



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE AJO
ENVEJECIDO EN UN MODELO DE DIABETES MELLITUS
TIPO 2**

TESIS

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

PRESENTA

OSCAR ALEJANDRO LINARES GARCIA



MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS
VOCAL	Profesor: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO
SECRETARIO	Profesor: DIANA BARRERA OVIEDO
1er. SUPLENTE	Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
2° SUPLENTE	Profesor: LAURA CARMONA SALAZAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL, EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN SEXTO PISO, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

FINANCIAMIENTO: Este trabajo fue apoyado por el proyecto PAPIIT IN205310.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. DIANA BARRERA OVIEDO

SUSTENTANTE:

OSCAR ALEJANDRO LINARES GARCÍA

Dedicatorias

A Oscarín, por estar conmigo siempre y en todo momento, en las buenas y en las malas, recordándome que vale la pena seguir adelante y seguir esforzándome todos los días por lo que quiero, enseñándome a ser curioso y deseoso de aprender cosas nuevas, a ver y explorar el mundo con ojos de niño.

A Dieguito, por ser testigo del esfuerzo dedicación y disfrute de una etapa muy importante de mi vida, por estar ahí (mas a fuerzas que de ganas) acompañándome a la biblioteca o al laboratorio, por escucharme hablar a veces sin saber que decir, por enseñarme que hay alegría e ilusiones.

A mi hermana Meli, por creer en mí y por apoyar con tanta dedicación y empeño a mi familia.

A mi mamá, por ser ejemplo de valores, perseverancia y autoestima, por todo el apoyo, amor y comprensión

A mi papá por su ejemplo, por su amor, por sus consejos, por enseñarme lo que se debe de hacer y lo que no se debe de hacer, por su fortaleza y ganas de seguir viviendo.

A Yanet, por acompañarme en esta etapa de mi vida, por ser mí amiga, mi cómplice y mi confidente, mi compañera de clases y de equipo de laboratorio, mi compañera de aventuras, de recorridos por el centro histórico.

A Claudia, por ser mi amiga incondicional, ejemplo de lo que es ser una gran mujer y excelente estudiante, una buena amiga.

A Juan Manuel por ser mi mejor amigo, mi cuate, mi carnal, por haberme permitido compartir todas las cosas que vivimos en la Universidad.

A Idalia, por su valiosa ayuda y por ser muy buena amiga.

A mi tía Martha, por ser mi segunda madre, por escucharme, alentarme y apoyarme siempre.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por acogerme en sus aulas y laboratorios y brindarme la oportunidad de formarme como profesionista.

A mis abuelos por ser ejemplo de sabiduría, humildad y nobleza.

A toda mi familia, primos, tíos, sobrinos..., por creer en mí y por brindarme todo su afecto, cariño y ejemplo.

A *Fisher Clinical Services Part of Thermo Fisher Scientific* y mis compañeros de la oficina por la oportunidad de trabajo, crecimiento y aprendizaje, porque técnicamente son mi segunda familia.

A Verito y Marlene porque además de ser mis amiga y compañeras de trabajo, son mis consejeras, gracias por ser escuchas generosas, por los consejos y apoyo.

A la Dra. Diana Barrera, por el apoyo, los consejos, la escucha y comprensión que siempre me brindó.

A mi amigo Jaime Zarate por su escucha y consejos.

A mis amigos y compañeros, por los buenos y no tan buenos momentos, por el aprendizaje que me dejan.

A todas las personas que padecen diabetes mellitus y sus secuelas.

Y con mucho respeto, a la memoria de todas las ratas de laboratorio que utilice para llevar a cabo este trabajo.

INDICE GENERAL

Abreviaturas	
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1. Diabetes mellitus (DM)	2
2.2. Epidemiología de la diabetes mellitus	3
2.3. Manejo de pacientes diabéticos	3
2.4. Tipos de diabetes mellitus	4
2.5. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)	5
2.5.1 Historia natural de la enfermedad	6
2.5.2 Desórdenes metabólicos	6
2.6. Efectos fisiológicos de la insulina	8
2.7 Diabetes mellitus y estrés oxidativo	9
2.8 Modelos experimentales de DM2	10
2.9 Propiedades farmacológicas del ajo	10
2.8.1 El ajo como suplemento dietario	11
2.8.2 Actividad farmacológica del extracto de ajo envejecido (EAE)	12
3. Antecedentes	13
4. Justificación	14
5. Hipótesis	14
6. Objetivo general	15
6.1 Objetivos particulares	15
7. Materiales y métodos	15
7.1. Reactivos	15
7.2. Modelo de diabetes mellitus tipo 2 inducido por estreptozotocina y una dieta hipercalórica	15
7.2.1 Preparación del EAE y STZ	15
7.2.2 Sujetos experimentales	16
7.3. Dieta	16

7.4. Establecimiento de la dosis de STZ	17
7.5. Evaluación del efecto del EAE	18
7.6. Procesamiento de las muestras biológicas	19
7.7. Determinación de parámetros bioquímicos	20
7.7.1. Creatinina en suero	20
7.7.2. Depuración de creatinina	21
7.7.3 Nitrógeno de urea en sangre	21
7.7.4 Determinación de glucosa	22
7.7.5 Determinación de colesterol	22
7.7.6 Determinación de triglicéridos	23
7.7.7 Cuantificación de proteínas en orina	24
8. Resultados y discusión	25
9. Conclusiones	33
10. Referencias	34

Índice de abreviaturas

AGL	Ácidos grasos libres
BUN	Nitrógeno de urea en sangre
CAT	Catalasa
CS	Creatinina en suero
COL	Colesterol
CT	Grupo control
DC	Depuración de creatinina
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EAE	Extracto de ajo envejecido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EO	Estrés oxidativo
IRA	Insuficiencia renal aguda
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PT	Proteínas totales en orina
PFGA	Productos finales de la glicosilación avanzada
RL	Radicales libres
SAC	S-alilcisteína
SOD	Superóxido dismutasa
SSI	Solución salina isotónica
STZ	Estreptozotocina
TGA	Trastorno de la glucosa en ayunas
TGL	Triglicéridos
TTG	Trastorno de tolerancia a la glucosa

1. Introducción

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de trastornos metabólicos que tiene como característica principal a la hiperglucemia. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) presenta grados variables de resistencia a la insulina (RI). Los defectos en la acción y/o secreción de la insulina originan hiperglucemia y complicaciones en el metabolismo de lípidos y proteínas.

Varios trabajos han evidenciado que el extracto de ajo envejecido (EAE) contrarresta el estrés oxidante y la generación de productos finales de la glicosilación avanzada (PFGA) originados por niveles elevados de glucosa (GLU) en sangre, los cuales están vinculados a enjecimiento y patogénesis de la DM. Por otra parte, se ha descrito que el EAE es capaz de disminuir los niveles de colesterol (COL), triglicéridos (TGL), proteínas de muy baja densidad (VLDL) y proteínas de baja densidad (LDL); parámetros que se incrementan por la alteración en el metabolismo de lípidos que se observa en la DM. En etapas avanzadas de DM, los pacientes llegan a desarrollar insuficiencia renal. En nuestro laboratorio, estudios *in vivo* han demostrado que el EAE es capaz de proteger ante la insuficiencia renal aguda inducida por ciclofosfamida. Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene por objetivo evaluar el efecto del EAE en un modelo de DM2 inducido por una dieta hipercalórica y estreptozotocina (STZ) en ratas macho Wistar.

2. Marco teórico

2.1 Diabetes mellitus

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la DM como una enfermedad crónica consecuencia de la producción insuficiente de insulina o el uso ineficaz de la misma. La DM comprende un grupo de trastornos metabólicos que comparten el fenotipo de hiperglucemia, se caracteriza por modificaciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Las manifestaciones clínicas características de la diabetes son la polidipsia, poliuria, polifagia, visión borrosa, pérdida de peso y la susceptibilidad a ciertas infecciones.

Las consecuencias agudas y potencialmente mortales de la DM no controlada, son la hiperglucemia con cetoacidosis y el síndrome hiperosmolar no cetósico (American Diabetes Association, 2012). Aunque a menudo, los síntomas son leves o están ausentes; la hiperglucemia moderada persiste durante años, lo que ocasiona daño a los tejidos en desarrollo (Holt, Cockram, & Flyvbjerg, 2010).

Entre las complicaciones a largo plazo se incluyen la retinopatía con potencial pérdida de la visión, nefropatía que conduce a insuficiencia renal, neuropatía periférica con riesgo de úlceras en los pies, amputación de miembros periféricos; la neuropatía autonómica que causa síntomas gastrointestinales, genitourinarios, cardiovasculares y disfunción sexual. Adicionalmente, los pacientes con diabetes presentan hipertensión, anormalidades en el metabolismo de lipoproteínas, aterosclerosis cardiovascular, enfermedad vascular periférica y cerebrovascular (American Diabetes Association, 2012).

Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Estos van desde la destrucción autoinmune de las células β o anormalidades genéticas en la función de la insulina.

2.2 Epidemiología de la diabetes mellitus

Durante el año 2012 se estimó que más de 310 millones de personas en el mundo tienen DM, esto equivale a una prevalencia del 8.3%. En México la DM es la segunda causa de muerte, se ha calculado que más 10.6 millones de personas viven con DM y la prevalencia de la enfermedad es de 15.59%. El impacto de esta enfermedad no sólo es en la mortalidad, sino en la morbilidad y en la calidad de vida, pues representa una enorme carga e impacto para el sistema de salud y la sociedad en general. La suma de gastos directos e indirectos atribuidos a la DM en México, estimada para el año 2010, fue de 778 427 475 pesos (Arredondo, 2011).

