

2015



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

DORIS ABIGAIL JUÁREZ MORA
2112030861
LICENCIATURA EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

[EFECTO DE LA SILIMARINA EN EL TRANSPORTADOR DE GLUCOSA GLUT 4 EN MÚSCULO ESQUELÉTICO EN RATAS CON INTOLERANCIA A LA GLUCOSA]

ASESOR INTERNO: CLAUDIA SOTO PEREDO
UNIDAD INTERDISCIPLINARIA DE DOCENCIA INVESTIGACIÓN Y SERVICIO
LAB. FARMACOLOGÍA

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	2
3. OBJETIVO GENERAL	8
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4. METODOLOGÍA	8
4.1 Grupos experimentales.....	8
4.2 Tolerancia a la glucosa	8
4.3 Tolerancia a la insulina	9
4.4 Expresión génica del transportador GLUT 4 y ribosomal 18S	9
4.5 Análisis inmunohistoquímico del transportador GLUT 4	9
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
6.1 Tolerancia a glucosa e insulina	10
6.2 Pesos.....	17
6.3 Glucosa basal.....	20
6.4 Estadística.....	22
6.5 Prueba de inmunoensayo.....	23
6.6 Expresión génica	24
7. CONCLUSIÓN	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes Mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica y crónico degenerativa cuya prevalencia se ha triplicado en los últimos 30 años, y se estima que habrá más de 320 millones de personas con diabetes mellitus para el año 2025. Antes de la aparición de la diabetes, hay una etapa intermedia llamada prediabetes, también llamada hiperglucemia intermedia o disglucemia, que se define generalmente como la alteración de la glucosa en ayunas (IFG), la intolerancia a la glucosa (ITG), o de ambas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la American Diabetes Association (ADA), la IFG, está definida entre los márgenes de 110-125 mg/dL. (American Diabetes Association, 2002) (Nathan y cols, 2007)

Por la relevancia del tema a nivel social y farmacológico, el presente proyecto se enfocó al estudio de la Silimarina como fármaco natural para el tratamiento y control de la intolerancia a la glucosa, para ello se realizó un modelo experimental con esta alteración y el tratamiento con Silimarina obteniendo posteriormente la expresión del gen GLUT 4 en el tejido muscular por análisis densitométrico e inmunohistoquímico, para observar el efecto de la Silimarina en dicho transportador de glucosa, el cual frente a la hiperglucemia disminuye su actividad o tiende a formarse un menor número de transportadores. (Durruty & García de los Ríos, 2001)

2. MARCO TEÓRICO

La ITG se define como una glucemia plasmática en sangre entre 140 mg/dL y 199 mg/dL a las dos horas posteriores de la administración de 75 g de glucosa (Artola y cols, 2015) (Tuomilehto, y cols, 2001). Es el principal factor de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y se han reportado complicaciones orgánicas importantes, así como daño a células β . (Oliart, Angulo, & Torres, 1998)

La curva de tolerancia a la glucosa es una prueba que mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa, en las personas con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, esta capacidad se encuentra alterada.

La curva consiste en lo siguiente: Después de un ayuno de 10 a 12 horas, se obtiene del sujeto bajo estudio, una muestra de sangre para determinar la glucemia (concentración de glucosa en la sangre). Si el valor de glucemia en ayunas es igual o mayor a 126 mg/dL, se cumple el umbral para el diagnóstico de la Diabetes Mellitus (DM) (American Diabetes Association, 2002) y la realización de la prueba está contraindicada, pues se corre el riesgo de provocar un shock hiperglucémico. Si la glucemia en ayunas es menor de 126 mg/dL, entonces se administra una carga de glucosa de 3 g/Kg (Hernández González y cols, 2007) y posteriormente, se toman muestras de sangre a intervalos regulares de tiempo, de acuerdo con alguno de los muestreos convencionales: Una muestra cada hora hasta las dos horas (tres muestras), o una muestra cada 30 minutos hasta las 2 horas (5 muestras). Si la glucemia en la muestra de las dos horas es igual o superior a los 200 mg/dL, se diagnostica DM, Figura 1. Finalmente, con los valores

de concentración de glucosa y tiempo obtenidos, se representa una curva. (Trujillo Arriaga., 2007)

mg/dl	D I A G N Ó S T I C O					
≥ 200	D I A B E T E S	*	*	*	D I A B E T E S	
< 200					I G T	
≥ 140	I F G	N	N	N	N	
< 140		O	O	O		
≥ 126	N O R M A L	R	R	R	O	
< 126		M	M	M		
≥ 100	N O R M A L	A	A	A	R	
< 100		L	L	L		
≥ 60	N O R M A L	hg	hg	hg	hg	
< 60		0	30	60	90	
		Tiempo de toma de la muestra (minutos)				

Figura 1. Valores de concentración de glucosa plasmática para el diagnóstico de las anomalías de la Curva de Tolerancia a la Glucosa, donde: * = Diagnóstico provisional de DM. Debe verificarse con una prueba subsecuente. IFG = Impaired Fasting Glucose (alteración de la glucosa en ayuno) IGT = Impaired Glucose Tolerance (intolerancia a la Glucosa). Pre Diabetes = Presencia de IFG y/o IGT. hg = hipoglucemia.

Las dos hormonas principales que intervienen en el control del metabolismo de la glucosa son la insulina, producida por las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans, y el glucagón, producido en las células α .

La insulina se deriva biosintéticamente de su precursor, la proinsulina, que consiste de las cadenas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos) (G. Gardner & Shoback, 2012) unidas por un péptido conector, identificado como péptido C. (Oliart, Angulo, & Torres, 1998)

La insulina humana tiene un peso molecular de 5808 y es liberada en respuesta a niveles elevados de glucosa en la sangre (Panduro, 2012). Su función principal es mantener la concentración de glucosa en plasma en un rango normal entre 80-105 mg/dL, favoreciendo la entrada y almacenamiento de la misma en músculo y tejido adiposo e inhibiendo la producción hepática de glucosa a través de la activación de vías de señalización de insulina. (Wang y cols, 2015)

La transmisión de las señales activadas por la insulina se inicia por la unión de la ésta a su receptor específico de membrana. (Oliart, Angulo, & Torres, 1998)

El receptor de insulina (ins-R) es una glicoproteína de superficie que consiste de una subunidad- α extracelular reguladora (135 kDa) y una subunidad- β transmembranal catalítica (95 kDa), Cualquier defecto en su función puede ser responsable de síndromes de resistencia extrema a la insulina. (Ros y cols, 2014) (Wang y cols, 2015)

El ins-R es una enzima alostérica en la cual la subunidad- α inhibe la actividad tirosin cinasa de la subunidad $-\beta$. La unión de la insulina a la subunidad- α resulta

en la dimerización del receptor al complejo $\alpha_2\beta_2$ en la membrana celular y en la autofosforilación de la subunidad- β a Tyr¹¹⁵⁸, Tyr¹¹⁶², y Tyr¹¹⁶³, el primer paso de la activación del receptor de insulina. La activación tirosin cinasa del receptor de insulina recluta y fosforila varios sustratos, incluyendo el IRS1-4. (Guo, 2014)

Las proteínas IRS se caracterizan por la presencia de un grupo NH₂-terminal, un dominio PH (pleckstrin homology) y PTB (phosphotyrosine binding) que permite su unión a residuos fosforilados de tirosina, seguido de un COOH terminal. El COOH terminal de cada proteína IRS tiene alrededor de 20 sitios de fosforilación de tirosina que actúan como switches de encendido y apagado para transducir la acción de la insulina, reclutar proteínas para la señalización corriente abajo, incluyendo la subunidad PI3K a través de la unión directa o a través de la fosforilación de IRS-1 en los residuos Tyr⁶⁰⁸ y Tyr⁹³⁹ (Manning & Cantley, 2007), la fosfotirosin fosfatasa SHP-2, Grb-2, SOCS3, Nck, Crk, SH2B. etc.

Después de ser activado PI-3K fosforila al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) para generar fosfatidilinositol (3,4,5) – trifosfato (PIP₃), un segundo mensajero 3-fosfoinositido dependiente de protein cinasa-1 y -2 (PDK1 y PDK2). PDK1 y PDK2 activan la protein cinasa Akt (PKB) por fosforilaciones en T³⁰⁸ y S⁴⁷³ respectivamente.

Además, la señalización del receptor tirosin cinasa activa el complejo 2 mTOR (mTORC2) (Manning & Cantley, 2007). mTOR es una protein cinasa que controla el crecimiento celular y el metabolismo en respuesta a nutrientes, factores de crecimiento y estatus de energía y para ello existen 2 complejos distintos, el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2). (Guo, 2014)

mTORC2 fosforila Akt en el residuo hidrofóbico S⁴⁷³ y lo activa al igual que otras protein cinasas, como PKC, sin embargo mTORC2 y PDK1 suprimen el factor de transcripción Foxo1 que promueve la gluconeogénesis, mediando el efecto de insulina de suprimir la producción de glucosa hepática (Guo, 2014). AKT también puede activar mTORC1 por fosforilación de PRAS40. Una vez activo tanto mTORC1 y S6K pueden fosforilar residuos de serina en IRS1. (Manning & Cantley, 2007)

AKT fosforila mediadores en el control de respuestas biológicas incluyendo AS160 para la activación de Rab10GTPasa y la translocación del transportador de glucosa GLUT 4. (Guo, 2014), (Olivares Reyes & Arellano Plancarte, 2008) Las moléculas de GLUT 4 se encuentran retenidas en vesículas especializadas cerca de la membrana plasmática en situación basal. Tras la estimulación de la célula con insulina, estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática en un proceso que implica a proteínas como v-SNARE, VAMP2 y caveolina. De esta forma, la insulina induce la externalización de GLUT 4 y el consiguiente aumento del transporte de glucosa. (De Solís, 2011)

Durante el estado postprandial, la secreción de insulina de las células β -pancreáticas controla la homeostasis de nutrientes promoviendo el proceso

anabólico en los tejidos. La insulina estimula el flujo de glucosa dentro del músculo y la grasa, la síntesis de proteínas y glicógeno en músculo e hígado, la síntesis de lípidos y el almacenamiento en hígado y grasa, mientras inhibe la oxidación de los ácidos grasos, la glicogenólisis y gluconeogénesis.

