

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**Efecto de la glicina y *Cucurbita ficifolia* Bouché
sobre la glicación de proteínas**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestro en Biología Experimental

Presenta:

Biol. Exp. Noe Salinas Arreortua

Co-director de tesis: José Luis Gómez Olivares

Co-director de tesis: Francisco Javier Alarcón Aguilar

Asesor: Genoveva Durán Reyes

México, D. F.

Junio 2009

Comité Tutorial

Co-Director: José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Co-Director: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud. D.C.B.S.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

Asesora: Dra. Genoveva Durán Reyes

Investigadora de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Hospital de Especialidades
CMN SXXI, IMSS

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacología y el Laboratorio de Biomembranas del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en colaboración con la U.I.M. en Bioquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa está evaluada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACYT, con número de registro UAM-I: 309-0 y con clave: C/PFPN-2002-35-32.

Este trabajo se llevó a cabo parcialmente con los recursos del CONACYT bajo el programa de Apoyo Complementario a investigadores en Proceso de Consolidación (APOY-COMPL-2008, convenio 90213).

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo proporcionado por el CONACYT a través de la beca con número de registro 204771.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Efecto de la glicina y *Cucurbita ficifolia* Bouché sobre la glicación de proteínas”.

Jurado de Examen

Presidente

Dr. Rubén Román Ramos

Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Secretario

Dra. Genoveva Durán Reyes

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Vocal

Dra. Margarita Díaz Flores

Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

Vocal

Dra. Rocío Salceda Sacanelles

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México

*A mis "viejos" ejemplo de
Bondad, generosidad,
y dedicación
a sus hijos*

AGRADECIMIENTOS

A mi amorosa Gisela, mi compañera.

A mis queridos hermanos Eyra, Anuar y Luis Alberto por su incondicional apoyo.

Al Dr. Jose Luis Gómez Olivares, por aceptarme en su laboratorio brindandome sus conocimientos y consejos en cualquier momento de la vida.

Al Dr. Francisco Javier Alarcón por su gran apoyo en estos últimos años y su gran labor como tutor y ejemplo.

A mi primer asesor y amigo Dr. Antonio Serratos Hernández.

Y a todos mis familiares, compañeros y amigos que me han apoyado en la realización de este proyecto. Su simple enumeración no expresaría mi gratitud.

Y..... recordando que la gratitud es la memoria del corazón.

Índice general	pág.
1 Introducción	14
1.1 Incidencia y mortalidad de diabetes mellitus (DM) en México	14
1.2 Definición de la DM	14
1.3 Clasificación y diagnóstico de la DM	15
1.4 Complicaciones crónicas de la DM	18
2 Glicación de proteínas durante la DM	22
2.1 Generación de productos de Amadori	22
2.2 Etapas reversibles del proceso de glicación	24
2.3 Etapa final en la formación de AGEs	24
2.4 Consecuencias de la glicación sobre la actividad biológica de las proteínas	25
2.5 Proteínas glicadas en la DM	27
2.5.1 Hemoglobina glicada	28
2.5.2 Albúmina glicada	29
2.5.3 Colinesterasas y su posible glicación	30
3 Propiedades estructurales y fisiológicas de la glicina	32
4 Uso de las plantas medicinales en el tratamiento de la DM	36
4.1 <i>Cucurbita ficifolia Bouché</i> (chilacayote) y su empleo tradicional en el control de la DM	37
5 Justificación	39
6 Hipótesis	40
7 Objetivo general	40
7.1 Objetivo particulares	40
8 Material y Métodos	42

8.1	Material vegetal y preparación del extracto hipoglucemiante de <i>Cucurbita ficifolia</i>	43
8.2	Animales de experimentación	43
9	Diseño experimental	43
9.1	Diabetes experimental	43
10	Curva de tolerancia a la glucosa y determinación de parámetros Bioquímicos	45
10.1	Registro de parámetros	45
10.2	Análisis estadístico	46
10	Resultados	47
10.1	Prueba de Tolerancia a la glucosa en animales sanos bajo tratamientos	47
10.2	Parámetros bioquímicos y actividades de GOT y GTP en animales sanos	49
10.3	Consumo de líquidos	51
10.4	Diabetes Experimental	52
10.5	Perfil Bioquímico y fisiológico de los animales diabéticos	54
10.6	Peso corporal, consumo de alimento y líquidos en ratones diabéticos	54
10.7	Consumo de líquidos en ratones diabéticos	55
11	Efecto de los tratamientos de <i>C. ficifolia</i> y glicina sobre la glicación de la hemoglobina	55
11.1	Correlación entre glucemia y hemoglobina glicada	56
12	Efecto de los tratamientos de <i>C. ficifolia</i> y glicina sobre la glicación de la albúmina sérica	57

13	Efecto de los tratamientos de <i>C. ficifolia</i> y glicina sobre la actividad específica de las colinesterasas	60
13.1	Efecto de los tratamientos de <i>C. ficifolia</i> y glicina sobre la glicación de las colinesterasas	61
14	Discusión	63
15	Conclusiones	72
16	Bibliografía	73

Anexo

1.	Descripción de las técnicas del estudio bioquímico	82
1.1	Cuantificación de triglicéridos	82
1.2	Cuantificación de colesterol	82
1.3	Cuantificación de las enzimas hepáticas: transaminasas glutámico oxaloacética (GOT) y glutámico pirúvica (GPT)	83
2	Cuantificación de hemoglobina glicada	83
3	Cuantificación de albúmina glicada	84
3.1	Cuantificación de albúmina sérica por el método de cresolsulfonftaleína (verde de bromocresol)	85
3.2	Determinación del contenido de proteínas séricas totales	86
4	Estimación de la actividad colinesterásica en suero de ratones sanos y diabéticos	87
4.1	Medida de la actividad colinesterásica en espectrofotómetro	87
4.2	Determinación de actividad colinesterásica en microplaca de titulación	88
5	Cromatografía de afinidad con matriz de ácido borónico	89

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia crónica, debido a disminución en la secreción y/o actividad de la insulina, hormona liberada por las células β del páncreas. Durante los períodos de hiperglucemia, las hexosas reaccionan con las proteínas, formando productos de glicación avanzada (AGEs), favoreciendo el desarrollo de complicaciones patológicas que comprometen la salud del individuo y aceleran el proceso de envejecimiento. Como una consecuencia directa de la glicación, se afecta la actividad biológica de diversas proteínas fisiológicamente importantes. Debido al impacto negativo sobre la calidad de vida del paciente con DM, se ha hecho necesario contar con alternativas que impidan directamente la glicación de proteínas, que sería de gran ayuda para tratar de prevenir el desarrollo de dichas complicaciones. Estudios recientes en animales de laboratorio y pacientes diabéticos indican que la ingesta de glicina reduce los niveles de hemoglobina glicada (A1C). Asimismo, la población también utiliza numerosas plantas medicinales para el control de la DM. Una de ellas es *Cucurbita ficifolia*, popularmente conocida como chilacayote y cuyos frutos son comestibles. Se ha demostrado experimental y clínicamente que el fruto de esta planta tiene efecto hipoglucémico a través de la estimulación en la secreción de insulina, con un consiguiente descenso en los niveles de la hemoglobina glicada. A pesar de que estas alternativas, glicina y *C. ficifolia*, potencialmente podrían reducir la glicación de otras proteínas, hasta ahora no se han realizado estudios al respecto.

El objetivo de la presente investigación consistió en determinar el efecto de la administración diaria de la glicina y de un extracto acuoso de *C. ficifolia* sobre la glicación de proteínas (hemoglobina, albúmina y colinesterasas) en ratones sanos y ratones con diabetes experimental inducida por la administración intraperitoneal de estreptozotocina. Se trabajó con ratones machos de la cepa CD-1. Se formaron 3 grupos de animales sanos y 3 de animales diabéticos (n=5), los cuales recibieron los siguientes tratamientos durante

71 y 21 días, respectivamente: Grupo 1 control; Grupo 2 glicina (0.1 g/kg); Grupo 3 *C. ficifolia* (0.65 mg/kg). Se midió consumo de alimento y agua, peso corporal, glucemia con y sin alimento, triglicéridos, colesterol, actividad de transaminasas glutámico oxalacética (GOT) y pirúvica (GPT); se realizó una curva de tolerancia a la glucosa oral en ratones sanos y se midieron los niveles de glicación en hemoglobina, albúmina y colinesterasas.

Los resultados en ratones sanos mostraron que ambos tratamientos redujeron la glucemia durante la prueba de tolerancia a la glucosa. En el caso del extracto, su administración produjo una disminución del 1.1% en los niveles de hemoglobina glicada. Por su parte, en los animales diabéticos tratados con glicina se observó una reducción del 1.3% en los niveles de albúmina glicada. En el caso del índice de glicación de las colinesterasas, en los ratones diabéticos tratados se presentó un aumento de la glicación por los diferentes tratamientos en la acetilcolinesterasa, mas no en la butirilcolinesterasa. Finalmente, los ratones tratados mostraron cambios significativos en la actividad de ambas colinesterasas. Por lo tanto, los tratamientos con extracto de *C. ficifolia* y glicina alteran la glicación de diferentes tipos de proteínas.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by chronic hyperglycemia, which is due to decreased secretion and/or activity of insulin, the hormone released by pancreatic β cells. During periods of hyperglycaemia, the hexoses react with proteins to form advanced glycation products (AGES), favoring the development of pathologic complications that jeopardize the health of individuals and accelerate the aging process. As a direct consequence of glycation, the biological activity of various physiologically important proteins is affected. Due to the negative impact of DM on quality of life of the patients, it is necessary to have alternatives that directly avoid the glycation of proteins. These alternatives would be helpful to prevent the development of such complications.

Recent studies in laboratory animals and diabetic patients indicate that the intake of glycine reduces the levels of glycated hemoglobin (A1c). Furthermore, some people in Mexico also use medicinal plants for DM control. One of them is *Cucurbita ficifolia*, popularly known as “chilacayote” and whose fruits are edible. It has been experimentally and clinically demonstrated that the fruit of this plant has hypoglycaemic effect through stimulating the secretion of insulin, consequently reducing levels of glycated hemoglobin. Although glycine and *C. ficifolia* represent alternatives that potentially could reduce the glycation of other proteins, studies conducted about this have not yet been performed.

The objective of this research was to determine the effect of the daily administration of glycine and an aqueous extract of *C. ficifolia* on the glycation of proteins (hemoglobin, albumin and cholinesterases) in normal and diabetic mice.

Male mice of strain CD-1 were used. Three groups were formed of healthy animals and other of diabetic animals (n = 5), which received the following treatments for 71 and 21 days, respectively: Group 1: control, Group 2 glycine (0.1 g / kg), Group 3 *C. ficifolia* (0.65

mg/kg). Glucose was measured with and without food. In addition, triglycerides, cholesterol, and the activity of glutamic oxalacetic and pyruvic transaminases activities (GOT and GPT, respectively) were determined. Curves of oral glucose tolerance in healthy mice were also performed. The level of glycation in hemoglobin, albumin and cholinesterase were finally registered. Results in healthy mice showed that both treatments reduced blood glucose in a glucose tolerance curve. In diabetic animals treated with glycine it was shown that there was a 1.3% of reduction in levels of glycated albumin. In the case of the extract, its administration resulted in a 1.1% decrease in glycated hemoglobin levels. The glycation index on cholinesterases in the treated diabetic mice indicated an elevation in the glycation of acetylcholinesterase but no in butyrylcholinesterase. Finally, mice showed significant changes in the activity of cholinesterases with both treatments. Therefore, both treatments (*C. ficifolia* and glycine) impaired the glycation of different proteins.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Incidencia y mortalidad de diabetes mellitus en México

Los cambios en la forma de vida de las personas durante el siglo pasado han dado lugar a un aumento dramático en la incidencia de la DM en todo el mundo, mismo que se ha relacionado a factores genéticos, estilo de vida y alimentación en calidad y cantidad (Zimmet *et al.*, 2001).

México está considerado entre los 10 países con mayor incidencia y prevalencia de la DM. Esta enfermedad crónico-degenerativa en 2006 afectó a cerca del 10% de la población de nuestro país y actualmente constituye la segunda causa de mortalidad (King *et al.*, 1998; Carvajal *et al.*, 2007). Como consecuencia, los costos en servicios médicos asociados al tratamiento epidemiológico de la DM y sus complicaciones actualmente representan una gran carga para los servicios de salud y para los pacientes (Gómez *et al.*, 2004).

Las principales causas de muerte por diabetes son las enfermedades cardiaca (en el 50% de los casos), cerebro-vascular (12%) y renal (10%). En conjunto, las enfermedades vasculares producen la muerte de casi el 72% de los diabéticos. En el resto de los casos, el 10% fallece por cáncer, el 6% por infecciones respiratorias y renales, el 1% por coma diabético y el 11% por otras causas (Fernández *et al.*, 2007).

1.2. Definición de la diabetes mellitus

La DM es un grupo de enfermedades metabólicas que se caracteriza por una hiperglucemia crónica que obedece al déficit en la secreción y/o actividad de la insulina, hormona liberada por las células β del páncreas. La hiperglucemia sostenida se manifiesta a través de varios síntomas y signos característicos, como son: polidipsia, polifagia, poliuria, glucosuria, astenia, pérdida de peso, cetonemia y cetonuria, principalmente (Committee Report, 2008).

A largo plazo, los pacientes con DM desarrollan enfermedades incapacitantes que si no son tratadas convenientemente, pueden llevar a la pérdida de un órgano o parte de un miembro, o poner en riesgo su vida. Estas enfermedades incapacitantes, conocidas en conjunto como complicaciones agudas y crónicas de la DM, son las principales causas de la invalidez y la mortalidad de los pacientes con diabetes, y son: coma cetoacidótico o diabético, coma hiperosmolar, coma hipoglucémico, nefropatía, neuropatía, retinopatía, enfermedad cardíaca, arterial cerebral, gangrena e infecciones recurrentes (Committee Report, 2008).

1.3. Clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus

Actualmente los criterios de clasificación se basan en la evidencia etiológica. La clasificación de DM incluye cuatro clases clínicas:

1. DM tipo 1, normalmente de inicio inesperado en la niñez o juventud. Menos del 10% de los pacientes con DM caen dentro de esta categoría. Los pacientes carecen de insulina endógena y presentan tendencia a la cetoacidosis y otras complicaciones agudas y crónicas.
2. DM tipo 2, de inicio lento que se manifiesta principalmente en la edad adulta. En este tipo de diabetes cae aproximadamente el 90% de los casos diagnosticados. El páncreas de estos pacientes genera y libera insulina, pero ésta resulta insuficiente, ya sea, por déficit en su secreción y/o resistencia a la acción de esta hormona.
3. Otros tipos de diabetes, entre los que se encuentran: defectos genéticos de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas, diabetes inducida por medicamentos o debido a otros síndromes (Down, Klinefelter, Cushing, Turner, entre otros.) (Elizalde, 2003).

4. DM gestacional (DMG), se manifiesta durante el embarazo, presenta una prevalencia que oscila del 1 al 14%, dependiendo de la población estudiada y representa cerca del 90% de todos los embarazos complicados por diabetes. Las pacientes que han sido diagnosticadas con DMG pueden o no llegar a desarrollar diabetes o intolerancia a la glucosa después del parto, aunque la mayoría regresa a la normalidad (Committee Report, 2008).

En cuanto a los criterios para realizar un diagnóstico fiable de la DM, en 1998 las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud coincidieron en que el nivel de glucosa sanguínea en ayuno deben ser igual o mayor a 126 mg/dl; y durante una curva de tolerancia a la glucosa oral (CTGO), el valor no debe de sobrepasar los 200 mg/dl a las 2 horas de iniciada la prueba (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios para diagnosticar DM

<p>1. Síntomas de diabetes con concentración casual de glucosa en plasma mayor de 200 mg/dL (11 mmol/L). Casual es definido como cualquier día sin tomar en cuenta el tiempo de la última comida. Los síntomas clásicos de diabetes incluyen poliuria, polidipsia y pérdida del peso inexplicable.</p> <p>2. Glucosa plasmática en ayuno igual o mayor a 126 mg/dl (7 mmol/l). Ayuno se define como: ninguna toma calórica, por lo menos 8 h antes.</p> <p>3. Glucosa en plasma durante una curva de tolerancia a glucosa a las 2 h de 200 mg/dl (11 mmol/l). La prueba se debe realizar como describe la OMS; esto es, realizar la CTG usando una carga de glucosa equivalente a 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua.</p>
--

(Committee Report, 2000; Committee Report, 2008)

También, se ha propuesto una nueva categoría de alteración en el metabolismo de la glucosa: variación en la concentración de glucosa en ayuno (IFG, *Impaired Fasting Glucosa*), la cual se considera intermedia entre la tolerancia normal y un posible diagnóstico de diabetes o intolerancia a glucosa. La IFG se define como glucosa plasmática en ayuno ≥ 110 mg/dl pero \leq de 126 mg/dl (Tabla 2).

Cabe señalar, que se eligió una glucosa de ayuno de 109 como el límite superior normal, por ser la concentración a partir de la cual se pierde la primera fase de secreción de insulina en respuesta a la administración de una carga intravenosa de glucosa y se asocia con un riesgo de progresión a daño micro- y macrovascular.

A pesar de lo anterior, el informe del Comité de Expertos sobre el Diagnóstico y la Clasificación de la Diabetes en los Estados Unidos de Norte América (ADA) de noviembre de 2003, recomienda la disminución de estos puntos de corte para la glucemia en ayuno en los siguientes niveles: ≥ 110 mg/dl y ≤ 100 mg/dl. Por lo tanto, en función de las cifras basales de glucemia, se consideran las categorías que se en listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Alteración de la glucosa en ayunas

Glucosa plasmática en ayunas inferior a 100 mg/dl	Glucemia en ayunas normal
Glucosa plasmática en ayunas entre 100 y 126 mg/dl	Deterioro de la glucemia en ayunas
Glucosa plasmática en ayunas igual o superior a 126 mg/dl	Diabetes mellitus*

*En los casos en los que se diagnostique provisionalmente DM, se debe proceder a su confirmación (Committee Report, 2000; Committee Report, 2008).

En cuanto al deterioro de la tolerancia a la glucosa se consideran las categorías de la Tabla 3.

Tabla 3. Deterioro de la tolerancia a la glucosa oral.

Glucemia a las 2 h postcarga de glucosa <140 mg/dl	Tolerancia normal a la glucosa
Glucemia a las 2 h postcarga de glucosa > 140 mg/dl e inferior a 200 mg/dl	Intolerancia a la glucosa
Glucemia a las 2 h post carga de glucosa > 200 mg/dl	Diabetes mellitus*

*En los casos en los que se diagnostica provisionalmente una DM, se debe proceder a su confirmación (Committee Report, 2000; Committee Report, 2008).

1.4. Complicaciones crónicas de la DM

En la actualidad, las complicaciones agudas ocasionadas por la DM han dejado de ser causa de muerte. Por lo que el enfermo con DM tipo 2 tiene una mayor expectativa de vida. No obstante, debe enfrentarse a las complicaciones crónicas de la enfermedad. En muchas ocasiones al paciente diabético se le identifica sólo cuando manifiesta alguna complicación crónica de la enfermedad. Dichas complicaciones, se clasifican dependiendo si afectan a los vasos capilares sanguíneos, pequeños o de mayor calibre y se denominan como micro- y macrovasculares, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Clasificación de las complicaciones de la DM.

TIPO DE COMPLICACIONES	DAÑO INDUCIDO
Microangiopática	Afectando la circulación en los vasos de pequeño calibre (retinopatía, neuropatía y nefropatía).
Macroangiopática	Equivalente a la aterosclerosis y afecta a los vasos de mayor calibre. (Enfermedad cardíaca, arterial cerebral y amputaciones).

Las complicaciones microvasculares se relacionan principalmente con daño al endotelio y músculo liso de microvasculatura y se manifiesta como retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética (Díaz *et al.*, 2004).

En tanto que las complicaciones macrovasculares son las más comunes en la DM tipo 2, donde se incluye a un grupo de trastornos que se caracterizan por aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón en todas sus modalidades, representando una de las principales causas de muerte en el paciente diabético.

La macroangiopatía diabética se refiere a las lesiones secundarias debidas a un proceso de ateromatosis que no son específicas de la DM. Sin embargo, en los pacientes diabéticos se presentan con mayor frecuencia, evolucionan con más rapidez y tienen características particulares. La lesión fundamental es la placa de ateroma, que si bien puede afectar a todo el organismo, tiene una especial predilección por las extremidades inferiores, donde se manifiesta como claudicación intermitente, atrofia muscular y cutánea, úlceras y gangrena. Cuando las lesiones ocurren en las arterias coronarias puede dar lugar a una angina de pecho o a un infarto al miocardio; si afectan la circulación cerebral pueden producir episodios de trombosis (Elizalde, 2003).

La retinopatía diabética constituye una complicación microangiopática crónica frecuente en el contexto de la DM y con una importante repercusión en el ámbito higiénico y de salud. Sin embargo, y a pesar de que sea la principal causa de ceguera de los pacientes, la retinopatía no representa la única alteración ocular relacionada con la enfermedad. La denominada diabetes ocular incluye otras manifestaciones clínicas que pueden comprometer a diversas estructuras oculares, como por ejemplo: córnea, cristalino, iris y pupila (Zacarías *et al.*, 2004).

