

7/4/15

87128

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD

AUTÓNOMA
UNIDAD XOCHIMILCO

METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
INVESTIGACIÓN BIOFARMACÉUTICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE *PHYSALIS*
CHENOPODIFOLIA LAM SOBRE LOS NIVELES DE GLUCOSA,
PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y GLUTATION EN SANGRE DE RATAS
NORMALES Y DIABÉTICAS

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS
P R E S E N T A
ADRIANA LÓPEZ ACOSTA

MATRÍCULA 202181032

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR: M. en C. Ma. TERESA RAMÍREZ APAN
ASESOR: M. en C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ
ASESOR: M. en C. TERESA IZQUIERDO SÁNCHEZ

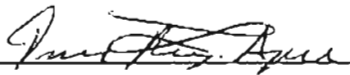
MÉXICO, D.F.

JULIO, 2004

COMITÉ TUTORIAL

VoBo


TUTOR


M. en C. Ma. Teresa Ramirez Apan


ASESOR

ASESOR


M. en C. Emma Maldonado Jimenez

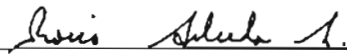

M. en C. Teresa Izquierdo Sanchez

SUSTENTANTE


Q.F.B. Adriana López Acosta

JURADO ASIGNADO SEGÚN EL TEMA


PRESIDENTA



Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Instituto de Fisiología Celular

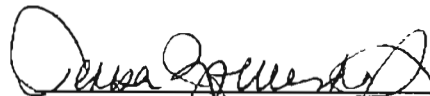
UNAM

VOCAL



Dra. Francisca Pérez Severiano
Instituto de Nacional de Neurología
y Neurocirugía

SECRETARIA



M. en C. Teresa Izquierdo Sánchez
Universidad Autónoma
Metropolitana

COMISIÓN DE LA MAESTRÍA: Dra. Julia Pérez Ramos.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del “Instituto de Química” perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

México, D.F.

A MI PADRE DIOS:

Por darme la oportunidad de vivir, por guiarme y alumbrarme mi camino, *gracias padre eterno.*

A MIS PADRES:

Francisco y Mari Luz, por darme la vida. *Gracias papitos por su infinito apoyo;* por haberme impulsado para alcanzar mis metas enseñándome a vencer las vicisitudes de la vida y a dar lo mejor de mí. Los amo.

A MIS HERMANAS:

Anggy y Dulce, por su apoyo y confianza incondicional, *gracias por compartir las enseñanzas que nos da la vida.* Sus palabras de aliento han sido fundamentales para subir un escalón más en la vida. Se que siempre contare con ustedes. Las quiero mucho.

A DANNY:

Daniel Iván GE, mi novio, amigo, compañero y cómplice, *gracias mi amor* por que siempre estas a mi lado, por tus palabras de aliento que siempre me has sabido dar cuando más lo necesito, gracias por tu paciencia en mis momentos de desesperación, y sobre todo gracias por la confianza que has depositado en mi. Te amo amor.

A MIS SUEGROS:

Guillermo y Rosa, por darme la oportunidad de conocerlos, *gracias por su confianza en mí y por apoyarme siempre,* los quiero mucho.

A MI COMITÉ TUTORIAL:

M. en C. Teresa Ramírez, M. en C. Emma Maldonado y M. en C. Teresa Izquierdo, gracias por su guía, apoyo y enseñanzas fundamentales para alcanzar este objetivo.

A MI JURADO:

Dra. Rocío Salceda Sacanelles y Dra. Francisca Pérez Severiano, por el apoyo y tiempo invertidos en el dictamen de este trabajo. *Mil gracias*

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO:

Mi *Alma Mater*, por haberme brindado la oportunidad de formarme profesionalmente, gracias por enseñarme lo valioso del trabajo en equipo.

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra manera estuvieron involucrados en la realización de este trabajo, y que sin su valiosa colaboración no hubiese sido posible su conclusión.

CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
I. INTRODUCCIÓN	
1. Introducción.....	1
II. GENERALIDADES	
2. Generalidades.....	3
2.1 Diabetes Mellitus.....	3
2.1.1 Historia de la enfermedad.....	3
2.1.2 Estadística de la enfermedad.....	5
2.1.3 Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	6
2.1.4 Diabetes Mellitus tipo 1.....	7
2.1.5 Diabetes Mellitus tipo 2.....	9
2.1.6 Características diferenciales entre la DM tipo 1 y 2.....	10
2.1.7 Complicaciones de la DM tipo 1 y 2.....	10
2.1.8 Tratamientos farmacológicos.....	12
2.1.8.1 Insulina.....	12
2.1.8.2 Hipoglucemiantes orales.....	12
2.1.9 Diabetes y medicina tradicional en México.....	14
2.1.9.1 <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam (tomatillo verde).....	15
2.2 Fisiología de los eritrocitos.....	17
2.2.1 Metabolismo de los eritrocitos.....	17
2.3 Viscosidad sanguínea en los pacientes diagnosticados con DM.....	22
2.4 Estrés oxidativo y diabetes.....	24
2.4.1 Especies reactivas del oxígeno (ROS).....	28
2.5 Técnicas de detección y cuantificación del daño por estrés oxidativo.....	30
2.5.1 Técnica de TBARS.....	34
2.6 Peroxidación de Lípidos.....	35
2.7 Glutación (GSH).....	39

	Pág.
2.7.1	Cuantificación de GSH..... 41
2.8	Antioxidantes..... 42
2.8.1	α -tocoferol (Vitamina E)..... 42
2.8.2.	Polifenoles y flavonoides..... 44
2.9	Inducción experimental de diabetes mellitus con aloxana..... 46
III.	OBJETIVOS
3.	Objetivos..... 47
3.1	Objetivo general..... 47
3.2	Objetivos particulares..... 47
IV.	JUSTIFICACIÓN
4.	Justificación..... 48
V.	HIPÓTESIS
5.	Hipótesis..... 49
VI.	DESARROLLO EXPERIMENTAL
6.	Desarrollo experimental..... 50
6.1	PRIMERA PARTE. <i>Desarrollo de los métodos de cuantificación</i>
6.1.1	Desarrollo del método de cuantificación de peroxidación de lípidos (LPO)..... 50
6.1.2	Curva de calibración para la cuantificación de MDA 55
6.1.3	Curva de calibración para la cuantificación de glutatión reducido..... 55
6.1.4	Determinación de la confiabilidad en la cuantificación de glucosa por dos métodos comerciales: Acucheck vs. Sera-pack..... 56
6.2	SEGUNDA PARTE. <i>Estudios in vitro</i>
6.2.1	Obtención de los extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam..... 58
6.2.2	Ensayo de la actividad antioxidante de los 8 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam por reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrazil hidrazilo (DPPH)..... 59
6.2.3	Inducción de diabetes con aloxana en ratas Wistar macho..... 62
6.2.4	Comparación de los estándares antioxidantes sobre la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas diabéticas y normoglucémicas..... 63
6.2.5	Determinación del efecto de los extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam sobre la LPO en eritrocitos de ratas..... 64

	Pág.	
6.2.6	Determinación de curvas concentración-respuesta de los extractos activos sobre la LPO en eritrocitos de ratas normales y diabéticas.....	65
6.3	TERCERA PARTE. <i>Estudios in vivo</i>	
6.3.1	Determinación de las condiciones de ayuno para la cuantificación del efecto hipoglucemiante de glibenclamida y 2 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam en ratas normoglucémicas.....	68
6.3.2	Determinación de la vía de administración para la cuantificación del efecto hipoglucemiante y la LPO en ratas normoglucémicas.....	69
6.3.3	Curva <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de glibenclamida para la determinación de su efecto sobre la LPO en eritrocitos de ratas normales y diabéticas.....	71
6.3.4	Curva dosis-respuesta de α -tocoferol para la determinación de su efecto sobre la LPO en ratas normoglucémicas y diabéticas.....	73
6.3.5	Determinación del efecto <i>in vivo</i> de 5 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam sobre los niveles de glucosa, LPO y GSH en ratas normoglucémicas y diabéticas.....	75
VII.	RESULTADOS	
7.	Resultados.....	77
7.1	PRIMERA PARTE. <i>Desarrollo de los métodos de cuantificación</i>	
7.1.1	Comparación de los métodos de cuantificación de peroxidación de lípidos.....	77
7.1.2	Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno que induce el 50% de peroxidación de lípidos (Cl ₅₀) en eritrocitos de ratas normoglucémicas.....	79
7.1.3	Resultado de la curva de calibración para la cuantificación de malondialdehído a partir de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano.....	80
7.1.4	Curva de calibración para la cuantificación de glutatión reducido.....	81
7.1.5	Determinación de la confiabilidad en la cuantificación de glucosa por dos métodos comerciales: Acucheck vs, Sera-pack.....	81
7.2	SEGUNDA PARTE. <i>Estudios in vitro</i>	
7.2.1	Niveles de glucosa en sangre de ratas Wistar al inducir un estado diabético con aloxana.....	82
7.2.2	Resultado de la actividad antioxidante de los extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam en la reducción del radical libre DPPH.....	82
7.2.3	Respuesta de estándares antioxidantes en la peroxidación de lípidos de eritrocitos de ratas diabéticas y normoglucémicas.....	83
7.2.4	Curva concentración respuesta de α -tocoferol en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.....	84
7.2.5	Efecto de los extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam sobre la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.....	85
7.2.6	Curva concentración-respuesta de los extractos que resultaron activos sobre la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.....	87

	<i>Pág.</i>	
7.2.7	Concentración de glutatión reducido (GSH) en eritrocitos de ratas normales, diabéticas y resistentes.....	88
7.2.8	Volumen corpuscular medio (VCM) presentado en sangre total de ratas normoglucémicas, diabéticas y resistentes.....	89
7.3	TERCERA PARTE. <i>Estudios in vivo</i>	
7.3.1	Efecto del ayuno y determinación del tiempo de muestreo para cuantificar el efecto hipoglucemiante de glibenclamida y 2 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam en ratas normoglucémicas.....	90
7.3.2	Comparación de dos vías de administración sobre el efecto hipoglucemiante y la peroxidación de lípidos de glibenclamida, α -tocoferol y tres extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam en ratas normoglucémicas.....	91
7.3.3	Curva <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de glibenclamida para la determinación de su efecto sobre la peroxidación de lípidos en ratas normoglucémicas y diabéticas.....	95
7.3.4	Curva dosis-respuesta de α -tocoferol sobre la peroxidación de lípidos en ratas normoglucémicas y diabéticas.....	96
7.3.5	Efecto post-administración de glibenclamida y tocoferol sobre los niveles de glutatión reducido (GSH).....	97
7.3.6	Efecto en los niveles de glucosa de 5 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam en ratas normales y diabéticas.....	99
7.3.7	Efecto de los 5 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam sobre los niveles de LPO en ratas normales y diabéticas.....	102
7.3.8	Efecto de los 5 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam sobre los niveles de glutatión reducido y volumen corpuscular medio en ratas normales y diabéticas.....	105
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
8.	Discusión de resultados.....	107
IX.	CONCLUSIONES	
9.	Conclusiones.....	119
X.	ANEXOS	
10.	Anexos.....	122
10.1	Resumen de resultados.....	122
10.2	Abreviaturas.....	123
XI.	BIBLIOGRAFÍA	
11.	Bibliografía.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
Tabla 1.	Clasificación de la diabetes mellitus de acuerdo a la NDDG y OMS..... 7
Tabla 2.	Características diferenciales entre la diabetes mellitus tipo 1 y 2..... 10
Tabla 3.	Tipos de insulina..... 12
Tabla 4.	Mecanismo de acción de los fármacos orales para el tratamiento de la DM..... 13
Tabla 5.	Marcadores del estrés oxidativo que se han reportado elevados en pacientes con diabetes mellitus..... 25
Tabla 6.	Resultado de 8 métodos de cuantificación de peroxidación de lípidos en diferentes fracciones sanguíneas de ratas normoglucémicas..... 77
Tabla 7.	Muestras pareadas..... 81
Tabla 8.	Prueba de t para grupos pareados..... 81
Tabla 9.	Porcentajes de reducción de los extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam..... 83
Tabla 10.	Actividad antioxidante <i>in vitro</i> en la peroxidación de lípidos (LPO)..... 84
Tabla 11.	Niveles de LPO y porcentajes de protección <i>in vitro</i> presentados por los extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam y α -tocoferol en tres grupos de ratas..... 86
Tabla 12.	Niveles de peroxidación de lípidos <i>in vivo</i> en eritrocitos de ratas normoglucémicas tratadas con los fármacos de referencia y 3 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam en dos vías de administración..... 94
Tabla 13.	Niveles de lipoperoxidación <i>in vivo</i> en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas pretratadas con tres dosis de glibenclamida por vía intraperitoneal..... 96
Tabla 14.	Niveles de lipoperoxidación <i>in vivo</i> en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas pretratadas con tres dosis de α -tocoferol por vía intraperitoneal..... 97
Tabla 15.	Efecto de los extracto de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam y fármacos de referencia sobre la LPO <i>in vivo</i> en ratas normoglucémicas..... 103
Tabla 16.	Efecto de los extracto de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam y fármacos de referencia sobre la LPO <i>in vivo</i> en ratas diabéticas..... 104
Tabla 17.	Efecto <i>in vivo</i> de 5 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam y sus controles sobre los niveles de GSH en ratas normoglucémicas y diabéticas..... 106
Tabla 18.	Efecto <i>in vivo</i> de 5 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam y sus controles sobre el Volumen Corpuscular Medio (VCM) en ratas normoglucémicas y diabéticas..... 106
Tabla 19.	Porcentajes de protección de LPO <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de cinco extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam..... 116
Tabla 20.	Resumen de resultados..... 122

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Complicaciones relacionadas al diagnóstico de la diabetes mellitus.....	11
Gráfica 2. Curvas concentración-respuesta de peróxido de hidrógeno en eritrocitos de ratas normoglucémicas.....	80
Gráfica 3. Curva de calibración para MDA.....	80
Gráfica 4. Curva de calibración para glutatión reducido.....	81
Gráfica 5. Niveles de glucosa en 3 grupos de ratas.....	82
Gráfica 6. Curva concentración-respuesta de α -tocoferol en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.....	85
Gráfica 7. Eficacia de los 8 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam sobre la peroxidación de lípidos.....	87
Gráfica 8. Curvas concentración-respuesta <i>in vitro</i> de los extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam que presentaron protección significativa contra la LPO.....	88
Gráfica 9. Promedio de la concentración de GSH.....	89
Gráfica 10. Promedio de VCM.....	89
Gráfica 11. Cursos temporales del efecto sobre los niveles de glucosa del vehículo (aceite de maíz) y glibenclamida con y sin ayuno.....	90
Gráfica 12. Cursos temporales del efecto sobre los niveles de glucosa del extracto 6 y 7 de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam con y sin ayuno.....	91
Gráfica 13. Cursos temporales del efecto hipoglucemiante en 2 vías de administración del vehículo (aceite de maíz), α -tocoferol y glibenclamida.....	92
Gráfica 14. Cursos temporales del efecto hipoglucemiante en 2 vías de administración de 3 extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam.....	93
Gráfica 15. Niveles de lipoperoxidación <i>in vitro</i> post-administración de glibenclamida.....	95
Gráfica 16. Concentración de GSH en eritrocitos de ratas cuantificado 6 horas después de ser administradas i.p. con 3 dosis de glibenclamida.....	98
Gráfica 17. Concentración de GSH en eritrocitos de ratas cuantificado 6 horas después de ser administradas i.p. con 3 dosis de α -tocoferol.....	98
Gráfica 18. Curso temporal de los niveles de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas con vehículo y glibenclamida sin ayuno.....	99
Gráfica 19. Curso temporal de los niveles de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas con α -tocoferol y extracto 3 de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam en ratas sin ayuno.....	100
Gráfica 20. Curso temporal del nivel de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas con los extractos 6 y 7 de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam.....	101
Gráfica 21. Curso temporal del nivel de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas con los extractos 2 y 5 de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam.....	101
Gráfica 22. Niveles de LPO en eritrocitos de ratas normoglucémicas pre-tratadas con vehículo, fármacos de referencia y extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam.....	103
Gráfica 23. Niveles de LPO en eritrocitos de ratas diabéticas pre-tratadas con vehículo, fármacos de referencia y extractos de <i>Physalis chenopodifolia</i> Lam.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1.	Best y Bartin con la perrita "Marjorie"..... 4
Figura 2.	Evolución preclínica y clínica de la diabetes mellitus tipo 1..... 8
Figura 3.	Evolución preclínica y clínica de la diabetes mellitus tipo 2..... 9
Figura 4.	<i>Physalis chenopodiifolia</i> Lam..... 16
Figura 5.	La glucosa atraviesa la membrana plasmática del eritrocito por transporte facilitado..... 19
Figura 6.	Vía de las pentosas y su relación con el ciclo del GSH..... 21
Figura 7.	Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA)..... 34
Figura 8.	Reacción general de la peroxidación de lípidos..... 36
Figura 9.	Reacciones de la etapa de propagación de la peroxidación de lípidos..... 37
Figura 10.	Estructura de GSH y GSSG..... 41
Figura 11.	Reacción del DTNB con GSH..... 41
Figura 12.	Inhibición de la vitamina E sobre la peroxidación de lípidos..... 43
Figura 13.	Flavonoides..... 45
Figura 14.	Estructura molecular del ácido nordihidroguayarético (NDH)..... 46
Figura 15.	Reducción de la aloxana para producir ácido dialúrico..... 46
Figura 16.	Espectro de absorción de tres inductores de lipoperoxidación en eritrocitos de ratas normoglucémicas y comparación del efecto alcanzado por tres inductores de lipoperoxidación a diferentes concentraciones..... 78

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

	<i>Pág.</i>
Diagrama 1.	Rutas propuestas por las cuales se generan las complicaciones características en la diabetes mellitus..... 27
Diagrama 2.	Síntesis de glutatión (GSH) a partir de la metionina..... 40
Diagrama 3.	Procedimiento para la extracción de ocho extractos de <i>Physalis chenopodiifolia</i> Lam..... 58

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<i>Pág.</i>
Esquema 1.	Metodología para la cuantificación de la peroxidación de lípidos en eritrocitos..... 53
Esquema 2.	Metodología para la determinación de la actividad antioxidante por reducción del radical DPPH..... 59
Esquema 3.	Metodología para la cuantificación de GSH en eritrocitos..... 67

I. Introducción

1. Introducción.

La Diabetes Mellitus (DM) es un trastorno metabólico caracterizado por un conjunto de alteraciones crónicas que se desarrollan cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el cuerpo no puede utilizarla de un modo eficaz. Esto ocasiona un aumento de glucosa en la sangre que puede dañar gravemente muchos órganos, como son: ojos, riñones, arterias, vasos sanguíneos y nervios. Estas lesiones llegan a incapacitar al paciente y a provocarle finalmente la muerte. (Contreras y cols., 1996)

Actualmente, se reporta que existen aproximadamente 177 millones de personas con diabetes en todo el mundo. Está previsto que esta cifra se elevará casi al doble para el año 2030, debido principalmente al aumento en el promedio de vida y a la urbanización de la población. (WHO, 2004)

Existen dos formas básicas de diabetes: la diabetes mellitus de tipo 1 y la diabetes mellitus de tipo 2. El tipo 1 se desarrolla con mayor frecuencia en niños y adolescentes y representa del 10 al 15% de todos los casos de diabetes. El tipo 2 se presenta principalmente en adultos y representa entre el 85 y 90% de todos los casos de diabetes.

A lo largo del siglo XX, el conocimiento herbolario popular sobre la diabetes así como la medicina tradicional indígena comenzaron a ser incorporados paulatinamente dentro de la práctica médica-académica. A partir de entonces, se han realizado investigaciones etnobotánicas que permiten registrar la manera en que la población mexicana se refiere a la diabetes, esto es, con base en las ideas que sobre la enfermedad ha construido desde su punto de vista cultural. Así fue como en la población mexicana comenzó el proceso de ensayo de innumerables plantas para la atención del padecimiento, y se descubrieron algunas especies que han resultado eficaces para su tratamiento. De esto son evidencia los estudios que desde 1903 comenzó a realizar Armendáriz acerca de la tronadora (*Tecoma stans*) como remedio contra la diabetes. Y esto es sólo el inicio de un sin número de investigaciones realizadas para el tratamiento de esta enfermedad a partir de plantas mexicanas.

En el caso de tratamientos herbolarios para tratar la diabetes, hasta la fecha se habla de que existen más de 150 especies utilizadas popularmente. La herbolaria

mexicana representa un recurso que ha a sido poco valorado en los medios académicos. Aunque esta situación poco a poco está cambiando, aún existe un amplio cúmulo de especies vegetales cuya acción terapéutica aún no se ha confirmado, por lo cual, es necesario continuar con la búsqueda de alternativas terapéuticas eficaces y seguras capaces de abatir los costos, sobre todo en aquellos tratamientos prolongados necesarios en enfermedades degenerativas, como es el caso de la diabetes, y que mejor opción que nuestra herencia ancestral herbolaria. (Aguilar y col., 2002; Aguilar y cols., 1996)

Desde esta perspectiva, el presente trabajo tuvo como propósito determinar el efecto *in vitro* e *in vivo* de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre los niveles de glucosa sanguínea, peroxidación de lípidos y la actividad de glutatión reducido en ratas normoglucémicas y resistentes.

II. Generalidades

2. Generalidades.

2.1. Diabetes mellitus.

2.1.1 Historia de la enfermedad.

La primera referencia que describe una extraña enfermedad que provoca en los individuos un adelgazamiento notorio, un apetito continuo, orina en abundancia y una enorme sed, se encuentra en el papiro encontrado por el egiptólogo alemán George Ebers en 1873, cerca de las ruinas de Luxor, fechado hacia el 1.500 antes de la era Cristiana. Sin duda estos síntomas describen los efectos de lo que hoy se conoce como diabetes infanto-juvenil. (Arganis, 2002)

El término diabetes deriva de la palabra griega *diabaínein* que significa "siforo (atravesar)". No existe un acuerdo sobre quién la nombró de esta manera. Algunos autores piensan que fue Apolonio de Menfis, mientras otros señalan a Areteus de Cappadocia (81-138 d. C) que fue quien describió la fatal evolución y desenlace de la enfermedad. Areteus interpretó así los síntomas de la enfermedad: *a estos enfermos se les deshace su cuerpo poco a poco y como los productos de desecho tienen que eliminarse disueltos en agua necesitan orinar mucho. Esta agua perdida tiene que ser repuesta bebiendo mucho. Como la grasa se funde poco a poco se pierde peso y como los músculos también van deshaciéndose el enfermo se queda sin fuerza.* (Hiriart, 2002; Arganis, 2002)

En la edad media Avicena (Ibn-Sina) evaporó la orina de un diabético y observó que dejaba residuos con sabor a miel. También hizo una descripción de las complicaciones de la diabetes. En el siglo XIII Feliche descubrió que el páncreas no era un trozo de carne como hasta entonces se había pensado, sino un órgano. En 1679 un médico llamado Thomas Willis, humedeció su dedo en la orina de un paciente diabético, comprobando así su sabor dulce, pero también encontró pacientes cuya orina no tenía ningún sabor y estableció entonces los términos de diabetes *mellitus* y *diabetes insípida* para diferenciarlos. (Hiriart, 2002)

En 1889 Joseph Von Mering y Oscar Minkowsky extirparon totalmente el páncreas de un mono (con la intención de ver los efectos de la ausencia de los jugos pancreáticos en la digestión del animal) y observaron como el animal se fue hinchando, manifestando

sed y aumentando la emisión de orina. Al investigar esta orina, se dieron cuenta de que contenía azúcar, por lo que llegaron a la conclusión de que la extirpación del páncreas producía una diabetes grave que terminaba con el fallecimiento en pocas semanas. A partir de este momento, centraron sus investigaciones en el funcionamiento del páncreas y la sustancia que producían los islotes de Langerhans, que posteriormente llamarían *isletina*, sin obtener resultados concluyentes. Quizá el momento más determinante y recordado de la historia de la diabetes se sitúa en el año 1921, cuando Frederick G. Banting y su ayudante Charles H. Best tuvieron la idea de ligar el conducto excretor pancreático de un mono, provocando la autodigestión de la glándula. Después, exprimiendo lo que quedaba de este páncreas obtuvieron un líquido que, inyectado en una cachorra diabética ("Marjorie"), conseguía reducir en dos horas la glucémia; con este experimento se había descubierto la insulina. (Arganis, 2002)



FIGURA 1. Best y Banting con la perrita "Marjorie"

El primer ensayo en humanos fue realizado poco tiempo después. El 11 de enero de 1922, Leonard Thompson, diabético de 14 años y con sólo 29 kilos de peso, recibió la primera dosis de insulina que provocó una mejora espectacular en su estado general; el paciente murió 13 años después, como causa de una bronconeumonía, observándose en su autopsia avanzadas complicaciones diabéticas. (Arganis, 2002)

El uso de la insulina se fue extendiendo, a pesar de que los métodos empleados para su extracción eran elevados y la cantidad extraída no era suficiente para toda la demanda. En España, el doctor Rossend Carrasco (1922), emprende la tarea de la obtención de la insulina a través de la extirpación del páncreas de los cerdos. Esta primera

insulina obtenida de animales generaba peligrosas hipoglucemias y grandes reacciones locales, debido en gran medida a sus impurezas. (Arganis, 2002)

Surgió entonces la idea de internacionalizar el nombre de la hormona del páncreas. Los laboratorios Lilly le dieron el nombre de Insulin (insulina en español) como se le conoce desde septiembre de 1923. El siguiente hito en la historia de la insulina fue la dilucidación de su estructura, proeza realizada en 1954 por Frederik Sanger de la Universidad de Cambridge. El trabajo realizado por Sanger consistió en elucidar no solo la estructura de la molécula de insulina, sino también el orden en que se alinean las distintas subunidades de aminoácidos, por esta proeza Sanger recibió el premio Nobel de medicina en 1955. Sin embargo, se necesitaron 12 años más para descubrir que la insulina se excreta y se almacena como proinsulina *inactiva*, la cual se escinde a insulina activa con sus cadenas y a un resto llamado péptido C, siendo hasta la década de los 70's cuando se conoció con exactitud su estructura tridimensional. Desde estas fechas tanto los métodos de conseguir la insulina como el tratamiento de la diabetes han avanzado y han llegado a unos niveles que seguramente nadie se imaginaba. **La vida de la persona con diabetes hoy en día puede ser de una calidad de vida igual a la de las personas sin diabetes.** (Hiriart, 2002; Arganis, 2002)

2.1.2 Estadística de la enfermedad

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud en el año 2000 existían alrededor de 177 millones de personas con diabetes en el mundo y se estima que en el año 2030 esta cifra aumentará a 370 millones. En México, actualmente la DM constituye uno de los problemas más importantes de salud pública. En el año 2000 se registraron 2.2 millones de diabéticos y se estima que en el año 2030 esta cifra alcanzará cerca de los 6.2 millones de pacientes. Anualmente se registran más de 180 mil nuevos casos y de acuerdo a la Secretaría de Salud, esta enfermedad presenta una tasa de mortalidad de 1/48.96, registrándose como la primera causa de muerte en México, con lo que nuestro país sustenta el noveno lugar entre los países con mayor prevalencia de diabetes. (WHO, 2004; SSA, 2003)

En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), esta enfermedad se sitúa entre los cinco primeros lugares de demanda de consulta externa y es uno de los principales motivos de ingreso hospitalario. Los costos relacionados directamente con el tratamiento de la diabetes, así como con las incapacidades que ocasiona, supera los 4 millones de dólares anuales. Sumando a estos los costos que originan en el sector privado y en la población no asegurada, se puede afirmar que el costo total en México alcanzaría cifras anuales superiores a los 10 millones de dólares. (Zarate, 2001; Kuri y cols, 2001)

En México la DM tipo 2 es el que se diagnostica con mayor frecuencia y constituye entre el 85 y 90% de todos los casos en el país, presentando una tasa de mortalidad de 1/365. Por el contrario, la DM tipo 1 registra una tasa de mortalidad de 1/13 por lo que estima que este tipo de diabetes constituye menos del 5% de todos los casos en el país. (SSA, 2003; Zarate, 2001; Kuri y cols, 2001)

2.1.3 Clasificación de la Diabetes Mellitus.

La DM es un trastorno caracterizado por un conjunto de alteraciones crónicas caracterizadas por el aumento en el nivel de glucosa de la sangre. Las causas de la hiperglucemia son la ausencia ó deficiencia en la producción de la hormona insulina, la disminución de la respuesta del cuerpo a la misma y todas aquellas condiciones que aumentan la producción o que disminuyen la utilización corporal de glucosa. (Hiriart y col., 2002; Guillen, 2002)

Se sabe que la DM no es una entidad clínica homogénea, sino que agrupa varios trastornos. De acuerdo a la National Diabetes Data Group (NDDG) de los Estados Unidos y a la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente la DM se clasifica de acuerdo a sus características etiológicas como se muestra en la tabla 1.

Sin embargo, como ya se ha hecho referencia, existen dos formas básicas de diabetes: la del tipo 1 (antes nombrada diabetes juvenil o dependiente de insulina), caracterizada por una falta total de insulina y la del tipo 2 (antes denominada del adulto o no dependiente de insulina) en la que los tejidos que normalmente responden a la insulina dejan de hacerlo, es decir, se vuelven resistentes. Ambos tipos tienen como consecuencia la incapacidad del organismo a metabolizar los nutrientes, especialmente los carbohidratos

(azúcares y almidones), por lo que se ha dicho que la diabetes es una enfermedad metabólica. (Hiriart y col., 2002; Goodman y col., 1996)

TABLA 1. Clasificación de la diabetes mellitus de acuerdo a la NDDG y OMS

- I. Diabetes Tipo 1
 - A. Autoinmune
 - B. Idiopática
- II. Diabetes Tipo 2
- III. Otros tipos de diabetes:
 - A. Defectos genéticos de la función de las células β .
 - B. Defectos genéticos en la acción de la Insulina.
 - C. Enfermedades del páncreas exócrino.
 - D. Endocrinopatías.
 - E. Inducidas por drogas.
 - F. Infecciones.
 - G. Formas no comunes de diabetes medradas por fenómenos autoinmunes.
 - H. Otros síndromes asociados a veces con diabetes.
- IV. Diabetes Gestacional.
- V. Alteraciones en el metabolismo de la glucosa o alteraciones en la homeostasis de la glucosa.

2.1.4 Diabetes mellitus tipo 1.

La DM tipo I es una enfermedad hereditaria que generalmente comienza de manera brusca antes de los 30 años con los llamados *síntomas cardinales*: poliuria, polifagia ó anorexia, astenia y pérdida de peso. Se caracteriza por cierta alteración en la respuesta del sistema inmunitario que se encarga de mantener la integridad del organismo. Esta condición lo predispone a dar una respuesta anormal de auto-inmunidad en la que se forman anticuerpos que destruyen rápida o lentamente las células β de los islotes de Langerhans y por lo tanto se deja de producir insulina. Cuando se ha perdido el 90% de dichas células se inician los síntomas antes mencionados, que la mayoría de las veces son tan aparatosos que frecuentemente el paciente es diagnosticado en estado de coma. (Guillén, 2002; Hiriart y col., 2002)

Con frecuencia el inicio de los síntomas de la enfermedad es desencadenado por alguna condición precipitante, como el estrés, alguna alteración emocional o afectiva,

infecciones bacterianas o virales, traumatismo o dolor, entre otros. En estos pacientes al desaparecer la condición precipitante, no obstante que la producción de insulina es insuficiente y que el número de células β es escaso, hay cierta mejoría del estado metabólico y de los síntomas, pero sólo por un periodo que varía de horas a meses y al que se ha denominado *luna de miel*. Sin embargo, posteriormente los requerimientos de insulina aumentan y reaparecen los síntomas. Desde el inicio de los síntomas, la mayoría de los pacientes muestra ya anticuerpos en contra de la enzima *descarboxilasa glutámica*, presente en las células β productoras de insulina, en contra de los islotes de Langerhans e incluso en contra de la misma insulina.

Como se muestra en la figura 2, a pesar de la carga genética del paciente, el número de células β y los niveles de glucosa sanguínea sólo se alteran hasta que aparecen auto-anticuerpos; se aprecia además que la destrucción celular se detiene y los niveles de glucosa se normalizan durante la *luna de miel*. (Guillén, 2002; Hiriart y col., 2002; Goodman y col., 1996; Salama y col., 2002)

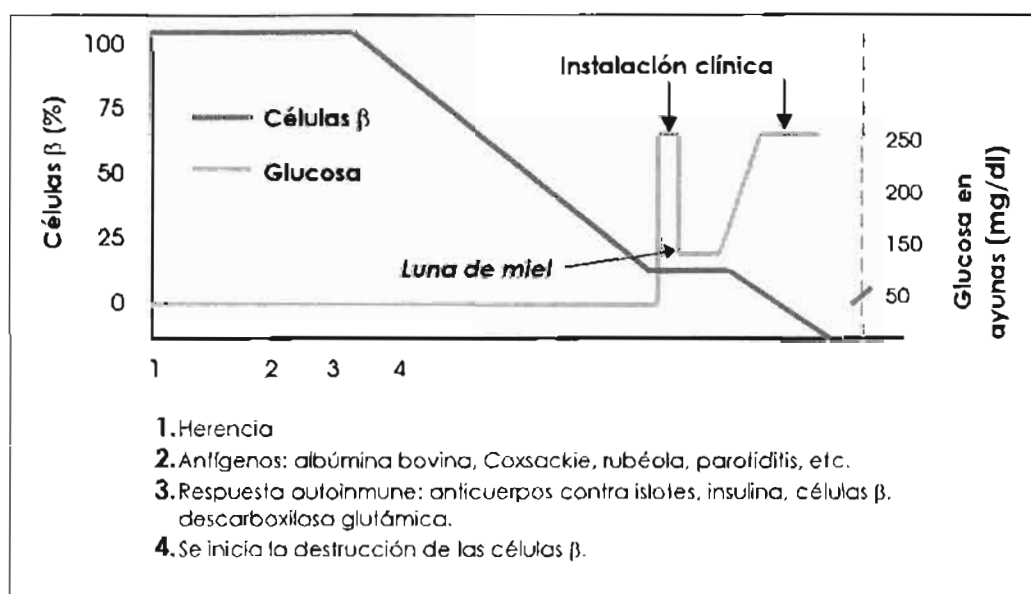


FIGURA 2. Evolución preclínica y clínica de la diabetes mellitus tipo 1. Se muestra la disminución en el número de células β del páncreas en función de diversos factores que caracterizan a la enfermedad. Los números del 1 al 4 indican el momento en el que actúan las distintas fases de la diabetes. La escala a la derecha de la figura marca la concentración de glucosa (110-125mg/dl), que aunque es aún normal, ya indica posible alteración en el sujeto. Esta concentración se considera el umbral para la diabetes, ya que cuando la glucosa rebasa los 126 mg/dl en el plasma sanguíneo de un individuo se establece el diagnóstico de esta enfermedad.*

2.1.5. Diabetes mellitus tipo 2

La DM tipo 2 también es una enfermedad hereditaria, pero a diferencia de la diabetes tipo 1, los factores genéticos son de mayor peso que los ambientales, por lo que la tendencia familiar llega a ser del 60-90%. Sin embargo, esta predisposición por sí sola no es suficiente, pues se requieren otros factores que desencadenen la enfermedad. Los más frecuentes son la edad, los embarazos continuos, la obesidad, la elevación crónica de hormonas antagónicas a la insulina o el empleo de ciertos medicamentos. Estos factores de riesgo, por un periodo variable que va de semanas hasta años, originan hiperglucemias moderadas que no llegan a producir síntomas. Sin embargo, en un momento dado la presencia de un factor precipitante como las infecciones (con mayor frecuencia) u otro tipo de estrés harán que la hiperglucemia aumente, lo que producirá síntomas muy notorios acompañados en ocasiones de deshidratación grave y coma. Posteriormente puede presentarse un periodo variable de adaptación, con disminución o desaparición de los síntomas, seguido de otro periodo de hiperglucemia acompañado de síntomas. Esta forma de presentación "ondulante" hace que el paciente no tome en serio la enfermedad, y se presta a que los charlatanes, empleando sustancias que no son útiles, "curen" aparentemente a los pacientes diabéticos. En la figura 3 se presenta la evolución clínica y preclínica de la diabetes mellitus tipo 2, en la que se aprecia claramente las fases características del transcurso de la enfermedad. (SSA; 2003; Goodman y col., 1996)

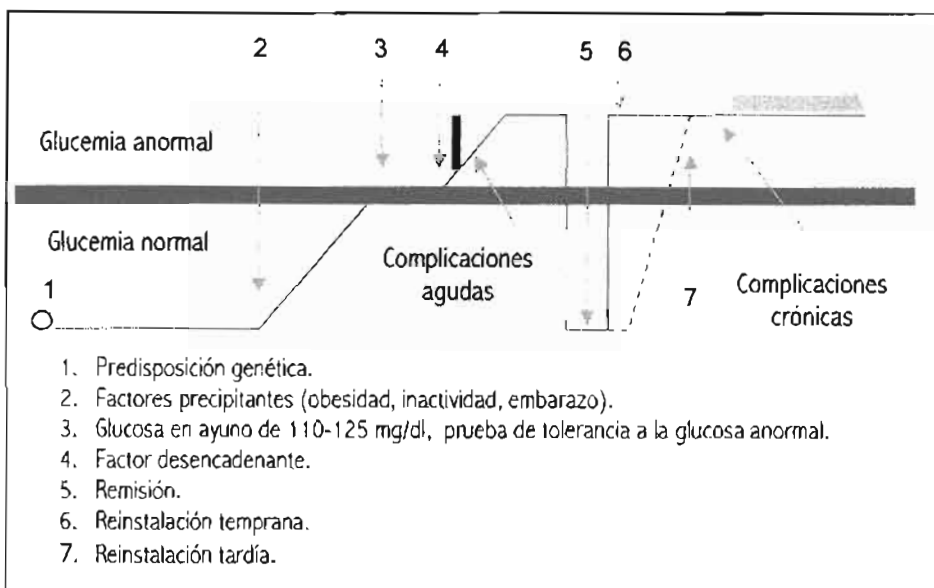


FIGURA 3. Evolución preclínica y clínica de la diabetes mellitus tipo 2. Se observa que en este tipo de pacientes existen factores genéticos y ambientales (precipitantes y desencadenantes) que interactúan entre sí para desencadenar la diabetes.*

2.1.6. Características diferenciales entre la DM tipo 1 y 2

Ahora bien, cada tipo de diabetes está representada por un conjunto de padecimientos. En la tabla 2 se resumen las características que identifican a la enfermedad.

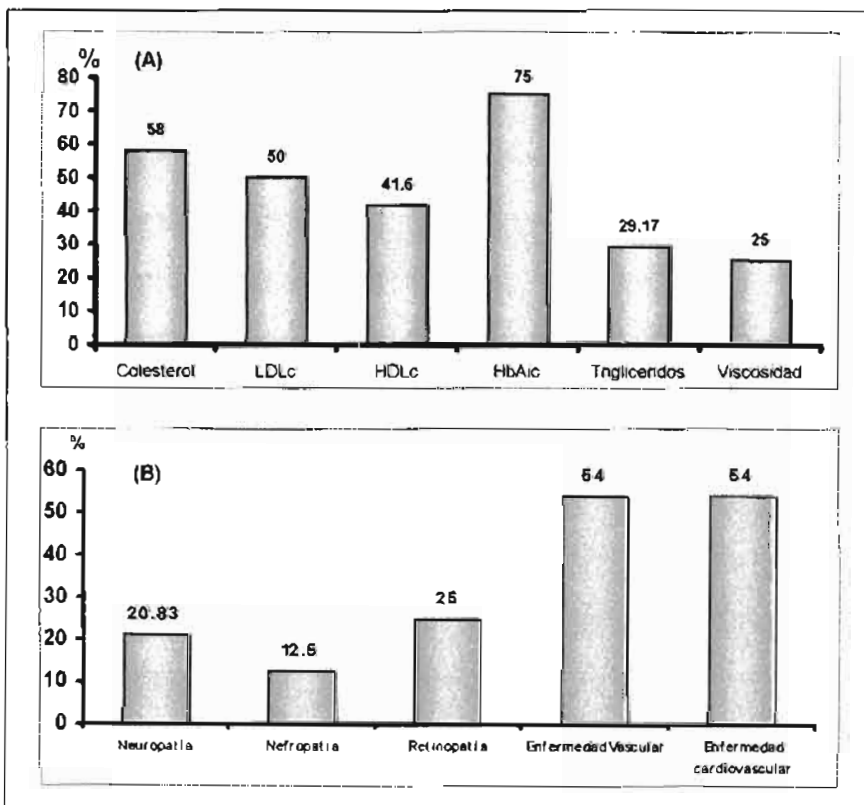
TABLA 2. Características diferenciales entre la diabetes mellitus tipo 1 y 2

CARACTERÍSTICA	DIABETES MELLITUS 1	DIABETES MELLITUS 2
Sexo	Hombres = mujeres	Mujeres < hombres
Edad diagnóstico	< 30 años	> 40 años
Presentación	Brusca	Solapada
Peso	Normal	Obesidad frecuente (80%)
Periodo remisión	Ocasional	Infrecuente
Tendencia a cetosis	Sí	No
Tendencia a coma hiperosmolar	No	Sí
Tratamiento con insulina	Indispensable	Inicialmente no, puede ser necesario para mejorar el control
Carácter hereditario	Afectación de gemelos idénticos 40-50%	90%
Genética	Asociado a genes del sistema HLA	Polimorfismo genético
Autoanticuerpos	85-90%	No
Inmunidad celular antipancreática	Sí	No
Etiología vírica	Posible	No
Insulinitis inicial	50-75%	No
Otras endocrinopatías asociadas	Sí	No
Insulinemia	Por debajo de lo normal	Variable (elevada o baja) pero con déficit relativo de insulina

2.1.7. Complicaciones de la DM tipo 1 y 2

Diversos estudios han coincidido en que ambos tipos de DM son propensas a desarrollar complicaciones, tales como las llamadas angiopatías, las cuales son

disfunciones vasculares que se manifiestan en algunos pacientes diabéticos después de un largo periodo de evolución. Pueden manifestarse en dos formas: macroangiopatías y microangiopatías. En las macroangiopatías, el flujo sanguíneo se ve alterado por la formación de placas de grasa y coágulos sanguíneos que se adhieren a la pared de la arteria y bloquean el flujo sanguíneo. Por otra parte, las microangiopatías se refieren al engrosamiento de las paredes de los pequeños vasos capilares, los cuales se debilitan, lo que produce pérdida de proteínas y lentificación del flujo sanguíneo en el organismo. Ambas angiopatías aparentemente están relacionadas a la toxicidad que representan los altos niveles de glucosa y otros azúcares en la sangre, además de un incremento en la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS). (Kador y col., 1984; Obrosova y cols., 1997; Williamson cols., 1993; Hammes y cols, 1998)



GRÁFICA 1. Complicaciones relacionadas al diagnóstico de la diabetes mellitus.

A) Parámetros alterados en pacientes diagnosticados con DM, lipoproteínas de baja densidad (LDL_c), lipoproteínas de alta densidad (HDL_c), hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}).

B) Angiopatías frecuentes en pacientes con DM de larga evolución.

Finalmente, ambos tipos de angiopatías producen lesiones tales como neuropatías, nefropatías, cardiopatías y retinopatías. Los parámetros que se han observado alterados y que están relacionados con las angiopatías son: hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia,

LDLc elevado, HDLc bajo, hemoglobina glucosilada elevada (HbA_{1c}) y viscosidad sanguínea elevada. En la gráfica 1 se presentan los porcentajes con los que se encuentran aumentados o disminuidos estos parámetros en el momento del diagnóstico de la enfermedad, así como el porcentaje en la frecuencia de las angiopatías diagnosticadas en pacientes con DM. (Salama y col, 2002)

2.1.8. Tratamientos Farmacológicos

2.1.8.1. Insulina

Es una hormona de efecto hipoglucemiante, producida por las células β del páncreas, cuyo estímulo más importante para su producción es la elevada concentración de glucosa en la sangre. Las diferentes pautas de tratamiento se consiguen mezclando los diversos tipos de insulina según su acción para conseguir un control satisfactorio. En la tabla 3 se presentan los diversos tipos de insulina. (Goodman y col., 1996; Maritim, 2003)

TABLA 3. Tipos de insulina.