La inactivación hepática de PI3K, PDK1, MTORC2 o Akt1 y Akt2 es suficiente para la inducción de hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipolipidemia. Los ratones que carecen de Akt2 desarrollan diabetes mellitus tipo 2. (Guo, 2014)

Los sitios involucrados en la regulación del consumo de glucosa en el músculo están definidos por tres pasos: 1) entrega de glucosa al músculo, 2) transporte de glucosa dentro del músculo a través de GLUT 4 y, 3) fosforilación de la glucosa dentro del músculo por una hexocinasa. (Wasserman y cols, 2011). El contenido de GLUT 4 en la membrana plasmática determina el transporte de glucosa dentro de la célula.

El músculo esquelético comprende la mayor parte del tejido sensible a la insulina y de esta manera el consumo de glucosa es cuantitativamente el más importante.

La regulación fisiológica del consumo de glucosa en el músculo requiere que la glucosa migre de la sangre, al espacio intracelular y después que se fosforile a glucosa 6-fosfato.

La liberación hepática de glucosa es el principal medio por el cual la glucosa en sangre se sostiene en el estado post-absorción frente al uso constante de glucosa en los tejidos. Por lo tanto, el control de la producción de glucosa hepática es clave para la regulación de la absorción de glucosa muscular. (Wasserman y cols, 2011)

Los ácidos grasos libres reducen la afinidad insulina-receptor, disminuyendo la acción de la insulina en los tejidos insulinosensibles; favoreciendo así la resistencia a la insulina. Se ha encontrado que a nivel de músculo se inhibe la captación y oxidación de glucosa con la consiguiente disminución de la síntesis de glicógeno. En el hígado se produce gluconeogénesis con mayor producción de glucosa y como consecuencia de todo esto, hay elevación de los niveles de glicemia y aparece la intolerancia a la glucosa. (Durruty & García de los Ríos, 2001)

La resistencia a la insulina se refiere a la respuesta disminuida de la acción de la insulina en tejidos adiposo, hepático y músculo esquelético, así como a la disminución en la captación de glucosa por los tejidos dependientes de insulina, se suprime la gluconeogénesis y glicogenólisis por el hígado y aumenta la lipólisis en el tejido graso y los ácidos grasos en la circulación, causando lipotoxicidad. De forma compensatoria, las células beta pancreáticas elevan su masa y secretan más insulina lo que produce hiperinsulinemia (Panduro , 2012) (Carrasco , Galgani, & Reyes, 2013)

La resistencia a la insulina asociada a factores de susceptibilidad genética condiciona alteraciones clínicas como la intolerancia a la glucosa que en última instancia deriva en diabetes mellitus tipo 2. (Cipriani Thorne & Quintanilla, 2010). En el primer estadio de la diabetes mellitus tipo 2, la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) aún es normal, en presencia de hiperinsulinemia y los individuos en ocasiones tienen obesidad, con incremento en la relación cintura – cadera; en esta etapa, se inicia la aceleración del envejecimiento arterial (aterogénesis) y el incremento en la prevalencia de hipertensión arterial. En un segundo estadio, ocurre alteración en la tolerancia a la glucosa, con niveles post prandiales de glucosa elevados, la producción hepática de glucosa se incrementa y el transporte de glucosa al interior de las células disminuye, pues empieza a ocurrir déficit en la secreción de insulina. En un tercer estadio, la diabetes mellitus se hace clínicamente detectable y se incrementa la presencia de macro y microangiopatía que ya ocurre en individuos con CTG alterada. (Cipriani Thorne & Quintanilla, 2010)

La DM2 del adulto se caracteriza por ser poligénica, con una progresiva disminución de la secreción de la insulina asociada a la alteración del control de la glicemia. (Cipriani Thorne & Quintanilla, 2010)

Se han postulado tres mecanismos para explicar cómo la hiperglicemia produciría resistencia a la insulina: a) disminución de la síntesis y actividad del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) en el músculo. La glucosa requiere de un transportador, de naturaleza proteica, para entrar a las células; frente a la hiperglicemia, el organismo reacciona formando un número menor de transportadores o disminuyendo su actividad. b) Aumento de la vía de la glucosamina. Se ha demostrado *in vitro*, que al incubar células de fibroblasto con glucosamina *in vivo*, la glucosamina produce resistencia a la insulina y déficit de secreción, por disminución de los transportadores de glucosa, GLUT 4 en el músculo y GLUT 2 en la célula beta. En el metabolismo normal, 2 a 3% de la glucosa se degrada a través de la formación de glucosamina; en los estados de hiperglicemia esta vía está muy aumentada, lo que explica que se produzca a través de este mecanismo toxicidad por la glucosa. c) Glicosilación de los transportadores. El ambiente crónico con niveles moderados o altos de glucosa producen unión de la glucosa a los grupos amino terminal de las proteínas, fenómeno llamado glicosilación, esta unión química cambia la estructura de las moléculas alterando sus funciones, en este caso de los transportadores de la glucosa, con una menor captación de glucosa en los tejidos periféricos.

El tratamiento de la DM2 tiene por objetivo disminuir la resistencia a la insulina, lo que conlleva una mejoría de la resistencia a la glucosa. (Durruty & García de los Ríos, 2001)

Afortunadamente, un gran número de estudios han demostrado que la prediabetes puede revertirse mediante el cambio de estilo de vida y las intervenciones farmacológicas. El cribado oportunista en grupos de riesgo, mediante el test FINDRISC, puede contribuir a detectar casos de prediabetes y a prevenir la DM2 y probablemente sus complicaciones crónicas. (Huashen y cols, 2015)

Para el tratamiento de DM2 se recurre a fármacos como biguanidas, sulfonilureas e inhibidores α -glucosidasa. (Gómez Zorita & Urdampilleta, 2012)

Se han realizado investigaciones con el propósito de obtener nuevos tratamientos terapéuticos para la DM2 y entre estos la Silimarina ha tomado gran importancia por sus propiedades antioxidantes en el perfil glucémico en pacientes diabéticos. (Huasheng y cols, 2015)

La Silimarina es un flavonoglicano extraído de las semillas y el fruto de *Silybum marianum* o «Cardo Mariano», y es una mezcla de siete compuestos diferentes: silibinina, silidianina y silicristina además de proteínas, taninos, tiraminas e histaminas y vitaminas A, E y K. (Huseini, y cols, 2006). Los principales efectos de la Silimarina son la estabilización de membrana del hepatocito, efecto antioxidante, regenerador celular, efecto antiinflamatorio y antifibrótico. Estas propiedades han sido evaluadas en ensayos clínicos y experimentales. Esta planta es una de las más estudiadas para el tratamiento de la enfermedad hepática, especialmente en aquéllas causadas por el estrés oxidativo (enfermedad hepática alcohólica, enfermedad por hígado graso no alcohólico y hepatotoxicidad por medicamentos). (Vázquez Frías y cols, 2013)

La Silimarina ha sido muy utilizada en intoxicación, así como en padecimientos hepáticos por su efecto regenerador celular e inhibidor de leucotrienos (Vázquez Frías y cols, 2013).

Se han descrito diferentes efectos en el páncreas, incluyendo: la recuperación de la función pancreática después del daño por aloxana, la inhibición de la liberación de insulina inducida por glucosa *in vitro* sin afectar la concentración sérica de glucosa *in vivo*, así como la protección de las células pancreáticas de la toxicidad por ciclosporina A, o bien un efecto citoprotector directo sobre las células beta del páncreas. (Vázquez Frías y cols, 2013)

Polyak SJ y colaboradores caracterizaron las diferentes medidas de protección de los compuestos puros de Silimarina, y encontraron que la silibinina, la taxifolina y la isosibilina A son los hepatoprotectores más efectivos (Polyak y cols, 2010); además, que la Silimarina inhibe parcialmente la translocación nuclear de las subunidades p50 y p65 del NF-KB. Por ello representa una nueva posibilidad en el tratamiento de la diabetes ya que no solo es capaz de mejorar los niveles de insulina en ratas sino que también induce la recuperación de la función pancreática. Aunque se necesitan más estudios para demostrar sus propiedades benéficas en la diabetes mellitus en humanos (Soto y cols, 2004).

3. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la expresión y detección del transportador de glucosa GLUT 4 en las células del músculo esquelético de ratas con ITG tratadas con Silimarina.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la participación del transportador GLUT 4 en la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en el tratamiento de Diabetes mellitus tipo 2.
- Aplicar la técnica y el fundamento en pruebas de biología molecular (RT-PCR, PCR), en histopatología (inmunohistoquímica) y extracción de RNA.