La nefropatía por DM es la tercera causa de insuficiencia renal terminal. La nefropatía clínica ocurre en el 30 al 40% de los casos con DM tipo 1 y es más frecuente si la enfermedad comienza antes de los 20 años. En la diabetes tipo 2 la frecuencia varía entre el 5 y el 16%. Por razones no bien conocidas, sólo determinados pacientes son susceptibles de complicaciones renales, que ocurren relativamente pronto en el curso de la diabetes y la incidencia aumenta anualmente a partir de los 10 años de padecerla (incidencia acumulada: 46% en varones y 32% en mujeres), hasta alcanzar un máximo alrededor de los 25 años de evolución.

La primera manifestación de la nefropatía diabética es la proteinuria, que al principio puede ser intermitente. La nefropatía diabética propiamente dicha se define por la presencia de proteinuria persistente (superior a 300-500 mg/24 h), que es precedida por una larga fase de microalbuminuria, que constituye un factor pronóstico de aparición de la enfermedad, de modo que cuando la microalbuminuria es superior a 20 ó 30 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ se debe someter al paciente a una vigilancia estrecha (Iglesias *et al.*, 2003).

Otro tipo de complicación es la neuropatía diabética, que principalmente se refiere a la afectación de las fibras nerviosas. Ésta es un hecho frecuente en la DM, a diferencia de otras complicaciones, no guarda relación estricta con el tiempo de evolución, de modo que en ocasiones puede aparecer poco después del diagnóstico de DM. Las lesiones no son siempre irreversibles y los síntomas pueden desaparecer. Se distinguen dos formas principales: neuropatía periférica y autónoma (Zacarías *et al.*, 2004).

A partir de lo descrito en párrafos anteriores, es claro que las causas de muerte e invalidez debidas a la diabetes son consecuencia del desarrollo de estas complicaciones. Asimismo, cabe señalar que se presentan de manera natural con el envejecimiento. Sin embargo, en la DM se desarrollan prematuramente, aunque los mecanismos bioquímico y moleculares que explican los daños ocasionados son prácticamente los mismos (Carvajal *et al.*, 2007).

En la evolución de estas complicaciones, la hiperglucemia y la resistencia a la insulina contribuyen de manera importante a los desórdenes vasculares y neurológicos a través de alteraciones en la vía del poliol, la vía de hexosamina, activación de la proteína cinasa C y acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs, *Advanced Glycation Elements*), lo cual resulta en generación de estrés oxidante. Dichos eventos son los principales responsables de los daños vasculares, neurológicos e inmunológicos que conducen al desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM (Huebschmann *et al.*, 2006; Lapolla *et al.*, 2007). Así, la glicación proteínica debida a hiperglucemia representa un campo de estudio interesante en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para la prevención de la morbilidad de la diabetes.

2. GLICACIÓN DE PROTEINAS DURANTE LA DM

2.1. Generación de productos Amadori

La glucosa es el monosacárido reductor más abundante en el organismo. Su concentración en la sangre está sometida a un cuidadoso mecanismo de regulación en individuos sanos. Sin embargo, en personas con hiperglucemia estos mecanismos se encuentran alterados, llevando a un aumento considerable en la formación de productos Amadori.

En 1912, Louis-Camille Maillard fue el primero en señalar en la patología humana, la importancia de las modificaciones de las proteínas inducidas por carbohidratos. Tales modificaciones estructurales durante la hiperglucemia crónica son causadas por la interacción de la glucosa y de otros carbohidratos (como la fructosa y la glucosa-6-fosfato o sus derivados) que posean un grupo carbonilo libre que puedan reaccionar con los grupos amino primarios con las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Figura 1)(Henle, 2005). Para formar bases de Schiff, productos de Amadori y finalmente los compuestos de carácter irreversible denominados AGEs (Gugliucci, 2000; Brownlee, 2001).

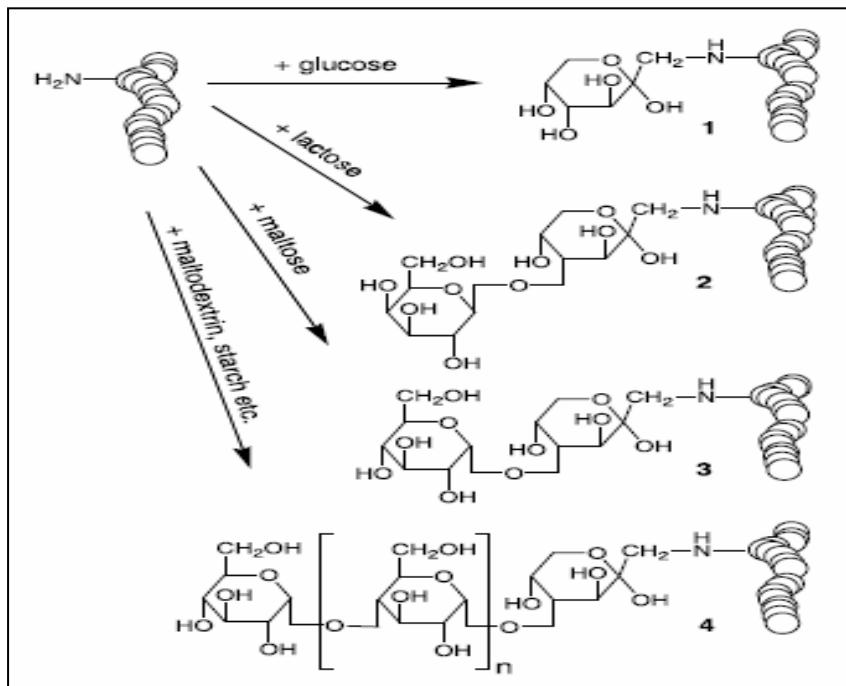


Figura 1. Formación de productos Amadori (aminocetosos) desde la reacción de unión de la proteína con diferentes azúcares para la formación de: 1. N-ε-fructosilina, 2. N-ε-lactosilina, 3. N-ε-maltosilina, maltodextrina) (tomado de Henle, 2005).

Este proceso conocido como glicación, está asociado con el “envejecimiento” acelerado en la diabetes y se inicia con la reacción entre los grupos carbonilos de los carbohidratos y los grupos amino de las proteínas, en especial con el amino terminal y el ϵ -amino de residuos de lisina, dando origen a los productos tempranos de glicación, también llamados de Amadori o fructosamina. A partir de ellos, y por cambios, transposiciones moleculares y oxidaciones, se forman compuestos α -dicarbonilos (α -oxoaldehídos), como la 3-desoxiglucosona, el metilglioxal y el glioxal, conocidos como precursores de los AGEs; que son más reactivos que sus predecesores y, al combinarse simultáneamente con los grupos reactivos de las proteínas, forman entre ellas puentes cruzados muy estables, conduciendo a su agregación y la pérdida de sus funciones biológicas.

Cabe señalar que las proteínas ricas en aminoácidos básicos (L-lisina y L-arginina) son especialmente susceptibles a la glicación (Díaz *et al.*, 2004; Carvajal *et al.*, 2007). Sin embargo, no todos los grupos amino son capaces de reaccionar con el grupo carbonilo de los azúcares, debido a que pueden estar ocultos en la estructura tridimensional de la proteína y las moléculas de los azúcares no tienen acceso a ellos. Por otra parte, el sitio de la proteína donde se encuentra cada grupo determina localmente su basicidad. Esto es, su capacidad para reaccionar a través de su par de electrones libres. Cuanto más básico es un grupo amino más fácilmente reaccionará con el grupo carbonilo de los azúcares. Ambos factores descritos determinan cuándo una proteína reacciona con un azúcar, aunque en el caso de las proteínas sólo algunas de las cadenas laterales de sus residuos de lisina, arginina y cisteína participarán directamente en la reacción (González *et al.*, 2000).

2.2. Etapas reversibles del proceso de glicación

La base de Schiff, inicialmente formada cuando reacciona un azúcar reductor con una proteína, resulta de la adición del grupo amino de la proteína al grupo carbonilo del azúcar. Esta molécula es sólo estable por un corto tiempo, debido a que inicia un proceso de reordenamiento de los enlaces químicos, que da lugar a un producto más estable denominado genéricamente producto de Amadori. Dicho producto aún posee un grupo carbonilo con capacidad de reaccionar con grupos amino primarios accesibles y, al igual que lo que ocurría con los azúcares, estabiliza su estructura a través de equilibrios entre una forma abierta y por lo menos dos anómeros cíclicos (Katchalsky-Sharon *et al.*, 1953).

Una vez que el azúcar reductor se pone en contacto con los grupos amino primarios de las proteínas, la formación de la base de Schiff transcurre rápidamente y alcanza el equilibrio termodinámico en unas pocas horas. En tanto que para los productos de Amadori, el equilibrio termodinámico se alcanza entre las 2 y las 4 semanas (Cerami *et al.*, 1987). El hecho de que ambas reacciones sean reversibles y consecutivas determina que, de acuerdo al tiempo de evolución, habrá predominio de la base de Schiff (horas) o del producto de Amadori (días). La interrupción del contacto de la glucosa con la proteína en cualquiera de estas etapas produce la reversión completa del efecto (Henle, 2005).

2.3. Etapa final en la formación de AGEs

Los productos Amadori poseen un grupo carbonilo que puede reaccionar con facilidad con otros grupos amino. El mecanismo de estas reacciones no se conoce con detalle, aunque se sabe que es un proceso que involucra complejos reordenamientos moleculares y, en algunos casos, la asociación entre varios de estos compuestos. En esta etapa, también se forman compuestos altamente reactivos que poseen dos grupos carbonilo y que actúan como propagadores de la reacción (Figura 2). Luego de varios meses o inclusive años de

contacto con glucosa, las proteínas de bajo recambio (vida media larga), como por ejemplo el colágeno, empiezan a originar AGEs (Vlassara *et al.*, 1984; Henle, 2005).

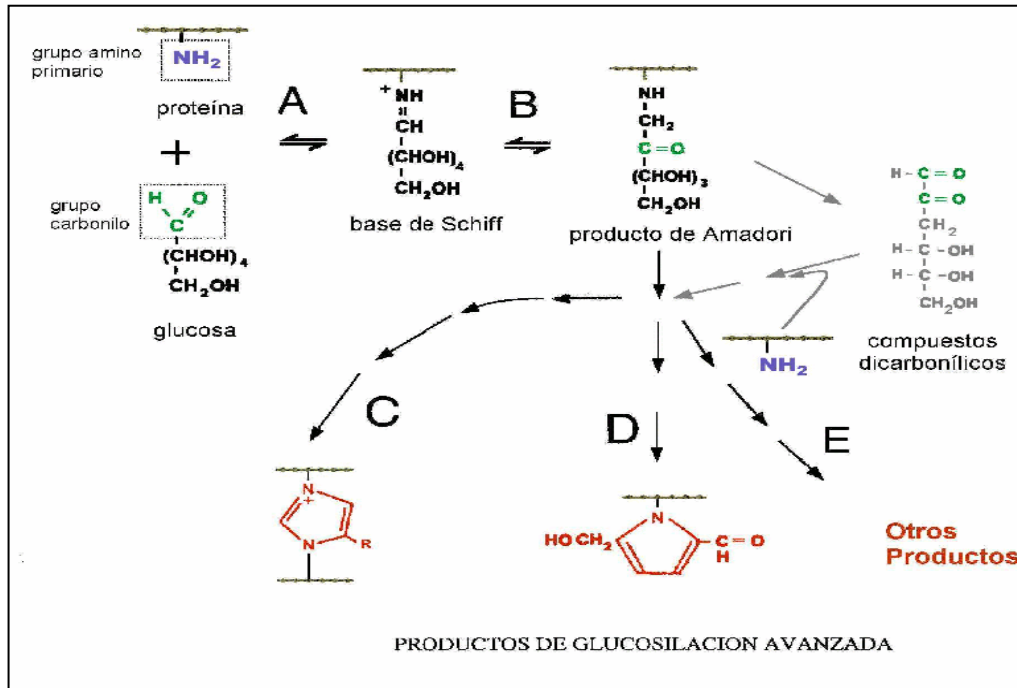


Figura 2. Proceso de glicosilación de proteínas. (A) Formación de la base de Schiff. (B) Reordenamiento de Amadori. A través de una serie de reacciones complejas los productos de Amadori pueden originar derivados con estructura imidazólica (C), pirrólica (D) y otras diversas (iminas, furanos, pirimidinas, etc.).

2.4. Consecuencias de la glicosilación sobre la actividad biológica de las proteínas

Estudios en los que las proteínas se ponen en contacto directo con azúcares han mostrado que la glicosilación puede o no afectar su actividad biológica. A este respecto, se ha considerado que dicha interacción debe ser estudiada cuidadosamente con el objeto de establecer una relación causa-efecto (González *et al.*, 2000), debido a que el fenómeno observado podría ser consecuencia de la glicosilación de otro componente no considerado, que a su vez interacciona con la proteína o interviene en las reacciones entre la proteína y algún producto secundario generado durante la glicosilación.

Hasta ahora, la disminución de la actividad biológica como consecuencia directa de la glicación se ha observado en varios casos, incluyendo sistemas enzimáticos donde los grupos amino participan en el proceso de catálisis. En este grupo se puede mencionar a la calmodulina, la superóxido dismutasa y la bomba de calcio en eritrocitos humanos (Kowluru *et al.*, 1989; Gonzales *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2004).

Sin embargo, el mecanismo por el que se modifica la actividad de esta enzima aún no se conoce (Dave *et al.*, 2002). De la misma manera, se ha observado que la glicación de la aldosa reductasa provoca un aumento de su actividad que *in vivo* puede dar lugar a alteraciones de los procesos celulares en los que participa cada enzima (Srivastava *et al.*, 1989). Por ejemplo, la bomba de calcio interviene en la regulación de la concentración de Ca^{+2} en el interior de las células. Las variaciones en dicha concentración, inducidas por diversos estímulos están implicadas en los procesos de contracción muscular, expresión génica, diferenciación celular, secreción y varias funciones neuronales (Carafoli-Klee, 1999). La inactivación parcial de esta enzima, producto de la glicosilación no enzimática, podría provocar alteraciones en estos importantes procesos. Por otra parte, la calmodulina ha sido reconocida como el principal mediador de los estímulos regulados por Ca^{2+} y su alteración traería graves consecuencias al normal funcionamiento de las células.

Por otro lado, se tienen reportes que la enzima superóxido dismutasa, que desempeña un papel fundamental en los mecanismos de defensa del organismo frente a los radicales libres de oxígeno, al ser modificada estructuralmente y siendo su actividad inhibida por el mecanismo de glicación, provocaría un aumento en el efecto nocivo de los radicales libres (Gonzales *et al.*, 2000), procesos que aceleran el daño en la DM.

Aunque los tratamientos actuales de la DM están dirigidos a reducir los niveles de glucosa sanguínea, buscando reducir la glicación proteínica y el desarrollo de las complicaciones

características de la DM, en la mayoría de los casos los medicamentos utilizados no logran aminorar los daños de origen vascular.

A partir de la década de los años 90 se han investigado varias alternativas de tratamiento para tratar de aminorar y/o prevenir el daño producido por la DM y sus complicaciones. Dos de las alternativas estudiadas en el presente trabajo son la glicina y *Cucurbita ficifolia*, las cuales en estudios previos se han propuesto como cuadyuvantes en el control de la DM (Gannon *et al.*, 2002; Almanza *et al.*, 2005).

2.5. Proteínas glicadas en la DM

Como se mencionó en párrafos anteriores, la glicación implica una reacción en la cual los azúcares (glucosa en general, pero no exclusivamente) reaccionan no-enzimáticamente con las proteínas (y en menor nivel con lípidos y el DNA) para formar los productos de glicación precoz, también llamados de Amadori o fructosamina (Millard, 1912; Gugliucci *et al.*, 2000).

En el hombre este proceso fue primeramente demostrado en la hemoglobina (Goldstein *et al.*, 1986), que se emplea como un indicador promedio de la exposición de glucosa retrospectivo de 2 a 3 meses, auxiliando en el control glucémico de pacientes con DM (Phillips, 2005). Sin embargo se han buscado otras proteínas que sufran glicación, como es el caso de la albúmina y las colinesterasas, que pueden servir como indicadores de control glucémico durante períodos más breves (15 días en humano y 3 días en ratón), lo cual podría ser de utilidad en estudios clínicos de ajuste al tratamiento.

2.5.1. Hemoglobina glicada

La hemoglobina es una proteína globular presente en altas concentraciones en los eritrocitos, cuya función es la fijación del oxígeno en los pulmones, y lo transportan por la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. Al volver a los pulmones, desde la red de capilares, la hemoglobina actúa como transportador de CO₂ y de protones (Schultz, 1993). Debido al tiempo de exposición de los eritrocitos a la glucosa circulante se favorece la glicación de esta proteína, debido a que su estructura existen sitios reactivos, como son el grupo amino terminal del aminoácido valina de la cadena α y β , y el grupo ϵ de los residuos de lisina (Siv *et al.*, 2005). La hemoglobina glicada se puede presentar en varias formas; la hemoglobina A1c es la mayor forma existente de la glicohemoglobina, sin ser la única, como se muestra en la Figura 3.

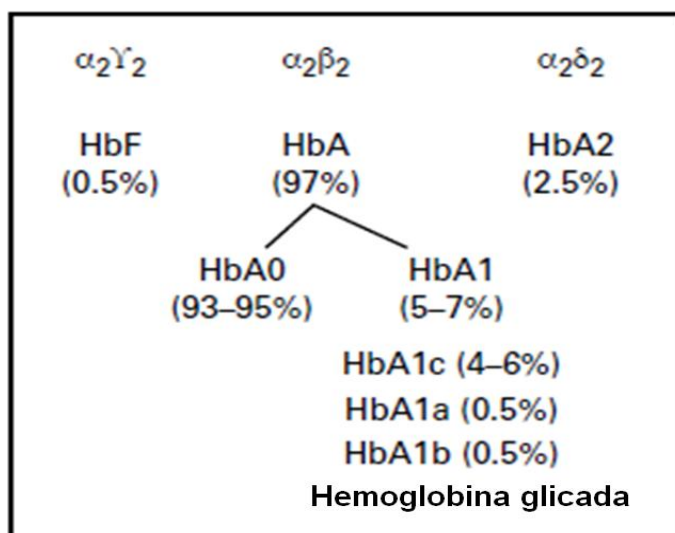


Figura 3. Las diferentes fracciones de hemoglobina glicada y sus variaciones en el suero humano (Tomado de Phillips, 2005).

En clínica, la medida de la fracción glicada de la hemoglobina A1c ha mejorado el monitoreo y el estudio de pacientes diabéticos, proporcionando una estimación promedio

que refleja el comportamiento del control de la glucemia durante un tiempo retrospectivo de 2 ó 3 meses.

2.5.2. Albúmina glicada

La albúmina es una de las proteínas más abundantes en el plasma, cuyas funciones incluyen: el control de la presión coloidal-osmótica, que se relaciona con la regulación de la distribución del fluido extracelular; el transporte de gran variedad de sustancias, por ejemplo hormonas esteroideas, bilirrubina, lípidos, vitaminas, calcio, trazas de metales, etc. (Guyton *et al.*, 1999).

En la DM la valoración de las proteínas plasmáticas glicadas (“fructosamina”) se utiliza como herramienta para supervisar el control glucémico obtenido durante un período de tres semanas (Dronge, 2006). El término “fructosamina”, nombre dado *p*-1-amino-1-deoxifruktosa, o también, isoglucosamina por Emil Fischer en 1986, quien fue el primero en sintetizarla, se refiere al estado de cetoamina de la unión glucosa-proteína. La naturaleza de esta reacción está ampliamente estudiada. Con el objeto de dilucidar la naturaleza de la hemoglobina A1c, se investigó el efecto de hiperglucemias sostenidas sobre otras proteínas, tales como colágeno, proteínas de membrana de los eritrocitos, LDL y HDL (Lyons *et al.*, 1997). La albúmina, las inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), α -1 antitripsina, α -2 macroglobulina, haptoglobina, transferrina y apoproteínas A-I y B100, son glicadas. Las cetoaminas formadas a partir de las proteínas sujetas a glicación constituyen un “reservorio” que recibe el nombre de “fructosamina” (Ludvigsen *et al.*, 1989; Gugliucci, 2000).

Por lo anterior, se ha considerado que la albúmina glicada refleja el comportamiento del control la glucemia durante un tiempo retrospectivo de 3 semanas, que puede ayudar a implementar un temprano inicio en la terapia con insulina, utilizándolo como un marcador

precoz para un buen control metabólico (Paroni *et al.*, 2007). La evaluación de la albúmina glicada se ha considerado que tiene ventajas sobre la hemoglobina A1c como un parámetro en el control metabólico en casos de enfermedades como anemias, DM gestacional y pacientes bajo un régimen constante de diálisis (Paroni *et al.*, 2007).