NOMBRE	COMIENZO	PICO	DURACIÓN
Acción rápida: Humulina regular, Actrapid	30 minutos	2-3 h	5-7 h
Acción intermedia: Humulina NPH, Insulatard	1-1,5 h	4-8 h	12-16 h
Acción ultrarrápida: Humalog	15-20 minutos	1,5 h	3-4 h
Acción lenta: Humulina lenta, Ultratard	4h	12-16 h	24 h

2.1.8.2. Hipoglucemiantes orales.

Existen cinco grupos de fármacos orales:

- Sulfonilureas:** son las que se han empleado por más tiempo en la práctica clínica. El principal requisito para su uso es que el páncreas aún sea capaz de secretar insulina, que el paciente sea diagnosticado con diabetes tipo 2, que tenga una complexión delgada, con menos de 5 años de evolución y con requerimientos de insulina menores de 40 U/día. Entre las sulfonilureas de mayor uso actualmente se encuentran la clorpropamida, tolbutamida y glibenclamida. (Kira, 1993; Kulkarni, 2002; Najeed, 2002; Kimono, 2003; Mikhailov, 2001)

2. **Biguanidas:** Son los fármacos de primera elección en pacientes obesos con diabetes tipo 2, con poco tiempo de evolución. Presentan ausencia de efectos sobre el peso del paciente, disminuyen el apetito e inducen cambios favorables sobre distintos factores de riesgo cardiovascular que frecuentemente coexisten en estos casos. La biguanida de mayor uso en la práctica médica es la metformina. (Aguilar y cols., 2002)
3. **Inhibidores de las α -glucosidasas:** La acción principal de estos fármacos consiste en disminuir la elevación de la glucosa posprandial (después de los alimentos). En promedio, su uso resulta en un descenso de 20-30 mg/dL del nivel de glucosa en ayuno, una reducción de la hemoglobina glucosilada de 0.06-1.4% y de 50 mg/dL del nivel de glucosa posprandial. (Aguilar, 2002; Gómez, 1997)
4. **Tiazolidinedionas:** Son producto de investigaciones recientes por lo cual llevan poco tiempo en uso clínico. Estos fármacos aumentan la utilización de la glucosa en los tejidos periféricos. En dosis altas inhiben la producción de glucosa en el hígado. (Aguilar, 2002)
5. **Metiglinidas:** Este grupo de medicamentos se caracteriza por su acción rápida y de corta duración. Al igual que las tiazolidinedionas, llevan poco tiempo de uso clínico por ser productos de investigaciones recientes. Su eficacia para reducir el nivel de glucosa es moderada. Estos fármacos podrían ser una opción terapéutica en pacientes con intolerancia a la glucosa o en diabetes de reciente diagnóstico. Entre los ejemplos de las metiglinidas se encuentran la nateglinida y repaglinida. (Horton y cols., 2000)

En la tabla 4 se esquematizan los principales mecanismos de acción de estos cinco grupos de hipoglucemiantes orales.

TABLA 4. Mecanismo de acción de los fármacos orales para el tratamiento de la DM

Acción \ Hipoglucemiante	Sulfonilureas	Biguanidas	Inhibidores de la α -glucosidasa	Tiazolidinedionas	Metiglinidas
Aumento de la secreción de insulina	+++	No	No	No	+++
Disminución de la resistencia a la insulina	+	++	+	+++	?
Reducción de la gluconeogénesis	No	+++	No	+	No
Retardo de la absorción intestinal de los carbohidratos	No	+	+++	No	No

Intensidad de la acción: +poca, ++regular, +++mucho.

2.1.9. Diabetes y medicina tradicional en México.

La medicina tradicional de cualquier pueblo tiene antigüedad histórica; utiliza plantas, minerales, y animales que se encuentran en el ecosistema propio, y es congruente con su cosmovisión, con sus tradiciones y con su ideología. (Aguilar y col., 2002)

A la medicina tradicional indígena de México la conocemos a través de las costumbres de los grupos marginados actuales, así como de los escritos tempranos de fray Bernardino de Sahagún y Martín de la Cruz. La medicina indígena fue fundamentalmente herbolaria, aunque también se utilizaron productos minerales y animales, todo reforzado con oraciones religiosas que honraban a diversas deidades.

En el siglo XVI, las enfermedades glandulares como la diabetes no eran reconocidas unitariamente. La preocupación del curandero eran los síntomas, por lo que eran lo único que trataban, aunque hay regiones étnicas como la maya-yucateca donde se le llamó *enfermedad dulce*, y para detectarla hacían orinar al enfermo cerca de un hormiguero y observaban si las hormigas eran atraídas por el azúcar que quedaba al secarse la micción.

Concretándose a la diabetes, ésta permaneció desconocida como insuficiencia metabólica, y cada una de sus manifestaciones se seguía tratando por separado. No fue sino hasta finales del siglo XIX y durante el siglo XX cuando se precisó la patología de la enfermedad, comenzándose a utilizar múltiples terapias. La medicina tradicional mexicana puso atención al problema, pero no penetró mucho en ello, por otra parte, la herbolaria casera y el curanderismo popular, continuaban curando sólo la sintomatología. Fue a lo largo del siglo XX cuando el conocimiento médico académico sobre la diabetes empezó a ser incorporado dentro de la cultura médica popular y gracias a la investigación etnobotánica, se comenzó a registrar la manera en la que la población mexicana se refería y trataba a la diabetes. (Aguilar y col., 2002; Alarcón y cols., 1996; Contreras y cols., 1998)

Para el primer tercio del siglo XX, el profesor Maximino Martínez, en su libro *Plantas medicinales de México*, cita para la diabetes las plantas de cuajilote, damiana, eucalipto, matarique y tronadora. A mediados del siglo, el doctor Luis G. Cabrera recomienda además el aguacate. Poco a poco fueron aumentando las investigaciones acerca de las plantas mexicanas hipoglucemiantes y el Instituto Nacional Indigenista cita muchas más:

cocoyol, prodigiosa, lengua de gallina, lágrima de San Pedro, tejocote, gobernadora y tronadora. (Aguilar y col., 2002; Alarcón y cols., 1996; Contreras y cols., 1998; Hiriart, 2002)

Aguilar y Xolalpa publicaron en el año 2002 una recopilación de plantas de uso popular en la población mexicana empleadas como hipoglucemiante y registraron un total de 179 especies pertenecientes a 68 familias botánicas, de las cuales, las familias Asteraceae, Cactaceae y Fabaceae son las mejor representadas. Así mismo, encontraron que las hojas son las estructuras vegetales más utilizadas, seguidas de los tallos y las raíces. Dentro de este listado se encuentra mencionado el tomatillo verde (*Physalis chenopodifolia* Lam), localizado dentro de la familia Solanaceae, el cual es motivo de estudio en este trabajo.

2.1.9.1. *Physalis chenopodifolia* Lam (Tomatillo Verde).

Physalis chenopodifolia Lam ó tomatillo es una planta originaria de Mesoamerica y cultivada principalmente en México y Guatemala, actualmente forma parte de la dieta común de estos países. Es una hierba de 15 a 60 cm. de altura, a veces con vellos esparcidos en sus tallos, sus hojas son más anchas en la parte central. Las flores son amarillas con manchas azules ó purpúreas ligeramente verdosas y están solitarias. Los frutos son verdes y un poco redondos, tienen una cáscara que los cubre también de color verde. Crece en áreas con clima templado desde el nivel del mar hasta los 2000 metros. Asociada a terrenos de cultivo de temporal y riego. En la figura 4 se presenta la flor y el fruto seccionado de *Physalis chenopodifolia* Lam. (FAO, 2004; Martínez, 1999)

En el siglo XVI, el Códice Florentino la menciona para aliviar las ampollas o el calor de la lengua. Francisco Hernández relata que “las hojas y los frutos de *Physalis chenopodifolia* Lam son muy eficaces contra los fuegos de San Antón, curan las fístulas lagrimales y los dolores de cabeza, alivian los ardores del estómago y resuelven las paperas. Su jugo es bueno contra las inflamaciones de garganta, curan las úlceras reptantes, la irritación de los niños que llaman siriasis, contra los flujos agudos y alivia instilado, el dolor de oídos. Detiene los flujos menstruales excesivos, cura el empacho,

quita la flatulencia, provoca la orina, alivia el asma aplicado al pecho, quita el dolor de vientre, detiene los flujos que provienen de causa cálida y aplicado a los pechos saca la leche". (Martínez, 1999; Mera, 1987; FAO, 2004)

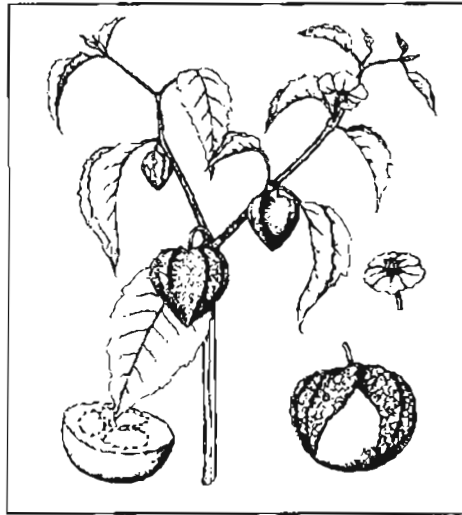


FIGURA 4. *Physalis chenopodifolia* Lam.*

Se emplea medicinalmente en problemas respiratorios y dolor de amígdalas en Veracruz y Morelos, tosferina y tos en Michoacán, los frutos son preparados de distintas maneras. En cocimiento junto con semillas de tamarindo, se administra por vía oral contra la tos. Asado en el comal, se abre a la mitad, se le pone un poco de sal y alcohol y se aplica lo más caliente que se tolere, dando masaje en las amígdalas inflamadas, sacando así todas las flemas. (Mera, 1987)

Por otra parte, asado se unta en la piel afectada por el "chincual" (granos en la piel). Se aplica como chiqueadores en la cabeza y en las coyunturas o se aplica tibio o casi frío en la planta de los pies y en el abdomen para bajar la fiebre. Se machaca y el jugo así obtenido se aplica en gotas cuando hay dolor en el oído. Otros usos medicinales que presenta esta planta son para tratar afecciones digestivas, bilis, inflamación de estomago y "latido", contra la calvicie y para el nacimiento de pelo, en el tratamiento de la presión alta, para la vista y en la diabetes. (Martínez, 1999)

* <http://www.fao.org>

2.2. Fisiología de los eritrocitos.

La sangre tiene una densidad relativa que oscila entre 1.056 y 1.066. Un milímetro cúbico de sangre humana contiene alrededor de cinco millones de glóbulos rojos, llamados eritrocitos o hematíes.

Los glóbulos rojos tienen forma de discos redondeados, bicóncavos con un diámetro aproximado de 7.5-8 μ . La forma bicóncava del eritrocito es una adaptación que hace que el área superficial, a través de la que intercambia el oxígeno por dióxido de carbono, sea la máxima posible.

La función del eritrocito es proteger y transportar a la hemoglobina para que ésta pueda realizar su función. En el interior del eritrocito también se encuentran diversas enzimas como la catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, las cuales son imprescindibles para mantener la integridad del eritrocito. (Elishkevitz y cols., 2002; Labrouche y cols., 1996; Mandori y col., 2002; Schmid-Schönbein y col., 1976; Sushil y cols., 1989; Waczulíková y col., 2002)

2.2.1. Metabolismo de los eritrocitos.

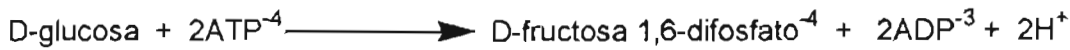
El eritrocito maduro es *incapaz* de sintetizar lípidos o proteínas, y debido a que carece de mitocondrias su única fuente energética para la síntesis de sustancias como GSH, coenzimas y ATP es el metabolismo de la glucosa. El mantenimiento de los niveles de ATP se logra a través de la GLUCOLISIS ANAEROBIA, cuyo rendimiento neto es de 2 ATP por cada molécula de glucosa oxidada. Esta fuente energética es suficiente para que desarrolle funciones que le permitan su supervivencia en la circulación (Álvarez y cols., 1997; Elishkevitz y cols., 2002; Labrouche y cols., 1996; Mandori y cols., 2002; Sushil y cols., 1989; Waczulíková y cols., 2002). El eritrocito presenta 4 vías metabólicas:

- A. Glucólisis anaerobia (vía de Embden-Meyerhof)
- B. Metabolismo óxido-reductor (vía de las pentosas y síntesis de glutatión)
- C. Metabolismo nucleotídico.
- D. Sistema diaforásico.

A. Glucólisis anaerobia

La glucosa que difunde hacia el interior del eritrocito, es oxidada a piruvato mediante un proceso de glucólisis sin consumo de O₂, en un proceso que consta de dos etapas:

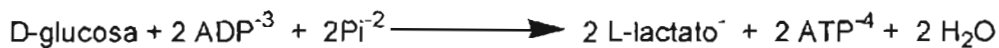
1. Transformación de glucosa en gliceraldehído-3-fosfato (GA3P) y dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) con un consumo de 2 ATP.



2. Oxidación de ambos compuestos a piruvato y lactato con formación de 2 ATP por cada molécula de GA3P (total = 2 ATP por cada molécula de glucosa).



Suma:



La glucólisis anaerobia posee tres enzimas que al catalizar reacciones irreversibles constituyen etapas limitantes, estas enzimas son: la *hexocinasa* (HK) que transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato (G6P), la *fosfofructocinasa* (PFK) que transforma la fructosa-6-fosfato (F6P) en fructosa-1,6-difosfato (F1,6DP) y la *piruvatocinasa* (PK) que transforma el fosfoenolpiruvato (PEP) en piruvato. Debido a que la vía de Embden-Mayerhof es la única fuente de energía del eritrocito, el déficit de una de estas enzimas es suficiente para bloquear su funcionamiento y ser causa de anemia hemolítica. El piruvato se transforma en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa eritrocitaria (LDH).

Otra reacción importante de la glucólisis anaerobia es catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que mantiene el NADH en un estado reducido, imprescindible para mantener el hierro reducido de la hemoglobina, a través de la reacción catalizada por NADH diaforasa ó citocromo B5-reductasa. El esquema se presenta en la figura 5. (Álvarez y cols., 1997; Elishkevitz y cols., 2002; Mandori y col., 2002; Sushil y cols., 1989; Waczulíková y cols., 2002)

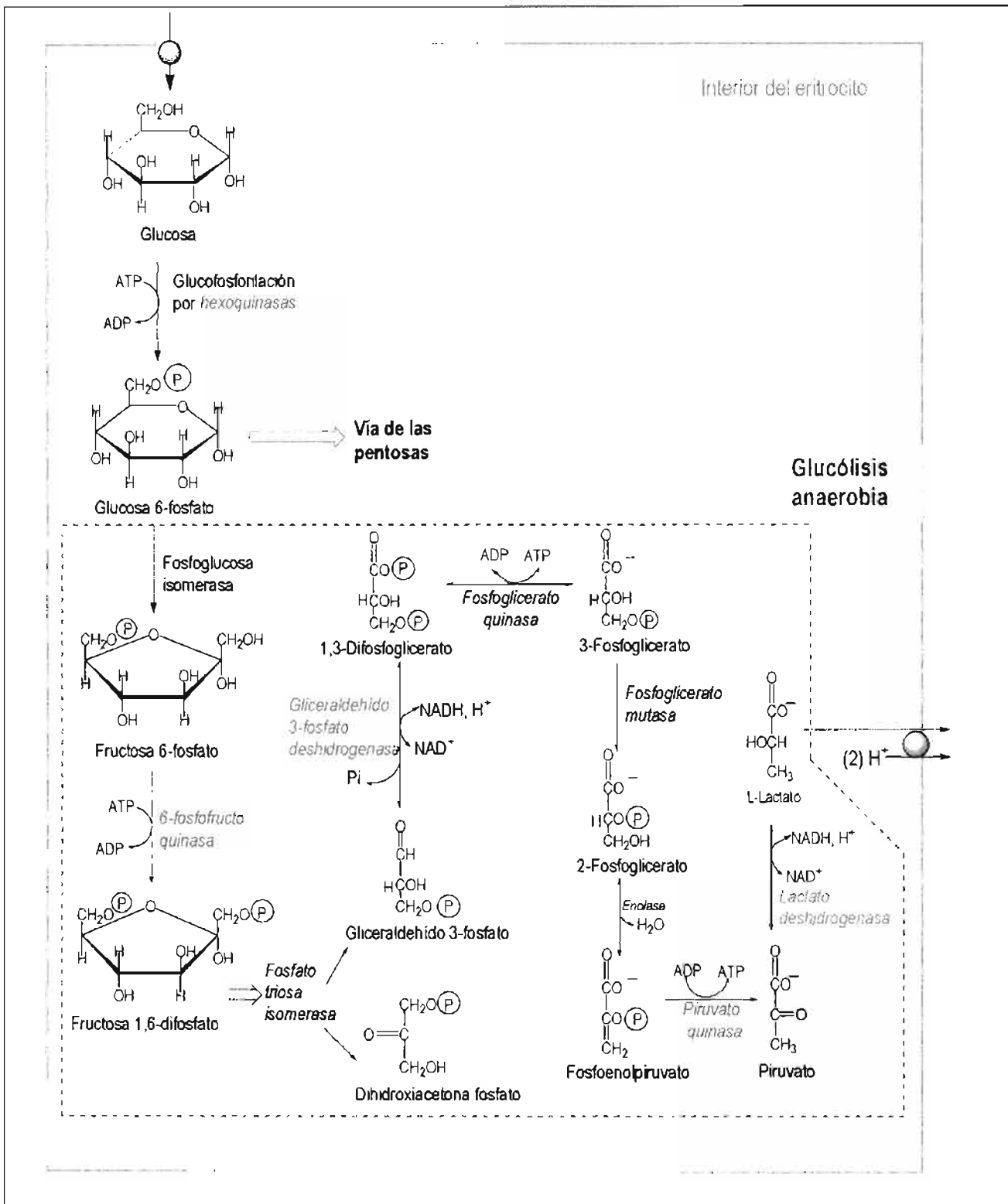


FIGURA 5. La glucosa atraviesa la membrana plasmática del eritrocito por transporte facilitado mediado por GLUT-1 (transportador de glucosa isoforma 1); posteriormente es metabolizada principalmente por glucólisis anaerobia, obteniendo lactato como producto final, el cual es liberado al plasma sanguíneo para ser transportado hasta el hígado.*

*Devlin (2002) Textbook of Biochemistry with clinical correlations

B. Metabolismo oxido-reductor (vía de las pentosas o hexosas monofosfato).

Una vía alternativa a la glucólisis anaerobia es el ciclo de las hexosas monofosfato que en condiciones normales deriva entre 5-10% del catabolismo de la glucosa. El principal factor limitante es el cociente $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ y la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual precisa del cofactor NADP^+ , pero que a la vez es fuertemente inhibida por el NADPH .

En el desarrollo de su función, el eritrocito suele hallarse sometido a agresiones oxidantes y el NADPH es, por si mismo, insuficiente para amortiguarlas, es por eso que los hematíes disponen del glutatión, que en estado reducido (GSH) realiza esta función. En su forma reducida y mediante una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa, el GSH elimina el exceso de peróxido. El nivel de GSH se mantiene elevado gracias al NADPH (de la vía de las pentosas) y a la actividad de la glutatión reductasa. El poder reductor del eritrocito reside en su capacidad de regenerar NADPH , necesario a su vez, para mantener el nivel de GSH (figura 6). Dado que el glutatión no difunde a través de las membranas eritrocitarias, su concentración se mantiene gracias a un sistema en el que intervienen 2 enzimas: la glutamilsteina sintetasa y la glutatión sintetasa. Este sistema metabólico consume energía (ATP) procedente de la glucólisis anaerobia. (Álvarez y cols., 1997; Elishkevitz y cols., 2002; Labrousche y cols., 1996; Mandori y col., 2002)

C. Metabolismo nucleotídico.

Junto a las enzimas glucolíticas, el eritrocito dispone de otras enzimas que también contribuyen al mantenimiento de la llamada mezcla de nucleótidos adenilicos: ATP y en mucho menor proporción ADP y AMP . Entre las enzimas destacan la adenilato cinasa (AK), la ATPasa , la adenosina diaminasa (ADA) y la pirimidina-5-nucleotidasa. AK y ATPasa contribuyen a reciclar el ADP a partir de ATP generado en la glucólisis. Tanto la AK como la ADA utilizan como sustrato a la adenosina. La pirimidina-5-nucleotidasa interviene en la degradación del RNA , y su déficit produce acumulación intraeritrocitaria de nucleótidos, que interfiere en la degradación normal del RNA y en la actividad de las enzimas clave de la glucólisis anaerobia disminuyendo la producción de ATP . (Álvarez y cols., 1997; Elishkevitz y cols., 2002; Mandori y col., 2002; Waczulíková y cols., 2002)

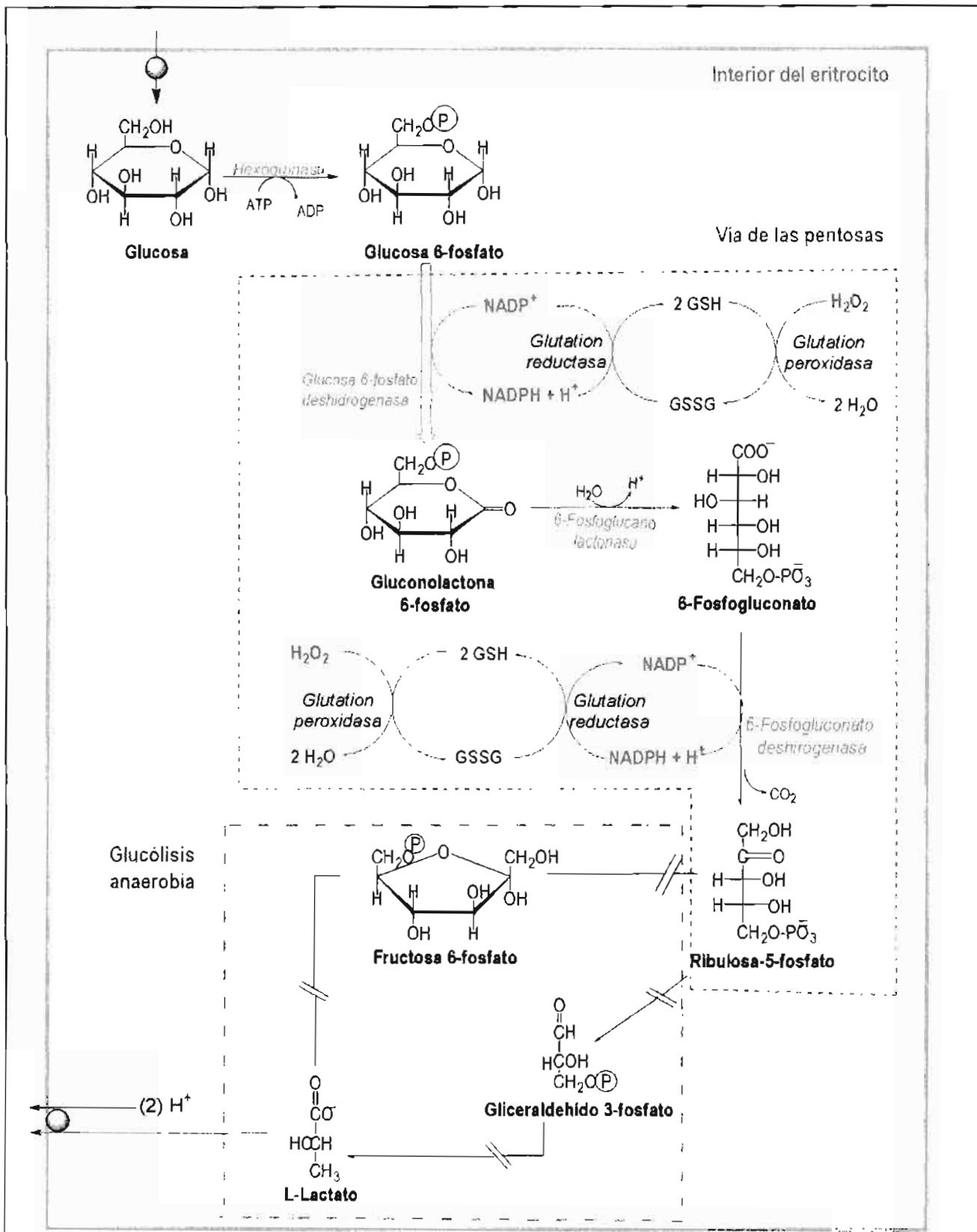


FIGURA 6. Vía de las pentosas y su relación con el ciclo del GSH. Después de que la glucosa atraviesa la membrana plasmática del eritrocito, puede tomar la vía alterna de las pentosas, a través de la cual provee NADPH al ciclo redox del GSH.*

*Devlin (2002) Textbook of Biochemistry with clinical correlations

D. Sistema de diaforasas.

El mantenimiento de la función respiratoria de la hemoglobina, requiere que el hierro hémico se halle en estado reducido, lo cual es regulado por la enzima metahemoglobina reductasa del citocromo B5.

El eritrocito normal posee 2 sistemas diaforásicos: el principal y el secundario. En el principal interviene la citocromo B5 reductasa que utiliza el NADH, en el secundario el NADH permanece inactivo. La citocromo-B5-reductasa esta presente en un gran número de células del organismo y cataliza la transferencia de electrones desde el NADH al citocromo B5, que los cede directamente al hierro hémico, manteniendo su estado reducido. (Álvarez y cols., 1997; Elishkevitz cols., 2002; Waczulíková y cols., 2002)

2.3. Viscosidad sanguínea en los pacientes diagnosticados con DM.

El aumento de la viscosidad sanguínea, aun en diabetes de precoz comienzo, se refleja por la reducción en la flexibilidad de los eritrocitos, así como en los cambios de las proteínas plasmáticas que favorecen la agregación de los hematíes. La viscosidad sanguínea se puede definir cualitativamente como la resistencia al flujo a consecuencia de una fricción interna. Es decir, cuanto mayor es la resistencia al flujo, mayor es la viscosidad de la sangre. Las diferentes técnicas de medición han permitido establecer ciertas características reológicas de la sangre. Ésta presenta un comportamiento "pseudoplástico", es decir, su viscosidad aumenta a medida que disminuye su velocidad de flujo. Se sabe también que la velocidad de la sangre aumenta cuando disminuye el diámetro del capilar en el que fluye; así, cuando el diámetro del capilar se aproxima al de los hematíes, la viscosidad aparente de la sangre alcanza su valor mínimo. Este comportamiento muy particular de la sangre, está ligado a la deformabilidad de los eritrocitos. Cualquier aumento de la rigidez de los hematíes, aumenta también la viscosidad sanguínea en el ámbito de la micro circulación. (Manodori y col., 2002; Labrouche y cols., 1996; Schmid-Schönbein y col., 1976; Racek y cols., 2001; Tedesco y cols., 2000). Por tanto, a una determinada velocidad de flujo, el aumento de la viscosidad de la sangre depende de:

- a) Un incremento del recuento de eritrocitos (hematocrito).

- b) Un incremento de la agregación de los mismos.
- c) Una reducción de la deformabilidad eritrocitaria.
- d) Un aumento de la concentración de las proteínas plasmáticas, sobre todo del fibrinógeno, las globulinas y alteraciones de la albúmina.

a) Hematocrito

El hematocrito es menor en la micro circulación que en los grandes vasos, debido a que aumenta la velocidad de circulación y por eso aparenta ser menor; los hematíes jamás entran en contacto con el endotelio de los vasos debido a que existe una membrana plástica que actúa como lubricante y que facilita el desplazamiento, su orientación, y por consiguiente, su deformación para poder atravesar el capilar. Todas estas observaciones han hecho pensar que la ligera anemia que se produce en el paciente diabético, es un mecanismo compensador para disminuir la viscosidad sanguínea y aumentar la perfusión de los tejidos. (Manodori y col., 2002; Labrousche y cols., 1996; Racek y cols., 2001; Tedesco y cols., 2000)

b) Agregación eritrocitaria.

La agregación eritrocitaria es el factor que más contribuye en la viscosidad de la sangre que fluye a baja velocidad. Cuando disminuye la velocidad de deslizamiento los eritrocitos se agregan formando "rouleaux" semejando pilas de monedas. Esta pila a su vez puede asociarse lateralmente a otra y conducir a formaciones tridimensionales. Cambios similares también ocurren en la estructura de la sangre durante la medida de los valores de sedimentación y si la tendencia de la agregación es manifiesta, la eritrosedimentación se eleva. La agregación se produce en forma creciente si se agrega albúmina, globulinas y fibrinógeno. (Labrousche y cols., 1996; Schmid-Schönbein y cols., 1976; Racek y cols., 2001; Tedesco y cols., 2000)

c) Deformabilidad eritrocitaria.

En la sangre, la deformabilidad de sus hematíes, depende de las propiedades de la membrana celular y de las características reológicas del medio intracelular.

e) Viscosidad del plasma.

Ha sido establecido que la viscosidad plasmática se debe a la concentración y forma de varias moléculas protéicas componentes del plasma. Cada proteína interviene en la viscosidad ya sea a través de su concentración o su "efecto intrínseco". Así, las globulinas, tienen por su alta concentración un "efecto buffer" sobre la viscosidad plasmática; mientras que el aumento en los niveles de fibrinógeno y macro globulinas determinan un aumento considerable de la viscosidad, debido a su alto peso molecular y estructura tridimensional. Es interesante hacer notar que un estricto control de la glucemia, por períodos mayores de 24 horas produce una tendencia de la hiperviscosidad al retornar a los niveles de glucosa normales. (Manodori y col., 2002; Labrouche y cols., 1996; Schmid-Schönbein y col., 1976; Racek y cols., 2001; Tedesco y cols., 2000)

2.4. Estrés oxidativo y diabetes.

El estrés oxidativo se define como la pérdida del equilibrio entre la producción de oxidantes y la actividad antioxidante del sistema. Actualmente, diversos estudios han revelado que en los pacientes diagnosticados con DM el estado de hiperglucemia causa estrés oxidativo, debido a un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), glucosilación no enzimática de proteínas y autooxidación de glucosa. En ausencia de una adecuada respuesta que compense el mecanismo endógeno antioxidante, el sistema comienza a sobrecargarse (desequilibrio redox), conduciendo a la activación de un "estrés intracelular" que se traduce en todas las complicaciones propias de la enfermedad. (Evans, 2002; West, 2000; Martim y cols., 2003)

El papel del estrés oxidativo en la patogénesis de las complicaciones de la diabetes está sugerido por los hallazgos que muestran que los eritrocitos de diabéticos tienen una concentración de peróxidos lipídicos significativamente mayor, lo cual al alterar la fluidez de la membrana, los hace hipercoagulables y más propensos a adherirse a las células endoteliales produciendo en consecuencia aumento de la densidad sanguínea. La peroxidación lipídica de membrana se correlaciona con el contenido de hemoglobina glucosilada en los eritrocitos. La suplementación con altos niveles de vitamina E (900UI/día) reduce el daño a la hemoglobina, mejorando la respuesta de la insulina en

individuos diabéticos y normales. Los pacientes diabéticos generalmente muestran concentraciones séricas de ácido ascórbico más bajas que los controles sanos no diabéticos. La suplementación con vitamina C ha demostrado reducir la glucosilación de proteínas plasmáticas y algunos estudios de intervención recientes han demostrado que la vitamina C suplementada (100 mg/día) puede reducir la acumulación de sorbitol eritrocitario en los diabéticos. La magnitud de este efecto es similar a la de los fármacos que reducen la producción de sorbitol a partir de la glucosa. (Byers y col., 1995; Halliwell, 1996; Cadenas y col., 2002)

En 1995 el Grupo de Estudio de Diabetes y Nutrición (DNSG) perteneciente a la Asociación Europea de estudios de pacientes diabéticos (EASD) presentó los resultados de un estudio clínico múltiple realizado en 120 pacientes diabéticos, en el cual, se encontró un incremento en los niveles de los marcadores del estrés oxidativo, tales como peroxidación de lípidos, daños oxidativos en el DNA (se producen: 8-hidroxidesoxiguanosina, 8-hidroxiadenina, 7-metil-8-hidroxi-guanina), así como reducción en los niveles de antioxidantes como: glutatión, vitamina E y vitamina C (tabla 5). (Evans, 2002; West, 2000; Maritim y cols., 2003; Diabetes and Nutrition Study Group of the EASD, 1995)

TABLA 5. Marcadores de estrés oxidativo que se han reportado elevados en pacientes con diabetes mellitus.

- **Formación de MDA**
- Incremento en la formación de isoprostanos
- Incremento en la generación de hidroxiperóxidos lipídicos
- Oxidación elevada de LDL
- Cambios en las enzimas antioxidantes
- Alteraciones en el sistema redox (NADPH, glutatión, vitaminas antioxidantes, etc.)
- Incremento de la ruptura oxidativa del DNA

El incremento en los niveles de peróxidos lipídicos, hidroxiperóxidos lipídicos, oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) así como de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron localizados en el torrente sanguíneo particularmente en el plasma y los eritrocitos de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 1 y 2. (Sushil, 1989)

La peroxidación de lípidos asociada a la oxidación de LDL involucra la oxidación de glucosa, seguida por una glucosilación no enzimática de proteínas (glucación) e incremento en la generación de ROS. La glucación involucra la condensación de glucosa en el grupo ϵ -amino de la lisina, con un grupo α -amino de un N-terminal ó las aminas de ácidos nucleicos (Maritim y cols., 2003; Evans y otros, 2002).

Estudios *in vivo* revelan que en estados de hiperglucemia el estrés oxidativo se encuentra ya aumentado incluso antes de que se hagan latentes las complicaciones clínicas, lo que evidencia el hecho de que el estrés oxidativo juega un papel crucial en la patogénesis de estas complicaciones. Entre las diversas señales de activación del estrés oxidativo se encuentran incluidos el factor nuclear- κ B (NF- κ B), los productos finales de la glucosilación avanzada (AGE's) y sus receptores (RAGE's), así como la proteína cinasa C (PKC). En un estudio realizado en células endoteliales de bovino expuestas a condiciones de hiperglucemia, se reportó un incremento inicial en la producción de ROS intracelular, así como la activación de NF- κ B; subsecuentemente, se incrementó la actividad de PKC y se aumentaron los niveles de AGE's y sorbitol. Estos eventos respaldan lo publicado por Karin y Ben (2000), quienes señalan que una regulación aberrante de NF- κ B está asociada con enfermedades crónicas, entre las que se encuentran la diabetes y la aterosclerosis. El NF- κ B regula la expresión de un gran número de genes que regulan diversos factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias (como TNF- α) y de RAGE's entre otras. (Evans y cols., 2002)

Los AGE's son un grupo heterogéneo de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos formados a través de vías no enzimáticas. La formación de AGE's se encuentra incrementada en estados de hiperglucemia y de estrés oxidativo. Los AGE's unidos a sus RAGE's activan la señal del post-receptor generando radicales libres intracelulares, además promueven la activación de la expresión de genes, como el del factor de

crecimiento endotelial vascular (VEGF), el cual esta relacionado con el desarrollo de retinopatías y metástasis tumorales. Los AGE's también inactivan a las enzimas antioxidantes alterando sus estructuras y funciones, y promueven la generación de radicales libres. Por lo cual los AGE's no sólo son marcadores, sino que actúan como mediadores en el desarrollo de complicaciones vasculares tardías en la diabetes. (Evans y cols., 2002)

En los tejidos en los cuales se han desarrollado las complicaciones diabéticas, se encuentra incrementada la concentración de diacilglicerol, el cual es un activador alostérico de varias isoformas de PKC, por lo que al ser activadas regulan la vasculatura, el hígado y la retina. (Evans y cols., 2002; Obrosova y cols., 1997)

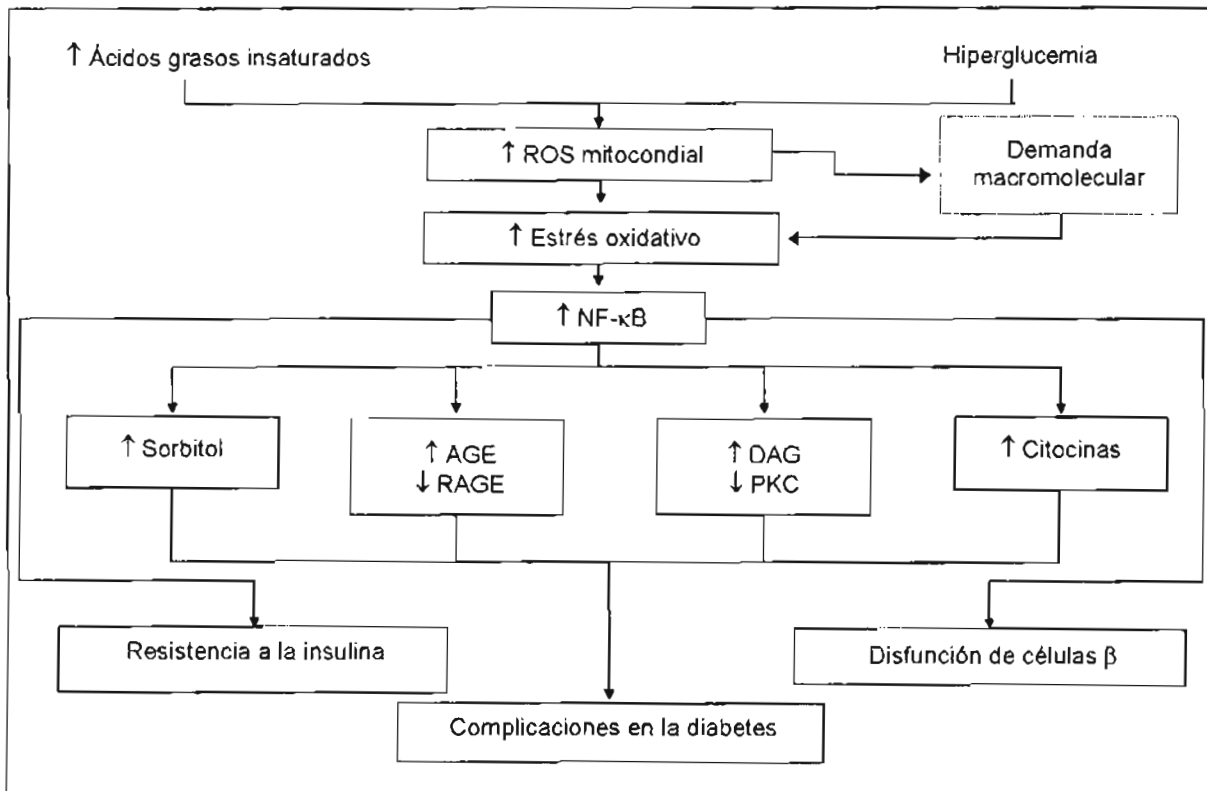


DIAGRAMA 1. Rutas propuestas por las cuales se generan las complicaciones características en la diabetes mellitus. NF-κB (factor nuclear-κB), PKC (proteínquinasa C), DAG (diacilglicerol), AGE (productos finales de la glucación avanzada), RAGE (receptores de los productos finales de la glucación avanzada)

Cuando la glucosa intracelular aumenta, la actividad de la aldosa reductasa es estimulada y cataliza la formación de sorbitol, el cual puede ser oxidado a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa. La importancia de la activación de la vía de los polioles,

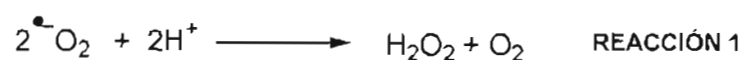
como una causa de las complicaciones diabéticas, ha sido demostrada en ratones transgénicos, en los cuales se ha sobre expresado el gen de la aldosa reductasa, y en los que se observó que la inhibición de esta enzima previene el desarrollo de retinopatías, neuropatías, nefropatías y cataratas. (Evans y cols., 2002; Dador y col., 1984; Obrosova y cols., 1997; Williamson y cols., 1993)

En el diagrama 1 se presenta una propuesta hecha por Evans (2002), de cómo la elevada concentración de ácidos grasos así como la hiperglucemia, promueven las fisiopatologías diabéticas, como consecuencia del aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS).

2.4.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS).

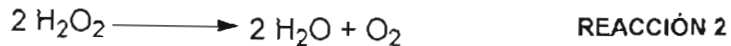
Del mismo modo que el oxígeno del aire es esencial para la vida, también puede formar parte de una gran variedad de las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS), que son, inevitablemente, producto del metabolismo normal aerobio. Concentraciones mínimas de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como en el sistema de señales intracelulares relacionado a la proliferación celular, la apoptosis y en la inmunidad; sin embargo, altas concentraciones o una eliminación inadecuada de ROS dan lugar al estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas ya que los radicales libres están involucrados en enfermedades crónicas tales como Alzheimer, Huntington, Parkinson y diabetes, entre otras. (Sushil, 1989; Matés, 2001; Loeckie, 1998; Halliwell y col., 1989)

Gran parte del oxígeno que llega a las células es reducido en el interior de las mitocondrias por el sistema citocromo oxidasa; sin embargo, una pequeña porción del oxígeno queda reducido parcialmente, presentando un electrón desapareado, convirtiéndose en una molécula inestable y altamente reactiva, denominada genéricamente anión superóxido (O_2^-), el cual forma parte de las ROS. El O_2^- es inmediatamente transformado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al adquirir dos protones, o bien, mediante las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y amino oxidasa (reacción 1). (West, 2000)

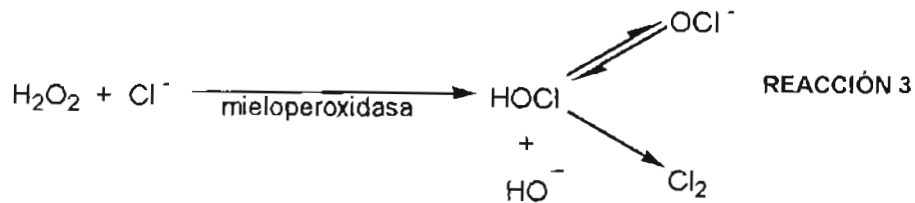


El destino del H₂O₂ puede seguir tres vías:

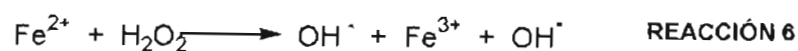
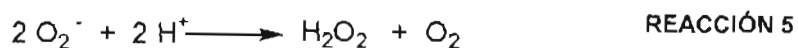
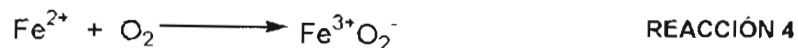
1. El H₂O₂ es reducido por acción de la enzima catalasa, la cual se encuentra en los peroxisomas (reacción 2); o bien, que sea reducido por la acción de la glutatión peroxidasa (GSH-px), la cual se encuentra en las mitocondrias y en el citosol de muchas células.



2. En presencia de cloro a través del sistema enzimático de la mieloperoxidasa de los leucocitos se forma ácido hipocloroso (anión hipoclorito). El ácido hipocloroso es el radical más tóxico y la especie mas reactiva formada por los fagocitos (reacción 3). Su efecto tóxico se ejerce también sobre células normales pudiendo oxidar lípidos y proteoglicanos de las membranas celulares. Intracelularmente inhibe los citocromos con lo que se impide la cadena respiratoria.



