inhibe la secreción de insulina y causa un estado de hiperglucemia permanente. La STZ es un análogo de nitrosourea en la que el radical N-metil-N-nitrosourea está vinculado al carbono-2 de una hexosa, propiedad que le permite entrar en la célula β a través del transportador de glucosa tipo 2 (GLUT2) (67). Las nitrosoureas son generalmente lipofílicas y su transporte en la membrana a través del transportador de glucosa GLUT2 es rápida, sin embargo, como resultado de la sustitución de una hexosa, la estreptozotocina es menos lipofílica.

1.8.3 Mecanismo de acción de la STZ

Daño al DNA

La estreptozotocina es un potente agente alquilante que metila directamente el DNA al unirse a éste en forma covalente en la posición 06 de guanina (60), la transferencia del grupo metilo de la estreptozotocina a la molécula de DNA ocasiona severos daños que resultan en la fragmentación del DNA. En el intento de reparar el DNA la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) es estimulada, esta acción disminuye la disponibilidad de NAD⁺ en la célula y posteriormente las reservas de ATP. El agotamiento de las reservas de energía celular dan lugar a la inhibición de la síntesis y secreción de insulina y posterior necrosis de las células β (60, 68).

La estreptozotocina también metila proteínas, proceso que contribuye a los defectos funcionales en las células β después de la exposición a la STZ (60).

La administración de inhibidores de la PARP (Poli (ADP-Ribosa) polimerasa) evitan la acción diabetogénica de la estreptozotocina, entre dichos inhibidores se encuentran la nicotinamida y la 3-betacarbazol.

La nicotinamida presenta un efecto protector contra la toxicidad de la STZ en la célula al preservar el pool intracelular de NAD⁺. Debido a que la nicotinamida es un precursor directo de NAD⁺ y además es un inhibidor de la poli (ADP-ribosa) polimerasa. Masiello y colaboradores (69) demostraron que diferentes dosis de nicotinamida previas a la administración de 65 mg/kg de STZ tienen diversos efectos en machos adultos Wistar; dosis bajas de nicotinamida (100 mg/kg) ofrecen una protección baja contra los efectos diabetogénicos de la STZ que incluyen pérdida de peso corporal, hiperglucemia e insulinemia, con dosis medias (230 mg/kg) se observó que la glucosa en sangre fue significativamente mayor que el grupo control pero no se

observó pérdida de peso e insulinemia, mientras que dosis altas (350 mg/kg) protegen de manera eficaz los efectos inducidos por la estreptozotocina.

El 3-betacarbazol es un inhibidor de la PARP que tiene la capacidad de disminuir el consumo NAD⁺ y preservar la reserva de ATP, protegiendo a la célula β de necrosis. El 3-betacarbazol permite a la célula β secretar insulina en respuesta a la hiperglucemia después de la administración de un agente diabetógeno como la STZ (70).

Especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico

El estrés oxidativo es una característica de la diabetes inducida por STZ en la que se promueve la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO) en el páncreas. En las células β el metabolismo de la STZ da lugar a la formación de alfacetoaldehídos, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical superóxido (O₂⁻), entre otras especies reactivas del oxígeno que pueden dañar la membrana celular al promover la glucosilación y oxidación de lípidos y proteínas de membrana, provocando cambios conformacionales de estas macromoléculas y por lo tanto el deterioro de sus funciones (71, 72).

Las células β pancreáticas son susceptibles a los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ERO), como el peróxido de hidrógeno, a causa de su contenido limitado de peroxidasa y catalasa. Se sabe que la STZ también disminuye las actividades de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (71).

La STZ actúa como un donador intracelular de óxido nítrico (NO) aumentando la actividad de la guanilato ciclasa y la formación de cGMP, efectos característicos de NO (66).

La STZ puede dañar las mitocondrias reduciendo la producción de ATP y aumentando la actividad de la oxidasa xantina, favoreciendo la formación de ácido úrico y aniones superóxido; la exposición de los radicales de anión superóxido a STZ puede generar radicales hidroxilo (70).

Aunque el efecto de ROS y del óxido nítrico aceleran el proceso de destrucción de las células β, no juegan un papel crucial en el efecto diabetogénico de la STZ.

1.9 Tratamiento de la diabetes

Los cambios de estilo de vida, principalmente la dieta y el ejercicio son las piedras angulares para el manejo no farmacológico de la diabetes tipo 2 y deben ser consideradas como la terapia de primera línea, a menos que la hiperglucemia sea tan severa que requiera un tratamiento farmacológico inmediato. Hay que tener en cuenta que ninguna dieta o régimen de ejercicio puede ser utilizado para todos los pacientes con diabetes y que ambos deben ser individualizados para que realmente sean una estrategia factible (73).

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-1994 para la prevención, tratamiento y control de la diabetes establece en el apartado sobre tratamiento que:

11.3.4 Las metas básicas del tratamiento incluyen el logro de niveles normales de glucosa, colesterol total, triglicéridos, presión arterial, control de peso, y la HbA1c. Estas metas serán objeto de vigilancia médica, y deberán contar con la participación informada del paciente para su consecución conforme al Apéndice normativo E de esta NOM.

11.3.5 El manejo inicial del enfermo se hará mediante medidas no farmacológicas. Se recomienda que esta forma de tratamiento se aplique de manera estricta, por lo menos durante un periodo de seis meses.

11.3.6 El manejo farmacológico se iniciará en caso de que no se alcancen las metas del tratamiento, durante el periodo antes señalado, o bien desde fases más tempranas, cuando el médico tratante así lo juzgue pertinente, sobre todo en presencia de hiperglucemia sintomática.

1.9.1 Tratamiento no farmacológico

Existen numerosos estudios realizados con pacientes diabéticos tratados con diferentes dietas y rutinas de ejercicio que demuestran su efecto favorable sobre el control de la glucosa y la reducción del riesgo cardiovascular.

Brinkworth *et al.* en un estudio realizado con 38 pacientes obesos con diabetes tipo 2 comparó, durante 16 meses, el tratamiento con una dieta rica en proteínas y una baja en proteínas, demostraron que una dieta rica en proteínas reduce la tensión arterial en mayor grado que una dieta baja en proteínas y que la dieta con mayor cantidad de proteínas disminuye en un 14% los niveles de proteína C reactiva, una molécula inflamatoria directamente relacionada con el proceso aterosclerótico, que además, es un predictor independiente de futuros eventos cardiacos. En este estudio también demostraron que a los 15 meses de llevar esta dieta se detectaba un incremento del 17% de HDL lo que representa una reducción sustancial del riesgo de enfermedad cardiovascular. Con ambas dietas se logró una reducción de la TA, siendo esta reducción mayor en los pacientes con la dieta rica en proteínas (74).

En el estudio realizado por Esposito *et al.* con 215 pacientes diabéticos de reciente diagnóstico sin tratamiento farmacológico, compararon dos dietas durante 4 años, una dieta baja en carbohidratos y rica en vegetales y granos enteros, baja en carne roja y rica en pollo y pescado (mediterránea MED) y con restricción calórica (1500 kcal/d para mujeres y 1800 kcal/d para hombres), con una dieta baja en grasa con la misma restricción calórica. A todos los pacientes les indicó realizar actividad física, caminar por lo menos durante 30 minutos. Al comparar los resultados se encontró que con ambas dietas los pacientes reducían sus niveles de glucosa plasmática en ayunas y de hemoglobina glucosilada pero las reducciones eran significativamente mayores en los pacientes con la dieta baja en carbohidratos, en los 4 años estudiados. También se encontró, con ambas dietas, una disminución en los niveles de insulina pero sin diferencia significativa en ninguno de los 4 años. Los pacientes con dieta baja

en carbohidratos tuvieron un mayor incremento en la sensibilidad a la insulina y en los niveles de adiponectina que fueron significativos en los años del estudio. A lo largo de todo el estudio, los pacientes con la dieta rica en carbohidratos presentaron un aumento significativo de HDL y disminución de los triglicéridos. La disminución de los niveles de colesterol total fue más alto en los pacientes con la dieta baja en carbohidratos, pero las diferencias entre grupos solo fue significativa en los 2 primeros años. La reducción de la presión sistólica y diastólica disminuyó más en la dieta MED pero las diferencias fueron significativas entre los grupos a los 4 años para la presión sistólica y a los 2 años para la presión diastólica. En este estudio también quedó demostrado que hay una diferencia significativa en la necesidad de recurrir a la terapia hipoglucemiante en los pacientes con las dos dietas. El 12% de los pacientes con la dieta MED y 24% de los pacientes con la dieta baja en grasa requirieron terapia con hipoglucemiantes a los 18 meses, al final del estudio 44% de los pacientes con la dieta MED y 70% de los pacientes con la dieta baja en grasa requirieron hipoglucemiantes (75).

Numerosos estudios realizados con pacientes diabéticos han demostrado que el ejercicio induce una notable mejoría en la sensibilidad a la insulina que provoca la preservación de la función de la célula β . La actividad física regular ha demostrado una reducción de complicaciones microvasculares y macrovasculares.

Agosti *et al.* determinaron que el ejercicio juega un papel fundamental en el tratamiento del paciente diabético. El ejercicio actúa principalmente reduciendo la hiperglucemia mejorando su sensibilidad ya que induce un rápido y continuo incremento en la incorporación de la glucosa al músculo en contracción, que es mediada por GLUT 4 que, en condiciones de ejercicio, se transloca a la membrana celular donde se inserta para incrementar el transporte de glucosa. El ejercicio puede incrementar el GLUT 4 en el músculo por regulación a nivel transcripcional y traduccional. Se ha sugerido que el ejercicio puede reducir la expresión de GLUT2 que es el mediador de la entrada de glucosa a la célula β , con la consecuente reducción de la secreción de insulina estimulada por glucosa. En pacientes con diabetes tipo 2 la estimulación con insulina no puede inducir la translocación normal de GLUT 4 y por ello hay una reducción en la estimulación del sustrato receptor de insulina IRS-1. El ejercicio físico provoca una mejora en la acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético (76).

Existe también una relación de la sensibilidad a la insulina relacionada con la actividad física y ha sido ampliamente demostrado que el entrenamiento aeróbico incrementa la acción de la insulina en pacientes diabéticos. Existen trabajos que demuestran que el NO media el transporte de glucosa al músculo esquelético mediado por el ejercicio. Se ha reportado niveles disminuidos de oxidación de grasa en pacientes diabéticos durante el ejercicio moderado y que el ejercicio aeróbico incrementa la capacidad oxidativa del músculo esquelético a través de un incremento en la utilización de los ácidos grasos libres, lo cual reduce el contenido muscular de triglicéridos. También se sabe que la actividad física rutinaria mejora el perfil lipídico por la reducción de los triglicéridos, incrementa HDL y disminuye la relación

LDL/HDL. Durante la actividad y post ejercicio hay un incremento de la actividad de la lipoprotein lipasa que incrementa la utilización de los triglicéridos circulantes y aumenta su depuración aún en reposo. Recientemente también se ha demostrado que el ejercicio está asociado con modificaciones positivas del perfil de lípidos y que la combinación de entrenamiento de resistencia y de fuerza provoca una reducción en triglicéridos, LDL, colesterol total y una elevación de HDL lo que da por resultado una reducción en el perfil de lípidos aterogénicos y en consecuencia una disminución del riesgo cardiovascular (76).

En un meta-análisis de 14 estudios, en los que se comparó el efecto del ejercicio en un total de 377 pacientes con diabetes tipo 2, quedó demostrado que el ejercicio mejora significativamente el control glucémico, reduce la grasa visceral y los triglicéridos plasmáticos, aún sin pérdida de peso (77).

En el estudio realizado por Marcus *et al.* con 15 pacientes diabéticos en el que compararon la combinación de ejercicio aeróbico y de resistencia con el ejercicio aeróbico, durante 16 semanas, encontraron una reducción en los valores de hemoglobina glucosilada en ambos grupos, de 0.3% en el grupo con ejercicio aeróbico y de 0.6% con la combinación de ejercicios, reducción clínicamente importante que es similar a la obtenida con terapias de largo plazo con hipoglucemiantes o insulina y dieta, que es del 0.6 al 0.8%. La reducción de IMC fue mayor en los pacientes con la combinación de ejercicio ganaron más tejido magro. Concluyen que el ejercicio aeróbico deber ser indicado a pacientes diabéticos pero no aislado ya que provoca pérdida de tejido magro. Los pacientes diabéticos tienen menor fuerza y calidad muscular que los individuo sanos y esto puede predisponer a los pacientes diabéticos a alteración de la función muscular y pérdida de fuerza muscular por lo que la adición de ejercicio de fuerza es de suma importancia para la mejora de la fuerza muscular (78).

El meta-análisis realizado por Boulé *et al.* para conocer los efectos de las intervenciones del ejercicio estructurado en pacientes con diabetes tipo 2 sugiere que el ejercicio reduce aproximadamente 0.66% los niveles de hemoglobina glucosilada, cantidad que reduce el riesgo de complicaciones de la diabetes. Sin embargo estudios con grandes cohortes han demostrado que la actividad física está asociada con una reducción significativa de riesgos vasculares subsecuentes que no pueden ser explicados sólo por la reducción de los niveles de glucosa (79).

Sheri *et al.* realizaron una revisión del efecto del ejercicio en el tratamiento y prevención de la diabetes y el que quedó demostrado que la reducción de los niveles de glucosa, inducidos por el ejercicio, está relacionado con la duración y la intensidad de éste, que la capacidad de realizar ejercicio más intenso o prolongado para aumentar la sensibilidad a la insulina da por resultado un mejor control glucémico postejercicio y después de 2 horas o más se produce una toma de glucosa sanguínea para la síntesis de glucógeno. El ejercicio también provoca que la acción de la insulina periférica, y no de la hepática, se incremente aún cuando no haya pérdida de peso. Señalan que para mantener la acción de la insulina optimizada, se recomienda

sesiones sucesivas de ejercicio que no estén separadas por más de 72 horas que pueden ser 10 a 15 minutos, siendo los 30 minutos lo óptimo y que el tipo de ejercicio debe variar basado en la presencia de complicaciones coexistentes. Al igual que otros autores, señalan que la combinación de ejercicio aeróbico con entrenamiento de resistencia brinda mayores beneficios ya que provoca una reducción de la grasa abdominal (80).

1.9.2 Tratamiento farmacológico

Cuando el paciente no haya respondido al tratamiento no farmacológico, requerirá ser tratado con fármacos hipoglucemiantes para mantener los niveles de glucosa lo más cercano a lo normal. Sin embargo, este tratamiento debe ser un auxiliar y no un sustituto de los cambios en el estilo de vida que debe realizar el paciente diabético.

Actualmente existen diversos tratamientos farmacológicos para este padecimiento, cuyos mecanismos de acción son diferentes, y que corrigen la hiperglucemia actuando sobre uno o más de los trastornos fisiopatológicos de la enfermedad y también diferentes propuestas de abordaje. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los esquemas no son aplicables a todos los pacientes y será responsabilidad del médico la elección que deberá individualizarse para cada paciente ya que todos tiene efectos secundarios que deberán tomarse en cuenta.

La metformina es un hipoglucemiante oral, del grupo de las biguanidas, de origen vegetal que fue obtenido de *Galega officinalis*, es ampliamente utilizado en pacientes diabéticos, especialmente en obesos; puede provocar náuseas, malestar estomacal, pirosis, vómitos, riesgo de acidosis láctica y reducir la absorción de vitamina B12 y sabor metálico.

La glibenclamida es un derivado de la sulfonilurea que promueve la secreción de insulina por las células β , puede producir ansiedad, escalofríos, somnolencia, taquicardia, náuseas, agitación, urticaria, anemia hemolítica y hipoplasia medular, una mayor incidencia de infecciones microbianas como consecuencia de la leucopenia y trombocitopenia que puede inducir, retaso en la cicatrización y hemorragia gingival; además que puede agotar la reserva pancreática.

Inicialmente se recurre a una monoterapia que deberá estar indicada de acuerdo a las características de cada uno de los pacientes, pero si esta falla se deberá administrar una farmacoterapia combinada y si no hubiera respuesta a ésta, se administrará insulina; sin olvidar la dieta y el ejercicio. Recientemente también se ha propuesto un abordaje más agresivo proponiéndose la insulinización temprana de los pacientes, pero este tratamiento difícilmente es aceptado como primera opción por los pacientes recién diagnosticados.

Sin embargo, a pesar de la gran variedad de fármacos que existe y la posible combinación de ellos, además de las diferentes estrategias de abordaje para fines

prácticos los pacientes están, en su mayoría, descontrolados y después de varios años desarrollan las complicaciones tardías que caracterizan a esta enfermedad.

Otra alternativa para controlar los niveles de glucosa es a través de la medicina tradicional que ha adquirido últimamente gran auge a nivel mundial y en consecuencia se realizan grandes inversiones para el desarrollo de fitomedicamentos. Los fitomedicamentos difieren sustancialmente de los medicamentos químico-farmacéuticos en sus ingredientes ya que mientras que estos últimos están compuestos por químicos puros, la mayoría de los fitomedicamentos presentan extractos vegetales con numerosos compuestos. Por ello la fuente del material vegetal, su calidad de producción, los procedimientos con los que se producen y especialmente la estandarización del extracto son de gran importancia (81). En nuestro país ya existe en la Ley General de Salud una regulación de los fitomedicamentos o medicamentos herbolarios (82).