Los pacientes diabéticos en México viven 20 años en promedio con la enfermedad; este padecimiento se presenta entre los 35 y 40 años. Por cada diabético que muere se detectan siete nuevos casos de enfermedad. La mortalidad por DM es mayor en los estados del Norte que en los del Sur, los del Centro tienen un comportamiento intermedio y el D.F. se comporta como los Estados del Norte, es más frecuente en los grupos sociales con estilo de vida urbano. La diabetes es la principal causa de demanda de consulta externa en instituciones públicas y privadas; y uno de los principales motivos para la hospitalización. Es más frecuente en el medio urbano (63%) que en el rural (37%) y mayor en mujeres que hombres (Moreno-Altamirano, 2001).

2.3 Manejo de pacientes diabéticos

En algunos individuos con diabetes, el adecuado control glucémico se puede lograr con pérdida de peso, ejercicio y / o agentes hipoglucemiantes, estos individuos no requieren insulina. Algunos pacientes producen una secreción de insulina residual, pero suelen requerir insulina exógena para el control glucémico adecuado, aunque pueden sobrevivir sin ella. Las personas con abundante destrucción de las células β , sin producción residual de insulina,

requieren la hormona para sobrevivir. El grado de hiperglucemia está relacionado con la severidad del proceso metabólico (American Diabetes Association, 2012).

2.4 Tipos de diabetes mellitus

Existen variantes de DM asociadas a interacciones genéticas y ambientales. Éstas se clasifican con base en el proceso etiológico, la edad de inicio y/o tipo de tratamiento (Fauci, 2009).

- *La DM tipo 1*, es consecuencia de la deficiencia de insulina, causada por la destrucción autoinmune de células β del páncreas, comprende 3 a 5% de todos los casos, y por lo general surge durante la infancia (Barret, 2010).
- *La DM2*, se caracteriza por la desregulación de la liberación de insulina por parte de las células β , junto con la resistencia a dicha hormona en tejidos periféricos, como el músculo de fibra estriada, el cerebro y el hígado. Este tipo de diabetes es predominante en población adulta con sobrepeso u obesidad, cabe destacar que la DM2 es la más frecuente en la población mexicana con un 90 a 95% de los casos de DM (Barret, 2010).
- *La DM tipo específico*, comprende un grupo de condiciones, que incluyen defectos genéticos en la secreción o acción de la insulina, como pancreatitis, trastornos exocrinos, tumores secretores de hormonas como la hormona del crecimiento, y el síndrome de Cushing. Algunos casos son causados por la administración de fármacos como los glucocorticoides; a su vez síndromes genéticos como el síndrome de Down y síndrome de Klinefelter pueden estar ligados al desarrollo de la enfermedad (Holt, 2010).

2.5 Diabetes mellitus tipo 2

La DM2 es precedida por un periodo de homeostasis anormal de la glucosa (GLU), clasificado como trastorno de la glucosa en ayunas (TGA) o trastorno de tolerancia a la glucosa (TTG) (Fauci, 2009), en el cual se considera que estos son estados prediabéticos (Figura1) (American Diabetes Association, 2012).

Estadios Tipos	Normoglicemia	Hiperglicemia			
	Regulación normal de la glucosa	Pre-Diabetes TGA o TTG	Diabetes No se requiere Insulina	Diabetes Se requiere insulina (control)	Diabetes Se requiere Insulina para sobrevivir
Tipo 1		←—————→			
Tipo 2		←—————→			
Tipo específico		←—————→			

Figura 1. Tipos y estadios de DM. Las variantes y etapas de DM pueden clasificarse de acuerdo a los niveles de glucosa en sangre y la dependencia de Insulina (Modificado de American Diabetes Association, 2012) .

En las primeras etapas de la DM2 existe un grado de hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en diversos tejidos, aunque no produce síntomas clínicos. Durante este período asintomático, es posible detectar una anomalía en el metabolismo de carbohidratos mediante la medición de la GLU plasmática en ayunas o después de un desafío con una carga oral de GLU. El grado de hiperglucemia puede cambiar con el tiempo, dependiendo de la extensión de la enfermedad (American Diabetes Association, 2012).

2.5.1 Historia natural de la enfermedad

La mayoría de las personas que padecen DM2 son obesos, esta condición por si misma es capaz de generar RI, la cual se define como un estado en el que las células, los tejidos y en general el organismo requieren cantidades elevadas de la hormona para lograr una respuesta normal (Mantzoros, 1995). La habilidad para liberar la hormona en respuesta a la demanda metabólica está acoplada a su producción en las células β . Los pacientes que no son obesos, de acuerdo a los criterios tradicionales de peso, suelen poseer un alto porcentaje de grasa corporal distribuido en la zona abdominal. Este tipo de DM puede permanecer sin diagnosticarse durante varios años, ya que la hiperglucemia se desarrolla de manera gradual y en etapas tempranas no produce síntomas severos.

2.5.2 Desórdenes metabólicos presentes en la diabetes mellitus tipo 2

En la mayoría de los pacientes con DM2 la enfermedad se manifiesta después de los 30 años. Al contrario de la DM1, la DM2 se caracteriza por un aumento en la concentración de insulina plasmática (hiperinsulinemia), que es la respuesta compensadora de las células β ante la resistencia a esta hormona. Además surge la glucosuria porque se rebasa la capacidad de los riñones para reabsorber la GLU (Barret, 2010).

En la DM la hiperglicemia contrasta con el déficit de GLU intracelular, debido a que la GLU es la fuente principal de energía para todos los procesos celulares, los requerimientos de energía sólo se pueden satisfacer si se recurre al catabolismo de lípidos y proteínas, lo que genera una serie de desórdenes metabólicos (Figura 2).

Dado que la insulina inhibe a la lípasa hormonosensible en el tejido adiposo, la resistencia a la hormona aumenta a más del doble la concentración plasmática de ácidos grasos libres (AGL). El aumento del glucagón, promovido por la demanda de energía, también contribuye a la movilización de AGL. Este

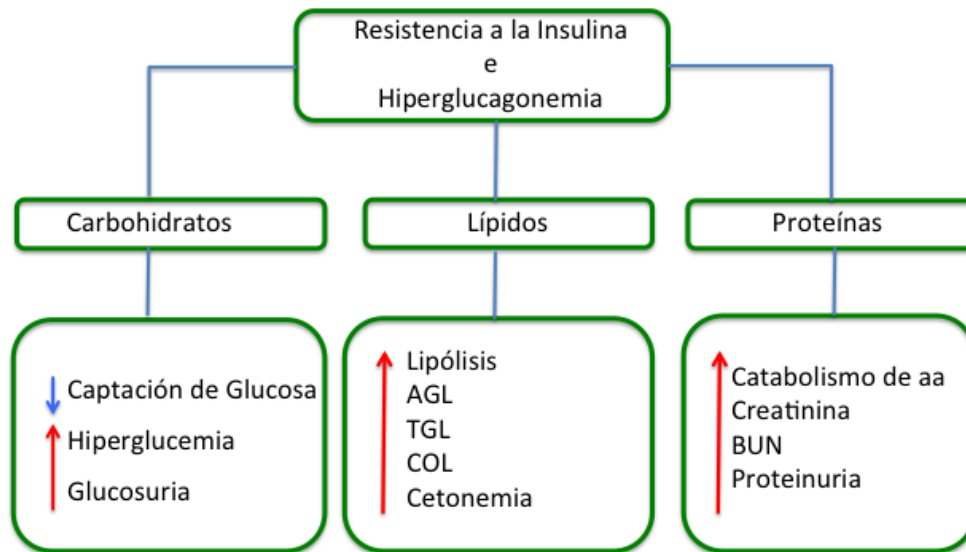


Figura 2. Alteraciones metabólicas en DM2. La resistencia o falta de producción de insulina conducen a la hiperglicemia, que a largo plazo genera anomalías en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas.

incremento en la concentración de AGL en circulación muestra correspondencia con la hiperglicemia, y en algunas modalidades, es buen indicador de la severidad de la enfermedad.

En el hígado y otros tejidos, los AGL son transformados en acetil-coenzima A (Ac-CoA); la cual se metaboliza con los residuos de aminoácidos (aa) para generar dióxido de carbono y agua en el ciclo de Krebs. Sin embargo, cuando se rebasa la capacidad para catabolizar a la Ac-CoA, el exceso es transformado en cuerpos cetónicos. En la DM no controlada, o en estadios avanzados de la enfermedad, también se observa el aumento en la concentración plasmática de triglicéridos (TGL) y de quilomicrones, por lo cual el plasma suele ser lipémico. El incremento en la cantidad de los constituyentes mencionados es causado por la menor extracción de TGL (Barret, 2010).

Otro componente alterado en la DM es el colesterol (COL), que suele estar elevado. La hipercolesterolemia proviene del incremento de la concentración plasmática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). Es probable que esta condición surja como consecuencia de la mayor producción de VLDL en el hígado; o de una menor extracción de VLDL y LDL del torrente circulatorio (Barret, 2010).

Además de las alteraciones del metabolismo de lípidos, se desencadenan anomalías en el metabolismo de proteínas. Durante la catabolia de aa, el hígado transforma una mayor cantidad de proteínas en GLU. La intensificación de la gluconeogénesis, es causada por la hiperglucagonemia; el incremento de la conversión de aa en dióxido de carbono y agua, conduce al aumento de creatinina en suero (CS), nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la aparición de proteinuria (Barret, 2010). En estados patológicos la elevación de la creatinina y BUN son un indicador de la función renal (Kelley, 1992), por tanto estos parámetros se encontrarán elevados en etapas avanzadas de DM donde ya está presente la insuficiencia renal.