3. En presencia de hierro se forma un radical hidroxilo altamente tóxico para las células provocando la peroxidación lipídica, y produciendo ruptura o mutación del DNA (reacción 4 a 6). Esto es, que se desencadena la reacción de Fenton descrita por Ebadi en 1996 y Mattson en 1998 (reacción 6), de esta forma el hierro resulta un catalizador adecuado en la producción de intermediarios de la reducción parcial del oxígeno de alta reactividad.(Matés, 2001; Yorek, 2003)



Se ha observado que un estado diabético conduce a la depleción celular del sistema de defensa antioxidante, incrementándose así los niveles de ROS. Esta nueva certeza de la presencia de estrés oxidativo en estados de hiperglicemia es un importante impulso para el progreso en el tratamiento de la diabetes, ya que ofrece una opción terapéutica mediante el empleo de antioxidantes ó nutrientes con alta capacidad antioxidante. (Cadenas y col., 2002; Wolf, 1993; Wolf y cols., 1991; Kashiwagi y cols., 1994)

Recientemente Giardino y colaboradores reportaron que la formación de AGE's y la peroxidación de lípidos eran procesos estrechamente dependientes. La autoxidación de glucosa conduce a la formación de ROS y la regeneración de glutatión se disminuye en presencia de altos niveles de glucosa afectando entonces las defensas antioxidantes. Verdaderamente son diversas las rutas propuestas por las cuales se pueden generar las ROS en estados diabéticos y son muchas las evidencias experimentales que se han acumulado; sin embargo, el mecanismo exacto y la fuente por la cual son generadas las ROS en el sistema vascular aún no se conocen detalladamente. (Giardino y cols., 1998; Kashiwagi y cols., 1994)

2.5. Técnicas de detección y cuantificación del daño por estrés oxidativo.

La importancia de reconocer los diversos productos formados durante la lipoperoxidación radica en la posibilidad de seleccionar el método adecuado para la cuantificación del grado de estrés oxidativo presente. Las técnicas para determinar el estrés oxidativo pueden ser divididas en dos grandes grupos: 1) cuantificación directa de radicales libres y 2) cuantificación indirecta. Estas últimas son las más habituales y miden los productos de la reacción de los ROS en las distintas entidades biológicas, o bien determinan la concentración de pares redox del cociente GSSG/GSH. (Halliwell y col., 1989; Wheatley, 2000)

1) DETERMINACIÓN DIRECTA DE RADICALES LIBRES.

A) Técnica del "Spin trapping"

La vida media de los radicales libres es muy corta y su concentración muy baja, por lo que su determinación en muestras biológicas es extremadamente difícil. La técnica más

adecuada en estas condiciones es la resonancia paramagnética de electrones (RPE). La técnica de "spin trapping" intenta superar estos problemas mediante la adición de un compuesto diamagnético adecuado, el denominado "trap". Los compuestos diamagnéticos más utilizados son el N-tert-butil-alfa-fenilnitrona (PBN), N-óxido-5,5-dimetilpirrolina (DMPO) o el 2-metil-2-nitrosopropano (MNP). Estos compuestos, al reaccionar con las ROS, generan radicales nitróxido relativamente estables cuya determinación es bastante reproducible y específica. El mayor problema, especialmente en sistemas biológicos donde están sujetos a degradación por distintos sistemas enzimáticos, es que se acorta su vida media y por lo tanto se dificulta su cuantificación. (Asensi y cols., 1994; Pompella y col., 2000; Valgimigli y cols., 2001)

B) Técnicas histoquímicas

La enorme ventaja de estas técnicas es que permiten la determinación del estrés oxidativo *in situ*. Esto hace posible obtener información muy valiosa de los lugares de producción de ROS tanto en células como en tejidos, ejemplo de estas técnicas son:

◆ Visualización de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$

Estas sustancias pueden ser visualizadas mediante el método de cloruro de cesio y diaminobenzidina- Mn^{2+} , y algunas de ellas pueden ser incluso adaptadas para la detección de especies reactivas mediante microscopía confocal. (Pompella y col., 2000; Valgimigli y cols., 2001)

◆ Citometría de Flujo.

El análisis por citometría de flujo utiliza células u organelos subcelulares, como por ejemplo mitocondrias aisladas. En este caso, hay que tener en cuenta que el análisis de la actividad oxidativa puede ser complicado por la posibilidad de hallar múltiples formas de O_2 reactivo en la misma célula. Además, el óxido nítrico (NO) endógeno puede provocar cambios en las propiedades ópticas en el fluorocromo utilizado, que son iguales a las producidas por otras moléculas que reaccionan con el O_2 . El análisis cuantitativo es difícil debido principalmente a tres razones:

1. La concentración variable de metales, que pueden catalizar o inhibir reacciones de los radicales libres.
2. La alta concentración intracelular de glutatión, el cual puede formar radicales tiol o sulfinilo, o bien, atrapar o reducir ROS (H₂O₂).
3. La presencia de otros agentes colectores de radicales libres, como la espermina.

La rodamina, fluoresceína y otros fluorocromos pueden ser químicamente reducidos a formas no fluorescentes. Estos derivados no fluorescentes son fácilmente oxidados por alguna especie del O₂ a la forma parental fluorescente. De esta forma, pueden ser utilizados como pruebas fluorogénicas para detectar actividad oxidativa en células y tejidos. (Asensi y cols., 1994; Valgimigli y cols., 2001)

2) DETERMINACIONES INDIRECTAS.

Existen dos subtipos de determinaciones indirectas del estrés oxidativo: las que se realizan sobre productos resultantes de la combinación de ROS con otras biomoléculas y las basadas en el estado redox de los sistemas antioxidantes. El primer apartado es el más amplio y complejo de todos, pues incluye una gran cantidad de posibles parámetros de medida, sin embargo, aquí se discuten tan solo aquellos que tienen una mayor repercusión en la literatura. (Asensi y cols., 1994; Pompella y col., 2000; Valgimigli y cols., 2001; Fernández y cols., 1997; Márquez y cols., 1996; Yilmaz y cols., 2002; West, 2000)

◆ *Proteínas.*

La oxidación de las proteínas es un parámetro muy confiable que puede utilizarse en muestras biológicas tanto *in vivo* como *in vitro*. Existen multitud de situaciones tanto fisiológicas como patológicas donde se producen modificaciones oxidativas de las proteínas. El grado de estas modificaciones puede ser valorado mediante la determinación del contenido de CARBONILOS EN LAS PROTEÍNAS. En realidad, la oxidación de las proteínas puede producirse mediante procesos que oxidan y rompen la unión peptídica y aquellos procesos que modifican cadenas laterales, como por ejemplo por reducción de azúcares y lípidos asociados a las proteínas, que generan productos como la pentosidina o

el 4-Hidroxi-2-nonenal. El método más utilizado y reproducible para valorar el contenido de carbonilos en una muestra se basa en la reacción de éstos con la 2,4-Dinitrofenilhidrazina para formar 2,4-Dinitrofenilhidrazona, la cual puede ser detectada y cuantificada espectrofotométricamente o por inmunoquímica mediante ensayo de inmunoenzima o por Western Blott. (Asensi y cols., 1994; Wheatley, 2000; Pompella y col., 2000; Valgimigli y cols., 2001; West, 2000)

◆ *Lípidos.*

La formación de DIENOS CONJUGADOS es una de las consecuencias del ataque oxidativo a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), por lo que se ha empleado como un índice de la peroxidación lipídica, tanto en alimentos como en fluidos biológicos, sin embargo no debe asumirse que la cantidad cuantificada de dienos conjugados sea equivalente a la peroxidación lipídica, ya que existe interferencia de otras biomoléculas que absorben en la misma región del espectro. El método convencional para su determinación consiste en la extracción de los dienos conjugados de las muestras con una mezcla de cloroformo-metanol y midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 230-235 nm.

La cantidad de PERÓXIDOS LIPÍDICOS puede ser cuantificada principalmente de dos formas: 1) separando sus productos, o bien 2) midiendo simplemente los peróxidos totales en las muestras. Dentro de la primera opción se encuentra la CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS), en la cual además de cuantificar los peróxidos lipídicos, también se consideran los aldehídos, isopróstanos, colesterol, etc. El método general consiste en extraer los peróxidos de las muestras, los cuales son reducidos por borohidruro hasta sus respectivos alcoholes, posteriormente son separados por GC e identificados por MS. Dentro de la segunda opción se encuentra el MÉTODO DE LIBERACIÓN DE YODO, el cual es uno de los métodos más antiguamente empleados, se usa comúnmente en la industria alimenticia, los peróxidos lipídicos oxidan el I^- a I_2 . En presencia de un exceso de I^- , el ión triyodo (I_3^-) puede ser cuantificado a 358 nm. El H_2O_2 y las proteínas peroxidadas también pueden oxidar el I_2 . (Asensi y cols., 1994; Pompella y col., 2000; Valgimigli y col., 2001; Fernández y cols., 1997; Márquez y cols., 1996; Yilmaz y col., 2002; Wheatley, 2000)

Posiblemente, uno de los marcadores más extensamente empleados dentro del campo del estrés oxidativo, y particularmente dentro del grupo de ácidos grasos es el malondialdehído (MDA). Existen distintas formas de determinarlo, ya sea por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), por cromatografía de gases (GC) o bien, mediante la técnica espectrofotométrica de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). (Fernández y cols., 1997; Márquez y cols., 1996; Yilmaz y cols., 2002; West, 2000; Wheatley, 2000)

2.5.1. Técnica de TBARS.

El ácido tiobarbitúrico (TBA) es el marcador más extensamente empleado para medir la peroxidación de ácidos grasos, en membranas celulares e incluso en alimentos. El método se basa en la reacción de dos moléculas de TBA con una molécula de MDA con la eliminación de dos moléculas de agua (figura 7). El producto de reacción es un cromógeno rosa que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 532 nm. (Halliwell, 1989; Loeckie, 1988; Fernández y cols., 1997; Márquez y cols., 1996; Yilmaz y cols., 2002; West, 2000; Wheatley, 2000)

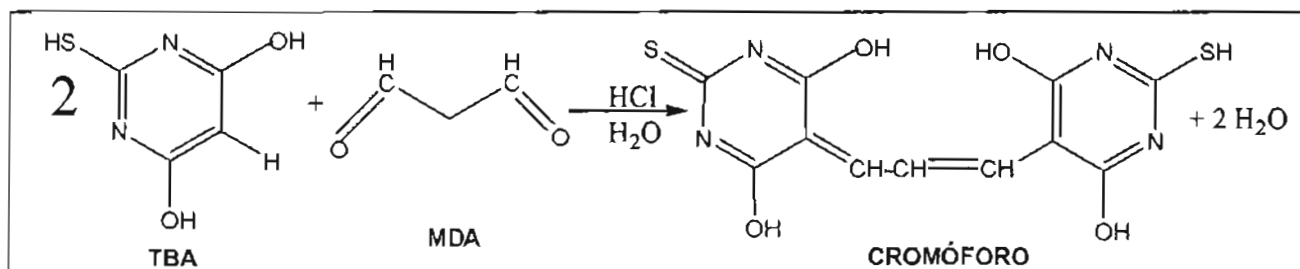


FIGURA 7. Reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) con malondialdehído (MDA) para formar un aducto rosa cuantificable espectrofotométricamente a 532 nm.

La concentración de TBARS es calculada interpolando la absorbancia obtenida a 532 nm en una curva estándar realizada con 1, 1, 3,3-Tetraetoxipropano (TEP) o bien con 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP), ya que el MDA se obtiene por hidrólisis ácida del TMP ó TEP en una reacción equimolar. La intensidad del color es una medida de la concentración de MDA, la velocidad de la reacción de TBA con MDA depende fundamentalmente de tres factores que se encuentran reportados en la bibliografía como determinantes para que se lleve a cabo la reacción; estos factores son:

1. Concentración de la solución de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), la cual incluye ácido tiobarbitúrico y ácido tricloroacético.
2. Temperatura a la que se lleva a cabo la reacción (estandarizada entre 95 y 100°C).
3. El pH del medio, el cual se recomienda que se encuentre por debajo de 3, por lo que generalmente se considera el uso de HCl ó H₂SO₄.

Quizá por su relativa sencillez, la técnica de TBARS ha sido empleada en diversas investigaciones donde se han analizado diversos fluidos biológicos de pacientes diabéticos. Soto y colaboradores (1994) reportaron que el MDA es significativamente más alto en pacientes diabéticos en comparación con los controles. Resultados similares fueron encontrados por Noberasco y col. (1982), y Galou y col. (1990), quienes encontraron que los niveles de MDA en el plasma de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 1 y 2 eran significativamente mas altos en comparación con los controles, aunque la diferencia entre los niveles plasmáticos del tipo 1 y 2 no diferían significativamente. Resultados controversiales fueron obtenidos al correlacionar la cantidad de triglicéridos y colesterol circulante con los niveles de MDA en suero de pacientes diabéticos hiperlipidémicos en comparación con pacientes normolipidémicos. Se encontraron niveles significativamente altos de MDA en orina en ambos grupos diabéticos en comparación con los controles, sin embargo, no se encontró correlación en los niveles de MDA de suero y orina (Fernández, 1997). En 1993 Akkus y colaboradores reportaron un incremento en la peroxidación de lípidos en leucocitos de pacientes diagnosticados con DM tipo 2, y en pacientes jóvenes diagnosticados con DM tipo I los niveles de MDA cuantificados por la prueba de TBARS fueron considerablemente altos ($p < 0.0002$). (Fernández y cols., 1997; Márquez y cols., 1996; Yilmaz y cols., 2002; Wheatley, 2000)

2.6. Peroxidación de Lípidos.

La peroxidación de lípidos (figura 8) es consecuencia común del estrés oxidativo y es probablemente, el proceso inducido por radicales libres que más se ha investigado, es un proceso degenerativo que afecta a los lípidos de la membrana, en la cual, los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA's) se presentan como blancos fácilmente accesibles a radicales endógenos. Una membrana celular cuyos lípidos han sufrido peroxidación se

torna rígida, pierde las funciones de sus canales y su integridad. (Loeckie, 1998; Sushil, 1989; Matés, 2001; Halliwell y col., 1989)

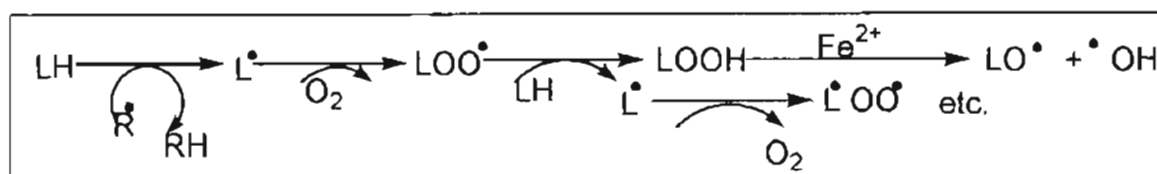
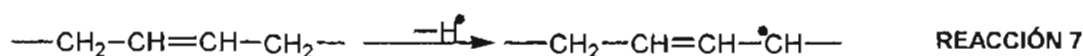


FIGURA 8. Reacción general de la peroxidación de lípidos. Reacción en cadena produciendo la formación de varios radicales. LH- lípido poli-insaturado, R[•]- radical sustrato, LO[•] - radical alcóxido, LOO[•] -radical peróxido, LOOH-hidroperóxido lipídico.

Los PUFA's son los más susceptibles a reaccionar con radicales libres. Debido a estas reacciones en cadena, un radical sustrato (R[•]) puede producir varios equivalentes de peróxidos de lípidos (LOOH). El proceso de peroxidación de lípidos comprende esencialmente tres pasos: iniciación, propagación y terminación.

1. Iniciación.

La reacción en cadena de la peroxidación de lípidos en una membrana ó ácido graso poli-insaturado se inicia al formarse un radical en un carbono central por el ataque de cualquier entidad química que tenga la suficiente reactividad para abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (-CH₂-). Ya que el átomo de hidrógeno tiene un sólo electrón, se producen carbonos con un electrón desapareado (-[•]CH-). La presencia de un doble enlace en un ácido graso debilita los enlaces C-H del átomo de carbono adyacente al doble enlace, facilitando la remoción del H[•] (reacción 7). (Halliwell y col., 1989; Wheatley, 2000)



2. Propagación.

El radical carbono producido en la etapa de iniciación tiende a estabilizarse mediante un rearrreglo molecular que produce un dieno conjugado, el cual reacciona con oxígeno triplete para producir radicales peróxido LOO[•] y alcóxidos LO[•]. Los radicales peróxidos pueden abstraer más hidrógeno de lípidos adyacentes por la acción de lipoxigenasas que

catalizan la conversión de ácidos grasos poli-insaturados para producir hidroxiperóxidos lipídicos ó endoperóxidos.

La formación de un endoperóxido a partir de un ácido graso poli-insaturado que contenga al menos tres metilenos sin dobles enlaces intercalados puede dar origen a la formación de malondialdehído (MDA) como producto de rompimiento por acción de radicales hidroxilo. Los metales de transición como el hierro o el cobre catalizan el rompimiento de hidroperóxidos a radicales que propagan la reacción, pero también pueden conducir a la formación de alcoholes secundarios, cetonas y aldehídos estables, incluyendo aquellos de cadena corta como el MDA (figura 9).

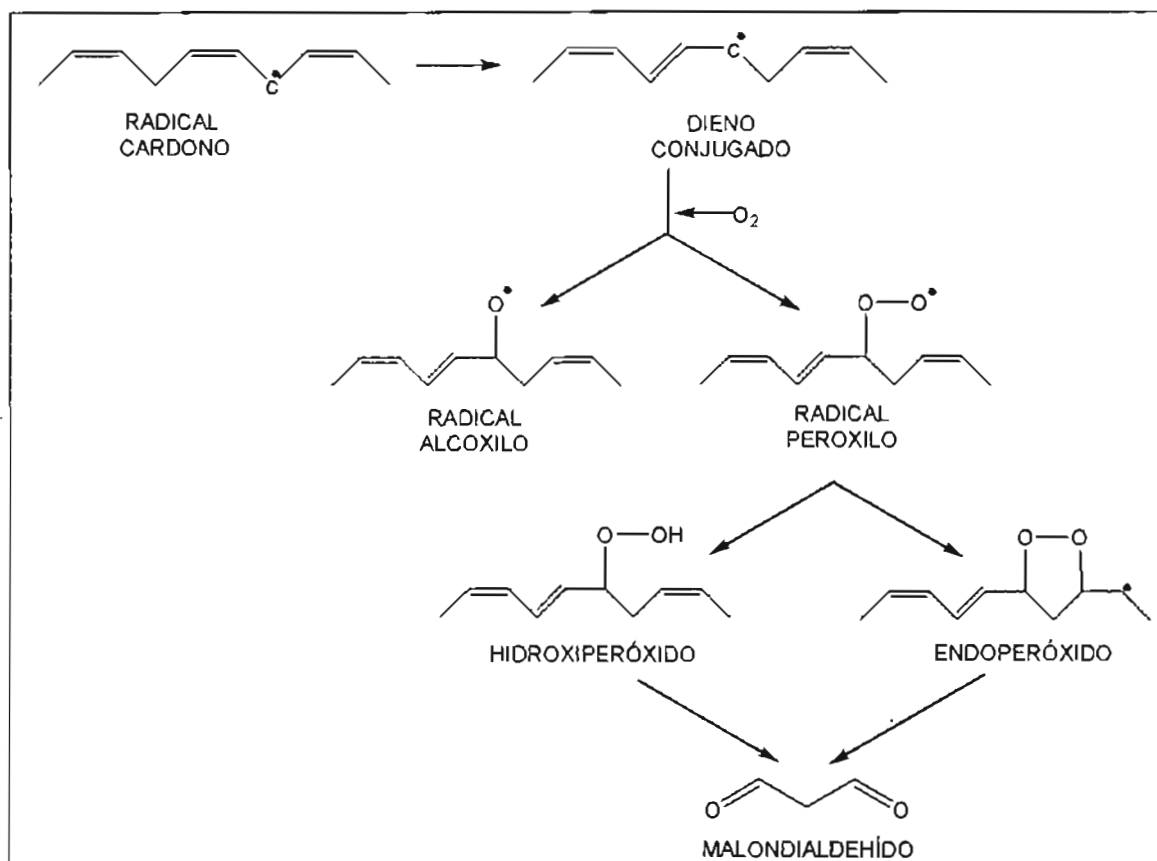
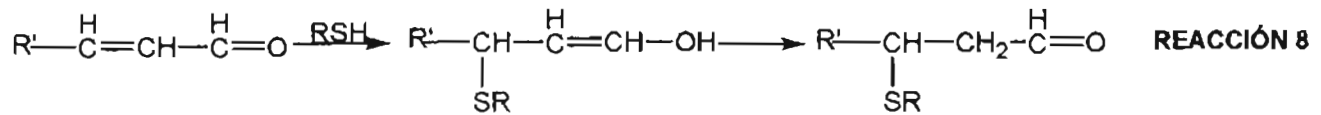


FIGURA 9. Reacciones de la etapa de propagación de la peroxidación de lípidos.

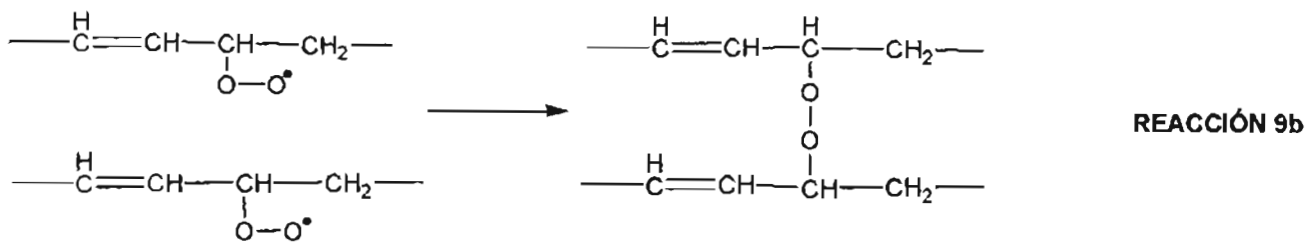
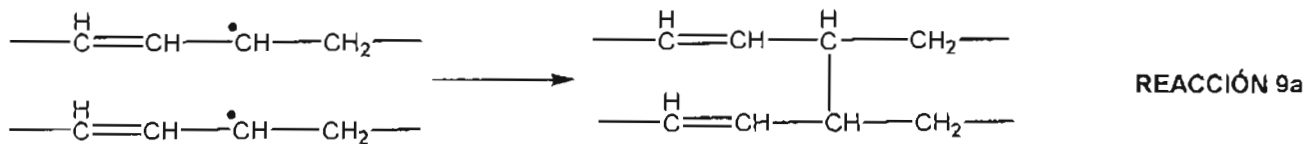
Los productos aldehícos pueden formar aductos con proteínas en concentraciones de nmol/mg (varía dependiendo del tipo de célula), esto se puede producir de dos maneras: por la acción de radicales libres, los cuales oxidan a las proteínas, o bien, por la adición de grupos tioles presentes en las proteínas, los cuales actúan sobre los dobles

enlaces (reacción 8). Esta reacción causa la inhibición enzimática responsable de la citotoxicidad de los aldehídos; los productos de peroxidación son metabolizados rápidamente, con lo cual, aumentan las concentraciones citoplasmáticas basales de estos aductos, inhibiéndose consecuentemente las enzimas antioxidantes. (Halliwell y col., 1989; Wheatley, 2000)

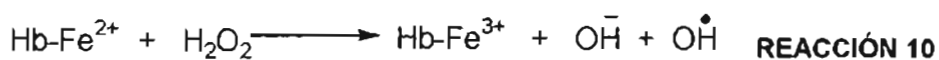


3. Terminación.

La reacción en cadena se termina por reacciones entre los radicales, produciéndose dímeros y una gran cantidad de polímeros (reacciones 9a y 9b).



En estados de hiperglicemia, el proceso de peroxidación de lípidos se produce de igual forma, desencadenándose por un aumento en los niveles de ROS; sin embargo en este caso, el efecto se hace mas patente y peligroso cuando la hemoglobina de los eritrocitos expuesta a una excesiva cantidad de peróxidos, libera iones hierro y promueve aún más la generación de iones $\cdot\text{OH}$ oxidando el hierro de la hemoglobina y produciendo metahemoglobina, una molécula incapaz de transportar oxígeno (reacción 10).



Así, las dos consecuencias fundamentales de la peroxidación de lípidos son:

- a) Que las membranas de los eritrocitos disminuyan progresivamente su capacidad de alargarse y estrecharse al pasar por pequeños capilares (deformabilidad), lo que altera la permeabilidad de los mismos y produce cambios en la actividad de las enzimas dependientes de lípidos, y finalmente los conduce a la hemólisis.
- b) Daños asociados a la toxicidad de los peróxidos de lípidos y sus productos de ruptura.

2.7. Glutación reducido (GSH).

El GSH junto con una larga serie de compuestos como el α -tocoferol (Vitamina E) y el ácido cítrico (Vitamina C), y enzimas tales como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutación peroxidasa (GSH-px), etc., forman el conjunto de sistemas antioxidantes celulares. Su función principal es proteger a la célula contra la acción de agentes oxidantes endógenos y exógenos, así como mantener la estabilidad de la membrana. El GSH también participa en el mantenimiento de la estructura de la hemoglobina, en la síntesis de proteínas en los reticulocitos, así como en la preservación de la integridad de algunas enzimas y proteínas de la membrana. (Sanchíz y cols., 1999; Ramazan y cols., 2000; Jain y cols., 2000; Santillán y cols., 1999; Januel y cols., 2003; Chen y col., 2002)

La síntesis del GSH ocurre de manera independiente a la síntesis ribosomal de proteínas, en la síntesis de glutación intervienen dos enzimas: γ -glutamilcisteinil sintetasa y glutación sintetasa. Ambas son dependientes de ATP y se encuentran localizadas en el citoplasma de las células de mamíferos. El intermediario, γ -glutamilcisteina esta presente en todas las células, comúnmente a concentraciones del orden micromolar (diagrama 2).

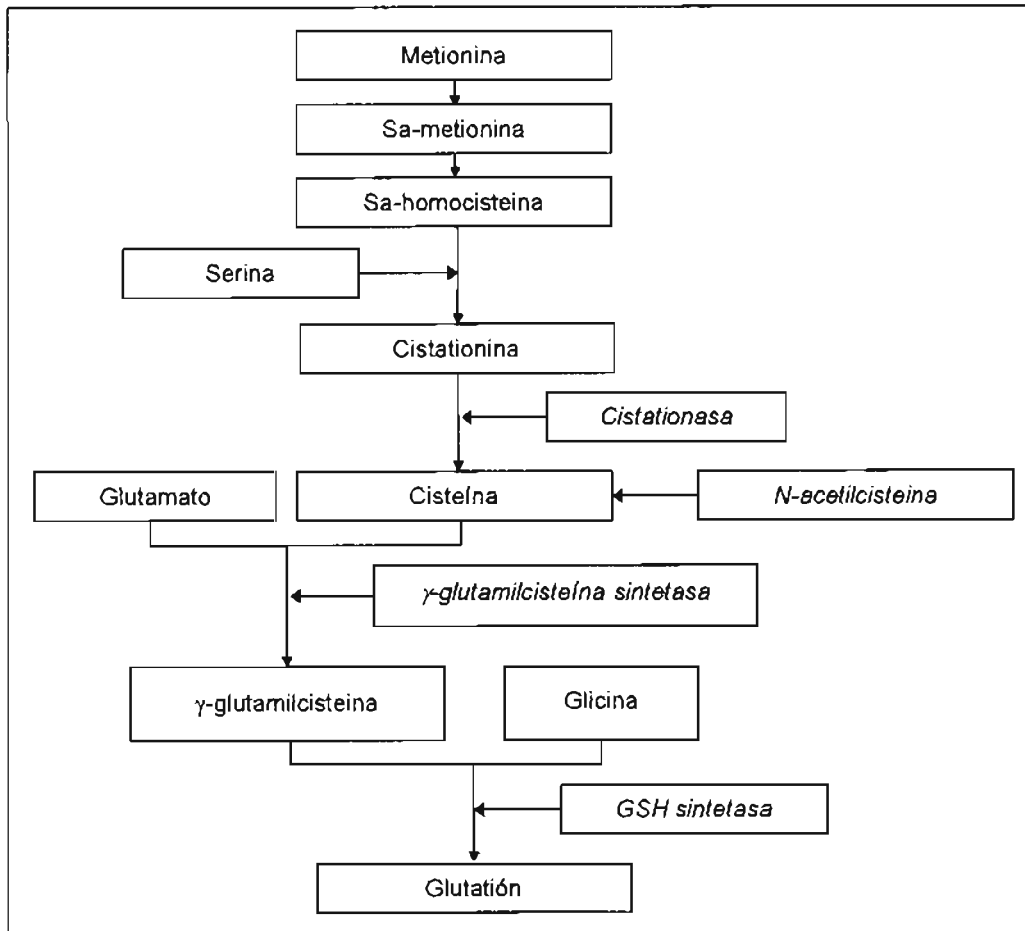


DIAGRAMA 2. Síntesis de glutatión (GSH) a partir de la metionina a través de la enzima intermediaria *γ-glutamilcisteína*.*

El glutatión es un tripéptido formado por los aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina (figura 10) que cumple una serie de funciones fisiológicas en el medio intracelular. Su molécula posee dos características especiales: la presencia de un enlace γ -carboxilato y un grupo tiol libre (-SH). El enlace γ -carboxilato une el glutamato a la cisteína y es la principal característica por la cual se nombra al GSH (γ -glutamil-cisteinil-glicina); este enlace impide que el GSH sea hidrolizado por las peptidasas y proteasas. Por otra parte, el grupo tiol de la cisteína es oxidado hasta la forma de disulfuro (GSSG), por lo que la molécula de GSH resulta ser un poderoso agente de reducción frente a sustancias tóxicas. (Sanchiz y cols., 1999; Ramazan y cols., 2000; Estrada y cols., 1999; Boon y cols., 1999; Jain y cols., 2000; Santillán y cols., 1999; Januel y cols., 2003)

*Sanchiz y cols., (1999.) Sanoarchivos de la Sociedad Española de Oftalmología

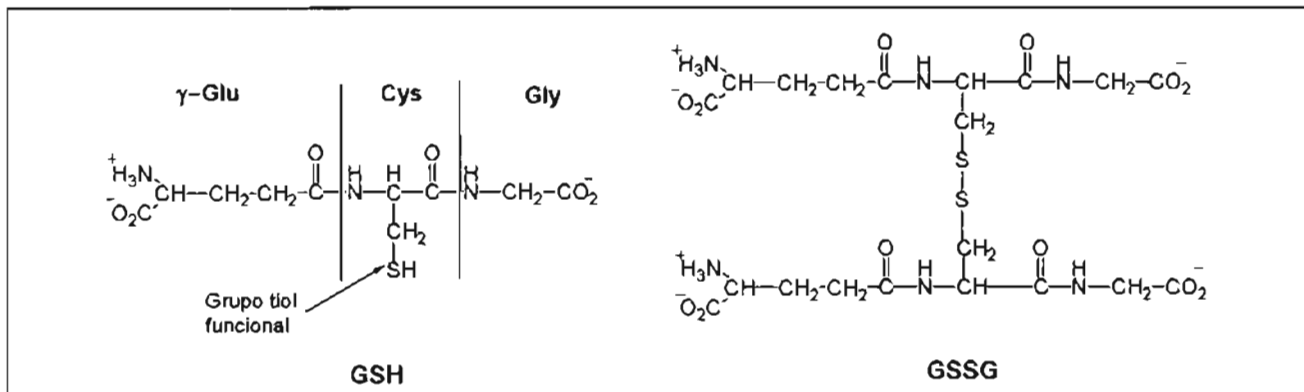


FIGURA 10. Estructura de GSH y GSSG. Como se aprecia el GSH es un tripéptido formado por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. El glutamato y la cisteína se enlazan por una unión isopeptídica entre el grupo γ -carboxilo del γ -glu y el grupo α -amino de la cys. El grupo -SH de la cys es la porción funcional de la molécula. Este grupo reacciona con electrófilos por lo que se oxida para formar el GSSG.*

2.7.1. Cuantificación de GSH.

El método habitual para la cuantificación de GSH se basa en el método de Ellman, este es un método muy sencillo que se basa en la determinación de la cantidad de grupos -SH presentes en el tejido estudiado. La reacción se lleva a cabo cuando una molécula del Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) que es reducida por el grupo -SH presente en el aminoácido cisteína del glutatión reducido (GSH), produce una molécula de Ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico por mol de GSH (figura 11), dado que esta es una reacción 1:1 es posible entonces determinar la cantidad de GSH presente por interpolación de una curva de calibración con estándar de GSH. (Sedlak y col., 1967; Akerboom y col., 1990)

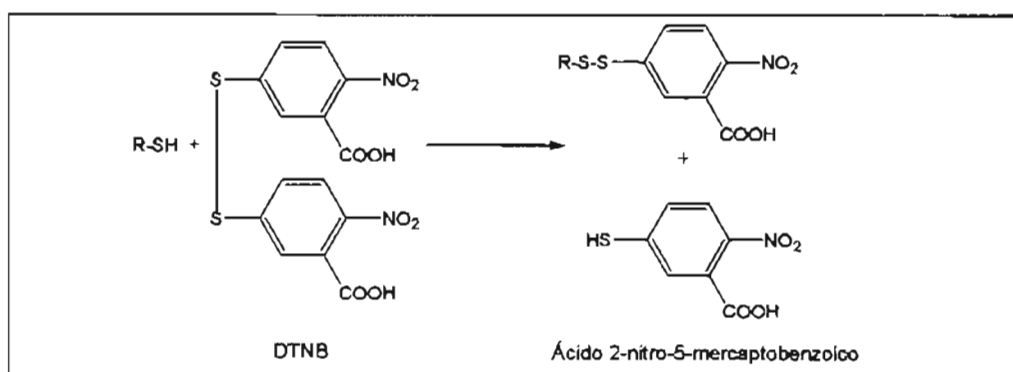


FIGURA 11. Reacción del DTNB con GSH (simbolizado como R-SH). El grupo -SH de la cisteína reacciona con el DTNB para formar el ácido nitromercaptobenzoico, molécula que presenta una coloración amarilla y que puede cuantificarse espectrofotométricamente.

El anión del ácido nitromercaptobenzoico produce un intenso color amarillo que puede ser cuantificado por espectrofotometría a una longitud de onda de 416nm. Sin embargo, es importante puntualizar que las condiciones óptimas para desarrollar este color dependen de la preparación del homogenado de cada tejido a estudiar. (Sedlak y col., 1967; Akerboom y col., 1990; Ching y col., 1974; Ramazan y cols., 2000; Estrada y cols., 1999; Boon y cols., 1999)

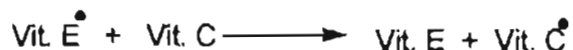
2.8. Antioxidantes.

Un antioxidante es cualquier sustancia presente en bajas concentraciones en comparación con un sustrato oxidable, que retarda ó previene significativamente la oxidación de este sustrato. El organismo cuenta con dos principales sistemas de defensa antioxidantes para eliminar los radicales libres:

1. Sistema enzimático: superóxido dismutasa (SOD) que elimina aniones superóxido, catalasa y peroxidasa que eliminan al H_2O_2 .
2. Sistema no enzimático: antioxidantes bioquímicos tales como α -tocoferol y vitamina C, los cuales además de su habilidad independiente para atrapar radicales, también actúan de forma sinérgica (reacción 11)



REACCIÓN 11



2.8.1. α -tocoferol (Vitamina E)

El α -tocoferol es considerado el mejor antioxidante en los tejidos del cuerpo, ya que es el primero en actuar en contra de la peroxidación de lípidos (figura 12). Protege a los PUFA's de las membranas celulares del ataque de radicales libres, y de esta manera impide cambios en la estructura y funciones de la misma. Además, la vitamina E regula la agregación plaquetaria por inhibición de la producción de prostaglandinas (tromboxano), también juega un papel importante en la regulación de la activación de la proteína cinasa C (PKC), funciones mitocondriales, metabolismo de ácidos grasos y proteínas, así como en la producción hormonal. (Gómez y cols., 1997; Halliwell, 1996; Jain y cols., 2000)

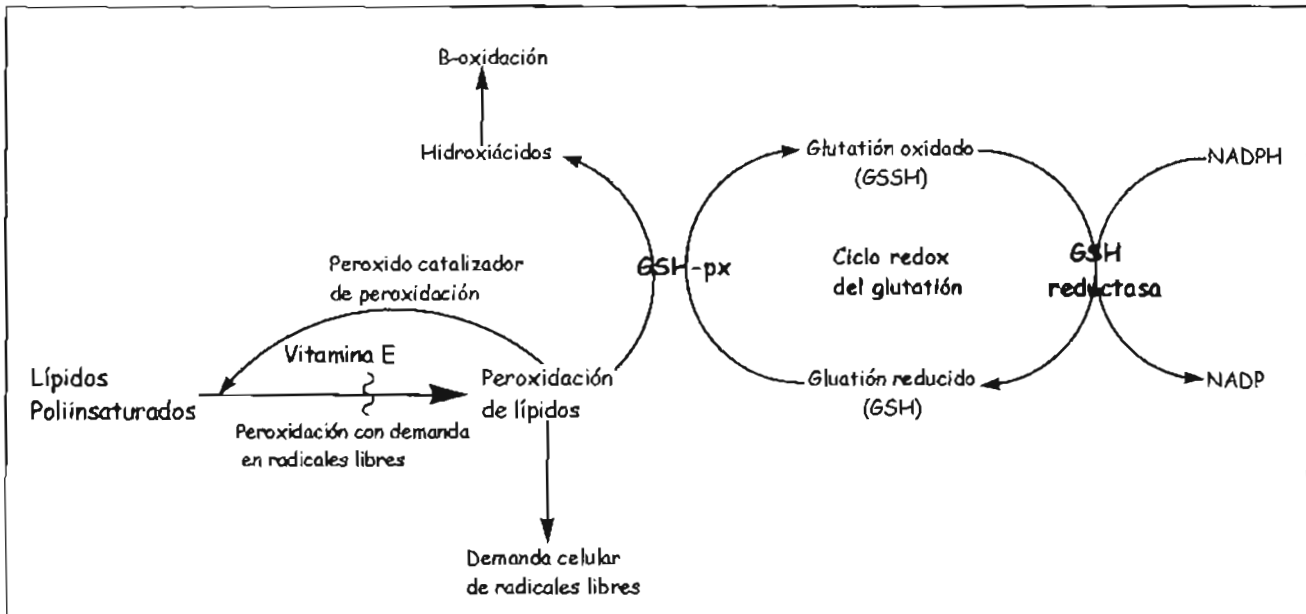


FIGURA 12. Inhibición de la peroxidación de lípidos. La peroxidación de lípidos (LPO) iniciada a partir de lípidos poli-insaturados (PUFA's) puede llegar a ser disminuida o retenida por acción de la vitamina E. Cuando las concentraciones de vitamina E no son suficientes y por consecuencia falla esta primera línea de defensa, interviene entonces el llamado ciclo redox del glutatión, mediante el cual, se eliminan los radicales libres formados durante la LPO.

Debido a su habilidad para reaccionar con radicales libres, la vitamina E es capaz de terminar reacciones en cadena entre ácidos grasos y los PUFA's en las membranas donde se encuentre. Esta actividad de "atrapador de radicales" es generalmente mayor para la forma de α -tocoferol, por lo que esta forma de vitamina E es la utilizada en suplementos nutricionales y fortificantes de alimentos con mayor frecuencia que otras formas de vitámeros de tocoferol de los alimentos. Al atrapar los radicales, la vitamina E se convierte a si misma en el radical tocoferoxil, pero debido a que este radical tocoferoxil es relativamente no reactivo, detiene el ciclo propagativo y destructor de la peroxidación lipídica. La vitamina E es el antioxidante liposoluble más abundante, sin embargo, está presente en menores cantidades que los PUFA's de membrana que protege, esto sugiere que la vitamina es reutilizada y es muy móvil dentro de las membranas. (Fee y cols., 1975; Gómez y col., 1997; Halliwell, 1996; Halliwell y col., 1989; Jain y cols., 2000; Tedesco y cols., 2000)

La vitamina E es transportada en el plasma por lipoproteínas, por lo cual el mecanismo del metabolismo de las lipoproteínas determina la liberación de la vitamina E a

los tejidos. Los tejidos periféricos pueden adquirir vitamina E de la dieta durante el catabolismo y pueden adquirir α -tocoferol siguiendo una secreción periférica por el hígado aumentado por las glucoproteínas de muy baja densidad las cuales son mediadas por las lipasas. Este mecanismo es particularmente importante para que los tejidos expresen la lipasa (músculo y cerebro). La vitamina E también puede ser intercambiada entre las lipoproteínas durante la lipólisis. (Halliwell, 1996; Halliwell y col., 1989)

Otro importante mecanismo por el cual se liberan tocoferoles a los tejidos es por los receptores de LDL. En este mecanismo intervienen fibroblastos con y sin receptores de LDL. Células eritrocíticas y tejidos como hígado y bazo, reemplazan rápidamente el viejo α -tocoferol por nuevo. Otros tejidos tales como corazón, músculo y espina dorsal lo renuevan muy lentamente. (Halliwell, 1996; Jain y cols., 2000)

2.8.2 Polifenoles y flavonoides.

Los polifenoles constituyen una amplia categoría de fitoquímicos y se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas comestibles por lo que son antioxidantes comunes en la dieta. La dieta fenólica incluye ácidos fenólicos, polímeros fenólicos (conocidos comúnmente como taninos), y flavonoides. Los ácidos fenólicos forman un grupo diverso que incluyen ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinámicos. Los polímeros fenólicos son compuestos de alto peso molecular como por ejemplo, los taninos condensados. Existen alrededor de 4000 flavonoides identificados hasta el momento, su estructura molecular consiste de un anillo aromático A, un anillo heterocíclico C y un segundo anillo aromáticos B (figura 13a). Todos ellos contienen grupos hidroxilo unidos a los anillos aromáticos, el cual le brinda su potente actividad antioxidante. Los flavonoides son divididos en dos grupos: antocianinas y antoxantinas. Las antocianinas, son glucósidos de antocianidinas y son los pigmentos de las plantas, son solubles en agua y se identifican fácilmente en los colores rojo, azul y púrpura de flores y frutos. Por el contrario las antoxantinas son descoloridas o bien presentan un color de blanco a amarillo; e incluyen flavonoles, flavonas, flavanonas e isoflavonas.

Los flavonoles son el grupo más amplio de los flavonoides, los más comunes son la quercetina, el kaempferol y la miricitina. La quercetina (figura 13b) es el principal

constituyente fenólico de las plantas y cuantitativamente el flavonoide más importante en la dieta; particularmente se encuentra en altas concentraciones en las cebollas, manzanas y en la col. (Moridani y cols., 2002)

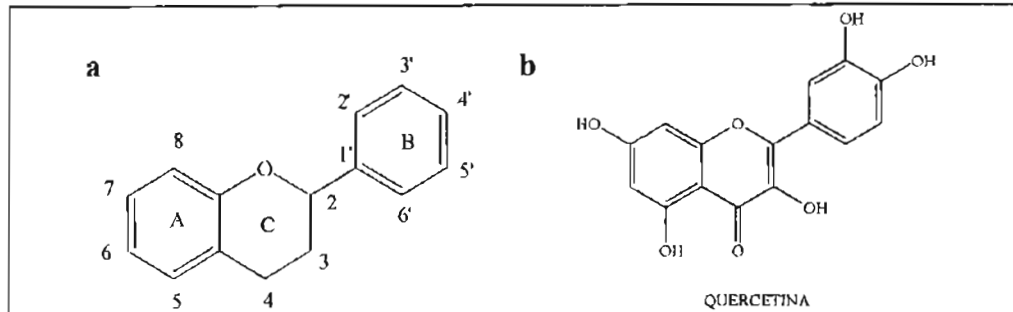


FIGURA 13. Flavonoides. a) estructura molecular característica de los flavonoides consistente de un anillo aromático A, un anillo heterocíclico C y un segundo anillo aromático B. b) Estructura molecular de la quercetina.