En relación con la aceptación de este tipo de tratamientos es importante señalar que en un estudio realizados en el IMSS para conocer la aceptación de los fitofármacos por los médicos y pacientes de atención primaria, y se encontró que el 68.8% de los médicos los aceptan (83).

Teniendo en cuenta la aceptación de los tratamientos herbolarios por los médicos y por los pacientes y que en muchos casos, son el único tratamiento al cual tienen acceso los habitantes de zonas aisladas, es posible que la implementación de este tipo de tratamientos, después de realizar estudios científicos controlados, contribuya a que los pacientes se apeguen mejor al tratamiento y logren controlar sus niveles de glucosa.

1.10 Medicina tradicional

La medicina tradicional es la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, ya sean explicables o no, utilizados en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales; los términos medicina complementaria/alternativa/no convencional se utilizan de manera indistinta con medicina tradicional (15).

En la América precolombina, diversos pueblos mesoamericanos habían logrado progresos notables en la medicina apoyando su conducta terapéutica en el conocimiento botánico y sus aplicaciones. En México un gran número de especies vegetales comerciales y medicinales fueron domesticadas e incorporadas a los grandes jardines botánicos de Chapultepec, Texcoco y Oaxtepec. Tras la conquista dichos conocimientos fueron plasmados en uno de los primeros libros de medicina escrito en toda América, en edición bilingüe, acerca de las hierbas y plantas que utilizaban en la terapéutica con sus indicaciones y modos de empleo, plasmadas en náhuatl por el médico tlaxtecolca Martín de la Cruz y su traducción al latín por el xochimilca Juan Badiano, ilustrado con iconografía de las plantas mediante dibujos

(84) dicho libro fue titulado *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Libro de las plantas medicinales indígenas o código De la Cruz-Badiano).

En muchos países en vías de desarrollo la mayoría de la población sigue utilizando la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades sanitarias primarias (15), se calcula que del 70 al 80 % de la población en estos países utiliza este tipo de medicina ya que además representa un recurso accesible económicamente. En nuestro país, el uso de plantas medicinales como parte de la medicina tradicional se ha mantenido vigente desde épocas prehispánicas. Actualmente se conocen 4 400 especies de plantas con propiedades medicinales; de éstas se estima que 500 especies son utilizadas empíricamente para el control de la diabetes mellitus (85). Asteraceae y Leguminosae son las familias botánicas con mayor número de especies utilizadas para este fin, sin embargo *Tecoma stans* L. (Bignoniaceae) y varias especies del género *Opuntia* (Cactaceae) son las plantas más utilizadas y estudiadas en el país como remedios para el tratamiento de la diabetes.

Diversas especies del género *Equisetum*, comúnmente conocidas como cola de caballo, han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes. Se caracterizan por ser plantas de esporas libres, tallo articulado y hojas en los nodos, actualmente se conocen 15 especies de *Equisetum* incluyendo híbridos estériles que dependen de reproducción vegetativa. Las especies de *Equisetum* se agrupan en dos subgéneros de acuerdo a caracteres morfológicos como la posición de los estomas: superficial en el subgénero *Equisetum* (*E. arvense*, *E. bogotense*, *E. diffusum*, *E. fluvial*, *E. palustre*, *E. pratense*, *E. sylvaticum* y *E. telmateia*), y por debajo de la superficie epidérmica en el subgénero *Hippochaete* (*E. giganteum*, *E. hyemale*, *E. laevigatum*, *E. myriochaetum*, *E. ramosissimum*, *E. scirpoides* y *E. variegatum*) (86).

El género se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo excepto Australia y Nueva Zelanda. En México el género está representado por cinco especies *E. arvense*, *E. hyemale*, *E. laevigatum*, *E. myriochaetum* y *E. telmateia*.

1.10.1 *Equisetum myriochaetum* Schlecht & Cham (Equisetaceae)

Reino	Plantae
Phylum	Arthrophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Equisetidae
Familia	Equisetaceae
Género	<i>Equisetum</i>
Especie	<i>myriochaetum</i>



Figura 7. *Equisetum myriochaetum* Schltr. & Cham.

Descripción botánica. Planta terrestre con tallos cilíndricos erectos de 2 a 8 m de alto, de 6-18 mm de diámetro; nudos y entrenudos bien definidos, en los nudos hay vainas con bordes dentados, en los entrenudos surcos con 16-48 canales longitudinales; estomas en una línea, a cada lado del surco; ramificaciones en verticilos regulares, con 6 a 8 canales; estrobilos terminales en las ramas y tallo principal, estrobilos del tallo de hasta 12 mm de diámetro, estróbilos de las ramas de hasta 4 mm de diámetro; numerosas esporas, globuliformes y provistas de eláteres (Figura 7) (87).

Distribución. Especie de amplia distribución en México, en los estados de Nayarit, Michoacán, Guerrero, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, D.F., Veracruz, Oaxaca y Chiapas (85). Se le encuentra a alturas de 300 a 2.100 m s.n.m. principalmente en cañadas, orillas de arroyos, terrenos arenosos húmedos y sobre laderas calizas con vegetación de bosque mesófilo de montaña, matorral submontano, bosque de Pinos, bosque tropical caducifolio, bosque tropical subperenifolio y bosque de galería (88).

Etnobotánica. Los miembros del género *Equisetum* son utilizados en la medicina tradicional mexicana, se les ha atribuido propiedades curativas para la diabetes así como para el tratamiento de afecciones renales, en algunas enfermedades del sistema digestivo, en el tratamiento de cálculos biliares, mal de orín, afecciones del hígado, problemas menstruales y garrotillo, como purificador de la sangre, en artritis, várices, sordera o dolor de oídos, infecciones de la piel, granos, piquetes de alacrán, en problemas de hemorroides y como cicatrizante. *Equisetum myriochaetum* se utiliza en

algunos de estados de la costa occidental del país como Chiapas, Oaxaca y Guerrero en donde la planta se administra vía oral para el tratamiento de cálculos renales, para curar la diabetes, mejorar la circulación y el ácido úrico. En ocasiones *E. miryochaetum* se prepara con pelos de elote y posteriormente se administra por vía oral para curar males renales y dolores corporales (89).

Farmacología. Diversas especies del género *Equisetum*, comúnmente conocidas como “cola de caballo”, han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes. Experimentalmente, la actividad hipoglucemiante de algunas de estas plantas ha sido demostrada en humanos y en diversos modelos animales. Andrade-Cetto *et al.* en el 2000 (90) demostraron el efecto hipoglucemiante del extracto butanólico y el extracto acuoso de *Equisetum myriochaetum* en ratas macho Wistar con diabetes inducida por STZ. El extracto acuoso, a una dosis única de 7 y 13 mg/kg, mostró una disminución significativa en el nivel de glucosa en plasma al minuto 60 ($p < 0.005$) y a los 120 y 180 ($p < 0.001$); el máximo efecto se observó a las 3 h. El extracto butanólico, a dosis únicas de 16 mg/kg y 8 mg/kg mostró actividad hipoglucemiante al minuto 60 ($p < 0.01$) y al minuto 120 ($p < 0.001$), respectivamente. El efecto máximo de ambas dosis se observó después de 3 horas; Revilla *et al.* en 2002 (91) reportaron una reducción significativa de los niveles de glucosa en 11 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 de reciente diagnóstico que ingirieron una dosis única de 0.33 g/kg del extracto acuoso de *E. myriochaetum*, los resultados obtenidos demostraron que el efecto hipoglucemiante se inició a los 90 minutos después de la administración del extracto y se mantuvo hasta los 180 minutos. Soleimani *et al.* en 2007 (92) demostraron que el extracto metanólico de *Equisetum arvense* a una dosis de 50-250 mg/kg ejerce un efecto hipoglucemiante ($p < 0.0001$) en ratas machos Wistar con diabetes inducida por STZ después del tratamiento diario por cinco semanas.

Componentes químicos. Caempferol-3- β -d-di(1-2)-glucopiranosido-4'-0-glucosido (=Caempferol-3-0-soforosido-4'-0-glucosido)[1], Caempferol-3-7- β -d-glucopiranosido [2], Caempferol-3- β -d-di(1-2)-glucopiranosido (=Caempferol-3-0-soforosido) [3] y ácido cafeíco 4- β -d-metil glucopiranosido [4], (93) (Figura 8). Otros compuestos presentes son β -sistosterol, Pinocembrina, β -d-glucosistosterol y ácidos grasos .

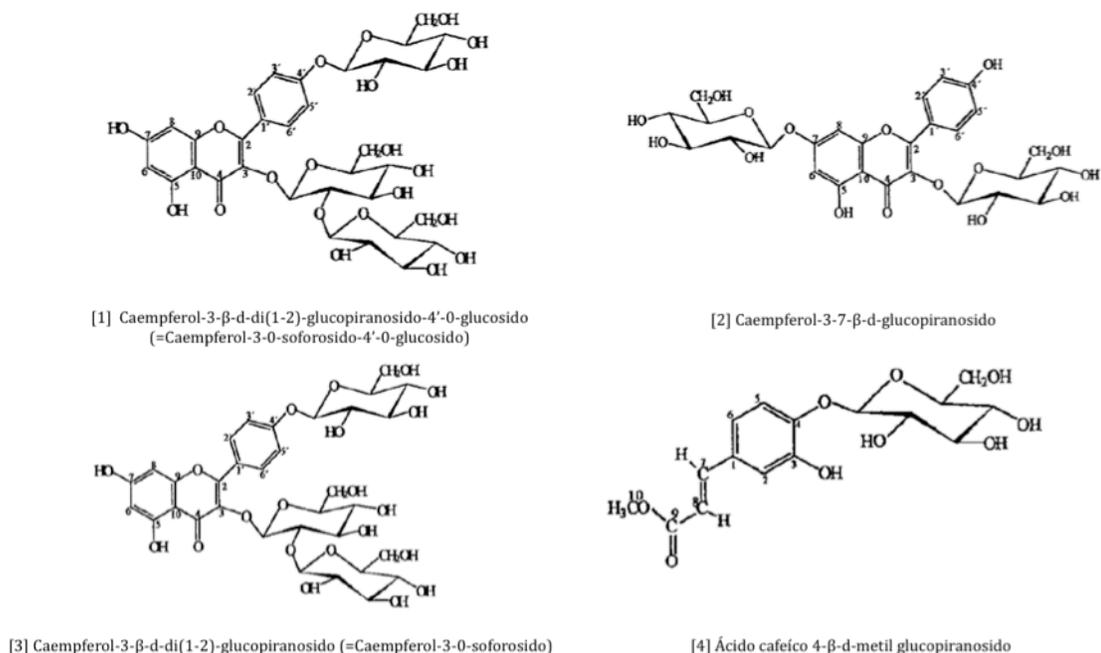


Figura 8. Estructuras químicas de los principales componentes químicos de *Equisetum myriochaetum*.

Toxicidad. Ordaz-Telléz *et al.* (94) demostraron *in vivo* e *in vitro* que los extractos acuoso y butanólico de las partes aéreas *Equisetum myriochaetum* no presentan actividad genotóxica. Por medio de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en ala de moscas *Drosophila melanogaster* en dosis de 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 y 500 µg/ml se observó que después de un tratamiento agudo no existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos a los que se les administró diferentes concentraciones de extracto. Por otro lado, en las pruebas de micronúcleos realizadas en linfocitos humanos con dosis de 12.5, 25, 50 y 500 µg/ml se observó que el 100% de las células expuestas a estas concentraciones de extracto sobrevivieron, obteniéndose una proporción de células binucleadas entre 53% y 82% y un Índice de proliferación celular con bloqueo de citocinesis (CPBI) entre 1,5 y 2. Ambas pruebas presentan nula actividad genotóxica; la falta de genotoxicidad indica que bajo condiciones experimentales los extractos acuoso y butanólico no produce daños en el material genético.

2. JUSTIFICACIÓN

Una alternativa para controlar los niveles de glucosa es a través de la medicina tradicional que ha adquirido últimamente gran auge a nivel mundial y se realizan grandes inversiones para el desarrollo de fitomedicamentos.

Para llegar a la implementación de un fitomedicamento se deben llevar a cabo gran cantidad de estudios científicos controlados inicialmente en modelos animales

(estudios preclínicos) y posteriormente en humanos (clínicos) para poder demostrar su efectividad y la ausencia de efectos adversos graves.

El efecto hipoglucemiante de *Equisetum myriochaetum* ha sido reportado por la medicina tradicional y demostrado en estudios agudos con modelos animales y pacientes con diabetes mellitus de reciente diagnóstico. Sin embargo no hay estudios que hayan analizado si su administración durante la gestación pudiera tener un efecto teratogénico sobre la descendencia o alterar la diferenciación y el desarrollo de diversos órganos, entre ellos el páncreas de los fetos de las madres diabéticas que recibieron el extracto durante la gestación.

El analizar este aspecto es de suma importancia, sobre todo teniendo en cuenta la que incidencia de diabetes gestacional a nivel mundial varía en un rango del 1 al 14%, de acuerdo con la población de estudio y los criterios de diagnóstico. En México entre el 9.2 y el 13% de las mujeres embarazadas desarrollan diabetes gestacional.

Aunado a ello se debe considerar que en muchos países en vías de desarrollo la mayoría de la población sigue utilizando la medicina tradicional, se calcula que del 70 al 80 % de la población en estos países utiliza este tipo de medicina por lo que es importante demostrar que el uso de *Equisetum myriochaetum* durante la gestación no tendrá efectos adversos sobre los productos.

3. HIPÓTESIS

La administración diaria, a partir del quinto día de gestación y durante 17 días, del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum*, no ejercerá un efecto teratogénico en los fetos de las ratas diabéticas que recibieron durante la gestación el extracto, ni afectará el desarrollo, la estructura histológica ni presencia de anticuerpos anti-insulina en el páncreas fetal de la descendencia.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Demostrar el efecto de la administración diaria, a partir del quinto día de gestación y durante 17 días, del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum*, sobre el desarrollo embrionario y sobre la estructura y presencia de anticuerpos anti-insulina en el páncreas fetal de la descendencia.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar el peso y talla de fetos así como el peso de las placentas de fetos de madres diabéticas que recibieron durante 16 días extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* en una dosis de 6.0 mg/kg y compararlo con el peso y talla de los fetos de madres diabéticas sin tratamiento, de madres sanas con tratamiento y de madres sanas sin tratamiento
- Determinar la presencia de malformaciones macroscópicas, reabsorciones, y número de fetos de madres diabéticas que recibieron durante 16 días extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* en una dosis de 6.0 mg/kg y compararla con las que se presenten en los fetos de madres diabéticas sin tratamiento, de madres sanas con tratamiento y de madres sanas sin tratamiento
- Determinar el efecto de la administración vía oral del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* durante 16 días en una dosis de 6.0 mg/kg sobre la estructura histológica del páncreas de fetos de ratas con diabetes inducida con STZ y compararla con la de los páncreas de los fetos de madres diabéticas sin tratamiento, de madres sanas con tratamiento y de madres sanas sin tratamiento para adicionalmente determinar si existe algún retraso en la diferenciación del páncreas.
- Detectar la presencia de insulina mediante inmunohistoquímica en los páncreas de fetos de madres diabéticas a las que se les administró durante 16 días el extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* en una dosis de 6.0 mg/kg y compararlo con la presencia de los anticuerpos anti-insulina que se detecten en los páncreas de los fetos de madres diabéticas sin tratamiento, de madres sanas con tratamiento y de madres sanas sin tratamiento

5. MATERIAL Y MÉTODO

El proyecto titulado “Efecto del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* en el desarrollo del páncreas de crías de ratas diabéticas” fue aprobado por el comité de bioética del Instituto Mexicano del Seguro Social con número de registro R-2009-3604-11.

5.1 Colecta y preparación del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum*

El extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* fue proporcionado por el laboratorio de Etnofarmacología de la Facultad de Ciencias de la UNAM a cargo del Dr. Aldolfo Andrade Cetto.

Colecta e identificación. Los ejemplares *E. myriochaetum* fueron colectados en Xochipala Guerrerro, México e identificados por Mónica Palacios-Ríos en el Instituto de Ecología en Jalapa Veracruz. Un ejemplar fue herborizado y depositado en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social en la Ciudad de México con número de registro IMSSM 15819.

Preparación de los extractos. Se pesaron 700 g de material vegetal seco y molido y se colocaron para su extracción en el aparato de Soxhlet.

La primera extracción se realizó con n-hexano (2 litros) durante 24 horas, obteniéndose el extracto hexánico (eHx), el material se secó a temperatura ambiente y posteriormente se realizó la segunda extracción con metanol (2 litros) por 48 horas, obteniéndose así el extracto metanólico (eMe); el extracto metanólico se evaporó en su totalidad a presión reducida. El residuo fue adicionado con una mezcla de CCl₄/MeOH 80% 1:1, la fase MeOH/H₂O fue desecada. El residuo se disolvió en n-BuOH: H₂O 1:1 y la fase BuOH se secó por liofilización; el extracto fue almacenado a -4°C.

Se obtuvieron 49.82 g en peso seco de extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum*.