2.5.3. Colinesterasas y su posible glicación

Los vertebrados poseen dos tipos de colinesterasas: acetilcolinesterasa o colinesterasa verdadera (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE), también llamada pseudocolinesterasa, colinesterasa plasmática o sérica. Ambas colinesterasas poseen una capacidad extraordinaria para hidrolizar ésteres de colina a mayor velocidad que otros ésteres, cuando se comparan las velocidades de hidrólisis en condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH y fuerza iónica, usando preparaciones desprovistas de otras esterasas. Las colinesterasas se diferencian claramente de otras esterasas por la fuerte inhibición que sufren con pequeñas cantidades (10^{-5} M) del alcaloide natural fisostigmina (eserina) (citado en Gómez, 2000). Actualmente se sabe que existe ChEs en invertebrados y vertebrados; en vertebrados se localizan no sólo en tejidos excitables, músculos y nervios, sino también en numerosos tejidos como vasos sanguíneos, hígado, intestino, páncreas, timo y placenta, entre otros, y entre tipos celulares tan diversos como células de las meninges, conjunto de células sanguíneas, óvulos y espermatozoides. En realidad se admite que todos los tejidos y fluidos de los vertebrados, excepto las lágrimas, la orina y el sudor, contiene ChEs, pero se desconoce el significado de su extraordinaria distribución (citado en Gómez, 2000).

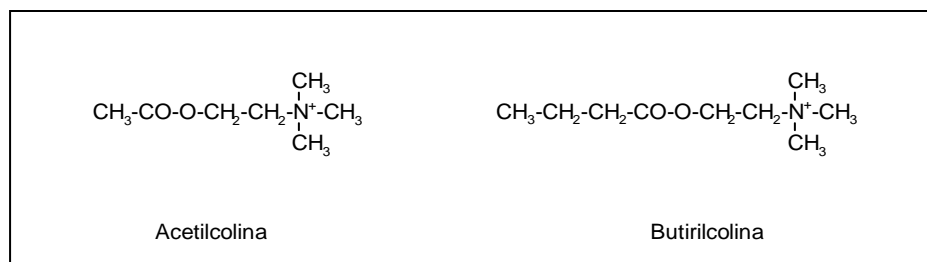


Figura 4. Estructura de la acetilcolina sustrato específico de la acetilcolinesterasa y butirilcolina, sustrato de de la butirilcolinesterasa. Cabe señalar que esta última enzima también puede degradar a la acetilcolina.

Las colinesterasas, además de diferenciarse por el sustrato preferente (Figura 4), estas enzimas presentan distinta afinidad hacia ciertos inhibidores selectivos, como BW284C51 para la AChE; mientras que la BuChE reduce su actividad en presencia de etopropazina, iso-OMPA o bambuterol. Otra diferencia cinética es que la AChE se inhibe por exceso de sustrato, lo que no ocurre con la BuChE (citado en Gómez, 2000).

La función de la AChE en el organismo es la inactivación rápida de la acetilcolina (Figura 4) tras su liberación en las sinapsis colinérgicas, finalizando la transmisión del impulso nervioso y facilitando el control temporal preciso de la contracción muscular (Katz, 1966; Nachmansohn y Neumann, 1975; Rosenberry, 1979).

Por ahora se desconoce el papel fisiológico concreto de la BuChE, pero a la vista de su abundancia en suero, se ha sugerido que participa en la desintoxicación (Lockridge, 1991; Catalán *et al.*, 1990) y, más recientemente, como intermediario en la morfogénesis (citado en Sánchez *et al.*, 2000). Debido a que ambas colinesterasas constituyen una parte importante de las proteínas en el suero, podrían estar sujetas al proceso de glicación, el cual induciría una alteración en su actividad por el cambio estructural debido a esta reacción.

Existen escasos estudios en los que se relacionan cambios en la actividad debido a ensamblado y procesamiento post-traduccional de las colinesterasas en la DM. A este respecto, se ha determinado en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina un aumento en la actividad AChE en islotes de Langerhans, en el tejido exócrino de páncreas, en comparación con los animales control (Rao *et al.*, 2007), y en otro modelo de roedor diabético se ha informado un aumento y alteración en el ensamblado de estructuras poliméricas (citado en Sánchez *et al.*, 2000 y 2001).

Recientemente se ha observado que la BuChE se encuentra significativamente elevada, tanto en pacientes con DM tipo 1 como en DM tipo 2, comparada con la actividad en los sujetos control (Sridhar *et al.*, 2005).

3. PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y FISIOLÓGICAS DE LA GLICINA

Se trata del aminoácido más sencillo; se encuentra dentro del grupo de los aminoácidos no esenciales y está compuesto por un molécula de carbono enlazada a un grupo amino y a un grupo carboxilo. La glicina funciona como un neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso central y recientemente se le ha atribuido, en diversos modelos experimentales, un efecto protector de lesiones isquémicas causadas por perfusión, shock, trasplante, hepatitis alcohólica, fibrosis hepática, artritis, tumores y por toxicidad medicamentosa. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la glicina ejerce sus efecto benéficos de protección permanecen sin comprenderse (Mancilla *et al.*, 2002)

Las funciones atribuidas a la glicina se atribuyen a su pequeño tamaño y a la falta de una cadena lateral significativa que podría afectar sus características físicas, impartir carga, hidrofobicidad u otras formas estructurales. Estas propiedades permiten a la glicina desempeñar un papel importante en la estructura de ciertas proteínas y actuar en varias funciones celulares como un modificador biológico. Cabe señalar que estas propiedades no son compartidas por otros aminoácidos, tales como valina, alanina, glutamina y serina (Mancilla *et al.*, 2002; Gannon *et al.*, 2002).

Uno de los mecanismos propuestos para este aminoácido incluyen: la supresión de la señalización por calcio, la disminución en la formación de radicales libres y el bloqueo de la permeabilización de la membrana plasmática que precede a la necrosis (Mancilla *et al.*, 2002). Recientes evidencias han mostrado que la glicina es un agente antiinflamatorio, inmunomodulador y citoprotector (Lezcano *et al.*, 2006).

La activación del canal de cloro dependiente de glicina (GlyR) es otro de los mecanismos postulados para los efectos de la glicina. El GlyR se expresa en una amplia variedad de células que participan en repuestas inflamatorias e inmunes, entre las que se incluyen los macrófagos, monocitos, neutrófilos y linfocitos (Ikejima *et al.*, 1997; Stachlewitz *et al.*, 2000). También, se expresa en otras células como hepatocitos, células endoteliales y células del tubo proximal (Zhong *et al.*, 2003).

La glicina bloquea el incremento intracelular de iones de calcio en respuesta a diferentes estímulos, como las endotoxinas, los polisacáridos el peptidoglicano (PG-PS), el péptido bacteriano formilmetionina-leucina-fenilalanina (FMLP), ácidos biliares, D-galactosamina, proliferadores peroxisomales, ciclosporina A, prostaglandina E₂ (PGE₂), fenilepinefrina, factor de crecimiento vascular del endotelio, concanavalina A y anticuerpo contra-CD3 (Ikejima *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2001).

El incremento de calcio intracelular induce la señalización para varios eventos a ese nivel, entre los que se encuentran: la producción de citocinas y mediadores de inflamación, activación de enzimas tipo proteasas y de la fosfolipasa A (PLA), que inducen proliferación y muerte celular. La activación de macrófagos lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

La activación del GlyR suprime estos eventos dependientes de calcio al inducir el influjo de cloro y, consecuentemente, la hiperpolarización de las membranas celulares y la inhibición de la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje (Werman *et al.*, 1967)(Figura 5).

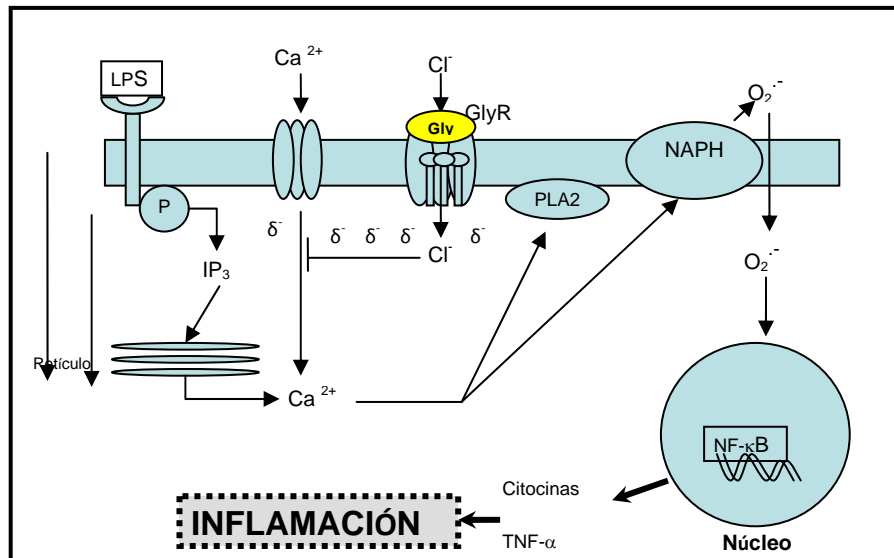


Figura 5. La activación del canal de cloro dependiente de glicina es uno de los mecanismos propuesto para los efectos de la glicina, siendo un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. El efecto inhibitorio se ejerce al unirse a su receptor (GlyR) localizado en la membrana postsináptica de neuronas de la espina dorsal. En la que la activación de los GlyR conduce a un aumento en la conductancia por cloro, que provoca una hiperpolarización de las membranas postsinápticas y contrarresta la acción despolarizante de los neurotransmisores excitatorios.

Por otro lado, se ha observado que la ingesta de proteínas ricas en glicina por las personas con DM, provoca un pequeño aumento en la concentración de glucosa en sangre y estimulación en la secreción de insulina y glucagón. Asimismo, cuando estas proteínas se ingieren con glucosa producen un efecto sinérgico en la secreción de insulina. El producto comercial denominado Gelatin, es el ejemplo de una proteína con un 30% de residuos de glicina. La estimulación en la secreción de insulina ayuda a remover la glucosa en sangre, siendo éste un agente terapéutico potencial para pacientes con DM (Gannon *et al.*, 2002; Vásquez *et al.*, 2006).

La administración de glicina también disminuye directamente la glicación de la hemoglobina (Lezcano *et al.*, 2006) y protege contra la nefropatía diabética, aparentemente por sus propiedades antioxidantes (Iglesias de la Cruz *et al.*, 2003; Vásquez *et al.*, 2003).

Con base en estos antecedentes, se puede considerar que la glicina representa una alternativa interesante con potencial para prevenir o aminorar los daños debidos a las complicaciones de la DM, a través de la inhibición de la glicación de proteínas, reducción de estrés oxidante y/o regulación del estado inflamatorio (Ramakrishnan, 1993; Yin *et al.*, 2002).

Los posibles mecanismos en torno a la acción de este aminoácido en la glicación de proteínas podrían ser: 1) que actúe como un competidor en la absorción de glucosa a nivel intestinal y, por lo tanto, disminuya la hiperglucemia y la glicación de proteínas; 2) que sirva como un inhibidor de la reacción de glicación, actuando como la aminoguanidina (Figura 6); 3) que actúe a través del receptor asociado a RAGEs (*Receptor for advanced glycation elements*), modulando la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la respuesta inflamatoria; 4) que reaccione con la glucosa formando glucosil-glicina y, de esta manera, por competencia disminuir el porcentaje de proteínas glicadas.

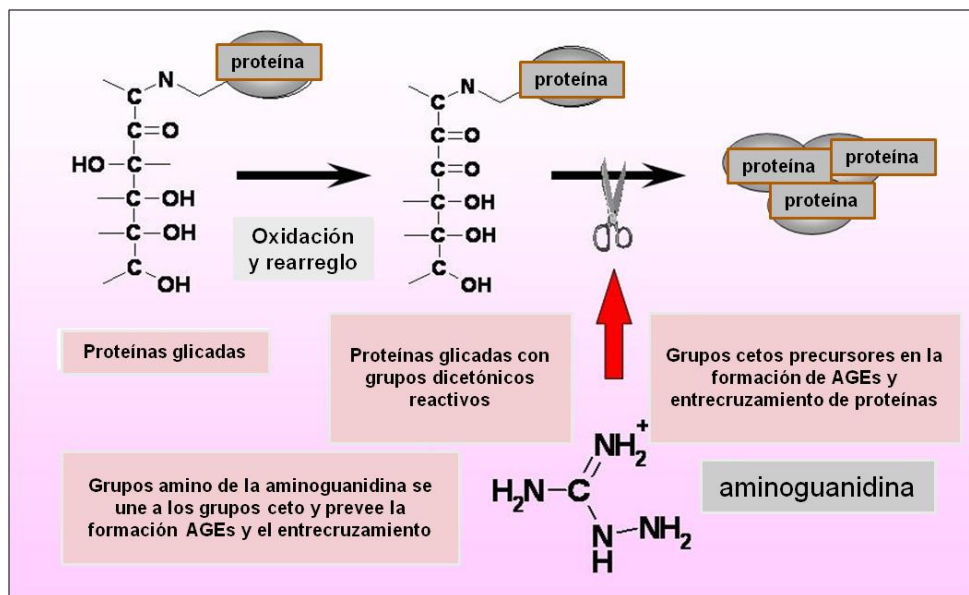


Figura 6. Mecanismo de inhibición de la aminoguanidina sobre los compuestos de glicación avanzada (AGEs) derivados del conjunto de proteínas sujetas a glicación. Se observa que los grupos amino de la aminoguanidina se unen a los grupos cetos de las proteínas glicadas, impidiendo la formación de aglomerados proteínicos e inhibiendo la formación de los AGEs (Tomado de Gugliucci, 2000).

4. USO DE PLANTAS MEDICINALES EN EL CONTROL DE LA DM

Como se ha mencionado en líneas anteriores, la DM es un grupo de enfermedades que afecta a un porcentaje elevado de la población y cuya prevalencia va en aumento. Por ello, además de las medidas preventivas y el uso de fármacos dirigidos a reducir la hiperglucemia, la población también acude al uso empírico de plantas medicinales.

En este sentido, la fitoterapia podría ser de utilidad en el control de la DM, sola o en combinación con la terapéutica convencional. Algunas plantas usadas por la población se aplican como remedio antidiabético, a la vez que son comestibles. Lo anterior es muy interesante debido a que se unen dos componentes esenciales en el control de la DM: alimentación y medicación. Así, las plantas antidiabéticas comestibles se pueden incluir en un menú para el tratamiento de pacientes con DM (Román *et al.*, 1992).

Las investigaciones etnobotánicas realizadas en México informan el uso empírico de más de 300 plantas antidiabéticas (Hernández, 1959). Cabe señalar que la mayoría de las especies antidiabéticas mexicanas son especies endémicas. De acuerdo con Aguilar y Xolalpa (2002), y Hernández y colaboradores (2002), entre las familias botánicas que contribuyen con más especies antidiabéticas mexicanas se encuentran: *Asteraceae*, *Leguminosae*, *Cactaceae* y *Cucurbitaceae*.

Es un hecho que pocas plantas comestibles son usadas como remedios antidiabéticos. Sin embargo, algunas de ellas incluso pueden reducir los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre, como por ejemplo *Opuntia streptacantha* Lemaire (*Cactaceae*) y *Cucurbita ficifolia* Bouché (*Cucurbitaceae*) (Hernández *et al.*, 2002). En este trabajo nos referiremos especialmente a esta última planta.

4.1. *Cucurbita ficifolia* Bouché (*chilacayote*) y su empleo tradicional en el control de la DM

Cucurbita ficifolia Bouché (Cucurbitaceae) es conocida en México como chilacayote y se cultiva por sus frutos comestibles (Xolalpa, 1990). El fruto maduro es similar a una pequeña calabaza blanca que puede llegar a medir de 18 a más de 40 cm de diámetro; tiene una delgada cáscara verde con manchas blancas (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005). Los componentes principales que se han reportado son: 94% de agua, 0.3% contenido de fibra, 1.2% de proteína, 17 mg de calcio, 0.6 mg de hierro, 7 mg de ácido ascórbico y 0.03 mg de tiamina. De 100 g de *C. ficifolia* se producen 3.34 Kjoule (14 Kcal) (Acosta-Patino, 2001; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005).

C. ficifolia se encuentra reportada para el tratamiento de heridas, fiebre y hemorroides (Hernández, 1959; Esteyneffer, 1978), pero el uso más actual es para el tratamiento de la DM tipo 2. Un extracto acuoso de *C. ficifolia* ha mostrado actividad hipoglucemiante en conejos con hiperglucemia temporal, así como en conejos con diabetes inducida con aloxana y en pacientes con diabetes tipo 2 (Román *et al.*, 1991, 1992 y 1995; Acosta *et al.*, 2001). El mismo efecto hipoglucémico agudo se ha determinado en el liofilizado obtenido del jugo de frutos maduros de *C. ficifolia*, analizado en ratones sanos y con diabetes inducida con aloxana (Alarcon-Aguilar *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2002).

Además, en ratones sanos la administración intragástrica e intraperitoneal del liofilizado produjo disminuciones significativas de glucemia de manera dosis dependiente (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002). En ratones diabéticos, la administración de *C. ficifolia* también mostró efecto hipoglucémico agudo. Además, la administración intragástrica diaria de esta preparación a ratas con diabetes inducida con aloxana redujo significativamente la glucemia después de 14 días de tratamiento (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002).

En estudios más recientes se han logrado caracterizar los compuestos responsables de la actividad hipoglucemiante, que en parte se explica por un aumento en la secreción de insulina (Almanza-Pérez *et al.*, 2005; Xia y Wang, 2006). Además, se ha estudiado el efecto antioxidante y antiinflamatorio de varios extractos de la planta en ratones con diabetes experimental inducida por la administración de estreptozotocina (Xia y Wang, 2006 y 2007). En estos estudios, los resultados mostraron que la administración diaria de un extracto acuoso de *C. ficifolia* disminuye los niveles de malondialdehído en el tejido pancreático, probablemente como resultado en la reducción de los niveles sanguíneos de glucosa y, consecuentemente de hemoglobina glicada.

En la actualidad se están realizando estudios evaluando la actividad hipoglucemiante de varios extractos orgánicos y acuosos del fruto de *C. ficifolia* y se ha logrado demostrar que los extractos acuosos procesados son los más efectivos para reducir los niveles de glucosa en ratones sanos y diabéticos. Cabe señalar que un precipitado de uno de los extractos acuosos evaluados contiene D-qui-ro-inositol, compuesto que se ha propuesto como el responsable de la actividad hipoglucemiante (Xia y Wang, 2006). A partir de estudios *in vitro* con líneas celulares expuestas a diferentes epímeros del mio-inositol, se ha sugerido que un posible mecanismo de la actividad hipoglucemiante se relaciona a que el D-qui-ro-inositol induce la entrada de glucosa a las células, por un mecanismo en el que mimetiza la acción de la insulina y, en consecuencia, favorece la translocación de los transportadores de glucosa (GLUT 4) en la membrana celular, teniendo como efecto la reducción de glucosa plasmática (Yap *et al.*, 2007) y, consecuentemente, de hemoglobina glicada.

5. JUSTIFICACIÓN

Cada vez existen más evidencias acerca de que los niveles altos de glucosa sanguínea favorecen la glicación de las proteínas con vida media larga. El proceso de glicación se ve acelerado cuando ocurre una elevación sostenida de la glucemia, debido a que conduce a un aumento en la producción y acumulación en diversos tejidos de productos avanzados de glicación, donde ejercerán sus efectos perjudiciales. En los últimos años se han investigado diversas proteínas cuya función pudiera estar alterada por la glicación. A este respecto se ha propuesto, además de la hemoglobina A1c, a la albúmina, como un marcador importante para evaluar el control de los pacientes diabéticos. Por otro lado, existe evidencia clínica de que la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa podrían ser útiles como proteínas marcadoras para evaluar la gravedad del síndrome metabólico, debido a que su actividad podría modificarse en la diabetes por la glicación (Cucuiano *et al.*, 1999; Sridhar *et al.*, 2005).

En estudios con pacientes que sufren diabetes tipo 2 y animales con diabetes experimental se ha observado que la administración de glicina o *C. ficifolia* produce efectos benéficos. En el caso de la glicina, en modelos experimentales de diabetes como en pacientes con DM tipo 2, se ha determinado que mejora la sensibilidad a la insulina y reduce las concentraciones de la hemoglobina A1c independientemente de los niveles de glucosa en sangre. Por otro lado, con *C. ficifolia* se ha informado que su administración reduce los niveles de la hemoglobina A1c como consecuencia de un importante efecto hipoglucémico. Sin embargo, aún no es claro cuál es el efecto de ambos tratamientos, solos o en combinación, sobre la glicación de otras proteínas. Por lo tanto, resulta interesante determinar si la glicina y/o el extracto acuoso utilizado de la forma tradicional de *C. ficifolia* disminuyen la glicación de otras proteínas cuya función se encuentra

alterada en la DM, tales como albúmina y colinesterasas en animales con diabetes experimental inducida con estreptozotocina.

6. HIPÓTESIS

Si la glicina y *C. ficifolia* reducen los niveles de hemoglobina glicada, su administración diaria podría inhibir la glicación de otras proteínas séricas y con actividad enzimática (albúmina, acetil- y butirilcolinesterasa).

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la administración oral de glicina o *Cucurbita ficifolia* reduce la glicación de proteínas séricas (albúmina y colinesterasas) en ratones con diabetes experimental.

7.1. Objetivos particulares

1. Obtener la preparación tradicional de *C. ficifolia*.
2. Evaluar el efecto producido por la administración diaria de esta preparación, así como de la glicina, sobre los niveles de glucosa sanguínea, y otros parámetros bioquímicos y fisiológicos, en ratones sanos y diabéticos.
3. Evaluar el efecto de la administración diaria del extracto de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de hemoglobina en ratones diabéticos.