4. METODOLOGÍA

4.1 Grupos experimentales

Se utilizaron ratas Wistar macho (n= 12) con un peso de 180 a 220 g. Estos animales tuvieron libre acceso a alimento y se les suministró sacarosa al 30 y 40% en el agua para beber. Las ratas se dividieron en los siguientes grupos:

- Grupo 1 Control 8 meses: Se les proporcionó agua purificada durante 8 meses.
- Grupo 2 Control Sano: Las ratas con peso aproximado de 200 g se sacrificaron al iniciar el experimento.
- Grupo 3 Sacarosa 30%: Para hidratarlas se les proporcionó sacarosa al 30% en agua, durante 8 meses.
- Grupo 4 Sacarosa 40%: Para hidratarlas se les proporcionó sacarosa al 40% en agua, durante 8 meses.
- Grupo 5 sacarosa 30% más tratamiento con Silimarina: la ratas recibieron el mismo tipo de alimento y bebida que el grupo de sacarosa 30% por 8 meses, posteriormente se les administró una dosis diaria de Silimarina (200 mg/Kg) por vía oral a cada una por un periodo de 9 a 12 semanas.
- Grupo 6 sacarosa 40% más tratamiento con Silimarina: Las ratas siguieron el mismo tratamiento con Silimarina que en el grupo anterior con excepción de la concentración en el agua con sacarosa que fue del 40%.

4.2 Tolerancia a la glucosa

La prueba se realizó al inicio y término del tratamiento.

Todos los grupos se mantuvieron en ayuno por 5 horas, se les administró glucosa por vía intraperitoneal con relación de dosis 3 g/Kg y la muestra de sangre se

obtuvo por punción en la cola a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos (se utilizó glucómetro Freestyle Optium)

4.3 Tolerancia a la insulina

La prueba se realizó al inicio y término del tratamiento.

Se administró por vía intraperitoneal insulina (1U/Kg) a todos los grupos experimentales y se les midió glucosa en sangre de la vena caudal a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, con glucómetro.

- Procesamiento de las muestras

4.4 Expresión génica del transportador GLUT 4 y ribosomal 18S

Al término del tratamiento, se extrajo de cada una de las ratas el músculo esquelético, se realizó la extracción del RNA total por el método con trizol (Chomczynski , 1993) seguido del tratamiento con DNAsa, posteriormente se desarrolló la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa inversa (RT-PCR) para después realizar PCR en punto final (GLUT 4 derecho 5'CGCTTTAGACTCTTTCGGGC3', GLUT 4 izquierdo 5' TTGCCCTTCTGTCCTGAGAG 3'). Por último se efectuó una electroforesis en gel de agarosa al 1.7% con el fin de obtener bandas con mejor resolución, se agregó bromuro de etidio para teñir y finalmente se realizó el análisis densitométrico de las bandas de expresión génica del GLUT 4.

4.5 Análisis inmunohistoquímico del transportador GLUT 4

Un fragmento de músculo de cada animal, se incluyó en parafina y de estos se obtuvieron los cortes con el tejido muscular, después se realizó la técnica de inmunohistoquímica por inmunoperoxidasa indirecta, al término se observaron las células en las laminillas haciendo uso del microscopio óptico Leica DM 1000, con el fin de evaluar el efecto de la Silimarina y la presencia del transportador de glucosa GLUT 4.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron utilizando la Prueba T y ANOVA seguido por la prueba de Tukey comparando al grupo control (Sano y 8 meses) con los grupos Sacarosa y Sacarosa + Silimarina con un valor significativo de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Tolerancia a glucosa e insulina

Las curvas de tolerancia a la glucosa e insulina realizadas al inicio, después de 8 meses y al final del tratamiento se muestran en las siguientes tablas y figuras.

Tiempo (min)/Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	2R	3R	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	96	90	84	90.000	4.996	0.333	0.192
15	227	281	194	234.000	12.988	2.438	1.407
30	221	217	199	212.333	11.786	0.650	0.376
60	139	97	112	116.000	6.439	1.181	0.682
120	82	99	96	92.333	5.125	0.504	0.291

Tabla 1. Concentraciones de glucosa en sangre, obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa al minuto 0, 15, 30, 60 y 120 reportados en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media, de los animales control sano al iniciar el tratamiento.

Tiempo (min)/Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1A	2A	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	122	119	99	113.333	6.291	0.694	0.401
15	295	184	125	201.333	11.175	4.791	2.766
30	151	167	104	140.667	7.808	1.818	1.049
60	101	103	104	102.667	5.699	0.085	0.049
120	111	106	97	104.667	5.810	0.394	0.227

Tabla 2. Concentraciones de glucosa en sangre, obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa al minuto 0, 15, 30, 60 y 120 reportados en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media, de los animales incluidos en el grupo control 8 meses al inicio del tratamiento.

Tiempo (min)/Rata							Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	3V	4V	5V	3A	4A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	80	71	67	76	70	78	73.667	4.089	0.282	0.115
15	193	202	220	288	245	224	228.667	12.692	1.901	0.776
30	177	178	89	174	165	301	180.667	10.028	3.780	1.543
60	101	110	86	104	78	117	99.333	5.514	0.817	0.334
120	85	88	78	125	87	71	89.000	4.940	1.042	0.425

Tabla 3. Concentraciones de glucosa en sangre, obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa al minuto 0, 15, 30, 60 y 120 reportados en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media, antes de comenzar el tratamiento con sacarosa.

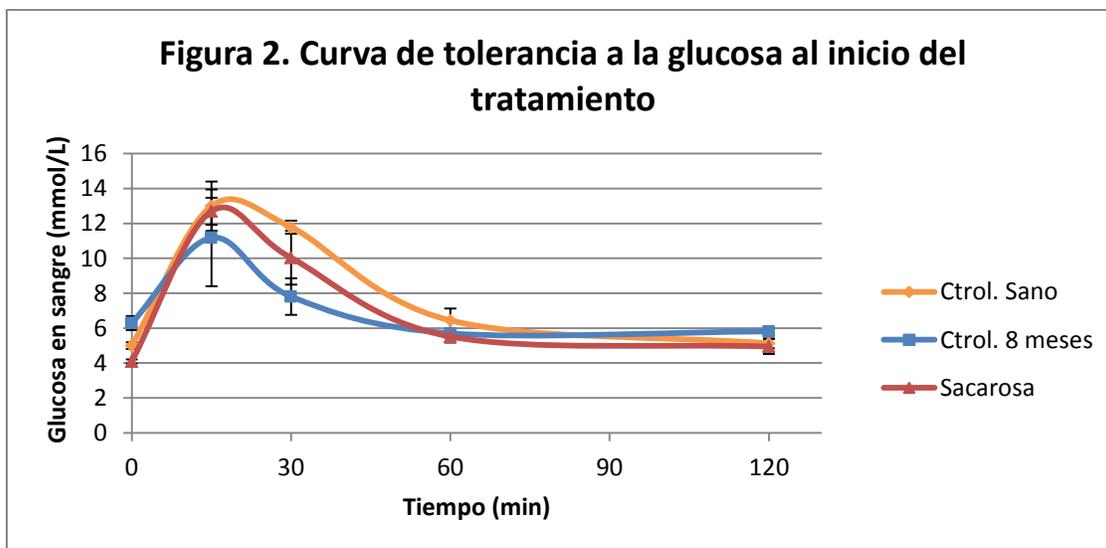


Figura 2. Representación gráfica del promedio de los niveles de glucosa en sangre en mmol/L y el error estándar de la media obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa con toma de muestra al minuto 0, 15, 30, 60 y 120 realizada a las ratas de los 3 grupos diferentes seleccionados para iniciar el estudio.

Las cifras anteriores de las tablas se resumen en la gráfica de la figura 2, en la cual se observa que todos los grupos en estudio tuvieron el mismo comportamiento después de la administración de glucosa, desde la primera toma en sangre al minuto 0 hasta la última al minuto 120 e incluso se puede percibir que el valor inicial y final son similares menores a 100 mg/dL, lo que indica que la insulina mantiene la concentración de glucosa en plasma en un rango normal al activarse la vía de señalización e inducir la externalización de GLUT 4 a la membrana plasmática y el consiguiente aumento del transporte de glucosa favoreciendo su entrada y almacenamiento en el musculo y el tejido adiposo. (De Solís, 2011), (Wang y cols, 2015)

TABLA 4. CURVA DE TOLERANCIA A LA INSULINA AL INICIO DEL TRATAMIENTO. GRUPO CONTROL SANO							
Tiempo (min)/Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	2R	3R	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	116	110	110	112.000	6.217	0.192	0.111
15	79	68	87	78.000	4.329	0.529	0.306
30	60	57	69	62.000	3.441	0.347	0.200
60	51	30	31	37.333	2.072	0.658	0.380
120	46	60	70	58.667	3.256	0.669	0.386

Tabla 4. Nivel de glucosa en sangre en la curva de tolerancia a la insulina realizada al grupo control sano al inicio del estudio expresada en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media al minuto 0, 15, 30, 60 y 120.

Tiempo (min)/Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1A	2A	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	108	83	87	92.667	5.144	0.745	0.430
15	71	49	53	57.667	3.201	0.650	0.376
30	50	39	45	44.667	2.479	0.306	0.176
60	29	25	26	26.667	1.480	0.116	0.067
120	31	20	20	23.667	1.314	0.353	0.204

Tabla 5. Nivel de glucosa en sangre en la curva de tolerancia a la insulina realizada al grupo definido como control 8 meses al inicio del estudio expresada en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media al minuto 0, 15, 30, 60 y 120.

Tiempo (min)/Rata							Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	3V	4V	5V	3A	4A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	80	71	67	76	70	78	73.667	4.089	0.282	0.115
15	107	110	65	94	83	110	94.833	5.264	1.005	0.410
30	102	100	25	87	49	94	76.167	4.228	1.760	0.719
60	100	70	21	62	64	98	69.167	3.839	1.605	0.655
120	68	71	20	40	54	75	54.667	3.034	1.184	0.483

Tabla 6. Nivel de glucosa en sangre en la curva de tolerancia a la insulina realizada a los animales destinados a ser el grupo tratado con sacarosa al inicio del estudio expresada en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media al minuto 0, 15, 30, 60 y 120.

