

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



**“Efecto de *Tillandsia usneoides* Linneo sobre la síntesis y secreción de
insulina en células RINm5F”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

Biól. Exp. JANET ALEJANDRA ESPEJEL NAVA

Codirectoras:

Dra. Clara Ortega Camarillo

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva

Asesor:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Marzo 2014

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT y CVU del becario 266046 y 421006

Se agradece el apoyo económico brindado por el IMSS con el número de folio 068-2013.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada “Efecto de *Tillandsia usneoides* Linneo sobre la síntesis y secreción de insulina en células RINm5F”, que presentó **Janet Alejandra Espejel Nava**

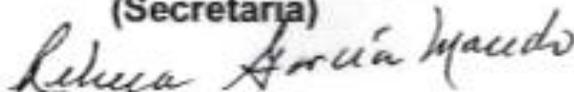
El día 14 de Marzo del año 2014

Sinodales

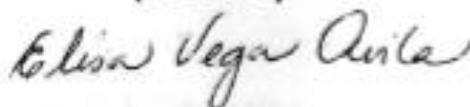
Dr. Francico Javier Alarcón Aquilar
(Presidente)



Dra. Rebeca García Macedo
(Secretaria)



Dra. Elisa Vega Ávila
(Vocal 1)



Dr. Gerardo Blancas Flores
(Vocal 2)



Comité tutorial

Codirectora

Dra. Clara Ortega Camarillo

UIM Bioquímica, Hospital de Especialidades, CMN SXXI, IMSS

clara.ortegacamarillo@gmail.com

Tel: 56 27 69 00 ext. 21 477

Codirectora

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva.

Depto. Ciencias de la Salud D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Lab. de Farmacología

mcev@xanum.uam.mx

Tel: 58 04 64 83

Asesor

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Dpto. Ciencias de la Salud. D.C.B.S.

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Lab. de Farmacología

aaasj2@prodigy.net.mx

Tel: 58 04 28-36

DEDICATORIA

A mi hijo José Alejandro

AGRADECIMIENTOS

*A Dios,
por permitirme llegar a la culminación de esta meta y por poner en mi
camino a personas tan maravillosas.*

*A mi hijo Ale,
por ser el motor que mueve mi vida, mi tesoro más grande y por todas
esas horas de espera afuera del hospital.*

*A mi abuelita, la Sra. María Teresa Blancas González,
por su amor y apoyo infinitos, y porque gracias a ella soy lo que soy.*

*A mi madre, la Sra. Taryn Nava Contreras,
por todo su amor, apoyo y comprensión, y por calmarme en momentos
de estrés.*

*A la Dra. Clara,
por todo su apoyo, comprensión, tolerancia y paciencia, porque sin ella
este trabajo simplemente no hubiese sido posible.*

*Al Dr. Francisco Alarcón y a la Dra. Carmen Escobar,
por su apoyo y comprensión.*

*A la Dra. Elisa Vega,
por su amistad y apoyo en todo momento*

*A las Dras. Rebeca García y Margarita Díaz,
por sus valiosas observaciones y consejos.*

*A mi tía, la Dra. Patricia Ramírez Romero,
por ser un pilar fundamental tanto en mi formación académica como
en mi vida personal.*

*A Gustavo,
por su comprensión y tolerancia.*

*A mis amigas del laboratorio Ángeles, Selene, Nayelí, y Caro,
por su paciencia y amistad, a Eli Miranda, por estar siempre dispuesta
a ayudarme*

*A mi padre, el Dr. José Alejandro Espejel Blancas,
por dejar de creer en mí, porque con eso, me diste alas para volar más
alto, y aquí estoy!*

ÍNDICE

Índice de figuras.....	11
Abreviaturas.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	15
1. Introducción	
1.1 Definición de diabetes mellitus (DM) y sus complicaciones.....	17
1.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus (DM).....	18
1.3 Prevalencia de la Diabetes Mellitus (DM).....	19
1.4 Diabetes Mellitus tipo 2(DT2).....	20
1.5 Fisiología de la célula β	21
1.6 Insulina.....	23
1.6.1 Mecanismo de secreción de la insulina inducida por glucosa y la importancia del Ca^{2+} intracelular.....	24
1.7 Tratamientos farmacológicos.....	29
1.7.1 Hipoglucemiantes orales.....	29
1.7.1.1 Sulfonilureas (SU).....	29
1.7.1.2 Meglitinidas.....	29
1.7.1.3 Tiazolidinedionas (Glitazonas).....	30
1.7.1.4 Biguanidas.....	30

1.7.1.5 Inhibidores de la alfa- glucosidasa.....	31
1.7.1 6 Incretinas.....	31
1.7.1.7 Inhibidores de la dipeptidilpeptidasa (DPP-IV).....	33
1.7.2 Insulinoterapia.....	33
2. Antecedentes	
2.1 Plantas medicinales.....	34
3. Justificación.....	37
4. Hipótesis.....	38
5. Objetivo general.....	39
6. Objetivos particulares.....	39
7. Materiales y método.....	39
7.1 Material vegetal.....	39
7.2 Obtención del extracto acuoso.....	40
7.3 Efecto hipoglucémico.....	40
7.4 Cultivo de la línea celular RINm5F.....	41
7.5 Viabilidad celular (prueba de azul de tripano).....	41
7.6 Funcionalidad celular (Prueba de MTT).....	43
7.7 Extracción de ARN total.....	43
7.7.1 Cuantificación de la expresión del ARNm de insulina. Transcripción en Reversa acoplada a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en tiempo real.....	44
7.8 Cuantificación de la secreción de insulina por el método de ELISA.....	45