4. Cuantificar la concentración de albúmina total en ratones diabéticos tratados.
5. Evaluar el efecto de la administración diaria del extracto de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de albúmina en ratones diabéticos.
6. Cuantificar la actividad colinesterásica en suero de ratones diabéticos tratados con el extracto de *C. ficifolia* y glicina.
7. Evaluar el efecto de la administración diaria del extracto de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de acetil- y butirilcolinesterasa en ratones diabéticos.
8. Relacionar los efectos en la glicación de proteínas en los animales con tratamientos y cuantificar las variaciones observadas en los parámetros bioquímicos y fisiológicos.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Materiales

- Cloroformo (Merck, Alemania).
- Glicina (Gibco BRL, E.U.A.).
- Etanol ABS (Merck, Alemania).
- Tiras reactivas para determinar glucosa (Acutrend sensor, Roche. Francia).
- Tiras reactivas para determinar colesterol total (Acutrend sensor, Roche. Francia).
- Tiras reactivas para determinar triglicéridos (Acutrend sensor, Roche. Francia).
- Tiras reactivas para determinar transaminasa glutámico oxaloacética (GOT) (Acutrend sensor, Roche. Francia).
- Tiras reactivas para determinar transaminasa glutámico pirúvica (GPT) (Acutrend sensor, Roche. Francia).
- Cuantificador de hemoglobina glucosilada (HbA1c) (Roche. Francia)
- Albúmina glicada (Sigma, E.U.A.).
- Azul de nitrotetrazolio (NBT) (Fluka, Alemania).
- 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína (BCF). (Wiener, Lab. Argentina)
- Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (Sigma, E.U.A)
- Tetraisopropilpirofosforamida (Iso-OMPA) (Sigma, E.U.A.)
- Dibromuro de 1,5-bis-alildimetilamoniofenil-pentan-3-ona (BW284C51) (Sigma, E.U.A.)
- Gel inmovilizador de ácido borónico (Pierce, E.U.A.)

8.1. Material vegetal y preparación del extracto hipoglucemiante de *Cucurbita ficifolia*

Los frutos maduros de *C. ficifolia* (diámetro mayor de 40 cm de ancho y peso mayor a 3 Kg) se colectaron durante el mes de septiembre del 2007, en el Municipio de Acolman, Estado de México. La preparación del extracto hipoglucemiante se realizó de la forma tradicional de acuerdo a su uso para el control de la DM en el estado de Hidalgo. El fruto maduro fue cortado por la mitad, obteniendo dos partes aproximadamente iguales, y después de retirar la semilla y el bagazo, se procedió a llenar de agua para beber ambas partes, dejando reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Después de este tiempo se colectó el extracto de cada mitad y se les dio a beber *ad libitum* a los animales de experimentación.

8.2. Animales de experimentación

Se trabajó con 35 ratones *Mus musculus*, cepa CD-1, machos (30-35 g), criados en el bioterio de la UAM Iztapalapa y mantenidos con una dieta básica para roedores y ciclos de luz-oscuridad 12-12 h. Los procedimientos de manutención y experimentación se siguieron según la NOM-062-ZOO-1999.

9.- DISEÑO EXPERIMENTAL

9.1. Diabetes experimental

A un lote de 15 animales se les administró por vía intraperitoneal estreptozotocina en una sola dosis de 135.7 mg/kg, disuelta en 0.12 ml de amortiguador de citratos (Na⁺) frío, a pH 4.5. Al octavo día de la administración se les evaluó la glucemia y los animales que presentaron glucemias superiores a los 200 mg/dl se incluyeron en el estudio.

Se formaron 6 grupos de 5 ratones cada uno (3 grupos de ratones sanos y 3 de ratones diabéticos), que recibieron los tratamientos descritos en el siguiente diagrama (Figura 7), en el agua de beber durante 71 días en animales sanos y durante 21 días en ratones diabéticos; la duración de este último experimento en animales diabéticos representa la vida media de la hemoglobina (20 días) como un marcador de glicación proteínica.

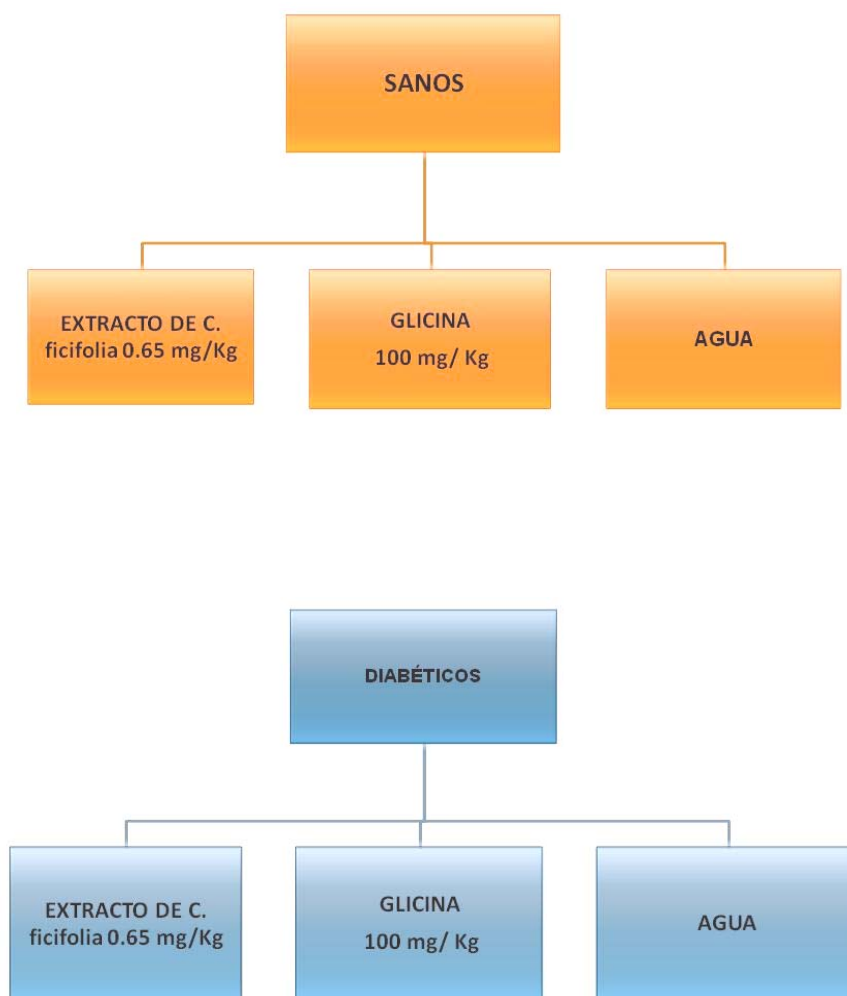


Figura 7. Esquema de los grupos experimentales. Cada grupo estuvo conformado por cinco animales de la misma edad y género

10. CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

A los ratones sanos (4½ meses de edad) con 55 días de tratamiento se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa. Se les administró D-glucosa (dextrosa anhidra pura) a razón de 2 g/Kg de peso por vía intragástrica y se valoró la glucemia a los tiempos 0 (antes de la administración de la glucosa), 30, 60, 90 y 120 minutos (después de la administración de glucosa) en muestras de sangre obtenida de la vena caudal.

10.1. Registro de parámetros

En ambos modelos, al inicio (t=0) y al final de los tratamientos se determinó: consumo de alimento, consumo de líquido y peso corporal. La glucemia y la hemoglobina glicada se midieron de muestras obtenidas por punción de la vena caudal. Para determinar posibles efectos colaterales se evaluaron las actividades glutámico pirúvico transaminasa (GPT), y glutámico oxalacético transaminasa (GOT), y se cuantificaron los contenidos de colesterol y triglicéridos usando tiras reactivas que se leyeron en un aparato Reflotrón Plus (Roche, México), cuyo fundamento se describe en el Anexo 1.

A los animales de experimentación se determinó la glucemia empleando un glucómetro de la marca comercial antes mencionada. La hemoglobina A1c se cuantificó en un aparato DCA 2000 (Bayer, México). Para la medición del peso corporal se usó una báscula granataria (OHAUS Alemania). Posteriormente, los animales fueron sacrificados por exsanguinación del seno orbital. Las muestras sanguíneas se procesaron para obtener el suero y se almacenaron a -80°C hasta el momento de los análisis específicos.

10.2 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante ANOVA. Para evaluar las diferencias dentro de un mismo grupo y entre los grupos se utilizó como prueba complementaria Tukey-Kramer. El nivel de confianza fue del 95%.

10.-RESULTADOS

10.1 Prueba de Tolerancia a la glucosa en animales sanos bajo tratamientos

A los diferentes grupos de ratones sanos (4½ meses de edad) se les realizó la prueba de tolerancia a la glucosa después de 55 días de tratamiento. Los resultados se muestran en la Figura 9.

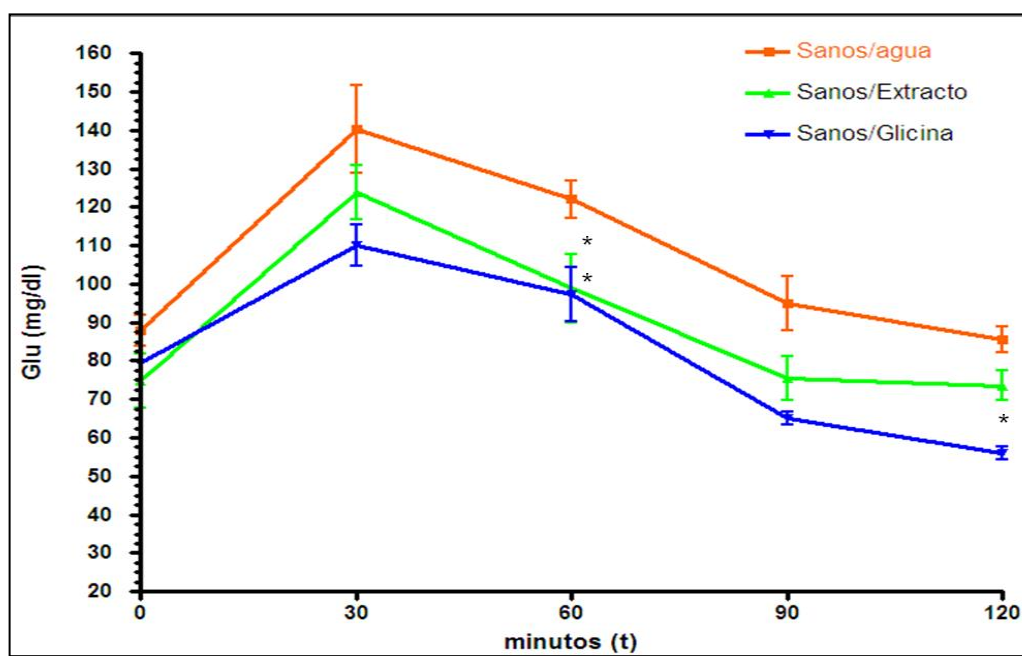


Figura 9. Curva de tolerancia a la glucosa en ratones sanos a los 55 días de tratamiento, con extracto de *C. ficifolia* y glicina. A los tres grupos de ratones se les determinó la concentración de glucosa a diferentes tiempos, después de un ayuno de 12 horas y una carga de glucosa de 2 g/kg. Los datos son el valor promedio \pm E.S.M. (n=5), *diferencia significativa con respecto al control (p<0.05).

Después de un ayuno de 12 h las concentraciones de glucosa oscilaron entre 80 y 110 mg/dL en todos los grupos y no se encontraron diferencias significativas entre ellos. Posterior a la carga de glucosa, en el minuto 30 se presenta el pico máximo de las concentraciones de glucosa en todos los grupos y un descenso paulatino en la concentración de glucosa. Ahora bien, el grupo tratado con glicina mostró diferencias

significativas en los tiempos 90 y 120 con respecto al grupo control. Respecto a los ratones tratados con el extracto de *C. ficifolia*, al tiempo 60 se encontró diferencia estadística entre éstos y el control.

En la Tabla 5 se muestra el incremento en la concentración de glucosa a diferentes tiempos durante la curva de tolerancia a la glucosa. Los valores se calcularon al restar del promedio de los valores de glucosa el valor inicial correspondiente al grupo. Como se puede observar en la Tabla 5, el incremento en la glucosa fue menor en los grupos que recibieron los tratamientos, siendo más contundente al minuto 60 debido a los tratamientos de *C. ficifolia* y glicina, reflejando una mejor respuesta en este parámetro con respecto a los ratones sin tratamiento.

Tabla 5. Diferencia en la glucemia de ratones sanos bajo tratamiento de extracto *C. ficifolia* y glicina.

mg/dl	Inicio	$\Delta(t)30$	$\Delta(t)60$	$\Delta(t)90$	$\Delta(t)120$
CONTROL	88±4.5	52.2±6.9	34±4.2	6.8±5.1	-2.40±2.9
GLICINA	79.3±0.5	30.6±2.1	*18±2.7	-14.3±0.6	*-23.3±0.7
<i>C.ficifolia</i>	74.8±4.6	35.8±3.4	*10.8±4.3	-12.6±3.4	-14.4±2.0

Los valores mostrados en la tabla representan las diferencias promedio calculadas al restar los valores de glucosa con el valor inicial de cada grupo de tratamiento. Los datos son la media \pm E.S.M. (n=5), *diferencia significativa con respecto al control (p<0.05).

Al final del tiempo de estudio se realizaron las mediciones de los parámetros bioquímicos en el grupo de ratones sanos sin tratamiento y tratados durante 71 días, con glicina o con el extracto de *C. ficifolia*. Se les cuantificó la glucosa en ayuno y después de la ingesta de alimento, concentración sanguíneas de triglicéridos, colesterol, y dos enzimas marcadores de daño hepático, como son GOT y GPT (Figura 10).

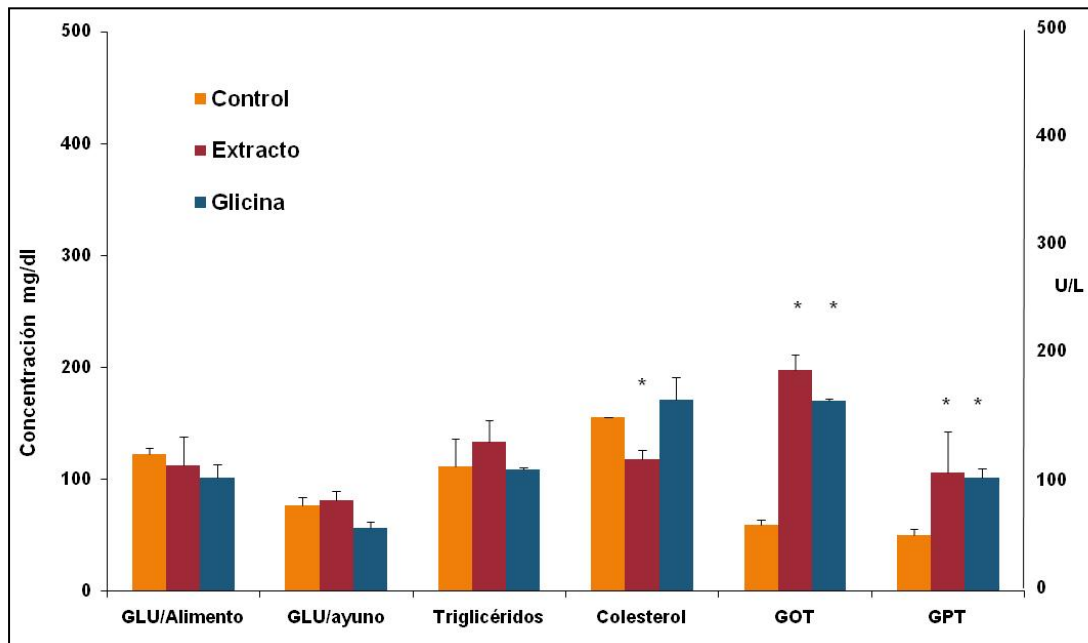


Figura 10. Glucemia con libre acceso de alimento, en ayuno, concentración sanguínea de triglicéridos, colesterol y actividad de las enzimas hepáticas GOT y GPT en unidades/ litro. Se muestra el efecto de 71 días de tratamiento sobre estos parámetros en ratones sanos. Los resultados representan el promedio \pm E.S.M. de 5 determinaciones independientes, * diferencia significativa con respecto a los valores en los animales control ($p < 0.05$)

10.2 Parámetros bioquímicos y actividades de GOT y GPT en animales sanos

Como se puede observar en la Figura 10, en el parámetro que corresponde al contenido de glucosa con libre acceso al alimento, los animales con tratamientos presentan niveles más bajos con respecto al control. Mientras, que en la glucosa en animales con ayuno, sólo el tratamiento con glicina redujo la glucemia. Sin embargo, la diferencia no fue significativa ($p > 0.05$). En cuanto a las concentraciones de triglicéridos tampoco hubo diferencias estadísticas, mientras, que las concentraciones de colesterol mostraron disminución significativa únicamente en el grupo tratado con el extracto de *C. ficifolia*.

Las actividades GOT y GPT mostraron un aumento significativo del 90 y 50% respectivamente con los tratamientos. A pesar de que los incrementos en ambos parámetros fueron notables, es necesario señalar que no rebasaron los valores normales en ratones que se han informado para estas enzimas. Además, los animales no

presentaron signos de daño (diarrea, cambios de temperatura corporal, convulsiones, etc.) debido a los tratamientos.

El peso corporal, consumo de alimento y agua no mostraron diferencias estadísticas entre los grupos, excepto en aquellos ratones que recibieron glicina, los cuales mostraron un aumento en el peso corporal (Tabla 6).

Tabla 6. Consumo de alimento, agua y peso corporal durante el tratamiento con extracto de *C. ficifolia* y glicina (71 días) en ratones sanos.

n=5	Peso corporal (g)	Consumo de alimento (g)	Consumo de H ₂ O (ml)
CONTROL	37.48 ± 0.49	16.83 ± 0.61	11.58 ± 0.50
GLICINA	40.43 ± 0.38*	16.74 ± 0.82	12.71 ± 0.39
<i>C. ficifolia</i>	39.3 ± 1.52	16.2 ± 0.89	12.34 ± 0.46

Los valores representan la media ± E.S.M. de 5 determinaciones independientes, *diferencia significativa con respecto al control (p< 0.05).

10.3 Consumo de líquidos

En la Figura 11 se muestran las variaciones en el consumo de líquidos que presentaron los ratones sanos. Como se observa en los ratones bajo los diferentes tratamientos se observa una ligera tendencia a la disminución en el consumo de líquidos con respecto a los ratones sin tratamiento.

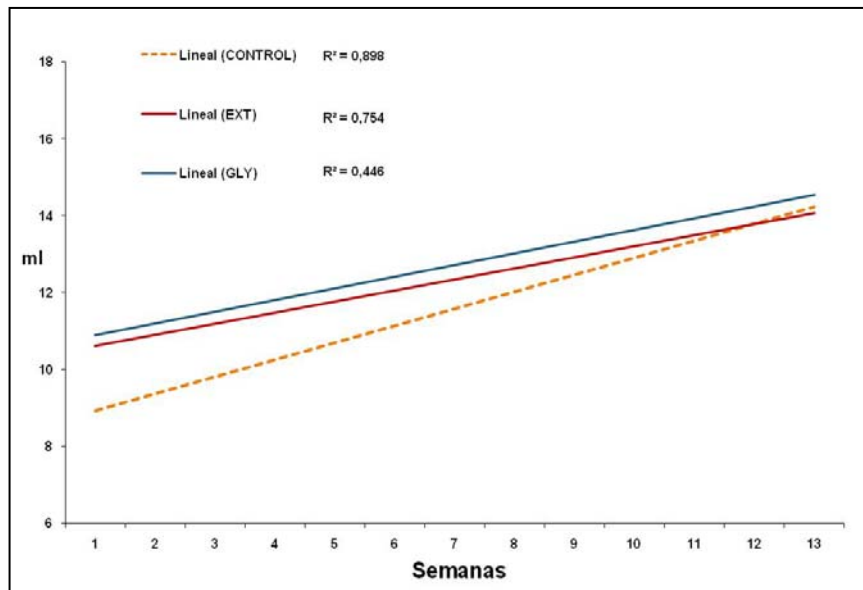


Figura 11. Consumo de líquidos en ratones sanos bajo tratamiento con el extracto de *C. ficifolia* y glicina. Los datos fueron analizados mediante regresión lineal.

En los ratones diabéticos primero se procedió a cuantificar los parámetros basales en relación a la glucemia con libre acceso al alimento y en ayuno, se midió el peso corporal, consumo de alimento y líquidos, así como hemoglobina glicada. A estos ratones se les administró un tratamiento subcrónico de 21 días con glicina y extracto de *C. ficifolia*, administrados independientemente.