2.6 Efectos fisiológicos de la insulina

La insulina es sintetizada como una prohormona que posteriormente es transportada en microvesículas al aparato de Golgi, en donde sufre las modificaciones postraduccionales que generan la forma activa de la hormona, la cual es almacenada en gránulos secretores que son liberados por exocitosis.

La principal condicionante para la liberación de insulina es la concentración de GLU en sangre, y la de otros nutrientes como los AGL y aa. Cuando la disminución de nutrientes circulantes es detectada por la células β , se detiene la secreción de insulina para evitar la hipoglucemia.

La insulina estimula la internalización de GLU a las células al incrementar el número de transportadores de dicho carbohidrato en la membrana celular. Los transportadores de glucosa (GLUT) se encargan de la difusión facilitada del carbohidrato a través de la membrana. Al cesar la acción insulínica, hay endocitosis de las zonas de la membrana con los transportadores y las vesículas están listas para la siguiente exposición a la insulina.

En los tejidos donde la insulina incrementa el número de GLUT, otras hormonas regulan el grado de fosforilación de la GLU dentro de las células. La insulina también intensifica la penetración del carbohidrato en los hepatocitos,

pero esto no sucede a través de los GLUT, pues induce la acción de la glucocinasa lo que incrementa la fosforilación de la GLU; de este modo disminuye el nivel de GLU libre en el citoplasma y ello facilita la penetración de la misma a la célula (Barret, 2010).

2.7 Diabetes mellitus y estrés oxidativo

Existen múltiples fuentes de especies reactivas (ER) y de estrés oxidativo (EO) en la DM que incluyen vías enzimáticas y no enzimáticas, donde la hiperglicemia juega un papel clave. Las fuentes no enzimáticas de EO pueden ser 1) la oxidación bioquímica de la GLU (hay un incremento en las ERO a través de la autooxidación de la GLU), 2) la formación de productos finales de la glicosilación avanzada (PFGA), donde la GLU puede reaccionar con proteínas de manera no enzimática dando lugar al desarrollo de productos de Amadori seguidos de la formación de PFGA (Ahmad, 2007), o 3) el incremento del metabolismo de la glucosa a través de la vía del poliol (sorbitol) y 4) la cadena respiratoria mitocondrial (Johansen, 2005). Las fuentes no enzimáticas en el incremento de EROS incluyen a la sintasa de óxido nítrico (SON), NAD(P)H oxidasa, y xantina oxidasa.

El EO juega un papel importante en el desarrollo de las complicaciones diabéticas tardías, induce disfunciones vasculares dependiendo del tamaño de la vasculatura afectada, en los vasos pequeños es un factor importante para la estimulación de la proliferación del endotelio y la formación de nuevos vasos parcialmente mal funcionales y contribuir así al desarrollo de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía). En la vasculatura coronaria, la generación de intermediarios reactivos del oxígeno es más importante para la desestabilización de las placas ateroscleróticas, causando un aumento del riesgo cardíaco en los pacientes diabéticos. (Parcker, 2000; Ceriello, 2003).

2.8 Modelos experimentales de DM2

El estudio de la DM requiere del diseño de modelos adecuados que asemejen la patogénesis de la enfermedad. En el caso de la población mexicana se incluyen factores como el estilo de vida y una dieta alta en grasas y carbohidratos.

Dentro de los modelos para inducir DM en roedores se encuentran los que emplean agentes químicos, siendo los más utilizados en investigación el aloxano y la estreptozotocina (STZ) (Mendez, 2010). Estos compuestos en dosis diabetogénicas actúan específicamente sobre las células β pancreáticas. En el caso de la DM2 una dieta alta en grasas ocasiona RI y obesidad en ratas, las cuales se han asociado a modelos de daño renal.

2.9 Propiedades farmacológicas del ajo

El ajo (*Allium sativum*) es un miembro de la familia Alliaceae, ha sido utilizado desde hace siglos como condimento y remedio popular para una variedad de padecimientos, entre los que se incluyen dolores de cabeza, parásitos intestinales, mordeduras de perro o picaduras de serpiente (Block, 1985).

Actualmente se han reconocido varias funciones biológicas y medicinales del ajo que se atribuyen a su alto contenido de compuestos órgano-sulfurados los cuales varían dependiendo de la presentación del ajo, dichos compuestos le proporcionan también su olor y sabor característicos (Corzo-Martinez, 2007). Los principales componentes azufrados en el ajo son las S-alquil-L-cisteína sulfóxidos, como la aliína y la γ -glutamilcisteínas; las cuales además de servir como péptidos de almacenamiento, son precursores de otros compuestos volátiles como la alicina, el sulfuro de dialilo (DAS) y el dialil disulfuro (DADS), entre otros (Lancaster, 1989). La eficacia de los constituyentes del ajo depende principalmente del modo de preparación de su extracto. El ajo intacto contiene una cantidad reducida de compuestos

medicinales activos, al triturar o cortar los dientes de ajo, se libera la enzima alinasa, que rápidamente lisa a los cistein-sulfoxidos citosólicos: aliína y γ -glutamilcisteinas, para formar alicina, el compuesto que produce el olor a ajo fresco. La alicina representa el 70-80% de los tiosulfinatos totales formados. La alicina y otros tiosulfinatos se descomponen instantáneamente en DAS, DADS, dialil trisulfuro (DAT) y ajoeno. Al mismo tiempo, las γ -glutamilcisteinas son convertidas a S-alilcisteína (SAC) por medio de una vía metabólica distinta a la vía aliína/alicina (Figura 3). La SAC, es un compuesto sulfurado no volátil soluble en agua, posee propiedades antioxidantes, por lo cual actúa como agente neutralizante de radicales libres (RL) o ERO (Corzo-Martínez, 2007).

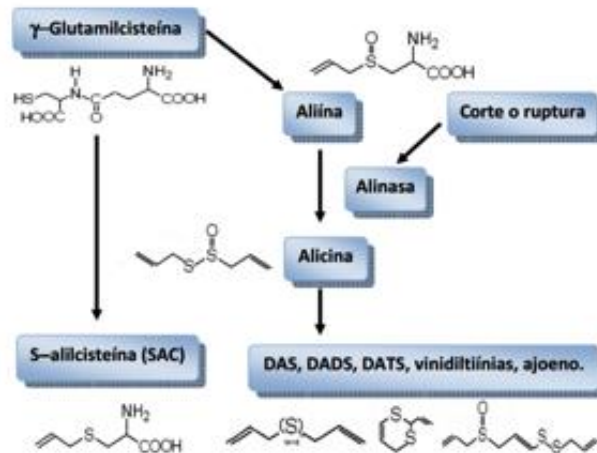


Figura 3. Formación de compuestos organo-sulfurados en el ajo a través de distintas vías metabólicas (Modificado de Corzo-Martínez M, 2007).

2.9.1 El ajo como suplemento dietario

Además de la presentación del ajo fresco, en el mercado internacional están disponibles otras presentaciones como: aceite de ajo esencial, el aceite de ajo macerado, el ajo en polvo y el EAE. Si se desea incluir un suplemento dietario basado en ajo, es importante considerar el proceso de manufacturación, pues debido a la cantidad de compuestos con actividad biológica presentes, se

pueden desarrollar efectos adversos o tóxicos. De acuerdo a varios estudios, el EAE es más eficaz y seguro en comparación con otras preparaciones, por ello sus efectos benéficos sobre la salud son los más estudiados (Corzo-Martínez, 2007).

2.9.2 Actividad farmacológica del EAE

El EAE se obtiene mediante el almacenamiento a temperatura ambiente de ajo rebanado y empapado en una mezcla agua/etanol durante más de 10 meses (Amagase, 2006). El EAE es la preparación con mayor actividad antioxidante, debido a que el procedimiento de extracción incrementa el contenido de compuestos organosulfurados solubles en agua, estables y altamente biodisponibles (Imai, 1994). El SAC es de los principales compuestos activos del EAE, sin embargo, esta preparación también contiene DAS, DATS, DADS, dialilpolisulfuro, flavonoides, saponinas, micronutrientes esenciales (selenio) y macronutrientes (lectinas) cuyo efecto antiperoxidante se ha demostrado en el hígado, los riñones y el corazón de rata (Amagase, 2001; Borek, 2001). Otros compuestos antioxidantes recientemente identificados en el EAE incluyen al N-fructosil glutamato, N-fructosil arginina (Ryu, 2001) y lisina N-fructosil (Moreno, 2006).

Los fitoquímicos presentes en el EAE pueden actuar de manera sinérgica, para ejercen su acción antioxidante y eliminar las EROS (Borek, 2001), incrementar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa; mecanismos de defensa importantes en las células vivas (Liu, 1992).

La acción antioxidante del EAE inhibe la peroxidación de los lípidos y la oxidación de las LDL lo que disminuye el riesgo de enfermedad cardiovascular y

cerebrovascular (Amagase, 2001; Lau, 2006). También ejerce un efecto antiinflamatorio inhibiendo la activación inducida por el estrés oxidativo, del factor nuclear kappa B (NF- κ B), que está implicado en la expresión de enzimas pro-inflamatorias, como la sintetasa de óxido nítrico inducible (SONi) y la ciclooxigenasa-II (COX-II). Además, se ha documentado que tiene efectos anticancerígenos, ya que inhibe el daño de los RL que generan mutaciones en el DNA (Corzo-Martínez, 2007).