7.9 Cuantificación intracelular de Ca^{2+}	46
7.9.1 Cuantificación de proteínas.....	47
7.9.2 Análisis estadístico.....	47
8.- Resultados	
8.1 Efecto hipoglucémico del extracto acuoso de <i>Tillandsia usneoides</i>	48
8.2 Viabilidad y funcionalidad celular.....	49
8.2.1 Prueba de viabilidad celular por azul de tripano en las células RINm5F.....	49
8.2.2 Prueba de funcionalidad celular en las células RINm5F por MTT.....	50
8.3 Extracción de ARNm de células RINm5F.....	51
8.4 Expresión del gen de insulina.....	53
8.5 Cuantificación de la secreción de insulina.....	54
8.6 Cuantificación de Ca^{2+} intracelular.....	56
9. Discusión	
9.1 Efecto hipoglucémico del extracto acuoso de <i>Tillandsia usneoides</i>	57
9.2 Pruebas de funcionalidad y viabilidad celular.....	60
9.3 Expresión del gen de insulina y secreción en las células RINm5F	61
9.3.1 Importancia del Ca^{2+} en la célula β	64
10. Conclusiones	66
11. Referencias bibliográficas	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de secreción de insulina
Figura 2	<i>Tillandsia usneoides</i> Linneo
Figura 3	Obtención del extracto acuoso de <i>T. usneoides</i>
Figura 4	Secuencia de los primers de insulina y β -actina
Figura 5	Efecto hipoglucémico de <i>T. usneoides</i>
Figura 6	Prueba de viabilidad celular
Figura 7	Prueba de funcionalidad celular
Figura 8	Análisis de integridad del ARN total
Figura 9	Expresión del ARNm de insulina con 11mM de glucosa
Figura 10	Expresión del ARNm de insulina con 30 mM de glucosa
Figura 11	Secreción de insulina con 11mM de glucosa
Figura 12	Secreción de insulina con 30 mM de glucosa
Figura 13	Contenido de Ca^{2+} intracelular

ABREVIATURAS

ADA:	Asociación Americana de Diabetes
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc:	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ATP:	Adenosin trifosfato
Ca²⁺:	Ión Calcio
DM:	Diabetes Mellitus
DT1:	Diabetes tipo 1
DT2:	Diabetes tipo 2
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FMD:	Federación Mexicana de Diabetes
Glib:	Glibenclamida
HMG:	Ácido 3-hidroxi-3-metilglutámico
IDF	Federación Internacional de Diabetes
K⁺:	Potasio
K⁺_{ATP}:	Canal de potasio dependiente de ATP
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Solución Salina amortiguadora de fosfatos
PCR-RT:	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
SU:	Sulfonilureas

RESUMEN

La diabetes es un grupo de alteraciones metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, afecta además al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas generando hiperlipidemia y glucotoxicidad. La hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo y disfunción de diferentes órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos, generando un importante problema de salud pública, pues es la principal causa de demanda de consulta externa en instituciones públicas y privadas, siendo uno de los principales motivos para la hospitalización. México ocupa el 6º lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes (10.8 millones) y acorde a lo publicado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, esta enfermedad se encuentra entre las primeras causas de muerte. Si bien la disposición de fármacos para el tratamiento y control de la diabetes es variado, el 80% de la población mundial utiliza las plantas como alternativa en el tratamiento de la diabetes.

Una planta frecuentemente utilizada en los estados de Veracruz e Hidalgo (México) y en el norte de Luisiana (E.U.A), para curar los síntomas de la diabetes es *Tillandsia usneoides* Linneo, conocida comúnmente como heno, la cual se prepara en cocimiento y se administra por vía oral. Se ha demostrado que el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* tiene un efecto hipoglucemiante en ratones sanos a las 4 y 8 horas posteriores a su administración y se sugirió al ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico (HMG), como el principio activo responsable de este efecto. Sin embargo, hasta

ahora no se cuenta con estudios sobre su mecanismo de acción, que permitan establecer su grado de eficiencia así como su potencial efecto toxicológico, por lo que resulta de gran interés determinar si *T. usneoides* tiene efecto hipoglucémico, a través de un aumento en la síntesis y/o secreción de insulina en un cultivo *in vitro* de células β pancreáticas (RINm5F).

La línea celular RINm5F fue tratada con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. usneoides* con la finalidad de establecer si puede inducir la síntesis de insulina y favorecer su secreción mediante el aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Los resultados mostraron que *T. usnooides* aumenta la expresión del ARNm de insulina sólo en condiciones hiperglucémicas (30 mM), pero no favorece el incremento del Ca^{2+} intracelular ni la secreción de insulina.

Por lo anterior, se sugiere que el extracto acuoso de *T. usneoides* podría estar activando la transcripción del gen de insulina, de tal manera que se incremente la expresión del mismo, más no la secreción de insulina; por lo tanto su mecanismo de acción podría estar involucrado en la captación de glucosa a nivel periférico.

ABSTRACT

Diabetes is a group of metabolic disorders characterized by chronic hyperglycemia resulting from defects in the secretion and / or insulin action, it affects the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins causing hyperlipidemia and glucotoxicity. Chronic hyperglycemia is associated with long-term damage and dysfunction of various organs, especially eyes, kidneys, nerves, heart and blood vessels, generating a significant public health problem, it is the leading cause of outpatient demand in public institutions and private, one of the main reasons for hospitalization. Mexico ranks 6th in the world in number of people with diabetes (10.8 million), according to data published by the National Health and Nutrition Survey 2012, this disease is among the leading causes of death. While the provision of drugs for the treatment and control of diabetes is extensive, 80 % of the world population uses medicinal plants as the main remedy.

A commonly plant used in the states of Veracruz and Hidalgo (Mexico) and northern Louisiana (USA), to cure the symptoms of diabetes is *Tillandsia usneoides* Linneo. is prepared in cooking and is administered orally. It has been shown that the aqueous extract of *T. usneoides* has a hypoglycemic effect in healthy mice at 4 and 8 hours after administration and was suggested to 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as the active component responsible for this effect. However, so far there are no studies on its mechanism of action, to establish their efficiency and their potential toxicological effects, so it is of great interest to determine whether *T. usneoides* has

hypoglycemic effect through increased in the synthesis and / or secretion of insulin in an in vitro culture of pancreatic β cells (RINm5F).