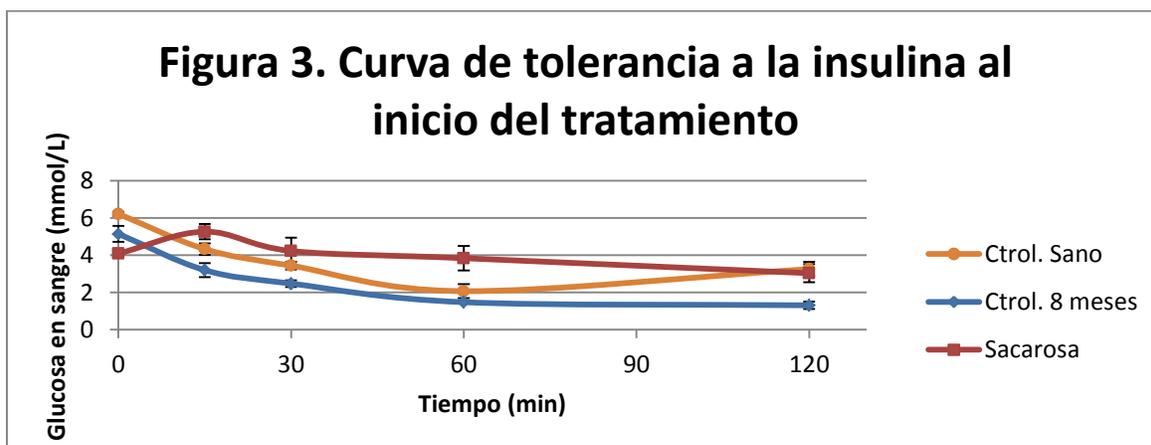


Figura 3. Grafico que representa la concentración de glucosa en sangre en mmol/L y el error estándar de la media en la curva de tolerancia a la insulina de los animales utilizados para el estudio al inicio del tratamiento, a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.

En la figura 3 se observa que hay diferencia en los niveles de glucosa en sangre entre el control sano y control 8 meses con el grupo restante, ya que entre los

minutos 15 y 60 en los 2 primeros grupos la señal de la insulina que inicia por la unión de esta a su receptor específico de membrana desencadena la cascada y disminuye la concentración de glucosa, sin embargo con el grupo Sacarosa hay una ligera variación de los valores entre la administración de la insulina y los minutos subsecuentes.

TABLA 7. CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA A 8 MESES DEL INICIO DEL TRATAMIENTO. GRUPO CONTROL 8 MESES

Tiempo (min)/Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1A	2A	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	85	96	89	90.000	4.996	0.309	0.178
15	145	161	231	179.000	9.936	2.539	1.466
30	120	153	134	135.667	7.530	0.919	0.531
60	107	142	154	134.333	7.456	1.355	0.783
120	117	107	79	101.000	5.606	1.093	0.631

Tabla 7. Concentraciones de glucosa en sangre, obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos reportados en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media, de los animales incluidos en el grupo control después de 8 meses de haber iniciado el tratamiento.

TABLA 8. CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA A 8 MESES DEL INICIO DEL TRATAMIENTO. GRUPO SACAROSA

Tiempo (min)/Rata							Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	3V	4V	5V	3A	4A	(mg/dl)	(mmol/L)		
0	65	68	89	92	88	88	81.667	4.533	0.659	0.269
15	466	438	599	599	477	228	467.833	25.968	7.566	3.089
30	599	426	599	599	599	225	507.833	28.188	8.597	3.510
60	488	481	599	599	453	447	511.167	28.373	3.876	1.582
120	475	305	376	423	411	302	382.000	21.203	3.808	1.555

Tabla 8. Concentraciones de glucosa en sangre, obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos reportados en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media, de los animales tratados con sacarosa después de 8 meses de haber iniciado el estudio.

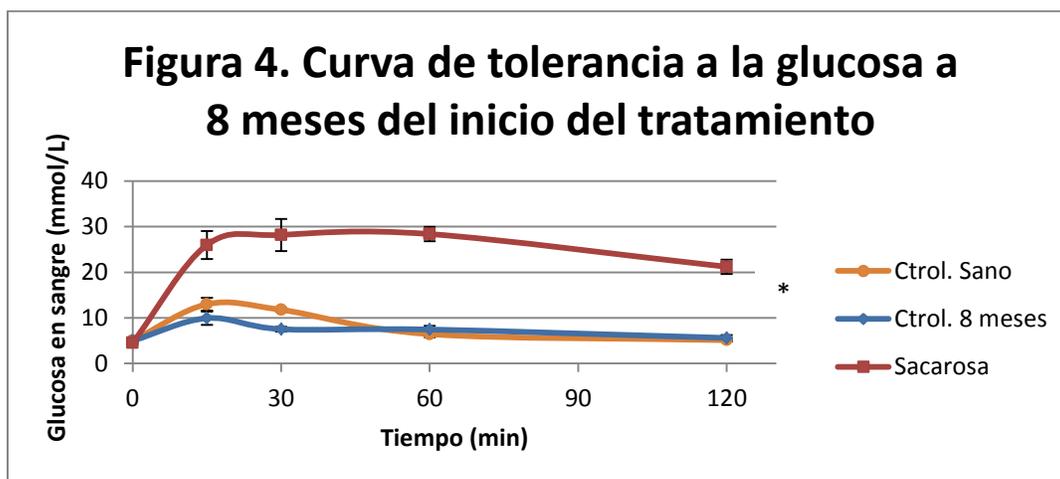


Figura 4. Curva de tolerancia a la glucosa a 8 meses del inicio del tratamiento que representa la concentración de esta en sangre en mmol/L y el error estándar de la media a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. *Significancia $p < 0.05$

Tiempo (min)/ Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1A	2A	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	86	102	87	91.667	5.088	0.497	0.287
15	30	52	65	49.000	2.720	0.982	0.567
30	25	39	42	35.333	1.961	0.504	0.291
60	20	21	29	23.333	1.295	0.274	0.158
120	20	28	42	30.000	1.665	0.618	0.357

Tabla 9. Nivel de glucosa en sangre en la curva de tolerancia a la insulina a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos reportados en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media, de los animales incluidos en el grupo control después de 8 meses de haber iniciado el tratamiento.

Tiempo (min)/Rata							Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	3V	4V	5V	3A	4A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	85	78	124	91	78	61	86.167	4.783	1.170	0.478
15	62	77	152	84	55	65	82.500	4.579	1.977	0.807
30	40	44	112	25	44	49	52.333	2.905	1.685	0.688
60	35	20	70	41	37	51	42.333	2.350	0.937	0.382
120	49	35	114	49	47	54	58.000	3.219	1.563	0.638

Tabla 10. Niveles de glucosa en sangre, obtenidos en la curva de tolerancia a la insulina a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos reportados en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media, de los animales tratados con sacarosa después de 8 meses de haber iniciado el estudio.

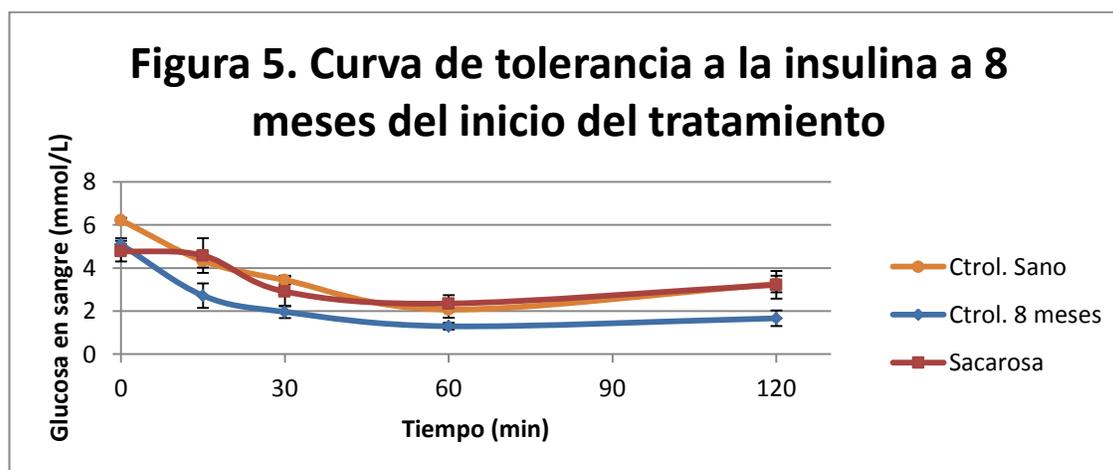


Figura 5. Curva de tolerancia a la insulina que compara la glucosa en sangre al minuto 0, 15, 30, 60 y 120 de los grupos Control y el tratado con sacarosa después de 8 meses del inicio del estudio con el grupo control sano, representando el error estándar de la media.

Después de 8 meses del inicio del tratamiento, al realizar la curva de tolerancia a la glucosa al grupo Sacarosa, se observó que todas las ratas presentaron concentraciones de glucosa arriba de 300 mg/dL al minuto 120 por lo que de

acuerdo a la literatura anteriormente citada se diagnostica intolerancia a la glucosa (ITG) y un diagnostico provisional de diabetes mellitus tipo 2, aunque no se presentó alteración de la glucosa en ayunas (IFG) a tiempo 0. (Trujillo Arriaga., 2007) Se considera que la intolerancia a la glucosa ocurrió debido a 1) Un defecto en la función de la subunidad β del receptor de insulina (Ros y cols, 2014), 2) a los ácidos grasos libres que reducen la afinidad insulina- receptor, disminuyendo la acción de la insulina en los tejidos adiposo, hepático y musculo esquelético favoreciendo la resistencia a la insulina, o 3) a la inactivación hepática de PI3K, PDK1, MTORC2 o Akt1 y Akt2 en la cascada de señalización de la insulina (Guo, 2014), y como consecuencia de ello en el músculo se inhibe la captación y oxidación de glucosa, la disminución de glicógeno y la producción de gluconeogénesis en el hígado elevándose los niveles de glucemia. (Durruty & García de los Ríos, 2001)

Posterior al análisis de los valores obtenidos en las curvas de tolerancia a la glucosa e insulina se eligieron las ratas 1R, 5V y 3A para iniciar el tratamiento con Silimarina durante 12 semanas.