3. Antecedentes

La hiperglicemia, principal fenotipo de la DM, genera un incremento en la glicosilación de proteínas y la formación de PFGA, los cuales están involucrados en el proceso de envejecimiento y patogénesis de la DM. La glicosilación y los AGEPs están acompañados de la formación de RL generados por la auto-oxidación de la GLU y de las proteínas glicosiladas, estos radicales dañan a las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Elosta, 2012). Dado lo anterior, los compuestos que combinan la acción antioxidante y la inhibición de la glicosilación, constituyen un auxiliar terapéutico en el manejo de la DM (Ahmad, 2006; Ahmad, 2007); y aunque varios compuestos están bajo estudio, pocos han sido implementados en la clínica con éxito (Elosta, 2012).

El EAE posee mayor capacidad antioxidante, en comparación con otras presentaciones, debido a su alto contenido en SAC. Se ha reportado que el EAE es capaz de proteger a las proteínas de la fragmentación inducida por la glicosilación e interfiere con la formación de AGEPs (Ahmad, 2007). Así mismo, se ha descrito que el EAE posee propiedades hipoglucemiantes (Ashraf, 2011), aunque se requiere de mayor evidencia para establecer esta condición, tales observaciones son respaldadas por la evidencia el grupo de Srinivasank (2005) quien ha descrito que la SAC es capaz de estimular la producción y secreción de insulina en el páncreas, lo que mejora el control del metabolismo de la glucosa.

Aunado a las propiedades hipoglucemiantes del EAE, se ha documentado que es capaz de reducir los niveles del COL (Chang, 1980), TGL, LDL y VLDL; además eleva la concentración de HDL (Effendy, 1997; Ashraf, 2011), parámetros que se encuentran alterados en el curso de la DM.

Trabajos desarrollados en nuestro laboratorio han demostrado que el EAE es capaz de proteger a ratas macho, con insuficiencia renal inducida por ciclofosfamida. Por lo anterior en el presente proyecto se busca evaluar el efecto del EAE en los parámetros bioquímicos alterados en un modelo de DM2.

4. Justificación

La DM2 es la variante predominante entre la población mexicana, los costos para la salud pública ascienden a más de 778 millones de pesos. Existen evidencias de que elementos incluidos en la dieta tradicional de nuestra población, como el ajo, ayudan a regular condiciones clínicas asociadas a la DM2 como: la hipertensión, la hiperglucemia y la producción de especies reactivas.

Un modelo asociado a dieta hipercalórica es el más cercano a la mayoría de los casos en nuestro país, es decir DM2 asociada a obesidad. Los medios de comunicación, la educación y el sistema de salud de nuestro país no han sido suficientes para controlar este problema de salud y el número de pacientes va en aumento cada año.

En este trabajo se evaluó el efecto del EAE, en un modelo de DM2 producido por una dieta hipercalórica y STZ, características que asemejan a la dieta de la población mexicana.

5. Hipótesis

El EAE regula los parámetros bioquímicos como CS, depuración de creatinina (DC), BUN, GLUC, COL, TRI, y proteinuria que se encuentran alterados en la DM2.

6. Objetivo general

Evaluar el efecto del EAE sobre los parámetros bioquímicos alterados en la DM en un modelo experimental de DM2 producido por estreptozotocina y una dieta hipercalórica.

6.1 Objetivos particulares

1. Establecer un modelo de DM2 por la ingesta hipercalórica que se simule la enfermedad desarrollada en la población mexicana.
2. Evaluar el efecto del EAE sobre los parámetros bioquímicos: CS, DC, BUN, GLUC, COL, TGL y proteinuria que se encuentran alterados en DM2.

7. Materiales y Métodos

7.1 Reactivos

Para la determinación de los parámetros bioquímicos: GLU, BUN, CS, COL y TGL se emplearon kits comerciales de la marca SPINREACT. La STZ se obtuvo de la marca comercial SIGMA, y el EAE de la marca KYOLIC®, de WAKUNAGA OF AMERICA.

7.2 Modelo de diabetes mellitus tipo 2 inducido por estreptozotocina y una dieta hipercalórica

7.2.1 Preparación del EAE y STZ

La solución de STZ se preparó al momento de ser administrada. Se pesó la cantidad necesaria para una dosis de 60 mg/Kg (tomando en cuenta el peso de

los sujetos experimentales en ese momento) y se disolvió en buffer de citratos pH 4.

El EAE se administró a una dosis de 0.6 mL /Kg de peso, y en su caso se empleo agua potable en los grupos control. La administración se realizó empleando una sonda esofágica.

7.2.2 Sujetos experimentales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 250 a 300 g, obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Las ratas se mantuvieron en el bioterio del departamento de farmacología a 22°C con ciclos controlados de luz-oscuridad de 12/12 horas, dentro de cajas de contención de polipropileno y cama de aserrín, para recolectar muestras de orina de 24 horas las ratas se mantuvieron en cajas metabólicas individuales (NALGEN COMPANY).

El protocolo experimental se desarrollo de acuerdo a los lineamientos éticos para el uso experimental de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

7.3 Dieta

El alimento empleado en el protocolo experimental fue de dos tipos: estándar (Rodent Laboratory Chow de Purina) e hipercalórico, alto en grasas al 15%. El alimento hipercalórico fue preparado en el laboratorio mezclando alimento estándar con manteca de cerdo (JC FORTES). El agua proporcionada fue de tipo potable para los grupos control o suplementada con azúcar de mesa (Great Value) al 15%, de acuerdo al grupo experimental. En todos los casos se proporcionó alimento y agua *ad libitum*.

7.4 Establecimiento de la dosis de STZ

En una primera etapa del proyecto, se probaron tres dosis de STZ a fin de establecer la óptima para causar un incremento notorio de GLU en sangre.

Se probaron tres dosis de STZ en animales con dieta suplementada con grasa y azúcar, la cual se proporcionó desde el inicio del protocolo y 15 días después se administró la STZ (Tabla 1). A partir de la administración de STS se determinó la concentración de GLU en sangre cada 7 días (Figura 3). Las ratas se sacrificaron por decapitación al término del protocolo.

Tabla 1. Protocolo desarrollado para establecer un modelo de DM2 inducido por STZ y una dieta hipercalórica en ratas macho Wistar. CT: grupo control, STZ: estreptozotocina

Protocolo	Duración	Grupos (dieta)			Dosis STZ (mg/Kg)
		CT	15% grasa-azúcar	15% grasa-azúcar-STZ	
1	23 días	CT	15% grasa-azúcar	15% grasa-azúcar-STZ	75
2	51 días	CT	15% grasa-azúcar	15% grasa-azúcar-STZ	50
3	29 días	CT	15% grasa-azúcar	15% grasa-azúcar-STZ	30

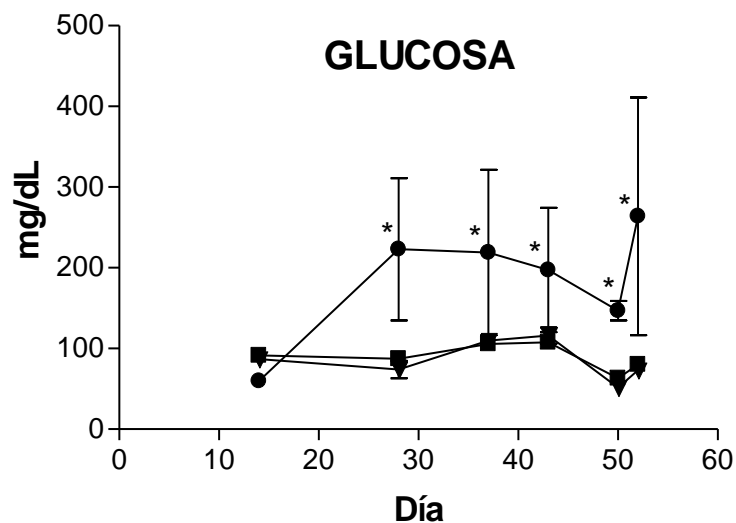


Figura 3. Protocolo 2 CT (■) 15% Grasa-azúcar (▲) 15% Grasa-azúcar+STZ (●).

n= 10, prom±EEM, ANOVA 2 vías P<0.0001

Durante esta fase se observó que la dosis de STZ de 75 mg/Kg genera una alta mortalidad mientras que la disminución de la dosis de STZ a 30 mg/Kg, no establece un cuadro de hiperglucemia lo suficientemente alto ni duradero como la dosis más altas. Basados en estas observaciones, decidimos utilizar una dosis de 60 mg/Kg calculada por extrapolación.

7. 5 Evaluación del efecto del EAE

Una vez establecidas las condiciones para el desarrollo del modelo experimental de DM2, un segundo protocolo de nueve semanas de duración se realizó para evaluar el efecto del EAE. Para lo anterior se formaron 17 grupos experimentales (Tabla 2) y se combinó el uso del EAE, la STZ y la dieta hipercalórica con grasa y azúcar (GA). El esquema incluyó diferentes periodos de tratamiento y se consideró como semana cero a la semana en que se inició la administración de STZ. Así mismo se evaluó la administración del EAE comenzando su uso 3 semanas previas a la administración de STZ (-3), 2 semanas previas a a la administración de STZ (-2), a la semana cero de administración de STZ (0) y 2 semanas posteriores a la administración de STZ (+2). La simbología de cada grupo y el tratamiento se encuentran representados en la Tabla 2.

Los sujetos experimentales se colocaron en cajas metabólicas cada semana a fin de obtener la orina de 24 horas y al siguiente día se obtuvo sangre de la vena caudal mediante punción. Al final del protocolo se recolectaron muestras de sangre y de orina de 24 horas y se sacrificó a los sujetos experimentales por decapitación.

Tabla 2. Grupos experimentales para evaluar el efecto del EAE en un modelos de DM2 inducido po STZ y una dieta hipercalórica.