10.4 .Diabetes experimental

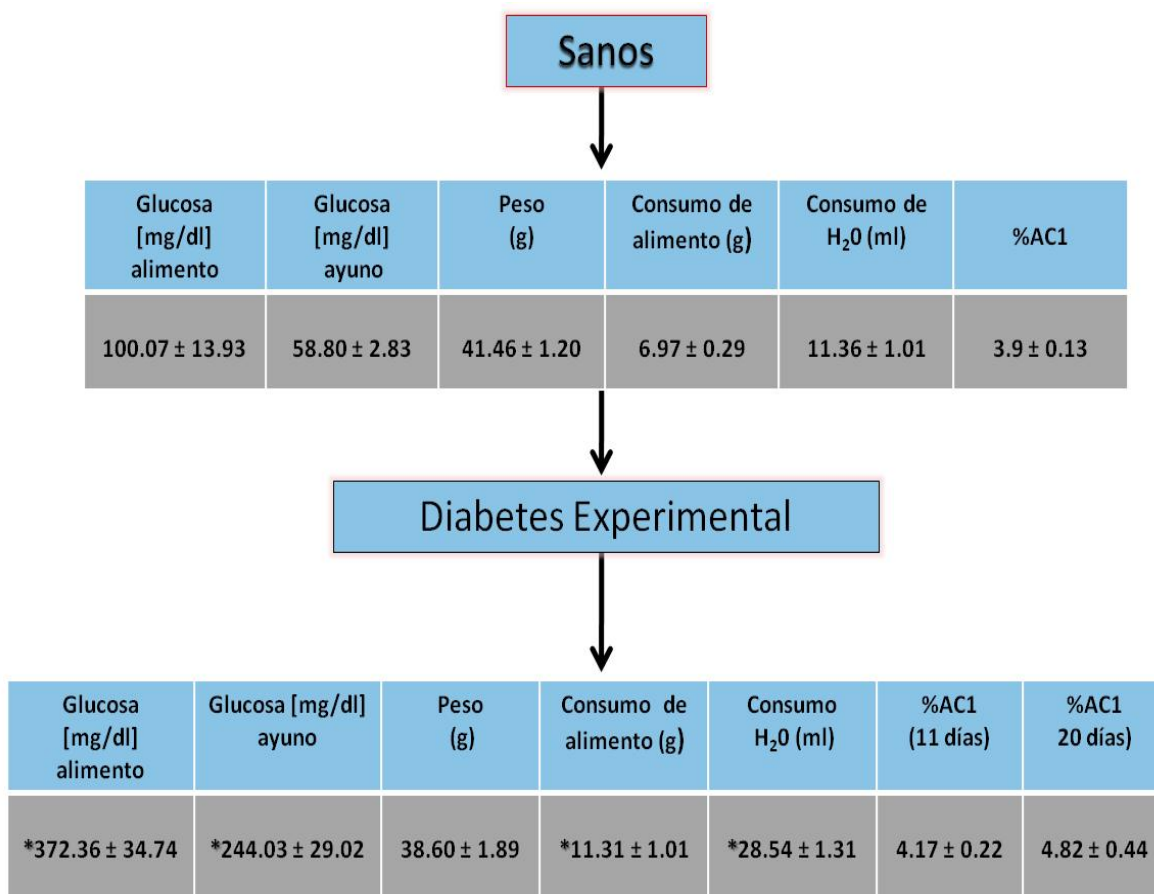


Figura 12. Cuantificación de parámetros bioquímicos: glucosa con alimento, en ayuno, peso, consumo de alimento, líquidos, y hemoglobina glicada (A1c), antes y después de la inducción de diabetes experimental con estreptozotocina. Los valores mostrados representan el promedio ± E.S.M. de al menos 5 determinaciones independientes, *diferencia significativa con respecto a los valores iniciales ($p < 0.05$).

Una vez que en los animales se estableció la diabetes se procedió a formar tres grupos: grupo control diabético, diabético tratado con glicina (0.1 g/kg) y el grupo tratado con el extracto de *C. ficifolia* (Figura 12).

10.5 Perfil Bioquímico y fisiológico de los animales diabéticos

En la Figura 13 se muestran las concentraciones de glucosa (con y sin ayuno), concentración de colesterol, y las actividades de GOT y GPT. Se observa que, en parámetros como glucosa cuantificada en animales con libre consumo de alimento, hay una mejor respuesta a la incorporación del monosacárido debido al tratamiento con glicina. Del mismo modo, en la glucemia en ayuno los tratamientos lograron disminuir la concentración de glucosa. Sin embargo, en ninguno de los casos se encontró diferencia significativa. Esto último también se observó en cuanto al colesterol y enzimas hepáticas.

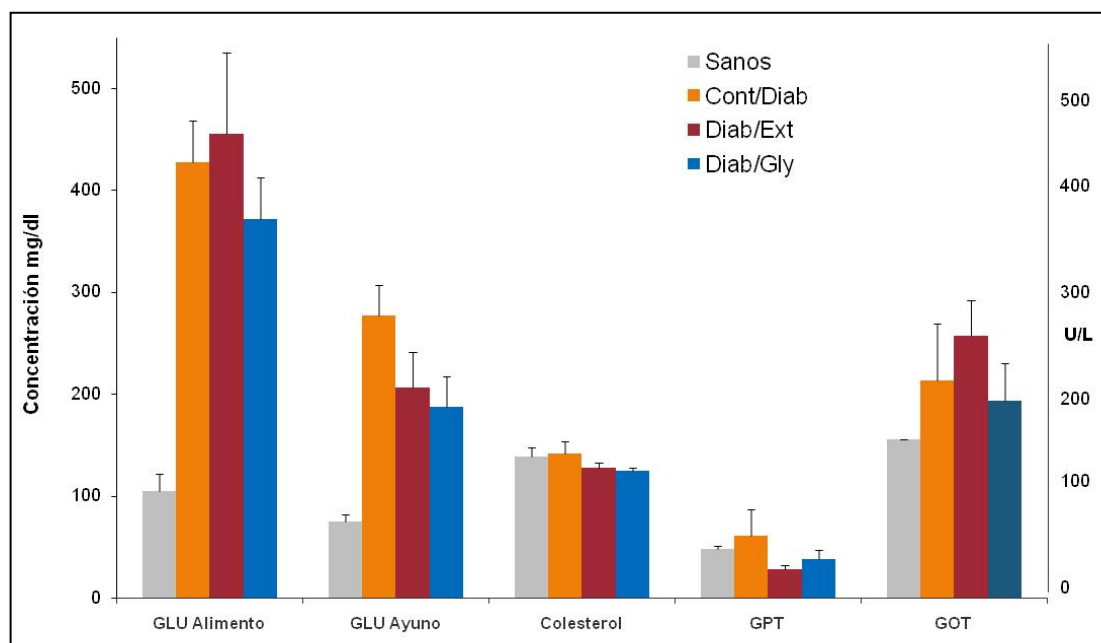


Figura 13. Glucemias con libre acceso al alimento, en ayuno, concentración sanguínea de colesterol, y actividad de las enzimas hepáticas GOT y GPT en unidades/litro. Se muestra el efecto de 21 días de tratamiento sobre estos parámetros en ratones diabéticos. Los resultados representan la media \pm E.S.M. de 5 determinaciones independiente

10.6 Peso corporal, consumo de alimento y líquidos en ratones diabéticos

En la Tabla 7 se puede observar que en los ratones diabéticos hubo una reducción significativa en el consumo de alimento con ambos tratamientos. En cuanto al consumo de líquidos, sólo los animales tratados con el extracto de *C. ficifolia* mostraron una reducción, sin llegar a ser estadísticamente significativa. Por último, ambos tratamientos redujeron el peso corporal, con un efecto significativo debido únicamente a la administración de *C. ficifolia*.

Tabla 7. Consumo de alimento, agua y peso corporal durante el tratamiento con extracto de *C. ficifolia* y glicina (21 días) en ratones diabéticos. Los valores representan la media \pm E.S.M. de 5 determinaciones independientes, *diferencia significativa con respecto al control diabético ($p < 0.05$).

n=5	Peso corporal (g)	Consumo de alimento (g)	Consumo de H ₂ O (ml)
CONTROL SANO	37.48 \pm 0.59	14.68 \pm 0.30	12.74 \pm 0.86
CONTROL DIABÉTICO	41.57 \pm 1.61	21.75 \pm 0.19	41.97 \pm 4.26
DIABÉTICO GLICINA	38.32 \pm 1.59	11.15 \pm 0.07 *	41.53 \pm 4.74
DIABÉTICO <i>C. ficifolia</i>	37.05 \pm 2.32 *	10.52 \pm 0.10 *	37.71 \pm 8.66

10.7 Consumo de líquidos en ratones diabéticos

En la Figura 14 se muestran las variaciones en el consumo de líquidos durante el período de tratamiento (21 días). Como se puede observar los ratones diabéticos con ambos tratamientos mostraron una tendencia al aumento en el consumo de líquidos

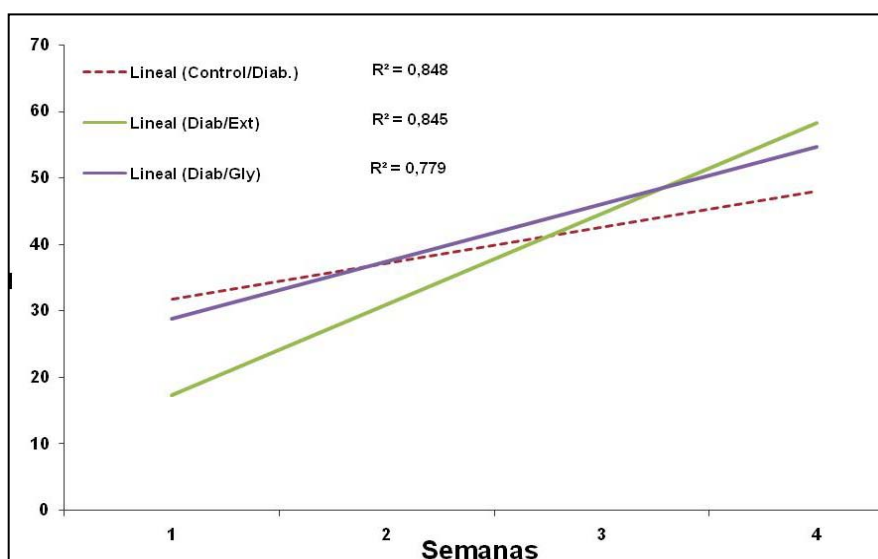


Figura 14. Curva de consumo de líquidos en los ratones diabéticos bajo administración de extracto de *C. ficifolia* y glicina, analizados mediante regresión lineal.

11 Efecto de los tratamientos de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de la hemoglobina

Como se muestra en la Figura 15, el extracto de *C. ficifolia* en animales diabéticos produjo descenso de 1.1% en los niveles de hemoglobina glicada, representando una reducción muy importante que podría resultar en disminución del riesgo de desarrollar complicaciones diabéticas. En los ratones que recibieron glicina no se observaron cambios importantes en este parámetro.

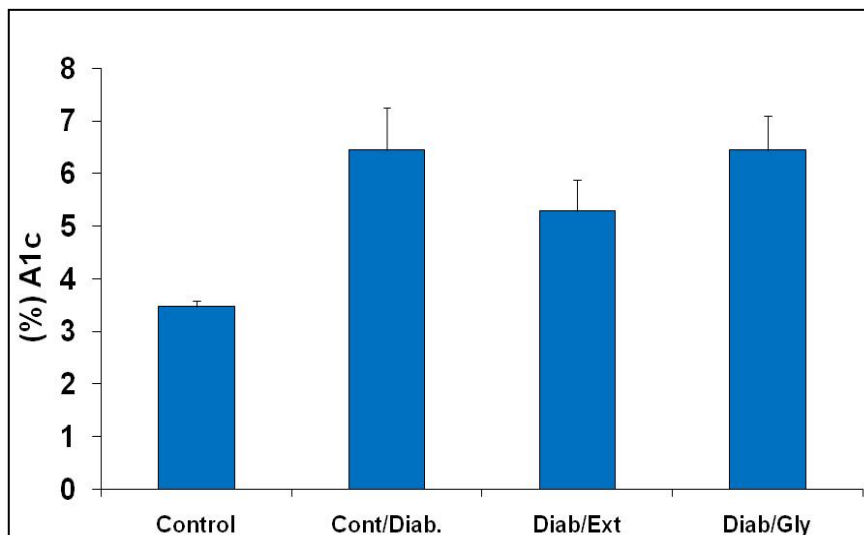


Figura 15. Unidades porcentuales de hemoglobina A1c en ratones diabéticos durante 21 días de tratamiento con extracto de *C. ficifolia* y glicina, observando la reducción de 1.1% en ratones tratados con *C. ficifolia*.

10.9 Correlación entre glucemia y hemoglobina glicada

Se decidió analizar una posible correlación entre la glucemia y los niveles porcentuales de hemoglobina A1c reportados en (American Diabetes Association, 2008) (Figura 16), observándose una relación proporcional entre el porcentaje de hemoglobina glicada y la concentración de glucosa plasmática promedio.

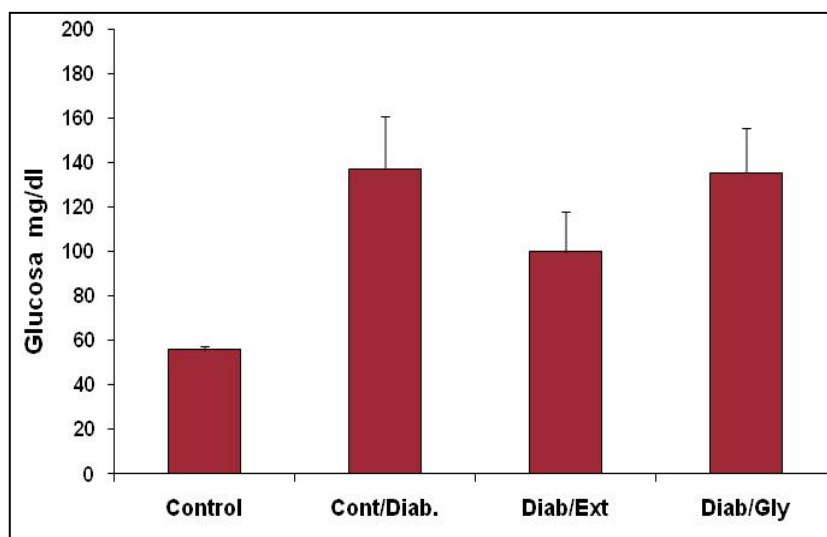


Figura 16. Contenidos promedio de glucosa calculado a partir de los valores de hemoglobina A1c en los ratones diabéticos tratados con extracto de *C. ficifolia* y glicina.

El extracto de *C. ficifolia* redujo un 27% el promedio de concentración de glucosa plasmática durante el tratamiento en ratones diabéticos, mientras que la glicina sólo alcanzó a reducir la glucemia promedio en 1.4%.

12 Efecto de los tratamientos de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de albúmina sérica

La albúmina es una proteína plasmática que cumple una función acarreadora con múltiples actividades biológicas, cuya glicación podría tener impacto negativo en su función y, por ende, una repercusión a nivel fisiológico.

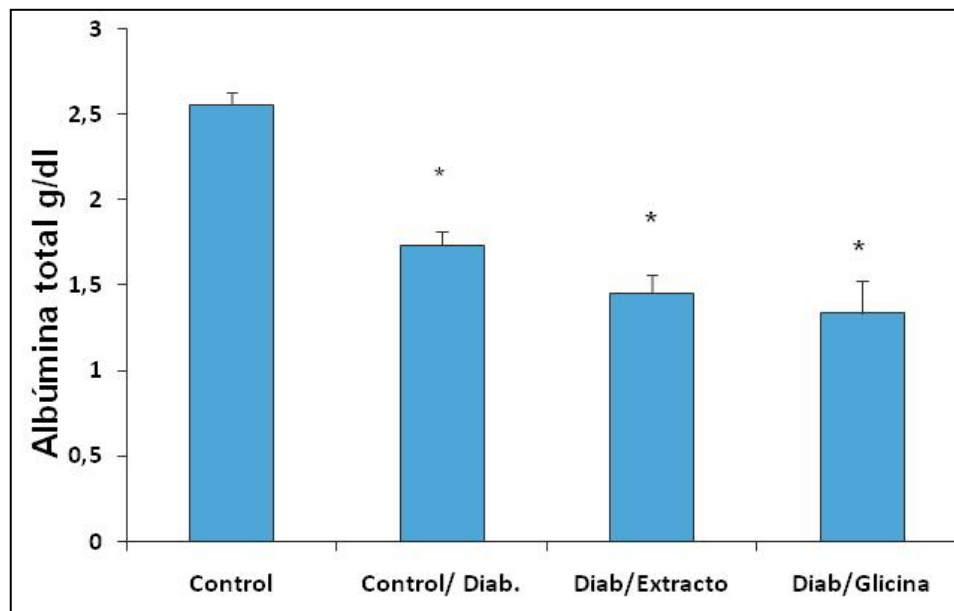


Figura 17. Albúmina total en ratones diabéticos tratados con un extracto de *C. ficifolia* y glicina. Los resultados representan la media \pm E.S.M. de al menos 5 determinaciones independientes. * diferencia significativa con respecto al control sano ($p < 0.05$).

Para conocer el porcentaje de albúmina glicada, primero se cuantificó la concentración total de la albúmina en el suero de todos los animales. En la Figura 17 se muestran los valores obtenidos respecto al contenido de albúmina, donde se puede observar que los

ratones diabéticos mostraron menor concentración en esta proteína en comparación con los ratones sanos.

Cuando los valores fueron expresados en gramos por decilitro, se observó una disminución significativa en la albúmina glicada en los ratones diabéticos tratados con glicina (Figura 18). Estos resultados apoyan los reportes previos que señalan el efecto supresor de la glicina en la glicación de proteínas.

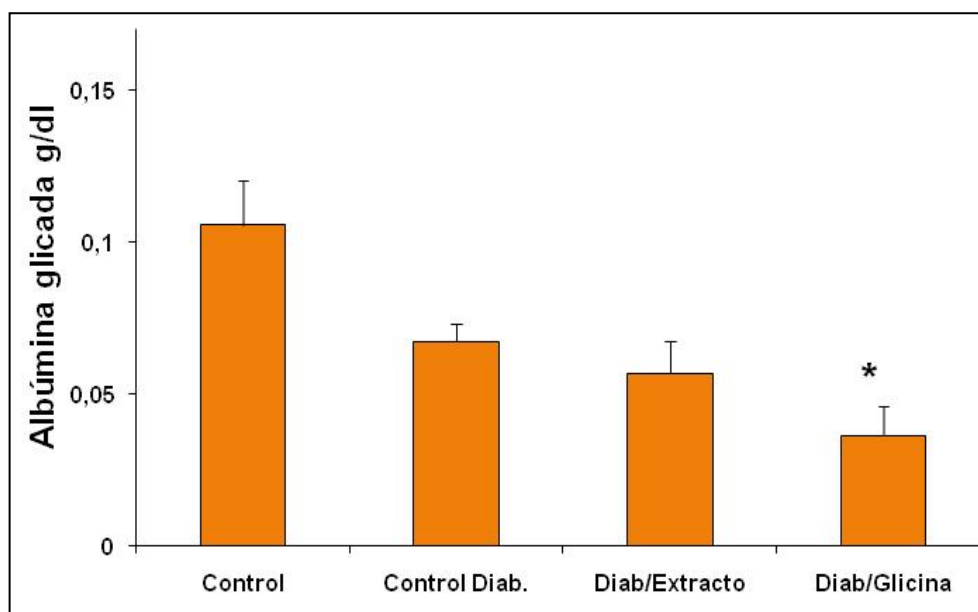


Figura 18. Albúmina glicada en ratones diabéticos tratados con un extracto de *C. ficifolia* y glicina. Los resultados representan la media \pm E.S.M. de 5 determinaciones independientes, * diferencia significativa con respecto al control diabético ($p < 0.05$).

Para poder expresar los datos obtenidos de la concentración de albúmina glicada en unidades porcentuales y mostrar la importancia en la reducción de este parámetro en la evaluación de los tratamientos con *C. ficifolia* y glicina, se realizó el cálculo del cociente de albúmina glicada/albúmina total x 100.

En la Figura 19 se muestra que en los ratones tratados con glicina hubo una reducción de 1% en los niveles de la albúmina glicada, respecto a los animales control diabéticos. Esta

reducción es una observación importante, ya que la glicina al parecer podría disminuir las complicaciones derivadas del desarrollo y/o evolución de la DM. En cuanto a la administración del extracto de *C. ficifolia* en los ratones no se observó reducción importante en este parámetro.