5.2 Animales e inducción de diabetes experimental

Se utilizaron 28 ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre 250-300 g que se mantuvieron bajo condiciones de bioterio con una temperatura de 25°C, acceso alimento y agua *ad libitum* y alternancia de luz/oscuridad 12/12. Se aparearon con machos de fertilidad comprobada durante toda la noche, a la mañana siguiente se realizó un frotis vaginal y fueron consideradas como gestantes aquellas que presentaron espermatozoides y/o tapón vaginal. Al quinto día de gestación, 14 ratas se inyectaron intraperitonealmente (ip) con una dosis única de 50 mg/kg de STZ en amortiguador de acetatos 0.1M pH de 4.3 y 14 ratas se inyectaron (ip) con una dosis única de amortiguador. A las 48 horas se les determinó niveles de glucosa sanguínea, las ratas inyectadas con STZ con niveles de glucosa ≥ 200 mg/dl fueron consideradas diabéticas y se incluyeron en el estudio.

Se formaron cuatro lotes:

1. Lote diabético con extracto (DE): 7 ratas gestantes diabéticas a las cuales se les administró diariamente, a partir del quinto día de gestación, y durante 16 días, una dosis de 6.0 mg/kg del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* diluido en un ml de solución salina (vía oral)

2. Lote diabético (D): 7 ratas gestantes diabéticas a las cuales se les administró diariamente, a partir del quinto día de gestación, y durante 16 días, 1 ml de solución salina (vía oral).

3. Lote control con extracto (NDE): 7 ratas gestantes no diabéticas a las cuales se les administró diariamente, a partir del quinto día de gestación, y durante 16 días, una dosis de 6.0 mg/kg del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* diluido en un ml de solución salina (vía oral).

4. Lote control (ND): 7 ratas gestantes no diabéticas a las cuales se les administró diariamente, a partir del quinto día de gestación, y durante 16 días, 1 ml de solución salina (vía oral).

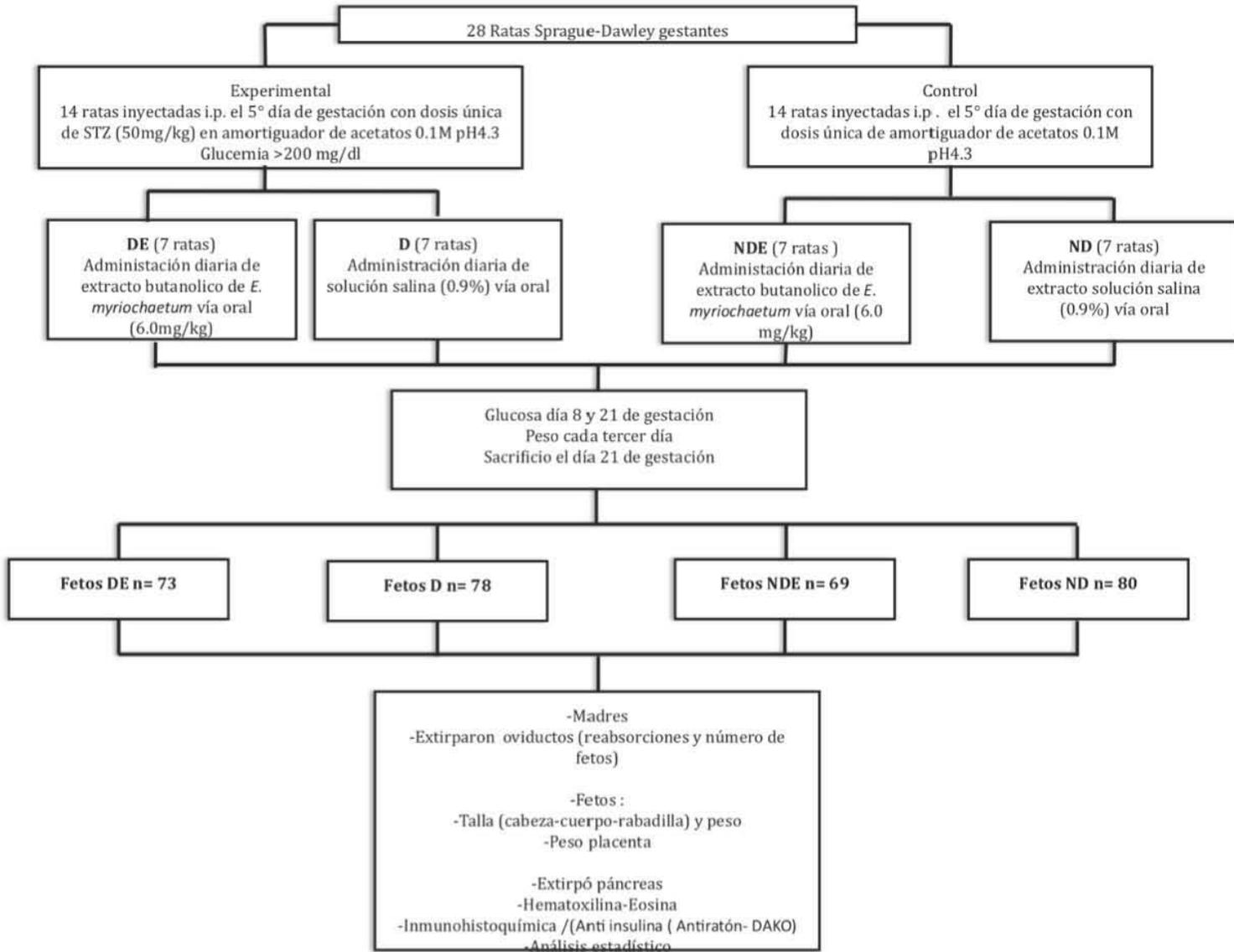
A partir del quinto día de gestación y cada tercer día se determinó el peso a las ratas de todos los lotes. A los 21 días de gestación se sacrificaron por dislocación cráneo-cervical y se les extirparon los cuernos uterinos para determinar el número de fetos, reabsorciones y malformaciones macroscópicas; se extirpó la placenta y se pesó. Los fetos se pesaron y midieron (cabeza, cabeza-rabadilla y cola). Se les extirpó el páncreas, se fijó en formol amortiguado al 10% durante 72 horas y se incluyeron en Paraplast para ser procesados con técnicas histológicas (HE) y realizar la técnica de inmunohistoquímica (Cocktail Antiratón- DAKO) para la determinación de anticuerpos anti-insulina. Los cortes histológicos se analizaron con el microscopio Nikon AlphaPhot-2 YS2.

5.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados de peso de las madres, número de fetos, talla y peso de fetos, y peso de las placentas fue realizado mediante el paquete estadístico MiniTab para Windows. Las variables evaluadas fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y posteriormente una post-prueba de Tukey para la comparación específica de los grupos, se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de $p \leq 0.05$. Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar (E.E).

Los datos de peso fetal y peso placentario se sometieron la prueba de correlación de Pearson (P) utilizando el programa estadístico Minitab para Windows.

5.4 Diagrama de flujo



6. RESULTADOS

6.1 Glucosa

El lote ND presentó un promedio de 106 ± 3.89 mg/dl de glucosa al día 8 de gestación y finalizó el tratamiento con un promedio de 92 ± 3.30 mg/dl.

El lote NDE tuvo un promedio de 103 ± 1.58 mg/dl de glucosa el día 8 de gestación y de 95 ± 2.64 el día 21 de gestación.

El lote D tuvo un promedio de 436 ± 31.84 mg/dl de glucosa el día 8 de gestación y de 549 ± 11.45 mg/dl el día 21 de gestación.

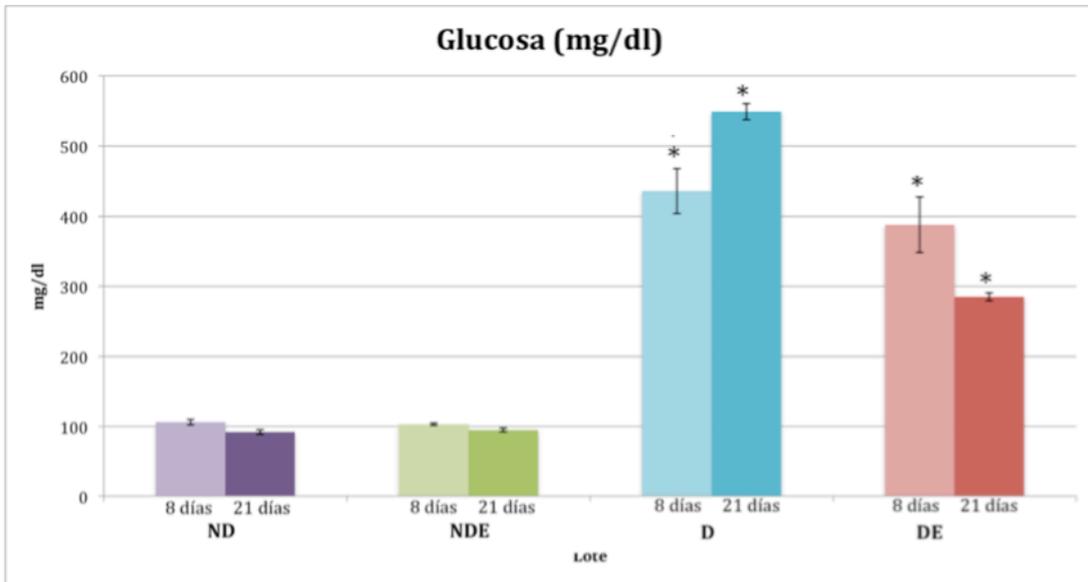
El lote DE tuvo un promedio de 388 ± 39.60 mg/dl de glucosa el día 8 de gestación y de 285 ± 5.61 mg/dl el día 21 de gestación.

El día 8 de gestación se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) al comparar los lotes ND vs D, DE; NDE vs D, DE. No hubo diferencias al comparar los lotes DE vs D.

El día 21 de gestación se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los lotes ND vs D, DE; NDE vs D, DE. El promedio de glucosa del lote DE es significativamente menor que el lote D ($p < 0.0001$).

Tabla 6. Niveles de glucosa de las ratas gestantes el día 8 y 21 de gestación. Datos expresados como promedio \pm EE.

Glucosa mg/dl				
Día de gestación	ND	NDE	D	DE
8	106 ± 3.89	103 ± 1.58	436 ± 31.84	388 ± 39.60
21	92 ± 3.30	95 ± 2.64	549 ± 11.45	285 ± 5.61



Gráfica 1. Promedio de glucosa el día 8 y 21 de gestación * ($p < 0.0001$) ND, NDE vs D, DE; DE vs NDE. Día 21 de gestación * ($p < 0.0001$) ND, NDE vs D, DE; D vs DE.

6.2 Peso

El lote ND (n=7 ratas) presentó un peso promedio de 235.79 ± 9.40 g al inicio del estudio y al finalizar presentaron un peso promedio de 355.1 ± 17.1 g, con un incremento de 119.31 g.

El peso promedio del lote NDE (n=7 ratas) al inicio del estudio fue de 235.39 ± 2.53 g y al termino de éste fue de 347 ± 5.52 g, con un incremento de 111.03 g.

El lote D (n=7 ratas) presentó un peso promedio de 234.7 ± 10.3 g al iniciar el estudio y al finalizar éste presentaron un peso promedio de 292 ± 11.5 g, con una ganancia de 57.6 g.

El lote DE (n=7 ratas) presentó un peso promedio de 255.4 ± 5.01 g al iniciar el estudio y al termino de éste el peso promedio fue de 318.26 ± 8.23 g, con un incremento de 62.86 g.

Al día 5 de gestación no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso entre los lotes.

El día 8 de gestación se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.038$) entre los lotes ND vs D, los lotes DE y NDE no presentaron diferencias significativas.

Al día 11 de gestación se presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) al comparar los lotes D vs DE, NDE, ND.

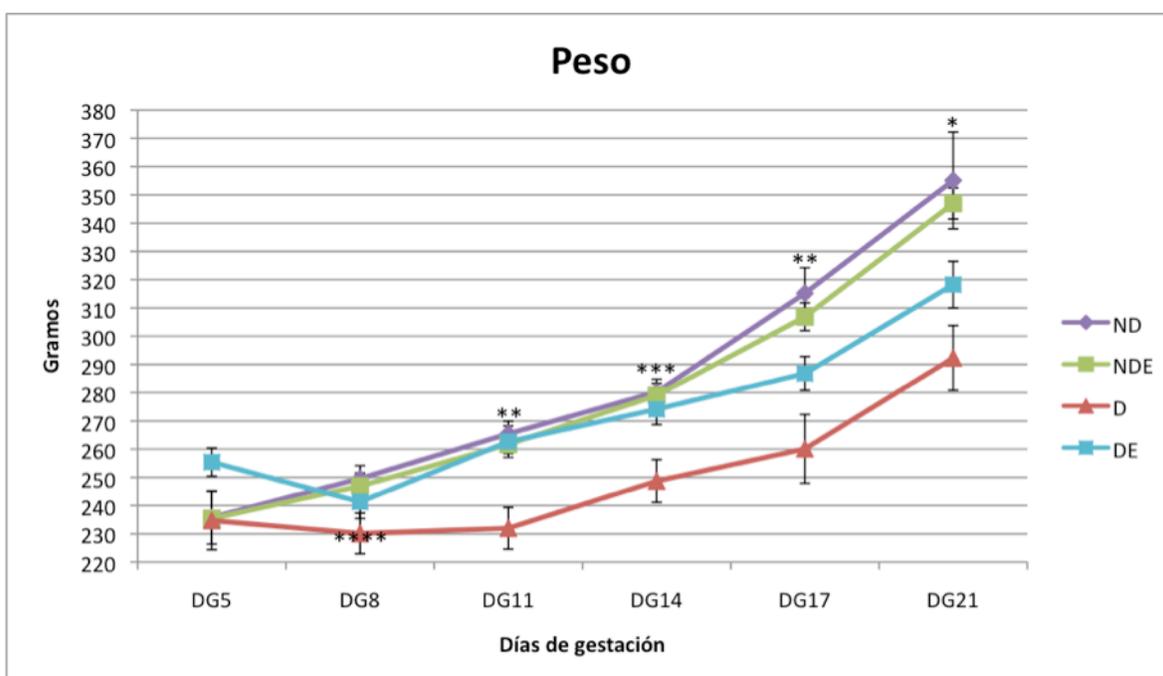
El día 14 de gestación la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.009$) al comparar el lote D vs ND, NDE. El lote DE no presentó diferencias significativas al compararlo con el resto de los grupos.

El día 17 de gestación hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) entre los lotes D vs ND, NDE. El lote DE no presentó diferencias significativas al compararlo con el resto de los grupos.

El día 21 de gestación se presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) al comparar los lotes D vs ND, NDE. El lote DE no presentó diferencias significativas al compararlo con los lotes ND, NDE y D.

Tabla 7. Peso de ratas gestantes. Datos expresados como promedio \pm EE.

Peso durante la gestación (g)				
Días de gestación	LOTE			
	ND (n=7)	NDE(n=7)	D (n=7)	DE (n=7)
5	235.79 \pm 9.40	235.39 \pm 2.53	234.7 \pm 10.3	255.40 \pm 5.01
8	249.59 \pm 4.55	246.94 \pm 4.63	230.13 \pm 7.20	241.29 \pm 5.85
11	265.43 \pm 4.52	261.69 \pm 3.20	231.97 \pm 7.39	262.64 \pm 5.55
14	280.21 \pm 4.57	279.03 \pm 4.27	248.69 \pm 7.60	274.13 \pm 5.49
17	315.17 \pm 9.10	306.86 \pm 4.91	260.10 \pm 12.2	286.81 \pm 6.00
21	355.1 \pm 17.1	347 \pm 5.52	292.3 \pm 11.5	318.26 \pm 8.23



Gráfica 2. Peso de ratas durante la gestación. $p < 0.038^{****}$ ND vs D día 8 de gestación; $p < 0.001^{**}$ D vs DE, NDE, ND día 11 de gestación; $p < 0.009^{***}$ D vs ND, NDE día 14 de gestación; $p < 0.001^{**}$ D vs ND, NDE día 17 de gestación; $p < 0.0001^*$ D vs ND, NDE día 21 de gestación.

6.3 Número de fetos

Las ratas del lote ND tuvieron un promedio de 11 fetos por rata, con un total de 78 fetos el día 21 de gestación.

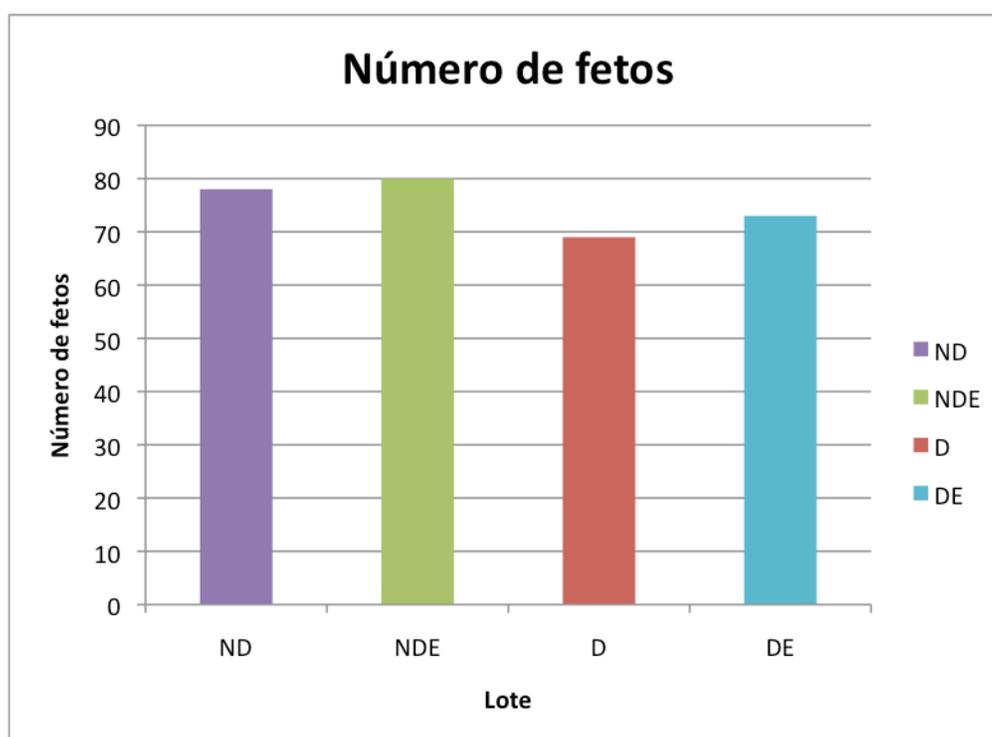
Las ratas del lote NDE tuvieron un promedio de 11 fetos por rata, con un total de 80 fetos el día 21 de gestación.