Grupo	Alimento Estándar	Alimento 15% GA	EAE 0.6 mL/G	STZ 60 mg/Kg	Sémana de inicio de tratamiento	Símbolo
Control	+	-	-	-	0	
GA+ STZ	-	+	-	+	0	
-3EAE+GA+STZ	-	+	+	+	-3	
-2EAE+GA+STZ	-	+	+	+	-2	
0EAE+GA+STZ	-	+	+	+	0	
2EAE+GA+STZ	-	+	+	+	2	
GA	-	+	-	-	0	
STZ	+	-	-	+	0	
EAE	+	-	+	-	0	
-3EAE+GA	-	+	+	-	-3	
-2EAE+GA	-	+	+	-	-2	
0EAE+GA	-	+	+	-	0	
2EAE+GA	-	+	+	-	2	
-3EAE+STZ	+	-	+	+	-3	
-2EAE+STZ	+	-	+	+	-2	
0EAE+STZ	+	-	+	+	0	
2EAE+STZ	+	-	+	+	2	

7.6 Procesamiento de las muestras biológicas

Las muestras de orina se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min en una centrifuga Hettich Zentrifugen EBA 20. Posteriormente, se conservaron en refrigeración a -20° C.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena caudal, recolectadas semanalmente en tubos Microtainer con gel separador (Becton Dickinson and Company) y centrifugadas a 6000 rpm durante 4 min, a fin de obtener plasma, para determinar GLU, COL, TGL, BUN, y CS, usando kits de diagnóstico clínico comerciales (Spinreact, S.A.U., España). El plasma remanente fue conservado en congelación a -20°C .

7.7 Determinación de parámetros bioquímicos

7.7.1 Creatinina en suero

La determinación de CS en las muestras de suero se realizó por espectrofotometría de acuerdo a la reacción descrita por Jaffe. La técnica está basada en la formación de un complejo rojizo (2,4,6-trinitrofenol) entre la creatinina y el picrato en un medio alcalino, dicho complejo absorbe a 520 nm. La absorbancia del color formado es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra analizada.

La técnica espectrofotométrica fue visible, cinética. Se empleó un espectrofotómetro BECKMAN COULTER, el cual se ajustó a cero empleando agua destilada, posteriormente se pipeteó 40 μL de muestra (suero o estándar de creatinina) en una celda y 400 μL del reactivo de trabajo, (ácido pícrico 17.5 mM e hidróxido de sodio 0.29 mM, 1:1), se mezcló y realizaron lecturas a los 0, 30, 60 y 90 segundos. La concentración de creatinina en la muestra se determinó calculando el cociente de las diferencias de absorbancia a los 30 y 90 segundos de la muestra entre el estándar, y multiplicado por la concentración del mismo (2 mg/dL).

7.7.2 Depuración de creatinina

Para el cálculo de DC se utilizó el volumen de orina en un periodo de 24 h y r la concentración de creatinina en esta muestra.

La DC se calculó de la siguiente manera:

$$DC = \frac{\text{Creatinina en orina} * \text{volumen de orina en 24 horas}}{\text{creatinina en suero} * 1440}$$

7.7.3 Nitrógeno de urea en sangre

La determinación cuantitativa de urea se realizo mediante un método cinético enzimático, el cual se basa en que la urea presente en la muestra es hidrolizada enzimáticamente por la ureasa en amoniaco y dióxido de carbono. Los iones amonio formados reaccionan con el alfa cetoglutarato por acción de la glutamato deshidrogenasa (GLDH) con una oxidación simultanea de NADH a NAD+.



La disminución de la concentración de NADH en el medio es proporcional a la concentración de urea en la muestra.

7.7.4 Determinación de glucosa

Para realizar las determinaciones de GLU, COL y TGL se empleó un método trinder de punto final, GOD-POD, CHOD-POD y GPO-POD respectivamente.

El principio del método para determinar GLU se basa en que la glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de GLU a ácido glucónico, el peróxido de hidrógeno producido (H_2O_2) se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, 4-aminofenazona (4-AF), en presencia de la enzima peroxidasa (POD). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de GLU presente en la muestra. Para ello se empleó un espectrofotómetro BECKMAN COULTER, el cual se ajustó a cero empleando agua destilada, posteriormente se pipetearon en una celda 40 μ L de muestra (suero o estándar de glucosa) y 400 μ L del reactivo, (TRIS pH 7.4 y 92mM, fenol 0.3 mM, GOD 15000 U/L, POD 1000 U/L, 4-AF 2.6mM), se mezcló e incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 30 minutos y se leyó a 505 nm. La concentración de GLU en la muestra problema se determinó calculando el cociente de la absorbancia de la muestra entre la absorbancia del estándar, y multiplicado por la concentración del mismo (100 mg/dL).

7.7. 5 Determinación de colesterol

En cuanto a la determinación de COL, los esteroides de COL presentes en la muestra serán esterificados por la colesterol esterasa (CHE) produciendo ácidos grasos mas COL, éste último en presencia de O_2 y gracias a la colesterol oxidasa (CHOD) formará 4-colestenona y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Finalmente, el peróxido de hidrógeno reacciona con la 4-aminofenazona en presencia de fenol, reacción catalizada por la enzima peroxidasa (POD), dando como resultado quinona (quinonimia), compuesto de color rojo, el cual es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra analizada.

En el laboratorio se utilizó agua destilada para ajustar el espectrofotómetro a cero de absorbancia, posteriormente se pipeteó en una celda, 40 µL de muestra (suero o estándar de colesterol) y 400 µL del reactivo, (PIPES pH 6.9 y 90mM, fenol 26 mM, CHE 1000 U/L, CHOD 300 U/L, POD 650 U/L, 4-AF 0.4 mM), se mezcló e incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 minutos y se leyó a 505 nm. La concentración de colesterol en la muestra problema se determinó calculando el cociente de la absorbancia de la muestra de suero entre la absorbancia del estándar, y multiplicado por la concentración del mismo (200 mg/dL).

7.7.6 Determinación de triglicéridos

Por su parte, la determinación de TGL se basa en el principio de que los TGL incubados con lipoproteinlipasa (LPL) generan glicerol y AGL. El glicerol es fosforilado por la glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol cinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrogeno reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD), produciendo quinona, y una coloración rojiza. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra analizada.

En el caso de la determinación de TGL, al igual que en el caso de la determinación de GLU y COL, se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia con agua destilada, posteriormente se pipetearon en una celda, 40 µL de muestra (suero o estándar de triglicéridos) y 400 µL del reactivo, (GOOD pH 6.3 y 90mM, p-clorofenol 2 mM, LPL 150000 U/L, GK 500 U/L, GPO 3500 U/L, POD 440 U/L, 4-AF 0.1 mM, ATP 0.1 mM), se mezcló e incubó a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 min y se leyó a 505 nm. La concentración de triglicéridos en la muestra problema se determinó calculando

el cociente de la absorbancia de la muestra de suero entre la absorbancia del estándar y multiplicado por la concentración del mismo (200 mg/dL).

7.7. 7 Cuantificación de proteínas en orina

El método utilizado está basado en la precipitación de proteínas totales en orina con ácido tricloroacético (TCA) y la medición de su turbidez a 420 nm (Pedraza , 1999). Las muestras de orina se diluyeron 1:5 con solución salina isotónica hasta un volumen final de 2 mL, después se separaron en 2 alícuotas de 1 mL, a una de ellas se le agregó 250 μ L de TCA al 12.5% y a la otra 250 μ L de solución salina, empleada como blanco de cada muestra. Los tubos se dejaron incubando a temperatura ambiente por 10 min. Los datos obtenidos se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB) en un intervalo de 0.04 a 0.8 mg/mL. Se calcularon los mg de proteína/24h. Los resultados se expresaron normalizados, donde 1 = al promedio de los valores del grupo control.

8. Resultados y discusión

Las ratas tratadas con STZ a una dosis de 60 mg/kg presentaron hiperglucemia estable por 2 semanas; en los individuos que recibieron dosis menores no se estableció la hiperglucemia o ésta se perdía; mientras que a dosis mayores se presenta hiperglucemia pero con alta mortalidad.

En un protocolo posterior se evaluó el efecto del EAE con diferentes esquemas de administración en las ratas tratadas con dietas hipercalórica (GA) y con STZ.

En la figura 4 se observa el comportamiento de la cantidad de alimento consumido y el peso corporal de las ratas. Los animales ingirieron alrededor de 25 g por día al inicio del estudio, el consumo fue aumentando ligeramente a través de los días y algunos grupos llegan hasta un máximo de 50 g por día. Este comportamiento va aunado al aumento de peso corporal en los animales control. Todos los grupos estudiados tienen la misma tendencia hasta la semana 0. Posteriormente, en la semana 0 y hasta la semana 5 el consumo de alimento es menor en los grupos GA, EAE y GA+EAE. Sin embargo, en estos grupos el peso corporal siguió aumentando a través de los días. El grupo CT y el grupo GA+STZ no tienen diferencia en su comportamiento. Por otro lado, los animales con tratamiento de STZ, -3, -2, 0 y 2STZ+EAE, aumentaron su consumo de alimento y disminuyó su peso corporal a través de los días. Este comportamiento es una característica de los pacientes con DM2, los cuales aumentan el consumo de alimento (polifagia), sin embargo no es utilizado eficientemente y no hay aumento de peso en la misma medida. El tratamiento con EAE en ratas con dieta GA y STZ (-3, -2, 0 y 2EAE+GA+STZ) promueve una ingesta normal de alimento, sin embargo no aumentan de peso al igual en el grupo control.