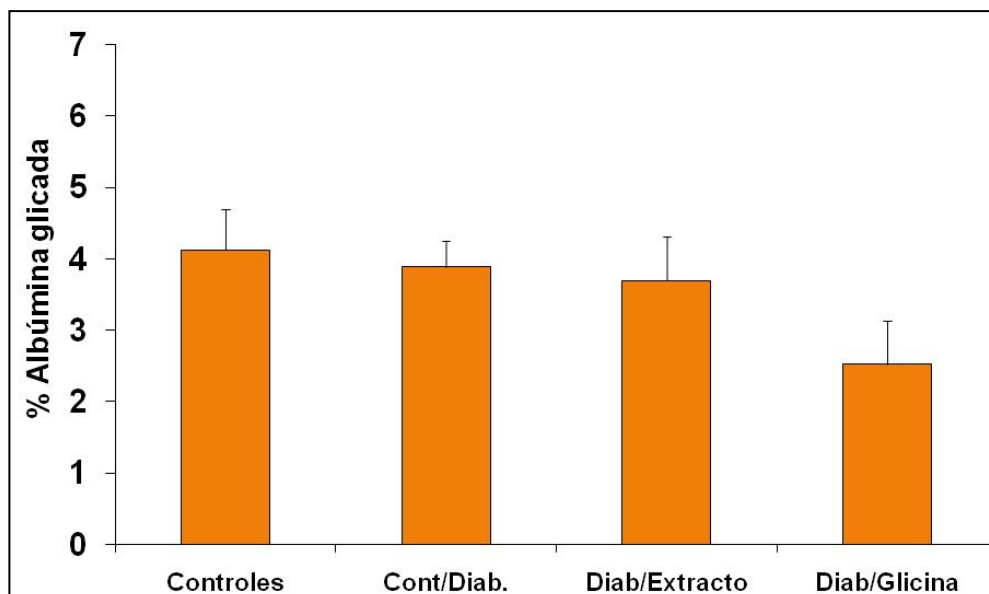


Figura 19. Porcentaje de albúmina glicada en ratones diabéticos durante 21 días de tratamiento con *C. ficifolia* y glicina, observando reducción de 1.1% en ratones tratados con glicina.

13 Efecto de los tratamientos de *C. ficifolia* y glicina sobre la actividad específica de las colinesterasas

En el caso de las colinesterasas séricas, antes de estimar el índice de glicación de estas enzimas, se procedió a medir su actividad específica, tanto en ratones sanos como en ratones diabéticos con tratamiento.

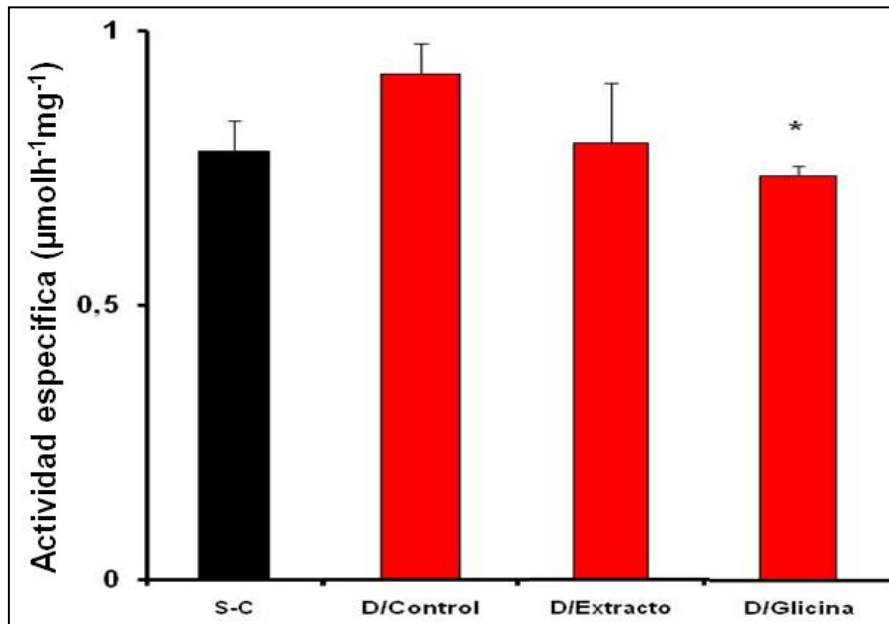


Figura 20. Actividad específica acetilcolinesterasa en el suero de ratones sanos sin tratamiento (S-C), diabéticos (D/Control), diabéticos tratados con extracto de *C. ficifolia* (D/Extracto) y glicina (D-glicina). Los resultados representan el promedio \pm E.S.M. de 5 determinaciones, * diferencia significativa con respecto al control diabético ($p < 0.05$).

En la Figura 20 se muestra la actividad específica para la AChE en ratones sanos y ratones diabéticos tratados con extracto de *C. ficifolia* y glicina, donde se puede observar que los valores de actividad AChE variaron entre 0.7 U/mg de proteína y 1 U/mg entre los diferentes grupos de ratones experimentales. La comparación de actividad específica entre los grupos mostró que presentaron diferencias significativas entre ratones diabéticos tratados con glicina con respecto a los ratones diabéticos control. En cuanto a

los ratones diabéticos que fueron tratados con el extracto de *C. ficifolia*, éstos presentaron una disminución no significativa en la actividad AChE específica.

En la Figura 21, se muestra que la actividad específica de BuChE en ratones diabéticos con tratamiento, la cual fue mayor en dos veces respecto a la actividad estimada en ratones sanos sin tratamiento, siendo los ratones tratados con extracto de *C. ficifolia* quienes mostraron tendencia a reducir la actividad con respecto a los controles. Cabe señalar que este hecho confirma hallazgos previos en humanos diabéticos

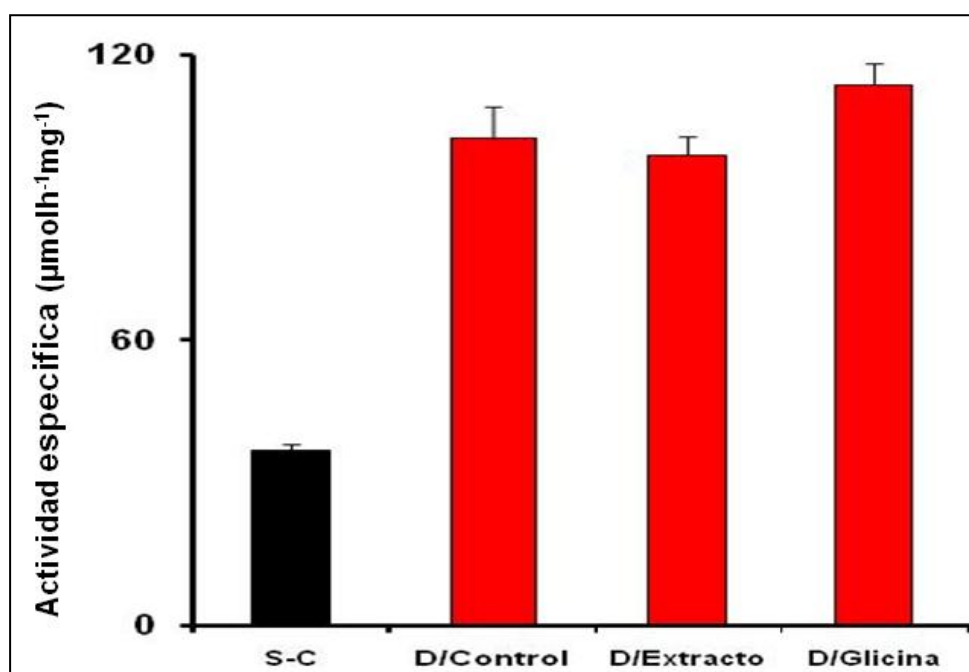


Figura 21. Actividad específica butirilcolinesterasa en el suero de ratones sanos sin tratamiento (S-C), diabéticos, diabéticos tratados con extracto de *C. ficifolia* y glicina. Los resultados representan la media \pm E.S.M. de 5 determinaciones.

13.1 Efecto de los tratamientos de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de las colinesterasas.

Para establecer el nivel de glicación de las colinesterasas, los sueros de los ratones sanos y ratones diabéticos se dejaron interaccionar con una matriz de ácido borónico durante 16 horas en agitación constante a 4 °C. Después de transcurrido el tiempo de incubación, los

sueros se clarificaron por centrifugación y la matriz se lavó extensivamente para eliminar actividad colinesterásica no ligada. Posteriormente, las proteínas ligadas a la matriz de ácido borónico fueron despegadas con amortiguador de sorbitol y se procedió a medir actividad colinesterásica.

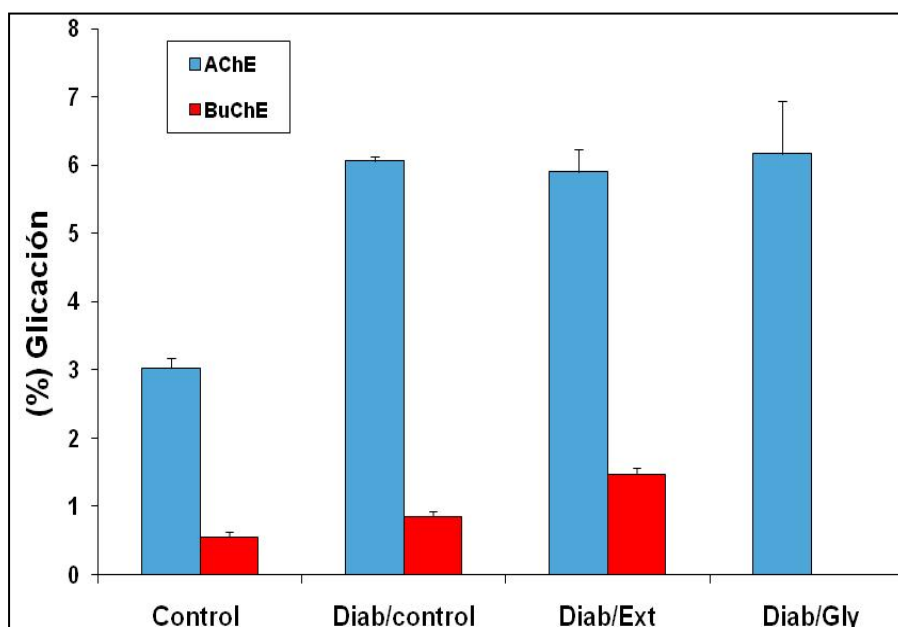


Figura 22. Efecto de los tratamientos con extracto de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de las enzimas acetil- y butirilcolinesterasa en los ratones diabéticos. Los valores representaron el promedio \pm E.S.M. de 5 determinaciones.

En la Figura 22 se muestra el porcentaje de actividades de AChE y BuChE separadas de la matriz para cada grupo de ratones sanos y diabéticos tratados, reflejando que las enzimas glicadas presentan variabilidad entre los diversos grupos. Los ratones sanos mostraron valores porcentuales de 3.0% y 0.5% de AChE y BuChE, respectivamente, Para los ratones diabéticos control fueron 6.06% y 0.84% de actividad recuperada; en cuanto a los ratones diabéticos tratados con extracto de *C. ficifolia* la actividad recuperada fue de 5.90% para AChE y 1.48% para BuChE y, por último, en los diabéticos tratados con glicina sólo se logró recuperar actividad AChE. Estos resultados señalan que la glicina podría reducir el nivel de glicación de la butirilcolinesterasa, favoreciendo el desarrollo de estudios para establecer el mecanismo por el que ocurrió la reducción en la glicación.

14. DISCUSIÓN

El presente estudio muestra evidencias de que la administración del extracto de *C. ficifolia* y glicina en ratones sanos durante 71 días produce reducción de la glucemia, ya que la glucemia alcanzada durante la prueba de tolerancia a la glucosa fue menor con respecto al grupo no tratado. Estudios previos, informaron que el extracto de *C. ficifolia* y la glicina podrían aumentar la sensibilidad de los receptores a insulina (Almanza *et al.*, 2005; Vásquez *et al.*, 2006), al mejorar la respuesta de los transportadores GLUT4 favoreciendo la captura de glucosa. Este efecto posiblemente se deba a un mecanismo similar al de insulina, el cual favorece la señalización e inducción de la translocación de los transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática celular de músculo esquelético, y adipocitos. Lo anterior trae como consecuencia el transporte interno del monosacárido y su decremento de la concentración sanguínea (Czech *et al.*, 1999).

Con respecto a los parámetros bioquímicos estimados en los ratones sanos que recibieron ambos tratamientos no se observaron cambios significativos con respecto al control. Sin embargo, la concentración del colesterol se redujo significativamente en los ratones expuestos al extracto de *C. ficifolia*. Asimismo, el incremento significativo de GOT y GPT con respecto al control sin tratamiento, las actividades no rebasaron los valores normales reportados para roedores (Buenrostro *et al.*, 1993). Esta elevación plasmática de las transaminasas podría estar indicando un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática de los hepatocitos, asociado a una reacción hepatocelular no específico (Pratt *et al.*, 2000) ya que este efecto no se presentó en los ratones diabéticos. Cabe señalar, que en cualquier enfermedad hepática que interviene un daño necroinflamatorio ocurre aumento en actividad sérica de las transaminasas.

Por otro lado, en enfermedades agudas o crónicas no hepáticas también puede observarse aumento en la actividad de las transaminasas, sobre todo de GPT. El aumento en GPT se ha relacionado con los procesos musculares, como distrofias, polimiositis o traumatismos, infarto agudo de miocardio, e incluso cuadros muy insignificantes, tales como un proceso gripal. Considerar el aumento en las transaminasas como indicador de daño hepático no sería confiable en este caso, debido a que se requiere de otras pruebas como las llamadas pruebas de función hepática, que incluyen bilirrubina total y directa, fosfatasa alcalina (FA), gammaglutamil transpeptidasa (GGT), albúmina y estudio de factores de coagulación (Giannini *et al.*, 2005). Para establecer un posible daño directo relacionado con los tratamientos es recomendable ampliar los parámetros analizados y corroborar con pruebas histológicas.

Las variaciones del peso corporal en el estudio mostraron que no se presentó un comportamiento similar entre los grupos con tratamiento. El grupo tratado con glicina mostró diferencias significativas asociadas con un ligero aumento de peso corporal; es probable que la glicina mimetice la acción de la insulina, teniendo un mecanismo propuesto para la taurina. Este ácido orgánico, componente principal de la bilis, se encuentra en pequeñas cantidades en los tejidos de muchos animales. Es un derivado del aminoácido cisteína que contiene el grupo tiol, y es el único ácido sulfónico natural conocido. La taurina también participa en otros procesos fisiológicos, incluyendo inhibición de neurotransmisores, estabilización de la membrana celular, regulación de los tejidos adiposos y homeóstasis del calcio. (Nakaya *et al.*, 2000). La glicina provocaría un efecto anabólico sobre el metabolismo de proteínas, aumentando la captación de aminoácidos y la producción de proteínas en los tejidos, reduciendo la concentración sanguínea de aminoácidos y reflejándose en la ganancia de peso (Olivares *et al.*, 2008). Se puede considerar que la glicina puede favorecer la recuperación del peso corporal perdido en esta patología, siendo similar a lo observado en otros modelos experimentales de DM tipo 2 (Vasquez *et al.*, 2003; Vasquez *et al.*, 2006).

En relación al consumo de alimento en ratones sanos bajo los distintos tratamientos, no se encontraron cambios significativos a los 5 meses de edad. Es decir, la cantidad de consumo de alimento se comportó dentro de lo normal. En cuanto al consumo de líquidos los ratones tratados con extracto de *C. ficifolia* y glicina mostraron una tendencia a una disminución en el consumo de este parámetro a lo largo del tratamiento. Finalmente, el peso en los ratones tratados con glicina presentó un incremento significativo en comparación con los ratones sin tratamiento.

Los ratones diabéticos sin ayuno tratados con glicina presentaron una disminución no significativa comparada con los controles diabéticos; esto probablemente se atribuya a la función de secretagogo de la glicina, reduciendo la glucemia (Gannon *et al.*, 2002; Vasquez *et al.*, 2003). En relación con el grupo de *C. ficifolia* con libre acceso al alimento, no se observó una reducción importante en las glucemias debido a que éste pudo haber contenido carbohidratos, provocando un aumento en el registro de este parámetro. Respecto a la concentración de glucosa en ayuno, ambos tratamientos redujeron de forma no significativa este parámetro. Sin embargo, se puede considerar que es importante reducir la concentración de glucosa en ayuno y disminuir las complicaciones relacionadas con la glucotoxicidad, definida como los efectos adversos que producen la hiperglucemia crónica sobre las estructuras celulares y sus funciones.

Las concentraciones de colesterol total también fueron determinadas en estos animales diabéticos bajo la administración de ambos tratamientos, donde se observó una ligera tendencia a reducirlo, pero ésta no fue significativa.

Al igual que en los ratones sanos, se evaluó el peso corporal al final del estudio, donde los animales diabéticos tratados con extracto y glicina mostraron una ligera disminución de peso corporal en comparación con los controles diabéticos. Pero al compararlos con los ratones sanos, éstos llegaron a corregir su peso corporal debido a los tratamientos, al

mostrarse favorecido tal vez por un aumento en la secreción de insulina similares a los reportados (Gannon *et al.*, 2002; Almanza *et al.*, 2005) dándose una corrección en la concentración de glucosa en sangre para un mejor manejo metabólico. En cuanto a la recuperación del peso en los ratones tratados con glicina no se reflejó debido a que posiblemente el tiempo de exposición del tratamiento fue menor (Vásquez *et al.*, 2003 y 2006).

En relación al consumo de alimento, los dos tratamientos lo redujeron significativamente, en comparación con los controles diabéticos, lo cual nos indicaría que estos tratamientos podrían ayudar a corregir el desequilibrio en el metabolismo, debido a que en esta patología se presenta una alteración en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos (Díaz *et al.*, 2004). En cuanto al consumo de líquidos, los ratones tratados con extracto presentaron un mayor consumo en este parámetro a lo largo de este tratamiento, y solo a los que se les administró la glicina presentan una ligera disminución no significativa. Sin embargo, podría reducir un síntoma como la polidipsia, la cual caracteriza a la DM (Díaz *et al.*, 2004).

El extracto de *C. ficifolia* en los ratones diabéticos redujo el índice en una unidad porcentual el nivel de la A1c, probablemente relacionado al decremento de la glucosa sanguínea en el tiempo de experimentación. El mecanismo relacionado a este efecto, se puede deber a que el extracto actúa a través de un sensibilizador de receptores insulínicos, como se ha informado previamente (Xia., *et al.* 2006). Además, el extracto de *C. ficifolia* puede contener cantidades suficientes del compuesto D-quirositol, epímero del mio-inositol, que podría actuar en regular la actividad insulínica, funcionando como un análogo (Yap *et al.*, 2007). En el caso de los animales tratados con glicina quizá el efecto no se pudo evidenciar, debido a que el tiempo para observar la disminución es de 3 a 6 meses. Otro factor que pudo influir en los resultados observados, es la dosis empleada en este trabajo, debido a que fue menor a la informada en un modelo de diabetes

experimental en ratas, en las que si se observó una disminución en este parámetro (Vásquez *et al.*, 2003 y 2006).

Por otra parte se ha propuesto que los niveles de A1c y la albúmina glicada reflejan diferentes períodos de la situación metabólica en el sujeto diabético. Por lo que se puede considerar que ambas se complementan para que los pacientes presenten un buen control metabólico a corto y largo plazo en el promedio de sus glucemias. La prueba de albúmina glicada tiene la posibilidad de brindar información del estado glucémico a corto plazo (Armbruster, 1987; Cefalu, *et al.*, 1998).

En los animales diabéticos se cuantificó el índice de glicación de la albúmina para conocer el control a corto plazo por parte de los tratamientos a los que fueron sometidos. Los resultados mostraron que en los ratones diabéticos tratados con extracto de *C. ficifolia* y glicina hubo una disminución en este parámetro. Una interpretación a este efecto se relaciona con la existencia de daño renal, que se ha utilizado como marcador bioquímico en esta patología, que genera la microalbuminuria. Aunque ésta no fue analizada, se define como presencia en la orina de 20 a 200 microgramos por minuto o 30 a 300 miligramos por 24 horas de la proteína más abundante en sangre, la albúmina (Iglesia de la Cruz *et al.*, 2003).

El análisis del efecto de la administración del extracto acuoso de *C. ficifolia* y glicina sobre la glicación de la albúmina mostró una disminución significativa sólo con glicina. El posible

mecanismo involucrado en este efecto parece relacionarse a que la glicina, podría estar actuando como señuelo o inhibidor de intermediarios durante la glicación, favorece la formación de glucosilglicina. Esto es, siendo la glicina un intermediario entre la glucosa y la albúmina (u otra proteína) provocaría la unión covalente del carbohidrato al aminoácido, como se muestra en la Figura 23 (Gugliucci, 2000).

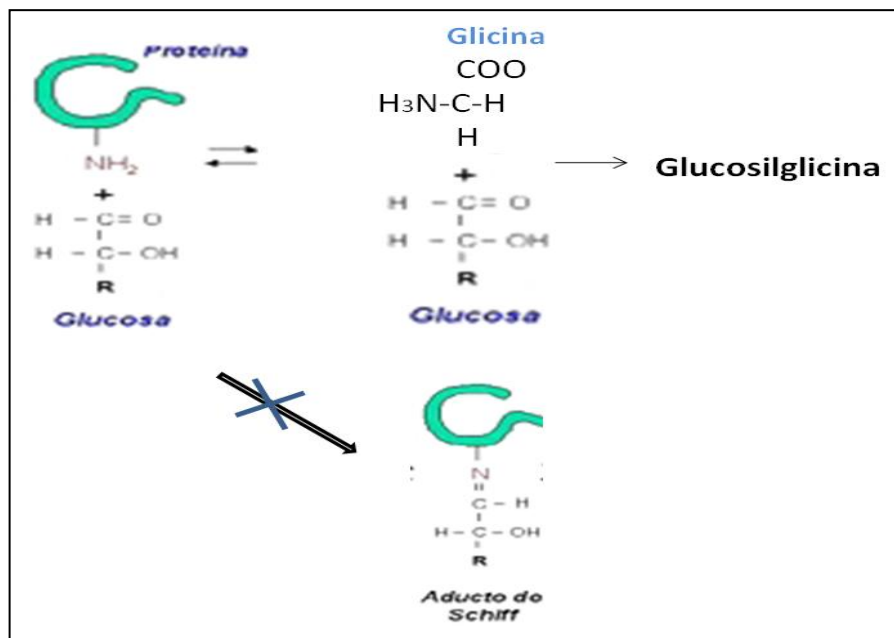


Figura 23. Mecanismo propuesto de inhibición del proceso de glicación mediado por la glicina y la posible formación del complejo glucosilglicina.