Las ratas del lote D tuvieron un promedio de 9 fetos por rata con un total de 69 fetos vivos el día 21 de gestación.

Las ratas del lote DE tuvieron un promedio de 10 fetos por rata con un total de 73 fetos vivos el día 21 de gestación.

Tabla 8. Número de fetos por lote.

Número de fetos				
Lote	ND	NDE	D	DE
Número de fetos	78	80	69	73



Gráfica 3. Número de fetos por lote.

6.4 Peso de fetos

Los fetos del lote ND tuvieron un peso promedio de 2.29 ± 0.023 g el día 21 de gestación.

Los fetos de las madres del lote NDE tuvieron un peso promedio de 2.18 ± 0.030 g.

Los fetos de las madres del lote D tuvieron un peso promedio de 1.95 ± 0.045 g.

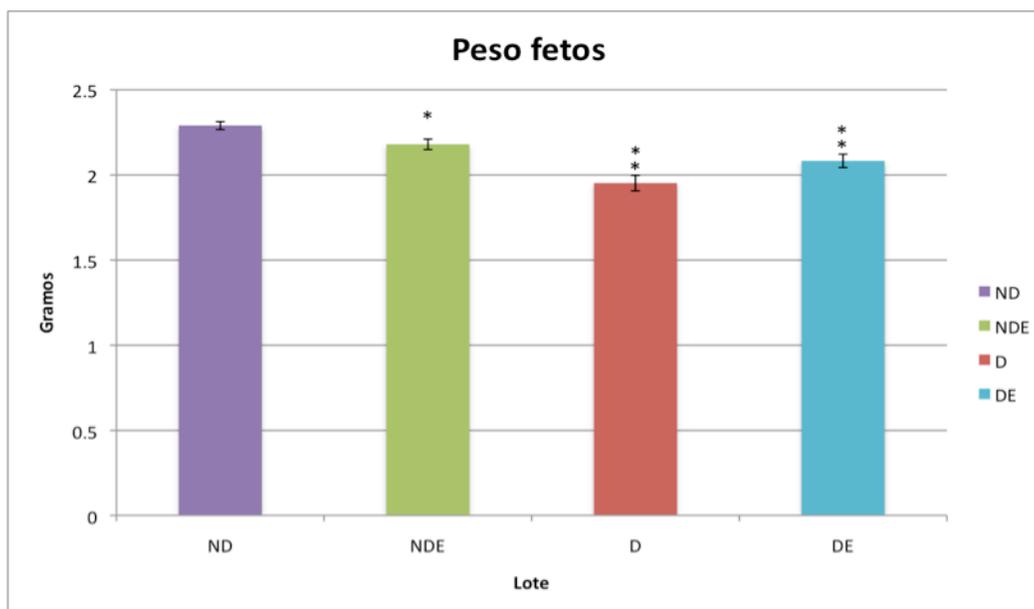
Los fetos de madres del lote DE tuvieron un promedio de peso de 2.0830 ± 0.039 g.

El promedio de peso de los fetos del lote ND fue significativamente mayor ($p < 0.0001$) al compararlo con el promedio de peso de los fetos D y DE. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el peso de los fetos del lote ND y NDE.

El peso promedio de los fetos del lote D fue significativamente menor con una $p < 0.0001$ al compararlo con los ND, NDE y DE.

Tabla 9. Peso de fetos. Datos expresados como promedio \pm EE.

Peso de fetos (g)				
Lote	ND (n=78)	NDE (n=80)	D (n=69)	DE (n=73)
Peso	2.29 ± 0.023	2.18 ± 0.030	1.95 ± 0.045	2.08 ± 0.039



Gráfica 4. Peso de los fetos el día 21 de gestación. * $p < 0.0001$ ND vs D, DE; $p < 0.0001$ ** D vs NDE, DE.

6.5 Talla de fetos (cabeza-cuerpo-cola)

La talla de los fetos de los cuatro lotes fue obtenida sumando las medidas de: cabeza, rabadilla y cola.

Los fetos correspondientes al lote ND tuvieron una talla promedio de 54.31 ± 0.31 mm al día 21 de gestación.

Los fetos de las ratas pertenecientes al lote NDE tuvieron una talla promedio de 53.97 ± 0.27 mm.

Los fetos del lote D presentaron una talla promedio de 50.77 ± 0.50 mm al día 21 de gestación.

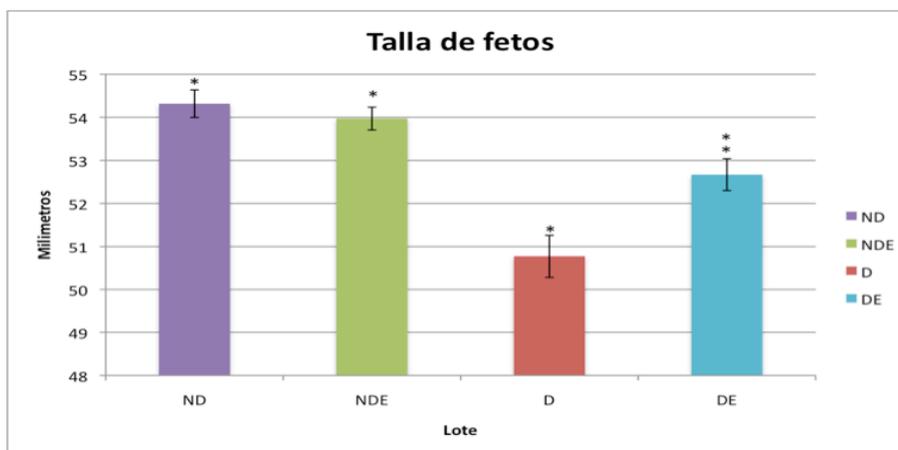
Los fetos correspondientes al lote DE tuvieron una talla promedio de 52.67 ± 0.37 mm.

La talla promedio del lote ND fue significativamente mayor ($p < 0.0001$) al compararla con la talla promedio de los fetos de los lotes DE y D. No hay diferencias estadísticamente significativas al comparar la talla de los fetos de los lotes ND y NDE.

La talla promedio de los fetos del lote D fue significativamente menor ($p < 0.0001$) al compararlo con los ND, NDE y DE.

Tabla 10. Talla de fetos. Datos expresados como promedio \pm EE.

Talla de fetos (g)				
Lote	ND (n=78)	NDE (n=80)	D (n=69)	DE (n=73)
Talla	54.31 ± 0.31	53.97 ± 0.27	50.77 ± 0.50	52.67 ± 0.37



Gráfica 5. Talla de los fetos al día 21 de gestación. $p < 0.0001$ * ND vs DE, D; $p < 0.0001$ ** D vs NDE, DE.

6.6 Reabsorciones y malformaciones

No se observó ninguna reabsorción en los oviductos de las ratas del lote ND (n=7 ratas). No se observaron malformaciones macroscópicas.

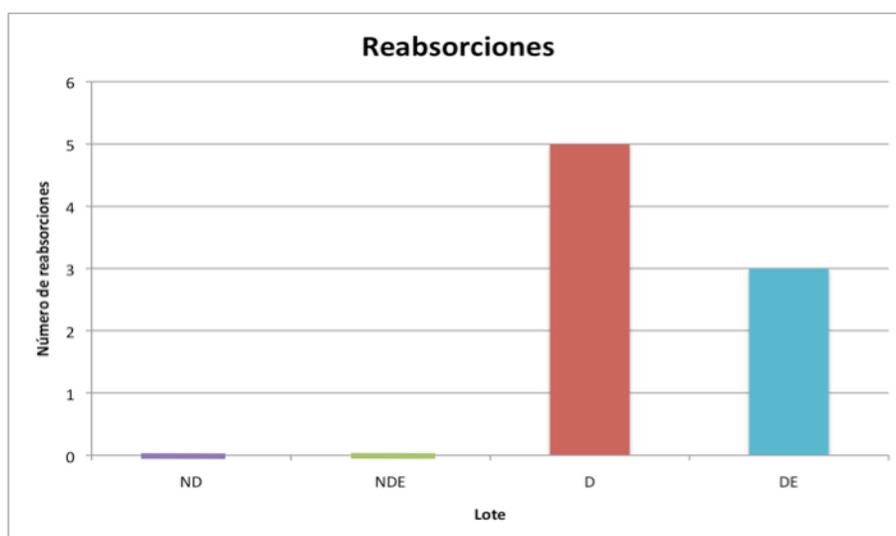
Las ratas del lote NDE (n=7) no presentaron reabsorciones ni malformaciones macrosómicas.

Las ratas del lote D (n=7) tuvieron 5 reabsorciones que se presentaron en 2 ratas, 3 y 2 respectivamente. Los fetos de este lote no presentaron malformaciones macrosómicas.

Las ratas del lote DE (n=7) tuvieron 3 reabsorciones que se presentaron en 2 ratas, 2 y 1 respectivamente. Los fetos de este lote no presentaron malformaciones macrosómicas.

Tabla 11. Reabsorciones al día 21 de gestación.

Lote	Número de reabsorciones
D	5
DE	3
ND	0
NDE	0



Gráfica 6. Reabsorciones al día 21 de gestación.

6.7 Peso de la placenta

El peso promedio de las placentas correspondientes a los fetos del lote ND fue de 0.60 ± 0.0093 g.

El peso promedio de las placentas de los fetos del lote NDE fue de 0.59 ± 0.0099 g.

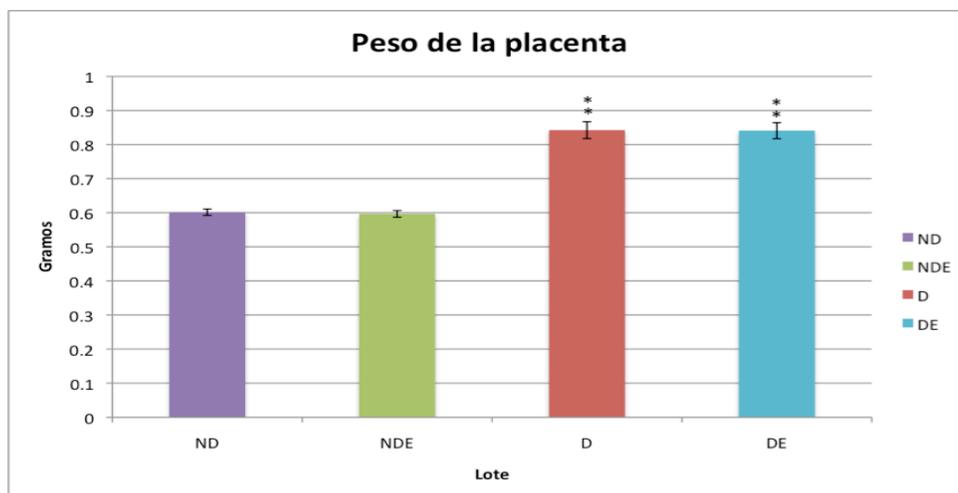
El promedio de peso de las placentas de los fetos del lote D fue de 0.84 ± 0.0247 g.

El promedio de las placentas en los fetos del lote DE fue de 0.84 ± 0.0236 g.

En la tabla 7 se muestran los pesos promedio de las placentas de los lotes ND, NDE, D y DE. El peso promedio de las placentas de los fetos del lote ND fue significativamente menor ($p < 0.0001$) que el peso promedio de las placentas del lote D y DE; el peso promedio de las placentas de los fetos del lote NDE fue significativamente menor ($p < 0.0001$) que el peso promedio de las placentas de los lotes D y DE. No hay diferencias estadísticamente significativas entre los pesos promedio de las placentas de los lotes ND y NDE; no hay diferencias estadísticamente significativas entre los pesos promedio de las placentas D y DE.

Tabla 12. Peso de la placenta. Datos expresados como promedio \pm EE.

Peso placenta (g)				
Lote	ND (n=78)	NDE (n=80)	D (n=69)	DE (n=73)
Peso	0.6015 ± 0.0093	0.5966 ± 0.0099	0.8423 ± 0.0247	0.8408 ± 0.0236



Gráfica 7. Peso de la placenta al día 21 de gestación $p < 0.0001^*$ ND vs D, DE; $p < 0.0001^{**}$ NDE vs D, DE.

6.8 Correlación entre peso fetal y peso placentario (Coeficiente de correlación de Pearson)

La relación peso fetal/peso placentario se emplea como un indicador de crecimiento fetal apropiado.

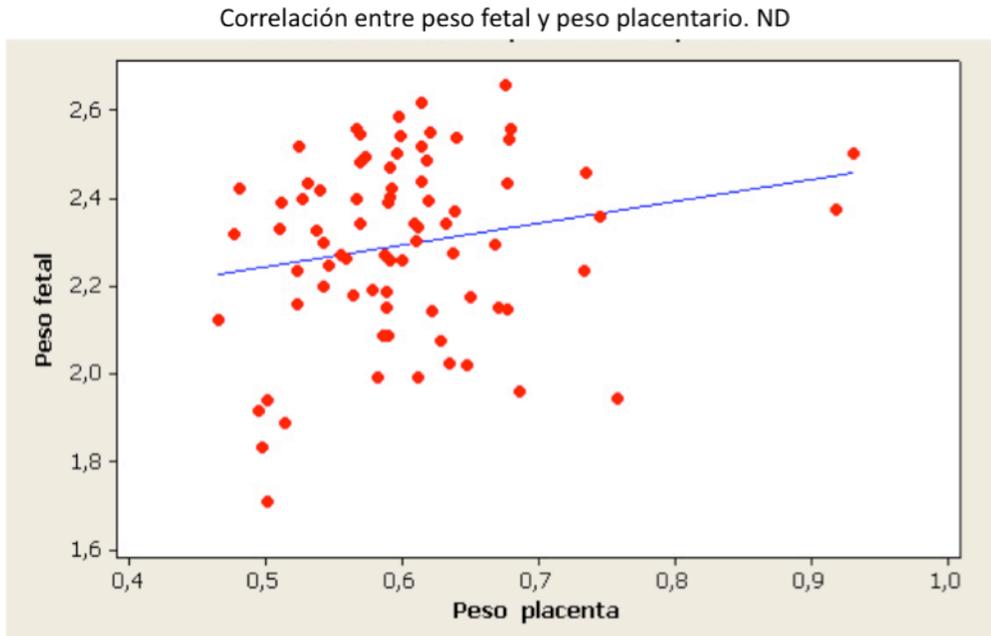
El coeficiente de correlación de Pearson (r) es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente, los valores de r oscilan entre 0 y 1. Cuando r es cercana a 1 la correlación es mayor y cuanto r es cercana de 0 la correlación es menor.

Tabla 13. Correlación de Pearson (r) entre el peso fetal y el peso placentario

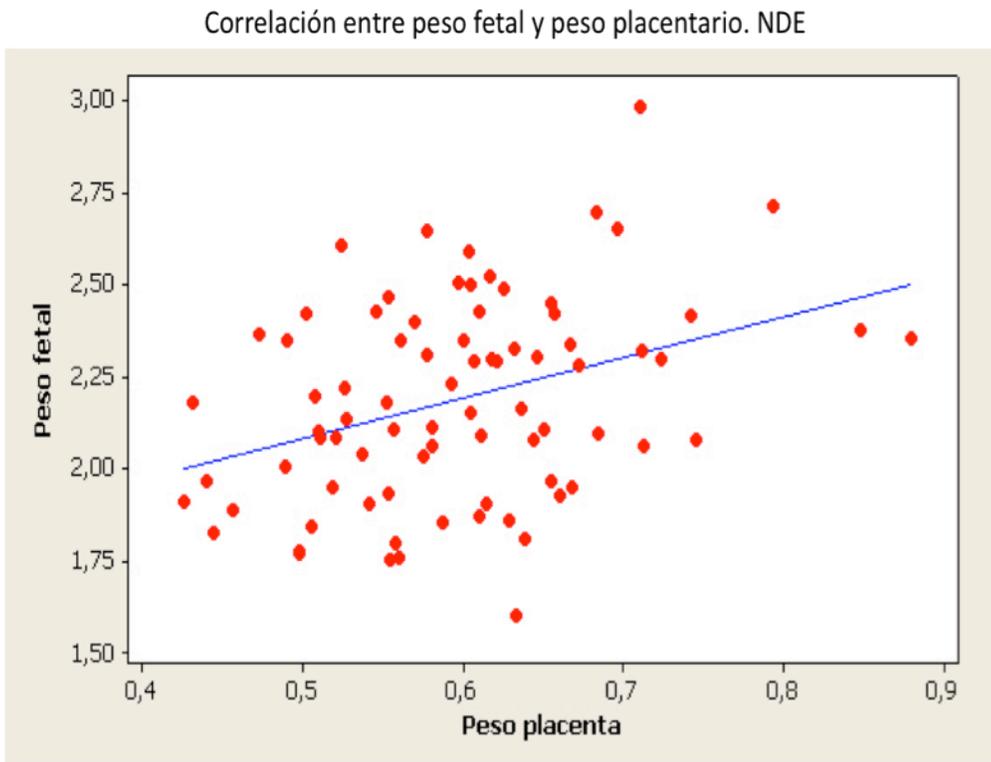
Correlación peso fetal/peso placentario				
Lote	ND	NDE	D	DE
Índice de correlación de Pearson (r)	0.198	0.358	-0.218	-0.102

Existe correlación positiva entre el peso fetal y el peso placentario en los lotes ND ($r=0.198$, $p<=0.082$) y NDE ($r=0.358$, $p<0.001$) es decir a mayor peso placentario mayor peso fetal.