The RINm5F cell line was treated with different concentrations of the aqueous extract of *T. usneoides* in order to establish whether it can induce insulin synthesis and promote their secretion by increasing the intracellular concentration of Ca^{2+} . The results showed that *T. usneoides* increased mRNA expression of insulin only in hyperglycemic conditions (30 mM), but no promotes the increase of intracellular Ca^{2+} and insulin secretion. Therefore, it is suggested that the aqueous extract of *T. usneoides* could be activating the insulin gene transcription, such that the expression thereof is increased, but not insulin secretion, and therefore their mechanism of action must be mediate the periferic glucose uptake.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de diabetes mellitus (DM) y sus complicaciones

La diabetes es un grupo de alteraciones metabólicas caracterizadas por hiperglucemia crónica, como resultado de defectos en la secreción y/o acción de la insulina, afecta además al metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas generando hiperlipidemia y glucotoxicidad (ADA, 2009; Reusch, 2003).

La hiperglucemia crónica se asocia con daño a largo plazo y disfunción de diferentes órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos, lo que conduce al desarrollo de las complicaciones diabéticas, ya sean agudas: hipoglucemia, cetoacidosis y coma hiperosmolar; o crónicas, que dependen de la alteración de vasos y capilares sanguíneos, pequeños o de mayor calibre, clasificándose en micro y macrovasculares, respectivamente. Las primeras se relacionan principalmente con daño al endotelio y músculo liso de la microvasculatura y se manifiestan como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética. El aumento de estas complicaciones correlaciona en la mayoría de los casos con la severidad y duración de la hiperglucemia crónica. Las complicaciones macrovasculares son las más comunes e incluyen a un grupo de trastornos que se caracterizan por aterosclerosis y enfermedad isquémica del corazón en todas sus modalidades, y son una de las principales causas de muerte del paciente diabético (Díaz-Flores *et al.*, 2004).

Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de diabetes; éstos van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas con la

consiguiente deficiencia de insulina, hasta las anomalías que se traducen en resistencia a la acción de esta hormona (ADA, 2009).

1.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus (DM)

El comité de expertos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), clasificó a la DM en 4 grupos (ADA, 2014):

- **Diabetes tipo 1 (DT1):** Resulta de la destrucción de las células β pancreáticas, conduciendo a una deficiencia absoluta en la producción de insulina.
- **Diabetes tipo 2 (DT2):** Resulta de un defecto progresivo en la secreción de insulina, generalmente se acompaña de resistencia a la insulina como antecedente.
- **Diabetes gestacional:** Se manifiesta durante el embarazo y se caracteriza por resistencia a la insulina.
- **Otros tipos de diabetes:** Debidos a otras causas como defectos genéticos en la función de las células β pancreáticas, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino y aquella inducida por fármacos que se emplean en el tratamiento del VIH/SIDA o después de un trasplante de órganos.

1.3 Prevalencia de la Diabetes Mellitus (DM)

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF por sus siglas en inglés) en el mundo hay más de 371 millones de personas con diabetes, de los cuales 4 de cada 5, viven en países de ingresos bajos y medios, por lo que más del 80 % de las muertes por diabetes se registran en éstos. La mitad de las muertes atribuibles a la diabetes ocurre en personas menores de 60 años y un 55% son mujeres. La DT2 representa el 90% de los casos a nivel mundial y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Así mismo, se estima que para 2030 esta cifra habrá aumentado hasta alcanzar los 552 millones. Hasta hace algunos años la DT2 sólo se observaba en adultos, pero en la actualidad también se está manifestando en niños (Goodarz *et al.*, 2011; IDF 2012).

México ocupa el 6º lugar a nivel mundial en número de personas con diabetes (10.8 millones) y acorde a lo publicado por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012), esta enfermedad se encuentra entre las primeras causas de muerte. La proporción de adultos con diagnóstico previo de DM va en aumento, registrándose cifras de acuerdo a la ENSANUT 2006 del 7.3% y en la ENSANUT 2012 de 9.2%. Los estados con prevalencias más altas son: Distrito Federal, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí. Sin embargo la IDF estima que aún hay 3,452,000 de personas sin diagnosticar (ENSANUT, 2012; IDF, 2012).

La DM es la principal causa de demanda de consulta externa en instituciones públicas y privadas, siendo uno de los principales motivos para la hospitalización.

Es más frecuente en el medio urbano (63%) que en el rural (37%); así mismo, se estima que la diabetes ha originado al menos 471,000 millones de dólares de gasto sanitario en 2012 y el 11% de los gastos totales en sanidad en adultos de 20 a 79 años (ENSANUT, 2012).

1.4 Diabetes tipo 2 (DT2)

La DT2 es una condición en la que el organismo es incapaz de regular los niveles de glucosa en sangre. La glucosa proviene de los alimentos ricos en carbohidratos (almidones y azúcares) y es la principal fuente de energía para el organismo. Se absorbe en el intestino y se produce en el hígado; la glucosa viaja por el torrente sanguíneo a todos los tejidos del organismo que la emplean como recurso energético y precursor primordial de otros compuestos que contienen carbono. El incremento de glucosa en sangre estimula a las células β del páncreas para que secreten insulina, hormona que regula la concentración plasmática de glucosa por dos vías principales:

- 1) Impide la liberación hepática de glucosa y
- 2) activa la captación de glucosa por el músculo y el tejido adiposo. Cuando los niveles de glucosa en sangre bajan, las células β suspenden la secreción de insulina y el metabolismo se torna en un estado basal. En la condición antagónica de escasez de insulina, la glucosa en sangre se eleva y se produce hiperglucemia. La alta concentración de glucosa crea un desequilibrio osmótico que obliga a la sangre a extraer agua de los tejidos y los riñones la excretan en la orina junto con el exceso de sales. Dicha hiperglucemia contribuye también al

desarrollo de ciertas complicaciones a largo plazo (Lienhart *et al.* 1992; ADA, 2009).