Tiempo (min)/ Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	3V	4V	4A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	80	117	90	95.667	5.310	1.062	0.613
15	379	122	385	295.333	16.393	8.334	4.811
30	342	181	445	322.667	17.910	7.386	4.264
60	351	151	483	328.333	18.225	9.278	5.357
120	222	138	350	236.667	13.136	5.926	3.421

Tabla 11. Concentración en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa realizada al final del estudio de los animales tratados con sacarosa a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.

Tiempo (min)/ Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	5V	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	92	90	75	85.667	4.755	0.516	0.298
15	315	270	320	301.667	16.744	1.529	0.882
30	124	207	209	180.000	9.991	2.692	1.555
60	98	174	220	164.000	9.103	3.420	1.974
120	101	144	154	133.000	7.382	1.563	0.902

Tabla 12. Concentración en mg/dL y mmol/L, desviación estándar y error estándar de la media obtenidos en la curva de tolerancia a la glucosa realizada al final del estudio de los animales tratados con sacarosa más Silimarina a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.

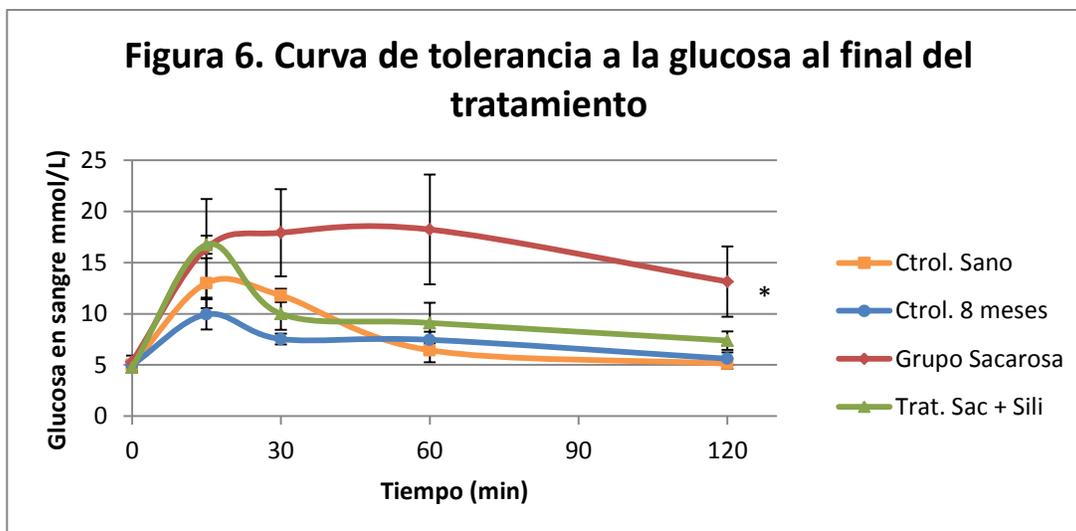


Figura 6. Curva de tolerancia a la glucosa que compara la concentración en sangre al minuto 0, 15, 30, 60 y 120 de los grupos Control 8 meses (tabla 7), el tratado con sacarosa y el tratado con sacarosa más Silimarina al final del estudio con el grupo control sano , representando el error estándar de la media. * Significancia $p < 0.05$

Después de administrar una dosis diaria de Silimarina a las ratas con ITG por 12 semanas, se observa que la glucosa desciende después del minuto 15 hasta llegar a un valor (alrededor de 140 mg/dL) similar obtenido al inicio de la prueba (0 minutos), por lo tanto se le atribuye a la Silimarina la disminución de glucosa en suero, la recuperación de la función pancreática y el efecto citoprotector en la células beta del páncreas (Vázquez Frías y cols, 2013). Por el contrario en el grupo tratado con Sacarosa los niveles de glucosa no descienden sino a partir del minuto 60 permaneciendo por arriba de 140 mg/dL hasta el final de la prueba, lo que posiblemente indica que el daño celular persiste y la respuesta de la acción de la insulina se encuentra disminuida en los tejidos insulinosensibles (resistencia a la insulina) y por consecuencia se disminuye la captación de glucosa. (Panduro , 2012), (Carrasco , Galgani, & Reyes, 2013)

Tiempo (min)/ Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	3V	4V	4A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	71	97	79	82.333	4.570	0.739	0.427
15	89	128	76	97.667	5.421	1.502	0.867
30	75	60	43	59.333	3.293	0.889	0.513
60	40	51	24	38.333	2.128	0.754	0.435
120	20	27	36	27.667	1.536	0.445	0.257

Tabla 13. Niveles de glucosa en sangre en mg/dL y mmol/L, obtenidos en la curva de tolerancia a la insulina a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, la desviación estándar y el error estándar de la media, de los animales tratados con sacarosa al final del tratamiento.

Tiempo (min)/ Rata				Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	5V	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	92	81	79	84.000	4.663	0.389	0.224
15	100	96	117	104.333	5.791	0.619	0.357
30	52	51	82	61.667	3.423	0.978	0.565
60	48	49	43	46.667	2.590	0.178	0.103
120	47	41	20	36.000	1.998	0.787	0.454

Tabla 14. Niveles de glucosa en sangre en mg/dL y mmol/L, obtenidos en la curva de tolerancia a la insulina a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos, la desviación estándar y el error estándar de la media, de los animales tratados con sacarosa más Silimarina al final del tratamiento.

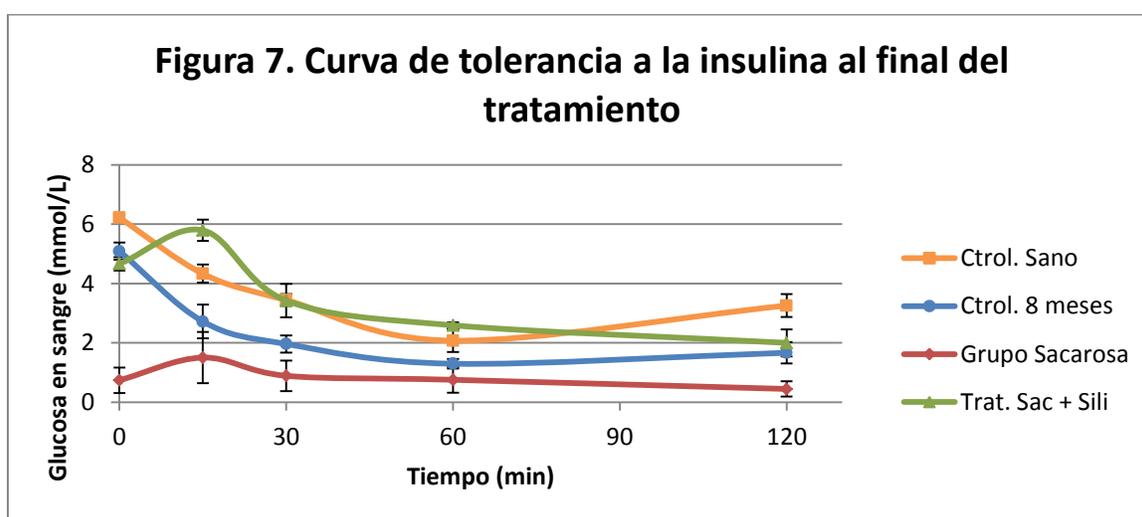


Figura 7. Curva de tolerancia a la insulina que compara la concentración en sangre al minuto 0, 15, 30, 60 y 120 de los grupos Control 8 meses (tabla 9), el tratado con sacarosa y el tratado con sacarosa más Silimarina al final del estudio con el grupo control sano, representando el error estándar de la media.

Los valores en las curvas son similares para los grupos Control y Tratamiento de Sacarosa con Silimarina, pero la diferencia es notoria para el grupo tratado con Sacarosa ya que los niveles de glucosa se mantuvieron bajos durante y al final de la prueba (hipoglucemia), es común que esto suceda en los individuos diagnosticados con diabetes, probablemente debido a la alteración de la β oxidación mitocondrial de los ácidos grasos que conduce a la hipoglucemia asociada con el ayuno y a la infiltración grasa de órganos. (Martínez, 2000), (Murray y cols, 2013)

6.2 Pesos

Los pesos registrados durante los tratamientos se muestran en las siguientes tablas.

TABLA 15. PESOS DEL GRUPO CONTROL DE 8 MESES DURANTE EL ESTUDIO						
Tiempo (mes)/ Rata	Peso (g)			Promedio	Desv. Est.	EEM
	1A	2A	3A			
0	220.6	228.6	226.5	225.233	4.148	2.395
1	346.8	363.8	362.1	357.567	9.363	5.406
2	373.1	390.4	384.5	382.667	8.795	5.078
3	390.5	392.2	392.2	391.633	0.981	0.567
4	431.4	454.5	430.5	438.800	13.604	7.854
5	475.5	482	462	473.167	10.202	5.890
7	511.5	508.4	488.6	502.833	12.423	7.173
8	543.2	527.3	512.7	527.733	15.256	8.808

Tabla 15. Pesos en gramos por mes de los animales del grupo control desde el inicio del tratamiento hasta 8 meses después de este y la correspondiente desviación estándar y error estándar de la media.