En cuanto a los ratones tratados con el extracto acuoso de *C. ficifolia*, éste provocó una tendencia ligera a disminuir la glicación de la albúmina. En este caso, es posible que un recambio rápido de la albúmina en estos ratones (promedio de 3 días en el ratón) y la remoción por vías urinarias de la albúmina glicada no permita cuantificar la concentración total y precisa de esta proteína. Por lo tanto, se podría evaluar la concentración de albúmina glicada en orina y compararla tanto entre ratones sanos y ratones diabéticos con tratamiento.

Finalmente, el análisis de los resultados en porcentaje de albúmina glicada señaló un importante descenso referido a una unidad porcentual en ratones tratados con glicina.

Este valor, se podría considerar de suma importancia, debido a que en el caso de la A1c la reducción en una unidad porcentual, se ha propuesto que tiene un impacto positivo en la reducción de las complicaciones relacionadas a la DM hasta en un 35%, y hasta en un 25% en las muertes relacionadas con la DM (Gugliucci, 2000).

La búsqueda de marcadores biológicos sobre el control metabólico durante la DM, o sobre el desarrollo o evolución del proceso de glicación, hizo posible analizar otras dos proteínas séricas, cuya participación o implicación en la enfermedad se ha hecho relevante en los últimos años. Este es el caso de las colinesterasas, cuya función biológica prioritaria se relaciona con la eliminación temporal precisa del neurotransmisor acetilcolina en las uniones neuromusculares o nerviosas. La existencia en casi todos los tejidos y fluidos ha supuesto una función depuradora de la acetilcolina circulante, que podría llevar a generar alteraciones fisiológicas, relacionadas a sus efectos muscarínicos y nicotínicos. No obstante, se ha establecido que la AChE participa en procesos de desarrollo, adhesión celular y relacionado su actividad con enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, Miastenia gravis y, más recientemente DM (Sanchez *et al.*, 2000 y 2001). Por su parte, la butirilcolinesterasa parece estar involucrada en desintoxicación de xenobióticos e insecticidas organofosforados y carbamatos (Iwasaki *et al.*, 2007).

Una primera evidencia encontrada sobre la posible participación de estas enzimas en la DM, fue hallar un aumento significativo en la actividad acetilcolinesterasa en los grupos diabéticos tratados con extracto de *C. ficifolia* y glicina, con respecto al grupo de ratones sanos con los mismos tratamientos. Por lo tanto el mecanismo por el que ocurrió esta diferencia podría relacionarse a una alteración en la expresión, regulación transcripcional, del gen AChE, o bien, a nivel de la síntesis de proteínas, degradación, ensamblado o procesamiento post-traducciona l de la enzima. Esta observación ha sido previamente informada en ratas Sprague-Dawley a las cuales se les indujo la DM experimental con estreptozotocina, donde se observaron cambios en la estructura de las formas ligeras de

la AChE (citado en Sánchez *et al.*, 2000). Aunque se debe tener en cuenta que la síntesis, ensamblado y procesamiento post-traducciona l de las colinesterasas son específicas de tejido y especie (Undurti, 2007).

En relación a lo anterior, en el suero de sujetos diabéticos tipo 2, no se han determinado cambios en la actividad de acetilcolinesterasa debido a la especificidad de la enzima y patología. Por lo tanto la evaluación de la actividad butirilcolinesterasa en el suero de los ratones sanos con tratamiento respecto a la actividad estimada en los ratones diabéticos tratados, mostró un incremento de dos veces en estos últimos. El mecanismo implicado podría ser alguno de los señalados para la AChE, o bien, que al ser la BuChE abundante en el suero, es mayor la probabilidad de glicación debido a los sitios posibles de glicación, por lo tanto estas modificaciones estructurales afecten las propiedades cinéticas de la enzima (Sánchez *et al.*, 2000). Recientemente se ha determinado que existe una fuerte relación en aumento de la actividad de la butirilcolinesterasa con el perfil inflamatorio de adipocitos, perfil de lípidos en suero y resistencia a la insulina (Iwasaky *et al.*, 2007). Cabe señalar que se ha observado que en pacientes diabéticos jamaiquinos y mexicanos la actividad de la butirilcolinesterasa se ve alterada (Raguobirsingh *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 2004). Sin embargo, la vía exacta que modifica la actividad de estas enzimas aún no es bien conocida (Dave *et al.*, 2002). Recientemente, en datos obtenidos en un modelo de glicación *in vitro*, se pudo analizar el incremento de glicación de las enzimas con respecto al tiempo en suero de pacientes sanos y en estado de hiperglucemia, reduciéndose la actividad hidrolítica de las ChEs y aumentando la glicación de las enzimas tanto de butiril- y acetilcolinesterasas (Pérez, 2008).

Debido a esto, se determinó el índice de glicación de las colinesterasas séricas usando como parámetro de evaluación la interacción con la matriz de ácido borónico (Liu, 2006). En cuanto a la actividad enzimática de la butirilcolinesterasa en ratones diabéticos con tratamiento, mostraron una baja retención a la matriz, que al parecer esta relacionado a

cambios conformacionales de las enzimas y, posiblemente, la reducción en la interacción con la matriz de ácido borónico en los ratones diabéticos tratados con glicina se deba al tratamiento, inhibiendo la glicación de la butirilcolinesterasa, como se encuentra reportado por Pérez (2008). En el que las enzimas glicadas *in vitro* y expuestas a glicina ocasiona la reducción en la interacción con la glucosa, disminuyendo consecuentemente la glicación. En cuanto a la acetilcolinesteras ninguno de los tratamientos redujo la glicación.

Una alternativa para esclarecer los cambios en la estructura de las colinesterasas en la diabetes, sería evaluar el procesamiento post-traducciona (glicosilación), debido a que en muchos estados patológicos inclusive el grado de alteración de la colinesterasas se ve afectado a nivel de maduración post-traducciona; esto se ha podido evidenciar por la alteración que puedan presentar estas enzimas en su patrón de glicosilación (Vidal, 1987). Una herramienta útil para analizar alteraciones en el patrón de glicosilación de las proteínas en estados alterados es mediante el empleo de las lectinas, las cuales se podría utilizar como una herramienta para pronosticar el impacto y la relevancia de las glicoproteínas en el área clínica y considerar algunas alteraciones en la glicosilación proteínica (Velan *et al.*, 1993).

15. CONCLUSIONES

C. ficifolia y glicina mejoraron la tolerancia a la glucosa en ratones sanos, observándose disminución en los niveles séricos de colesterol total.

C. ficifolia y glicina redujeron significativamente el consumo de alimento y el peso corporal en ratones diabéticos; mientras que el consumo de líquidos sólo fue reducido por el extracto de *C. ficifolia* en este mismo modelo.

C. ficifolia redujo la hemoglobina glicada en 1.1% en ratones diabéticos, mientras que glicina redujo en 1.3% los niveles de la albúmina glicada.

C. ficifolia no redujo la glicación de las Colineterasas, ni produjo alteraciones en su actividad.

La glicina también redujo la glicación de la butirilcolineterasa sin afectar su actividad.

La glicina no modificó la glicación de la acetilcolinesterasa sin embargo si disminuyó su actividad.

Los tratamientos con extracto de *C. ficifolia* y glicina alteraron el nivel de glicación de diferentes tipos de proteínas, dependiendo del tiempo de exposición, vida media de las proteínas, o concentración de las mismas, y debido a los mecanismos de acción diferentes característicos de cada tratamiento.

16.-BIBLIOGRAFIA

- Acosta P.J.L., Jiménez B.E., Juárez O.M.A., Díaz Z.J.C. Hypoglycemic action of *Cucurbita ficifolia* on Type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. *J. Ethnopharmacol* 2001. 77:99-101.
- Alarcón A.F., Hernandez G.E., Campos S.A., Xolalpa M.S., Rivas V.J., Vazquez C.L., Román R.R. Evaluation of the hypoglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* Bouché (Cucurbitaceae) in different experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 2002. 82:185-189.
- Almanza P.J., López C.E., Vázquez C.L., Banderas D.T., Román R.R., Alarcón A.F. Efecto de los extractos vegetales obtenidos de 5 plantas antidiabéticas sobre los niveles de glucosa e insulina en ratones sanos y diabéticos. 2º Congreso Nacional de Química médica. 2005.
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2008. *Diabetes Care.* 2008. 31:S12-S54.
- Armbruster D.A., Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. *Clin. Chem.* 1987. 12:2153-2163.
- Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976. 72:248-254.
- Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* 1995. 46:223-234.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001. 414:813-820.
- Buenrostro D. L., Miranda R. E. Guía práctica para el manejo de animales de laboratorio. UNAM. 1ªed. 1993. Pag.113.
- Campoy, F.M. Formas moleculares de acetilcolinesterasa de fracciones microsomales de músculo esquelético. Diferencias en su glicosilación e interacción con anticuerpos. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, España 1992.

- Catalán R.E., Martínez A.M., Aragonés M.D., Hernández, F. Molecular forms of BuChE in rat brain microvessels. *Neurosci. Lett.* 1990. 120:46-49.
- Carafoli E., Klee C. Calcium as a cellular regulator. Oxford University Press, New York, 1999.
- Carvajal G.S., Zamudio P.C., Carvajal- M.E.J., Juárez E.C.V. Prevención de los daños producidos por la diabetes mellitus y la senescencia *Gac. Méd. Méx.* 2007. 143:51-59.
- Cefalu WT, Parker TB. Validity of fructosamine as index of short-term glycemc control in diabetic outpatients. *Diabetes Care.* 1988. 11:662-667.
- Cerami A., Vlassara H., Brownlee M. Glucose and aging. *Sci. Am.* 1987. 9:82-88.
- Cetto A., Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes *J. of Ethnopharmacol.* 2005. 99:325-348.
- Committee Report. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification. *Diabetes Care.* 2000. 25:7-25.
- Committee Report. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification. *Diabetes Care.* 2008. 31:1-60.
- Cucuiano M. Serum gamma-glutamyltransferase and/or serum cholinesterase as Marker of the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 1999. 22:1381-1382.
- Czech P. M., Corvera S. Signaling Mechanisms That Regulate Glucose Transport. *J. Biol. Chem.* 1999. 274:1865-1878.
- Dave K.R., Katyare S.S. Effect of alloxan-induced diabetes on serum and cardiac butyrylcholinesterases in the rat. *J. Endocrinol.* 2002. 175:241-250.
- Díaz F.M., Baiza G. L., Ibáñez H.L., Pascoe L.D., Guzmán G.A., Kumate R.J. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Méd. Méx.* 2004. 140:437-446.
- Dronge A. Diabetes Control Benefits Surgery. *Arch. Surgery.* 2006. 141:375-380.

- Elizalde J.M. Estudio cuantitativo de la permeabilidad de la barrera hematoacuosa ocular como índice de actividad de la retinopatía diabética proliferativa. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 2003. 183 pag.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.J., Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961. 7:88-95.
- Esteyneffer J. Florilugio Medicinal. Academia Nacional de Medicina. México, 973 pag.
- Fernandez O. G., Rojas R., Aguilar S. C., Rauda J., Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la encuesta nacional de salud 2000. *Sal. Pub. Mex.* 2007. 49:331-337.
- Gannon M.C., Nutall F.Q. The metabolic response to ingest glycine. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002. 76:1302-7.
- Giannini G. E., Testa R., Savarino V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canad. Med. Assoc.* 2005.172:367-379.
- Goldstein D. E., Little R. R., Widmeyer H. M. Glycated hemoglobin: Methodologies and clinical applications. *Clin. Chem.* 1986. 32:64-70.
- Gómez O.J.L., López D.R., Ruiz G.G., Arellano M.A. Interacción de lectinas de las colinesterasas séricas de individuos con tolerancia a la glucosa oral alterada y sujetos diabéticos. *Diabetes hoy.* 2004. 37:895-898.
- Gómez-Olivares JL. Enzimas Colinesterasas. Alteraciones en su actividad en diversas patologías. Comunicación personal 2008.
- Gómez-Olivares JL. Propiedades estructurales de las colinesterasas de corazón, eritrocito e hígado de ratones normales y distróficos *lama 2*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia. España 2000.
- Gómez L. A., Navarrete E. M., García R. F., Galván G. F. Diabetes mellitus e hipertensión arterial. Costos en estudio de laboratorio. *Rev. Méd. IMSS.* 2004. 42:331-335.

- González F.L.F, Castello P R., Gagliardino J.J., Pablo J. F.C. Rossi. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al Día Internacional*. 2000. 3:1-17.
- Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *JAOA*. 2000.10:621-634.
- Guyton C.A., John E. H. Tratado de Fisiología Médica. McGRAW-HILL. España 1ª ed.1999: 640-643.
- Huebschmann A.G., Regensteiner J.G., Vlassara H., Reusch J.E. Diabetes and advanced glycosilation end products. *Diabetes Care*. 2006. 29:1420-1432.
- Henle T. Protein-bound advanced glycation end products (AGEs) as bioactive amino acid derivates in foods. *Amino Acids*. 2005. 29:313-322.
- Hernández E.G., Efrain A.C.S., Román R.R., Alarcón AF., Lara L.A, Flores S.J.L. Acute toxicological study of *Curcubita ficifolia* juice in mice. *Proc. West. Pharmacol. Soc*. 2002. 45:42-43.
- Hernández F. Historia Natural de la Nueva España. En: UNAM (Ed.) Obras Completas, Tomo II. México. 1959.
- Hugués-H.B, Rodríguez-G.J.C, Rodríguez-G y Marrero R.M.T. Animales de experimentación como modelos de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Cub. Endocrinol*. 2002. 13:160-168.
- Iglesias de la Cruz M.C., Chen S., Ziyadeh F.N., Pancorbo A. Patogenesis de la Nefropatía Diabética. *Ciencia al Día*. 2003. 5:1-14.
- Ikejima K., Qu W., Stachlewitz RF., Thurman RG. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am. J. Physiol*. 1997. 272:1581-1586.
- Iwasaky T., Yoneda M., Nakajima A., Terauchi Y. Serum butiricholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Japan. Social. Inter. Med*. 2007. 25:1633-1639.
- Johonson R.N., Metcalf P.A., Baker J.R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta* 1982. 127:87-95.

- Katz B. Nerve, muscle and synapse. McGraw Hill, New York. 1966.
- Katchalsky A., Sharon N. Kinetics of aldose-amino acid interaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1953. 10:290-301.
- King H., Aubert R.E., Herman W.H. Global Burden of Diabetes, 1995-2025 Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care.* 1998. 21:1414-1431.
- Kowluru, R.A., Heidorn, D.B., Edmondson, S.P., Bitensky, M.W., Kowluru, A., Downer, N.W., Whaley, T.W. Trehella, J. Glycation of calmodulin: chemistry and structural and functional consequences. *Biochemistry.* 1989. 28:2220-2228.
- Lapolla A., piarilli F., Sartore G., Ceriello A., Ragazzi E., Reitano R., Bacarin L., Laverda B., Fedele D. Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease. *Diabetes Care.* 2007. 30:670-676.
- Lezcano M.D., Terán O.L., Carvajal S.G., Gutiérrez de la Cadena M., Terán E.D., Estrada P.S. Effect of glycine in the immune response of the experimentally diabetic rats. *Rev. Alerg. Méx.* 2006. 53:212-216.
- Li X., Bradford B.U., Wheeler M.D., Simpson S.A., Pink M.H., Brodie A.T., Schwab J. H., Thurman R.G. Dietary glycine prevents peptidoglycan polysaccharide-induced reactive arthritis in the rat: role for glycine-gated chloride channel. *Infect. Immun.* 2001. 69:5883–5891.
- Liu X. C. Boronic acids as ligands for affinity chromatography. *Chin. J. Chromatogr.* 2006. 24:73-78.
- Lockridge O., Bartels C.F., Nogueira C.P., Arpagaus M., Adkins S., LaDu B.N. Nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. En: *Cholinesterases: structure, function, mechanism, genetics and cell biology.* Am. Chem. Soc. Washington, D.C.1991. p. 193.
- Ludvigsen W. C., Sprague G., Smith M. K. Fructosamine clinical usefulness and determination of reference ranges. *J. Insur. Med.* 1989. 21:203-208.
- Lyons T., Jenkins A. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr. Opin. Lipidol.* 1997. 8:174-80.

- Mancilla A.L.G., Gómez-P.F.J. Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus. Conceptos actuales. Rev. Endocrinol. Nutr. 2002. 10:63-68.
- Maillard LC. Condensation des acides aminés sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique. CR Acad. Sci. 1912. 154:66-68.
- Nachmansohn, D., Neumann, E. Chemical and molecular basis of nerve activity. Academic Press, New York. 1975.
- Nakaya Y., Minami A., Harada N., Sakamoto S., Niwa Y., Obnaka M. Taurine improves insulin sensitivity in the Otsuka Longs-Evans Tokushima fatty rat, a model of spontaneously type 2 diabetes. Am. J.Clin. Nutr. 2000. 71:54-58.
- Olivares R., Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. REB. 2008. 27: 9-18.
- Osterman G.M.S., Vesper W.H. Assessment of the relationship between glucose and A1c using kinetic modeling. J. Diab. Complic. 2006. 20:285-294.
- Paroni R., Ceriotti F., Galanello R., Leoni B. G., Panico A., Scurati E., Paleari R., Chemello L., Quaino V., Scaldaferrri L., Lapolla A., Mosca A. Performance Characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma. Clin. Biochem. 2007. 40:1398-1405.
- Pérez Aguilar Benjamín. Análisis de glicación in vitro de la butirilcolinesterasas en suero humano. Tesis profesional 2008.
- Phillips J.P. A1C- frequently asked questions. Aust. Fam. Phys. 2005. 34:663-667.
- Pineda S.Y. Estudio de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y catalasa en eritrocitos de ratas diabéticas tratadas con glicina. Tesis. Universidad Autónoma de México. 2004. 37pp.
- Pratt S.D., Marshall M. K. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. N. Eng. Jour. Med. 2000. 342:1266-1271.
- Raguobirsingh O., Bharaj B,J., Morrison E,Y. Change in serum cholinesterase activity in Jamaican diabetics. J. Nat. Med. Assoc. 1992. 84:853-855.

- Ramakrishnan S., Sulochana K.N. Decrease in glycation of lens proteins by lysine and glycine by scavenging of glucose and possible mitigation of cataract genesis. *Exp. Res.* 1993. 57:623-628.
- Rao A.A., Sridhar R.G., Das N.U. Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Med. Hypot.* 2007. 69:1272-1276.
- Rosenberry T.L. Quantitative simulation of endplate currents at neuromuscular junctions based on the reaction of acetylcholine with acetylcholine receptor and acetylcholinesterase. *J. Biophys.* 1979. 26: 263-290.
- Román R.R., Flores S.J.L., Partida H.G., Lara L.A., Alarcón A.F. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch. Invest. Med.* 1991. 22: 87-93.
- Román R.R., Alarcón A.F., Lara L.A., Flores S.J.L. Hipoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Arch. Med. Res.* 1992. 23:105-109.
- Román R.R., Flores S.J.L., Alarcón A.F. Anti-hyperglycemic effect of some edible plant. *J. Ethnopharmacol.* 1995. 48:25-32.
- Ruiz-Espejo, F., Cabezas-Herrera, J., Illana, J., Campoy, F.J., Muñoz-Delgado, E., Vidal, C.J. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. *C. Res. Treat.* 2003. 80:105–114.
- Sáez-Valero, J., Vidal, C.J. Biochemical properties of acetyl- and butyrylcholinesterase in human meningioma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. 1317:210-218.
- Sánchez Chávez.G., Salceda R. Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterases in the rat retina. *IUBMB. Life.* 2000. 49:283-287.
- Sánchez Chávez.G., Salceda R. Acetyl- and butyrylcholinesterase molecular forms in normal and streptozotocin-diabetic rat retinal pigment epithelium. *Neurochem. Inter.* 2001.39:209-215.
- Schultz R. Proteínas Fisiológicas. En: Devlin T. Barcelona: Reverté; 1993. pag. 95-133.