Los polifenoles protegen fácilmente a las células del estrés oxidativo que causa citotoxicidad. Además, estos compuestos presentan un amplio espectro de acciones tales como antitumorales, antivirales, antibacteriales, cardioprotectores y antimutagénicos (Moridani, 2002). Los efectos tóxicos de los polifenoles hacia las células tumorales se adjudican a la inhibición de topoisomerasas, fosfatidilinositol 3-cinasa y ciclos celulares. Los polifenoles y flavonoides pueden actuar también como sustratos de la peroxidasas y oxidasas polifenólicas, se produce quinona o quinonemetida del tipo prooxidante y/o productos alcalinizantes. (Moridani y cols., 2002)

El ácido nordihidroguayarático (NHG) (figura 14) se encuentra clasificado dentro de los polifenoles (Moridani M, 2002) y se considera un potente inhibidor de la lipoxigenasa; también se ha encontrado que inhibe el transporte de proteínas del retículo endoplásmico al aparato de Golgi. El primer y mayor efecto del NHG detectado hasta ahora es su acumulación en el compartimiento intermediario del aparato de Golgi. Sin embargo el NHG también se ha caracterizado por tener muchos otros efectos, producidos por una vía alterna a la inhibición de la lipoxigenasa. Estos efectos incluyen la inhibición del nitrilotriacetato férrico que es un mediador hepático y renal de la toxicidad y que promueve tumores renales (Anzar, 1999); bloquea la vía secretoria y endocítica de células dendríticas humana; modula la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial, activa al Ca^{2+} dependiente de K^+ en las células del músculo liso, induce la apoptosis en células

deficientes de lipo-oxigenasa vía oxidación de glutatión y despolarización mitocondrial, bloquea el transporte de proteínas de la vía secretora causando como ya se había mencionado redistribución de proteínas de Golgi dentro del retículo endoplásmico. (Fujiwara y cols., 2003; Lambert y cols., 2001; Moridani y cols., 2002)

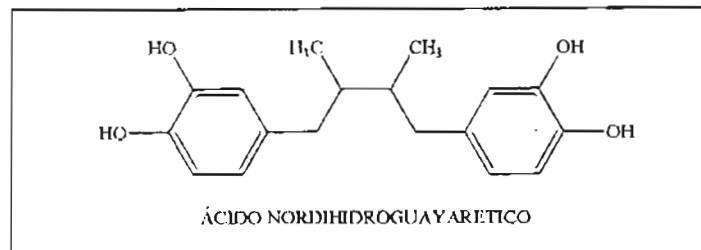


FIGURA 14. Estructura molecular del ácido nordihidroguayarético (NHG).

2.9. Inducción experimental de diabetes mellitus con aloxana.

La aloxana (2,4,5,6[1H, 3H] pirimidinetetrona) es un agente tóxico selectivo de las células β -pancreáticas; esta toxicidad a sido atribuida en parte a la acumulación de aloxana en los islotes de Langerhans y células β . El páncreas posee niveles relativamente bajos de enzimas, tales como, superóxido dismutasa (SOD), Mn-SOD, y glutatión peroxidasa (GSH-px), las cuales protegen a los componentes celulares de las especies reactivas del oxígeno. El mecanismo tóxico de la aloxana involucra un ciclo redox entre la aloxana y el ácido dialúrico (figura 15). La oxidación del ácido dialúrico en presencia de un catalizador metálico apropiado como el hierro, genera el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, producidas por reacciones del tipo Fenton. Específicamente, la reacción de aloxana con GSH genera $O^{\bullet-}$ y H_2O_2 , el radical hidroxilo se genera al liberarse hierro de la ferritina. Este mecanismo incluye la protección contra la toxicidad del aloxana en los islotes de Langerhans por SOD, catalasa y metales quelantes. (Katsumata y cols., 1993)

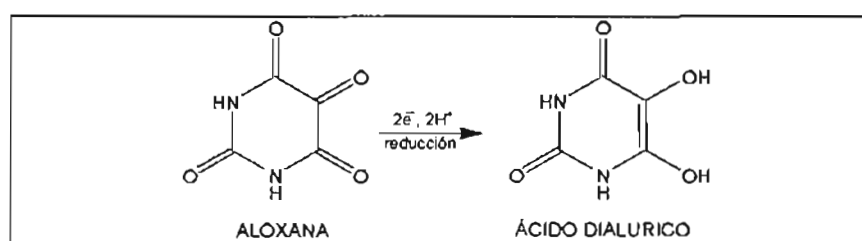


FIGURA 15. Reducción de la aloxana para producir ácido dialúrico, el cual es oxidado nuevamente a aloxana produciendo entonces $O^{\bullet-}$, H_2O_2 y $^{\bullet}OH$; estos radicales causan toxicidad de las células β pancreáticas, lo que provoca un estado diabético inducido.

III. Objetivos

3. Objetivos.

3.1 Objetivo general

- Determinar el efecto de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la concentración de glucosa en sangre, la peroxidación de lípidos y la actividad del glutatión reducido en ratas Wistar normales y diabéticas, y establecer si existe relación entre dichos efectos.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar la actividad *in vitro* de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam y estándares de referencia sobre las concentraciones de glucosa y volumen corpuscular medio, peroxidación de lípidos y glutatión reducido en sangre y eritrocitos de ratas Wistar, en estados normales y diabéticos.
- Estimar la actividad *in vivo* de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam y estándares de referencia sobre las concentraciones de glucosa y volumen corpuscular medio, peroxidación de lípidos y glutatión reducido en sangre y eritrocitos de ratas Wistar, en estados normales y diabéticos.

IV. Justificación

4. Justificación.

La DM es una enfermedad crónico-degenerativa padecida por cerca de 143 millones de personas en el mundo y para la que hasta ahora no existe cura. Actualmente la DM es la tercera causa de muerte en México y se estima que para su tratamiento se invierten más de 100 millones de pesos anualmente. Las personas que padecen esta enfermedad están propensas a sufrir una serie de complicaciones graves que pueden derivar en incapacidad ó muerte. El desarrollo de algunas de estas complicaciones como nefropatías, retinopatías y neuropatías, parece estar relacionado con los altos niveles de glucosa en sangre, que es la principal característica de la enfermedad.

Lo anterior ha conducido a que en el tratamiento de la DM se considere como de primordial importancia reducir y controlar los niveles de glucosa en sangre y así, han surgido medicamentos como las sulfonilureas, biguamidas, tiazolidinedionas o inhibidores de las α -glucosidasas que son empleados solos o combinados para conseguir dicho fin. Sin embargo, estos tratamientos son costosos y un gran número de enfermos no tienen acceso a ellos por lo que recurren a otros, principalmente a la herbolaria. Afortunadamente México es un país con una gran biodiversidad y una rica tradición herbolaria. La conjunción de estos dos factores resultan en un gran número de plantas que se consideran medicinales, entre ellas se registran 179 especies (Aguilar, 2002) a las que se atribuyen propiedades hipoglucemiantes. Sin embargo, estas propiedades requieren ser validadas mediante estudios científicos serios, que valoren además su toxicidad y que establezcan las dosis en que puedan ser usadas. Una vez hecho esto se contará con un recurso eficaz, seguro y de bajo costo para controlar la enfermedad.

Con base en lo anterior se pretende evaluar el efecto de 8 extractos de diferentes partes constitutivas de *Physalis chenopodifolia* Lam para establecer si esta especie posee actividad hipoglucemiante y en qué parte se concentra el compuesto activo. Además, considerando que la DM está asociada con un incremento en la formación de radicales libres y que los eritrocitos de los pacientes diabéticos presentan alteraciones en la fluidez de la membrana por incremento en la peroxidación de lípidos, se plantea evaluar el efecto de los extractos sobre este proceso. Estas valoraciones se harán en eritrocitos de ratas diabéticas y normoglucémicas. Finalmente, se determinará si existe relación entre los resultados de los diferentes experimentos.

V. Hipótesis

5. Hipótesis.

- El efecto hipoglucemiante de diversas partes constitutivas de *Physalis chenopodifolia* Lam reportado por la medicina tradicional, esta relacionado con la disminución en el proceso de la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas normales y diabéticas.

VI. Desarrollo Experimental

6. Desarrollo Experimental.

6.1. PRIMERA PARTE. *Desarrollo de los métodos de cuantificación.*

6.1.1. Desarrollo del método de cuantificación de peroxidación de lípidos (LPO).

a) Animales.

Para los ensayos en eritrocitos tanto *in vitro* como *in vivo* se emplearon ratas Wistar macho con un peso promedio entre 250-300g, donadas por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. Las ratas se mantuvieron a una temperatura ambiente de 25°C con ciclos de 12 horas luz/oscuridad, fueron alimentadas con Prolab RMH2500 (Lab Diet®) con libre acceso de agua.

b) Protocolos experimentales.

Para desarrollar el método de cuantificación de peroxidación de lípidos se usaron diferentes protocolos en los que se emplearon eritrocitos, fantasmas de eritrocitos ó plasma de sangre obtenida por punción cardiaca de ratas que fueron anestesiadas intraperitonealmente con fenobarbital sódico (20 mg/kg). La sangre fue depositada en tubos humedecidos con heparina e inmediatamente fueron centrifugados a 3200 rpm a 4°C durante cinco min. Posteriormente se decantó el sobrenadante y los eritrocitos fueron lavados dos veces con amortiguador de fosfatos pH 7.4 (1:1 v/v).

- **Ensayos con eritrocitos.**

En tubos de rosca y protegidos de la luz se agregaron 100 µl de eritrocitos a los que se les adicionó como inductor de LPO al 2,2'-Azobis (2-metilpropionamida) dihidroclorato (compuesto AZO), FeSO₄ ó H₂O₂ y se dejaron incubar de 30 a 120 min. a 37°C. Posteriormente se adicionó ácido tricloroacético (TCA) para llevar a cabo la desproteinización de los eritrocitos. A continuación los tubos fueron centrifugados a 3200 rpm durante tres min. y posteriormente se tomaron 2 ml del sobrenadante los cuales fueron

depositados en tubos protegidos de la luz a los que se les agregó ácido tiobarbitúrico (TBA) y finalmente la reacción se llevó a cabo en un baño de agua a ebullición ($90\pm 5^{\circ}\text{C}$). Las proporciones de TCA, TBA y el tiempo de reacción variaron de acuerdo a las técnicas descritas en la literatura. (Fee y col, 1975; Yilmaz y col, 2002; Yagi, 1984; Sushil y col., 1989; Quinlan y col., 1988)

- **Fantasmas de eritrocitos.**

Los fantasmas de eritrocitos se obtuvieron por lisis hipotónica empleando 9 volúmenes de Tris (17 mM pH 5-EDTA 0.1mM) por volumen de eritrocitos. Una vez obtenidos los fantasmas se tomó 1 ml de éstos y se depositaron en un mortero al cual se adicionaron pequeñas cantidades de hielo seco para macerar y homogenizar los fantasmas. Posteriormente se adicionaron 2 ml de solución Alsever's (dextrosa 0.116M, NaCl 0.071M, citrato de sodio 0.027M y ácido cítrico 0.002M). A continuación se tomaron 3 ml de la solución de fantasmas y se les agregó FeSO_4 ($0.15 \mu\text{M}$). También en este protocolo se variaron las proporciones de TCA y TBA con la finalidad de ver que técnica era la mejor en producir el cromóforo formado por la LPO.

Los blancos tanto en los eritrocitos como en los fantasmas de eritrocitos fueron agua desionizada ó n-butanol cuando se extrajo el cromóforo, las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 532 nm en un espectrofotómetro "Genesis".

- **Plasma.**

También se llevaron a cabo pruebas con plasma para medir la LPO. Se colocaron 500 μl en tubos cubiertos de la luz y se les adicionó compuesto AZO (50mM) ó FeSO_4 ($0.15\mu\text{M}$). Se dejaron incubar a 37°C por 2 horas y transcurrido este periodo se adicionaron 4 ml de una mezcla cloroformo-metanol (2:1) y se agitaron vigorosamente en vortex. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min., transcurrido el tiempo se desecho la fase inorgánica. Se tomaron 2.5 ml de la fase orgánica y se agregó 1 ml de agua desionizada y se dejó reposar por 5 min. en un baño de hielo. Transcurrido el tiempo, los tubos eran centrifugados a 5,000 rpm por 5 min. Finalmente se tomó 1 ml del

sobrenadante y se leyó a una longitud de onda de 240nm con 370 nm de excitación y 430 nm de emisión con un slit de 15. Como blanco se empleo agua desionizada.

c) Inductores de LPO en eritrocitos de ratas.

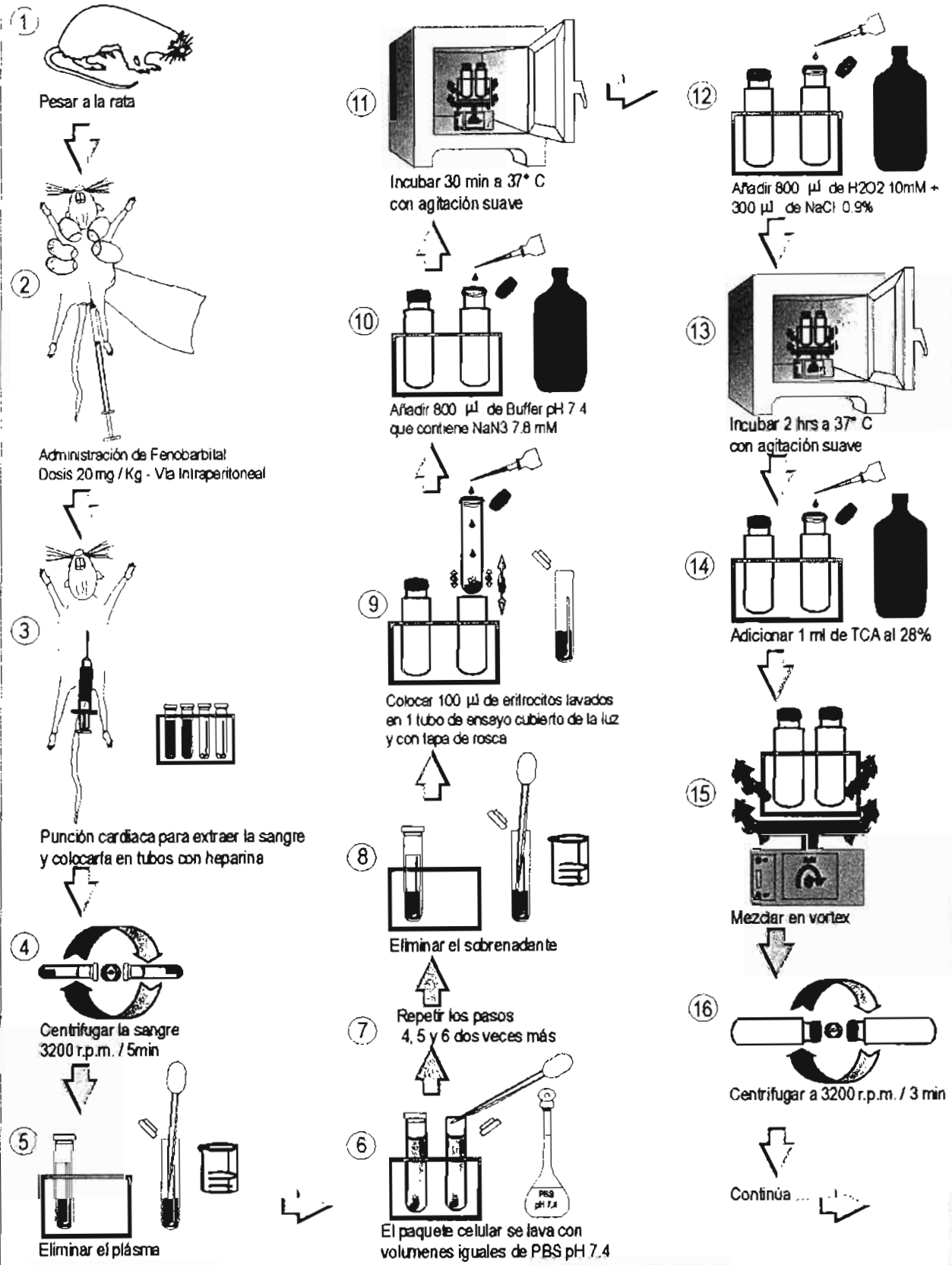
Se realizaron barridos espectrofotométricos con los tres inductores de peroxidación: FeSO₄, H₂O₂ y compuesto AZO, a diferentes concentraciones. Para ésto, se colocaron 100 µl de eritrocitos en un tubo de ensaye con tapa rosca y protegidos de la luz a los que se les adicionó: compuesto AZO 50, 100 y 200 mM, FeSO₄ 0.10, 0.15 y 0.20 µM ó H₂O₂ 400 y 526 µM. Posteriormente, las muestras se incubaron a 37°C con agitación suave durante 2 horas, finalizado el tiempo, a cada tubo se le adicionó 1 ml de TCA al 1%, se agitaron vigorosamente en vortex por 1 minuto y se centrifugaron por 3 min a 3200 rpm; a continuación, se tomó 1 ml del sobrenadante y se colocó en otro tubo protegido de la luz y se adicionó 1 ml de TBA, en seguida los tubos fueron colocados en un baño de agua a ebullición (90±5°C) por 15 min.. Finalizado el tiempo de incubación, los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y una vez fríos, se les adicionó 2 ml de n-butanol y se agitaron, posteriormente se eliminó la fase inorgánica y extrajo la fase orgánica, a la cual se le realizó un barrido espectrofotométrico determinando la longitud de onda de máxima absorbancia.

Posteriormente, se determinó la concentración inductiva media (CI₅₀) del H₂O₂ a través de la realización de curvas concentración-respuesta usando concentraciones logaritmicas (1 a 5 µM), y de esta manera determinar la ecuación lineal. La CI₅₀ se obtuvo sustituyendo los valores de la ecuación 1 con los obtenidos en la ecuación de la recta.

$$CI_{50} = \frac{y_{50}^{-a}}{b} \quad \left. \vphantom{CI_{50}} \right\} \text{ ECUACIÓN 1}$$

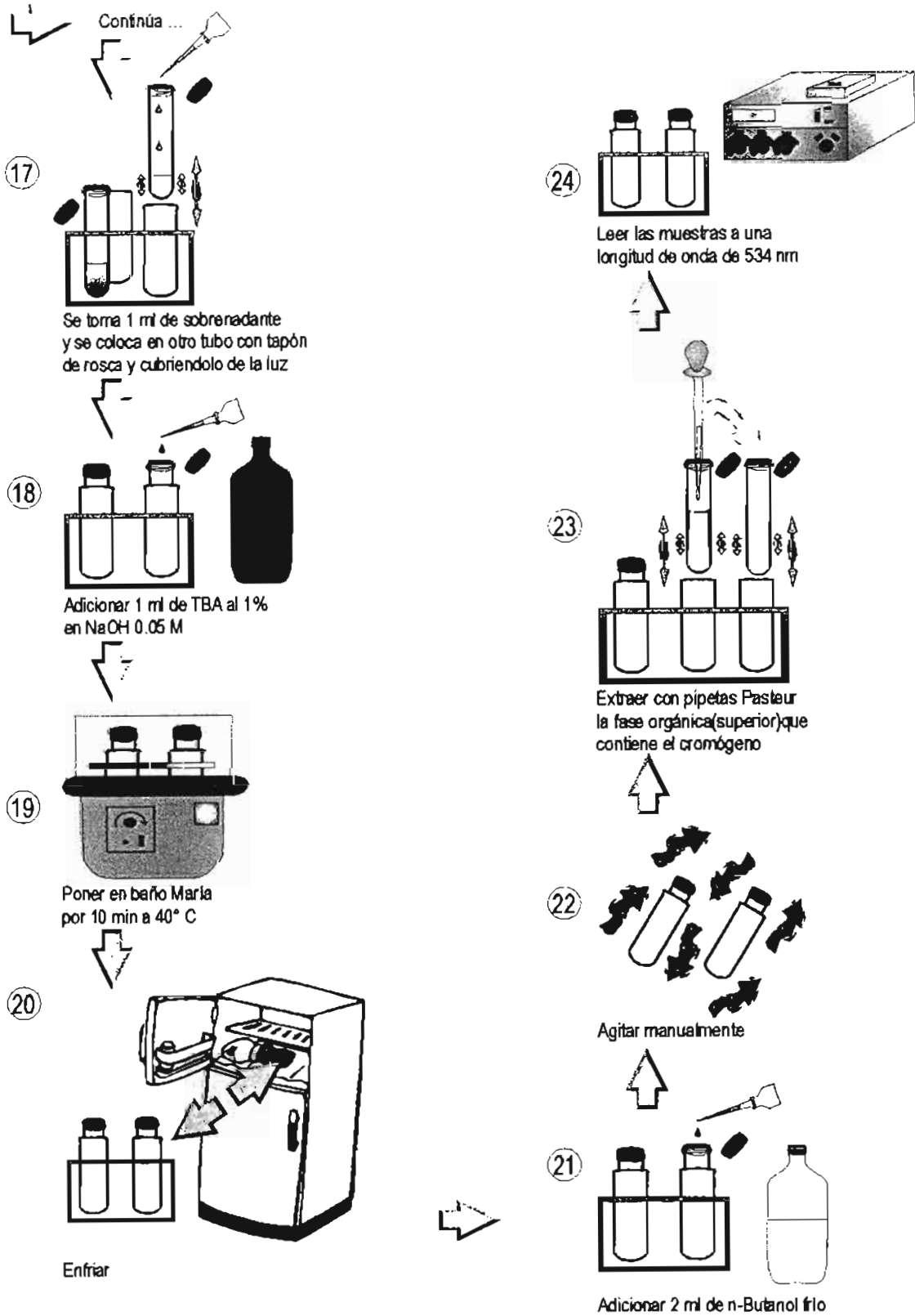
Finalmente, la metodología realizada para la cuantificación de los niveles de peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas fue una modificación de la técnica reportada por Quintan y Halliwell (1988) y se presenta en el esquema 1.

Esquema 1. Metodología para la cuantificación de Peroxidación de Lípidos en eritrocitos. (1 de 2)





Esquema 1. Metodología para la cuantificación de Peroxidación de Lípidos en eritrocitos. (2 de 2)



6.1.2. Curva de calibración para la cuantificación de malondialdehído a partir de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano.

Se prepararon 25 ml de una solución stock de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP) a una concentración de 5 mM en una solución de H₂SO₄ al 1%, una vez preparada la solución, se protegió de la luz y se dejó hidrolizar por 2 horas; transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota de 20 μ l y se aforo a 50 ml con agua desionizada para obtener así una solución secundaria con una concentración de 2 μ M, a partir de la cual se realizaron diluciones para obtener las siguientes concentraciones: 1.5, 1.125, 0.850, 0.635, 0.475 y 0.360 μ M.

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1.5 ml de cada concentración preparada y se colocaron en tubos de ensaye protegidos de la luz; a los que se les añadió 1.5 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 1%; la cual se preparó con 1g de TBA y se aforó a 100 ml con una solución de NaOH 0.5N. A continuación se taparon los tubos firmemente y se colocaron en baño de agua a ebullición (90 \pm 5°C) por 15 min.

Transcurrido el tiempo, se sacaron los tubos del baño maría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, el cromóforo fue extraído con 3 ml de n-butanol y las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

La curva se realizó por triplicado en tres experimentos independientes y a partir de éstas se obtuvo la ecuación de la recta.

6.1.3. Curva de calibración para la cuantificación de glutatión reducido (GSH).

La curva se realizó por triplicado en tres experimentos independientes y a partir de estas se obtuvo la ecuación de la recta. Todos los reactivos empleados se prepararon el día del experimento y fueron utilizados inmediatamente. El intervalo de concentración para la curva de calibración fue de 0.01-0.5 mM. Primeramente se preparó el reactivo de Ellman, para lo cual, se pesaron 20 mg de ácido 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) y se aforó a 50 ml con una solución de citrato de sodio al 1%, una vez preparada la solución se vierte en un frasco ámbar limpio y seco, el cual debe conservarse a una temperatura de

4°C hasta el momento de su uso. Por otra parte, en un matraz aforado de 10 ml se colocaron 15.7 mg de estándar de GSH pesados con precisión y se aforó con agua desionizada para obtener una solución stock con una concentración de 5 mM. A partir de esta solución se llevaron a cabo diluciones para así obtener las siguientes concentraciones: 0.015, 0.020, 0.060, 0.12, 0.17, 0.22, 0.35 y 0.45 mM. Posteriormente, se tomó una alícuota de 450 µl de cada dilución, y se colocó en un vial de vidrio con tapa rosca y protegido de la luz a los que se les adicionaron 450 µl de amortiguador de fosfatos (0.4 M pH 7.0) más 2.5 ml del reactivo de Ellman. La mezcla se leyó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm, empleando como blanco una solución formada por 450 µl de buffer de fosfatos más 450 µl de agua desionizada y 2.5 ml del reactivo de Ellman. Las lecturas se tomaron dentro de los 5 min. posteriores a la adición del reactivo de Ellman ya que el cromóforo formado es muy lábil.

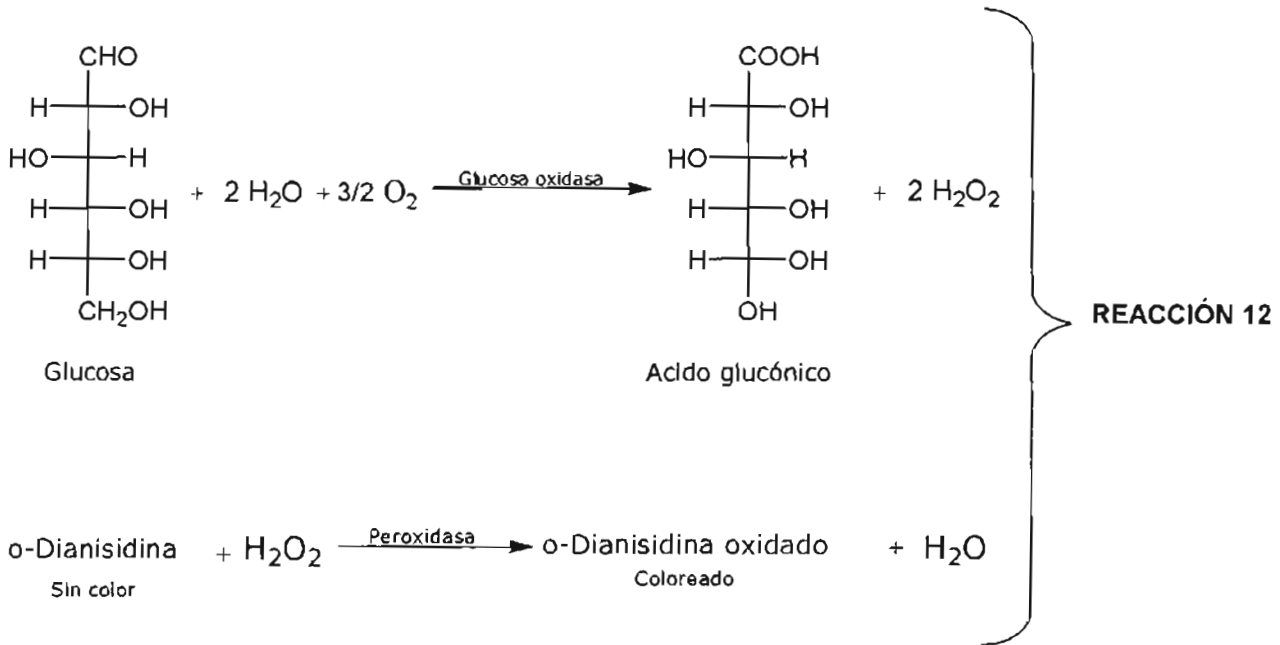
6.1.4. Determinación de la confiabilidad en la cuantificación de glucosa por dos métodos comerciales: Accucheck vs. Sera-pack.

Dada la premura del tiempo en el que se debían analizar todos los parámetros, se consideró cuantificar la glucosa empleando un analizador automático "Accucheck[®]" en comparación con un método semi-automático "Sera-pak[®]".

Para llevar a cabo esta determinación, se tomó un tamaño de muestra de 20 ratas Wistar macho. Las muestras de sangre fueron recolectadas de la cola para ambos métodos. La determinación de glucosa por el analizador automático Accucheck[®] se llevó a cabo colocando una gota de sangre total en la tira reactiva para ser cuantificado y se registro la lectura obtenida.

Para la determinación con el kit de Sera-pak[®] se recolectaron 50 µl de sangre de la misma rata en un tubo eppendorf previamente humedecido con heparina, las muestras fueron centrifugadas a 3200 rpm durante 5 min., transcurrido éste tiempo, se tomaron 10 µl del plasma y se añadió 1 ml de una solución del kit Sera-pak[®] que contiene la enzima glucosa oxidasa y un cromógeno aceptor de oxígeno (o-Dianisidine), el cual al reaccionar

con el peróxido obtenido de la reacción de glucosa por acción de la enzima, se torna en un pigmento rosa que se cuantifica espectrofotométricamente a una longitud de onda de 500 nm como se muestra a continuación (reacción 12).



Las muestras se leen contra un blanco en el cual se sustituye el plasma por agua destilada. La cantidad de glucosa se obtiene en referencia a la absorbancia de la solución calibradora incluida en el kit sustituyendo los valores de la ecuación 2.

$$\text{Glucosa}(\text{mg/dL}) = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times 100 \quad \left. \vphantom{\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}}} \right\} \text{ ECUACIÓN 2}$$

En donde:

A = absorbancia a 500nm

6.2. SEGUNDA PARTE. Estudios *in vitro*.

6.2.1. Obtención de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam.

Los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam fueron obtenidos en el laboratorio 2-7 de productos naturales del Instituto de Química (UNAM), la planta fue colectada en julio del 2001 en la población de San Pedro Actopan, Milpa Alta, DF. Se obtuvieron un total de ocho extractos: 2 obtenidos a partir de la cáscara, 3 a partir de los frutos frescos y 3 a partir de hojas, tallos y flores (secos y molidos) como se muestra en el diagrama 3.

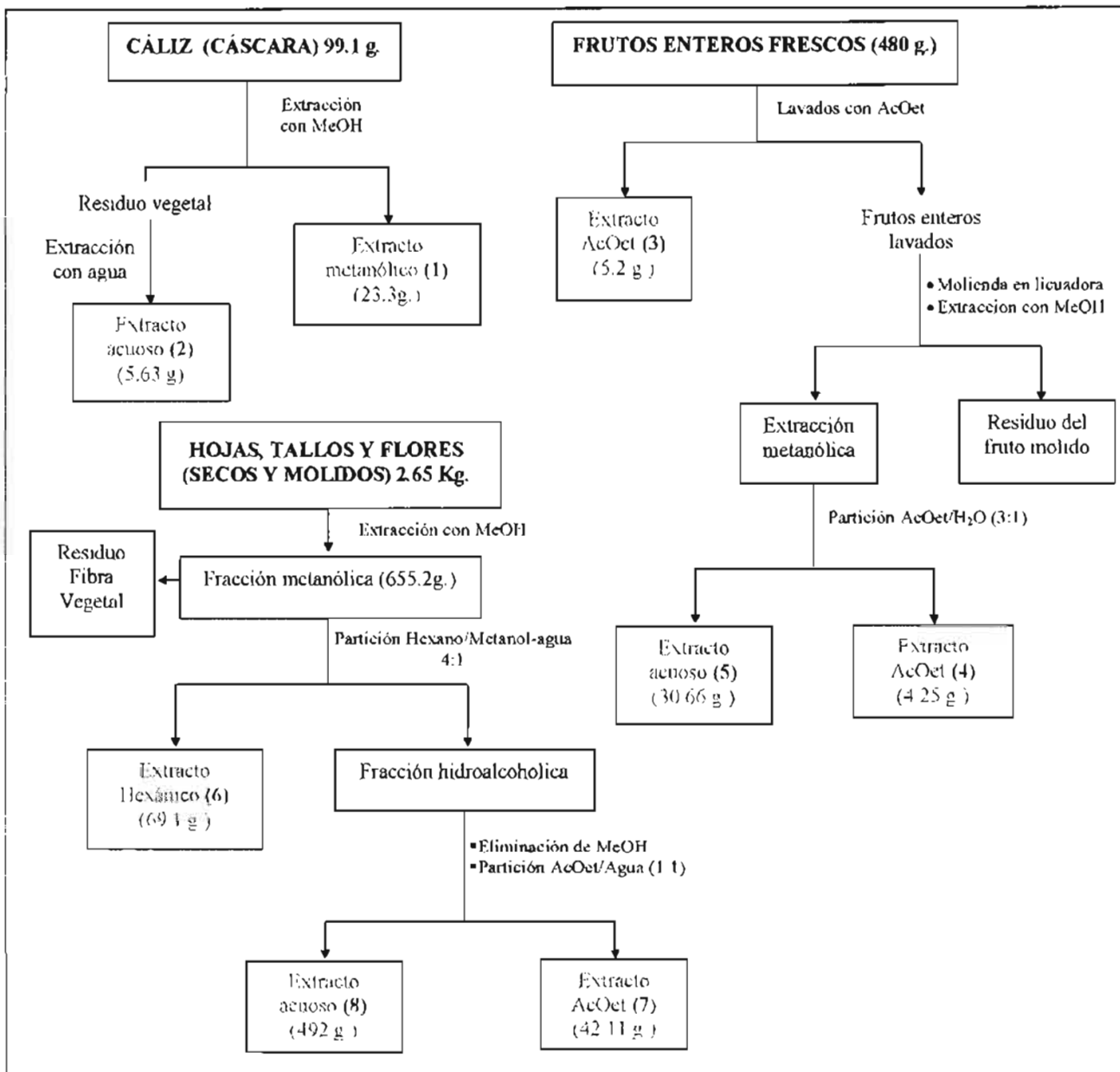
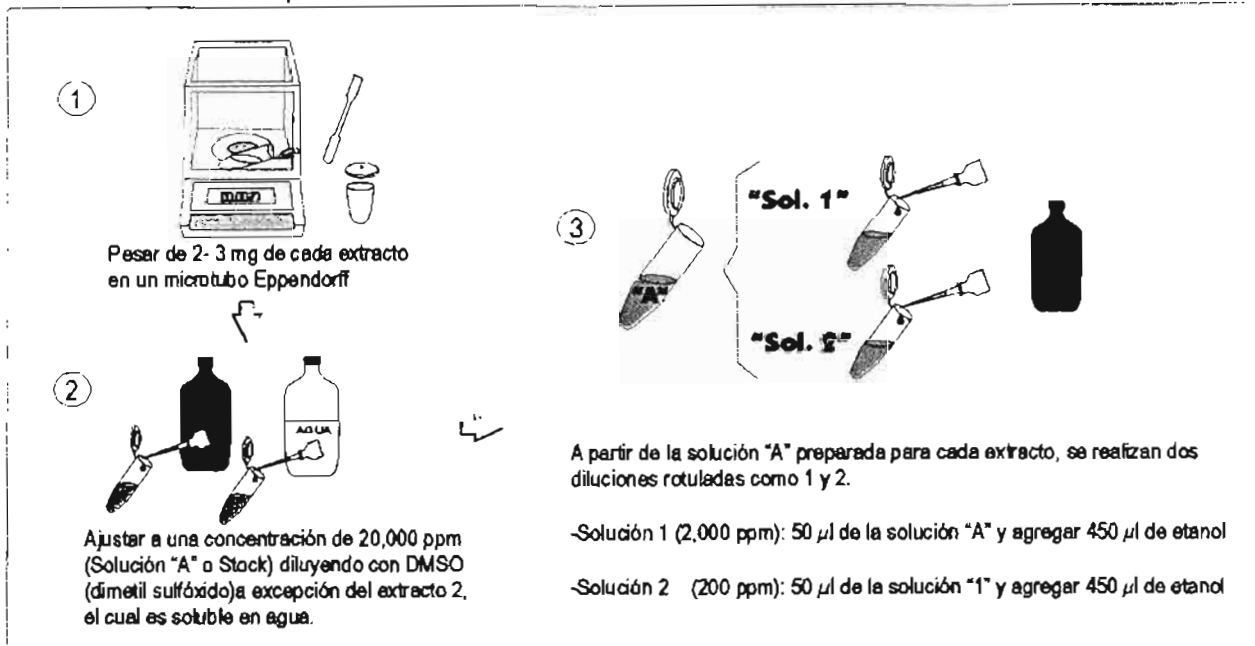


DIAGRAMA 3. Procedimiento para la extracción de ocho extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam.

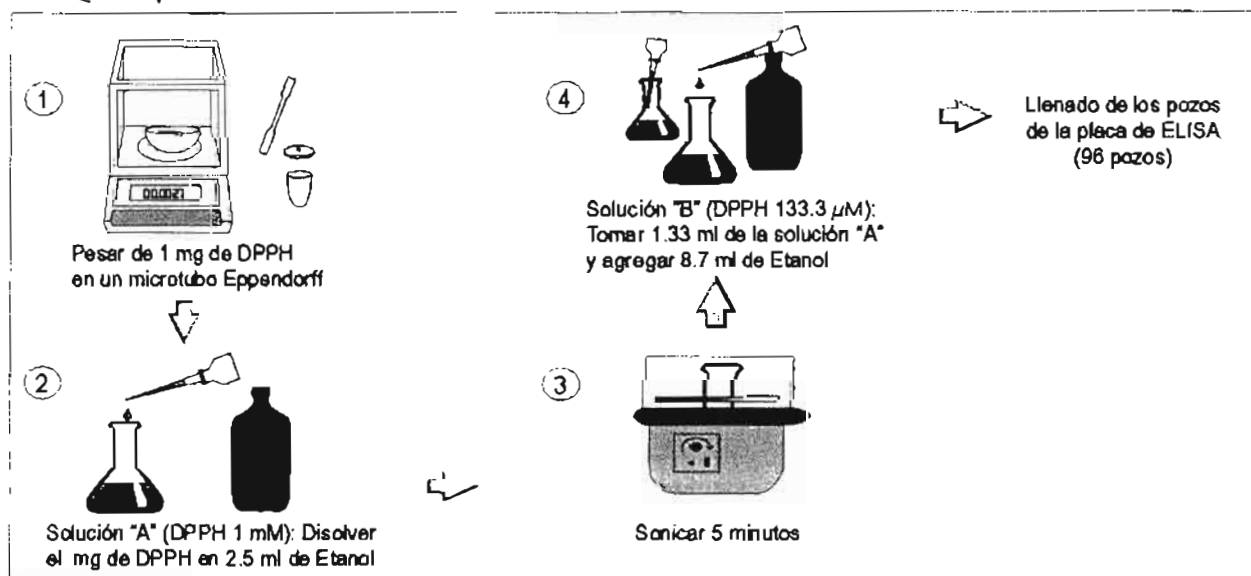
6.2.2. Ensayo de la actividad antioxidante de los 8 extractos de *Physalis chenopodiifolia* Lam por reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrazil hidrazilo (DPPH).

En este estudio se emplearon concentraciones de 20 y 200 ppm para cada extracto, el procedimiento que se llevó a cabo se presenta en el esquema 2.

Esquema 2. Metodología para la determinación de la actividad antioxidante por reducción del radical DPPH.
Preparación de extractos



Preparación de la solución de DPPH



Llenado de los pozos de la placa de ELISA de 96 pozos (1 de 2)

- 1 Con una micropipeta multicanales, tomar 50 µl de etanol y llenar los pozos A1 – H1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 2 Tomar 50 µl de la solución 2 del extracto y vertirlos en los pozos A2 – D2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 3 Tomar 50 µl de la solución 1 del extracto y vertirlos en los pozos A3 – D3. Repetir el procedimiento anterior con cada una de las muestras hasta llenar todos los pozos de la mitad superior de la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 4 Los pozos de la mitad anterior se llenan de la misma forma que los anteriores

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 5 Tomar 150 µl de etanol y vertirlos en los pozos A1 – A12 y H1 – H12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 6 Tomar 150 µl de la solución B de DPPH y agregarlos a los pozos B1 – G1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Llenado de los pozos de la placa de ELISA de 96 pozos (2 de 2)

- 7 Repetir sucesivamente la operación anterior con los pozos B2 – G2 hasta llenar los pozos B12 – G12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- 8 Proteger la placa de la luz con una película de aluminio y agitar 30 min. a temperatura ambiente. Medir la densidad óptica a 515 nm en un lector de ELISA

Finalmente, los resultados se obtienen a partir de la ecuación 3.

$$\%Reducción = \frac{C - E}{C} \times 100 \quad \left. \vphantom{\frac{C - E}{C} \times 100} \right\} \text{ ECUACIÓN 3}$$

En donde:

C = Absorbancia de las muestras que solo tienen DPPH

E = Absorbancia de las muestras que contienen la solución del extracto más el DPPH.

6.2.3. Inducción de diabetes con aloxana en ratas Wistar macho.

La inducción de diabetes se dividió en dos protocolos. El primero se siguió para los experimentos *in vitro* y el segundo en los experimentos *in vivo*.

- PROTOCOLO PARA EXPERIMENTOS *IN VITRO*

1. Pesar y marcar cada rata.
2. Administración vía intraperitoneal de 120 mg/kg de aloxana en solución de citrato de sodio 0.05 M pH 4.5.
3. Después de 72 horas se verificó el peso y la concentración de glucosa en sangre en cada rata.

Las ratas se dividieron en dos grupos de acuerdo a los niveles de glucosa que presentaban. El primero fue el grupo de ratas diabéticas que presentaban niveles de glucosa ≥ 200 mg/dL, y el segundo con niveles de glucosa por debajo de 200 mg/dL, a las que se les llamo resistentes.

- PROTOCOLO PARA EXPERIMENTOS *IN VIVO*

1. Pesar y marcar cada rata.
2. Administración vía intraperitoneal de 120 mg/kg de aloxana en solución de citrato de sodio 0.05 M pH 4.5.
3. Después de 24 horas se verificó el peso de cada rata. Aquellas ratas cuyo peso aumentó o bien permaneció constante, se volvieron a administrar con aloxana pero ahora con una dosis de 90 mg/kg.
4. Después de 48 horas de la segunda administración todas las ratas desarrollaron diabetes.

6.2.4. Comparación de estándares antioxidantes sobre la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas diabéticas y normoglucémicas.

Para esta parte del experimento se emplearon 12 ratas Wistar macho, las cuales se dividieron en dos grupos de 6 ratas; al primer grupo se les indujo un estado diabético con aloxana como se indica en el protocolo para experimentos *in vitro* del punto 6.2.3., el segundo grupo fue considerado normoglucémico y se utilizó directamente. De cada rata se obtuvieron alrededor de 3 ml de eritrocitos a partir de los cuales se probaron por duplicado cada una de las concentraciones de los antioxidantes dando así un total de 6 experimentos independientes:

1. Actividad antioxidante del ácido norhidroguayarático 10 μM
2. Actividad antioxidante del ácido norhidroguayarático 25 μM
3. Actividad antioxidante de la quercetina 10 μM
4. Actividad antioxidante del hidroxitolueno butilado 10 μM
5. Actividad antioxidante del α -tocoferol 25 μM
6. Índice de lipoperoxidación inducida con H_2O_2 4 mM sin ningún antioxidante

Para determinar el efecto antioxidante de estos compuestos, se siguió el procedimiento descrito en el esquema 1; con la diferencia de que antes de añadir el buffer de azida de sodio en el paso 10, se añadió el antioxidante a probar en la concentración determinada y se incubó 30 min. a 37°C con agitación suave. Finalizado el tiempo de incubación, se prosiguió como se indica en el esquema 1 a partir del paso 10.

Una vez determinado que el mejor antioxidante fue el α -tocoferol, se prosiguió a realizar curvas concentración-respuesta tanto en eritrocitos de ratas normoglucémicas como diabéticas para determinar la concentración que proteja en un 50% la peroxidación de lípidos (CP_{50}). Para esto, se realizaron curvas que incluían concentraciones de 1-150 μM . Cada curva se realizó en 5 experimentos independientes.

En un matraz aforado de 25 ml protegido de la luz, se preparó una solución stock 4 mM de α -tocoferol, se pesaron 43.1 mg de α -tocoferol y se adicionaron 50 μl de dimetilsulfóxido (DMSO), aforándose con amortiguador de fosfatos (0.4M pH 7). A partir de

esta solución stock, se tomaron diferentes volúmenes para obtener concentraciones finales de 150, 100, 31.6, 10, 3.2 y 1 μM en volúmenes totales de 2000 μl los cuales incluían: 100 μl de eritrocitos de ratas normoglucémicas ó diabéticas de acuerdo al experimento, 800 μl de amortiguador con azida de sodio (7.8 mM pH 7.4), 800 μl de solución de H_2O_2 (10 mM), el volumen correspondiente de la solución stock de α -tocoferol y amortiguador de fosfatos 0.4 M pH 7 para completar el volumen final de 2 ml.