1.5 Fisiología de la célula beta

El páncreas es una glándula mixta con doble función, ambas relacionadas con el manejo de los nutrientes. El 98% del páncreas está constituido por el páncreas exócrino, formado por numerosos conductos y acinos lobulares conectados por tejido conjuntivo y recubiertos por una delicada cápsula, cuya función es sintetizar, almacenar y secretar al duodeno, las enzimas (proteasas, lipasas, amilasas y nucleasas) necesarias para la digestión de los alimentos. El páncreas endócrino representa el 2% de la masa pancreática total y está constituido por los islotes de Langerhans en los que las diferentes células se organizan en una estructura tridimensional que permite la regulación parácrina de sus secreciones, con una enorme vascularización que facilita el intercambio rápido de metabolitos y hormonas al espacio intracelular y la sangre. Todo ello tiene como acción fundamental la homeostasis de la glucosa (Brandan *et al.*, 2011).

El páncreas humano cuenta con 1 a 2 millones de islotes de Langerhans que se encuentran distribuidos de forma aparentemente aleatoria; cada islote mide aproximadamente 0.3 mm de diámetro y están organizados en torno a pequeños capilares, hacia los que vierten sus hormonas; contienen cinco tipos celulares principales y dos secundarios, que se distinguen por las características de sus gránulos y por su contenido hormonal.

Los cinco tipos principales son:

- Células α : secretan glucagón que produce hiperglucemia por su actividad glucogenolítica en el hígado.
- Células β : producen insulina, única hormona hipoglucemiante.
- Células δ : secretan somatostatina que suprime la liberación de insulina y de glucagón.
- Células PP: secretan polipéptido pancreático, que ejerce diversas acciones digestivas como estimular la secreción de enzimas gástricas e intestinales e inhibir la motilidad intestinal.

Células ϵ : secretan ghrelina, la cual tiene acción orexigénica.

Los dos tipos celulares secundarios son:

- Células D1: sintetizan polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), una hormona que produce glucogenólisis e hiperglucemia, aunque también estimula la secreción de fluidos digestivos.
- Células enterocromafines: sintetizan serotonina (Brandan *et al.*, 2011)

Estos grupos están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células β están en el interior del islote (aproximadamente el 70%) y el resto de los grupos celulares se encuentra en la periferia. La organización del aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD (β - α - δ) por su forma centrífuga de aporte vascular. Otro tipo celular, recientemente encontrado en la periferia del islote pancreático, es el parecido a las células neuronales de

Schwann, ocupan menos de 1% y se cree que podrían ser importantes en la regeneración pancreática (Olvera-Granados, 2008).

La célula β no sólo funciona como una bomba de insulina, sino que posee un sofisticado sistema sensor que adapta la cantidad de hormona secretada a la demanda glucídica. Aunque la glucosa es el nutriente esencial desencadenante de dicha respuesta, otros nutrientes, como los ácidos grasos y ciertos aminoácidos, también son capaces de regular respuestas secretoras dependientes de glucosa. La glucosa puede tener, en este sentido, una doble cara, ejerciendo un efecto beneficioso o deletéreo sobre la célula β . Todo depende del tiempo en el que la célula β está expuesta a las altas concentraciones de glucosa, es decir, si la célula está sometida a una hiperglucemia aguda (situación fisiológica) o crónica (situación patológica). Esta última es típica de la DT2 (Roche, 2003).

1.6 Insulina

La insulina fue descubierta en 1922, es una hormona peptídica de 5.8 KDa y es secretada por las células β en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de glucosa en la sangre. Su principal función es mantener la homeostasis de la glucosa en el organismo, favoreciendo su entrada y almacenamiento en músculo y tejido adiposo. Además, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos (Olivares y Arellano, 2008)

La insulina es sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso de las células β del páncreas en forma de preprohormona, la preproinsulina, que al perder 23 aminoácidos de la secuencia líder, se convierte en proinsulina unida por puentes disulfuro intracatenarios y por el péptido C o péptido conector. Posteriormente es transportada al aparato de Golgi en microvesículas, donde es empacada en gránulos de secreción, dentro de los cuales ocurre una continua conversión de proinsulina a insulina, con la liberación del péptido C por la acción de las convertasas PC2 y PC3 y la carboxipeptidasa H, quedando como hormona funcional con cadenas A y B de polipéptidos unidos por puentes disulfuro (Stainer *et al.*, 1996).

1.6.1 Mecanismo de secreción de la insulina inducida por glucosa y la importancia del Ca^{2+} intracelular

La glucosa es el estímulo esencial de la secreción de insulina por la célula β pancreática, aunque también ejercen su influencia aminoácidos, cetonas, péptidos gastrointestinales y neurotransmisores. Las concentraciones de glucosa mayores a 3.9 mmol/L (70 mg/mL) estimulan la síntesis de insulina primordialmente al intensificar la traducción y el procesamiento de la proteína. La glucosa comienza a estimular la secreción de insulina cuando es introducida en la célula β por el transportador de glucosa GLUT-2, el cual es un transportador de glucosa no dependiente de insulina y lleva a cabo un transporte tipo uniport, tiene baja afinidad ($K_m = 15\text{--}20$ mM) por la glucosa y se expresa en el hígado humano adulto, riñón, células β y en la membrana basolateral de las células epiteliales del intestino

delgado. El GLUT-2 actúa como un regulador que sólo permite la entrada de glucosa cuando está lo suficientemente elevada en plasma como para requerir la liberación de una cantidad significativamente importante de insulina (Yamasaki *et al.*, 2010; Eliasson *et al.*, 2008).