Existe correlación negativa entre el peso fetal y el peso placentario en los lotes D ($r=-0.218$, $p<0.071$) y DE ($r=-0.102$, $p<0.390$) lo cual nos indica que a menor peso placentario menor peso fetal.

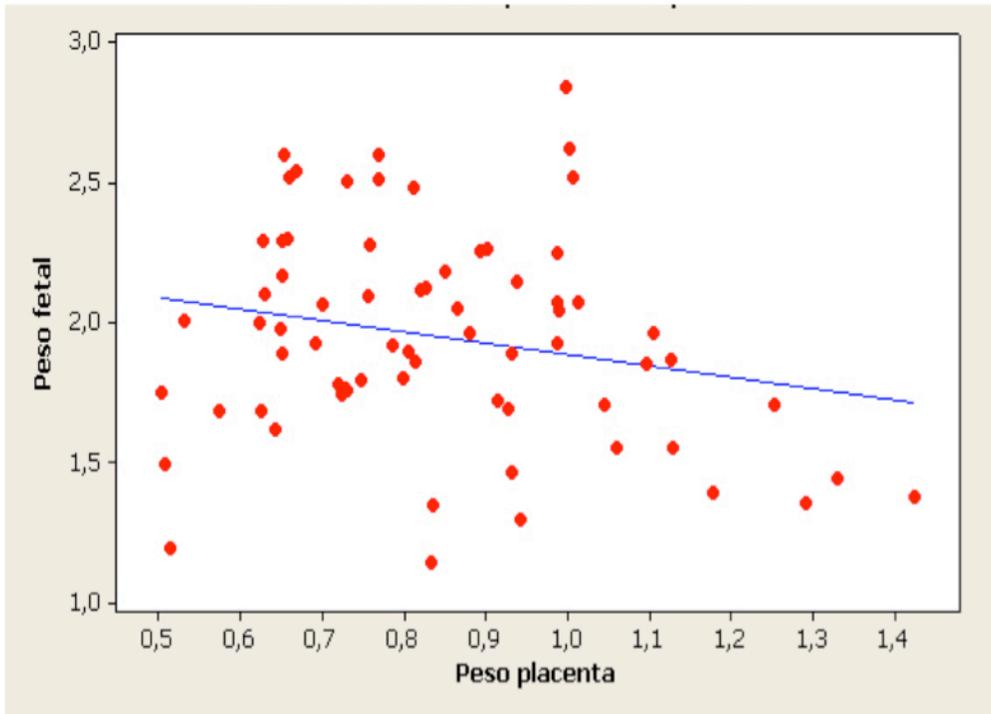


Gráfica 8. Índice de correlación del lote ND, $r=0.198$ con $p < 0.082$



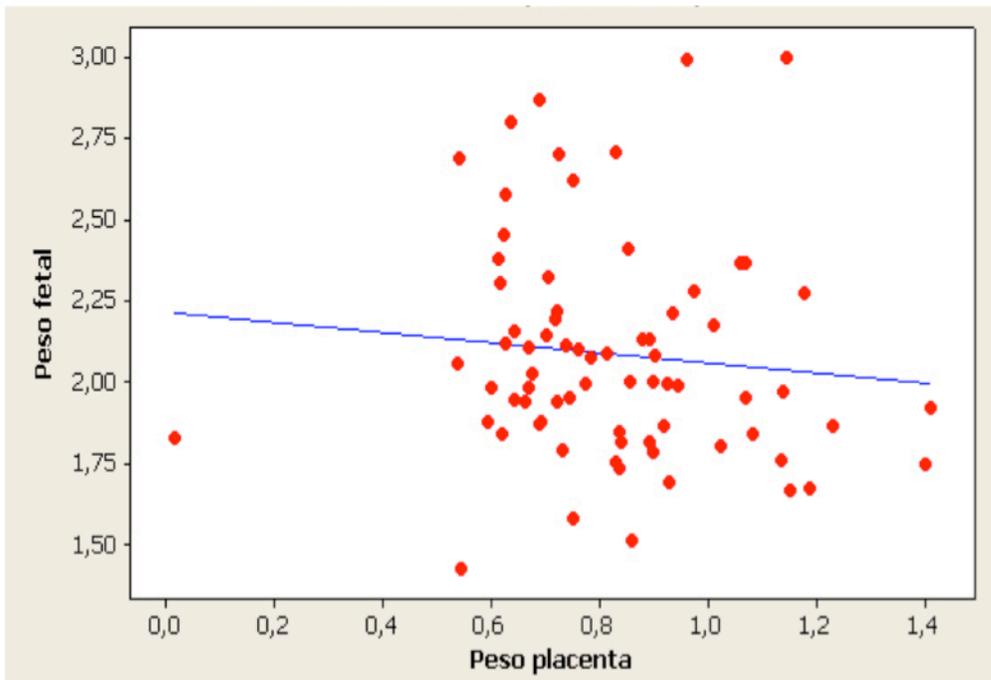
Gráfica 9. Índice de correlación del lote NDE, $r=0.358$ $p < 0.001$

Correlación entre peso fetal y peso placentario. D



Gráfica 10. Índice de correlación del lote D, $r=-0.218$ $p<0.071$

Correlación entre peso fetal y peso placentario. DE



Gráfica 11. Índice de correlación del lote DE, $r=-0.102$ $p<0,390$

6.9 Resultados histológicos

Lote control (ND)

En el lote ND se observaron estructuras acinares desarrolladas con conformación lóbulo-acinar típica del tejido exocrino pancreático. Se observaron agrupaciones endocrinas tipo islote de forma esférica entre el tejido acinar (Figura 9-A).

Lote control con extracto (NDE)

Estructuras acinares desarrolladas en conformaciones lóbulo acinar. Se observaron células endocrinas organizadas en estructuras redondeadas tipo islote así como pequeños grupos de células endocrinas asociados a ductos y vasos sanguíneos entre la masa acinar (Figura 9-B).

Lote diabético (D)

Se observó retraso en la organización del tejido pancreático en el que fue posible distinguir grandes agrupaciones irregulares de células endocrinas asociadas a epitelio ductal y vasos sanguíneos. No se observan estructuras redondeadas tipo islote.

Las diferencias en la organización histológica del páncreas fetal del lote D con respecto al lote ND es que en el primero es posible distinguir un retraso en la organización del tejido endocrino al observarse grupos de células con estructuras irregulares de gran tamaño embebidas en el tejido acinar mientras que en el lote ND se observaron estructuras redondeadas tipo islote, organización característica del tejido endocrino.

Lote diabético con extracto (DE)

Se observaron grandes agrupaciones de células endocrinas en estructuras tipo islote así como agrupaciones endocrinas de gran tamaño y bordes irregulares asociadas a tejido acinar, ductos y vasos sanguíneos. El tejido acinar se observó en su conformación típica lóbulo-acinar (Figura 9-D).

Las diferencias en la organización histológica del páncreas de los fetos del lote DE con respecto al lote ND es que en el primero fue posible observar grupos celulares endocrinos organizados en estructuras redondeadas tipo islote de gran tamaño y grandes grupos de células endocrinas de bordes irregulares contrario a lo observado en el lote ND en donde fue posible observar estructuras redondeadas tipo islote, las observaciones realizadas no indican retraso en la organización del tejido endocrino en los fetos de ratas diabéticas (DE) que recibieron extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum*.

Los páncreas de los fetos correspondientes a los grupos D y DE presentan un retraso en la organización del tejido exocrino evidenciado por agrupaciones celulares de gran tamaño asociadas a tejido acinar, dicho retraso fue más evidente en los páncreas de fetos de ratas diabéticas (D) contrario a lo observado en los grupos ND y NDE en cuya organización endocrina es posible distinguir estructuras redondeadas tipo islote características del páncreas murino.

En todos los lotes fue posible observar tejido exocrino con su organización acinar característica.

Tabla 14. Resultados histológicos

LOTE	RESULTADOS HISTOLÓGICOS	
	Tejido exocrino	Tejido endocrino
Lote control ND	Estructuras acinares desarrolladas con conformación lóbulo-acinar típica.	Agrupaciones de células endocrinas en estructuras redondeadas tipo islote entre el tejido acinar.
Lote control con extracto (NDE)	Estructuras acinares desarrolladas en conformaciones lóbulo acinar.	Agrupaciones de células endocrinas en estructuras redondeadas tipo islote entre el tejido acinar. Presencia de pequeños grupos celulares asociados a ductos y vasos sanguíneos entre la masa acinar.
Lote diabético (D)	Estructuras acinares en conformaciones lóbulo acinares.	No se observan estructuras redondeadas tipo islote. Se observan agrupaciones celulares de gran tamaño asociadas al epitelio ductal y vasos sanguíneos. Retraso en la organización del tejido endocrino.
Lote diabético con extracto (DE)	El tejido acinar se observó en su conformación típica lóbulo-acinar	Agrupaciones de células endocrinas en estructuras redondeadas tipo islote así como agrupaciones irregulares de gran tamaño de células endocrinas asociadas al tejido acinar, ductos y vasos sanguíneos.

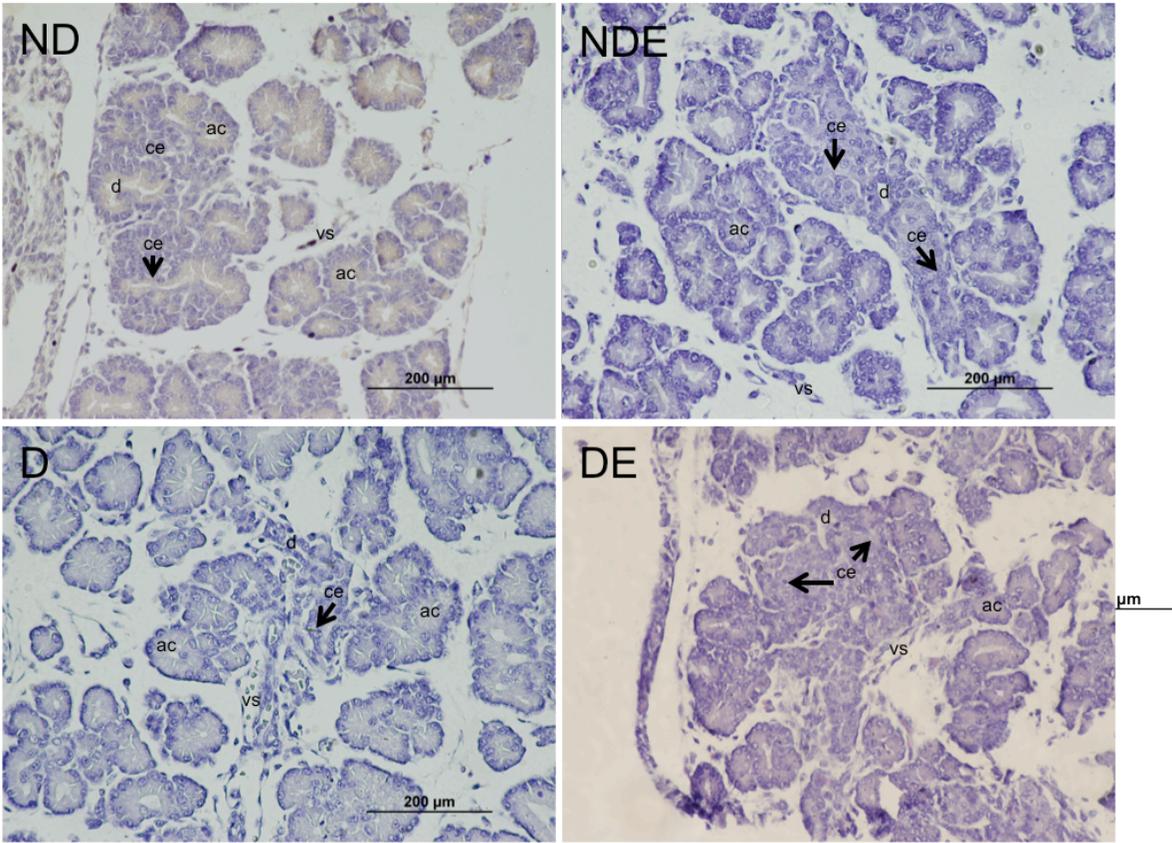


Figura 9. Micrografías de páncreas de fetos de 21 días de gestación con tinción Hematoxilina-Eosina, d=ductos, ac= acinos, ce=células endocrinas, vs=vasos sanguíneos. Lote ND 40X Lote NDE 40X Lote D 40X Lote DE 40X.

6.10 Resultados inmunohistoquímicos

Lote control (ND)

El día 21 de la gestación se observó en los páncreas de fetos de ratas controles células β positivas a insulina en agrupaciones endocrinas tipo islote (Figura 9ND), la inmunopositividad se observó en el centro de dichas estructuras con escasas células positivas en la periferia de los islotes.

Lote control con extracto (NDE)

Se observaron agrupaciones de células β positivas a insulina en estructuras tipo islote, la inmunopositividad se observó en el centro de dichas estructuras y ocasionalmente en la periferia de éstas. Se observaron pequeños grupos celulares positivos a insulina asociados a ductos pancreáticos y tejido exocrino (Figura 10 NDE).

Lote diabético (D)

Se observaron células β positivas a insulina distribuidas entre la masa endocrina así como células positivas a insulina asociadas a los ductos pancreáticos (Figura 10 D).

Lote diabético con extracto (DE)

Se observaron células β positivas a insulina dispersas en las estructuras tipo islote localizadas en su mayoría en el centro de éste. Se observaron pequeños grupos celulares positivos a insulina entre el epitelio ductal y el tejido exocrino (Figura 10 DE).

La diferencia en la inmunopositividad entre el grupo ND y el grupo D es que en el primero las células positivas a insulina se localizan principalmente al centro de la agrupación tipo islote concordando con la organización típica del islote en murinos, mientras que en el grupo D la inmunopositividad fue menor y distribuida en las estructuras tipo islote evidenciando retraso en la organización del páncreas endocrino.

Contrario a lo observado en el ND los páncreas fetales del lote NDE presentaron inmunopositividad a insulina en el centro del islote así como escasas células positivas a insulina en los bordes del mismo e inmunopositividad en agrupaciones endocrinas asociadas a acinos y ductos. Por otro lado en los fetos del lote DE se observó baja

inmunopositividad y ésta se distribuyó en las estructuras tipo islote aunque la abundancia de células positivas a insulina fue mayor en el centro de dicha estructura, se observaron células positivas a insulina entre el tejido acinar.

Tabla 15. Resultados inmunohistoquímicos

LOTE	RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS
Lote control ND	Células β positivas a insulina en agrupaciones tipo islote, la inmunopositividad se observó en el centro de dichas estructuras con escasas células positivas en la periferia de los islotes (Figura 9 ND).
Lote control con extracto (NDE)	Células β positivas a insulina en agrupaciones tipo islote, la inmunopositividad se observó en el centro de dichas estructuras y ocasionalmente en el borde de éstas. Pequeños grupos celulares positivos a insulina asociados a ductos pancreáticos y tejido exocrino (Figura 9 NDE).
Lote diabético (D)	Células β positivas a insulina distribuidas entre la masa endocrina. Células positivas a insulina asociadas a los ductos pancreáticos (Figura 9 D).
Lote diabético con extracto (DE)	Células β positivas a insulina dispersas en la estructura tipo islote localizadas en su mayoría en el centro de ésta. Pequeños grupos celulares positivos a insulina entre el epitelio ductal y el tejido exocrino (Figura 9 DE).