El procedimiento consistió en una serie de 3 incubaciones a 37°C con agitación suave; en la primera incubación se añadieron volúmenes de 100 μl de eritrocitos en 6 tubos de ensaye con tapa rosca y protegidos de la luz, posteriormente, se añadió a cada tubo el volumen correspondiente de la solución stock de α -tocoferol para completar la curva, y se incubó por 30 min.; después de este tiempo se incorporó un tubo testigo que contenía 100 μl de eritrocitos y se añadieron 800 μl de amortiguador con azida de sodio (7.8 mM pH 7.4) a cada tubo y se incubó por 30 min más, finalmente después de este tiempo se añadieron 800 μl de solución de H_2O_2 10 mM y el volumen correspondiente de amortiguador de fosfatos (0.4 M pH 7) a cada tubo para completar un volumen final de 2000 μl y se incubó por última vez durante 2 h. Al finalizar el tiempo de incubación se adicionó a cada tubo 1 ml de TCA al 28%, se mezclaron en vortex por 1 min. y fueron centrifugados a 3200 rpm por 3 min. A continuación se tomó 1 ml del sobrenadante de cada tubo y se colocaron en otros tubos con tapa rosca limpios, secos y protegidos de la luz, a los que se adicionaron 1 ml de TBA al 1% y se colocaron en un baño de agua a ebullición ($90\pm 5^\circ\text{C}$) por 15 min. Los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se les adicionó 2 ml de n-butanol para extraer el cromógeno en la fase orgánica, la cual fue leída al espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

6.2.5. Determinación del efecto de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la peroxidación de lípidos (LPO) en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.

Para esta parte del experimento se requirieron 36 ratas Wistar macho con las cuales se formaron tres grupos de 12 ratas: a 24 ratas se les indujo un estado diabético con

aloxana como se indica en el protocolo para experimentos *in vitro* del punto 6.2.3; de estas ratas se formaron 2 grupos de 12; el primero correspondiente al grupo de ratas diabéticas con niveles de glucosa de 250-389 mg/dL y el segundo grupo correspondiente a las ratas resistentes, las cuales a pesar de haberseles administrado aloxana sus niveles de glucosa permanecieron entre 80-115 mg/dL, el tercer grupo se formó con las 12 ratas restantes a las cuales no se les administró nada y cuyos niveles de glucosa se encontraban entre 52-98 mg/dL por lo que fueron consideradas normoglucémicas.

Teniendo como antecedente el estudio de DPPH descrito en el apartado 6.2.2, en el cual se observó que con una concentración de 200 ppm la mayoría de los extractos reducían el DPPH, se procedió entonces a realizar la prueba de peroxidación de lípidos empleando esa concentración en los eritrocitos de ratas normoglucémicas, diabéticas y resistentes. Se emplearon 6 ratas de cada grupo para probar los primeros 4 extractos y las otras seis para probar los extractos 5, 6, 7 y 8. Por lo cual, con los eritrocitos obtenidos de cada rata se cuantificó:

1. El nivel basal de LPO.
2. Índice de LPO inducido con H₂O₂ 4 mM
3. Nivel de LPO obtenido con α -tocoferol 25 μ M (control positivo)
4. Efecto antioxidante de 4 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam (200 ppm)

El procedimiento que se siguió fue el descrito en el esquema 1, con la diferencia que entre el paso 9 y 10 se incluye una incubación más en la cual se añade el extracto a probar y se incuba por 30 min. a 37°C con agitación suave; los pasos siguientes se realizaron tal como se indica en el esquema.

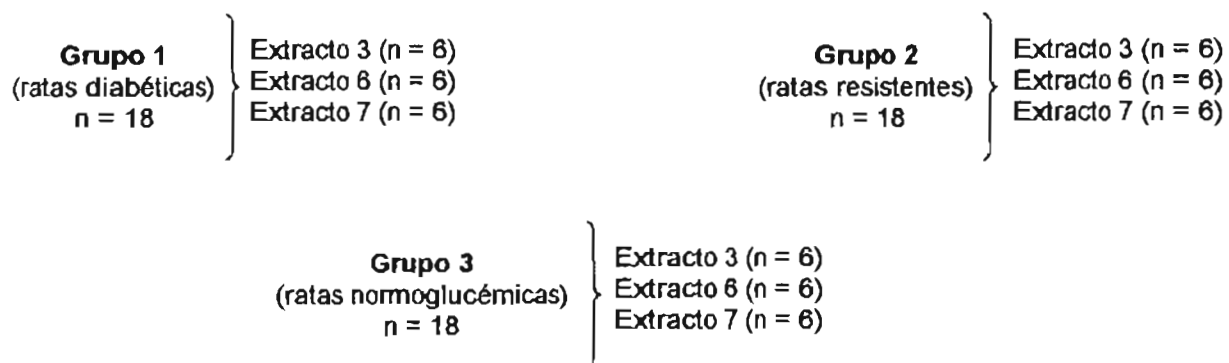
6.2.6. Determinación de las curvas concentración-respuesta de los extractos que resultaron activos sobre la peroxidación de lípidos (LPO) en eritrocitos de ratas normales y diabéticas.

Una vez identificados aquellos extractos que resultaron efectivos antioxidantes contra la peroxidación de lípidos inducida con H₂O₂, se procedió a realizar curvas

concentración-respuesta para cada uno de ellos. El intervalo de concentración para cada curva fue de 100-1000 ppm, y como estándar positivo se empleo el α -tocoferol en una concentración de 10.7ppm (25 μ M).

Se requirieron un total de 54 ratas Wistar macho las cuales se dividieron de la siguiente manera: 36 ratas fueron administradas con aloxana como se indica en el protocolo de inducción de diabetes para experimentos *in vitro* descrito en el apartado 6.2.3.; posteriormente, estas ratas fueron divididas en dos grupos de 18 ratas, el primero correspondió al grupo de ratas diabéticas (glucosa = 280 ± 80 mg/dL) y el segundo al grupo de ratas resistentes (glucosa = 98 ± 20 mg/dL); el tercer grupo lo formaron las 18 ratas restantes a las que no se les administró nada y que fueron consideradas normoglucémicas.

A su vez cada grupo fue subdividido como se indica a continuación:

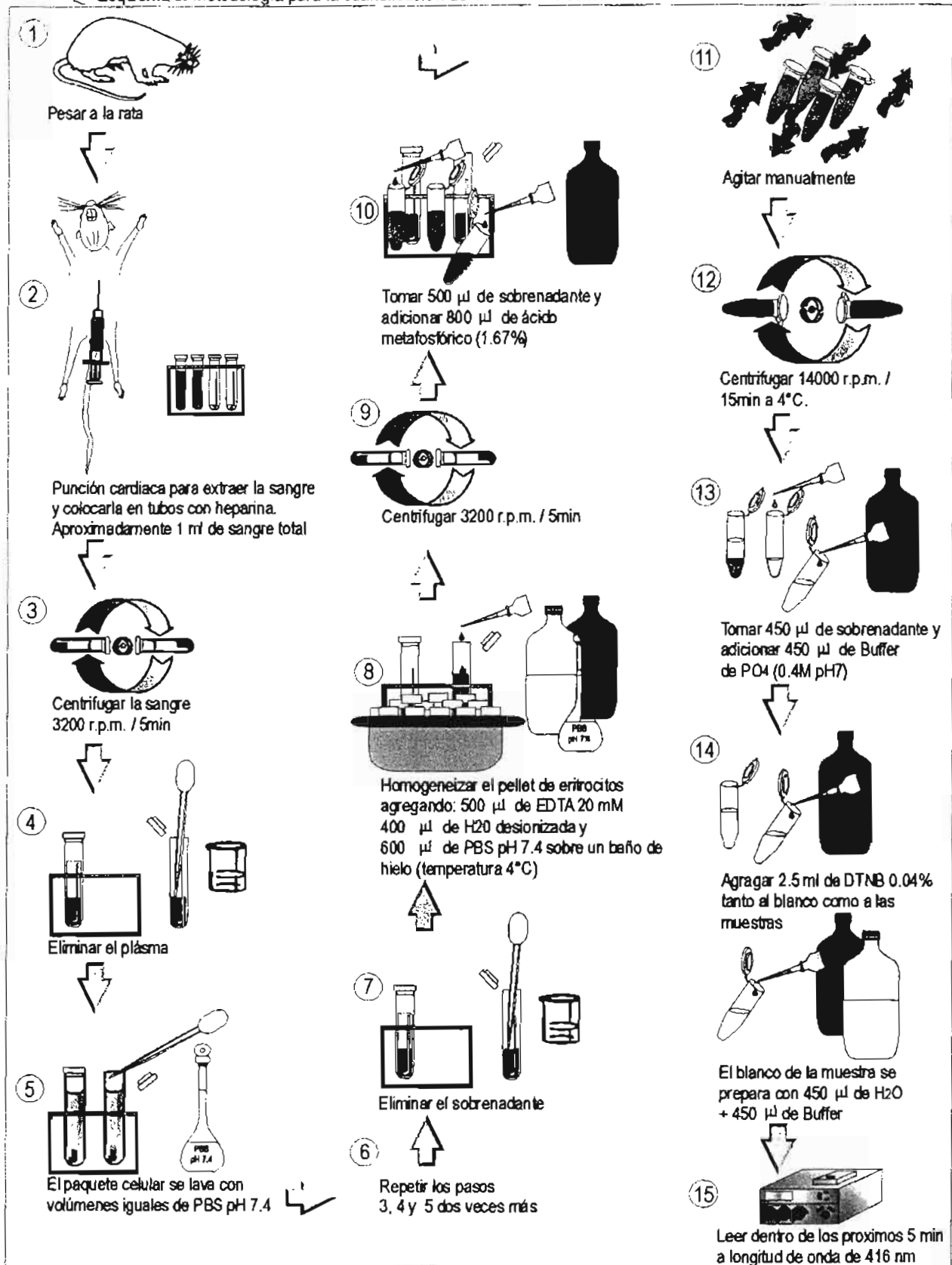


Con los eritrocitos obtenidos de cada rata se cuantificó la curva completa para cada extracto con las concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm así como el nivel de LPO obtenido con α -tocoferol 25 μ M (control positivo). La metodología que se llevó a cabo fue la descrita en el esquema 1, con la diferencia que entre el paso 9 y 10 se incluyó una incubación más en la cual se añadió el extracto a probar en la concentración determinada, o bien el α -tocoferol a una concentración de 25 μ M, y se incubó por 30 min. a 37°C con agitación suave; los pasos siguientes se realizaron tal como se indica en el esquema.

Los eritrocitos restantes se utilizaron para cuantificar el nivel de glutatión reducido (GSH) y el volumen corpuscular medio (VCM) en cada estado glucémico.

La metodología que se empleó para determinar los niveles de GSH fue una modificación de la técnica reportada por Ökkes (2002) y se presenta en el esquema 3.

Esquema 3. Metodología para la cuantificación de GSH en eritrocitos



Por otra parte, el VCM, se cuantificó para confirmar el aumento en la densidad de la sangre reportado en pacientes diagnosticados con diabetes mellitus.

Este parámetro se obtuvo relacionando el hematocrito con la cantidad de eritrocitos de cada individuo como se muestra en la ecuación 4.

$$VCM = \frac{Ht_{\%}}{Cuentaeritrocitoria(\times 10^{12} / lt)} = fl \quad \left. \vphantom{\frac{Ht_{\%}}{Cuentaeritrocitoria(\times 10^{12} / lt)}} \right\} \text{ ECUACIÓN 4}$$

En donde:

VCM: volumen corpuscular medio

Ht: hematocrito

fl: femtolitros (10^{-15} litros)

6.3. TERCERA PARTE. Estudios *in vivo*.

6.3.1 Determinación de las condiciones de ayuno para la cuantificación del efecto hipoglucemiante de glibenclamida y 2 extractos de *Physalis chenopodiifolia* Lam en ratas normoglucémicas.

Antes de iniciar los experimentos *in vivo* se determinaron las condiciones de ayuno adecuadas para la cuantificación de los niveles de glucosa, para lo cual, se emplearon 24 ratas Wistar macho con un peso entre 250-300g, las cuales se dividieron en 8 grupos de 3 ratas como se indica a continuación:

Grupo 1. Administración del vehículo (aceite de maíz) sin ayuno.

Grupo 2. Administración del vehículo con ayuno de 18 horas.

Grupo 3. Administración de 15 mg/kg de glibenclamida sin ayuno.

Grupo 4. Administración de 15 mg/kg de glibenclamida con ayuno de 18 horas.

Grupo 5. Administración de 150 mg/kg del extracto 6 (extracto hexánico de partes aéreas) de *Physalis chenopodifolia* Lam sin ayuno.

Grupo 6. Administración de 150 mg/kg del extracto 6 de *Physalis chenopodifolia* Lam con ayuno de 18 horas.

Grupo 7. Administración de 150 mg/kg del extracto 7 (extracto de acetato de etilo de las partes aéreas) de *Physalis chenopodifolia* Lam sin ayuno.

Grupo 8. Administración de 150 mg/kg del extracto 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam con ayuno de 18 horas.

Todos los compuestos fueron administrados en aceite de maíz vía oral. En el caso de los grupos 2, 4, 6 y 8 se les retiró el alimento 18 horas antes de iniciar el experimento y se les mantuvo con libre acceso de agua. Al inicio del experimento se les tomó una muestra de sangre por la cola y se cuantificaron los niveles de glucosa por el analizador Acucheck® los cuales correspondieron a el valor basal (tiempo cero), posteriormente se les administró el compuesto correspondiente a cada grupo y se realizaron muestreos para determinar los niveles de glucosa a los 30, 90, 180 y 300 min. En el caso de los grupos 1, 3, 5 y 7 se llevó a cabo el mismo procedimiento a diferencia que a estos grupos se les mantuvo con libre acceso de agua y alimento.

El análisis estadístico se llevó a cabo por medio de una prueba de t-student no pareada para cada tiempo de muestreo con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.001$.

6.3.2 Determinación de la vía de administración para la cuantificación del efecto hipoglucemiante en ratas normoglucémicas.

Se probaron dos vías de administración: la oral y la intraperitoneal. Para esto se emplearon 36 ratas Wistar macho, las cuales fueron divididas en 12 grupos de tres ratas:

Grupo 1. Administración vía oral del vehículo (aceite de maíz).

Grupo 2. Administración vía intraperitoneal del vehículo.

Grupo 3. Administración vía oral de 50 mg/kg de α -tocoferol (control positivo antioxidante contra la LPO)

- Grupo 4.** Administración vía intraperitoneal de 50 mg/kg de α -tocoferol.
- Grupo 5.** Administración vía oral de 15 mg/kg de glibenclamida.
- Grupo 6.** Administración vía intraperitoneal de 15 mg/kg de glibenclamida.
- Grupo 7.** Administración vía oral de 150 mg/kg del extracto 3 (extracto de acetato de etilo del fruto) de *Physalis chenopodifolia* Lam.
- Grupo 8.** Administración vía intraperitoneal de 150 mg/kg del extracto 3 de *Physalis chenopodifolia* Lam.
- Grupo 9.** Administración vía oral de 150 mg/kg del extracto 6 (extracto hexánico de las partes aéreas) de *Physalis chenopodifolia* Lam.
- Grupo 10.** Administración vía intraperitoneal de 150 mg/kg del extracto 6 de *Physalis chenopodifolia* Lam.
- Grupo 11.** Administración vía oral de 150 mg/kg del extracto 7 (extracto de acetato de etilo de las partes aéreas) de *Physalis chenopodifolia* Lam.
- Grupo 12.** Administración vía intraperitoneal de 150 mg/kg del extracto 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam.

Todos los grupos permanecieron con libre acceso de agua y alimento. En todos los casos el procedimiento a seguir fue esencialmente el mismo: en un tubo eppendorff humedecido con heparina se recolectaron 300 μ l de sangre total de la cola de la rata, y posteriormente se le administro el compuesto correspondiente a cada grupo ya sea por vía oral ó intraperitoneal y se realizó un muestreo a los 30, 90, 180 y 360 min. para determinar el efecto hipoglucemiante en cada tiempo. La muestra obtenida al inició del experimento fue centrifugada durante 5 min a 3200 rpm, y con el plasma obtenido se determinó la glucosa con el kit Serapack® registrándose como el nivel de glucosa a tiempo cero; posteriormente, con los eritrocitos obtenidos de esa muestra se cuantifico el índice de lipoperoxidación basal como se indica en el esquema 1, siguiendo los pasos del 14 al 24.

Al finalizar el tiempo de muestreo, las ratas fueron anestesiadas con fenobarbital y se extrajeron por punción cardiaca alrededor de 5 ml de sangre, posteriormente las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. De la sangre obtenida se realizaron los siguientes análisis:

Índice de peroxidación de lípidos al final del experimento: para esta prueba se emplearon 100 μl de eritrocitos lavados y se prosiguió como se indica en el esquema 1 de los pasos 14 al 24.

Índice de peroxidación de lípidos inducida con H_2O_2 4mM: este análisis se realizó siguiendo el esquema 1 de los pasos 4 al 24.

Recuento de eritrocitos: Se llevó a cabo realizando una dilución 1:200 de la sangre obtenida con una solución amortiguadora de fosfatos 0.4M pH 7.4, posteriormente, la dilución fue homogeneizada cuidadosamente, a continuación con una pipeta clínica se tomó una alícuota de 500 μl de los cuales se desecharon las 3 primeras gotas y la cuarta gota fue colocada en una cámara de Neubauer para su recuento directo al microscopio. El número de eritrocitos obtenidos se multiplicó por 10 000 para obtener así el número de eritrocitos por μl de sangre.

El análisis estadístico para los cursos temporales del efecto hipoglucemiante de cada compuesto se llevó a cabo mediante una prueba de t-student pareada para cada tiempo de muestreo con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y $p < 0.001$. Para el análisis de los niveles de peroxidación de lípidos se realizó un ANOVA seguido de una prueba de Tuckey's con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

6.3.3. Curva *in vitro* e *in vivo* de glibenclamida para la determinación de su efecto sobre la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.

Para la curva *in vitro* se requirieron un total de 10 ratas Wistar macho, las cuales fueron divididas en dos grupos de 5 ratas: el primer grupo fue administrado con aloxana como se indica en el protocolo de inducción de diabetes para experimentos *in vivo* (apartado 6.2.3.), al segundo grupo no se les administró nada por lo que fueron consideradas normoglucémicas. Todas las ratas se encontraban con libre acceso de agua y alimento. Para las curvas *in vitro* se emplearon rangos de concentraciones de 1-316 μM . Cada curva se realizó en 5 experimentos independientes.

En un matraz aforado de 25 ml protegido de la luz, se preparó una solución stock 4 mM de glibenclamida, para esto, se pesaron 49.4 mg de glibenclamida y se le adicionaron 50 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente se aforó con amortiguador de fosfatos 0.4 M pH 7, agregándolo poco a poco y sonicándolo. A partir de esta solución, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 316, 100, 31.6, 10, 3.2 y 1 μ M.

Una vez obtenidos los eritrocitos como se indica en el esquema 1 (pasos 1-8), se añadieron volúmenes de 100 μ l de eritrocitos en 6 tubos de ensaye con tapa rosca y protegidos de la luz, posteriormente, se añadió a cada tubo el volumen correspondiente de la solución stock de glibenclamida, y se incubó por 30 min. a 37°C con agitación suave; después de este tiempo se incorporó un tubo más que contenía 100 μ l de eritrocitos y se añadió a cada tubo 800 μ l de amortiguador de azida de sodio (7.8 mM pH 7.4) y a continuación se incubó por 30 min. más bajo las mismas condiciones de incubación, después de este tiempo se añadieron 800 μ l de solución de H₂O₂ 10 mM y el volumen correspondiente de amortiguador de fosfatos (4 mM pH 7) a cada tubo para completar un volumen final de 2000 μ l y nuevamente se incubaron a 37°C durante 2 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionó 1 ml de TCA al 28% y se agitaron vigorosamente en vortex por 1 minuto, posteriormente los tubos fueron centrifugados a 3200 rpm durante 3 min y a continuación se tomó de cada tubo 1 ml del sobrenadante mismos que fueron colocados en otros tubos con tapa rosca limpios, secos y protegidos de la luz, a estos se les adicionó 1 ml de TBA al 1% y se cerraron firmemente para ser colocados en un baño de agua a ebullición (90 \pm 5°C) durante 15 min; a continuación los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se les adicionaron 2 ml de n-butanol para extraer el cromógeno en la fase orgánica mismo que se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm.

Para las curvas *in vivo* se emplearon 30 ratas Wistar macho las cuales se dividieron en 2 grupos de 15 ratas; el primer grupo fue administrado con aloxana como se indica en el protocolo de inducción de diabetes para experimentos *in vivo* (apartado 6.2.3.), al segundo grupo no se les administró nada por lo que fueron consideradas normoglucémicas. Cada grupo de 15 ratas fue dividido a su vez en tres grupos de 5 ratas, a las que se les administró glibenclamida intraperitonealmente en las dosis de 10, 15 ó 20 mg/kg.

El experimento se realizó siguiendo el mismo procedimiento para todos los casos: primeramente se recolectaron de la cola de la rata aproximadamente 300 μ l de sangre total en un tubo eppenforff humedecido con heparina, posteriormente cada rata fue administrada con la dosis correspondiente de glibenclamida suspendida en aceite de maíz vía intraperitoneal, la muestra obtenida al inició del experimento fue centrifugada por 5 min. a 3200 rpm, y con los eritrocitos obtenidos se cuantificó el índice de lipoperoxidación basal como se indica en el esquema 1, siguiendo los pasos del 14 al 24. Después de 6 horas las ratas fueron anestesiadas con fenobarbital para así obtener por punción cardiaca alrededor de 5 ml de sangre, posteriormente las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. De la sangre obtenida se realizaron los siguientes análisis:

Índice de peroxidación de lípidos al final del experimento: para esta prueba se emplearon 100 μ l de eritrocitos lavados y se prosigió como se indica en el esquema 1 de los pasos 14 al 24.

Índice de peroxidación de lípidos inducida con H_2O_2 4 mM: este análisis se realizó siguiendo el esquema 1 de los pasos 4 al 24.

Nivel de GSH después de la administración de glibenclamida: esta prueba se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el esquema 3 de los pasos 3 al 15.

Recuento de eritrocitos: Como se indica en el apartado 6.3.2.

El análisis estadístico se llevo a cabo mediante un análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnett para el efecto sobre la peroxidación de lípidos con un nivel de significancia de $p < 0.05$ ó $p < 0.001$; y para el nivel de GSH se realizó una prueba de Tuckey's con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

6.3.4. Curva dosis-respuesta de α -tocoferol para la determinación de su efecto sobre la peroxidación de lípidos en ratas normoglucémicas y diabéticas.

Se emplearon 30 ratas Wistar macho las cuales fueron divididas en 6 grupos de 5 ratas; 3 de estos grupos fueron administrados con aloxana como se indica en el protocolo de inducción de diabetes (apartado 6.2.3); una vez determinado el estado diabético a través de la cuantificación de glucosa (≥ 200 mg/dL), a cada grupo se le administró

intraperitonealmente alguna de las siguientes dosis de α -tocoferol: 25, 50 ó 100 mg/kg; los tres grupos restantes fueron considerados normoglucémicos y también fueron administrados con dosis de 25, 50 ó 100 mg/kg de α -tocoferol.

La curva se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento para los seis grupos: primeramente se recolectaron 300 μ l de sangre de la cola de la rata, los cuales fueron depositados en un tubo eppendorff humedecido con heparina, posteriormente a cada rata se le administró la dosis correspondiente de α -tocoferol vía intraperitoneal. La muestra obtenida al inició del experimento fue centrifugada durante 5 min a 3200 rpm, a continuación se eliminó el sobrenadante y se adicionaron 150 μ l de amortiguador de fosfatos pH 7.4, la muestra fue nuevamente centrifugada por 5 min. a 3200 rpm y con los eritrocitos obtenidos se cuantificó el índice de lipoperoxidación basal; para esto, en un tubo de vidrio con tapa y protegido de la luz se colocaron 100 μ l de eritrocitos y se les adicionó 1 ml de TCA al 1%, posteriormente se continuó como se indica en el esquema 1, siguiendo los pasos del 15 al 24. Después de 6 horas de la administración de α -tocoferol las ratas fueron anestesiadas con fenobarbital para así obtener por punción cardiaca 5 ml de sangre, posteriormente las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. De la sangre obtenida se realizaron los siguientes análisis:

Índice de peroxidación de lípidos al final del experimento: para esta prueba se emplearon 100 μ l de eritrocitos lavados y se prosigió como se indica en el esquema 1 de los pasos 14 al 24.

Índice de peroxidación de lípidos inducida con H₂O₂ 4 mM: este análisis se realizó siguiendo el esquema 1 de los pasos 4 al 24.

Nivel de GSH después de la administración de α -tocoferol: esta prueba se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el esquema 3 de los pasos 3 al 15.

Recuento de eritrocitos: Como se indica en el apartado 6.2.3.

El análisis estadístico se realizó con un ANOVA seguido de una prueba de Dunnett para determinar el efecto sobre la peroxidación de lípidos con un nivel de significancia de $p < 0.05$ ó $p < 0.001$. Para determinar el efecto del α -tocoferol administrado en tres diferentes dosis sobre el nivel de GSH se realizó una prueba de Tuckey's con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

6.3.5. Determinación del efecto *in vivo* de 5 extractos de *Physalis chenopodiifolia* Lam sobre los niveles de glucosa, peroxidación de lípidos (LPO) y glutatión reducido (GSH) en ratas normoglucémicas y diabéticas.

Se emplearon 48 ratas Wistar macho, las cuales fueron divididas de acuerdo al estado glucémico y al compuesto administrado como se indica a continuación: 24 ratas fueron administradas con aloxana como se indica en el protocolo de inducción de diabetes (apartado 6.2.3.), a las otras 24 ratas no se les administró nada por lo que fueron consideradas normoglucémicas. Cada grupo glucémico (normoglucémicas y diabéticas) fue subdividido a su vez en ocho grupos de tres ratas: al primer grupo se le administró el vehículo (aceite de maíz), al grupo 2 se le administraron 15 mg/kg de glibenclamida, el grupo 3 fue administrado con 50 mg/kg de α -tocoferol, los grupos del 4 al 8 fueron administrados respectivamente con 150 mg/kg de los extractos 2, 3, 5, 6 y 7 de *Physalis chenopodiifolia* Lam.

Una vez determinado el grupo correspondiente a cada rata, se procedió a realizar el experimento, todos los grupos fueron manipulados bajo las mismas condiciones y con el mismo procedimiento: primeramente se recolectaron 300 μ l de sangre en un tubo eppendorff humedecido con heparina, la cual se obtuvo de la vena caudal de la cola de la rata a través de un pequeño corte al final de la misma, a continuación, se les administró vía intraperitoneal el compuesto correspondiente a cada grupo, inmediatamente después de la administración, se comenzó a tomar el tiempo para realizar muestreos de los niveles de glucosa a los 30, 90, 180 y 360 min., la determinación de glucosa a lo largo del muestreo se realizó por medio del analizador Acucheck[®].

Con la sangre obtenida al inicio del experimento se determinó la cantidad de glucosa a tiempo cero y el índice de peroxidación basal; la sangre fue centrifugada a 3200 rpm durante 5 min, cuidando de mantener las muestras a 4°C; con el plasma obtenido se determinó la glucosa basal empleando el kit de Serapack[®], por otra parte, al paquete celular se le añadió un volumen igual de PBS pH 7.4 y se volvió a centrifugar a 3200 rpm por 5 min., y con los eritrocitos obtenidos se determinó el índice de peroxidación basal como se indica en el esquema 1 pasos del 9 al 24.

Al final del tiempo de muestreo, las ratas fueron administradas con 0.2 mg/kg de fenobarbital y posteriormente, se extrajeron 5 ml de sangre por punción cardiaca, la sangre fue depositada en tubos humedecidos con heparina y se mantuvieron a una temperatura de 4°C. De la muestra obtenida se realizaron los siguientes análisis:

Recuento de eritrocitos: Como se indica en el apartado 6.2.3.

Volumen Corpuscular Medio (VCM): para determinarlo se requirieron 500 µl de sangre total, la cual fue depositada en micro tubos para ser centrifugada a 3600 rpm por 10 min. El resultado se obtuvo sustituyendo las incógnitas de la ecuación 4 del apartado 6.2.6.

La sangre restante fue centrifugada a 3200 rpm durante 5 min.; con el plasma obtenido del sobrenadante se determinó una vez más la glucosa a los 360 min. empleando el kit de Serapack® con el fin de corroborar la confiabilidad para cuantificar la glucosa por ambos métodos. Al paquete celular se le añadió un volumen igual de PBS pH 7.4 y se volvió a centrifugar a 3200 rpm por 5 min., la operación se repite una vez más y con los eritrocitos obtenidos se determinaron los siguientes parámetros:

Índice de peroxidación de lípidos al final del experimento: para esta prueba se emplearon 100 µl de eritrocitos lavados y se prosigió como se indica en el esquema 1 de los pasos 14 al 24.

Índice de peroxidación de lípidos inducida con H₂O₂ 4 mM: este análisis se realizó siguiendo el esquema 1 de los pasos 9 al 24.

Nivel de GSH después de la administración del extracto: esta prueba se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el esquema 3 de los pasos 8 al 15.

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo aplicando una prueba de Levene para determinar homogeneidad de varianza seguido de un ANOVA de una vía y finalmente una prueba de Dunnett's con un nivel de significancia de $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

VII. Resultados

7. Resultados.

7.1. PRIMERA PARTE. *Desarrollo de los métodos de cuantificación*

7.1.1. Comparación de los métodos de cuantificación de peroxidación de lípidos.

Con respecto a la fracción sanguínea empleada para la determinación de LPO y a pesar de que uno de los objetivos planteados en el estudio era cuantificar el daño oxidativo presente en un estado diabético en eritrocitos, también se consideró el hecho de cuantificarlo en fantasmas de eritrocitos (dado que el daño de interés se encuentra a nivel membrana) y en el plasma, el cual es reportado habitualmente como medida indirecta.

Resumiendo las variaciones realizadas, fueron evaluados esencialmente 8 métodos de cuantificación, en los cuales se modificó el inductor de peroxidación empleado y las proporciones del reactivo TBARS. Cada inductor se empleó a una concentración constante en todos los experimentos. (tabla 6)

TABLA 6. Resultado de 8 métodos de cuantificación de peroxidación de lípidos en diferentes fracciones sanguíneas de ratas normoglucémicas.

REFERENCIA	MÉTODO	INDUCTOR	FRACCIÓN SANGUÍNEA EMPLEADA	REACTIVO TBARS	RESULTADO
Fee y col., 1975	1	AZO (50 mM)	Eritrocitos	TCA 15% TBA 0.67% H ₂ SO ₄ 0.1N	*
Yilmaz y col., 2002	2		Eritrocitos	TCA 15% TBA 0.67% en HCl 0.1N	**
Yagl K, 1984	3		Plasma	Fluorescencia	*
Modificación de Yilmaz y col., 2002	4	FeSO ₄ (0.15 μM)	Fantasmas de eritrocitos	TCA 15% TBA 0.67% HCl 0.1N	*
Modificación de Yilmaz y col., 2002	5		Fantasmas de eritrocitos	TCA 20% TBA 0.76% en NaOH 0.5N	*
Sushil y col., 1989	6		Eritrocitos	TCA 25% TBA 1% en NaOH 0.5N	**
Yagl, 1984	7		Plasma	Fluorescencia	*
Quinlan G y Halliwell B, 1988	8	H ₂ O ₂ (400 μM)	Eritrocitos	TCA 28% TBA 1.0% en NaOH 0.5N	***

Intensidad del cromóforo: *ausente, **tenue, ***intenso

Cabe mencionar, que el criterio para considerar una prueba como positiva, se basó en la obtención del cromóforo, ya que la intensidad de coloración de éste se relaciona directamente con la peroxidación de lípidos. Como se observa el método con el que se obtiene mejores resultados es el identificado con el número 8 y la fracción sanguínea en la que se presentan son los eritrocitos.

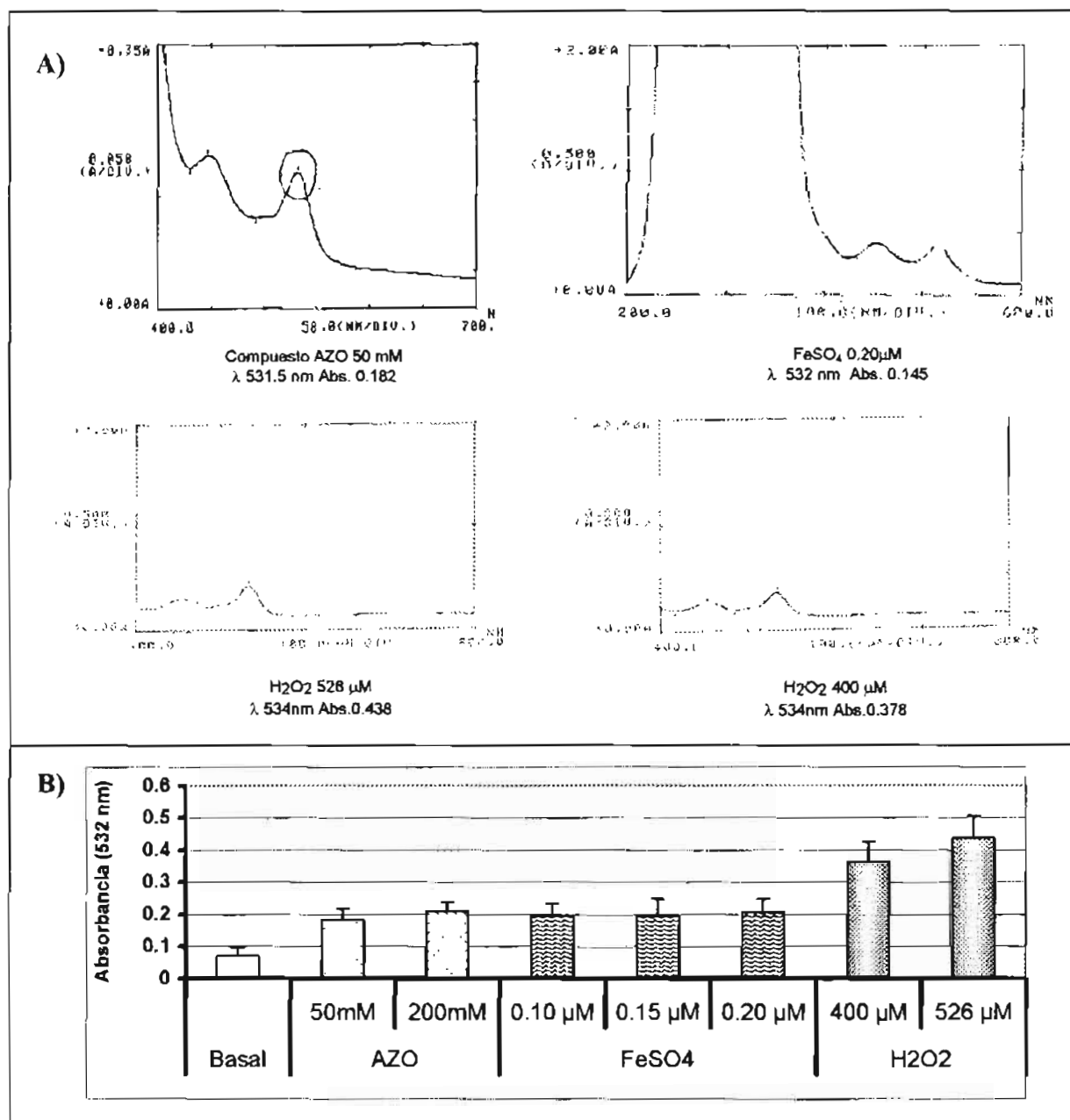


FIGURA 16. A) Espectro de absorción de tres inductores de lipoperoxidación (LPO) en eritrocitos de ratas normoglucémicas B) Comparación del efecto alcanzado por tres inductores de LPO a diferentes concentraciones.

Una vez determinado el método, se procedió entonces a realizar pruebas con los tres inductores de peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas normoglucémicas, empleando el método número 8.

En la figura 16A se muestra el espectro de absorción espectrofotométrica de TBARS obtenido con cada inductor. Se observa que el espectro de absorción obtenido de la peroxidación de lípidos en eritrocitos inducida con H₂O₂ es más definido; en cambio, con el compuesto AZO y el FeSO₄ se presentó mucha interferencia en el espectro de absorción a pesar de mostrarse una buena señal en ambos casos. Finalmente, se observa que con el H₂O₂ se obtienen mayores niveles de peroxidación de lípidos en comparación con los otros dos inductores (figura 16B).

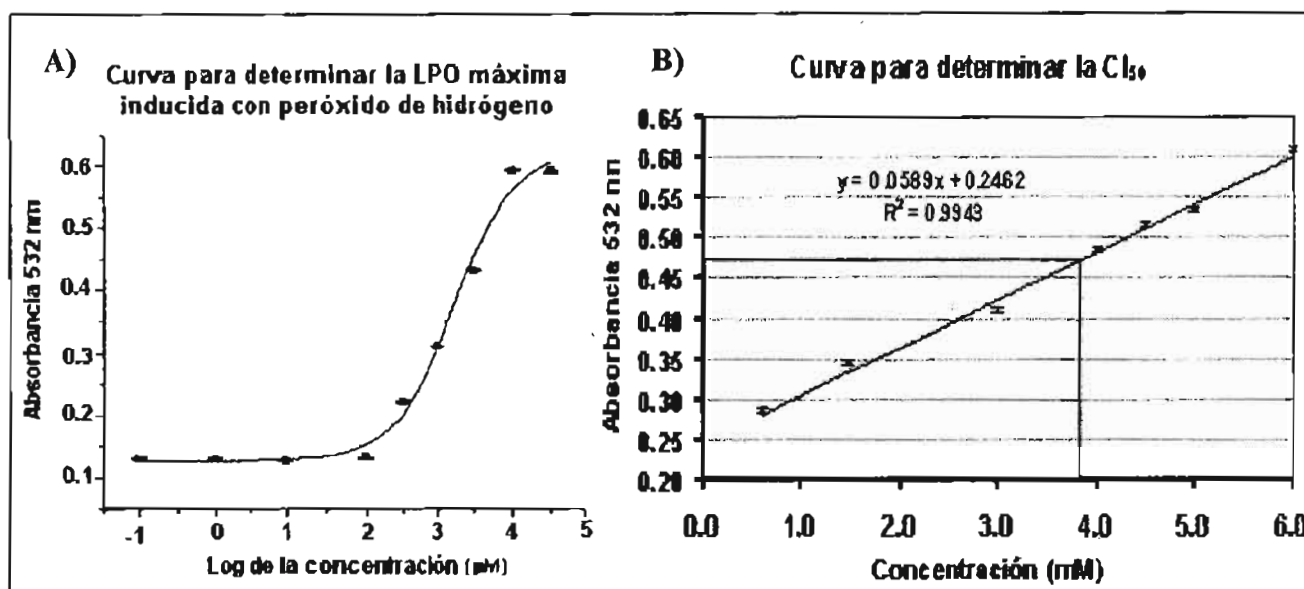
7.1.2. Determinación de la concentración de peróxido de hidrógeno que induce el 50% de peroxidación de lípidos (CI₅₀) en eritrocitos de ratas normoglucémicas.

Con el peróxido de hidrógeno seleccionado como inductor de peroxidación de lípidos, se procedió a construir una curva concentración-respuesta empleando eritrocitos de ratas normoglucémicas. Para la primer curva se emplearon concentraciones de 0.1 a 100 000µM con el fin de determinar las concentraciones que se encontraran en la pendiente de la sigmoide, las cuales estuvieron entre el intervalo de 2.69 - 3.78 µM del rango logarítmico (0.489-6.025 mM).

Posteriormente se construyó una segunda curva concentración-respuesta en el intervalo de las concentraciones de 0.5 a 6.0 mM que permitió determinar la concentración inductiva media (CI₅₀) para la determinación de la peroxidación de lípidos (Gráfica 2B). La CI₅₀ se obtiene por interpolación de la ecuación de la recta y empleando la ecuación 5.

$$CI_{50} = \frac{y_{50} - a}{b} \quad \left. \vphantom{CI_{50}} \right\} \text{ ECUACIÓN 5} \quad CI_{50} = \frac{0.47 - 0.2462}{0.0589} = 3.80mM \approx 4.0mM$$

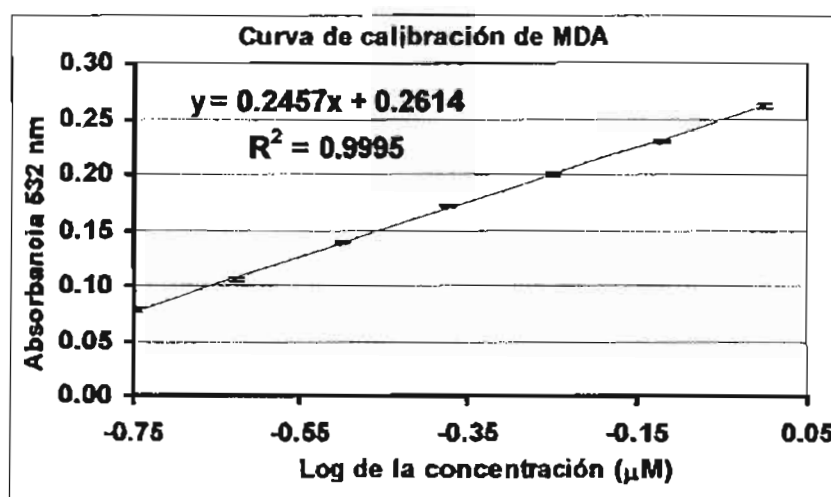
$y_{50}=0.47, a= 0.2462, b=0.0589$
(Ecuación de la recta, Grafica 2B)



GRÁFICA 2. Curvas concentración-respuesta de peróxido de hidrógeno en eritrocitos de ratas normoglucémicas. A) Intervalo logarítmico B) Intervalo lineal. Se presenta el promedio \pm el EE de $n=5$.

7.1.3. Resultado de la curva de calibración para la cuantificación de malondialdehído a partir de 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP)

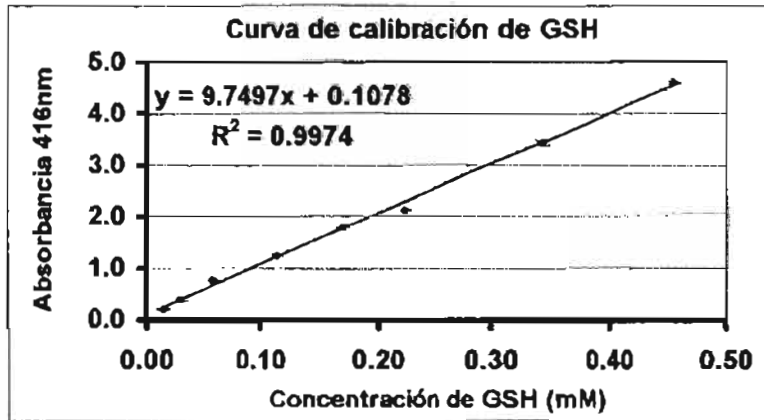
En la gráfica 3 se presenta la curva de calibración de la formación de malondialdehído (MDA) a partir de TMP a una longitud de onda de 532 nm mostrando un coeficiente de correlación cercano a la linealidad.



GRÁFICA 3. Curva de calibración para MDA. Cada punto representa el promedio de $n = 3 \pm$ la DE.

7.1.4. Curva de calibración para la cuantificación de glutatión reducido (GSH)

El intervalo de trabajo lineal para la cuantificación espectrofotométrica de GSH fue de 0.01-0.5 mM, con un coeficiente de correlación de 0.9974, como se observa en la gráfica 4. Las lecturas se llevaron a cabo a una longitud de onda de 416nm.



GRÁFICA 4. Curva de calibración para glutatión reducido. Cada punto representa el promedio de $n=3 \pm$ la DE.