La glucosa se fosforila mediante la enzima glucocinasa a glucosa-6-fosfato, esta fosforilación es el paso limitante de la velocidad que controla la secreción de insulina regulada por glucosa. El metabolismo ulterior de la glucosa 6-fosfato por la vía de oxidación de la glucosa (glucólisis, ciclo de Krebs y cadena respiratoria) produce ATP (adenosin trifosfato) y aumenta la relación ATP/ADP. Lo que favorece la unión del ATP a los canales de K^+ sensibles a ATP (K^+_{ATP}), los cuales regulan negativamente el ATP intracelular, por lo que un descenso en la concentración de este nucleótido favorece el cierre del canal. El canal de K^+_{ATP} es un octámero compuesto de cuatro subunidades Kir 6.2 y cuatro SUR1. Ambos tipos de subunidades contienen dominios de unión al nucleótido; Kir 6.2 al parecer media la respuesta inhibitoria a ATP; SUR1 se liga a ADP (adenosin difosfato), a las sulfonilureas y meglitinidas (promotores de la secreción de insulina). Al disminuir la permeabilidad de la membrana al K^+ , el catión deja de salir y se acumula dentro de las células, y la membrana celular se despolariza. Esta despolarización abre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y el ion Ca^{2+} inunda la célula a favor de un gradiente de concentración alto, lo que activa a la fosfolipasa C (PLC), la cual metaboliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) y produce fosfatidilinositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG), que participan en la movilización de las reservas intracelulares de Ca^{2+} . Son estas condiciones las que

activan el complejo sistema de microtúbulos y microfilamentos encargados de la exocitosis de los gránulos de insulina (Yamasaki *et al.* 2010; Eliasson *et al.* 2008). (Figura 1).

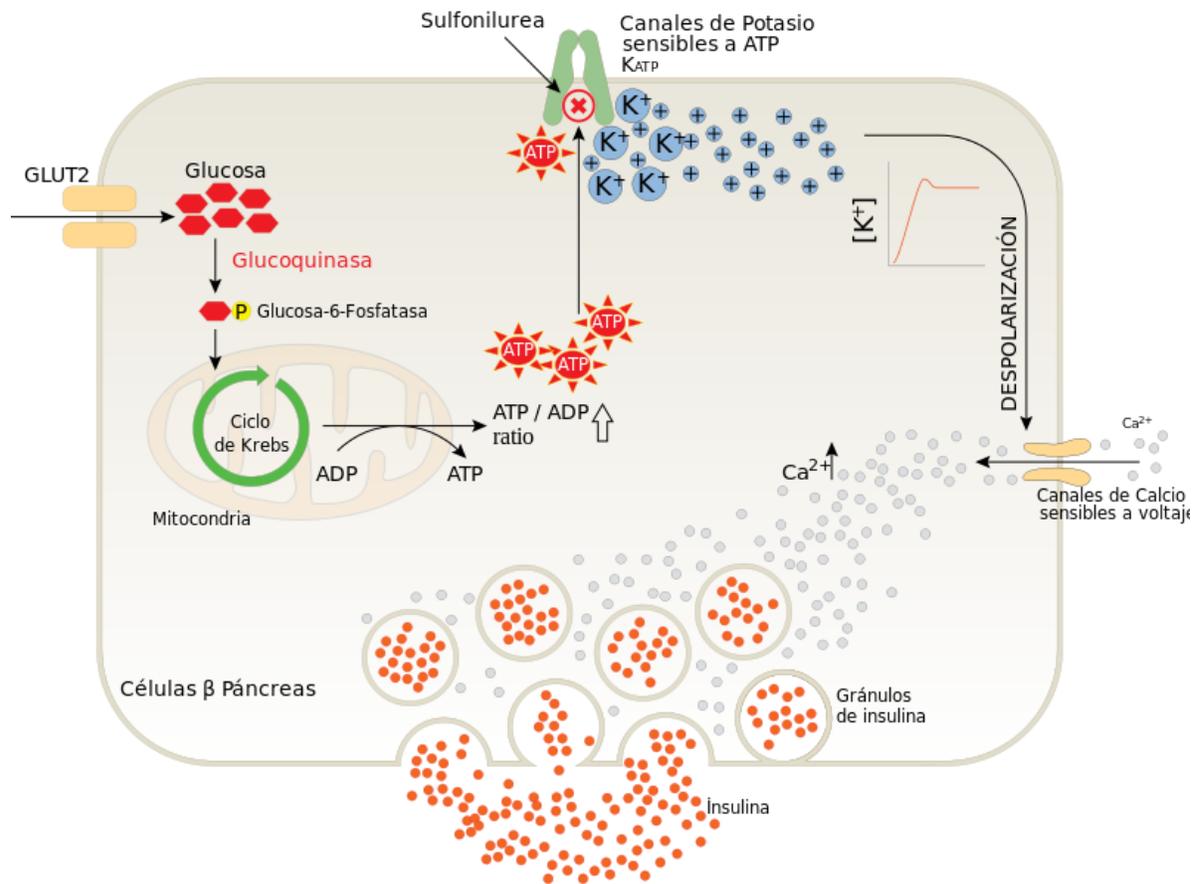


Figura 1. Mecanismo de secreción de insulina inducida por glucosa (www.esacademic.com).

La disponibilidad de Ca^{2+} regula una serie de eventos; por un lado, la exocitosis de insulina mediada por segundos mensajeros dependientes de Ca^{2+} , como la PLC, que se encarga de hidrolizar al PIP_2 en DAG e IP_3 ; por otro lado, el DAG activa a la

proteína cinasa C (PKC) que también puede activarse por Ca^{2+} libre en el citoplasma e inducir la exocitosis de la insulina. Así mismo, el IP_3 entra al retículo endoplásmico (RE) para liberar más Ca^{2+} al citoplasma. El receptor inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3R) es un canal de Ca^{2+} intracelular sensible a IP_3 y juega un papel en la regulación de la secreción de insulina.