TABLA 16. PESOS DEL GRUPO TRATADO CON SACAROSA DURANTE EL ESTUDIO						
Tiempo (mes)/ Rata	Peso (g)			Promedio (g)	Desv. Est	EMM
	3V	4V	4A			
0	275	231	248.5	251.500	22.153	12.790
1	473	380	415.1	422.700	46.963	27.114
2	440.8	591.5	499.5	510.600	75.961	43.856
3	500	600.3	548.8	549.700	50.156	28.958
4	600	615	610	608.333	7.638	4.410
5	615	679	660	651.333	32.868	18.977
7	640	834	788	754.000	101.371	58.526
8	711	936	853	833.333	113.782	65.692
9	812	1060	941	937.667	124.034	71.611
10	777	1046	987	936.667	141.387	81.630

Tabla 16. Pesos en gramos por mes de los animales del grupo tratado con sacarosa desde el inicio del tratamiento hasta 10 meses después de este y la correspondiente desviación estándar y error estándar de la media.

TABLA 17. PESOS DEL GRUPO TRATADO CON SACAROSA + SILIMARINA DURANTE EL ESTUDIO						
Tiempo (mes)/ Rata	Peso (g)			Promedio (g)	Desv. Est	EEM
	1R	5V	3A			
0	298.3	250	235.8	261.367	32.764	18.916
1	465	450	396.5	437.167	36.008	20.789
2	594	598.8	497	563.267	57.439	33.162
3	610	605.4	540.5	585.300	38.866	22.439
4	690	615	600	635.000	48.218	27.839
5	700	680	610	663.333	47.258	27.285
7	871	830	743	814.667	65.363	37.737
8	915	940	737	864.000	110.693	63.909
9	978	1030	823	943.667	107.686	62.173
10	1040	993	824	952.333	113.597	65.585

Tabla 17. Pesos en gramos por mes de los animales del grupo tratado con sacarosa más Silimarina desde el inicio del tratamiento hasta 10 meses después este y la correspondiente desviación estándar y error estándar de la media.

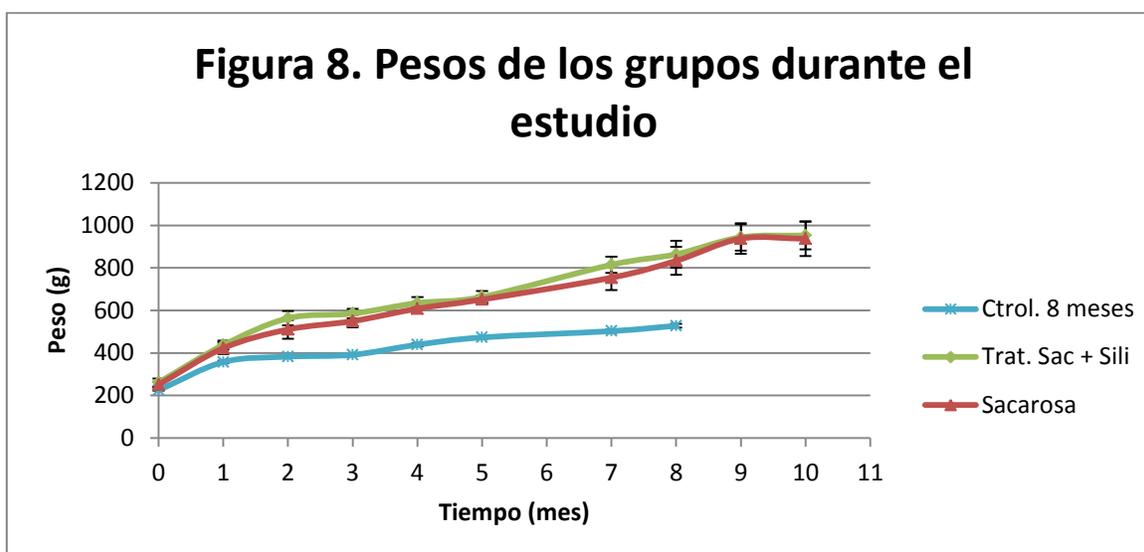


Figura 8. Gráfica del incremento de peso en gramos y del error estándar de la media de los tres grupos diferentes; control de 8 meses, el tratado con Sacarosa y el tratado con sacarosa más Silimarina; desde el comienzo del tratamiento hasta el final del mismo representado por mes.

En la gráfica se observa el aumento constante de peso en todos los grupos de estudio, es importante mencionar que la obesidad es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la resistencia a la insulina y para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. En la obesidad el tejido adiposo segrega cantidades elevadas de interleucina 6 (IL-6), resistina y TNF- α principalmente, que hacen que el tejido se vuelva resistente a la acción de la insulina. Se cree que el TNF- α induce un defecto en la capacidad de fosforilación de residuos de tirosina en el IRS-1, que es

necesaria para el progreso de la señal de la insulina y por tanto disminuye la expresión génica del transportador GLUT 4. (Rodríguez y cols, 2009)

6.3 Glucosa basal

La glucosa basal registrada durante los tratamientos se muestra en las siguientes tablas.

Tiempo (mes) /Rata	Glucosa en sangre (mg/dL)			Promedio		Desv. Est	EEM
	1A	2A	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	89	90	108	95.667	5.310	0.594	0.343
1	92	85	85	87.333	4.848	0.224	0.130
2	119	96	114	109.667	6.087	0.671	0.388
3	89	83	86	86.000	4.774	0.167	0.096
4	107	101	105	104.333	5.791	0.170	0.098
5	71	100	94	88.333	4.903	0.850	0.491
7	70	77	87	78.000	4.329	0.474	0.274
8	85	96	89	90.000	4.996	0.309	0.178

Tabla 18. Glucosa basal en mg/dL y mmol/L medida por 8 meses a las ratas pertenecientes al grupo control y la correspondiente desviación estándar y error estándar de la media por mes.

Tiempo (mes) /Rata	Glucosa en sangre (mg/dL)			Promedio		Desv. Est	EEM
	3V	4V	4A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	71	67	78	72.000	3.996	0.309	0.178
1	79	61	86	75.333	4.181	0.716	0.413
2	63	56	85	68.000	3.774	0.840	0.485
3	60	61	83	68.000	3.774	0.722	0.417
4	63	79	81	74.333	4.126	0.548	0.316
5	63	83	67	71.000	3.941	0.587	0.339
7	68	89	88	81.667	4.533	0.658	0.380
8	69	92	84	81.667	4.533	0.648	0.374
9	71	97	79	82.333	4.570	0.739	0.427
10	74	117	84	91.667	5.088	1.249	0.721

Tabla 19. Glucosa basal en mg/dL y mmol/L medida durante 10 meses a las ratas pertenecientes al grupo tratado con sacarosa y la correspondiente desviación estándar y error estándar de la media por mes.

TABLA 20. GLUCOSA BASAL MEDIDA CADA MES DEL GRUPO TRATADO CON SACAROSA + SILIMARINA DURANTE EL ESTUDIO

Tiempo (mes) /Rata	Glucosa en sangre (mg/dL)			Promedio		Desv. Est	EEM
	1R	5V	3A	(mg/dL)	(mmol/L)		
0	80	76	70	75.333	4.181	0.279	0.161
1	88	65	85	79.333	4.403	0.694	0.401
2	74	74	87	78.333	4.348	0.417	0.241
3	70	70	86	75.333	4.181	0.513	0.296
4	78	65	84	75.667	4.200	0.539	0.311
5	82	75	77	78.000	4.329	0.200	0.116
7	65	92	88	81.667	4.533	0.809	0.467
8	72	87	89	82.667	4.589	0.516	0.298
9	80	81	87	82.667	4.589	0.210	0.121
10	100	103	109	104.000	5.773	0.254	0.147

Tabla 20. Glucosa basal en mg/dL y mmol/L medida durante 10 meses a las ratas pertenecientes al grupo tratado con sacarosa más Silimarina y la correspondiente desviación estándar y error estándar de la media por mes.

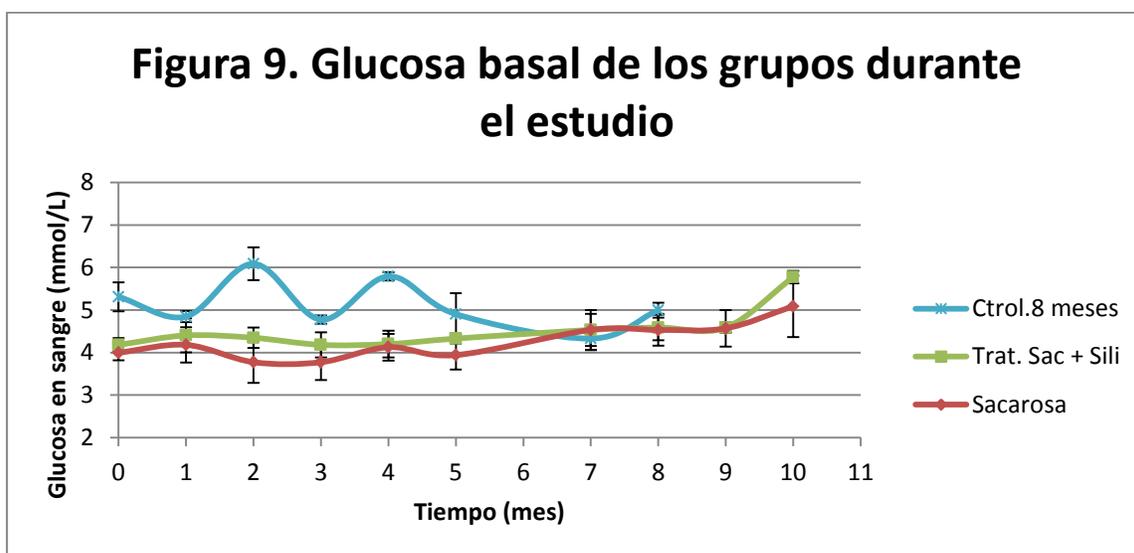


Figura 9. Grafica que representa los niveles de glucosa basales (mmol/L) y el error estándar de la media de los 3 grupos diferentes; Control de 8 meses, el tratado con sacarosa y sacarosa más Silimarina; durante el tratamiento representado por mes.