7.1.5 Determinación de la confiabilidad en la cuantificación de glucosa por dos métodos comerciales: Accucheck vs. Sera-pack.

Se aplicó una prueba de t pareada para 2 muestras independientes, como se muestra en las tablas 7 y 8. Se consideraron las siguientes hipótesis:

H₀: No hay diferencia entre ambos métodos ($\mu_1 = \mu_0$)

H_a: Si hay diferencia entre ambos métodos ($\mu_1 \neq \mu_0$)

TABLA 7. Muestras pareadas

	Promedio	N	Desviación estándar	Promedio Error Std
ACUCHEK	115.3500	20	29.4713	6.5900
SERAPACK	114.5000	20	28.9800	6.4801

TABLA 8. Prueba de t para grupos pareados

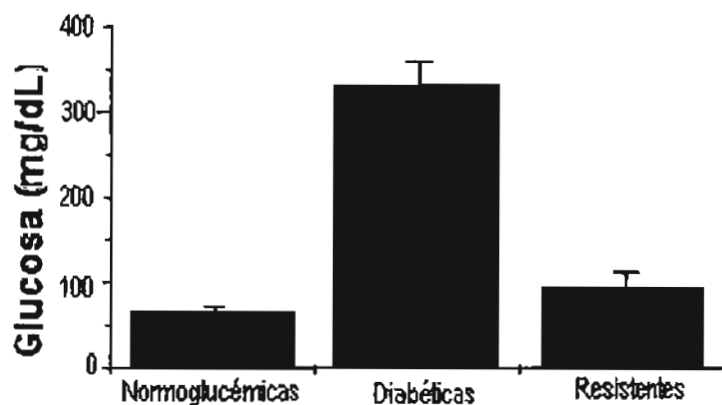
	Diferencias pareadas				t	df	p Sig. (2 colas)	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio del error estándar	Intervalo de confianza al 95%				
				Superior				Inferior
ACCUCHEK-SERAPACK	0.8500	3.4070	0.7618	-0.7445	2.4445	1.116	19	0.278

Dado que $p > 0.05$, se puede concluir que no hay diferencias en la cuantificación de glucosa por ambos métodos.

7.2. SEGUNDA PARTE. Estudios in vitro

7.2.1. Niveles de glucosa en sangre de ratas Wistar al inducir un estado diabético con aloxana.

En la gráfica 5 se presentan los promedios de glucosa en sangre total de tres grupos de ratas. El primero corresponde al grupo de ratas normoglucémicas cuyo promedio fue de 75.23 ± 25.74 mg/dL. En el caso de ratas diabéticas se dividieron en dos grupos, el primero en el que los niveles de glucosa fluctuaban entre 250-389 mg/d, valores reportados como de diabetes moderada; el segundo con niveles de glucosa inferiores de 115mg/dL a las que se les llamo resistentes.



GRÁFICA 5. Niveles de glucosa en 3 grupos de ratas. Cada barra representa el promedio de n=18

7.2.2. Resultado de la actividad antioxidante de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam en la reducción del radical libre 2,2-Difenil-1-picrazil hidrazilo (DPPH).

Antes de comenzar a probar los extractos en los eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas, se realizó un estudio previo de DPPH con la finalidad de encontrar alguna posible relación entre la actividad antioxidante y la prevención de la peroxidación de lípidos, ya que finalmente en ambos procesos intervienen reacciones de oxido-reducción.

Los resultados obtenidos en el estudio de DPPH se muestran la tabla 9. En esta se observa que los extractos de la cáscara y fruto redujeron en más del 50% al radical DPPH en la concentración de 200 ppm.

TABLA 9. Porcentajes de reducción de DPPH por los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam.

EXTRACTO		% DE REDUCCIÓN	
		20 ppm	200 ppm
Cáliz (cáscara)	Extracto metanólico (1)	-1.34	71.074
	Extracto acuoso (2)	11.002	66.863
Frutos enteros frescos	Extracto AcOet (3)	-8.65	-5.101
	Extracto AcOet (4)	7.138	67.583
	Extracto acuoso (5)	0.537	89.129
Hojas, tallos y flores (secos y molidos)	Extracto hexánico (6)	-7.047	1.275
	Extracto AcOet (7)	0.470	36.711
	Extracto acuoso (8)	20.760	39.060

7.2.3. Respuesta de estándares antioxidantes en la peroxidación de lípidos de eritrocitos de ratas diabéticas y normoglucémicas.

Se llevaron a cabo pruebas con 4 antioxidantes: ácido norhidroguayaretico (NHG), quercetina, hidroxitolueno butilado (BHT) y α -tocoferol con la finalidad de encontrar algún estándar que protegiera contra la peroxidación de lípidos que se induciría con H₂O₂; los cuales serían considerados como control positivo.

Como se observa en la tabla 10, el α -tocoferol fue el único antioxidante que inhibió la peroxidación de lípidos de los eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas en un 84.1% y 84.4% respectivamente.

La quercetina mostró una importante inhibición en la peroxidación de lípidos de ratas diabéticas (50%), sin embargo, en los eritrocitos de ratas normoglucémicas favoreció la peroxidación. Tanto el ácido norhidroguayaretico (NHG) como el hidroxitolueno butilado

(BHT) potenciaron la peroxidación de lípidos en los eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.

Con base a estos resultados, se decidió emplear el α -tocoferol como estándar antioxidante, por lo que se realizó la curva concentración-respuesta que se muestra en la gráfica 6.

TABLA 10. Actividad antioxidante *in vitro* en la peroxidación de lípidos (LPO). Se presentan los promedios \pm la desviación estándar de n=6. (-) Incrementa la peroxidación de lípidos (+) Protege de la peroxidación de lípidos.

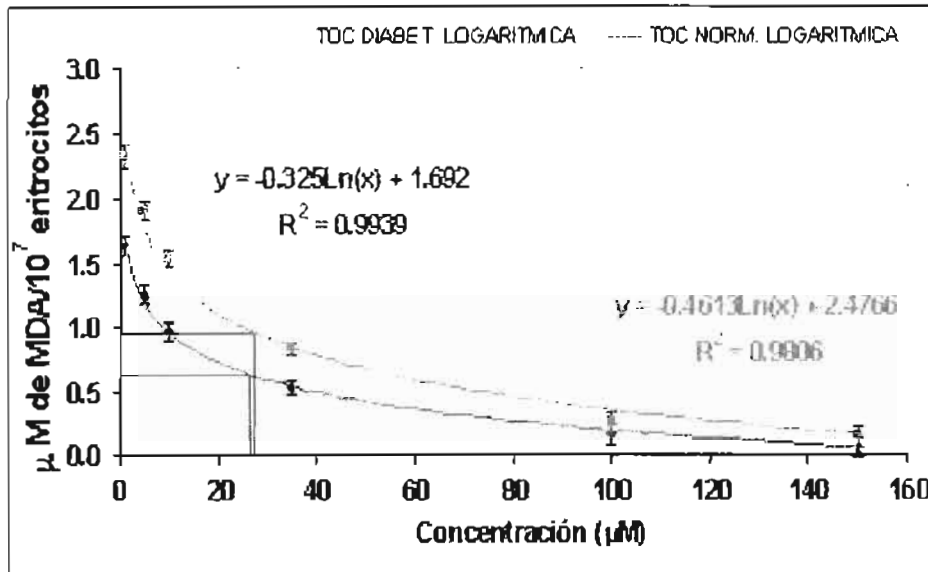
ANTIOXIDANTES	$\mu\text{m MDA}/10^7$ eritrocitos		% de Protección	
	NORMOGLUCÉMICAS	DIABÉTICAS	$\% \text{ protección} = 100 - \left(\frac{\text{tratamiento}}{\text{Control}} \times 100 \right)$	
LPO INDUCIDA CON H_2O_2 4mM SIN ANTIOXIDANTE	1.70 \pm 0.62	2.63 \pm 0.30	NORMOGLUCÉMICAS	DIABÉTICAS
Ác. norhidroguayaretico (10 μM)	2.33 \pm 0.13*	2.77 \pm 0.27	-37.06	-5.32
Ác. norhidroguayaretico (25 μM)	7.33 \pm 0.37*	7.39 \pm 0.21*	-331.18	-180.99
Quercetina (10 μM)	2.47 \pm 0.21*	1.31 \pm 0.20*	-45.29	+50.19
Hidroxitoluenobutilado (10 μM)	1.87 \pm 0.08	3.50 \pm 0.19*	-10.00	-33.07
α -tocoferol (25 μM)	0.27 \pm 0.34*	0.41 \pm 0.49*	+84.12	+84.41

* $p < 0.05$ ANOVA de una vía seguida de una prueba de Dunnet (n=6)

7.2.4. Curva concentración-respuesta de α -tocoferol en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.

En la gráfica 6 se presentan las curvas concentración-respuesta *in vitro* de α -tocoferol en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas. A partir de las curvas se determinó la concentración de α -tocoferol que protege a los eritrocitos en un 50% de la peroxidación de lípidos (CP_{50}) inducida con H_2O_2 .

La CP_{50} del α -tocoferol obtenida en los eritrocitos de ratas normoglucémicas fue de 23 μM y para los eritrocitos de ratas diabéticas de 26 μM ; por lo que decidió emplear la concentración de 25 μM en los siguientes experimentos.



GRÁFICA 6. Curva concentración-respuesta de α -tocoferol en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas. Se presenta el promedio \pm la DE n=5.

$$\ln X = \frac{y - a}{b} \quad \left. \vphantom{\ln X} \right\} \text{ ECUACIÓN 6}$$

Eritrocitos ratas normoglucémicas
$\ln X = \frac{0.680 - 1.692}{-0.325} = 3.11$
$e^{3.11} = 22.5\mu\text{M}$

Eritrocitos ratas diabéticas
$\ln X = \frac{0.981 - 2.4766}{-0.4613} = 3.24$
$e^{3.24} = 25.6\mu\text{M}$

7.2.5. Efecto de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas.

Teniendo como antecedente el estudio de DPPH descrito en el apartado 7.2.2, en el cual se observó que con una concentración de 200 ppm la mayoría de los extractos reducían el DPPH, se procedió entonces a realizar la prueba de peroxidación de lípidos empleando esa concentración en los eritrocitos de ratas normoglucémicas, diabéticas y resistentes.

En la tabla 11 se muestra que los extractos 3, 6 y 7 produjeron protección significativa contra la peroxidación de lípidos de eritrocitos de ratas normoglucémicas, diabéticas y resistentes. Sin embargo, esta actividad no coincide con lo encontrado en el estudio de DPPH en donde los más activos fueron los extractos 1, 4 y 5.

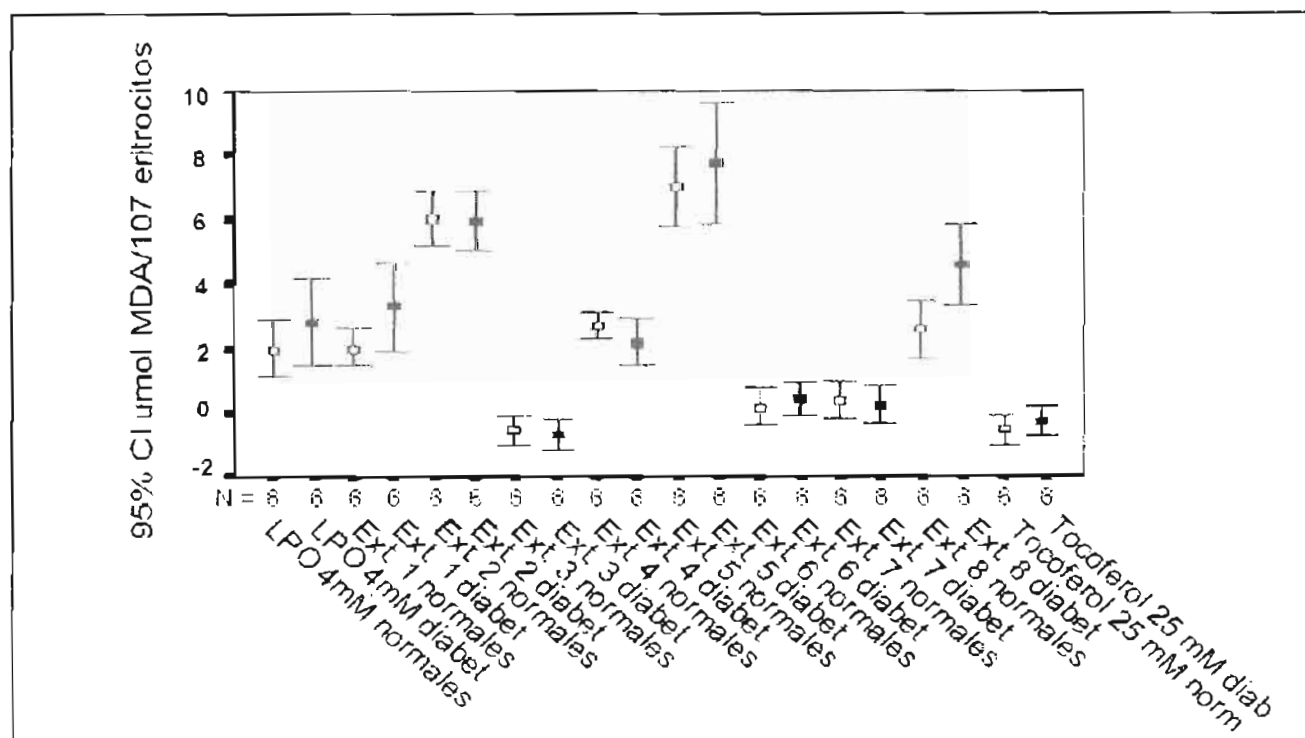
TABLA 11. Niveles de LPO y porcentajes de protección *in vitro* presentados por los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam y α -tocoferol en tres grupos de ratas, se presentan los promedios de $n=6 \pm$ las DE. (+) protege, (-) no protege.

GRUPO	$\mu\text{mol MDA}/10^7$ eritrocitos			% de Protección			
	Normales	Diabéticas	Resistentes	$\% \text{ Protección} = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control } H_2O_2} \times 100 \right)$			
Basal	0.03 \pm 0.02	0.06 \pm 0.03	0.03 \pm 0.03				
Inducida con H_2O_2 4mM (control)	1.94 \pm 0.52	2.75 \pm 0.63	2.08 \pm 0.49	Normales	Diabéticas	Resistentes	
Extracto 1	1.98 \pm 0.07	3.26 \pm 0.13	2.64 \pm 0.09	-2	-18	-27	
Extracto 2	5.98 \pm 1.00	5.93 \pm 1.19	5.39 \pm 1.12	-208	-115	-159	
Extracto 3	0.18 \pm 0.01*	0.09 \pm 0.02*	0.18 \pm 0.02*	+91	+97	+91	
200 ppm	Extracto 4	2.64 \pm 0.16	1.82 \pm 0.02	1.92 \pm 0.21	-37	+34	+8
ppm	Extracto 5	6.97 \pm 0.27	7.75 \pm 1.24	7.12 \pm 1.11	-260	-182	-242
Extracto 6	0.39 \pm 0.32*	0.65 \pm 0.46*	0.46 \pm 0.32*	+80	+77	+78	
Extracto 7	0.65 \pm 0.15*	0.49 \pm 0.27*	0.50 \pm 0.12*	+67	+82	+76	
Extracto 8	1.85 \pm 0.96	5.54 \pm 1.28	3.70 \pm 1.60	+5	-101	-78	
α -tocoferol 10.7 ppm (25 μ M)	0.23 \pm 0.26*	0.27 \pm 0.13*	0.24 \pm 0.22*	+88	+90	+88	

* $p < 0.05$ con respecto a la LPO obtenida con H_2O_2 4mM para cada grupo experimental ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett

En la gráfica 7 se presentan los intervalos de confianza al 95% del efecto *in vitro* observado de los 8 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la peroxidación de lípidos. Los cuadros vacíos representan eritrocitos de ratas normoglucémicas y los cuadros rellenos representan eritrocitos de ratas diabéticas. Las dos primeras barras representan los niveles de LPO inducidos con H_2O_2 4 mM tanto en eritrocitos de ratas normoglucémicas como diabéticas consideradas como control. Se aprecia que las barras correspondientes a

los extractos 1, 4 y 8 no presentaron diferencia significativa con respecto a su control (normoglucémico ó diabético). En las barras de los extractos 2 y 5 se observó un incremento significativo en los niveles de peroxidación con respecto a su control, por el contrario, en las barras correspondientes a los extractos 3, 6 y 7 se apreció una disminución significativa en los niveles de LPO con respecto a su control. Las dos últimas barras corresponden al nivel de peroxidación de lípidos presentado con α -tocoferol, el cual fue considerado en el estudio como control positivo.

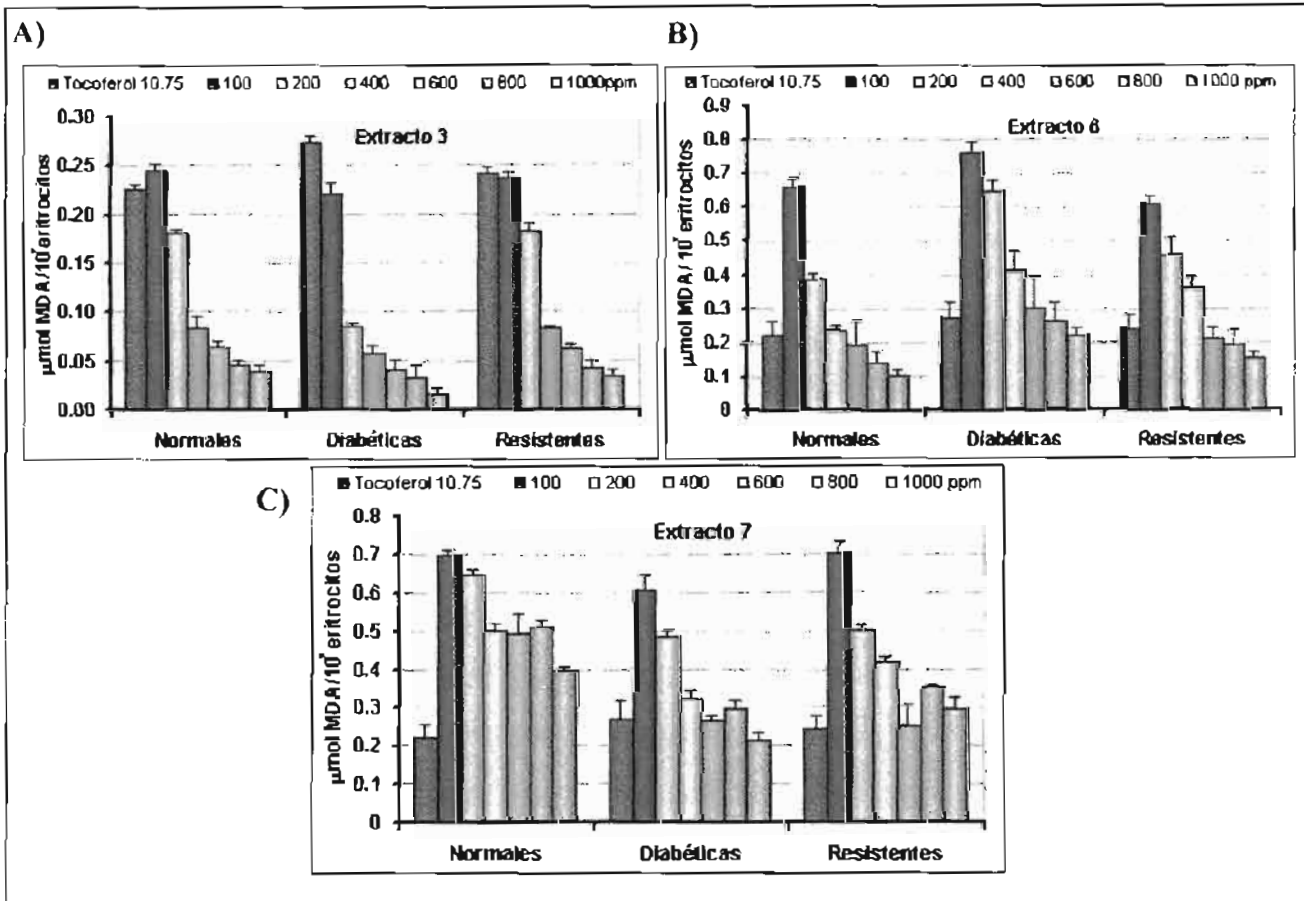


GRÁFICA 7. Eficacia de los 8 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la peroxidación de lípidos.

7.2.6. Curva concentración-respuesta de los extractos que resultaron activos sobre la peroxidación de lípidos en eritrocitos de ratas normales y diabéticas.

Se procedió a realizar curvas concentración-respuesta en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas para los tres extractos activos. Los resultados se presentan en la gráfica 8, en la cual se observa que el extracto 3 presentó la mejor protección contra

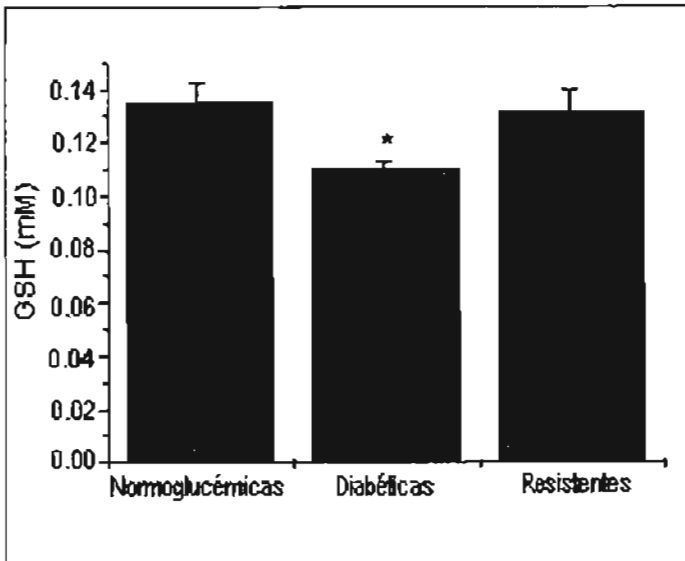
la peroxidación de lípidos de manera dependiente de la concentración. El extracto 6 también presentó efecto protector dependiente de la concentración; sin embargo, en este caso el efecto fue más notorio en eritrocitos de ratas normoglucémicas. En cambio en extracto 7 no mostró ninguna relación dependiente de la concentración.



GRÁFICA 8. Curvas concentración-respuesta *in vitro* de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam que presentaron protección significativa contra la peroxidación de lípidos en tres grupos de ratas. Se presentan los promedios de $n=6 \pm$ la DE.

7.2.7. Concentración de glutatión reducido (GSH) en eritrocitos de ratas normales, diabéticas y resistentes.

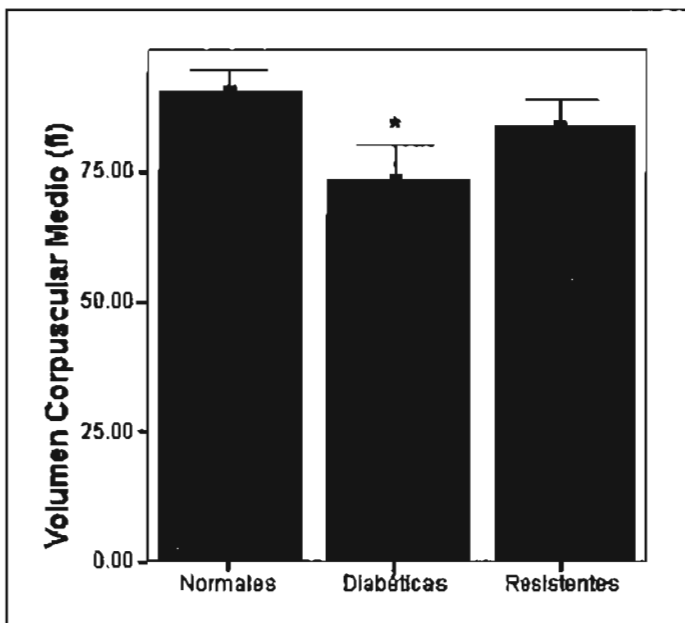
En la gráfica 9 se muestra la comparación de los promedios de GSH cuantificado en eritrocitos de ratas normoglucémicas, diabéticas y resistentes. Sólo el grupo de ratas diabéticas presentó diferencia significativa en los niveles de GSH respecto al grupo control.



GRÁFICA 9. Promedio de la concentración de GSH \pm el EE en 3 grupos de ratas. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet's para $n=18$. * $p<0.05$.

7.2.8. Volumen corpuscular medio (VCM) presentado en sangre total de ratas normoglicémicas, diabéticas y resistentes.

Se encontró una diferencia significativa entre los valores de VGM del grupo de ratas normoglicémicas con respecto al grupo de ratas diabéticas (gráfica 10); lo cual coincide con la bibliografía citada en donde se reportan incrementos en la viscosidad de la sangre de pacientes diabéticos. (Manodori, 2002; Labrouche, 1996; Schmid-Schönbein, 1976)



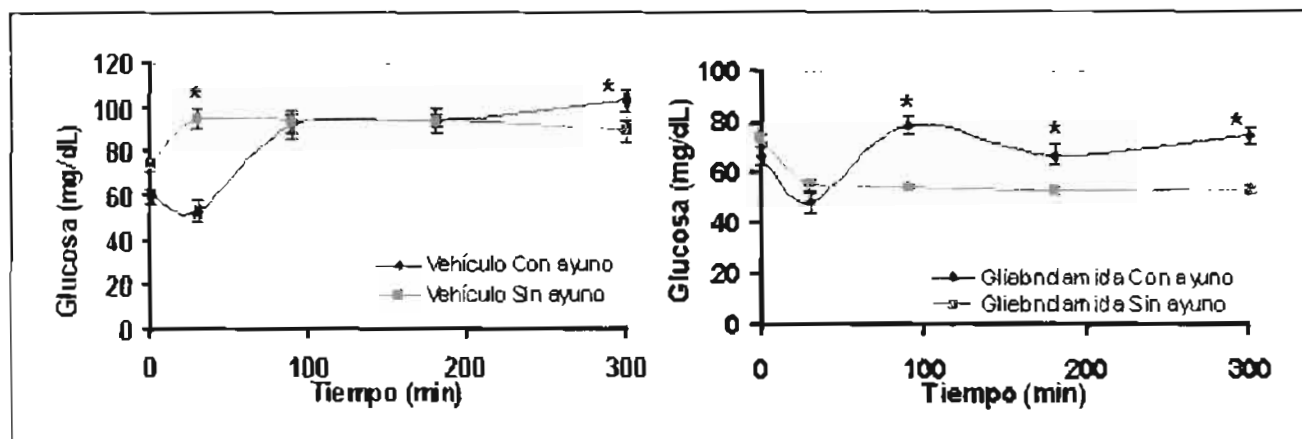
GRÁFICA 10. Promedio de VCM \pm el EE en 3 grupos de ratas. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet's para $n=18$. * $p<0.05$.

7.3. TERCERA PARTE. Estudios in vivo

7.3.1. Efecto del ayuno y determinación del tiempo de muestreo para cuantificar el efecto hipoglucemiante de glibenclamida y 2 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam en ratas normoglucémicas

En la gráfica 11 se observan las diferencias en el efecto hipoglucemiante al administrar por vía oral glibenclamida ó aceite de maíz en ratas sometidas a ayuno por 18 horas. Tanto en el vehículo como en la glibenclamida los niveles de glucosa descendieron en los primeros treinta minutos, pero a los 90 minutos aumentó la glucemia de manera importante, y solo para la glibenclamida permaneció discretamente baja durante los siguientes minutos.

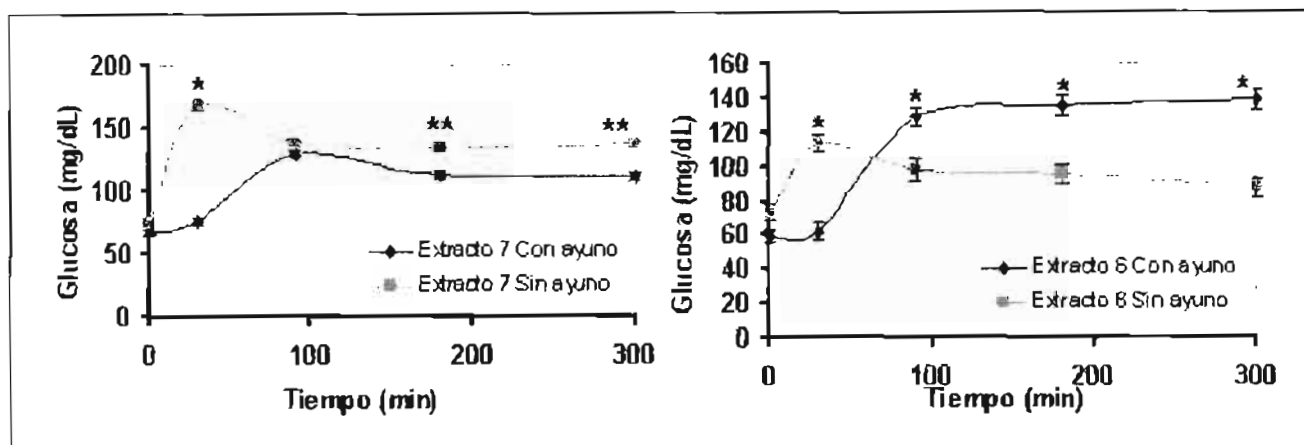
Por el contrario en el caso de las ratas sin ayuno, el comportamiento de glibenclamida corresponde al esperado como fármaco hipoglucemiante y el vehículo permaneció constante sin interferir en las concentraciones de glucosa.



GRÁFICA 11. Cursos temporales del efecto sobre los niveles de glucosa del vehículo (aceite de maíz) y glibenclamida (10mg/kg) con y sin ayuno. Cada punto representa el promedio de $n=3 \pm$ la DE. * $p<0.05$.

En la gráfica 12 se observa el comportamiento de dos de los extractos administrados por vía oral en ratas con y sin ayuno. Al igual que la figura anterior, las curvas correspondientes a un estado de ayuno descienden a los 30 minutos y posteriormente aumentan a los 90 minutos de muestreo permaneciendo casi constantes hasta el final del tiempo de monitoreo. En condiciones sin ayuno ambos extractos elevan los niveles de glucosa a los 30 minutos, sin embargo, el comportamiento cinético del

extracto 6 difirió significativamente respecto a las condiciones con ayuno. Para el extracto 7 el comportamiento cinético fue más discreto.

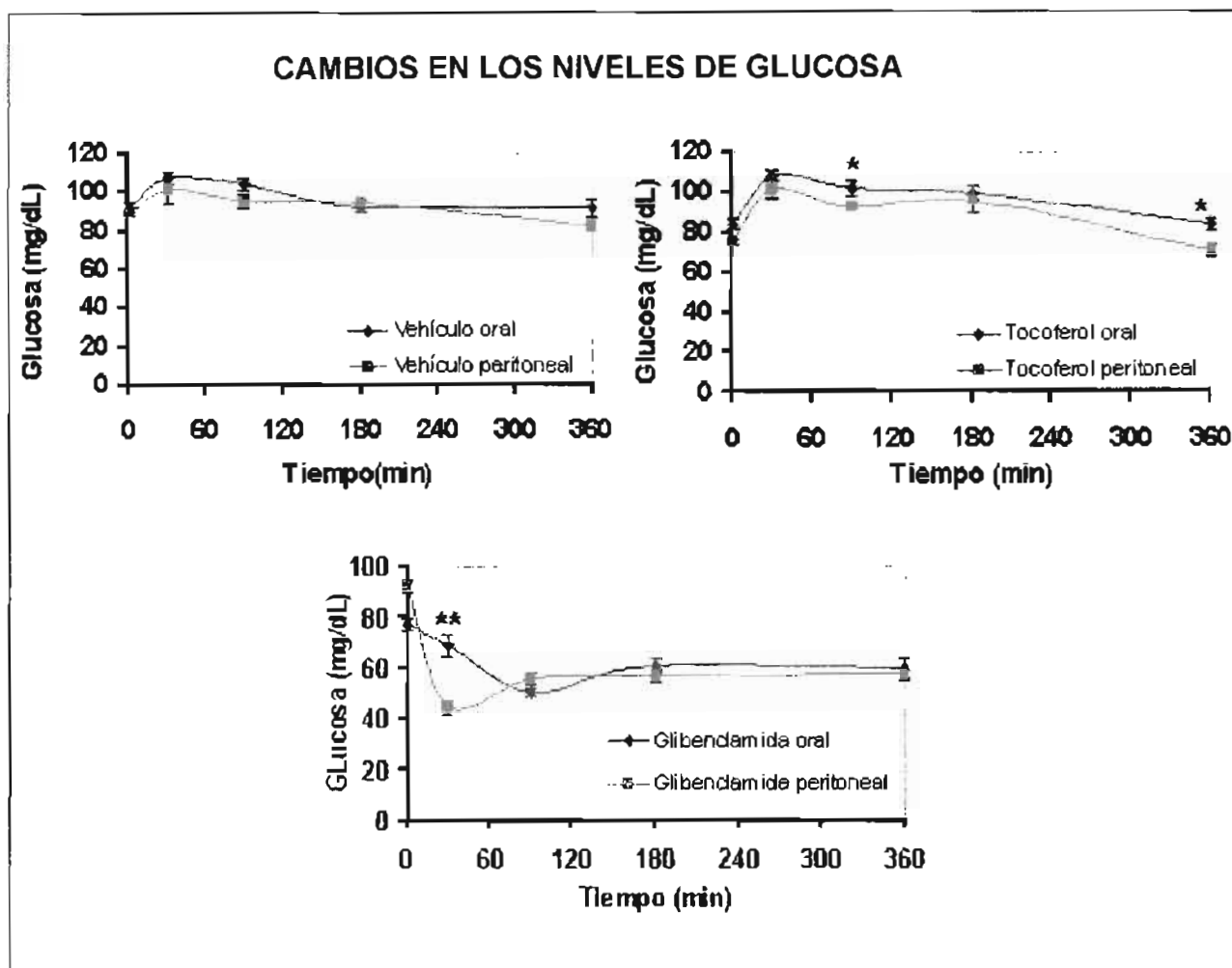


GRÁFICA 12. Cursos temporales del efecto sobre los niveles de glucosa del extracto 6 y 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam (150 mg/kg) con y sin ayuno. Cada punto representa el promedio de $n=3 \pm$ la desviación estándar. ** $p<0.05$, * $p<0.001$

7.3.2. Comparación de dos vías de administración sobre el efecto hipoglucemiante y la peroxidación de lípidos de glibenclamida, α -tocoferol y tres extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam en ratas normoglucémicas.

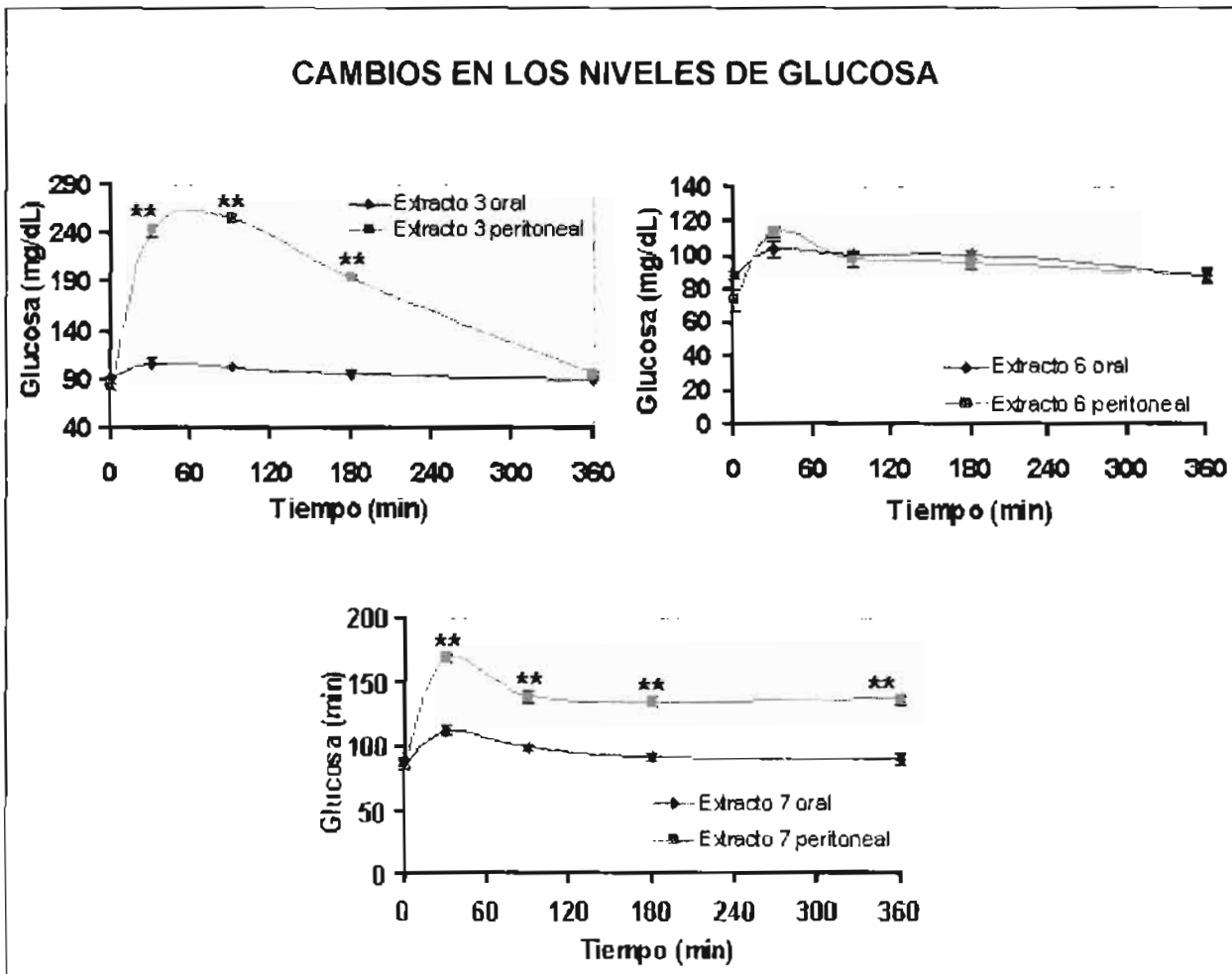
En las gráficas 13 y 14 se presentan las curvas obtenidas sobre el efecto hipoglucemiante del vehículo, α -tocoferol, glibenclamida y tres extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam al administrarse por vía oral o intraperitoneal.

En la gráfica 13 se observan los cursos temporales del vehículo, α -tocoferol y glibenclamida; en los primeros dos casos el comportamiento fue muy similar para ambas vías, no así en el caso de glibenclamida para la cual se observa que administrada por vía intraperitoneal se aprecia un efecto hipoglucemiante importante en un tiempo menor (30 minutos); sin embargo, a lo largo del muestreo se observa que las curvas comienzan a presentar un comportamiento hipoglucemiante similar.



GRÁFICA 13. Cursos temporales del efecto glucémico en 2 vías de administración del vehículo (aceite de maíz), α -tocoferol (50 mg/kg) y glibenclávida (10mg/kg). Cada punto representa el promedio de $n=3 \pm$ la desviación estándar. ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

En la gráfica 14 se presentan las curvas de los tres extractos de *Physalis chenopodiifolia* Lam activos en el estudio de peroxidación de lípidos *in vitro*. En este caso se observan incrementos significativos en los niveles de glucosa desde los primeros 30 min después de la administración intraperitoneal de los extractos 3 y 7 con respecto al grupo de ratas administradas con los mismos extractos pero por la vía oral. Para el extracto 6 los niveles de glucosa se traslapan en ambas vías de administración.



GRÁFICA 14. Cursos temporales del efecto glucémico en 2 vías de administración de 3 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam (150 mg/kg). Cada punto representa el promedio de $n=3 \pm$ la desviación estándar. $**p<0.001$.

En la tabla 12 se aprecia que el peróxido de hidrógeno en el grupo control induce la peroxidación de lípidos en más del 99 y 120% con respecto a su basal de la misma vía de administración.

En el caso del pretratamiento con glibenclamida por vía intraperitoneal se incrementó la peroxidación de lípidos en más del 200% respecto a su basal y en 150% cuando se administra por vía oral. Con respecto al grupo control, la glibenclamida incrementó la peroxidación en casi el 80% cuando se administra por vía i.p. y alrededor del 50% cuando se administró por vía oral.

TABLA 12. Niveles de peroxidación de lípidos *in vivo* en eritrocitos de ratas normoglucémicas tratadas con los fármacos de referencia y 3 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam en dos vías de administración. Se presenta el promedio de $n=3 \pm$ la desviación estándar. En el porcentaje de protección el (+) protege y el (-) no protege.

GRUPO	Vía de admón.	$\mu\text{M DE MDA}/10^7$ ERITROCITOS			INCREMENTO RESPECTO A LA BASAL (MISMO GRUPO Y VÍA DE ADMÓN.)	% de Protección
		Basal	6 hrs. post-administración	Inducción de LPO con H_2O_2 4mM		
Control (aceite de maíz)	p.o.	0.02 $\pm 1.2^{-3}$	0.02 $\pm 2.1^{-3}$	1.78 $\pm 2.1^{-3}$	99.11	$\%P = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100 \right)$
	i.p.	0.02 $\pm 1.2^{-3}$	0.17 $\pm 1.8^{-3}$	1.82 $\pm 3.1^{-2}$	121.2	
Glibenclamida (10 mg/kg)	p.o.	0.02 $\pm 1.2^{-3}$	0.02 $\pm 0.9^{-2}$	2.75 $\pm 2.1^{-2}$	152.7	-54
	i.p.	0.02 $\pm 1.2^{-3}$	0.04* $\pm 1.2^{-3}$	3.70 $\pm 2.1^{-2}$	217.3	-79
α -tocoferol (50 mg/kg)	p.o.	0.02 $\pm 1.1^{-3}$	0.02 $\pm 1.5^{-3}$	2.45 $\pm 3.1^{-2}$	116.5	-37
	i.p.	0.02 $\pm 1.3^{-3}$	0.02 $\pm 2.9^{-4}$	0.51* $\pm 2.5^{-2}$	25.5	+71
Extracto 3 (150 mg/kg)	p.o.	0.02 $\pm 2.6^{-4}$	0.02 $\pm 1.1^{-3}$	2.17 $\pm 2.2^{-2}$	108.5	-22
	i.p.	0.02 $\pm 1.5^{-3}$	0.02 $\pm 1.5^{-3}$	0.52* $\pm 3.5^{-2}$	26.0	+71
Extracto 6 (150 mg/kg)	p.o.	0.02 $\pm 1.9^{-3}$	0.02 $\pm 2.6^{-3}$	2.60 $\pm 2.1^{-2}$	144.4	-46
	i.p.	0.02 $\pm 1.5^{-3}$	0.03* $\pm 5.2^{-4}$	1.80* $\pm 4.1^{-3}$	100.1	+1
Extracto 7 (150 mg/kg)	p.o.	0.02 $\pm 1.7^{-3}$	0.02 $\pm 2.5^{-4}$	2.73 $\pm 3.1^{-2}$	151.6	-53
	i.p.	0.02 $\pm 1.79^{-3}$	0.01 $\pm 1.1^{-3}$	1.79* $\pm 2.5^{-2}$	105.3	+2

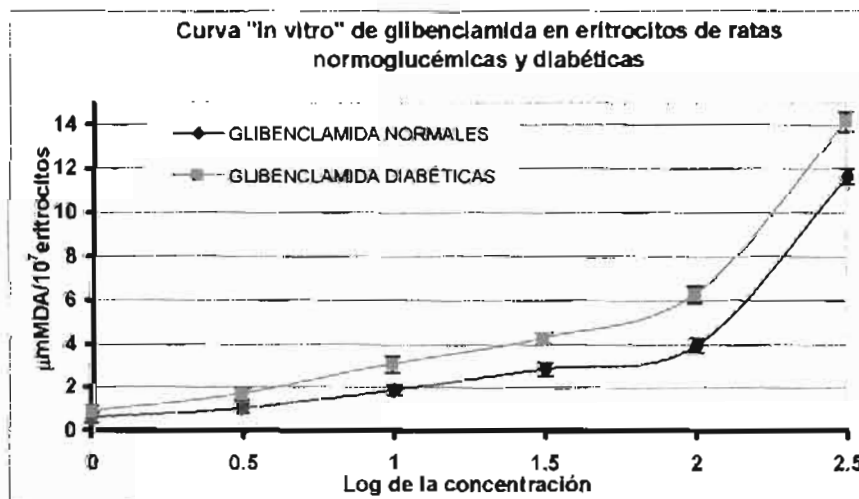
* $p < 0.05$ con respecto a la vía oral del mismo grupo
ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tuckey's

Tanto el α -tocoferol como el extracto 3 administrados por vía oral incrementaron la peroxidación de lípidos con respecto a su basal en un 116 y 108% respectivamente, a diferencia de un 25.5 y 26% cuando se administra por vía i.p. Esto indica que la administración por vía intraperitoneal en ambos casos protege a los eritrocitos de la lipoperoxidación en un 71% y la induce en un 37 y 22% cuando se administra por vía oral.