La secreción de insulina *in vivo* es bifásica, con una 1ª fase que se desarrolla rápidamente y es dependiente de calcio, y una 2ª fase lenta y sostenida. (Roche,2003). En 1999 Gromada y col. identificaron un conjunto de gránulos disponibles para liberación, RRP (por sus siglas en inglés pool of readily releasable granules). Estos gránulos se sitúan en las inmediaciones de la membrana plasmática y de ellos se desprende un subconjunto de gránulos inmediatamente liberables, IRP (por sus siglas en inglés immediately releasable pool), los cuales se localizan junto a los canales de Ca^{2+} , por lo que el término de la 1ª fase de secreción se refleja por el vaciamiento del IRP, y la 2ª fase involucra el suministro de nuevos gránulos (Eliasson *et al.*, 2008). Para su liberación, los gránulos deben ser reclutados hacia la membrana plasmática, donde se acoplan para la fusión de membranas y la liberación de su carga.

La secreción de insulina también está regulada por las proteínas Syntaxina 1, VAMP-2 (vesicle-associated membrane protein-2) y SNAP-25 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein-25) (Bhalla *et al.*, 2006), las cuales pertenecen a la familia de proteínas SNARE (por sus siglas en inglés: soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment protein receptor). Estas proteínas participan en la movilización y

exocitosis de los gránulos de insulina. En 2005 Lam *et al.*, observaron que la sobreexpresión de Syntaxina 1 en las células β disminuye la secreción de insulina y en 1997 Sadoul *et al.*, ya habían observado que la hidrólisis de VAMP-2 y la ruptura de SNAP-25 reducen drásticamente la secreción de insulina.

La DT2 se asocia con una pérdida completa de la primera fase de secreción de insulina y con una reducción considerable de la segunda fase (Eliasson *et al.*, 2008), lo que genera hiperglucemia persistente, la cual se considera el principal factor de riesgo para el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM, que son el resultado de reacciones químicas y de la activación o alteración del metabolismo causado por el exceso de glucosa (Díaz-Flores *et al.*, 2004).

1.7 Tratamientos farmacológicos

1.7.1 Hipoglucemiantes orales

1.7.1.1 Sulfonilureas (SU)

Las SU son ácidos débiles que se unen ampliamente a las proteínas (> 90%), se metabolizan en el hígado y se excretan a través del riñón o por las heces. Las SU aumentan la liberación de insulina a través del canal de K^+_{ATP} y pueden disminuir la resistencia periférica a la insulina. Las SU bloquean el canal de K^+_{ATP} e inhiben el flujo de K^+ , inducen la despolarización de la membrana de la célula β y, como consecuencia, los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje presentes se abren para permitir la entrada de iones de Ca^{2+} , lo que produce a su vez activación de cinasas y la exocitosis de los gránulos secretores de insulina. Las SU de segunda generación

(glibenclamida o gliburida, gliclazida, glipizida y glimepirida) presentan mayor potencia farmacológica y mayor perfil de seguridad para el paciente (ADA, 2007; Mateos y Zacarias, 2003).

1.7.1.2 Meglitinidas

Las drogas que pertenecen a este grupo son la repaglinida y la nateglinida. Estos fármacos restauran la primera fase de secreción de insulina, disminuyen la hiperglucemia postprandial y evitan el pico hiperglucémico entre las comidas (ADA, 2007; Mateos y Zacarias, 2003).

Estos fármacos son secretagogos no sulfonilureicos, actúan a través del cierre del canal de K^+_{ATP} en la membrana de la célula β , se unen a receptores distintos de las SU. Uno de ellos es un receptor con una alta afinidad por la repaglinida y baja afinidad por las SU; y el otro es un receptor con una alta afinidad por las SU y una baja afinidad por la repaglinida (Fuhlendorff *et al.*, 1998).

1.7.1.3 Tiazolidinedionas (Glitazonas)

Estos fármacos (rosiglitazona y pioglitazona) actúan a nivel del receptor nuclear PPAR- γ (por sus siglas en inglés: peroxisome proliferator-activated receptor gamma). La activación de este receptor modifica la transcripción nuclear de genes que regulan el metabolismo de carbohidratos y lípidos. El efecto más prominente es el incremento en la captación de glucosa estimulada por insulina a nivel de músculo esquelético. Esto resulta en una disminución de la resistencia a la insulina en tejidos periféricos,

además de disminuir la producción hepática de glucosa (ADA, 2007; Mateos y Zacarías, 2003).

1.7.1.4 Biguanidas

Las biguanidas son compuestos que tienen 2 moléculas de guanidina, la droga más empleada de esta clase es la metformina. La metformina reduce la absorción intestinal de glucosa, inhibe la gluconeogénesis, estimula la captación celular de glucosa e incrementa la unión de insulina con su receptor. Mejora la tolerancia oral y la captación de glucosa en tejido muscular, por lo que estimula la síntesis de glucógeno (metabolismo no oxidativo). También se ha observado un incremento en la concentración de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 en varios tejidos (ADA, 2007; Mateos y Zacarías, 2003).

1.7.1.5 Inhibidores de la alfa-glucosidasa

Los inhibidores de α -glucosidasa son acarbosa y miglitol. Estos fármacos inhiben la absorción de carbohidratos a nivel intestinal después de una comida, por lo que disminuye la hiperglucemia postprandial. Retrasan la digestión de carbohidratos, al cambiar la absorción a las porciones más distales del intestino delgado y colon, por lo que retrasan la entrada de glucosa a la circulación sistémica, lo que permite ampliar el tiempo de la célula β para aumentar la secreción de insulina en respuesta al pico de glucosa plasmática (ADA, 2007; Mateos y Zacarías, 2003).