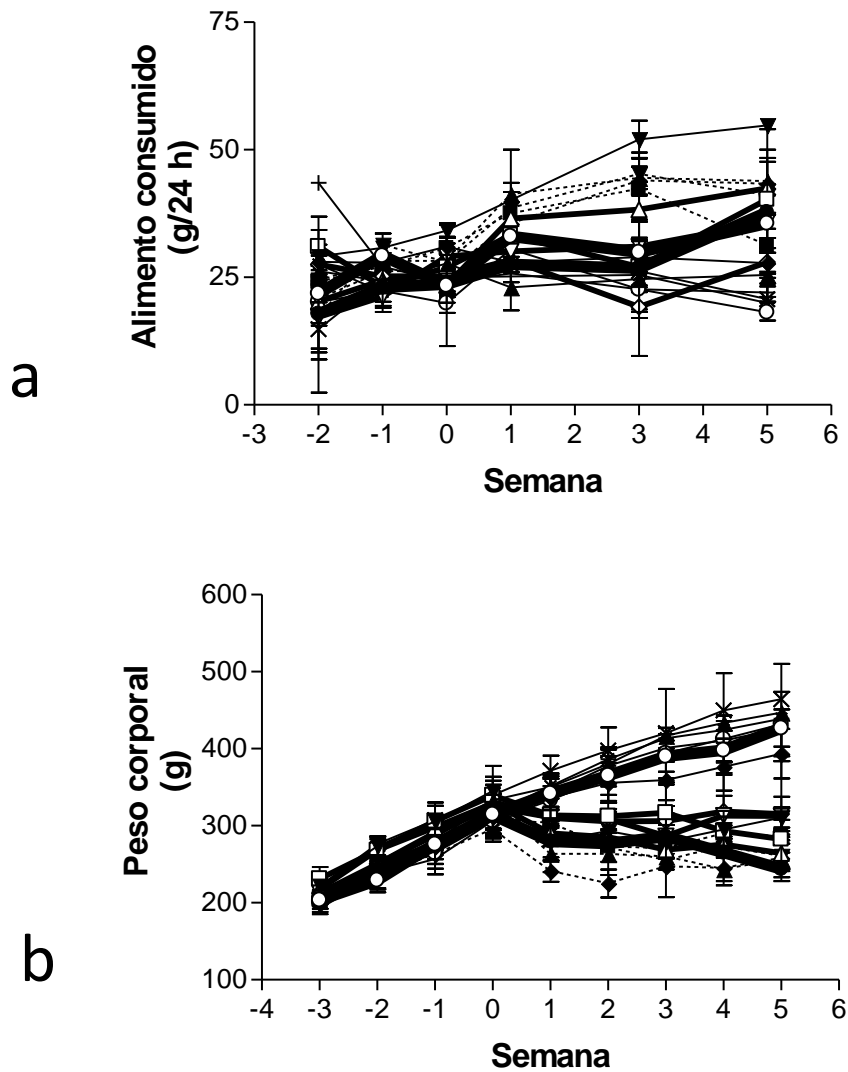


Figura 4. Alimento consumido (a) y peso corporal (b) de ratas tratadas con streptozotocina (STZ) y dieta alta en grasa y azúcar (GA). Líneas gruesas (■): control (○) y GA+STZ (●); líneas de grosor medio (—): -3EAE+GA+STZ (□), -2EAE+GA+STZ (△), 0EAE+GA+STZ (▽) y 2EAE+GA+STZ (◇); líneas delgadas (—): GA (▲), STZ (▼), EAE (◆), -3EAE+GA (○), -2EAE+GA (X), 0EAE+GA (+) y 2EAE+GA (*); líneas punteadas (.....): -3EAE+STZ (◆), -2EAE+STZ (▼), 0EAE+STZ (▲) y 2EAE+STZ (■). n= 3-12, prom±EEM, ANOVA 2 vías P<0.0001.

En la figura 5 observamos los volúmenes de agua ingerida y de orina. Los animales del grupo control tomaron alrededor de 50 mL y orinaron 12 mL. A partir de la administración de la STZ, los animales de los grupos GA+STZ, EAE+STZ aumentaron el volumen de agua ingerida y el de orina. El grupo con sólo STZ aumento estos parámetros a partir del día 3. Este comportamiento

también es observado en los pacientes con DM2 (polidipsia y poliuria). La administración de EAE en el modelo de GA+STZ no cambia el comportamiento de estos parámetros.

La figura 6 muestra los niveles de GLU, COL y TGL sanguíneos. Los animales del grupo control presentaron niveles normales (100 mg/dl) en los tres parámetros a lo largo del estudio. La dieta con solo GA no modifica ninguno de estos parámetros; la administración de sólo STZ, aumenta la GLU y ligeramente los TGL. Los animales con dieta GA y tratados con STZ, presentan aumento de GLU, COL y TGL; estos aumentos se observan luego de 24 h de la administración de la STZ y se mantienen durante todo el estudio. Dichos parámetros clínicos son característicos de pacientes con DM2 (Pollak 2007; Tesone 2007; Vergès 2005). El tratamiento con EAE 3 semanas antes de la administración de STZ (-3EAE+GA+STZ) previene: a) el aumento de GLU en los días 1 y 2 en un 30%, y en los días 4 y 5 en un 80%; b) el aumento del COL en el día 2 en un 100% y en el día 5 en un 50%; y c) el aumento de TGL en el día 4 en un 90% y en el día 5 en un 100%. El tratamiento con EAE administrado al mismo tiempo que la STZ, previene: a) el aumento de GLU en los días 1 y 2 en un 30%; b) el aumento del COL en el día 4 en un 80% y en el día 5 en un 100%; y c) el aumento de TGL en el día 5 en un 50%.

Los parámetros anteriores nos indican que el modelo que se realizó tiene las características deseables para el estudio de la DM2 en roedores.

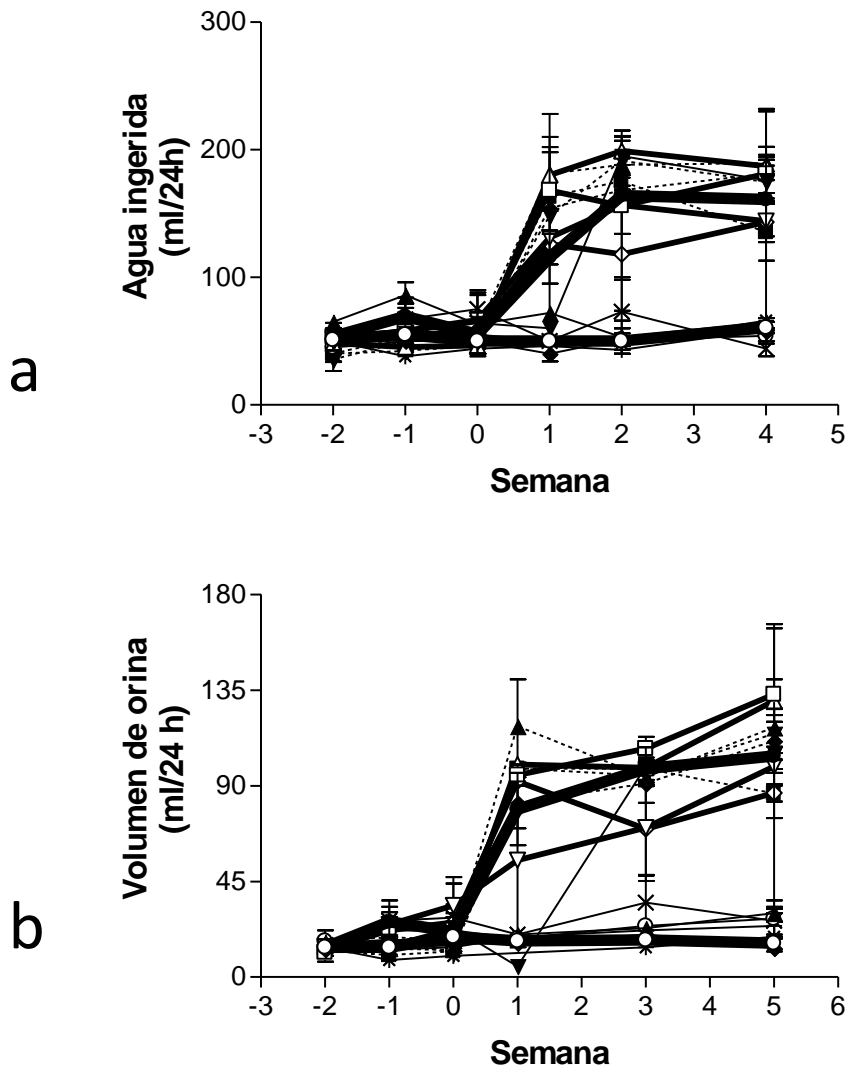


Figura 5. Efecto de extracto de ajo envejecido (EAE) en el agua ingerida (a) y el volumen de orina (b) de ratas tratadas con streptozotocina (STZ) y dieta alta en grasa y azúcar (GA). Líneas gruesas (■): control (○) y GA+STZ (●); líneas de grosor medio (—): -3EAE+GA+STZ (□), -2EAE+GA+STZ (Δ), 0EAE+GA+STZ (∇) y 2EAE+GA+STZ (◇); líneas delgadas (—): GA (▲), STZ (▼), EAE (◆), -3EAE+GA (○), -2EAE+GA (X), 0EAE+GA (+) y 2EAE+GA (*); líneas punteadas (.....): -3EAE+STZ (◆), -2EAE+STZ (▼), 0EAE+STZ (▲) y 2EAE+STZ (■). n= 3-12, prom±EEM, ANOVA 2 vías P<0.0001.