Los extractos 6 y 7 presentaron efectos similares, por una parte, cuando se administraron por vía oral incrementaron la peroxidación de lípidos respecto al grupo control; en cambio cuando se administraron por vía intraperitoneal mostraron un efecto discretamente protector sobre la lipoperoxidación (1 y 2% respectivamente).

7.3.3. Curva *in vitro* e *in vivo* de glibenclamida para la determinación de su efecto sobre la peroxidación de lípidos en ratas normoglucémicas y diabéticas.

Debido a que se observó un incremento en los niveles de peroxidación de lípidos en los grupos administrados con glibenclamida vía intraperitoneal y oral, fue necesario hacer curvas concentración-respuesta *in vitro* e *in vivo* para determinar si el incremento de la peroxidación de lípidos era un proceso dependiente de la concentración.



GRAFICA 15. Niveles de lipoperoxidación *in vitro* post-administración de glibenclamida. Se presenta el promedio de $n=5 \pm$ la DS.

En la gráfica 15 se presenta la curva concentración-respuesta *in vitro* de glibenclamida en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas inducidas con H₂O₂ 4 mM, en la cual se observa un incremento de la LPO dependiente de la concentración. Este comportamiento también se presentó *in vivo* tanto en eritrocitos de ratas normoglucémicas como en diabéticas pretratadas con glibenclamida (tabla 13).

Cuando se administraron dosis de 10 y 15 mg/kg de glibenclamida en ratas normoglucémicas se incrementaron los niveles de LPO de 11.6 y 69.8% respectivamente, en comparación con un 3.7 y 39.6% que presentaron las ratas diabéticas. En cambio, cuando se administraron dosis de 20 mg/kg el incremento en la LPO fue mayor en las ratas diabéticas en un 149% en comparación con un 76% encontrado en las ratas normoglucémicas.

TABLA 13. Niveles de lipoperoxidación *in vivo* en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas pretratadas con tres dosis de glibenclamida por vía intraperitoneal. Se presentan los promedios de n=5 ± la DS. * p<0.05 **p<0.001 con respecto al control de la toma basal, 6 horas post-administración ó inducido con H₂O₂ según sea el caso. En el porcentaje de protección el (+) protege y el (-) no protege.

Dosis de glibenclamida	µmol MDA/10 ⁷ eritrocitos							
	Normoglucémicas				DIABÉTICAS			
	Basal	6 hrs. post-administración	Inducción de LPO con H ₂ O ₂ 4mM	% de Protección	Basal	6 hrs. post-administración	Inducción de LPO con H ₂ O ₂ 4mM	% de Protección
Control (aceite de maíz)	0.015 ± 5.8 ⁻⁴	0.017 ± 1.0 ⁻³	1.521 ± 3.7 ⁻²	$\%P = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100 \right)$	0.017 ± 1.0 ⁻³	0.017 ± 2.5 ⁻³	2.163 ± 1.7 ⁻¹	$\%P = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100 \right)$
10 mg/kg	0.015 ± 9.8 ⁻⁴	0.018 ± 2.1 ⁻³	1.697 ± 5.5 ⁻¹	-11.6	0.016 ± 1.7 ⁻⁴	0.022 ± 3.8 ⁻³	2.243 ± 5.4 ⁻¹	-3.7
15 mg/kg	0.016 ± 2.2 ⁻³	0.025 ^{**} ± 4.3 ⁻³	2.582 [*] ± 1.0 ⁻¹	-69.8	0.019 ± 2.2 ⁻³	0.028 ^{**} ± 2.4 ⁻³	3.019 ± 4.1 ⁻¹	-39.6
20 mg/kg	0.015 ± 1.7 ⁻³	0.025 ^{**} ± 3.9 ⁻³	2.674 [*] ± 2.9 ⁻¹	-75.8	0.018 ± 3.6 ⁻³	0.027 ^{**} ± 4.4 ⁻³	5.386 ^{**} ± 6.7 ⁻¹	-149.0

ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet

7.3.4. Curva dosis-respuesta de α-tocoferol sobre la peroxidación de lípidos en ratas normoglucémicas y diabéticas.

Debido a que en este estudio se empleo el α-tocoferol como estándar positivo contra la peroxidación de lípidos, fue necesario realizar una curva dosis-respuesta para

determinar si su efecto era dependiente de la concentración. En la tabla 14 se observa el efecto *in vivo* del α -tocoferol sobre los niveles de LPO. Se aprecia que tanto en las ratas normoglucémicas como en las diabéticas el porcentaje de protección contra la LPO es mayor al 50% para las tres dosis probadas; sin embargo, también se observa que al administrar dosis de 50 mg/kg el porcentaje de protección es mayor en las ratas normoglucémicas (68%) que en las diabéticas (56%); en cambio, al administrar dosis de 25 y 100 mg/kg prácticamente fueron similares.

TABLA 14. Niveles de lipoperoxidación *in vivo* en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas pretratadas con tres dosis de α -tocoferol por vía intraperitoneal. Se presentan los promedios de $n=5 \pm$ la DS * $p<0.05$ ** $p<0.001$ con respecto al control de la toma basal, 6 horas post-administración ó inducido con H_2O_2 según sea el caso. En el porcentaje de protección el (+) protege y el (-) no protege.

Dosis de α -tocoferol	$\mu\text{mol MDA}/10^7$ eritrocitos							
	Normoglucémicas				DIABÉTICAS			
	Basal	6 hrs. post-administración	Inducción de LPO con H_2O_2 4mM	% de Protección	Basal	6 hrs. post-administración	Inducción de LPO con H_2O_2 4mM	% de Protección
Control (aceite de maíz)	0.015 $\pm 5.8^{-4}$	0.017 $\pm 1.0^{-3}$	1.521 $\pm 3.7^{-2}$	$\%P = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100 \right)$	0.017 $\pm 1.0^{-3}$	0.017 $\pm 2.5^{-3}$	2.16 $\pm 1.7^{-1}$	$\%P = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100 \right)$
25 mg/kg	0.017 $\pm 1.1^{-3}$	0.018 $\pm 1.1^{-3}$	0.737* $\pm 1.7^{-2}$	+51.5	0.019 $\pm 3.0^{-3}$	0.018 $\pm 3.21^{-3}$	1.016* $\pm 6.1^{-2}$	+53.0
50 mg/kg	0.018 $\pm 2.5^{-3}$	0.016 $\pm 2.6^{-3}$	0.479** $\pm 1.0^{-2}$	+68.5	0.018 $\pm 2.8^{-3}$	0.019 $\pm 2.5^{-3}$	0.936** $\pm 1.9^{-2}$	+56.7
100 mg/kg	0.017 $\pm 1.4^{-3}$	0.016 $\pm 1.0^{-3}$	0.381** $\pm 7.4^{-3}$	+75.0	0.016 $\pm 2.1^{-3}$	0.015 $\pm 1.5^{-3}$	0.519** $\pm 7.8^{-2}$	+76.0

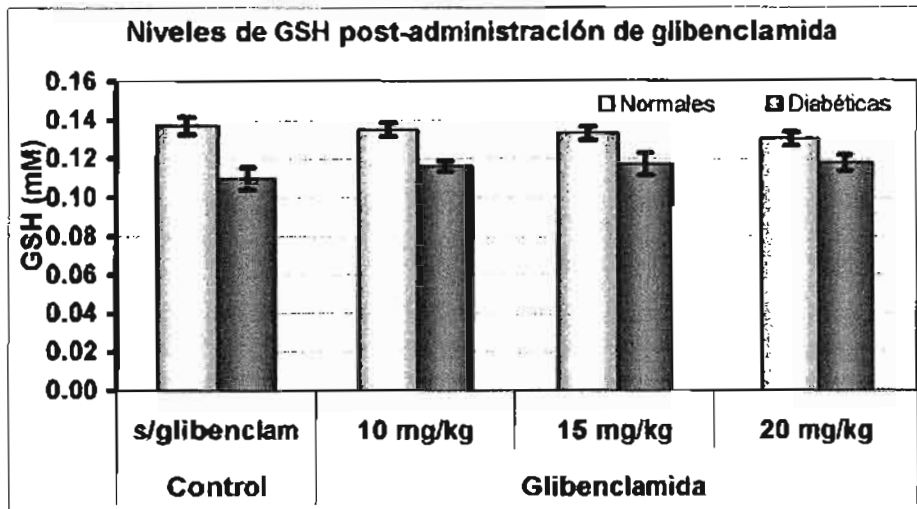
ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett

7.3.5. Efecto post-administración de glibenclamida y tocoferol sobre los niveles de glutatión reducido (GSH)

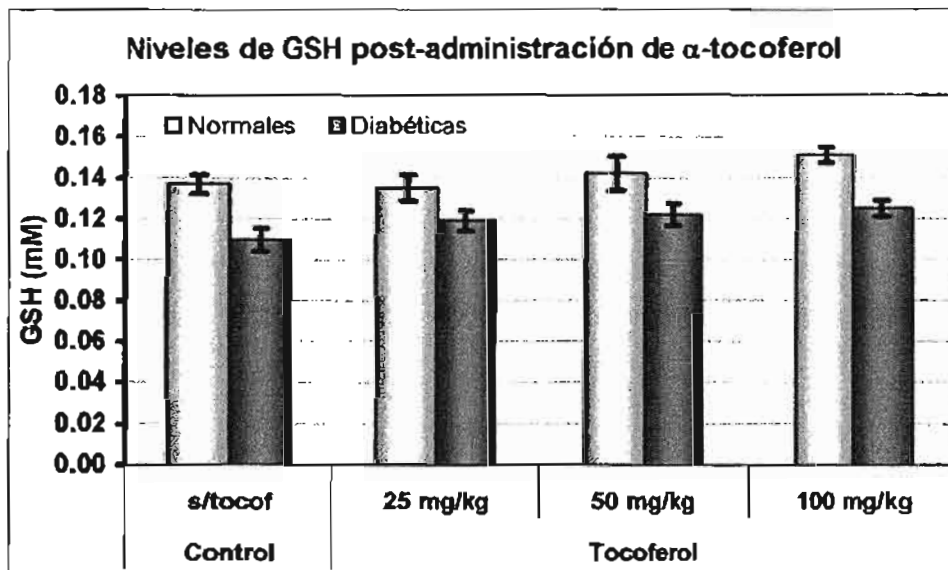
Se cuantificaron las concentraciones de GSH al administrar diferentes dosis de glibenclamida y α -tocoferol, tanto en ratas normoglucémicas como en diabéticas.

En la gráfica 16 se presentan las concentraciones de GSH después de 6 horas de la administración i.p. de 3 dosis de glibenclamida. Se observa diferencia significativa en los 3 grupos de ratas diabéticas con respecto a los tres grupos de ratas normoglucémicas, sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre los grupos administrados con

diferentes dosis con respecto al control, esta condición se observó tanto en eritrocitos de ratas normoglucémicas como en las diabéticas.



GRÁFICA 16. Concentración de GSH en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas cuantificado 6 horas después de ser administradas i.p. con 3 dosis de glibenclamida. Se presenta el promedio \pm la desviación estándar de $n = 5$. ANOVA seguido de Tuckey $*p < 0.05$ con respecto al grupo de ratas normales administradas con la misma dosis.

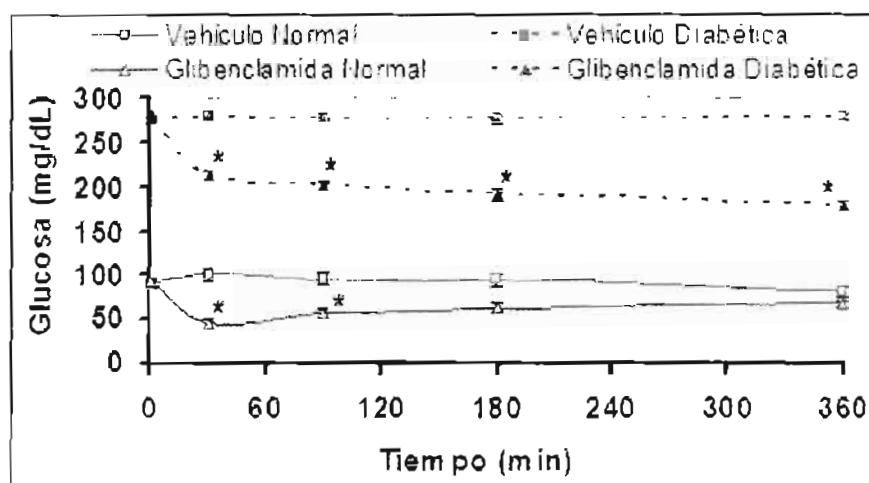


GRÁFICA 17. Concentración de GSH en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas cuantificado 6 horas después de ser administradas i.p. con 3 dosis de α -tocoferol. Se presenta el promedio \pm la desviación estándar de $n = 5$. ANOVA seguido de Tuckey $*p < 0.05$ con respecto al grupo de ratas normales administradas con la misma dosis.

Los resultados en la concentración de GSH obtenidos después de 6 horas de la administración i.p. de 3 dosis de α -tocoferol se presentan en la gráfica 17. Al igual que la gráfica de glibenclamida, se observa diferencia significativa entre los tres grupos de ratas diabéticas respecto a los grupos de ratas normoglucémicas. En las ratas diabéticas no se presentó diferencia significativa entre los grupos administradas con 25, 50 y 100 mg/kg de α -tocoferol con respecto a su control glucémico. En las ratas normoglucémicas, se presentó diferencia significativa en el grupo administrado con 100 mg/kg con respecto a su grupo control.

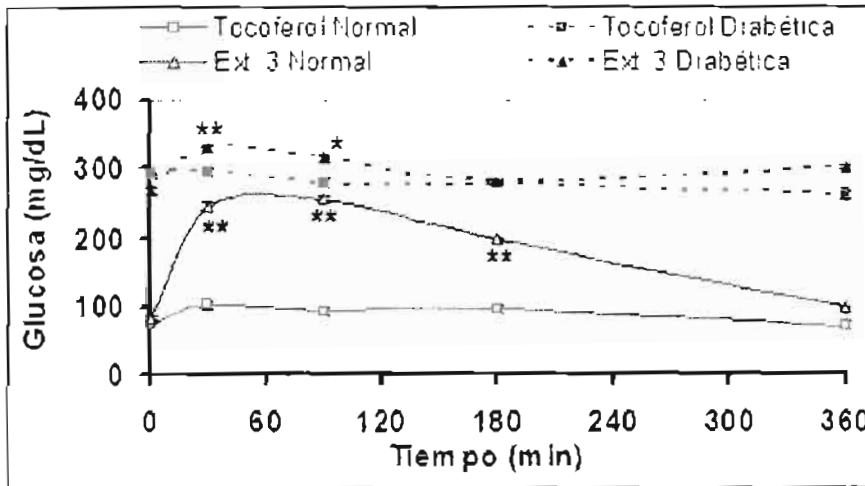
7.3.6. Efecto en los niveles de glucosa de 5 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam en ratas normales y diabéticas.

En la gráfica 18 se presentan los cursos temporales del efecto hipoglucemiante que tuvieron el vehículo (aceite de maíz) y la glibenclamida en ratas normoglucémicas y diabéticas. En las curvas del vehículo se aprecia que tanto en las ratas normales como en las diabéticas no hubo cambios importantes con respecto a los niveles de glucosa inicial durante el transcurso del monitoreo. En el caso de la glibenclamida, se observó un comportamiento similar en ambos grupos, evidenciándose más el efecto hipoglucemiante en las ratas diabéticas.



GRAFICA 18. Curso temporal de los niveles de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas i.p. con vehículo (aceite de maíz) y glibenclamida (10 mg/kg) sin ayuno. Se presentan los promedios de $n=3 \pm$ la DS. * $p<0.05$.

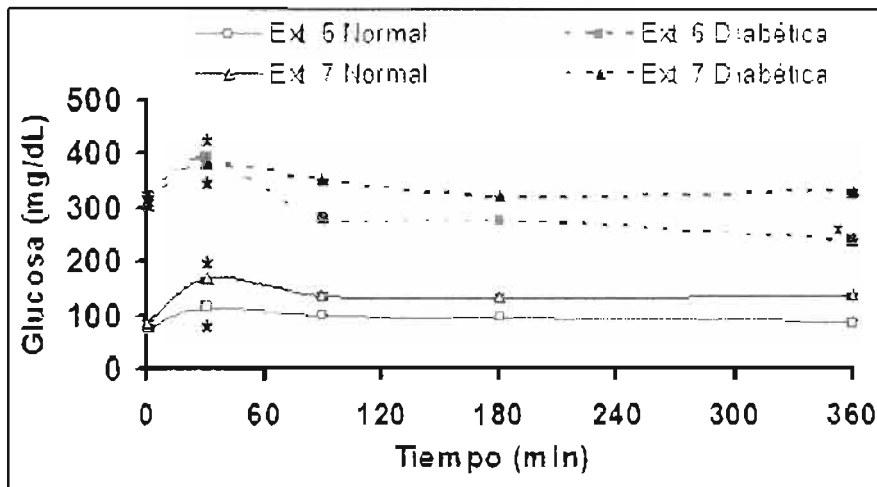
En la gráfica 19 se presentan los cursos temporales de α -tocoferol y del extracto 3 de *Physalis chenopodifolia* Lam, en el α -tocoferol no se observó ningún cambio importante durante el monitoreo en los dos grupos de ratas. Por el contrario, en el caso del extracto 3 se observó un incremento significativo de glucosa a partir de los primeros 30 minutos de muestreo, siendo más notable en las ratas normoglucémicas.



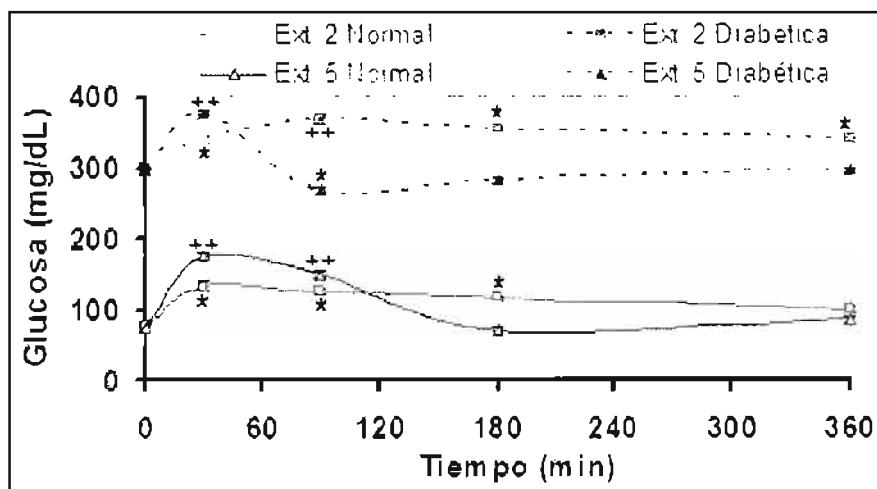
GRAFICA 19. Curso temporal de los niveles de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas i.p. con α -tocoferol (50 mg/kg) y extracto 3 de *Physalis chenopodifolia* Lam (150 mg/kg) sin ayuno. Se presentan los promedios de $n=3 \pm$ las DS. ** $p<0.001$, * $p<0.05$.

En las gráficas 20 y 21 se presentan los cursos temporales de los extractos 2, 5, 6 y 7 en ratas normoglucémicas y diabéticas. Los cursos temporales de los extractos 6 y 7 de los dos grupos de ratas, también presentaron un efecto hiperglucemiante significativo en los primeros 30 minutos de muestreo, mismo que fue desapareciendo en los siguientes minutos de muestreo.

En el extracto 2 se observa un aumento significativo en los niveles de glucosa para ambos grupos de ratas a lo largo de todo el curso temporal. Para el extracto 5 se presentó un aumento significativo en los valores de glucosa en los primeros 30 minutos de muestreo en los 2 grupos de ratas, posteriormente este efecto se vio disminuido ligeramente por debajo del valor inicial y con el tiempo regreso a su valor basal.



GRAFICA 20. Curso temporal del nivel de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas i.p. con los extractos 6 y 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam (150 mg/kg) sin ayuno. Se presentan los promedios de $n=3 \pm$ las DS. * $p<0.05$.



GRAFICA 21. Curso temporal del nivel de glucosa en ratas normoglucémicas y diabéticas administradas i.p. con los extractos 2 y 5 de *Physalis chenopodifolia* Lam (150 mg/kg) sin ayuno. Se presentan los promedios de $n=3 \pm$ las DS. ** $p<0.001$, * $p<0.05$.

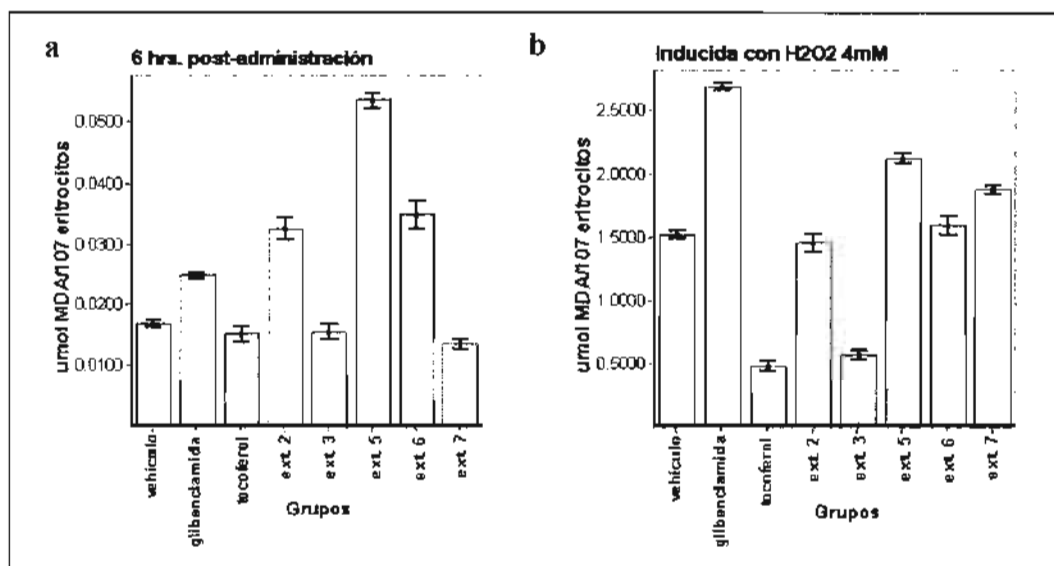
7.3.7. Efecto de los 5 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre los niveles de LPO en ratas normales y diabéticas.

En la tabla 15 y 16 se muestran los resultados obtenidos del efecto sobre la LPO de los extractos 2, 3, 5, 6 y 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam, así como de sus controles (α -tocoferol y glibenclamida) en ratas normoglucémicas y diabéticas, respectivamente.

La gráfica 22 permite observar el efecto presentado en las ratas normoglucémicas después de seis horas de la administración intraperitoneal del compuesto correspondiente a cada grupo, así como el efecto presentado al inducir la LPO *in vitro* en sus eritrocitos. Se observa que después de 6 horas, el grupo administrado con el extracto 5 de *Physalis chenopodifolia* Lam es el que presentó mayores niveles de LPO, por lo que al igual que en los experimentos *in vitro* este extracto promovió un incremento significativo en los niveles de LPO con respecto a sus controles; los grupos correspondientes a los extractos 2 Y 6 presentaron niveles de LPO iguales, ambos con incrementos significativos con respecto al control. Los grupos correspondientes a los extractos 3, 7 y α -tocoferol no mostraron diferencias significativas con respecto al control. Además, se aprecia que el grupo administrado con glibenclamida presenta un incremento significativo con respecto al control por debajo del presentado en los grupos correspondientes a los extractos 5, 2 y 6, sin embargo, en la gráfica 22b se aprecia que el grupo más susceptible a la LPO al inducirla con H_2O_2 es el grupo administrado con glibenclamida, este efecto aunque menor, también fue observado en el grupo de ratas diabéticas administradas con glibenclamida (gráfica 23a y b). Tanto en la gráfica 22b y 23b, se aprecia el efecto antioxidante que presentaron los grupos administrados con el extracto 3 de *Physalis chenopodifolia* Lam y con α -tocoferol al disminuir significativamente los niveles de LPO, es de resaltar además, que el grupo de ratas diabéticas administradas con el extracto 3 presentó un efecto antioxidante de casi tres veces mayor que el presentado en el grupo administrado con α -tocoferol, el cual fue empleado como estándar positivo del efecto antioxidante contra la LPO.

TABLA 15. Efecto de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam y fármacos de referencia sobre la LPO *in vivo* en ratas promedio \pm la desviación estándar de n=3. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnet. *p<0.01, **p<0.001 con respecto al tipo de muestra.

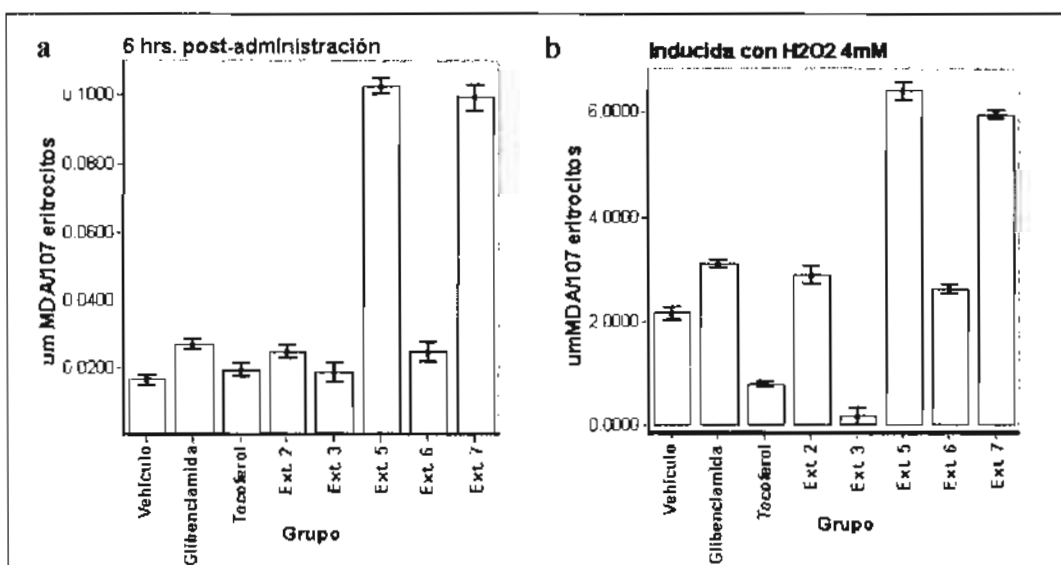
Muestra	$\mu\text{mol MDA}/10^7$ eritrocitos en ratas normoglucémicas						
	Control (aceite de maíz)	Glibenclámdida (10 mg/kg)	α -tocoferol (50 mg/kg)	Extracto 2	Extracto 3	Extracto 5 (150 mg/kg)	Extracto 7 (150 mg/kg)
Basal	0.0147 \pm 5.8 ⁻⁴	0.0167 \pm 1.2 ⁻³	0.0170 \pm 2.0 ⁻³	0.0143 \pm 5.7 ⁻⁴	0.0147 \pm 2.1 ⁻²	0.0180 \pm 1.0 ⁻³	0.0180 \pm 1.0 ⁻³
6 hrs. post-administración	0.0170 \pm 1.0 ⁻³	0.0250 * \pm 1.0 ⁻³	0.0154 \pm 2.0 ⁻³	0.0327 * \pm 3.1 ⁻³	0.0157 \pm 2.1 ⁻³	0.0537 * \pm 2.1 ⁻³	0.0537 * \pm 2.1 ⁻³
Inducida con H ₂ O ₂ 4mM	1.521 \pm 3.7 ⁻²	2.694 ** \pm 5.5 ⁻²	0.486 ** \pm 2.5 ⁻³	1.468 \pm 1.0 ⁻²	0.569 ** \pm 1.8 ⁻²	2.132 ** \pm 6.4 ⁻²	2.132 ** \pm 6.4 ⁻²



GRAFICA 22. Niveles de MDA en eritrocitos de ratas normoglucémicas con vehículo (control) y extractos de *Physalis c...* (a) A la izquierda al fin de 6 hrs. (b) A la derecha inducida con H₂O₂ 4mM.

TABLA 16. Efecto de los extractos de *Physalis chenopodiifolia* Lam y fármacos de referencia sobre la LPO *in vivo* en promedio \pm la desviación estándar de n=3. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett. *p<0.001, **p<0.001 control vs. grupo de muestra.

Muestra	$\mu\text{m MDA}/10^7$ eritrocitos en ratas diabéticas						
	Control (aceite de maíz)	Glibenclamida (10 mg/kg)	α -tocoferol (50 mg/kg)	Extracto 2	Extracto 3	Extracto 5 (150 mg/kg)	Extracto 7 (150 mg/kg)
Basal	0.0170 $\pm 1.0^{-3}$	0.0210 $\pm 1.7^{-3}$	0.0203 $\pm 3.2^{-3}$	0.0199 $\pm 3.0^{-3}$	0.0180 $\pm 4.3^{-3}$	0.0163 $\pm 1.1^{-3}$	0.0163 $\pm 1.1^{-3}$
6 hrs. post-administración	0.0167 $\pm 2.5^{-3}$	0.0273 * $\pm 2.8^{-3}$	0.0197 $\pm 3.1^{-3}$	0.0250 $\pm 3.3^{-3}$	0.0187 $\pm 4.7^{-3}$	0.1026 * $\pm 4.2^{-3}$	0.1026 * $\pm 4.2^{-3}$
Inducida con H ₂ O ₂ 4mM	2.163 $\pm 1.7^{-1}$	3.111 ** $\pm 1.4^{-1}$	0.806 ** $\pm 8.5^{-2}$	2.471 $\pm 4.1^{-2}$	0.293 ** $\pm 2.8^{-1}$	6.072 ** $\pm 2.2^{-2}$	6.072 ** $\pm 2.2^{-2}$



GRAFICA 23. Niveles de MDA en eritrocitos de ratas diabéticas. Vehículo (control), Glibenclamida, Tocoferol y extractos de *Physalis oleracea* (a) A la izquierda al 6 hrs. post-administración y (b) A la derecha inducida con H₂O₂ 4mM.

7.3.8. Efecto de los 5 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre los niveles de glutatión reducido y Volumen Corpuscular Medio en ratas normoglucémicas y diabéticas.

En la tabla 17 se muestra el resultado obtenido sobre los niveles de GSH en los grupos administrados con cinco extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam. Se aprecia que no existió diferencia significativa con respecto al control en ninguno de los grupos administrados con los 5 extractos ó controles, tanto en ratas normoglucémicas como en las diabéticas. Sin embargo, si se conservó la diferencia significativa de los grupos de ratas normoglucémicas con respecto a los grupos de ratas diabéticas, tal como se observó en la segunda parte de los experimentos *in vitro* (apartado 7.2.7).

La tabla 18 presenta los resultados del efecto observado en las ratas normoglucémicas y diabéticas administradas con los cinco extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam y sus controles sobre la densidad sanguínea, representado por el valor del Volumen Corpuscular Medio (VCM). Al igual que en la tabla 17, no se presentó diferencia significativa en ninguno de los grupos administrados con los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam ni en sus estándares (α -tocoferol y glibenclamida) con respecto al grupo control. Sin embargo, si se conservó la diferencia significativa de los grupos de ratas normoglucémicas con respecto a los grupos de ratas diabéticas, tal como se observó en la segunda parte de los experimentos *in vitro* (apartado 7.2.8).

TABLA 17. Efecto *in vivo* de 5 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam y sus controles sobre los niveles normoglucémicos y diabéticos. Se presenta el promedio \pm la desviación estándar de n=3. ANOVA de una prueba de Dunnet. *p<0.05 con respecto al grupo correspondiente de ratas normoglucémicas.

Estado glucémico	GLUTATIÓN REDUCIDO (mM)						
	Vehículo (control)	Glibenclamida (10 mg/kg)	α -tocoferol (50 mg/kg)	Extracto 2	Extracto 3	Extracto 5 (150 mg/kg)	Extracto
Normo-glucémicas	0.137 $\pm 2.51^{-3}$	0.134 $\pm 6.83^{-3}$	0.146 $\pm 1.29^{-2}$	0.148 $\pm 7.70^{-3}$	0.142 $\pm 7.07^{-3}$	0.142 $\pm 8.89^{-3}$	0.137 $\pm 7.18^{-3}$
Diabéticas	0.112* $\pm 1.02^{-2}$	0.103* $\pm 2.00^{-2}$	0.105* $\pm 1.28^{-2}$	0.106* $\pm 3.86^{-3}$	0.119* $\pm 5.88^{-3}$	0.110* $\pm 5.27^{-3}$	0.111* $\pm 1.96^{-3}$

TABLA 18. Efecto *in vivo* de 5 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam y sus controles sobre el Volumen (VCM) en ratas normoglucémicas y diabéticas. Se presenta el promedio \pm la desviación estándar de n=3, seguido de una prueba de Dunnet. *p<0.05 con respecto al grupo correspondiente de ratas normoglucémicas.

Estado glucémico	VOLUMEN CORPUSCULAR MEDIO (fl)						
	Vehículo (control)	Glibenclamida (10 mg/kg)	α -tocoferol (50 mg/kg)	Extracto 2	Extracto 3	Extracto 5 (150 mg/kg)	Extracto
Normo-glucémicas	89.60 ± 0.70	92.43 ± 9.20	89.70 ± 11.96	87.00 ± 1.80	92.76 ± 11.62	89.10 ± 4.85	91.57 ± 8.77
Diabéticas	73.04* ± 2.12	71.23* ± 1.88	74.77* ± 2.15	72.83* ± 2.66	75.17* ± 3.84	74.23* ± 4.76	72.50* ± 1.31

VIII. Discusión de Resultados

8. Discusión de resultados.

En la primera parte del trabajo se probaron diferentes fracciones sanguíneas y condiciones de reacción para desarrollar la técnica de LPO. En la tabla 6 se muestra que la proporción de TCA, TBA e inductor, así como las condiciones de pH son determinantes para la LPO. Como ya lo han reportado diversos autores (Yilmaz y col., 2002) un pH de 3 es determinante para que reaccione el MDA con TBA, por lo cual al aumentar la concentración de TBA y TCA en presencia de NaOH se favorece la formación del cromóforo.

Respecto a los resultados obtenidos con cada tipo de inductor (figura 16b), solamente el H_2O_2 indujo una respuesta de LPO de manera dependiente a la concentración. Cada uno de los inductores que se emplearon ejerce su función por diferentes mecanismos. Así, el compuesto AZO en solución acuosa y a una temperatura de $37^\circ C$ forma 2 radicales carbonilo y una molécula de nitrógeno, los radicales carbonilos formados reaccionan con oxígeno generando así el radical peroxilo, el cual propaga la reacción de LPO. Bajo nuestras condiciones experimentales, el compuesto AZO produjo una reacción de LPO independiente de la concentración, debido quizás a que se requería mayor tiempo de incubación y a que en condiciones deficientes de oxígeno, el radical peroxilo reacciona con otra molécula igual formando dímeros que terminan la reacción de LPO. En el caso del $FeSO_4$, en solución acuosa el fierro se oxida a Fe^{3+} iniciándose entonces una serie de reacciones en cadena para formar como producto final el ion hidroxilo y como producto intermedio el H_2O_2 mismo que es degradado por la catalasa. Bajo nuestras condiciones experimentales, esta enzima no fue inhibida, por lo que quizás ésta sea la razón por la cual el $FeSO_4$ no indujo la LPO de manera dependiente a la concentración. Respecto al H_2O_2 , éste es por si mismo un producto del estrés oxidativo el cual al disociarse en $\cdot OH$ e $\cdot OH$ actúa directamente en el proceso de LPO debido a que el ión $\cdot OH$ es el más tóxico de los ROS. En nuestras condiciones de trabajo, la catalasa fue inhibida con azida de sodio por lo que el radical $\cdot OH$ se encontró disponible para iniciar la LPO.

A pesar de existir diversos reportes en los que se evalúa la LPO en plasma, fantasmas de eritrocitos y el propio eritrocito, en nuestro estudio los resultados fueron

mejores al emplear eritrocitos completos, esto se explica debido a que la LPO se ve favorecida por la propia hemoglobina, la cual por si misma es considerada un catalizador de la LPO, al permanecer en contacto directo con radicales libres, mismos que traspasan la membrana del eritrocito a través de canales iónicos. Se ha descrito que el uso del plasma para la cuantificación de LPO en esta fracción sanguínea por la técnica de TBARS se realiza de manera indirecta a través del MDA liberado y circulante en el torrente sanguíneo, por lo que su cuantificación debe realizarse por un método más sensible como el fluorométrico. (Matés, 2001; Sushil, 1989)

Con el propósito de validar el método de LPO en eritrocitos de ratas normales y diabéticas se cuantificaron los niveles de glucosa por un método enzimático (Sera-pack) y un método amperimétrico (Acucheck) (tabla 8), en el cual se comprobó la confiabilidad del último y en base a ello se demostró que los niveles de glucosa en ratas normales tuvieron un valor promedio de 75.2 mg/dl y en ratas diabéticas fluctuaba entre 250-389 mg/dl (gráfica 5).

◆ *Pruebas in vitro*

Entre los ensayos para evaluar la actividad antioxidante de una molécula ó extracto, se encuentra la reducción del radical estable 2,2-Difenil-1-picrazil hidrazilo (DPPH). Como se muestra en la tabla 9, los extractos del cáliz (1 y 2) así como del fruto fresco sometido a un proceso de partición (4 y 5) fueron activos en reducir el DPPH. En cambio el extracto de acetato de etilo del fruto fresco (3) y el extracto hexánico de las partes aéreas secas de la planta (6) no tuvieron actividad, mientras que los extractos de la fracción acuosa y de acetato de etilo de la planta seca (7 y 8) produjeron una actividad antioxidante menor al 50% al emplearse a una concentración de 200 ppm.

Tomando en cuenta la CI_{50} del H_2O_2 en la LPO, se determinó la concentración de MDA formado en eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas, mostrando así que los eritrocitos de ratas diabéticas incrementaron la LPO 1.5 veces más respecto a las ratas normales (tabla 10). Al probar la actividad antioxidante de cuatro estándares de referencia; se observó que el NHG, antioxidante e inhibidor de la lipoxigenasa, favorecía significativamente la LPO de manera dependiente de la concentración y de forma más

notable en eritrocitos obtenidos de ratas normoglucémicas. Otro compuesto estudiado fue la quercetina, una flavona reconocida ampliamente como antioxidante natural, sin embargo, los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* revelaron que solo protegió en un 50% a los eritrocitos de ratas diabéticas, en cambio, en los eritrocitos de ratas normoglucémicas se incrementó el porcentaje de LPO hasta un 49%; esto quizá se deba a los cambios en la membrana del eritrocito, puesto que en un estado diabético se ha reducido la capacidad selectiva de la misma, permitiendo así el paso de mayores cantidades de quercetina al interior de los eritrocitos, y probablemente actué directamente en contra de los radicales libres presentes. En cambio, en los eritrocitos de ratas normoglucémicas, la quercetina podría estar actuando como sustrato de las peroxidasas y oxidasas, provocando así un efecto pro-oxidante y con ello incrementando los niveles de LPO (Moridani M, 2002).

El hidroxitolueno butilado (BHT) es un antioxidante sintético empleado en la industria alimenticia y cosmética, cuya acción antioxidante es evitar la absorción de oxígeno, con lo que disminuye la oxidación de ácidos grasos. Se han realizado estudios que indican que el BHT disminuye los índices de LPO *in vitro* en tejidos tales como hígado y riñón (Márquez y cols., 1996), sin embargo en el presente estudio el BHT no fue un antioxidante eficaz contra la LPO, esto quizá se deba al tipo y cantidad de ácidos grasos, así como a las enzimas presentes en los eritrocitos (Maritim y cols., 2002; Subu y cols., 2002; Som y cols., 2001; Calderón y cols., 2000).

El α -tocoferol presentó actividad antioxidante significativa en eritrocitos de ratas normales y diabéticas. Esta actividad se explica por el hecho de que al atrapar radicales, la vitamina E se convierte a sí misma en el radical tocoferoxil y debido a que éste es relativamente no reactivo, detiene el ciclo propagativo y destructor de la peroxidación lipídica. Además, el α -tocoferol resulta más atractivo que los PUFA's para los radicales libres, por lo que pequeñas cantidades de esta vitamina pueden proteger grandes extensiones de la membrana de los eritrocitos. (Gómez y col., 1997; Halliwell, 1996; Halliwell y col., 1989; Jain y cols., 2000; Tedesco y cols., 2000).

En los ensayos *in vitro* se evaluó la actividad inhibitoria de los 8 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la LPO, para realizarlo se tomó en cuenta que a una

concentración de 200 ppm cuatro de los extractos tuvieron actividad antioxidante en la prueba de reducción de DPPH, por lo que se evaluó esta misma concentración en los eritrocitos obtenidos de ratas normales y diabéticas. Como se observa en la tabla 10, los extractos que no presentaron actividad sobre el DPPH (3, 6 y 7) fueron los que tuvieron actividad significativa en contra de la LPO *in vitro* con una actividad comparable a la del α -tocoferol.

En la gráfica 8 se presentan las curvas concentración-respuesta de los extractos que resultaron activos en el estudio de LPO, se observó que el extracto 3 presentó una relación dependiente de la concentración siendo 40% más activo que los extractos 6 y 7 a la concentración de 100 ppm. En la gráfica 8A se aprecia que el grupo de eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas tratados con el extracto 3 presentó un efecto protector contra la LPO incluso mayor que el observado en el grupo tratado con α -tocoferol (10.75 ppm). Respecto a la actividad del extracto 6 (gráfica 8B), en eritrocitos de ratas normoglucémicas la concentración requerida para alcanzar un efecto antioxidante mayor al del α -tocoferol fue de 800 ppm; y para los eritrocitos de ratas diabéticas la concentración requerida para alcanzar tal efecto fue aún mayor.

Se pudo apreciar además que tanto en el extracto 3 como en el 6 (gráfica 8A y B), los grupos pertenecientes a los eritrocitos de ratas resistentes tuvieron un comportamiento intermedio entre los eritrocitos de ratas normoglucémicas y diabéticas, lo cual revela que a pesar de que la concentración de glucosa no indica un estado diabético, el hecho de haber sido expuestas a un estímulo de inducción diabético sí alteró los mecanismos antioxidantes. Para el extracto 7 (gráfica 8C) se encontró que ninguno de los tres grupos de eritrocitos presentó una actividad dependiente de la concentración y solo en eritrocitos de ratas diabéticas dicho extracto a una concentración de 1000 ppm tuvo una actividad comparable a la del α -tocoferol.