1.7.1.6 Incretinas

Las incretinas son hormonas intestinales que se liberan al torrente circulatorio tras la ingesta, participan en la homeostasis de la glucemia, regulando la secreción de insulina y glucagón de manera dependiente de la glucosa. Las dos incretinas identificadas son el polipéptido insulínico gástrico (GIP) y el péptido similar a glucagón-1 (GLP-1). El GLP-1 se libera en las células L intestinales situadas principalmente en el duodeno, íleon e intestino grueso y el GIP es producido en las células K intestinales situadas principalmente en el duodeno y el yeyuno. Su mecanismo de acción consiste en activar receptores que se expresan en diferentes tejidos, como los receptores de GLP-1, acoplados a la proteína G, que se expresan en las células β y α de los islotes del páncreas, en el sistema nervioso central y periférico, corazón, riñón, pulmón, tejido adiposo y tracto gastrointestinal. Las acciones que produce son: estimula la secreción de insulina sólo en caso de hiperglucemia, por lo que no produce hipoglucemias, inhibe la secreción de glucagón, hace más lento el vaciado gástrico; inhibe la secreción de ácido gástrico y actúa sobre el hipotálamo produciendo sensación de saciedad.

El GIP, cuyos receptores se expresan en los islotes pancreáticos, el tejido adiposo y el cerebro, ejerce efectos estimuladores sobre la secreción de insulina dependiente de glucosa y potencia la proliferación y la supervivencia de células β , pero no influye sobre la secreción de glucagón ni el vaciado gástrico. Tanto el GLP-1 como el GIP son inactivados por la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) rápidamente, de tal

manera que la vida media de GLP-1 circulante es de 1-2 min y la del GIP es de 5-7 min

Un fármaco análogo del GLP-1 es la exenatida, la forma sintética del exendín 4, péptido que se encuentra de forma natural en la saliva del lagarto *Heloderma suspectum* (monstruo de Gila). Es resistente a la enzima DPP-IV e *in vitro* se une con mayor afinidad y similar eficacia al receptor de GLP-1, con una vida media de 3-4 h, resultando eficaz cuando se aplica en monoterapia y en asociación con hipoglucemiantes orales, sólo está aprobada su utilización en el tratamiento combinado con metformina y/o sulfonilurea en pacientes que no hayan alcanzado el control glucémico con estos fármacos (Nogales y Arrieta, 2010)

1.7.1.7 Inhibidores de la dipeptidilpeptidasa (DPP-IV)

Los inhibidores de la enzima DPP-IV se unen a la propia enzima inhibiendo de una forma reversible la hidrólisis de las incretinas endógenas, con el consiguiente aumento tanto de GIP como de los niveles de GLP-1 plasmático, potenciando su acción, lo que conlleva al aumento de la respuesta insulínica y a la disminución de la secreción de glucagón. En modelos animales se ha observado, al igual que con los análogos de GLP-1, que se preserva la masa y la función de las células β de los islotes pancreáticos. Tienen la ventaja de que su administración sea por vía oral. Se ha observado mejoría de la glucemia basal y posprandial, en la hemoglobina glicada (HbA1c) y un efecto neutro sobre el peso (Nogales y Arrieta, 2010).

1.7.2 Insulinoterapia

La insulina es necesaria para el metabolismo normal de carbohidratos, proteínas y grasas. Sin embargo, debe emplearse bajo un control estricto ya que provoca episodios frecuentes de hipoglucemia y ganancia de peso. En la DT1 es el tratamiento indispensable que debe ser utilizado desde el momento del diagnóstico, mientras que en la DT2 cuando persiste la hiperglucemia en ayuno, se puede iniciar con insulina nocturna de manera combinada con hipoglucemiantes orales de administración diurna. La insulina humana debe considerarse como el medicamento de primera línea en la diabetes gestacional y en pacientes diabéticos con sobrepeso, comparada con insulina o SU, ya que parece disminuir el riesgo de complicaciones crónicas y los episodios de hipoglucemia (NOM, 2010).

Aunque estos fármacos han demostrado ya su utilidad en el control de la diabetes mellitus, en la mayoría de los casos no logran detener el desarrollo de las complicaciones de origen vascular (Tesfaye *et al.*, 2005; Arana y Méndez, 2003), observándose a menudo efectos secundarios que van desde alteraciones gastrointestinales, retención de líquidos, incremento de peso, anemia y siendo el más grave la hipoglucemia. Así mismo hay que recordar que los fármacos hipoglucemiantes están contraindicados en el embarazo y la lactancia (Llave-Gomero, 2008).

2.- ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales

Dado que en los últimos años, la hiperglucemia ha sido señalada como la responsable de desencadenar las vías señalización que convergen finalmente en la presentación de las complicaciones tardías de la diabetes, el tratamiento debe estar dirigido a corregir y/o mantener bajos los niveles de glucosa circulantes. Si bien la disposición de fármacos para el tratamiento y control de la diabetes es variado, el 80% de la población mundial utiliza las plantas como principal remedio medicinal, según la OMS (Beyra, 2004), siendo en los países subdesarrollados la primera alternativa de tratamiento para diversas patologías (Bailey y Day, 1989). No obstante, en países como Estados Unidos, la medicina alternativa como complemento a las terapias médicas prescritas también es frecuente (Garrow y Egede, 2006).

México no es la excepción y los pacientes diabéticos recurren esencialmente a la herbolaria para controlar aquellos padecimientos relacionados con su enfermedad (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Johnson *et al.*, 2006). La medicina herbolaria se utiliza en adición a los medicamentos farmacológicos, por diferentes razones que incluyen disponibilidad y bajo costo (Romero *et al.*, 2009). Debido a la popularidad de este tipo de terapia, es que la Organización Mundial para la Salud (OMS 2002-2005), considera que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, y destaca la importancia de establecer las bases científicas que sustenten la seguridad, efectividad y calidad, necesarias para su administración en humanos (Sánchez, 2000; Kumar *et al.*, 2007).