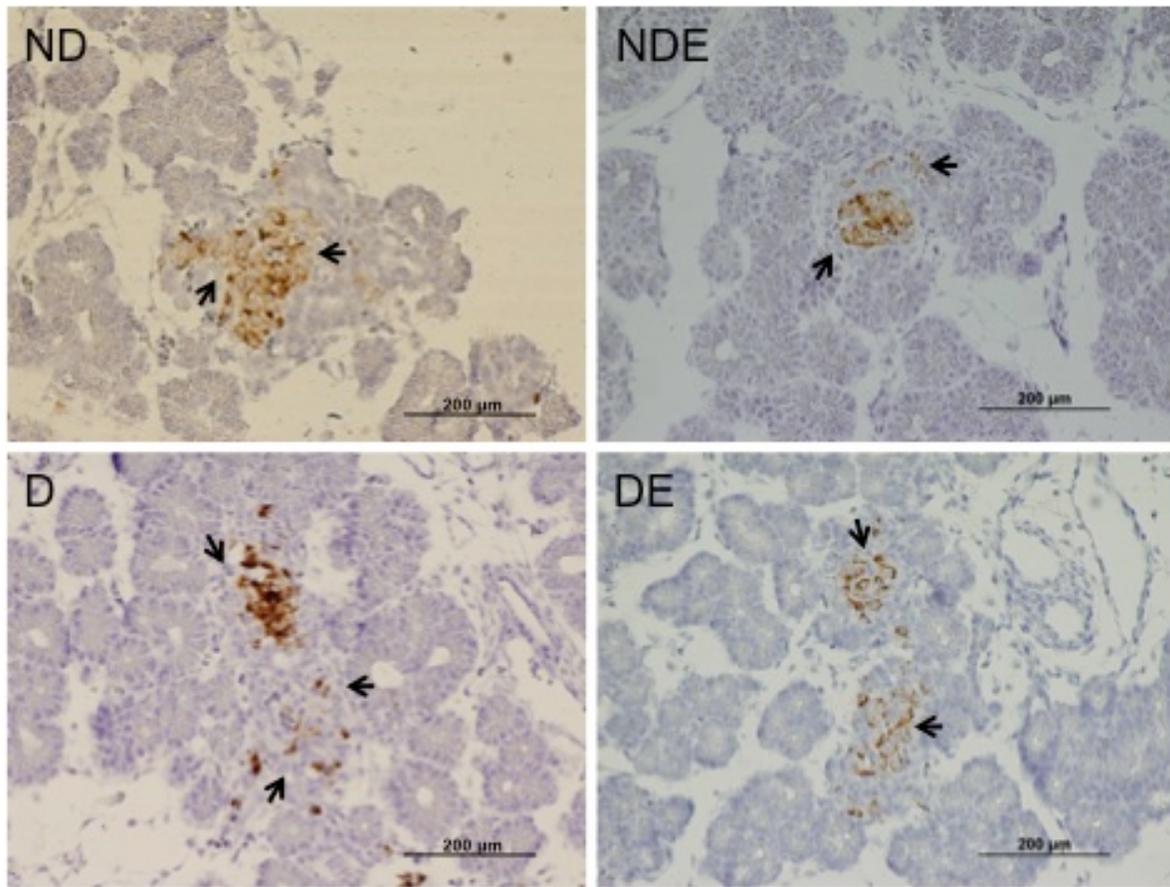


Figura 10. Micrografías de páncreas de fetos de 21 días de gestación marcado anticuerpo anti-insulina y Hematoxilina-Eosina, las flechas indican inmunopositividad. Lote ND 40X Lote NDE 40X Lote D 40X Lote DE 40X.

Tabla 16. Determinación cualitativa de la inmunopositividad al anticuerpo anti-insulina en páncreas de fetos de 21 días de gestación.

Lote	ND	NDE	D	DE
Inmunopositividad a insulina	+++	++	+	++

7. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica progresiva que se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, debido al incremento en su prevalencia, cronicidad y complicaciones incapacitantes.

Actualmente existen diversos tratamientos farmacológicos cuyos mecanismos de acción son diferentes, y que corrigen la hiperglucemia actuando sobre uno o más de los trastornos fisiopatológicos de la enfermedad, así como diferentes propuestas de abordaje, sin embargo es importante tener en cuenta que los esquemas no son aplicables a todos los pacientes y será responsabilidad del médico la elección que deberá individualizarse para cada paciente ya que todos tiene efectos secundarios que deberán tomarse en cuenta.

A pesar de la gran variedad de fármacos que existe y la posible combinación de ellos, además de las diferentes estrategias de abordaje, para fines prácticos, los pacientes están, en su mayoría, descontrolados y después de varios años, desarrollan las complicaciones tardías que caracterizan a esta enfermedad, con el alto costo social y económico que ello implica.

Otra alternativa para controlar los niveles de glucosa es a través de la medicina tradicional que ha adquirido últimamente gran auge a nivel mundial y actualmente se realizan grandes inversiones para el desarrollo de fitomedicamentos. Los fitomedicamentos difieren sustancialmente de los medicamentos químico-farmacéuticos en sus ingredientes ya que mientras que estos últimos están compuestos por químicos puros, la mayoría de los fitomedicamentos presentan extractos vegetales con numerosos compuestos. Por ello la fuente del material vegetal, su calidad de producción, los procedimientos con los que se producen y especialmente la estandarización del extracto son de gran importancia (10).

Teniendo en cuenta la aceptación de los tratamientos herbolarios y que en muchos casos, son el único tratamiento al cual tiene acceso los habitantes de zonas aisladas, es posible que la implementación de este tipo de tratamientos, después de realizar estudios científicos controlados, contribuya a que los pacientes se apeguen mejor al tratamiento y logren controlar sus niveles de glucosa.

Se ha reportado que 500 especies de plantas son utilizadas empíricamente para el control de la diabetes mellitus, entre ellas se encuentra *Equisetum myriochaetum*, comúnmente conocida como “cola de caballo”.

En estudios crónicos con modelos animales con diabetes inducida con STZ y con pacientes diabéticos de reciente diagnóstico, se ha demostrado el efecto hipoglucemiante de *Equisetum myriochaetum* (88, 90 91, 92), pero no hay trabajos publicados en relación al efecto de su administración durante la gestación, y en consecuencia, no hay reportes sobre su efecto en el desarrollo embrionario.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que en el día 21 de gestación había una disminución significativa en los niveles de glucosa de las ratas del lote diabético que recibió durante 17 días el extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* (DE 388±39.60 mg/dl) al compararlo con el lote diabético sin tratamiento (D 436±31.84 mg/dl) ($p<0.0001$). Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.0001$) al comparar ND vs D, DE y NDE vs D, DE; lo que indica que aunque el extracto ejerce efecto hipoglucemiante en las ratas del lote DE los niveles de glucosa no se reducen hasta alcanzar los niveles de los lotes ND y NDE.

La reducción en los niveles de glucosa de las ratas gestantes a las que se les administró el extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* se puede explicar debido a que algunos componentes del extracto, como el caempferol, que forma parte de la familia de bio-flavonoides, tienen la capacidad para evitar la absorción de glucosa y mejoran la tolerancia a ésta (105) además de que protege a las células β , permitiendo una mayor viabilidad y una reducción del índice apoptótico (106).

Los resultados de este trabajo mostraron que las ratas gestantes de los cuatro lotes aumentaron de peso a lo largo de la gestación, siendo el lote ND el que mayor ganancia de peso tuvo con un promedio de 119.31 g y seguido por el lote NDE que incrementó un promedio de 111.03 g. Este hecho puede atribuirse a que los dos primeros tercios de la gestación se caracterizan por el metabolismo materno anabólico con hiperfagia que estimula el aumento de peso, depósitos de grasa e incremento de masa magra, así como el incremento en los niveles de leptina e insulina sérica, sensibilidad a la insulina normal o ligeramente aumentada debido al consumo de glucosa por parte de la placenta y el feto, motivo por el cual la madre puede presentar hiperglucemia en ayuno y aunque en esta etapa el crecimiento fetal es limitado, la diferenciación celular y organogénesis ocurren en este período. El aumento de peso en la madre al inicio de la gestación es seguido de una etapa catabólica en la que la sensibilidad a la insulina por parte de la madre disminuye promoviendo la lipólisis y cetonemia en el ayuno e hiperglucemia postprandial, ofreciendo al feto mayor oferta de nutrientes favoreciendo su crecimiento al incrementar el tejido graso y aumentando sus reservas de glucógeno hepático (99).

Los lotes D y DE presentaron menor aumento de peso, 57.6 y 62.86 g respectivamente, con una disminución de peso al día 8 de gestación, dicha condición se asocia con la pérdida de proteínas debido a la imposibilidad de utilizar los carbohidratos ingeridos como fuente de energía recurriendo a los depósitos de glucógeno existentes en el hígado y músculo (62).

El día 8 de gestación, el peso promedio de las ratas del lote D fue significativamente menor ($p<0.038$) al compararlo con el lote ND; el día 11 de gestación, el peso de las ratas del lote D fue significativamente menor ($p<0.0001$) al compararlo con los lotes NDE, D y DE, misma que se mantuvo hasta el día 21 de gestación ($p<0.0001$). Como se

observa en los resultados, durante la gestación los lotes D, NDE y DE tuvieron menor incremento de peso que el grupo ND, sin embargo no hay diferencias significativas. Al analizar los datos se observó que el peso promedio que se incrementó durante la gestación en las ratas del lote NDE es similar al peso promedio de las ratas del lote ND (111.03 g y 119.31 g, respectivamente). Por el contrario, las ratas del lote DE y D tuvieron un incremento de peso promedio menor (62.86 y 57.6 g, respectivamente) lo que nos sugiere que la menor ganancia de peso en el lote DE se debe exclusivamente al efecto de la diabetes y no es causado por la ingesta del extracto de *E. myriochaetum*.

Por otro lado, el aumento de peso en las ratas del lote ND también puede atribuirse a que dicho lote presentó un número de fetos promedio por rata de 11, siendo éstos los de mayor peso (2.29 ± 0.023 g) y longitud (54.31 ± 0.31 mm), contrario a lo observado en los lotes NDE (10 fetos, 2.18 ± 0.030 g, 53.97 ± 0.27 mm), D (9 fetos, 1.95 ± 0.045 g, 50.77 ± 0.50 mm) y DE (10 fetos, 2.08 ± 0.039 g, 52.67 ± 0.37 mm), cuyo promedio de fetos fue menor siendo éstos más pequeños y de menor peso.

Yamada *et al.* demostraron que la diabetes inducida con STZ eleva el gasto de energía en ratas Wistar gestantes hasta en un 16% y como consecuencia aumentan la ingesta de alimento; sin embargo, la síntesis protéica es poco eficiente probablemente asociada a alteraciones gastrointestinales relacionadas con el funcionamiento en uniones gap, lo que da lugar a una disminución de la motilidad gastrointestinal y con ello la reducción en la absorción de nutrientes, lo que repercute directamente en el peso de la rata gestante, así como en el de su descendencia (100, 101).

Los fetos del lote D pesaron menos y fueron de menor talla que los fetos de los lotes DE, NDE y ND. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras investigaciones (102, 103, 104) que aseguran que la diabetes materna ocasiona un retraso en el desarrollo y crecimiento fetal. Los resultados obtenidos en relación al peso y talla fetal en los lotes que recibieron extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* nos sugieren que éste tiene un efecto benéfico en el crecimiento de los fetos de madres diabéticas ya que encontramos que el peso y talla de los lotes NDE y DE no presentan diferencias significativas y ambos son significativamente mayores que los de los fetos del lote D. Estos resultados sugieren que la administración del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* favorece el crecimiento del feto en condiciones diabéticas, aunque sin llegar a igualar a los presentados por el lote control, dicha condición puede estar asociada al efecto hipoglucemiante de *Equisetum myriochaetum* el cual reduce los niveles de glucosa en la madre, permitiendo al feto desarrollarse en un ambiente intrauterino menos hiperglucémico.

Se ha reportado que el número de fetos por cuerno uterino es determinante en el peso de éstos. De esta manera, cuando el número de fetos por cuerno uterino es menor el peso de éstos es mayor (107); la posición intrauterina también está involucrada en el peso fetal, se ha reportado que los fetos de menor peso se localizan en la parte media

del cuerno uterino mientras que los de mayor peso se localizan cercanos a los ovarios (107, 108). El sexo del feto se relaciona con el peso, se ha reportado que los machos son más pesados que las hembras, sin embargo el peso de las placentas es similar en ambos sexos (108). Los lotes ND y NDE tuvieron mayor número de fetos el día 21 de gestación (n=78 y n=80, respectivamente) lo cual nos indica que el extracto butanólico de *E. myriochaetum* no ejerce efectos negativos en el número de fetos por camada. El número de fetos en el lote D y DE (n=69 y n=73) fue menor que en los lotes controles, lo cual sugiere que el estado hiperglucémico de las madres proporciona un ambiente intrauterino alterado para el desarrollo de los fetos, reflejado en el mayor número de reabsorciones y, por lo tanto, menor número de fetos el día 21 de gestación.

En humanos se ha reportado que la incidencia de abortos en embarazos complicados con diabetes mellitus tipo 1 es del 17.5% y en mujeres con diabetes mellitus tipo 2 es de 13.6%, contrario a 12% presentado en mujeres no diabéticas. Los abortos en mujeres diabéticas se relacionan con el mal control glucémico ya que la hiperglucemia estimula diferentes vías, como la vía aldolasa reductasa, estrés oxidativo y proteína cinasa C, que producen daño y disfunción celular con anomalías en la angiogénesis, crecimiento y apoptosis anormal, favoreciendo los abortos espontáneos (109).

Se registraron reabsorciones en los lotes D y DE, 5 y 3 respectivamente, los lotes ND y NDE no presentaron reabsorciones lo que demuestra que las reabsorciones se debe a la hiperglucemia y no a la administración del extracto. Se ha sugerido que las malformaciones así como las reabsorciones pueden atribuirse al estrés oxidativo característico de los cuadros diabéticos inducidos por STZ (110).

En el presente trabajo no se observaron malformaciones macrosómicas, sin embargo las malformaciones en la descendencia de madres con diabetes inducida por STZ más frecuentes son las derivadas de defectos de cierre del tubo neural, entre ellas se encuentran: anencefalias, exencefalias, microcefalia y espina bífida (110) .

Se sabe que la presencia de ROS es un factor clave en el aumento de reabsorciones y malformaciones de crías de madres diabéticas. Un efecto muy importante de la sobreproducción de ROS es el aumento en la peroxidación lipídica, que favorece la formación de isoprotanos, a través de la reacción no enzimática del ácido araquidónico con radicales libres, que resulta altamente perjudicial para el embrión. Se sabe que la hiperglucemia materna aumenta la producción de ROS al mismo tiempo que disminuye la eficiencia de los mecanismos que atenúan los daños causados por éstos, por lo que se presenta una disminución de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión y catalasa, hecho que se relaciona directamente con el aumento de malformaciones, disminución del peso y talla de los fetos y crías de ratas diabéticas (104).

El tamaño de la placenta está directamente asociado con el peso del producto al nacer (111, 112). Se ha demostrado que anomalías tales como diabetes gestacional, hipertensión y anemia durante el embarazo influyen en el funcionamiento, peso y tamaño de la placenta como respuesta adaptativa para mantener su óptimo funcionamiento (111, 113). En virtud de las múltiples funciones de la placenta se ha propuesto que dicho órgano desempeña un papel clave en la programación fetal y que cualquier cambio en el patrón de funcionamiento altera el desarrollo del feto, conduciendo al desarrollo de enfermedades cardiovascular y metabólicas en la vida adulta (114).

Se observó que las placentas de los lotes D y DE fueron de mayor peso, 0.842 y 0.840 g, respectivamente, que las placentas de los lotes ND y NDE, 0.601 y 0.596 g respectivamente. Al no encontrarse diferencias significativas entre el peso de las placentas de los lotes ND y NDE se puede concluir que la administración del extracto no altera el desarrollo de la placenta, y al no encontrarse diferencias significativas en el peso de las placentas de los lotes D y DE podemos inferir que a pesar de las propiedades hipoglucemiantes atribuidas al extracto, su efecto no es capaz de minimizar las alteraciones en la placenta producidas por un estado diabético lo que se refleja en un mayor peso placentario.

La variación en el peso y estructura de las placentas de fetos de ratas con diabetes inducida por STZ fue documentada por Loredó (115), quien reportó que la estructura placentaria de 20 días de gestación presenta adelgazamiento de las vellosidades como resultado de la disminución de tejido conjuntivo, incremento en la vascularización de la región laberíntica, menor grosor de los vasos sanguíneos y dilatación de los mismos así como un aumento en la extensión y número de capas del espongiotrofoblasto y un aumento de células ricas en glucógeno en el trofoblasto.

Es necesario llevar a cabo estudios que pongan de manifiesto el efecto del extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* en el desarrollo de las placentas y su estructura histológica, así como las posibles repercusiones en su funcionamiento.

Aunque no se sabe con exactitud los mecanismos que regulan la posición fetal en el cuerno uterino y las diferencias en el momento de la implantación, se ha registrado que al inicio de la gestación estos acontecimientos influyen en la correlación entre el peso del feto y de la placenta, lo que se explica con el hecho de que los tejidos del feto y la placenta crecen de manera similar en etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo en estados de desarrollo más avanzados (E 17), los factores genéticos tienen una influencia menor en el crecimiento de ambas estructuras y el óptimo crecimiento del feto depende en gran medida del medio intrauterino, así como del desarrollo y funcionamiento de la placenta.

Neroli *et al.* (108) reportaron que fetos de ratas sanas presentan una correlación positiva con el peso placentario el día 13 de gestación ($r = 0.322$), el día 17 la

correlación es negativa ($r=-0.485$) y el día 21 de gestación dicha correlación es inexistente.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una baja correlación entre el peso fetal y el peso placentario en los lotes ND ($r=0.198$) y NDE (0.358) el día 21 de gestación mientras que en los lotes D y DE la correlación es inexistente, este hecho puede atribuirse a que en estados diabéticos la estructura y funcionamiento de la placenta se ve alterado evitando con ello el óptimo transporte de nutrientes de la madre al producto, dando como resultado descendencia de menor talla y peso (102, 103, 104, 115). Los resultados en la baja correlación en el lote NDE y la nula correlación en el lote DE nos sugieren que el extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* no ejerce efectos sobre el crecimiento del feto y la placenta.