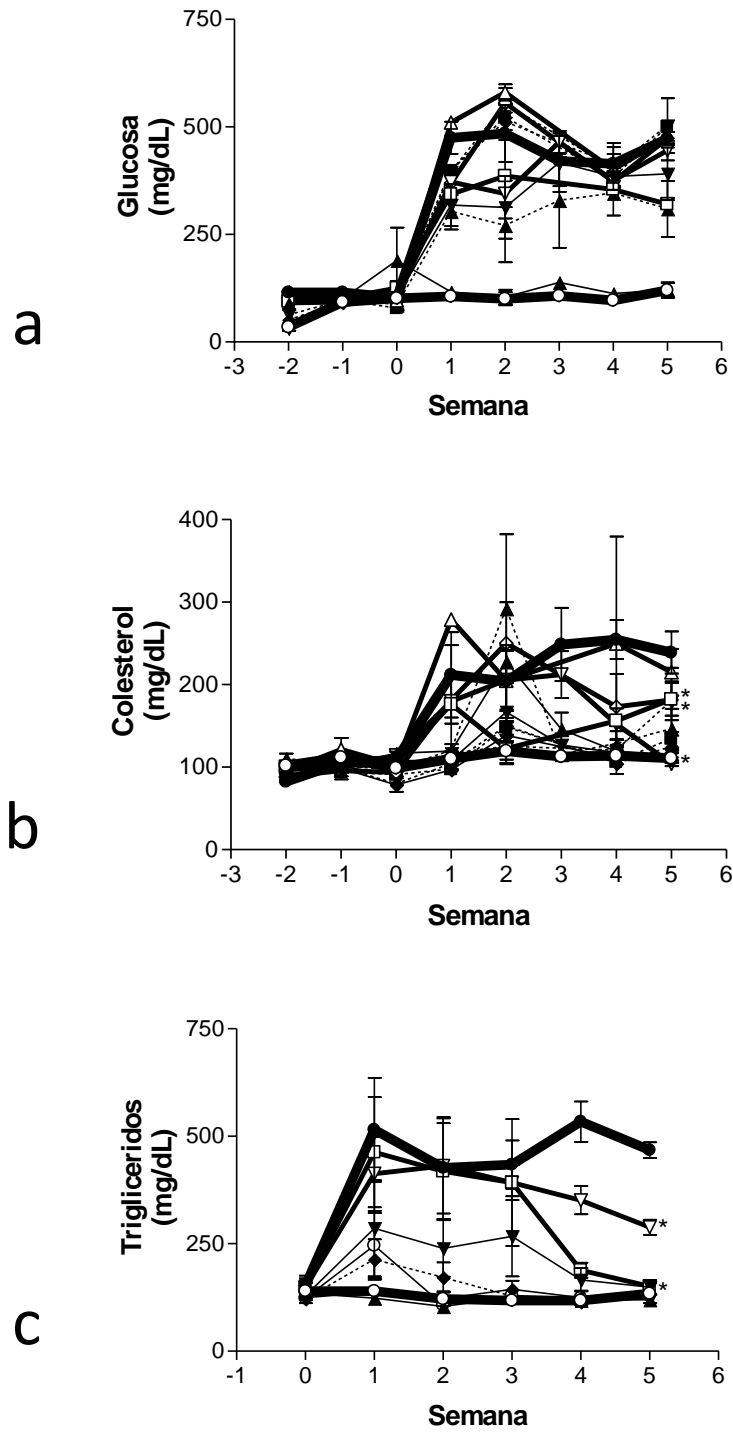


Figura 6. Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) en la glucosa (a), el colesterol (b) y los triglicéridos (c) en sangre de ratas tratadas con streptozotocina (STZ) y dieta alta en grasa y azúcar (GA). Líneas gruesas (■): control (○) y GA+STZ (●); líneas de grosor medio (—): -3EAE+GA+STZ (□), -2EAE+GA+STZ (Δ), 0EAE+GA+STZ (▽) y 2EAE+GA+STZ (◇); líneas delgadas(—): GA (▲), STZ (▼), EAE (◆), -3EAE+GA (○), -2EAE+GA (X), 0EAE+GA (+) y 2EAE+GA (*); líneas punteadas (.....): -3EAE+STZ (◆), -2EAE+STZ (▼), 0EAE+STZ (▲) y 2EAE+STZ (■). n= 3-12, prom±EEM, ANOVA 2 vías P<0.0001, *P<0.0001 vs GA+STZ.

Adicionalmente se determinaron parámetros para evaluar la función renal (Figuras 7 y 8). Los animales del grupo control presentaron niveles normales de CS (0.5 mg/dl), DC (2 ml/24h) y BUN (20 mg/dl). Encontramos que en el grupo GA+STZ, la CS aumenta con un máximo de 3 veces respecto al control en la semana 3, posteriormente vuelve a disminuir casi hasta ser normal en la semana 5. La administración del EAE evita este aumento, EAE administrado 3 semanas antes de la STZ solo permite el aumento de casi al doble en las semanas 2 y 5. EAE administrado 2 semanas antes o al mismo tiempo que la STZ solo permiten un aumento al doble de la CS; y EAE administrado 2 semanas después induce la disminución de la creatinina. La STZ por sí sola no produce aumento de la creatinina en suero.

La depuración de creatina en el grupo GA+STZ disminuye y se mantiene baja a partir de la semana 3. El grupo administrado con sólo STZ no presenta disminución de la DC. Todos los tratamientos con EAE evitan la disminución de la DC partir de la semana 2 hasta llegar a ser normal en la semana 4 o 5 (2EAE+GA+STZ).

Los niveles de BUN presentan una tendencia a aumentar en todos grupos administrados con STZ, sin embargo no hay diferencia estadística. Por tanto la disminución de los niveles de BUN que se observan al administrar EAE tampoco presentan diferencia estadística.

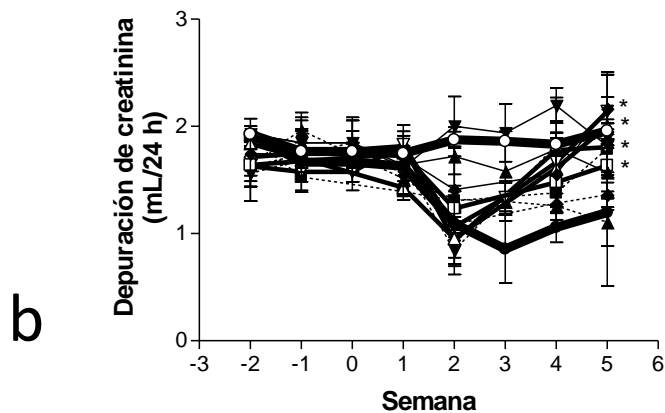
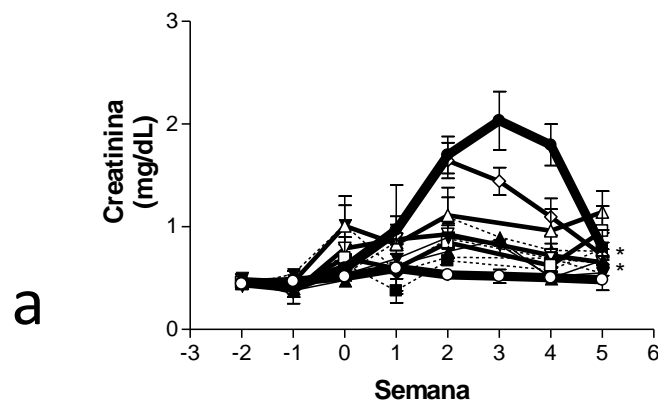
También se evaluó la cantidad de proteína presente en la orina. Se obtuvo mayor dispersión de los valores medidos, pero no presentan ninguna tendencia o diferencia entre los grupos a través de los días.

Existen muchos trabajos sobre modelos de diabetes, los cuales tienen variantes en dosificación y en especie animal (Rodríguez 1994; Mendez, 2010). A pesar de que se ha especulado que el mejor modelo es el cuyo; los costos de obtención, mantenimiento y administración de STZ disminuyen el empleo de este animal. La rata es un roedor muy utilizado como modelo debido a que su

manejo, mantenimiento y cantidad de muestra obtenida es adecuada para diversos estudios.

El uso del EAE en nuestro modelo de DM2, asociado a dieta hipercalórica, permite pensar que es posible que pacientes que lo consuman puedan tener un mejor control o un retraso en la aparición del daño renal en el curso de su enfermedad.

La dieta hipercalórica no modifica en gran medida la hiperglucemia, sin embargo si aumenta el COL, los TGL y el daño renal (CS y DC) (American Diabetes Association, 2012).



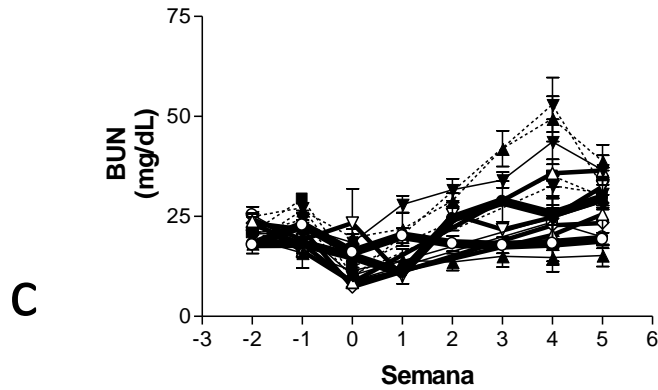


Figura 7. Efecto de extracto de ajo envejecido (EAE) en la creatinina en suero (a), la depuración de creatinina (b) y el BUN (c) de ratas tratadas con streptozotocina (STZ) y dieta alta en grasa y azúcar (GA). Líneas gruesas (■): control (○) y GA+STZ (●); líneas de grosor medio (▬): -3EAE+GA+STZ (□), -2EAE+GA+STZ (Δ), 0EAE+GA+STZ (∇) y 2EAE+GA+STZ (◇); líneas delgadas (—): GA (▲), STZ (▼), EAE (◆), -3EAE+GA (○), -2EAE+GA (X), 0EAE+GA (+) y 2EAE+GA (*); líneas punteadas (.....): -3EAE+STZ (◆), -2EAE+STZ (▼), 0EAE+STZ (▲) y 2EAE+STZ (■). n= 3-12, prom±EEM, ANOVA 2 vías $P < 0.0001$, * $P < 0.0001$ vs GA+STZ.