Tanto en las pruebas *in vitro* como *in vivo* cuando se compara la respuesta que tuvieron los extractos, estándares de referencia y grupo control sobre los niveles de GSH y VCM en ratas normoglucémicas y diabéticas se aprecia que en ambos casos se encuentran disminuidos significativamente en eritrocitos de ratas diabéticas con respecto a

las normales. Esto corrobora lo reportado en diversas investigaciones en humanos en las que se señala que los enfermos con diabetes mellitus presentan disminuidos los niveles de GSH, esto debido a que se encuentra aumentada la cantidad de radicales libres, los cuales degeneran el sistema redox del glutatión en el eritrocito. Otra consecuencia del daño por los radicales libres sobre la membrana del eritrocito es la disminución de la deformabilidad de la misma, lo cual se ve reflejado en la disminución del VCM que se traduce en un aumento de la densidad sanguínea que se observa en estados diabéticos. (Elishkevitz y cols., 2002; Mandori y col., 2002)

● *Pruebas in vivo*

Actualmente, existen un gran cantidad de artículos en los cuales se presenta el estudio del efecto hipoglucemiante de diversas plantas, en la mayoría de estas investigaciones, así como en la nuestra, se han empleado ratas de la cepa Wistar como modelo experimental para determinar tal efecto (Sabu y cols., 2002; Alarcón y cols., 1996; Som y cols., 2001; Contreras y cols., 1996; Yilmaz y cols., 2002; Kulkarni y cols., 2002; Maritim y cols., 2002), sin embargo, no se le ha dado importancia al estado de ayuno adecuado en los animales, y a la vía de administración de los extractos. Razón por la cual, dentro de la tercera parte de los experimentos se consideró la importancia de establecer las condiciones de ayuno, los tiempos de muestreo y la vía de administración idóneos para determinar el comportamiento glucémico de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam en ratas Wistar normoglucémicas.

Los cursos temporales presentados en la gráfica 11, revelaron que a las ratas sin ayuno que se les administró por vía oral el vehículo ó glibenclamida se apegaron al comportamiento esperado, es decir, sin cambios en los niveles de glucosa para el grupo control y con descenso para el grupo administrado con glibenclamida. En el caso de los extractos 6 y 7 (gráfica 12) se reflejó que el ayuno favorecía en los primeros minutos un descenso en los niveles de glucosa, los cuales se incrementaron conforme transcurría el tiempo. En cambio bajo las condiciones sin ayuno ocurrieron efectos opuestos, es decir, en los primeros minutos post-administración se elevaron los niveles de glucosa los cuales posteriormente descendieron hasta alcanzar los valores basales.

Por otra parte, en las gráficas obtenidas de los cursos temporales para la determinación de la vía de administración se observó que sí existen diferencias al variar de una vía oral a una intraperitoneal. En la gráfica 13 se observan los cursos temporales en los niveles de glucosa del vehículo, α -tocoferol y glibenclamida, en los dos primeros casos prácticamente no se apreciaron cambios significativos en los niveles de glucosa respecto a la vía de administración, sin embargo, en el caso de la glibenclamida se observó un retraso en el descenso de los niveles de glucosa en el grupo de animales administrados vía oral. El comportamiento cinético de la administración oral e intraperitoneal de los extractos 3, 6 y 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam presentados en la gráfica 14, revelaron diferencias importantes principalmente en el caso de los extractos 3 y 7, en los cuales se observa que al ser administrados por vía intraperitoneal se incrementaron significativamente los niveles de glucosa respecto a la vía oral, la cual prácticamente permaneció sin cambios respecto a su basal. Estos resultados pueden ser explicados en parte por el efecto de primer paso que sufren todos los fármacos en el hígado al ser administrados por vía oral y en este caso los extractos, otra factor podría ser la posibilidad de que los extractos tengan glúcidos y estos se sumen a los niveles de glucosa sanguínea.

El efecto de la variación de resultados al cambiar la vía de administración, también fue evaluado en el estudio de LPO, las diferencias se aprecian con mayor claridad a través del porcentaje de protección (tabla 12), dentro de los cuales quizás los ejemplos más contundentes sean los resultados obtenidos para el extracto 3 y para el α -tocoferol, en los cuales se pueden observar que no hubo protección contra la LPO al emplear una vía de administración oral, en cambio, al administrar por una vía intraperitoneal, ambos produjeron porcentajes de protección del 71%.

Estos resultados establecieron claramente la razón de elegir una vía de administración intraperitoneal y un acceso libre de alimento.

En esta parte del estudio también se evidenció que la glibenclamida era capaz de incrementar la LPO en ratas normales, razón por la cual se realizaron curvas *in vivo* e *in vitro* tanto en ratas normoglucémicas como diabéticas (gráfica 15 y tabla 13). Estas curvas revelaron que la tendencia de la glibenclamida de incrementar los niveles de LPO era dependiente de la concentración tanto en estados normoglucémicos como diabéticos,

además, en la tabla 13 se aprecia que a una dosis de 20 mg/kg la susceptibilidad a la LPO en ratas diabéticas se incrementó aproximadamente el doble con respecto a las normales. Estos resultados apoyan el hecho de que el daño producido en el páncreas de las ratas diabéticas favorecen la formación de los radicales libres (ROS); además, sugieren que este incremento en los niveles de LPO de los pacientes diabéticos tratados con glibenclamida, potencialmente sería la causa de las complicaciones diabéticas como es el aumento en la viscosidad sanguínea misma que conlleva a diversas cardiopatías, nefropatías, retinopatías, etc. (Evans, 2002; West, 2000; Maritim y cols., 2003)

En la tabla 14 se aprecia que el α -tocoferol protegió la LPO de manera dependiente de la dosis y que prácticamente no se observó diferencia entre ambos grupos de ratas. Estos resultados apoyan la hipótesis de que los radicales libres generados durante la LPO son antagonizados por los antioxidantes como es el caso del α -tocoferol.

Inicialmente y dada la bibliografía consultada (Wolf y cols., 1991; Sushil y col., 1989; Som y cols., 2001), se consideró una relación existente entre los índices de LPO y el efecto hipoglucemiante de los extractos, por lo cual se llegó a pensar que aquellos extractos que fueran activos contra la LPO *in vitro*, también serían activos como agentes hipoglucemiantes *in vivo*, conservando su actividad antioxidante; sin embargo, dados los resultados previos en los niveles de glucosa obtenidos al determinar la vía de administración, en los cuales se observó que ninguno de los 3 extractos presentaba actividad hipoglucemiante, fue necesario incluir a dos de los extractos que habían resultado ser activos en reducción al DPPH (extracto 2 y extracto 5), e inactivos contra la LPO *in vitro* (gráfica 21).

En los resultados del efecto en los niveles de glucosa de los cinco extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam, así como de los estándares positivos (glibenclamida y α -tocoferol) y del vehículo, se observa que con la administración intraperitoneal y en un estado sin ayuno, el curso temporal obtenido para el vehículo y el α -tocoferol (gráfica 18 y 19) permanece prácticamente sin cambios tanto en un estado diabético como normoglucémico. La glibenclamida por su parte, siguió manteniendo su cualidad hipoglucemiante en ambos grupos (gráfica 18). El extracto 3 aumento significativamente los niveles de glucosa en ratas normoglucémicas (gráfica 19) hasta un estado

transitoriamente diabético en los primeros 90 minutos post-tratamiento, durante el cual, las ratas observaron conductas letárgicas con incremento de micciones como las observadas en el grupo de ratas diabéticas; en cambio, en el grupo de ratas diabéticas administradas con el extracto 3, el aumento en los niveles de glucosa no fue considerable y sólo se observó un ligero incremento en los primeros 30 minutos después de la administración, para posteriormente disminuir hasta llegar a niveles basales. En el caso de los extractos 6 y 7 (gráfica 20) los cursos temporales de los grupos correspondiente a las ratas normoglucémicas permanecieron prácticamente sin cambios; en los grupos de ratas diabéticas se aprecia un ligero incremento para ambos extractos a los 30 minutos del curso temporal, en el caso del extracto 7 este incremento regresa al final del curso temporal a sus niveles basales. En el caso del extracto 6 los niveles de glucosa descienden ligeramente por debajo del valor basal a partir de los 90 minutos del curso temporal permaneciendo así hasta el final del periodo de estudio. En la gráfica 21 se aprecia que tanto el extracto 2 como el 5 incrementaron los niveles de glucosa sanguínea, sin embargo, en el caso del extracto 5, este incremento decae por debajo del nivel basal a los 90 minutos en el caso de las ratas diabéticas y a los 180 minutos en el caso del grupo de ratas nomoglucémicas, para finalmente regresar a sus niveles basales. En general, ninguno de los 5 extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam presentaron actividad hipoglucemiante *in vivo*, por el contrario, todos presentaron un incremento en los niveles de glucosa en las primeras horas de sus cursos temporales. Estos resultados sostienen la posibilidad de que los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam contengan glúcidos que se sumen a la glucosa basal.

En la gráfica 22 y tabla 15 se presentan los resultados de los cinco extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la LPO en ratas normoglucémicas. Se observa que en el caso del control a las 6 horas post-administración los niveles de LPO se elevaron alrededor de 1.2 veces con respecto a su valor basal y al inducir la LPO con H₂O₂ el aumento con respecto a su basal fue de 103 veces. En el caso de la glibenclamida, la LPO también se aumentó respecto a su basal en un orden de 1.5 veces a las 6 horas post-administración y 160 veces más cuando se indujo la LPO. Fue interesante el comportamiento que tuvieron las ratas que se pre-trataron con α -tocoferol, puesto que se

observó que a las 6 horas post-tratamiento el nivel de LPO era menor de 1 y que los niveles de MDA aumentaron respecto a su basal aproximadamente 29 veces en presencia de H₂O₂. En el caso de las ratas a las que se les administraron los extractos 2, 5 y 6 de *Physalis chenopodifolia* Lam también se observó que a las 6 horas post-administración se habían incrementado los niveles de LPO en el orden de 2 a 3 veces respecto a sus valores basales; y para el caso de los extractos 3 y 7 estos fueron aproximadamente de uno. Por otra parte, la LPO en presencia del H₂O₂ y de los extractos: acuoso de la cáscara (2), extracto del fruto fresco (5) y los extractos de las partes aéreas secas (6 y 7) presentaron un incremento mayor de 100 veces. Sólo el extracto 3 (extracto de acetato de etilo del fruto fresco) presentó una protección importante contra la LPO comparable a la del α -tocoferol.

Por otra parte, en la tabla 16 y gráfica 23 se presentan los resultados obtenidos con las ratas diabéticas. En estas se aprecia que los grupos pre-tratados con glibenclamida y con los extractos 2 y 6 presentaron un incremento en los niveles de LPO en un orden de 1 a 1.3 veces después de seis horas de su administración. En cambio, la magnitud del incremento de los niveles de LPO en los grupos pre-tratados con vehículo, α -tocoferol y extracto 3 fueron menores a 1. Además se observó un incremento significativo de LPO en los grupos de ratas administrados con los extractos 5 y 7. En estos resultados se observa además, que los eritrocitos de ratas diabéticas pre-tratadas con diferentes extractos ó compuestos de referencia son susceptibles a la inducción de LPO con H₂O₂ (gráfica 23-b), como es el caso de los grupos tratados con vehículo, glibenclamida, extracto 2 y extracto 6 en los que se presentó un incremento de LPO de 100 a 150 veces con respecto a su valor basal. Los grupos administrados con los extractos 5 y 7 incrementaron su concentración de MDA en un orden de 370 y 340 veces respectivamente con respecto a su valor basal. En cambio, en el caso del α -tocoferol y del extracto 3, la susceptibilidad fue menor a 40. Se puede resumir entonces que con excepción del extracto 3, los cuatro extractos restantes administrados a ratas diabéticas incrementaron la LPO en proporción de 100 a 370 veces respecto a su valor basal, lo que sugiere que los extractos al ser biotransformados generan productos oxidantes que muy posiblemente sean los responsables del incremento en la LPO.

Los resultados obtenidos con los grupos de ratas normales y diabéticas administrados con glibenclamida sugieren que ésta participa en un proceso que debilita los mecanismos antioxidantes, los cuales, afectan la integridad del eritrocito y lo condicionan a lipoperoxidarse con más facilidad.

Finalmente, los resultados resumidos obtenidos del efecto de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam sobre la LPO *in vivo* e *in vitro*, se presentan en la tabla 19, en la que se encuentran representados los porcentajes de protección y la actividad que presentaron en cada caso.

TABLA 19. Porcentajes de protección sobre la LPO *in vivo* e *in vitro* de cinco extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam.

<i>In vitro</i>				<i>In vivo</i>			
Grupo	$\%P = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control } H_2O_2} \times 100 \right)$		Actividad	Grupo	$\%P = 100 - \left(\frac{\text{Tratamiento}}{\text{Control}} \times 100 \right)$		Actividad
	Normales	Diabéticas			Normales	Diabéticas	
Control				Control			
Inducida con H ₂ O ₂ 4mM	1.94 ±0.52	2.75 ±0.63		(aceite de maíz) Inducida con H ₂ O ₂ 4mM	1.52 ±3.7 ⁻²	2.163 ±1.7 ⁻¹	
Ext. 2	-208	-115	Pro-oxidante	Ext. 2	+3.5	+13	Antioxidante
Ext. 3	+91	+97	Antioxidante	Ext. 3	+63	+87	Antioxidante
Ext. 5	-260	-182	Pro-oxidante	Ext. 5	-40	-181	Pro-oxidante
Ext. 6	+80	+77	Antioxidante	Ext. 6	-5.5	-160	Pro-oxidante
Ext. 7	+67	+82	Antioxidante	Ext. 7	-24	-61	Pro-oxidante
α-tocoferol 10.7 ppm	+88	+90	Antioxidante	α-tocoferol 50 mg/kg	+68	+63	Antioxidante
Glibenclamida	-79	-70	Pro-oxidante	Glibenclamida 10 mg/kg	-70	-40	Pro-oxidante

A partir de esta tabla es posible determinar que en estados diabéticos, los eritrocitos son aproximadamente 1.42 más susceptibles a la LPO inducida con H₂O₂, con respecto a los estados normoglucémicos, tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*. Esto se obtuvo

relacionando el porcentaje de protección de los estados diabéticos entre los estados normoglucémicos como se indica a continuación:

<p><i>In vitro</i></p> $\frac{2.75}{1.94} = 1.417 \approx 1.42$	<p><i>In vivo</i></p> $\frac{2.163}{1.52} = 1.42$
---	---

Se aprecia que *in vitro* el extracto 2 incrementó más la LPO en eritrocitos de ratas normales que en las diabéticas, sin embargo, en ambos casos el extracto mantuvo una actividad pro-oxidante, por el contrario, *in vivo* presentó una actividad antioxidante, protegiendo de forma más importante al grupo de ratas normoglucémicas.

El extracto 3 conservó su actividad antioxidante tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*, siendo en ambos casos más activo en los grupos diabéticos. Estos resultados demuestran que el extracto 3 posee componentes antioxidantes, sin embargo el hecho de que su actividad sea mayor en los experimentos *in vitro* sugiere el hecho de que el extracto posea grupos antioxidantes susceptibles a ser fácilmente biotransformados, lo que disminuye su capacidad de reducir los niveles de LPO en los experimentos *in vivo*.

El extracto 5 mantuvo su actividad pro-oxidante tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*; en el caso de los grupos diabéticos, su actividad fue prácticamente la misma (-181 y -182%); en cambio *in vivo* en los grupos normoglucémicos, éste pierde considerablemente su capacidad de favorecer la LPO al ser biotransformado en el organismo de la rata. Esto sugiere que dentro de los componentes del extracto algunos podrían estar actuando sobre algún sistema enzimático (GSH, NADPH, SOD, xantina/oxidas) que regule el bloqueo del estrés oxidativo el cual a su vez induce la LPO. Cabe recordar, que tanto el extracto 5 como el 2 fueron los que demostraron reducir la actividad del radical estable DPPH, ensayo que sirve para medir la capacidad antioxidante de muchos compuestos de origen natural (Ko, 1997)

Un hecho relevante fue el que presentaron los extractos 6 y 7, ya que ambos extractos *in vitro* protegían de manera importante a los eritrocitos tanto de ratas normoglucémicas como diabéticas contra la LPO inducida con H₂O₂; en cambio, en los experimentos *in vivo* dichos extractos perdieron tal capacidad, actuando en este caso

como pro-oxidantes, siendo más evidente en el grupo de ratas diabéticas. Estos resultados sugieren fuertemente que ambos extractos son biotransformados rápidamente en el organismo de las ratas, además de que muy probablemente también algunos de estos productos de biotransformación sean oxidantes *per se*, o bien, alteren vías enzimáticas de oxidación.

El α -tocoferol conservó su actividad antioxidante tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*, siendo más notable su efecto protector en los ensayos *in vitro*, esto podría deberse a que *in vivo* el fármaco ya es sometido a procesos metabólicos con lo que se reduce su actividad antioxidante.

La glibenclamida sí disminuyó los niveles de glucosa sanguínea en los experimentos *in vivo*, sin embargo, presentó también una actividad pro-oxidante tanto en los ensayos *in vitro* como *in vivo*. En un estudio realizado por Kimoto y cols. (2003) se reporta que la glibenclamida disminuye la expresión del gen SOD2 en células β MIN6 de ratón, lo que produce una disminución en la actividad de diversos mecanismos enzimáticos antioxidantes; también se han reportado (Efanova, 1998) que las sulfonilureas inducen apoptosis de células β , indicando que éstas pueden tener un efecto adicional conectado directa ó indirectamente a las vías que activan la muerte celular programada; por lo que estos estudios representan una explicación a nuestros resultados. Por otra parte, esta actividad fue únicamente menor en el caso del grupo de las ratas diabéticas de los experimentos *in vivo* (-44%). Teniendo en cuenta que la predisposición a la DM tiene una carga genética, este resultado probablemente se debe a que en estados diabéticos el organismo active mecanismos compensadores contra el estrés oxidativo, en los que podrían estar involucrados complejos sistemas enzimáticos antioxidantes en fagocitos tales como neutrófilos, eosinófilos, monocitos y macrófagos por lo que de cierta manera el organismo podría estar preparado para flanquear estas agresiones (Gallin y cols., 1992)

IX. Conclusions

9. Conclusiones.

- Ninguno de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam presentó actividad hipoglucemiante. Por el contrario, todos presentaron aumento de glucosa sanguínea durante las primeras horas de los cursos temporales determinados en ratas normoglucémicas como diabéticas.
- En los estudios *in vitro* e *in vivo* los extractos 2 y 5 correspondiente al extractos acuosos de la cáscara y el fruto respectivamente, no presentaron actividad inhibitoria de la LPO, por el contrario, mostraron un efecto oxidante.
- Los extractos 6 y 7 correspondientes a los extractos hexánico y de acetato de etilo de las partes aéreas de *Physalis chenopodifolia* Lam, si presentaron actividad antioxidante *in vitro*, sin embargo esta actividad no se observó en los experimentos *in vivo*. Este comportamiento podría deberse a la biotransformación de los extractos con lo cual se generan productos oxidantes que muy posiblemente sean los responsables del incremento en la LPO observada *in vivo*.
- El extracto 3 de *Physalis chenopodifolia* Lam correspondiente al extracto de acetato de etilo de los frutos enteros frescos, presentó actividad antioxidante tanto en los experimentos *in vitro* como *in vitro* de la LPO e incluso en el grupo de ratas diabéticas su efecto fue mejor que el observado con el α -tocoferol.
- Los eritrocitos de ratas diabéticas son 1.4 veces más susceptibles a la LPO inducida con H₂O₂ que los eritrocitos de ratas normales tanto *in vitro* como *in vivo*.
- En los experimentos *in vivo* la administración de los extractos 6 y 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam y de glibenclamida en animales con libre acceso de agua y alimento, permitió observar menores fluctuaciones en los niveles de glucosa sanguínea.

- La vía de administración intraperitoneal de los extractos 3, 6 y 7 de *Physalis chenopodifolia* Lam así como de los fármacos de referencia, permitió un acceso más rápido a la circulación sanguínea en comparación con la vía de administración oral.
- Los niveles de GSH y VCM son significativamente menores en ratas diabéticas respecto a las ratas normales tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*.
- Se corroboró el efecto antioxidante del α -tocoferol y el efecto hipoglucemiante de la glibenclamida; sin embargo, en ésta última también se observó que este fármaco promovió la LPO tanto en los experimentos *in vitro* como *in vivo*.
- A pesar de que en los objetivos planteados al inicio de la investigación no se contemplaba el estudio del fármaco glibenclamida, debido a los resultados obtenidos en este estudio acerca de su efecto estimulante en la LPO, es recomendable ampliar el estudio acerca de este efecto, con el fin de confirmar los hallazgos aquí encontrados, debido a su implicación en la fármaco-terapia de los pacientes diagnosticados con Diabetes Mellitus.
- En el modelo experimental *in vitro* e *in vivo* propuesto en este estudio, no se encontró relación entre la actividad de los extractos de *Physalis chenopodifolia* Lam con respecto a la disminución de los niveles de glucosa, LPO, GSH y VCM tanto en estados normoglucémicos como diabéticos.

PROPUESTAS

- Dados los precedentes obtenidos en este estudio, es importante continuar las investigaciones con respecto a la actividad antioxidante del extracto de acetato de etilo de *Physalis chenopodifolia* Lam (extracto 3), el cual demostró incluso ser más eficaz que el α -tocoferol en el grupo de ratas diabéticas de los experimentos *in vivo*. La propuesta es identificar y aislar los compuestos presentes en éste extracto, con la finalidad de obtener el activo antioxidante y eliminar aquellos que contribuyen al incremento observado en los niveles de glucosa sanguínea.
- La glibenclamida es una sulfonilurea usada ampliamente en el tratamiento de la DM. Por lo que debido a los resultados obtenidos en este estudio acerca de su efecto pro-oxidante, los cuales coinciden con Kimoto y cols (2003); es de suma importancia continuar las investigaciones acerca del efecto que este fármaco causa en los pacientes diabéticos, con el fin de revalorar su actividad terapéutica. Además, sería conveniente proponer una terapia combinada que incluya el fármaco hipoglucemiante y un activo antioxidante desde el momento en que la enfermedad ha sido diagnosticada.

X. Anexos

10. Anexos.

10.1 Resumen de resultados.

TABLA 20. Resumen de resultados. N: ratas normoglucémicas, D: ratas diabéticas, NP: no se probó, (-) el dato es referencia para obtener nivel de glucosa se conservó ó regresó a su valor basal, (↑) el nivel de glucosa basal se elevó, (↓) el nivel de glucosa basal disminuyó. * posibles de realizar *in vivo*, por lo que estos valores corresponden al promedio obtenido en cada grupo de ratas empleadas en los experimentos.

Extracto ó fármaco de referencia	Experimentos <i>in vitro</i>												Experimentos <i>in vivo</i>	
	DPPH (% de reducción)		LPO (% de protección)		GSH (mM)		VCM (fl)		GLUCOSA (mg/dL)		LPO (% de protección)		GSH (mM)	
	20 ppm	200 ppm	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D
Acelte de maíz (control)	NP	NP	-	-	0.135* ±1.14 ⁻³	0.110* ±1.00 ⁻²	90.6* ±0.82	74.3* ±3.01	75.2* ±25.7	320* ±76.2	-	-	0.137 ±2.51 ⁻³	0.112 ±1.02 ⁻²
Extracto 1	-1.34	71.1	-2	-18										
Extracto 2	11.0	66.9	-208	-115							3.5	13	0.148 ±7.7 ⁻³	0.106 ±3.86 ⁻³
Extracto 3	-8.7	-5.1	91	97							63	87	0.142 ±7.07 ⁻³	0.119 ±5.88 ⁻³
Extracto 4	7.1	67.8	-37	34										
Extracto 5	0.5	89.1	-260	-182							-40	-181	0.142 ±8.89 ⁻³	0.110 ±5.27 ⁻³
Extracto 6	-7.0	1.3	80	77							-5.5	-160	0.137 ±7.18 ⁻³	0.111 ±1.96 ⁻³
Extracto 7	0.5	36.7	67	82							-24	-61	0.138 ±3.38 ⁻³	0.105 ±9.55 ⁻³
Extracto 8	20.8	39.1	5	-101										
α-tocoferol	NP	NP	88	90							68	63	0.146 ±1.29 ⁻²	0.105 ±1.28 ⁻²
Gilbenclamida	NP	NP	-79	-70							-70	-40	0.134 ±6.83 ⁻³	0.103 ±2.00 ⁻²

10.2 Abreviaturas.

ADA: adenosina diaminasa

ADP: adenosina difosfato

AK: adenilato quinasa

AMP: adenosina monofosfato

ATP: adenilato trifosfato

AZO compuesto: 2,2'-Azobis(2-metilpropionamida)dihidroclorato

Cl₅₀: concentración inductora media

CP₅₀: concentración protectora media

DAG: diacilglicerol

DE: desviación estándar

DHAP: dihidroxiacetona fosfato

DM: diabetes mellitus

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrazilhidrazilo

DTNB: Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico

EE: error estándar

EXT. 1: extracto metanólico de la cáscara de *Physalis chenopodifolia* Lam

EXT. 2: extracto acuoso de la cáscara de *Physalis chenopodifolia* Lam

EXT. 3: extracto de acetato de etilo de los frutos de *Physalis chenopodifolia* Lam

EXT. 4: extracto de acetato de etilo de la segunda extracción de los frutos de *Physalis chenopodifolia* Lam

EXT. 5: extracto acuoso de los frutos de *Physalis chenopodifolia* Lam

EXT. 6: extracto hexánico de las partes aérea de *Physalis chenopodifolia* Lam

EXT. 7: extracto de acetato de etilo de las parte aéreas de *Physalis chenopodifolia* Lam

EXT. 8: extracto acuoso de las partes aéreas de de *Physalis chenopodifolia* Lam

F1,6DP: fructosa 1,6-difosfato

F6P: fructosa-6-fosfato.

GA3P: gliceraldehído-3-fosfato

G6P: glucosa-6-fosfato

GSH: glutati3n reducido
GSH-px: glutati3n peroxidasa
GSSH: glutati3n oxidado
HbA_{1c}: hemoglobina glucosilada
HDL: lipoprote3nas de alta densidad
HK: hexoquinasa
IM: intramuscular
i.p.: intraperitoneal
IV: intravenosa
LDH: lactato deshidrogenasa
LDL: lipoprote3nas de baja densidad
LPO: peroxidaci3n de l3pidos
MDA: malondialdeh3do
NHG: 3cido nordihidroguayar3tico
PEP: fosfoenolpiruvato
Pi: fosfato
PKC: fosfoquinasa C
PKF: fosfofructoquinasa
PUFA's: 3cidos grasos poli-insaturados
RAGE's: receptores de los productos finales de la glucaci3n avanzada
ROS: especies reactivas del ox3geno
SOD: super3xido dismutasa
TBA: 3cido tiobarbit3rico
TBARS: especies reactivas al 3cido tiobarbit3rico
VCM: volumen corpuscular medio

XI. Bibliografía

11. Bibliografía.

1. AGUILAR C. Abigail, Reza A, García E y Rull JA. (1992). "Biguanide related lactic acidosis: incidence and risk factors". Arch. Med. Resch 23:19-24.
2. AGUILAR C. Abigail y Xolalpa M. Santiago (2002). "La herbolaria mexicana en el tratamiento de la diabetes", Ciencia. Revista de la academia mexicana de ciencia, 53(3):24-35.
3. AGUILAR S. Carlos A. (2002). "Avances en el tratamiento de la diabetes tipo 2", Ciencia. Revista de la academia mexicana de ciencia, 53(3):63-71.
4. AKERBOOM TP y Sies Helmut. (1990) "Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples" Enzimology 48:373-383.
5. ALARCÓN Aguilar, F. J.; Román Ramos, R.; Flores Sáenz, J. L.; et al. (1996) "Efectos Antihiper glucémico de 24 Plantas Usadas como Antidiabéticas". Resumen de Ponencias del Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México, Tlaxcala, Tlax., 24-30 de junio, p. 96-101.
6. Álvarez A, Callaghan RC y O'Connor Blasco JE (1997) Biochemistry clinical. 5ª ed. Ed. McGraw-Hill. EEUU.
7. ARGANIS J. Elia Nora (2002). "El concepto de la diabetes mellitus en la medicina mexicana del siglo XIX". LABORAT-acta, 14(4):121-127.
8. ASENSI M, Sastre J, Pallardó FV, Estrela J y Viña J (1994) "High performance liquid chromatography determination of oxidized glutathione in blood". Methods in Enzymology 234:367- 371.
9. BOON PJ, Marinho HS, Oosting R y Mulder G (1999). "Glutathione conjugation of 4-hydroxy-trans-2,3-nonenal in the rat in vivo, the isolated perfused liver and erythrocytes". Toxicology and Applied Pharmacology, 159:214-223.
10. BYERS T y GUERRO N (1995). "Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention". Am. J. Clia. Nutr. 62:13853-13938
11. CADENAS E y Packer L (2002) *Handbook of Antioxidants*. 2th ed. Revised and Expanded. Ed. Marcel Dekker, INC. U.S.A.
12. CALDERON Guzmán D y otros. (2000). "Efecto de la deficiencia de proteínas sobre la peroxidación de lípidos en cerebro de ratas". Arch Neurocién (Mex), 5(2):55-59.

13. CONTRERAS Weber, C.; Román Ramos, R.; Alarcón Aguilar, F.; y Balderas Barajas, R. (1996) "*Efecto Hipoglucémico de Extractos y Fracciones de L. caulescens (Ort.) Epl.*" Resumen de Ponencias del Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México, Tlaxcala, Tlax., 24-30 de junio, p. 99.
14. CHEN RH y Wang SP. (2002). "*Role of acid back-diffusion, glutathione, oxyradical, and histamine in antral hemorrhagic ulcer in rats: the protective effect of lysozyme chloride and antioxidants*". J Lab Clin Med, 140:142-151.
15. CHENG Jin-Shiung y Jan Chung-Ren. (2002) "*Effect of norhidroguaiaretic acid on intracellular Ca²⁺ concentrations in hepatocytes*". Toxicology in Vitro, 16:485-490.
16. CHING KCH y Tappel L (1974) "*Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats*". J Nutr 104:444-451.
17. DIABETES AND NUTRITION STUDY GROUP OF THE EASD. (1995) "*Recommendations for the nutritional management of patients with diabetes mellitus*". Diabetes Nutr Metab. 8:1-4.
18. DEVLIN Thomas M. (2002) *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*. 5th ed. Ed. Wiley-Liss. U.S.A.
19. EFANOVA IB, Zaitsev SV, Zhivotovsky B y Köhler M. (1998) "*Glucose and tolbutamide induced apoptosis in pancreatic β -cell. A process dependent on intracellular Ca²⁺ concentration.*" J. Biol. Chem. 273:33501-33507.
20. ELISHKEVITZ K y cols., (2002). "*Rheological of red blood cell aggregation in diabetic patients in relation to their metabolic control*" Diabetic Med., 19(2):152-156.
21. ESTRADA CM y cols., (1999). "*Enzimas de la biosíntesis del glutatión reducido (GSH). Valores normales y estudio de un paciente con deficiencia de GSH*". Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter, 15(1):35-41.
22. EVANS Joseph L, Goldfine ID, Maddux BA y Grodsky GM. (2002). "*Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes*". Endocrine Reviews, 23(5):599-622.
23. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2004) <http://www.fao.org>
24. FEE J. A. y cols. (1975) "*Observation on the mechanism of the oxygen/diabetic acid-Induced hemolysis of vitamina E-deficient rat red blood cells and the protective roles of catalasa and superoxide dismutasa*" Archives of biochemistry and biophysics. 169:160-167.

-
25. FERNÁNDEZ J y cols., (1997) "*Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat*". Food Chemistry. 59:345-353.
26. FUJIWARA Toshiyuki, Misumi Yoshio e Ikehara Yukio. (1998) "*Dynamic recycling of ERGIC53 between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex is disrupted by nordihydroguaiaretic acid*". Biochemical and Biophysical Research Communications, 253:869:876.
27. FUJIWARA Toshiyuki, Misumi Yoshio e Ikehara Yukio. (2003) "*Direct interaction of the Golgi membrane with the endoplasmic reticulum membrane caused by nordihydroguaiaretic acid*". Biochemical and Biophysical Research Communications, 301:927-933.
28. GALLIN John I, Goldstein IM y Snyderman. (1992) "*Basic Principles and Clinical Correlates*". 2ª ed. Ed. Reven Press. London.
29. GIARDINO I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. (1998) "*Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis*", Diabetes, 47:1114-1120.
30. GÓMEZ Pérez FJ y Rull JA. (1997). "*Principios generales de tratamientos del paciente diabético*", Tratado de Diabetología, 1ª ed, Instituto Nacional de Nutrición, México, p. 375-383.
31. GOODMAN & GILDMAN. (1996). *The pharmacological basis of therapeutics*. 9ª ed. Ed. McGraw-Hill. EEUU.
32. GUILLÉN G. Miguel A. (2002). "*Diabetes mellitus: como se manifiesta, como evoluciona y como se complica*"; Ciencia. Revista de la academia mexicana de ciencia, 53(3):54-62.
33. HALLIWELL B (1996). "*Antioxidants in Human Health and Disease*". Ann. Rev. Nutr. 16:33-50.
34. HALLIWELL B. y Gutteridge J. (1989) "*Free radicals in biology and medicine*". 2ª ed. Ed. Clarendon Press Oxford: Oxford University Press.
35. HAMMES HP, Wellensieck B, Klötting I, Sickel E, Bretzel RG y Brownlee M. (1998) "*The relationship of glycaemic level to advanced glycation end-product (AGE) accumulations and retinal pathology in spontaneous diabetic hamsters*". Diabetología, 41:165-170.
36. HERNÁNDEZ Ávila M. y Olaíz Fernández G. (2002) "*La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública*". Ciencia. Revista de la academia mexicana de ciencia, 53(3):8-17.
-

37. HIRIART Marcia. (2002). "La historia natural de la diabetes". *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana de Ciencia*, 53(3):4-7.
38. HIRIART Marcia y Vidaltamayo Román. (2002) "Cuestión de hormonas: el papel de las hormonas del páncreas en la salud y en la diabetes". *Ciencia. Revista de la academia mexicana de ciencia*, 53(3):36-45.
39. HORTON EC y otros. (2000). "Nateglinide alone and in combination with metformin improves glycemic control by reducing mealtime glucose levels in type 2 diabetes". *Diabetes Care*, 23:1660-1665.
40. JAIN SK y otros (2000). "La suplementación con vitamina E restablece el glutatión y el malondialdehído (MDA) a concentraciones normales en los eritrocitos de niños con diabetes tipo 1". *Diabetes Care*, 23:1389-94.
41. JANUEL C y otros (2003). "Covalent coupling of reduced glutathione with ribose: loss of cosubstrate ability to glutathione peroxidase". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620:125-132.
42. KADOR PF y Kinoshita JH. (1984). "Diabetic and galactosaemic cataracts". *Ciba Found Symp* 106:110-131.
43. KASHIWAGI A y otros. (1994) "Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium". *Diabetología*, 37:264-269.
44. KATSUMATA K, Katsumata Y, Ozawa T. (1993). "Potentiating effect of combined usage of three sulfunil urea drugs on occurrence of alloxana diabetes in rats" *Horm Metab Res*, 25:125-126.
45. KIMOTO Kiyoko y otros. (2003). "Glicazide protects pancreatic β -cells from damage by hydrogen peroxide", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303:112-119.
46. KIRK K. y otros. (1993). "Glibenclamide and meglitinide block the transport of low molecular weight solutes into malaria-infected erythrocytes". *Federation of European Biochemical Societies*, 323(1 y 2):123-128.
47. KO Feng N, Hsiao G y Kuo Y. (1997). "Protection of oxidative hemolysis by demethyldiisoeugenol in normal and β -thalassemic red blood cells". *Free Radical Biology & Medicine*, 22(1,2):215-222
48. KURI Morales P. y otros. (2000) "Estado actual de la diabetes". *Foro Silanes, atención a la salud en México*, año 4(10):6-9.

49. KULKARNI Jayant S. y otros. (2002). "Effects of chronic treatment with cromakalim and glibenclamide in alloxan-induced diabetic rats", *Pharmacological Research*, 46(2):101-105.
50. LABROUCHE S y otros. (1996). "Biological Correlations". *Metabolism*, 45(1):57-62.
51. LAMBERT Joshua D, Meyers Ross O, Timmermann Barbara N y Dorr Robert T. (2001). "Pharmacokinetic analysis by high-performance liquid chromatography of intravenous nordihydroguaiaretic acid in the mouse". *Journal of Chromatography B*, 754:85-90.
52. LOECKIE L y otros. (1998) "Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and humans." *Free Radical Biology & Medicine*, 26:202-226.
53. MANDORI Annamaria B y Kuypers Frans A. (2002). "Altered red cell turnover in diabetic mice". *J Lab Clin Med*, 140:161-165.
54. MARITIM AC, Dene BA, Sanders RA y Watkins JB. (2002). "Effects of β -carotene on oxidative stress in normal and diabetic rats" *Journal Biochemistry Molecular Toxicology*, 16(4):203-208.
55. MARITIM AC, Sanders RA y Watkins JB. (2003). "Diabetes, Oxidative Stress and Antioxidants: A review". *J Biochem Molecular Toxicology*, 17(1):24:38.
56. MÁRQUEZ IC, Ferrano S y Tiscow G. (1996) "Lipoperoxidación como medida de la acción de radicales libres en hígado de ratón en presencia de butil hidroxitolueno". *Acta Científica Venezolana*, 48(1):66.
57. MARTÍNEZ M. (1999) "Infrageneric taxonomy of *Physalis*. In" M. Nee, D.E. Symon, R.N. Lestár & J.P. Jessop editors. *Solanaceae IV*, pp 275-283.
58. MATÉS Sánchez JM. (2001) *¿Es todo el oxígeno saludable para los seres vivos?*. Foro de investigación, departamento de biología molecular y bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. España.
59. MERA LM. (1987) "Estudio comparativo del proceso de cultivo de la arvense *Physalis chenopodiifolia* Lamarck y *Physalis philadelphica* var. *philadelphica* 'Rendidora'" Universidad Autónoma de Chapingo. Colegio de Postgraduado. (Tesis)
60. MIKHAILOV Michael V. y otros. (2001). "Molecular structure of the glibenclamide binding site of the β -cell K_{ATP} channel", *Federation of European Biochemical Societies*, 499:154-160.

61. MORIDANI Majid Y, Galati Giuseppe y O'Brien Peter J. (2002). "Comparative quantitative structure toxicity relationship for flavonoids evaluated in isolated rat hepatocytes and HeLa tumor cells". *Chemico-Biological Interactions*, 139:251-264.
62. NAJEED Syed A. y otros.(2002). "Differential effect of glyburide (glibenclamide) and metformin on QT dispersion: a potential adenosine triphosphate sensitive K⁺ channel effect", *The American Journal of cardiology*, 90:1103-1106.
63. OBATA Toshio y Yamanaka Yasumitsu. (1998). "Glibenclamida, an antagonist of ATP sensitive K⁺ channels, blocks free radical generation in the rat myocardium", *Neuroscience Letters*, 257(1):57-59.
64. OBROSOVA I y otros. (1997). "Glycolytic pathway, redox state of NAD(P)-couples and energy metabolism in lens in galactose-fed rats: effect of an aldose reductase inhibitor". *Currents Eye Research* 16(1):34-43.
65. POMPELLA A y Bielsalski HK (2000) "Histochemical visualization of oxidant stress". *Free Rad Biol Med* 29:1096-105.
66. QUINLAN Gregory J, Halliwell Barry, Moorhouse CP y Gutteridge J. (1988). "Action of lead (II) and aluminium (III) ions on iron-stimulated lipid peroxidation in liposomes, erythrocytes and rat liver microsomal fractions". *Biochimica et Biophysica Acta*, 962:196-200.
67. RACEK J y otros. (2001). "What is the source of free radicals causing hemolysis in stored blood?" *Physiol Res*, 50:383-388.
68. RAMAZAN MS y otros (2000). "The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus". *Clinical Biochemistry*, 33(8):669-674.
69. SABU MC, Smitha K y Kuttan R. (2002). "Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes". *Journal of Ethnopharmacology* 83: 109-116.
70. SALAMA Benarroch I y Sánchez GA. (2002). "Factores de riesgo y complicaciones crónicas en el diagnóstico reciente de la diabetes mellitus". *Revista Cubana de Endocrinología* 12(2):76-81.
71. SANCHÍZ JB y otros. (1999) "Determinación de los niveles de glutatión, enzimas del sistema glutatión y productos de la peroxidación lipídica en el cristalino cataroso y en el cristalino" *Sanoarchivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 11:89-98.

72. SANTILLÁN DP y otros. (1999) "Actividad de superóxido dismutasa y las concentraciones de glutatión y malondialdehído en los tejidos pulmonar y cardiaco post-perfusión, preservación y reperfusión del bloque cardiopulmonar". Rev Inst Nal Enf Resp Mex, 12(1):13-18.
73. SEDLAK J y Lindsay RH (1967). "Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent" Arch Biochem Biohys 74, 443:192-205.
74. SCHMID-SCHÖNBEIN H. y Volger E. (1976). "Red-cell aggregation and red-cell deformability in diabetes". Diabetes, 25(2):897-902.
75. SOM Nath Singh y otros. (2001). "Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats". Journal of Ethnopharmacology 76:26-277.
76. SSA/Dirección General de Salud/INEGI/CONAPO <http://www.salud.gob.mx>
77. STENESH J. (1998) *Biochemistry*. 1ª ed. Ed. Plenum Press NY and London. U.S.A.
78. SUSHIL KJ y cols. (1989) "Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes"; Diabetes, 38:26-31.
79. TEDESCO Idolo y otros. (2000). "Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells". J. Nutr. Biochem. 11:114-119.
80. VALDEZ R. y Cedillo T. (2003). "Analizan el uso farmacológico de plantas antidiabéticas". Semanario de la UAM. Órgano Informativo de la Universidad Autónoma Metropolitana. Contra la diabetes, de la planta al medicamento. 9(15):2-9.
81. VALGIMIGLI L, Pedulli GF y Paolini M (2001) "Measurement of oxidative stress by EPR Radical-probe technique". Free Rad Biol Med 31:708-16.
82. VERSPOHL EJ (2002) "Recommended Testing in Diabetes Research", Planta Med, 68:581-590.
83. WACZULÍKOVÁ I., Sikurová L. y Cársky J. (2002) "Fluidity gradient of erythrocyte membranes in diabetics: the effect of resorcylic acid aminoguanidine", Bioelectrochemistry, 55:53-55.
84. WEST IC. (2000). "Radicals and oxidative stress in diabetes". Diabetic Medicine, 17:171-180.
85. WHEATLEY RA. (2000). "Some recent trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation". Trends in analytical chemistry. 19(10):617-628.

- 86.WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION).2004. <http://www.who.int>
- 87.WILLIAMSON JR y otros. (1993). "*Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications*". *Diabetes*, 42(6):801-813.
- 88.WOLF SP. (1993) "*Diabetes mellitus and free radicals*". *Br Med Bull*, 49:642-652.
- 89.WOLF SP, Jiang ZY, Hunt JV. (1991) "*Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing*", *Free Radic Biolo Med*, 10:339-352.
- 90.YAGI Kunio (1984) "*Assay for blood plasma or serum*" *Methods in enzymology*, 105:328-331.
- 91.YILMAZ Ö, Özkan Y, Yildirim M, Öztürk A y Erşan Y. (2002), "*Effects of lipoic acid, ascorbic acid-6-palmitate, and fish oil on the glutathione malonaldehyde and fatty acids levels in erythrocytes of streptozotocin diabetic male ratas*", *J. of Cell. Biochem.* 86:530-539.
- 92.YOREK Mark A. (2003). "*The role of oxidative stress in diabetic vascular and neuronal disease*". *Free Radical Research*, 37(5):471-480.
- 93.ZARATE Aguilar A. (2000), "*Diabetes mellitus, prioridad institucional*". *Foro Silanes, atención a la salud en México, año 4(10):5.*
- 94.<http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol20/n1/revis2a.html> Utilización de órganos, revisión del daño orgánico y los posibles mecanismos de prevención. Revisado 23 de marzo del 2003.
- 95.<http://www.udec.cl/ofem/revista/revista01/revista5.html> Radicales libres. Dr. Oscar Román A. Área temática: citogenética. Revisado 25 de abril del 2003.
- 96.<http://www.bibliotecamedica.tripoid.com/hematología>.