- Siv M., Golkar O., Vesper H. W. Assessment of the relationship between glucose and A1C using kinetic modeling. *J. Diab. Comp.* 2006. 20:285-294.
- Skudelski T. The mechanism of alloxana and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001. 50:536-546.
- Sridhar GR, Nirmala G, Allam A, Madhavi AS, Sreelatha S, Sudha R., Vijayalakshmi P. Serum butyrylcholinesterase in type 2 diabetes mellitus: a biochemical and bioinformatics approach. *Lipids in Health and Disease.* 2005. 4:18-22.
- Srivastava S.K., Ansari N.H., Bhatnagar A., Hair G., Liu S., Das B. Activation of aldose reductase by nonenzymatic glycosylation. *Progr. Clin. Biol. Res.* 1989. 304:171-184.
- Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B. Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology.* 1999. 29:737-745.
- Undurti N.D., Acetylcholinesterase and butirilcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Med. Sci. Monit.* 2007. 13:214-221.
- Vlassara H., Brownlee M., Cerami A. Myelin by Macrophages increases with the presence of advanced glycosylation end products. *J. Exp. Med.* 1984. 160:197-206.
- Vásquez A. N., Zamudio P., Cerón E., Vanda B., Zenteno E., Carvajal S. G. Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 2003. 134:521-527.
- Vásquez A. N., Lascurain R., Cerón E., Vanda B., Carvajal S. G., Tapia A., Guevara J., Montaña F., Zenteno E. Oral Glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences.* 2006. 79:225-232.
- Velan B., Kronman Ch., Ordentlich A., Flashner Y., Leitner M., Cohen S., Shafferman A. N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *J. Biochem.* 1993. 296:649-656.
- Vidal C.J Glycosilation of cholinesterases and its alteration in some pathological processes. *Recent. Res. Dev. Neurochem.* 1996. 1:37-54.
- Vlassara H., Brownlee M., Cerami A. Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation end products. *J. Exp. Med.* 1984. 160:197-207.

- Werman R., Davidoff, R. A., Aprison, M.H. Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature*. 1967. 214:681-683.
- Xia T., Wang Q. D-Chiro-Inositol found in *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extracts plays the hypoglycaemic role in streptozotocin diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 2006. 58:1527-1532.
- Xia T., Wang Q. Antihyperglycemic effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Fitoterapia*. 2006. 77:530-537.
- Xia T., Wang Q. Hypoglycaemic role of *Cucurbita ficifolia* (Cucurbitaceae) fruit extract in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Sci. Food. Agric.* 2007. 87:175-1757.
- Xolalpa S. Tesina. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México. 1990, 150p.
- Xolalpa, S., Aguilar, A. La herbolaria Mexicana en el tratamiento de la diabetes. *Ciencia*. 2002. July–September. 24–35.
- Yap A., Nishiumi S., Yoshida K. Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology*. 2007. 55:103–108.
- Yin M., Ikejima K., Arteel G.E. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998. 286:1014-1019.
- Zacarías C.R, Rosas G.J. Complicaciones microvasculares en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Endocrinol. Nutr.* 2004. 12:s31-s44.
- Zimmet P., Alberti K., Shaw J. Global and societal implication of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001. 414:782-787.
- Zhong Z., Wheeler MD., Li X., Froh M., Schemmer P., Yin M., Bunzendaal H., Bradford B., Lemasters J. L-Glycine a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2003. 6:229-240.

Anexo

1. Descripción de las técnicas del estudio bioquímico

1.1. Cuantificación de triglicéridos

Es realizada mediante la acción catalítica de una esterasa, los triglicéridos se hidrolizan a glicerol y ácido graso libre. El glicerol es fosforilado mediante la enzima glicerolcincasa (GK) y adenosin trifosfato (ATP) a L- α -glicerol-fosfato. Este último es oxidado bajo la catálisis de la enzima L- α -glicerol-fosfato-oxidasa (GPO) por el oxígeno del aire, a hidroxiacetonafosfato. El peróxido de hidrógeno formado simultáneamente oxida un indicador redox bajo la acción catalítica de la peroxidasa. Resulta un color azul cuya intensidad se hace cada vez más profunda y que es proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra, donde la absorbancia fue medida a 612 nm de longitud de onda.

1.2. Cuantificación de colesterol

Se realizó bajo la acción catalítica de la enzima colesterol esterasa, los ésteres de colesterol son hidrolizados en colesterol y el respectivo ácido graso. Mediante la enzima colesterol oxidasa, el colesterol libre es oxidado en presencia de oxígeno a colesteno, formándose al mismo tiempo peróxido de hidrógeno. Este último oxida al indicador 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en presencia de peroxidasa, a un colorante azul cuya concentración es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra. La absorbancia fue medida a 642 nm de longitud de onda.

1.3. Cuantificación de las enzimas hepáticas: transaminasas glutámico oxaloacética (GOT) y glutámico pirúvica (GPT)

La TGO cataliza la reacción de α -cetoglutarato y ácido alaninisulfínico a piruvato y glutamato. En la segunda reacción el piruvato formado se hidroliza bajo la acción de piruvato oxidasa a acetilfosfato anhídrico carbónico y peróxido de hidrógeno. Posteriormente, en presencia de peróxido oxidasa, forma un color azulado, cuya formación se puede seguir en un espectrofotómetro a 567 nm de longitud de onda. La medición de la enzima GPT se llevó a cabo en dos reacciones, primero, ésta cataliza la reacción de α -cetoglutarato y alanina piruvato y glutamato. En la segunda reacción el piruvato formado se hidroliza bajo la acción de la piruvato oxidasa a acetilfosfato, anhídrico carbónico y peróxido de hidrógeno. En presencia de la peroxidasa, el peróxido oxida la forma reducida e incolora del indicador a la forma azul y a través de una medición a 567 nm de longitud de onda, siguiendo el desarrollo del colorante, se refleja la actividad enzimática de la transaminasa.

2. Cuantificación de hemoglobina glicada

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, la hemoglobina A1c se forma por la glicosilación no enzimática de la porción N-terminal de la cadena β de la hemoglobina A₀. El nivel de la hemoglobina A1c es proporcional al nivel de la glucosa en la sangre durante un periodo aproximado de dos a tres meses (Osterman *et al.*, 2003; Phillips, 2005). Por lo tanto, la hemoglobina A1c ha sido aceptada como indicador de la concentración media diaria de la glucemia en los dos meses precedentes. Estudios previos han demostrado que los niveles obtenidos mediante la determinación regular de hemoglobina A1c conducen a cambios en el tratamiento de la diabetes y a mejorar el control metabólico, que se traducen en una disminución de los niveles de hemoglobina A1c.

En este análisis se determinó la concentración de hemoglobina A1c, y la de hemoglobina total y la relación entre ambas nos, puede brindar el porcentaje de hemoglobina A1c.

Para la determinación de hemoglobina total se utiliza ferricianuro potásico, el cual oxida a la hemoglobina de la muestra transformándola a metahemoglobina. La metahemoglobina forma entonces un complejo con el tiocianato, formándose tiocianmetahemoglobina, la sustancia coloreada cuya intensidad de color se mide a 531 nm de longitud de onda y es proporcional a la concentración de hemoglobina total de la muestra.

Para la medida específica de A1c se utilizó la inhibición de la aglutinación de partículas de látex. Un aglutinador (polímero sintético) que contiene múltiples copias de la porción inmunoreactiva de la A1c y que produce aglutinación de partículas de látex recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón, específico para A1c.

3. Cuantificación de albúmina glicada

En los últimos años se han desarrollado diferentes métodos para medir proteínas glicadas. Entre los que se encuentran la cromatografía de afinidad, métodos espectrofotométricos basados en la reacción del ácido tiobarbitúrico, cromatografía líquida de alta resolución, métodos inmunoradiométricos, entre otros.

En este trabajo se valoró la albúmina glicada por el método propuesto por Johnson (1982). El cual se basa en la reducción en medio alcalino de las sales de azul de nitrotetrazolio (NBT) por parte de las proteínas glicadas sérica, originando formazán, cuya formación es proporcional a la concentración sérica de proteínas glicadas, en este caso, la albúmina.

Para semipurificar la albúmina, se llevó a cabo la extracción de esta con solventes orgánicos (Pineda, 2004). Para esto, se emplearon 100 µl del suero de cada uno de los ratones y se les adicionó 100 µl de la solución de etanol-cloroformo 3:1; la mezcla se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, para sedimentar la hemoglobina y

no tener absorbancia por este parámetro. A continuación, la mezcla se centrifugó a 14000 g durante 15 minutos, el sobrenadante se utilizó para la determinación del contenido de albúmina y albúmina glicada.

Para la cuantificación de albúmina glicada se preparó la sal de NBT a 0.574 mM, que se disolvió en un amortiguador de carbonato a una concentración de 0.2 M a pH 10.3. El procedimiento realizado se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Método para cuantificación de albúmina glicada

Tubo	H ₂ O (destilada)	Muestra (suero)	NTB 0.574mM
Blanco	225 µl	0 µl	1.3 ml
Control	205 µl	20 µl	1.3 ml
Problema	205 µl	20 µl	1.3 ml

Finalmente, el cambio de absorbancia a 530 nm de longitud onda se midió en el intervalo de 10 a 13 minutos después de iniciada la reacción, esperando que la albúmina glicada redujera las sales de NBT, mostrando el cambio de color.

3.1 Cuantificación de la albúmina sérica por el método de cresolsulfonftaleína (verde de bromocresol)

Para cuantificar la concentración de albúmina, las muestras de suero se pusieron a reaccionar específicamente con la forma aniónica del 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfonftaleína, en presencia de un exceso de colorante y en solución amortiguadora a pH 3.9. El aumento de absorbancia a 620 nm de longitud de onda, respecto del blanco, es proporcional a la cantidad de albúmina presente en las muestras.

Para establecer la concentración de albúmina glicada se realizó una curva de calibración de la siguiente manera: a partir de un estándar puro de albúmina con 3% de glicación, se

preparó una solución patrón de 20 mg/ml. De esta se tomaron diferentes volúmenes como se indica en el cuadro de abajo. Las lecturas fueron tomadas a 530 nm. La curva se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Curva patrón de albúmina glicada

Ensayo	H ₂ O (destilada)	Muestra (suero)	NTB 0.574mM
1	4 ml	0	1.3 ml
2	0.390 ml	10 µl	1.3 ml
3	0.380 ml	20 µl	1.3 ml
4	0.370 ml	30 µl	1.3 ml
5	0.360 ml	40 µl	1.3 ml
6	0.350 ml	50 µl	1.3 ml

3.2 Determinación del contenido de proteínas séricas totales

Para la determinación del contenido de proteínas en suero de los distintos grupos de ratones, se empleó el método de Bradford (1976). Éste es un ensayo de unión proteína-colorante basado en el cambio de color en respuesta a varias concentraciones de proteína. La determinación del contenido de proteínas se relaciona a la unión de Azul Brillante de Coomassie G-250 con los residuos de Arg y, en menor grado, con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe de la proteína. La unión del Azul Brillante de Coomassie G-250 a las proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. El colorante existe en dos formas con colores diferentes, rojo y azul. La forma roja se convierte en azul cuando se une el colorante a la proteína.

Para valorar proteínas se usó un micrométodo, para lo que se elaboraron dos curvas de calibración usando albúmina de suero bovino como proteína estándar. Se prepararon dos soluciones; una con 5 µg/10 mL y otra con 28.2 µg/10 mL, se repartieron los volúmenes de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µL y se completaron a 10 µL con agua bidestilada. Los volúmenes de muestra (de dilución 1:10) fueron de 10 µL. Cada muestra se preparó, como mínimo, por

triplicado. Se agregaron 200 μL del reactivo de Bradford a cada una de las muestras y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. La absorbancia se leyó 595 nm de longitud de onda.

4. ESTIMACIÓN DE LA ACTIVIDAD COLINESTERÁSICA EN SUEROS DE RATONES SANOS Y DIABÉTICOS

La actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) se valoró mediante el método espectrofotométrico de Ellman y colaboradores (1961), utilizando los tioanálogos de los sustratos naturales; acetiltiocolina (ATCh) y butiriltiocolina (BuTCh), respectivamente. En este método se aprovecha la capacidad del cromógeno ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para oxidar a los grupos tioles libres. Aunque, la especificidad de la colinesterasas hacia su sustrato específico es elevada, fue conveniente usar inhibidores selectivos. Por ello, cuando se realizó la estimación de la actividad se incorporó a la mezcla de reacción Tetraisopropilpirofosforamida (Iso-OMPA), inhibidor relativamente selectivo para la BuChE. Cuando se determinó la actividad BuChE había en la mezcla de reacción Dibromuro de 1,5-bis-alildimetilamoniofenil-pentan-3-ona (BW284C51), siendo un inhibidor selectivo AChE.

Las ChEs hidrolizan los ésteres de la acetil- o butiriltiocolina, liberando acetato o butirato, respectivamente, y la propia tiocolina, que reacciona rápidamente con el DTNB, produciendo el anión 5-tio-2-nitrobenzoato, que presenta un color amarillo intenso y un máximo de absorbancia a 412 nm de longitud de onda, lo que facilita su medida en espectrofotómetro (Ruiz-Espejo *et al.*, 2002).

4.1. Medida de la actividad colinesterásica en espectrofotómetro

La medida de AChE en espectrofotómetro se realizó en un espectrofotómetro Lambda 2 (Perkin Elmer, E.U.A.), a 20 °C. El medio de reacción contenía amortiguador fosfato 100

mM, pH 8.0 con DTNB 0.33 mM, ioduro de acetil- o butiriltiocolina 1 mM, y el inhibidor respectivo: Iso-OMPA 50 μ M o BW284C51 10 μ M (Sáez-Valero *et al.*, 1993).

Para las valoraciones se usaron cubetas de cuarzo de 1.5 mL en las que se depositaron, secuencialmente y siempre en el mismo orden, la disolución de DTNB, el inhibidor de colinesterasa a determinar y la muestra (25 μ L), hasta completar un volumen de 1 mL. Tras agitar la cubeta, la mezcla de reacción se incubó durante 20-30 minutos, para que el DTNB reaccionara con los grupos tioles existentes en la muestra. Transcurrido este tiempo, se comprobó que la absorbancia a 412 nm se mantuviera constante, y entonces se añadieron 25 μ L del análogo del sustrato (acetil- o butiriltiocolina) para iniciar la reacción; la mezcla se agitó por inversión y se registró la absorbancia a 412 nm frente a una cubeta "blanco" que contenía todos los reactivos, excepto la muestra, sustituyendo su volumen por amortiguador fosfato.

4.2. Determinación de la actividad colinesterásica en microplaca de titulación

La actividad colinesterásica obtenidas de las interacciones con matrices de afinidad (lectinas o ácido borónico) se determinaron por el método de Ellman y colaboradores (1961) adaptado a un microensayo (Campoy, 1992). Para ello se utilizaron placas de microtitulación de material plástico transparente (Nunc, E.U.A), con 96 pocillos de 400 μ l y con un fondo plano. Las concentraciones de los reactivos (sustrato, inhibidor de ChE y DTNB) empleadas fueron las mismas de la valoración en cubeta, pero ahora el amortiguador de fosfatos a pH 7.5. De este modo, para un volumen final de 275 μ l, se depositaron en los pocillos 25 μ l de muestra, 225 μ l del medio de reacción (amortiguador fosfato 100 mM conteniendo DTNB 0.39 mM y el inhibidor de cada enzima a la concentración adecuada), y finalmente 25 μ l de sustrato (a la concentración de 11 mM). Antes de añadir el sustrato, cada una de las muestras se incubó con los reactivos durante 20-30 min para eliminar las interferencias de DTNB con los grupos tioles de las proteínas.

El cambio de absorbancia, debido a la hidrólisis espontánea del sustrato, se valoró en varios pocillos “blancos”, a los que se les añadió el buffer de fosfato en lugar de muestra. La reacción comenzó cuando se añadieron los análogos de los sustratos respectivos, e inmediatamente después se realizó la lectura de la placa, correspondiendo al tiempo cero, seguida de varias lecturas a diferentes tiempos, mientras se desarrollaba la reacción. La placa se mantuvo a temperatura ambiente durante todo el tiempo de reacción. Los cambios en absorbancia se registraron en un lector de placas (Molecular Devices, E.U.A.), empleando el modo dual de lectura de absorbancia a 405 nm y 620 nm, y proporcionando el valor de la diferencia $A_{405}-A_{620}$; al restar el valor A_{620} se eliminaron las posibles interferencias debidas al plástico de la placa. Finalmente, se determinó el aumento en la absorbancia por minuto y se eliminó la hidrólisis espontánea del sustrato (pocillos “blancos”).

La actividad enzimática se expresó en unidades arbitrarias (U.A.), de modo que una unidad de este tipo, representa un aumento en $A_{405}-A_{620}$ de 0.001 por minuto y por cada μl de muestra, a temperatura ambiente y en las condiciones de ensayo.

El método del microensayo presenta varias ventajas respecto a la medida en cubeta. La enzima se valora con una mejor relación muestra/reactivos y a tiempos mayores. Además, se reduce el tiempo invertido en los experimentos, pudiéndose procesar hasta 600 muestras diarias. Por otra parte, se ahorran muestra y reactivos, por el menor volumen de reacción.

5. Cromatografía de afinidad con matriz de ácido borónico

El gel inmovilizado de ácido borónico es un sencillo soporte para la purificación de nucleótidos y otras pequeñas moléculas de bajo peso molecular o proteínas glicadas como la hemoglobina (Liu., 2006), las cuales contienen grupos cis-diol. El ligando (ácido m-aminofenilborónico) une los grupos cis-diol en las porciones de los azúcares tanto de

nucleótidos como de los azúcares que se incorporaron a las proteínas glicadas formando un compuesto reversible de 5 anillos y posteriormente despegando las moléculas de la matriz con una solución de sorbitol como se muestra en la (Figura 24)

La matriz de ácido borónico se equilibró como amortiguador de acetato de amonio, pH 10.4. Posteriormente, se añadieron 200 µl de suero de ratones sanos y diabéticos, dejándolos interaccionar con la matriz durante 16 h en agitación constante a 4 °C, la fracción no ligada que correspondió a colinesterasas no glicadas, se colectaron por centrifugación a 10,000 g en una microcentrifuga (Eppendorf, Alemania). Se lavó el gel extensivamente. La matriz se incubó en un amortiguador de sorbitol 0.2 M pH 8.0, bajo las condiciones antes descritas, para despegar las colinesterasas ligadas a la matriz.

Las muestras se colectaron por centrifugación como se describió antes. Finalmente, la actividad colinesterásica se determinó en las fracciones no retenidas y retenidas mediante el procedimiento del apartado respectivo.

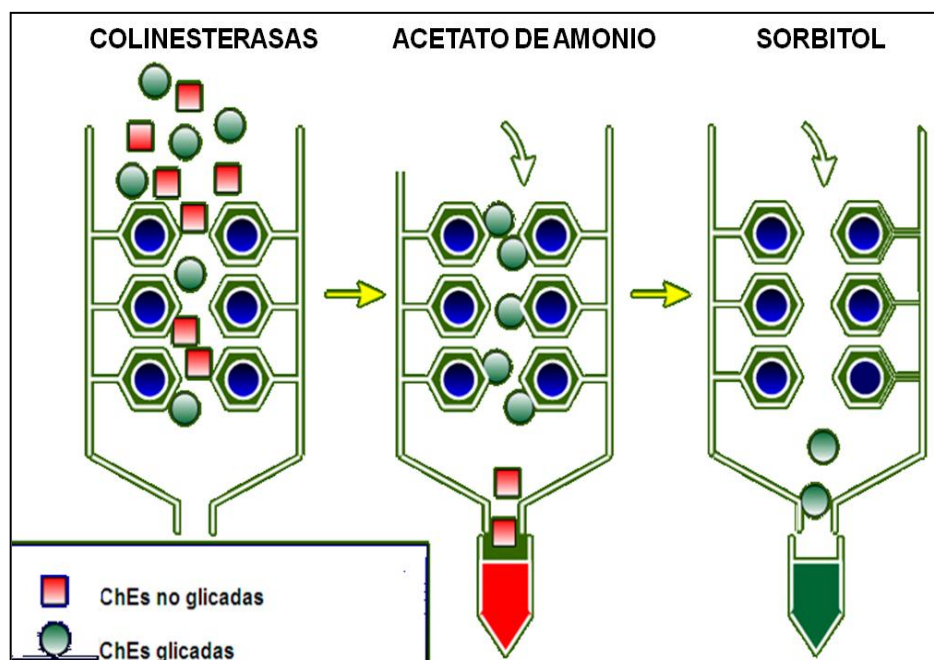


Figura 24. Interacción de las colinesterasas con la matriz de ácido borónico con los sueros de ratones sanos y diabéticos en los diversos tratamientos. El lavado extensivo con acetato de amonio para equilibrar la matriz de afinidad y para arrastrar a las colinesterasas no glicadas. El amortiguador con sorbitol sirvió para despegar a las colinesterasas glicadas. La actividad colinesterásica se estimó por el micrométodo descrito en el apartado de métodos.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00046

Matricula: 206380337

EFFECTO DE LA GLICINA Y
CUCURBITA FICIFOLIA BOUCHE
SOBRE LA GLICACION DE
PROTEINAS

En México, D.F., se presentaron a las 9:00 horas del día 15 del mes de junio del año 2009 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. RUBEN ROMAN RAMOS
DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES
DRA. MARGARITA DIAZ FLORES
DRA. GENOVEVA DURAN REYES



NOE SALINAS ARREORTUA
ALUMNO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: NOE SALINAS ARREORTUA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE FRANCISCO FLORES PEDROCHE

PRESIDENTE

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

VOCAL

Rocio Salceda S.
DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

VOCAL

Margarita Diaz Flores
DRA. MARGARITA DIAZ FLORES

SECRETARIO

Genoveva Duran Reyes
DRA. GENOVEVA DURAN REYES