Se ha observado que existen cambios morfológicos de gran importancia en la estructura del páncreas endocrino de crías de ratas con diabetes inducida con STZ (116). En este trabajo se observó retraso en la organización histológica del tejido pancreático en los fetos del lote diabético (D), evidenciado por la ausencia de agrupaciones tipo islote y la presencia de agrupaciones celulares de gran tamaño asociadas al epitelio ductal y vasos sanguíneos. Los fetos de ratas diabéticas que recibieron durante 17 días extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* (DE) presentaron agrupaciones de células endocrinas en estructuras redondeadas tipo islote, así como agrupaciones irregulares de gran tamaño de células endocrinas asociadas a tejido acinar, ductos y vasos sanguíneos. Por el contrario en los fetos de las ratas del lote ND el tejido endocrino se organizó en agrupaciones de células en estructuras redondeadas tipo islote entre el tejido acinar y en los fetos de las ratas del lote NDE se observaron agrupaciones de células endocrinas en estructuras redondeadas tipo islote entre el tejido acinar, así como pequeños grupos celulares asociados a ductos y vasos sanguíneos entre la masa acinar.

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos sugerir que el extracto butanólico de *Equisetum myriochaetum* administrado a ratas gestantes diabéticas no evita el retraso en el desarrollo de páncreas de su descendencia, pero este retraso es menos severo lo cual queda evidenciado por la presencia de agrupaciones celulares tipo islote, que no se observaron en el lote D, aunque coexistiendo con agrupaciones irregulares de gran tamaño de células endocrinas asociadas a tejido acinar, ductos y vasos sanguíneos.

El retraso en el desarrollo y diferenciación del tejido pancreático en crías y fetos de ratas diabéticas fue reportado por Morán-Zanabria (103) quien observó que la diferenciación celular en el páncreas de ratas se presenta el día 15 de gestación, evidenciando un retraso en el desarrollo de fetos de ratas con diabetes inducida por STZ (50 mg/kg), observándose un retardo en la fusión de los primordios pancreáticos y baja actividad proliferativa del tejido epitelial pre-ductal. El retraso en la proliferación celular endocrina y desarrollo pancreático fue evidente a lo largo de

toda la gestación y hasta el primer día de vida extra uterina (1d.V.E.U.). Particularmente se observó que el día 21 de gestación los fetos de ratas diabéticas presentaron una disminución en la actividad proliferativa de células endocrinas, retrasando la formación de islotes.

Estudios inmunohistoquímicos han puesto de manifiesto que los fetos de 21 días de madres sanas presentan abundantes células positivas a insulina al centro de los islotes. En contraste los fetos de madres diabéticas presentan escasa inmunopositividad a insulina en células β y con frecuencia presentan vacuolización (116). Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado previamente, los fetos de ratas sanas presentaron células β positivas a insulina localizadas en el centro de las agrupaciones tipo islote, por el contrario los fetos de madres diabéticas presentaron células inmunopositivas a insulina ampliamente distribuidas en las agrupaciones endocrinas, así como células asociadas a ductos pancreáticos.

El retraso en la organización del páncreas fue evidenciado también por la inmunopositividad a insulina presentada en el lote D y DE, en los que se pudo observar que ésta se extiende en la masa celular endocrina sin llegar a restringirse al centro de la agrupación e incluso presentando positividad a insulina en células dispersas entre el tejido acinar y ductal, contrario a lo observado en los páncreas de fetos del lote ND en donde la inmunopositividad se presentó principalmente en el centro del islote y escasamente en células asociadas a ductos. El retraso en la organización del páncreas en los fetos del lote D se evidenció en la amplia inmunopositividad a insulina en las agrupaciones tipo islote, así como la positividad en células asociadas a ductos y tejido acinar; este hecho se debe a que el feto no sintetiza glucosa por lo que existe una transferencia constante de la circulación materna a la fetal, la unidad feto placentaria consume hasta 50% de la glucosa de la madre por lo que si ésta es diabética el feto se desarrollará en un medio hiperglucémico que estimulará su páncreas a una mayor secreción de insulina (117).

Los resultados obtenidos en el lote D concuerdan con los reportados en la literatura, en la que se asevera que debido a que, la descendencia de madres diabéticas crece en un ambiente metabólico alterado la madre le transfiere por la placenta grandes cantidades de glucosa, lípidos y aminoácidos que estimulan el páncreas fetal, ocasionando diversos efectos. Se ha observado que cuando las madres presentan diabetes severa los fetos se enfrentan a concentraciones elevadas de glucosa, lo que produce hiperglucemia fetal severa que ocasiona hipertrofia de las células β y puede conducir a hiperinsulinemia temprana; esta adaptación, sin embargo, parece ser limitada y la sobreestimulación de las células β ocasiona que la secreción de insulina sea más rápida que su biosíntesis por lo que ocasiona la hipertrofia de las células β que en estados de desarrollo más avanzados son incapaces de secretar insulina, dando como resultado hipoinsulinemia fetal (118-120).

De acuerdo con los resultados obtenidos respecto a la inmunopositividad a insulina en el páncreas de fetos de las ratas del lote DE podemos inferir que el efecto hipoglucemiante de *Equisetum myriochaetum* en las madres no evita que su descendencia presente alteraciones en la secreción anormal de insulina, hecho que se refleja la baja inmunopositividad de las células β a insulina. Sin embargo, nuevamente se observa que el retraso no es tan severo como en el lote D ya que la mayor inmunopositividad a insulina está concentrada en el centro de las estructuras tipo islote.

Se sabe que durante la vida fetal temprana las células β no responden ante el estímulo de la glucosa, sin embargo se ha reportado que un ambiente hiperglucémico las células β fetales son capaces de liberar insulina como respuesta al cierre de canales K^+ sensibles a ATP, ocasionando la despolarización de la célula y permitiendo la entrada de iones de Ca^{2+} a la célula, condición que desencadena la exocitosis de los gránulos de insulina. En etapas de desarrollo más avanzado, un ambiente intrauterino hiperglucémico moderado ocasiona hiperinsulinemia fetal e hiperplasia de las células β , mientras que hiperglucemias severas retardan su proliferación (116).

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el tratamiento con extracto butánolico de *Equisetum myriochaetum* en ratas Sprague-Dawley gestantes con diabetes inducida con STZ durante 17 días en una dosis de 6.0 mg/kg:

- Favorece la disminución de los niveles de glucosa el día 21 de gestación, sin embargo éstos no se igualan a los obtenidos por los lotes no diabéticos (ND y NDE).
- No favorece el aumento de peso en ratas gestantes, sin embargo se observa una mayor ganancia de peso en comparación con el lote D pero sin llegar a igualar los obtenidos por los lotes ND y NDE.
- No induce malformaciones macroscópicas
- Reduce el número de reabsorciones y eleva el número de fetos vivos al día 21 de gestación en comparación con el lote diabético sin tratamiento.
- No ejerce efecto en el peso placentario de fetos de madres diabéticas, lo cual fue evidenciado en el mayor peso de las placentas del lote DE en comparación con el peso placentario en fetos de ratas sanas. Los pesos de las placentas de fetos del lote D y DE no presentan diferencias significativas.
- Favorece el crecimiento de los fetos de madres diabéticas, lo cual se reflejó en mayor peso y mayor talla en los fetos de madres diabéticas que recibieron el extracto al compararlos con los fetos del lote de ratas diabéticas sin el tratamiento.
- Disminuye el retraso en el desarrollo del páncreas de fetos de madres diabéticas, lo cual se ve reflejado en la organización histológica, en donde fue posible observar estructuras tipo islote, así como en la inmunopositividad al centro de dicha estructura, organización típica del páncreas en ratas.

9. PERSPECTIVAS

Dado el alto porcentaje de la población utiliza la medicina tradicional y la aceptación que tiene, además de que para las poblaciones aisladas es la única alternativa de tratamiento, es sumamente importante estudiar el efecto de la administración del extracto de *Equisetum myriochaetum* sobre el desarrollo embrionario y determinar si este tratamiento se puede administrar durante la gestación.

En este estudio se demostró que su administración no ejerce efectos teratogénicos macroscópicos, se demostró una reducción en el número de reabsorciones, un incremento, en el número de fetos vivos y en el peso y talla de éstos. Un hallazgo importante fue la disminución en el retraso en el desarrollo del páncreas de fetos de madres diabéticas, lo cual podría ser un efecto “protector” ante la agresión de la hiperglucemia materna sobre el desarrollo fetal.

Será importante hacer estudios en las crías de madres diabéticas tratadas con *Equisetum myriochaetum* para conocer el desarrollo posnatal y analizar la estructura y función del páncreas en la vida adulta, comparándolo con la de aquellas crías de madres diabéticas que no recibieron tratamiento durante la gestación.

10. REFERENCIAS

1. Islas S, Revilla MC. Diabetes mellitus: concepto y nueva clasificación. En: Islas S, Revilla MC, editores. Diabetes mellitus. 3ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2004. p. 3-20.
2. Bennett PH, Knowler WC. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. En: Ronald K, editor. Joslin's Diabetes mellitus. EUA: Library Congress Cataloging Publication data; 2005. p. 331-40.
3. Asociación Latinoamericana de diabetes. Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de Diabetes Mellitus tipo 2. Revista ALAD. 2006; 16: 104-06.
4. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diab Res Clin Pract. 2010; 87: 4-14.
5. Zimmet P, Cowie C, Ekoe JM. Classification of Diabetes Mellitus and other categories of glucose intolerance. En: DeFronzo RA, editor. International Textbook of Diabetes Mellitus. 3ª ed. Inglaterra: John Wiley & Sons. 2004. p. 3-14.
6. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2008; 31: 555-60.
7. O'Dea K. Westernisation, insulin resistance and diabetes in Australian Aborigines. Med J Aust. 1991; 155: 258-64.
8. Schulz LO, Bennett PH, Ravussin E, Kidd JR. Effects of Traditional and Western Environments on Prevalence of Type 2 Diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. Diabetes Care. 2006; 29 (8): 1866-71.
9. American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2003; 26: 103-05.
10. Boinpally T, Jovanovic L. Management of type 2 diabetes and gestational diabetes in pregnancy. Mt Sinai J Med. 2009; 76 (3): 269-80.
11. Secretaría de Salud. Boletín "México sano". www.salud.gob.mx [Fecha de consulta: 25 de septiembre de 2012]
12. Organización Mundial de la Salud. Programa de Diabetes de la OMS. www.who.int/es/ [Fecha de consulta: 10 de marzo de 2012]
13. Valdespino JL, Olaiz G, López-Barajas MP, Mendoza L, Palma O, Velázquez O, Tapia R, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo I. Vivienda, población y utilización de servicios de salud. México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2003.
14. Secretaría de Salud. Programa Nacional de Salud 2007-2012. www.salud.gob.mx [Fecha de consulta: 30 de septiembre de 2012]
15. Organización Mundial de la Salud. Día Mundial de la Diabetes: muchas de las amputaciones que acarrea la enfermedad se podrían evitar. www.who.int/es/ [Fecha de consulta: 15 de marzo de 2012]

16. Rull JA, Aguilar-Salinas CA, Rojas R. Epidemiology of Type 2 Diabetes in Mexico. *Arch Med Res.* 2005; 36 (3): 188-96.
17. Instituto Nacional de Salud Publica. ENSANUT 2006. <http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf> [Fecha de consulta: 27 de mayo de 2011]
18. Sistema Nacional de Información en salud. Mortalidad. <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/> [Fecha de consulta: 12 de agosto de 2011]
19. Edlund H. Pancreatic organogenesis- Developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet.* 2002; 3 (7): 524-32.
20. Bonal C; Herrera PL. Genes controlling pancreas ontogeny. *Int J Dev Biol.* 2008; 52 (7): 823-35.
21. Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 1995; 121 (6): 1569-80.
22. Murtaugh, LC. Pancreas and β -cell development: from the actual to the possible. *Development.* 2007; 134 (3): 427-38.
23. Duvillie B. Control of pancreatic development by intercellular signals. *Biochem Soc T.* 2008; 36 (3): 276-79.
24. Gu G. Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development.* 2002; 129 (10): 2447-57.
25. Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing β cells in the mammalian pancreas. *Nature.* 1997; 386 (6623): 399-402.
26. Collombat P. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev.* 2003; 17 (20): 2591-603.
27. Seymour PA, Sander M. Historical perspective: beginnings of the β -cell: current perspectives in β cell development. *Diabetes.* 2011; 60 (2): 364-76.
28. O`Rahilly G. Anatomía de Gadner. 5ª ed. México: McGraw-Hill; 2001.
29. Andralojc KM, Mercalli A, Nowak KW. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia.* 2009; 52 (3): 486-93.
30. Suckale J, Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling focus on the β cell. *Front Biosci.* 2008; 13: 7156-71.
31. Gartner LP, Hiatt JL. Texto Atlas de Histología. 3ª ed. McGraw Hill Interamericana. México; 2001.
32. Olvera-Granados, CP. Páncreas y células β : mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina ¿Regeneración?. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2008; 65: 306-24.
33. Shabapoor F, Separovic F, Wade J. The human insulin superfamily of polypeptide hormones. *Vitam Horm.* 2009; 80: 1-31.

34. Davis SN, Granner DK. Hipoglucemiantes orales y propiedades farmacológicas del páncreas endocrino. En: Brunton LL, John SL, Parker KL, editores. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª ed. España: McGraw-Hill; 2006.
35. Bastarrachea RA, Laviada-Molina H, Machado-Domínguez I. El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular. *Rev Endocrinol Nutr.* 2005; 13 (4): 180-89.
36. Facultad de Medicina- U.N.N.E. Hormonas pancreáticas. <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/hpancreas.pdf>. [Fecha de consulta: 27 de enero de 2012]
37. Quesada I, Tudurí E, Nadal A. Regulación por glucosa de la función de las células α , β y δ en el islote de Langerhans. En: Montanya E, editor. El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes. España: Editorial de la Sociedad Española de Diabetes; 2007. p. 18-32
38. Ganong WF. Fisiología médica. 23ª ed. México: Manual Moderno; 2010.
39. Maestro-Gutiérrez B. Modulación transcripcional del receptor de insulina por la 1, 25-dihidroxitamina D3. Implicaciones en el control de las actividades biológicas de la insulina. (Tesis doctoral). España: Universidad Complutense de Madrid; 2004.
40. Kendrey G, Roe FCJ. Histopathological changes in the pancreas of laboratory rats. *Lab Anim.* 1969; 3: 207-20.
41. Bendayan M, Ito S. Immunohistochemical localization of exocrine enzymes in normal rat pancreas. *J Histochem Cytochem.* 1979; 27: 1029.
42. Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma?. *Gene Ther.* 2004; 11 (1): 64-6.
43. Festing FW, Baumans M, Combes R. Reducing the Use of Laboratory Animals in Biomedical Research: Problems and Possible Solutions The Report and Recommendations of ECVAM Workshop. *ATLA.* 1998; 26: 283-301.
44. Concepción-Alfonso AR, De la Peña-Pino R, García-Capote J. Acercamiento al accionar ético-moral del científico que trabaja con animales de experimentación. *Acta bioeth.* 2007; 13 (1): 9-15.
45. Organización Mundial de la Salud. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. www.who.int/es/ [Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2011]
46. Bioética y derecho. Código de Nuremberg. www.bioeticayderecho.ub.es. [Fecha de consulta: 10 de diciembre de 2011]
47. Rodríguez E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioeth.* 2007; 13 (1): 25-40.
48. Leiter EH, Von Herrath M. Animal models have little to teach us about type 1 diabetes: 2. In opposition to this proposal. *Diabetologia.* 2004; 47: 1657-60.
49. Aluja, A. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Méd Méx.* 2002; 138 (3): 295:98.

50. Roep BO, Atkinson M, Von Herrath M. Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4 (12): 989-97.
51. Shafrir E, Ziv E. A useful list of spontaneously arising animal models of obesity and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 296: 1450-52.
52. Hugues-Hernandorena B, Rodríguez-González JC, Rodríguez-García JC. Animales de laboratorio en la endocrinología: Biomodelos de la diabetes mellitus tipo 1. *Rev Cubana Endocrinol* 2001; 12(3): 168-77.
53. . Kalman R, Ziv E, Shafrir E, Bar-On H, Perez R. *Psammomys obesus* and the albino rat—two different models of nutritional insulina resistance, representing two different types of human populations. *Lab Anim*. 2001; 35 (4): 346-52.
54. Bauer B, Ghahary A, Scott PG. The JCR:LA-cp rat: A novel model for impaired wound Ealing. *Wound Repair Regen*. 2004; 12 (1): 86-92.
55. Casado M. Modelos animales en el estudio de la diabetes. *Diabetologia*. 2007; 23(6): 432-38.
56. Plum L, Wunderlich FT, Baudler S, Krone W, Bruning JC. Transgenic and knockout mice in diabetes research: novel insights into pathophysiology, limitations, and perspectives. *Physiology*. 2005; 20: 152-61.
57. Rodriguez-Ramos GH. Diabetes mellitus experimental. *Clin Vet*. 1994; 6: 347-77.
58. Chiquete E, Nuño-Gonzales P, Panduro A. Perspectiva histórica de la diabetes mellitus. *RedAlyC*. 2001; 3: 5-10.
59. Kounoue E, Izumi K, Ogawa S, Kondo S, Katsuta H. The significance of T cells, B cells, antibodies and macrophages against encephalomyocarditis (EMC)-D virus-induced diabetes in mice. *Arch Virol*. 2008; 153 (7): 1223-31.
60. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001; 50(6): 537-46
61. Black HE, Rosenblum Y. Chemically Induced (Streptozotocin-Alloxan) Diabetes Mellitus in the Dog *Biochemical and Ultrastructural Studies*. *Am J Pathol*. 1980; 98 (2): 295-10.
62. Mora AC, Aragón D, Ospina LF. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae-Columbia*. 2009; 16 (3): 311-19.
63. Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem*. 2007; 22 (2): 60-64.
64. Lenzen S. Alloxan and streptozotocin diabetes. En: Peschke E, editor. *Endocrinology III lectures within the "time structures of endocrine systems" project framework*. Alemania: *Abhandlung der Sächs*; 2007. p. 119-38.
65. Islas-Andrade S, Revilla-Monsalve MC, De la Peña JE, Polanco AC, Palomino MA, Velasco AF. Streptozotocin and alloxanin experimental diabetes: Comparison of the two models in rats, *Acta Histochem Cytoc*. 2000; 33: 201-08.

66. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51 (2): 216-26.
67. Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic β -cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. 2000; 43 (12): 1528-33.
68. Repetto M, Repetto-Kuhn G. *Toxicología fundamental*. España: Ediciones Díaz de Santos; 2009.
69. Masiello P, Broca C, Gross R, Roye M. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*. 1998; 47 (2): 224-29.
70. Pandya KG, Patel MR, Lau-Cam CA. Comparative study of the binding characteristics to and inhibitory potencies towards PARP and in vivo antidiabetogenic potencies of taurine, 3-aminobenzamide and nicotinamide. *J Biomed Sci*. 2010; 24 (17): 1-16.
71. Clapés S. Peroxidación lipídica y otros indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos, *Rev Cubana Invest Biomed*. 2001; 20 (2): 93-98.
72. Bolzán AD, Bianchi M. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutat Res*. 2002; 512: 121-34.
73. Turner B, Williams S, Taichman D. *In the Clinic Type 2 diabetes*. EUA; American College of Physicians , 2010.
74. Brinkworth GD, Noakes M, Parker B, Foster P, Clifton PM. Long-term effects of advice to consume a high-protein, low-fat diet, rather than a conventional weight-loss diet, in obese adults with Type 2 diabetes: one-year follow-up of a randomised trial. *Diabetologia*. 2004; 47: 1677-86.
75. Esposito K, Maiorino M, Ciotola M, Di Palo C, Scognamiglio P, Gicchino M, Petrizzo M, Saccomanno F, Beneduce F, Ceriello A. Effects of a Mediterranean-Style Diet on the Need for Antihyperglycemic Drug Therapy in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Ann Intern Med*. 2009; 151: 306-14.
76. Agosti V, Graziano S, Artiacio L, Sorrentino G. Biological mechanisms of stroke prevention by physical activity in type 2 diabetes. *Acta Neurol Scand*. 2009; 119: 213-23.
77. Thomas DE, Elliott EJ, Naughton GA. Exercise for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006; 3: 2968.
78. Marcus R, Smith S, Morell G, Addison O, Dibble L, Wahoff-Stice D, LaStayo P. Comparison of combined aerobic and high-force eccentric resistance exercise with aerobic exercise only for people with type 2 diabetes mellitus. *Phys Ther*. 2008; 88 (11): 1345-54.
79. Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ. Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA*. 2001; 286: 1218-27.
80. Colberg SR, Grieco CR. Exercise in the treatment and prevention of Diabetes. *CSMR*. 2009; 8 (4): 169-75.
81. Allemann C, Herren D, Badertscher KM. Requirements for quality of approved plant medicines. *Ther Umsch*. 2002; 59 (6): 267-73.

- 82- Secretaría de Salud. Ley General de Salud. Reglamento de insumos para la salud. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/ris.html> [Fecha de consulta: 19 de septiembre de 2012]
83. Romero-Cerecero O, Reyes-Morales H, Herrera-Arellano A, Lozoya-Legorreta X, Tortoriello J. Aceptación de los fitomedicamentos por médicos y pacientes en clínicas de atención primaria. *Rev Med IMSS*. 2004; 42 (2): 133-39.
84. Mendoza-Patiño N, Figueroa-Hernández JL. Herbolaria. *Rev Fac Med UNAM*. 2006; 48 (6): 248-49.
85. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*. 2005; 99: 325-48.
86. Guillon JM. Molecular phylogeny of horsetails (*Equisetum*) including chloroplast atpB sequences. *J Plant Res*. 2007; 120 (4): 569-74.
87. Gómez D. Contribuciones a la Pteridología centroamericana. Flora de Nicaragua I. Isoetaceae, Equisetaceae, Lycopodiaceae. Selaginellaceae y los grupos Euspoangiados. Costa Rica: Museo Nacional de Costa Rica; 1985.
88. Andrade-Cetto, A. Estudio etnofarmacológico de *Equisetum myriochaetum* Schlechtendal & Chalm y *Cecropia obtusifolia*. (Tesis doctoral). México: Facultad de Ciencias, UNAM; 1999.
89. Gallardo-Pérez JC, Esparza-Aguilar ML, Gomez-Campos A. Importancia etnobotánica de una planta vascular sin semilla en México: *Equisetum*. *Polibotánica*. 2006; 21: 61-74.
90. Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H, Revilla MA, Islas SA. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rat. *J Ethnopharmacol*. 2000; 72 (1-2): 129-33.
91. Revilla MC, Andrade-Cetto A, Islas S, Wiedenfeld H. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on type 2 diabetic patients. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81: 117-20.
92. Soleimani, S, Azarbaizani FF, Nejati V. The effect of *Equisetum arvense* L. (Equisetaceae) in histological changes of pancreatic β -cells in streptozotocin-induced diabetic in rats. *Pak J Biol Sci*. 2007; 10: 4236-40.
93. Wiedenfeld H, Andrade-Cetto A, Perez Amador C. Flavonol glycosides from *Equisetum myriochaetum*. *Bioch Syst Ecol*. 2000; 28: 395-97.
94. Ordaz Téllez MG, Barcenas-Rodríguez B, Quevedo-Olivares G. A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotoxic either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test. *J Ethnopharmacol*. 2007; 111: 182-89.
95. Lindsay RS. Gestational diabetes: causes and consequences. *Br J Diabetes Vasc Dis*. 2009; 9 (1): 27-31.
96. Kennedy-Shiver E. National Institute of Child Health & Human Development. Gestational Diabetes. http://www.nichd.nih.gov/health/topics/Gestational_Diabetes.cfm [Fecha de consulta: 12 de enero de 2012]

- 97- American Diabetes Association. Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26 (1): 1-2.
98. Cruz J, Hernández-García P, Yanes-Quesada M. Macrosomía neonatal en el embarazo complicado con diabetes. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 2008; 24 (3): 1-20.
99. Osorio JH. Embarazo y metabolismo de los carbohidratos. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 2002, 54 (2): 97-106.
100. Yamada R, Griggio M, Luz J. Energy balance of pregnant diabetic rats. *Br J Nutr*. 2002; 87 (5): 509-15.
101. Oztürk Y, Aydin S, Ozçelikay AT, Altan VM, Yildizoğlu-Ari N. Calmodulin content and in vitro contractility of duodenum from streptozotocin-induced diabetic rats: effects of insulin therapy and calmodulin antagonism. *Eur J Pharmacol*. 1997; 321 (1): 59-65.
102. Ktorza A, Girard JR, Kinebanyan MF, Picon L. Hyperglycaemia induced by glucose infusion in the unrestrained pregnant rat during the last three days of gestation: metabolic and hormonal changes in the mother and the fetuses. *Diabetologia*. 1981; 21 (6): 569-74.
103. Morán L. Efecto de la diabetes materna sobre el desarrollo del páncreas fetal de rata. (Tesis de Licenciatura). México: Facultad de Ciencias, UNAM; 2006.
104. Polanco-Ponce AC, Revilla MC, Palomino Garibay MA, Islas SA. Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas. *Ginecol Obstet Mex*. 2005; 73: 544-52.
105. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diab Res Clin Pract*. 2010; 87: 4-14.
106. Zhanga Y, Zhenb W, Maechlerc P, Liub D. Small molecule kaempferol modulates PDX-1 protein expression and subsequently promotes pancreatic β -cell survival and function via CREB. *J Nutr Biochem*. 2012; 24 (4): 638-46.
107. Barr M, Jensh R, Brent RL. Prenatal growth in the albino rat: effects of number, intrauterine position and resorptions. *Am J Anat*. 1970; 128 (4): 413-28.
108. Norman NA, Bruce NW. Fetal and placental weight relationships in the rat at days 13 and 17 of gestation. *J Report Fertil*. 1979. 57 (2): 345-48.
109. Soutelo MJ, Faraj G. Aborto recurrente y diabetes. *Revista SAEGRE*. 2010; 17(2): 27-35.
110. Damasceno DC, Volpato GT, De Mattos Paranhos, Cunha MV. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci*. 2002; 72 (3): 235-44.
111. . Daskalakis G, Marinopoulos S, Krielesi V. Placental pathology in women with gestational diabetes. *Acta Obstet Gyn*. 2008; 87: 403-07.
112. Jansson T, Powell TL. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potencial interventional approaches. *Clin Sci*. 2007; 113: 1-13.
113. Asgharnia M, Esmailpour N, Poorghorban M, Atrkar-Roshan Z. Placental weight and its association with maternal and neonatal characteristics. *Acta Med Iranica*. 2008; 46 (6): 467-72.

114. Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. Symposium Report. *J Physiol.* 2006; 572: 25-30.
115. Loredó-Nuñez E. Efecto de la diabetes materna sobre la estructura de la placenta de 20 días de desarrollo. (Tesis de Licenciatura). México: Facultad de Ciencias, UNAM; 2003.
116. Calvo RM, Forcen R, Obregon MJ, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Regadera J. Immunohistochemical and morphometric studies of the fetal pancreas in diabetic pregnant rats. Effects of insulin administration. *Anat Rec.* 1998; 251 (2): 173-80.
117. Suárez-González JA, Roche CS, Alvarez MC, Corrales A. Buenas prácticas en la atención a las gestantes diabéticas. *REVOG.* 2010; 15: (4): 109-15.
118. Van Assche FA, Holemans K, Aerts L. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. *Br Med Bull.* 2001; 60 (1): 173-82.
119. Arulmozhi DK, Veeranjanyulu A, Bodhankar SL. Neonatal streptozotocin-induced rat model of Type 2 diabetes mellitus: A glance. *India J Physiol.* 2004; 36 (4): 217-21.
120. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. *J Physiol.* 2003; 547 (1): 11-20.

11. ANEXOS

11.1 Clasificación etiológica de la Diabetes mellitus (6)

- I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células β que causa una relativa a absoluta deficiencia de la insulina)
 - A. Mediada por mecanismos inmunológicos
 - B. Idiopática
- II. Diabetes tipo II (rango variable desde resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa de insulina a defecto en la secreción de insulina con resistencia a ésta).
- III. Otros tipos específicos de Diabetes
 - A. Defectos genéticos en la función de la célula β en:
 1. Cromosoma 12 HNF-1 α (MODY3)
 2. Cromosoma 7, glucocinasa (MODY2)
 3. Cromosoma 20, HNF-4 α (MODY1)
 4. Cromosoma 13, Factor promotor de insulina-1 (IPF-1; MODY4)
 5. Cromosoma 17, HNF-1 (MODY5)
 6. Cromosoma 2, NeuroD1 (MODY6)
 7. DNA Mitocondrial 8
 - Otros
 - B. Defectos genéticos en la acción de la insulina
 1. Resistencia a la insulina tipo A
 2. Lepracaunismo
 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
 4. Diabetes lipotrófica
 5. Otros
 - C. Enfermedades del páncreas endocrino
 1. Pancreatitis
 2. Trauma/pancreatectomía
 3. Neoplasia
 4. Fibrosis quística
 5. Hemocromatosis
 6. Pancreatopatía fibrocalculosa
 7. Otros
 - D. Endocrinopatías
 1. Acromegalia
 2. Síndrome de Cushing
 3. Glucagonoma
 4. Feocromocitoma
 5. Hipertiroidismo
 6. Somatostatina
 7. Aldosteronoma
 8. Otros
 - E. Sustancias químicas o fármacos capaces de inducir diabetes
 1. Vacor
 2. Pentamidina
 3. Ácido nicotínico
 4. Glucocorticoides
 5. Hormona tiroidea
 6. Diazóxido
 7. Agonistas adrenérgicos β
 8. Tiacidas
 9. Dilantinas
 10. Interferón α
 11. Otros
 - F. Infecciones
 1. Rubéola congénita
 2. Citomegalovirus
 3. Otros
 - G. Formas poco comunes de Diabetes mediada inmunológicamente
 1. Síndrome del "hombre rígido"
 2. Anticuerpos para el receptor de insulina
 3. Otros
 - H. Síndromes que algunas veces se acompañan de Diabetes
 1. Síndrome de Down
 2. Síndrome de Klinefelter
 3. Síndrome de Turner
 4. Síndrome de Wolfram
 5. Ataxia de Friedreich
 6. Corea de Huntington
 7. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
 8. Distrofia miotónica
 9. Porfiria
 10. Síndrome de Prader-Willi
 11. Otros
- IV. Diabetes mellitus gestacional (GDM)

11.2 Inmunohistoquímica. Método de inmunohistoquímica de doble anticuerpo con peroxidada.

1. elaboración de amortiguador PBS a un pH 7.0-7.2 . detergente Twin 2.0 al 0.1%
2. desparafinar cortes e hidratar hasta agua destilada
3. calentar laminillas en una solución de recuperador antigénico por 30 min a partir de que hierva el agua. Los cortes se enfrían a temperatura ambiente por 20 minutos
4. enjuagar los cortes en agua destilada. Se construye un cámara húmeda. Los cortes se limpian en solución PBS-Twin por 5 minutos
5. dejar reposar los cortes por 15 minutos en solución PBS-Twin
6. separar las muestras con Pad-ped, se realiza el bloqueo de peroxidada endógena por 10 minutos (2 gotas en cada muestra)
7. enjuagar con solución PBS-Twin por 5 minutos
8. colocar el bloqueador de proteínas no específicas por 10 minutos y decantar el exceso sin lavar
9. se incuba el anticuerpo primario en una dilución optima por 45 minutos mientras que otra muestra del tejido es incubada con solución PBS-Twin (la dilución del anticuerpo se realiza con solución PBS-Twin)
10. se lavan los cortes en solución PBS-Twin
11. se incuba el anticuerpo secundario por 45 minutos (Anticuerpo acoplado a peroxidada de rábano)
12. lavar las laminillas con PBS-Twin
13. realizar la dilución de cromógeno-sustrato (DAB)
14. se incuba la dilución reveladora por 1 minuto y lavara con agua destilada
15. contrastar con Hematoxilina por 2 minutos, deshidratar y montar con Entellan

NOTA. Los cortes utilizados para este tipo de técnica deben de ser montados en porta objetos pretratados con Poli-L-lisina para una mayor afinidad del mecanismo inmunohistoquímico de esta técnica específica

Soluciones

Solución de Poli-L-lisina

- diluir la Poli-L-lisina 1:10 partes en agua destilada

Los portas son incubados en esta dilución por 30 minutos y después secar en la estufa toda la noche

PBS (Amortiguador de fosfatos)

- fosfato de sodio dibásico	8.5176 g
- fosfato de sodio monobásico	3.4834 g
- cloruro de sodio	11.946 g
- agua destilada	1000 ml

Ajustar pH 7.4 con OHNa3

Solución de PBS- Twin al 0.1%

- solución de PBS pH 7.4 300 ml
- solución Twin 20 0.3 ul

Solución de recuperador antigénico

- solución de recuperación antigénica 10X 10 ml
- agua destilada 90 ml

Peroxido de hidrógeno al 3%

- peroxido de hidrógeno al 30% 10 ml
- agua destilada 90 ml

Combinarse en una relación 1:5 con alcohol metílico

- alcohol metílico (4 partes) 80 ml
- peroxido de hidrógeno al 3% (1 parte) 20 ml

Anticuerpo

- anticuerpo anti insulina (LabVision) Cocktail antiratón 1µl
- solución PBS-Twin 349 µl

11.3 Índice de abreviaturas

CPBI - Índice de proliferación celular con bloqueo de citocinesis

D- Lote diabético

DM - Diabetes mellitus

HNF- Factor nuclear de hepatocitos

H₂O₂- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

IGF - Factores del crecimiento insulinoides

IFG - glucemia alterada en ayuno

IGT- Intolerancia a la glucosa

IR- Receptor de insulina

mg/dl - miligramos por delciletro

MODY - Diabetes del adulto de inicio en la juventud

Ngn3 - Neurogenina 3

ND- Lote no diabético

NDE- Lote no diabético con extracto

NO - Óxido nítrico

O₂- Radical superóxido

Pdx1- Homeobox pancreático duodenal 1

Ptf1a -Factor de transcripción específico del páncreas 1a

ROS -Especies reactivas de oxígeno

TNF- Factor de necrosis tumoral de citocinas

μl - microlitros