Para tener control y registro de la concentración de glucosa en sangre, se midió glucosa basal cada semana que para fines prácticos se promedió por mes en todos grupos durante el estudio, no hubo diferencias entre los grupos.

6.4 Estadística

Los resultados del análisis estadístico de los diferentes tratamientos se muestran a continuación.

Prueba T

Los resultados de la prueba T muestran que al comparar la concentración plasmática de glucosa (mmol/L) a tiempo 0 contra el tiempo 120' hubo significancia $p < 0.05$ ($p = 0.008$) en el grupo tratado con Sacarosa, esto quiere decir que la concentración de glucosa a las dos horas, posteriores a la administración de la dosis, no regresó al valor inicial (tiempo 0), mientras que en los grupos control sano, control 8 meses y Sacarosa más Silimarina no se observó significancia con ($p > 0.05$) $p = 0.803$, 0.460 y 0.147 respectivamente, ya que los valores obtenidos fueron muy semejantes a los valores iniciales (Figura 6).

ANOVA

Utilizando el análisis estadístico de ANOVA se obtuvo una significancia intergrupos (Control Sano, Control 8 meses, Sacarosa y Sacarosa + Silimarina) de $p < 0.001$. Posteriormente para conocer la diferencia honestamente significativa (HSD) intragrupo se realizó la prueba de Tukey.

TABLA 21. HSD DE TUKEY				
	Control Sano	Control 8 meses	Sacarosa	Sacarosa + Silimarina
Control Sano			*	
Control 8 Meses			*	
Sacarosa	*	*		*
Sacarosa + Silimarina			*	

*Grupos donde hubo significancia

En la Tabla 21 se puede observar que hubo diferencia significativa del grupo Sacarosa en comparación con los grupos Control Sano, Control 8 meses y Sacarosa + Silimarina. La concentración de glucosa en el grupo Sacarosa tratado con Silimarina, fue semejante a su valor inicial al finalizar la prueba de tolerancia a la glucosa (Figura 6). Lo que sugiere que la Silimarina disminuye los niveles de glucosa plasmática, debido a su efecto antioxidante y posible propiedad como regeneradora de células β del páncreas. (Vázquez Frías y cols, 2013), (Soto y cols, 2014). Mientras tanto las ratas que continuaron el tratamiento con Sacarosa permanecieron con niveles de glucosa elevados.

6.5 Prueba de inmunoensayo

A continuación se muestra el inmunoensayo de GLUT 4 de acuerdo a los diferentes tratamientos.

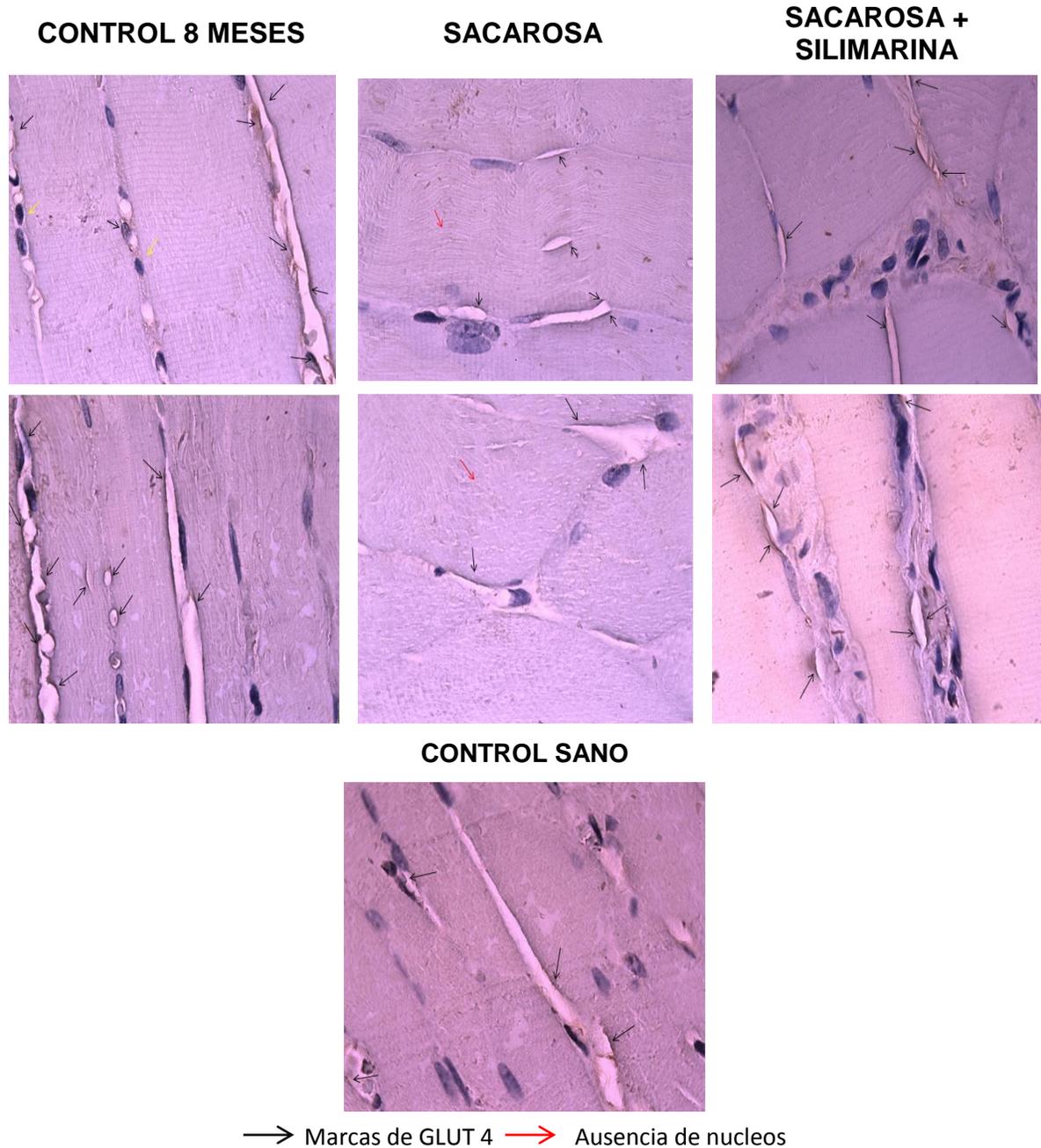


Figura 10. Inmunoensayo del transportador de glucosa GLUT 4 en músculo esquelético de ratas. Objetivo 100X. Se observa el aumento y disminución del número de transportadores en la membrana, en flechas color negro las marcas de GLUT 4 y en rojo la ausencia de núcleos en el tejido.

En el inmunoensayo de GLUT 4 en músculo esquelético todos los grupos presentaron coloración (café oscuro) producida por la unión de los anticuerpos al transportador (marcas) representadas por las flechas color negro. Por un lado del grupo control 8 meses se nota una distribución uniforme de las marcas de GLUT 4 en la membrana plasmática. En el grupo Sacarosa tratado con Silimarina se observa una mayor presencia de GLUT 4, e incluso una cantidad similar de núcleos como en los grupos Control, mientras que en el grupo no tratado (Sacarosa) se percibe lo contrario, una disminución tanto en el número de núcleos como en las marcas del transportador de glucosa en la membrana. Al haber disminución de la síntesis y actividad del transportador de glucosa GLUT 4 en el tejido muscular, un aumento en la vía de glucosamina y glicosilación de los transportadores, ocasionado por la hiperglucemia, se favorece en última instancia a la aparición de la intolerancia a la glucosa (Durruty & García de los Ríos, 2001) que es precedida por la intolerancia a la insulina, en la que al no haber respuesta a la insulina, no se lleva a cabo la translocación del transportador de vesículas intracelulares a la membrana plasmática, y por tanto se ve afectado el transporte de glucosa. (Gaster y cols, 2001)

6.6 Expresión génica

En la expresión génica del transportador de glucosa, GLUT 4 (medida como la relación de densitometría de GLUT 4 y el ribosomal 18S) se obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA 22. DENSITOMETRÍAS						
Grupo	Ribosomal 18S	GLUT 4	Rel. Densitométrica	Promedio	Desv. Est	EEM
Control Sano	40368.85	28398	7.035	7.037	1.441	0.832
Control Sano	35386.24	30005.05	8.479			
Control Sano	35941.24	20115.11	5.597			
Control 8 meses	22641.26	14758.55	6.518	5.832	0.896	0.517
Control 8 meses	29464.98	18145.02	6.158			
Control 8 meses	43507.08	20965.27	4.819			
Sacarosa	35711.64	17460.23	4.889	5.156	1.652	0.954
Sacarosa	16636.1	11520.53	6.925			
Sacarosa	27743.56	10138.15	3.654			
Sac + Sili	42819.32	28825.76	6.732	7.535	1.645	0.950
Sac + Sili	39986.29	37696.55	9.427			
Sac + Sili	39859.36	25696.73	6.447			

Tabla 22. Densitometría de las bandas de expresión génica del GLUT 4 en el músculo esquelético correspondientes a Control sano, control de 8 meses, al tratado con sacarosa y sacarosa más Silimarina, la desviación estándar y el error estándar de la media.