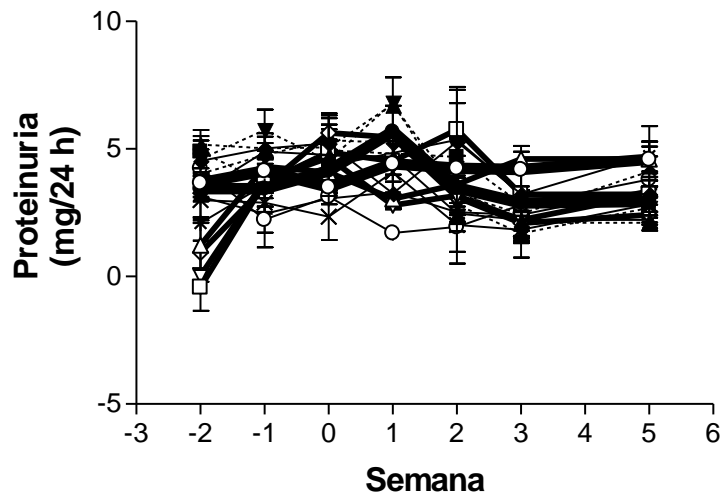


Figura 8. Efecto del extracto de ajo envejecido (EAE) en la proteinuria de ratas tratadas con streptozotocina (STZ) y dieta alta en grasa y azúcar (GA). Líneas gruesas (■): control (○) y GA+STZ (●); líneas de grosor medio (▬): -3EAE+GA+STZ (□), -2EAE+GA+STZ (Δ), 0EAE+GA+STZ (∇) y 2EAE+GA+STZ (◇); líneas delgadas (—): GA (▲), STZ (▼), EAE (◆), -3EAE+GA (○), -2EAE+GA (X), 0EAE+GA (+) y 2EAE+GA (*); líneas punteadas (.....): -3EAE+STZ (◆), -2EAE+STZ (▼), 0EAE+STZ (▲) y 2EAE+STZ (■). n= 3-12, prom±EEM.

9. Conclusiones

- Obtuvimos un modelo de DM2 en ratas, asociado a dieta hipercalórica. Los animales presentan poliuria, polidipsia, polifagia, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hiperlipidemia y daño renal.
- El EAE es capaz de controlar parcialmente la polifagia, la hipercolesterolemia, la hiperlipidemia y el daño renal.

10. Referencias

- Ahmad MS, A. N. (2006). Antiglycation properties of aged garlic extract: Possible role in prevention of diabetic complications. *The Journal of Nutrition*, 136, 796S-799S.
- Ahmad MS, P. M. (2007). Aged garlic extract and S-allyl cysteine prevent formation of advanced glycation end products. *European Journal of Pharmacology*, 561, 32-38.
- Amagase. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*, 136, 716S-725S.
- Amagase H, P. B. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, 131, 955S-962S.
- American Diabetes Association. (2012). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 35(Supplement 1), S64-S71.
- Arredondo A, D. I. (2011). Costos de la Diabetes en América Latina: Evidencias del Caso Mexicano. *Value in Health*, 14, S85-S88.
- Ashraf R, K. R. (2011). Garlic (*Allium sativum*) supplementation with standard antidiabetic agent provides better diabetic control in type 2 diabetes patients. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 565-570.
- Barret KM, B. S. (2010). *Fisiología Médica*, Gagnon. En B. KM (Ed.). Mc Graw Hill.
- Bilous, R., & Donnelly, R. (2010). *Handbook of Diabetes – 4th ed.* West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Block E. (1985). The chemistry of garlic and onions. *Scientific American*, 252, 114-119.
- Borek C. (2001). Antioxidants and cancer. *Science and Medicine*, 4, 51-62.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *NATURE*, 414.
- Ceriello, A. (2003). New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a "Causal" Antioxidant Therapy. *Diabetes Care*, 26 (5).

- Chang ML, J. M. (1980). Effect of garlic in lipid synthesis in rats. *The Journal of Nutrition*, 110, 931-936.
- Corzo-Martinez M, C. N. (2007). Biological Properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 609-625.
- Effendy JL, S. D. (1997). The effect of aged garlic extract "Kyolic", on the development of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 132, 37-42.
- Elosta A, G. T. (2012). Natural Products as Anti-glycation Agents: Possible Therapeutic Potential for Diabetic Complications. *Current Diabetes Reviews*, 8, 92-108.
- F. Gary Cunningham, K. J. (2010). *Williams Obstetrics, Twenty-Third Edition*. USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Fauci AS, B. E. (2009). *Harrison Principios de Medicina Interna (17a Edición. ed.)*. México, D.F.: McGraw-Hill INTERAMERICANA EDITORES.
- Gardner, D. G., & Shoback, D. (2011). *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology, Ninth Edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Guyton, A. C. (2006). *Tratado de fisiología médica 11a ed*. Madrid: Elsevier.
- Holt RI, C. C. (2010). *Textbook of Diabetes (4th Edition Ed.)*. Singapore: Wiley-Blackwell.
- Holt, R., Cockram, C. S., & Flyvbjerg, A. (2010). *Textbook of diabetes. – 4th ed*. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Imai J, I. N. (1994). Antioxidants and free radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Médica*, 60, 417-420.
- Joost, H.-G., & Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (Review). 18(247- 256).
- KelleyWN. (1992). *Medicina Interna (2a Edición. ed., Vol. 1)*. (K. WN, Ed.) Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Kim E. Barrett, S. M. (2010). *Ganong's Review of Medical Physiology, Twenty-Third Edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc.

- Lancaster JE. (1989). G-Glutayl peptides in the biosynthesis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (flavor precursors) in Allium. *Phytochemistry*, 28, 455-460.
- Lau BHS. (2006). Suppression of LDL oxidation by garlic compounds is a possible mechanism of cardiovascular health benefit. *Journal of Nutrition*, 136, 765S-768S.
- Lawal, M. (2008). Management of diabetes mellitus in clinical practice. Vol 17(No 17).
- Liu JZ, L. X. (1992). The FASEB Journal. Dietary garlic powder increase glutathione content and glutathione-S-transferase activity in rat liver and mammary tissues. 6, A3230-.
- Mantzoros CS, F. J. (1995). Insulin resistance: the clinical spectrum. *Advances in Endocrinology and Metabolism*, 6, 193-232.
- Molina, P. E. (2010). *Endocrine Physiology*, Third Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Moreno FJ, C.-M. M. (2006). Changes in antioxidant activity of dehydrated onion and garlic during storage. *Food Research International*, 39, 891-897.
- Moreno-Altamirano. (2001). Epidemiología y diabetes. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*, 44(1), 35-37.
- Murillo, M. D., Dader, M. J., & Fernández-Llimós, F. (2004). Guía de seguimiento farmacoterapéutico sobre diabetes. Granada, España: Universidad de Granada (UGR).
- O'Brien, W. e. (2010). Evolutionary ancestry and novel functions of the mammalian glucose transporter (GLUT) family *BMC*. 10:152.
- Online Etymology Dictionary. (s.f.). Recuperado el 6 de febrero de 2012, de <http://www.etymonline.com/index.php?term=pancreas>
- PA, T. (2007). Ateroesclerosis y Diabetes. Una revisión . *Asociacion lationoamericana de dabetes*, XV (1).
- Pitocco, D., & Zaccardi, F. (2010). Oxidative Stress, Nitric Oxide, and Diabetes. *Rev Diabet Stud* , 7(15-25).

- Pollak F, A. A. (2007). Dislipidemia y Diabetes Mellitus tipo 2. Asociacion Iationoamericana de dabetes, XV(1).
- R. A. De Fronzo (Editor), E. F. (2004). International Textbook of Diabetes Mellitus, 3rd Edition. John Wiley & Sons Ltd. .
- Rubio Guerra, A. F. (2004). Resistencia a la insulina. Mexico DF: McGraw-Hill Interamericana.
- Ryu K, I. N. (2001). Alpha-(1-deoxy- D-fructos-1-yl)-L-arginine, an antioxidant compound identified in aged garlic extract. The Journal of Nutrition, 131, 972S-976S.
- Schultz, J., & Harris, a. k. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes. Cardiovascular Diabetology, 4:5.
- Singh VK, S. D. (2008). Pharmacological Effects of Garlic (*Allium sativum* L.). ARBS Annual Review of Biomedical Sciences, 10, 6-26.
- Srinivasan K. (2005). Plants food in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. International. Journal of Food Science and Nutrition, 56, 399-414.
- Vergès B. (2005). New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. Diabetes & Metabolism, 31(5), 429-439.
- Wood, S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. 89(3-9).
- World Health Organization. (s.f.). Diabetes Fact Sheet No. 312. (World Health Organization 2011) Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
- Zwart, L. L. (1999). Biomarkers of free radical damage Applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology and Medicine, 26(1/2 pp 202-226).