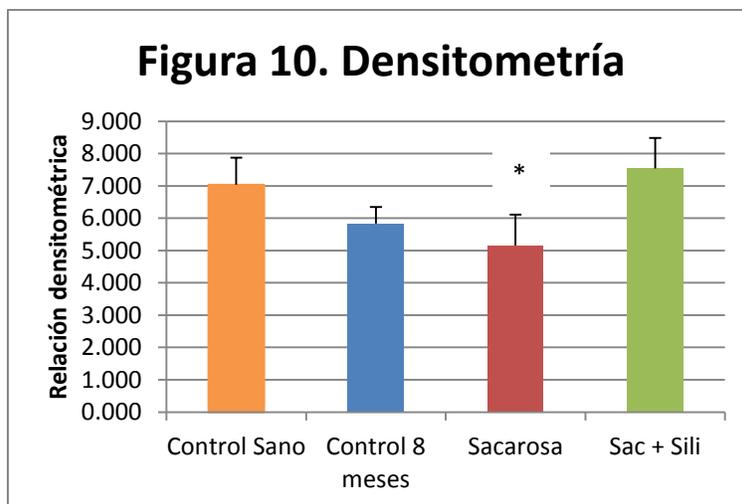


Figura 11. Grafica que representa la relación densitométrica y el error estándar de la media entre los distintos grupos tratados. * Significancia $p < 0.05$



Ilustración 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.7% de los productos de PCR de Glut 4 y ribosomal 18S en donde el No. de banda 4, 5 y 7 son Control Sano; 8, 9 y 10 son Control de 8 meses; 1, 2 y 12 son Tratadas con Sacarosa y 3,6 y 11 corresponden al tratamiento de Sacarosa mas Silimarina.

Por último los resultados de la densitometría en gel de agarosa de los productos de PCR indican que la expresión de GLUT 4 es consistente con el inmunoensayo.

Al comparar el grupo tratado con Silimarina con el grupo Control Sano no hay significancia $p > 0.05$ ($p = 0.341$) entre ellos, esto indica que puede haber igual o mayor expresión génica de GLUT 4 en el grupo tratado durante 12 semanas, lo que a su vez es favorable pues al incrementar la expresión de GLUT 4 mejora el metabolismo de la glucosa en las ratas y se plantea que si la Silimarina incrementa la expresión génica de la células β entonces hay un incremento de insulina en los niveles séricos, se inicia la unión de esta a su receptor y se desencadenan las señales que permiten que se lleve a cabo la translocación de los transportadores de glucosa a la membrana y se disminuya la glucemia.

Por el contrario, el grupo no tratado tuvo significancia $p < 0.05$ ($p = 0.008$) con respecto al grupo control, es decir que la expresión del transportador disminuyó notablemente como se observa en la figura 10 y 11. En una investigación realizada por Gaster Michael y colaboradores, encontraron que en efecto la cantidad de GLUT 4 en músculo esquelético disminuye en pacientes con Diabetes

Mellitus tipo 2 debido a que se reduce la sensibilidad de la insulina. (Gaster y cols, 2001)

En el caso del grupo Control de 8 meses y el grupo Control Sano no hubo significancia $p= 0.166$, aunque en la figura 11 se observa una disminución de la expresión de GLUT 4 en el grupo control de 8 meses.

7. CONCLUSIÓN

La expresión del transportador de glucosa GLUT 4 resulta disminuida en los animales no tratados, y elevada en los tratados, por tanto se sugiere que la Silimarina incrementa el número de GLUT 4 en las células del músculo esquelético, controla la intolerancia a la insulina y reduce el riesgo de aparición de diabetes mellitus.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ADA. (2008). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *American Diabetes Association*, S55-S60.
- American Diabetes Association. (2002, January). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes care*, 25, S5-S20.
- Artola, S., Mata-Cases, M., Escalada, J., Ezkurra-Loyola, P., & Ferrer-García, J. C. (2015). Consenso sobre la detección y el manejo de la prediabetes. Grupo de Trabajo de Consensos y Guías Clínicas de la Sociedad Española de Diabetes. (7):456-468(47).
- Carrasco, F., Galgani, J., & Reyes, M. (2013). Síndrome de resistencia a la insulina. Estudio y manejo. *Rev. Med. Clin. Condes*, 24(5), 827-837.
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15(3), 532-537.
- Cipriani Thorne, E., & Quintanilla, A. (2010, Jul). Diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. *Revista Médica Herediana*, 21(3), 160-171.
- De Solís, A. (2011). *ACCIÓN DE LA INSULINA EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE LA RATA WISTAR: Efecto del envejecimiento, la restricción calórica y la leptina en la rata Wistar*. Madrid: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM).
- Durruty, P., & García de los Ríos, M. (2001, Junio). Glucose and lipid toxicity in the pathogenesis and evolution of type 2 diabetes. *Revista médica de Chile*, 129(6), 671-679.
- G. Gardner, D., & Shoback, D. (2012). *Greenspan. Endocrinología básica y clínica* (Novena ed.). California: McGraw Hill.
- Gaster, M., Staehr, P., Beck Nielsen, H., Schrøder, H., & Handberg, A. (2001, Junio). GLUT4 Is Reduced in Slow Muscle Fibers of Type 2 Diabetic Patients Is Insulin Resistance in Type 2 Diabetes a Slow, Type 1 Fiber Disease? *Diabetes. American Diabetes Association*, 50(6), 1324-1329.
- Gómez Zorita, S., & Urdampilleta, A. (2012). El GLUT 4: Efectos de la actividad física y aspectos nutricionales en los mecanismos de captación de glucosa y sus aplicaciones en la diabetes tipo 2. *Avances en Diabetología*, 28(1), 19-26.
- Guo, S. (2014, Jan 8). Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *J Endocrinol*, 1-36.
- Hernández González, G., Camacho Reynoso, R., Castro Rosas, J., & Gómez Aldapa, C. (2007). Evaluación del efecto antihiper glucémico del bagazo de naranja (*Citrus sinensis* var. Valencia) en estudios in vivo. *Revista de Salud Pública y Nutrición*(12), 730-737.
- Huasheng, L., Nie, L., Zhenzhen, X., Huanhuan, W., & Hua, Z. (2015, Jul). Association between the level of circulating adiponectin and prediabetes: A meta-analysis. *J Diabetes Investig*, 6(4), 416-429.

- Huseini, F., Larijani, B., Heshmat, R., Fakhrzadeh, H., Radjabipour, B., Toliat, T., et al. (2006). The efficacy of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytotherapy Research*, 20(12), 1036-1039.
- Manning, B., & Cantley, L. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, 1261-1274.
- Martínez, M. (2000). Hipoglucemias de etiología metabólica. *Anales Españoles de Pediatría*, 52(1), 1-9.
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., Rodwell, V., & Weil, A. (2013). *Harper. Bioquímica ilustrada* (29 ed.). McGraw Hill.
- Nathan, D., Davidson, M., DeFronzo, R., Heine, R., Henry, R., Pratley, R., et al. (2007, Marzo). Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance. Implications for care. *Diabetes Care*, 30(3), 753-759.
- Oliart, R., Angulo, O., & Torres, E. (1998). Insulina: su gen y su mecanismo de acción molecular. *BEB*, (2); 79-85(17), 78-85.
- Olivares Reyes, J. A., & Arellano Plancarte, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB*, 27(1), 9-18.
- OMS. (2013). *Diabetes*.
- Panduro, A. (2012). *Biología molecular en la clínica* (Segunda ed.). México: McGraw Hill.
- Polyak, S., Morishima, C., Lohmann, V., Pal, S., Lee, D., Liu, Y., et al. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *PNAS*, 107(13), 5995-5999.
- Rodríguez, E., Perea, J., López Sobaler, A., & Ortega, R. (2009). Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutrición Hospitalaria*, 24(4), 415-421.
- Ros, P., Colino-Alcola, E., Grasso, V., Barbetti, F., & Argente, J. (2014). Síndrome de insulinoresistencia severa tipo A debido a mutación del gen del receptor de insulina. 1(82).
- Soto, C., Mena, R., Luna, J., Cerbón, M., Larrieta, E., Vital, P., et al. (2004). Silymarin induces recovery of pancreatic function after. *Life Sciences*, 75(18), 2167-2180.
- Soto, C., Raya, L., Pérez, J., González, I., & Pérez, S. (2014). Silymarin Induces Expression of Pancreatic Nkx6.1 Transcription Factor and β Cells Neogenesis in a. *Molecules*, 19(4), 4654-4668.
- Trujillo Arriaga, H. (2007). *La curva de tolerancia a la glucosa oral. Un enfoque alternativo*. México D.F.: UAM-I.
- Tuomilehto, J., Lindström, J., Eriksson, J., Valle, T., Hämäläinen, H., Ilanne-Parikka, P., et al. (2001, May 3). Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 1343-1350.

- Vázquez Frías, R., Reyes García, J. G., Fernández del Valle Laisequilla, C., Anaya Reyes, M., & Rizzoli Córdoba, A. (2013). Silimarina, ácido alfa-lipoico y seleniometionina en el tratamiento de hígado graso: revisión sistemática de la literatura. *Anales Médicos. Asociación medica Centro Medico ABC*, 58(1), 37-46.
- Wang, J., Liu, B., Han, H., Yuan, Q., Xue, M., Xu, F., et al. (2015, Feb 23). Acute Hepatic Insulin Resistance Contributes to Hyperglycemia in Rats Following Myocardial Infarction. *Molecular Medicine*, 21(1), 68-76.
- Wasserman , D., Kang, L., Ayala, J., Fueger, P., & Lee Young, R. (2011). The physiological regulation of glucose flux into muscle in vivo. *Exp Biol*, 214(2), 254-262.