Se conocen más de 400 tratamientos naturales con plantas para la diabetes mellitus, pero sólo un pequeño número de éstos han recibido evaluación científica y médica para probar su eficacia (Bailey y Day, 1989; García *et al.*, 2009). Por lo que actualmente varios grupos de investigación están interesados en el conocimiento y desarrollo de nuevas moléculas activas, a partir de diversas plantas medicinales.

Los efectos hipoglucémicos de algunas plantas usadas como remedios antidiabéticos se han confirmado en algunas poblaciones (Alarcón-Aguilar *et al.*, 1998) y los mecanismos moleculares de su actividad hipoglucémica están en estudio. En México, algunas de las plantas antidiabéticas que se encuentran en investigación son las pertenecientes a la familia Cucurbitaceae: *Cucurbita ficifolia* Bouché (chilacayote) e *Ibervillea sonora* Greene (wareque), debido a sus efectos hipoglucémicos. La administración del extracto acuoso de estas cucurbitáceas por separado disminuyen significativamente los niveles circulantes de glucosa, tanto en animales diabéticos como sanos (Alarcón-Aguilar *et al.*, 2002;), sus efectos también se han estudiado en pacientes con hiperglucemia (Acosta *et al.*, 2001). A partir de la década de 1990, se han realizado importantes estudios farmacológicos en los cuales se ha probado el efecto hipoglucémico de diferentes plantas, que fueron usadas en su forma tradicional (Román-Ramos *et al.*, 1991, 1992 a, 1992b y 1995; Alarcón Aguilar *et al.*, 1998; Andrade-Cetto y Heinrich; 2005).

México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4500 plantas, de las cuales más de 300 especies vegetales de unas 70 familias diferentes son usadas tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes,

según información etnobotánica registrada en el Herbario medicinal del IMSS (Muñetón, 2009).

Una planta comúnmente utilizada en los estados de Veracruz e Hidalgo (México) y en el norte de Luisiana (E.U.A), para curar los síntomas de la diabetes es *Tillandsia usneoides* L. (heno) (Fig. 2). Se prepara en cocimiento y se administra por vía oral (www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx).



Figura 2. *Tillandsia usneoides* L. (www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx)

Tillandsia usneoides L. pertenece a la familia de las Bromeliáceas, es una planta epífita, herbácea, que cuelga de los árboles en hebras ramificadas de hasta 8 m, sin raíces, se nutre por las hojas que están cubiertas por tricomas, por lo que sus requerimientos de agua y nutrientes son mínimos; presenta inflorescencias reducidas a una sola flor terminal. (Hornung-Leoni, 2011).

Se ha demostrado que el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* tiene un efecto hipoglucemiante en ratones sanos a las 4 y 8 horas posteriores a su administración (Keller y Bonfiglio, 1981) y en 1995 se sugirió al ácido 3-hidroxi-3-metilglutárico

(HMG), como el principio activo responsable de este efecto (Witherup y Mclaughin 1995). Sin embargo, hasta ahora no se cuenta con estudios sobre su mecanismo de acción, que permitan establecer su grado de eficiencia así como su potencial efecto toxicológico.

3.- JUSTIFICACIÓN

La DT2 es reconocida por la OMS como una amenaza mundial. En 2005 se registraron 1.1 millones de muertes por esta enfermedad, de las cuales alrededor de 80% ocurrieron en países de ingresos bajos o medios. En México la DT2 ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, sin distinción de género y de conformidad con la información de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT, 2012) la prevalencia aumentó a 14%, lo que representa un total de 8 millones de personas con diabetes (FMD, 2010).

Hasta el momento las opciones terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad no son curativas y además representan un alto costo, por lo que a pesar de tener una terapia farmacológica, los pacientes siguen utilizando plantas con propiedades antidiabéticas como alternativa de tratamiento.

Por lo que las plantas medicinales representan una fuente de materia prima para la búsqueda de nuevas sustancias o mezclas de sustancias que permitan ofrecer alternativas novedosas de tratamiento para el paciente. Sin embargo, antes de iniciar su estudio a nivel clínico, es necesario validar científicamente sus efectos hipoglucémicos, los posibles mecanismos de acción por los cuales estas plantas

ejercen su efecto hipoglucémico a nivel experimental y determinar si ejercen o no algún efecto tóxico sobre el organismo; por lo que resulta de gran interés determinar si *Tillandsia usneoides* tiene efecto hipoglucémico, a través de un aumento en la síntesis y/o secreción de insulina por la célula β pancreática.

4.- HIPÓTESIS

Si el extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* L. tiene efecto hipoglucémico, entonces aumentará la síntesis y secreción de insulina.

5.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de *Tillandsia usneoides* L. sobre la expresión y secreción de insulina en células β pancreáticas sometidas a altas concentraciones de glucosa.

6.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Valorar el efecto hipoglucémico de *T. usneoides* L. *in vivo*.
- Evaluar la viabilidad de las células RINm5F en presencia de diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. usneoides* L.
- Determinar la respuesta en la inducción y secreción de insulina, en células RINm5F en condiciones normoglucémicas e hiperglucémicas, en presencia de *T. usneoides* L.
- Medir la concentración intracelular de Ca^{2+} en células RINm5F en presencia de *T. usneoides* L.

7.- MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Material vegetal

La planta completa de *Tillandsia usneoides* se compró en mercados populares de la ciudad de México en el mes de diciembre.

7.2 Obtención del extracto acuoso

Tillandsia usneoides L. se identificó taxonómicamente en el herbario del CMNSXXI con el número 15,992. Se tomaron 30 g de la planta completa, se lavó y se sometió a decocción en 1 L de agua durante 10 min. La fase acuosa se colocó durante 72 h dentro de una campana de flujo laminar con aeración constante y una vez seca se raspó. El producto resultante, con rendimiento del 1.63%, se utilizó en los experimentos correspondientes (Fig. 3).



Figura 3. Obtención del extracto acuoso de *T. usneoides*.

7.3 Efecto hipoglucémico

Para evaluar el efecto hipoglucémico del extracto acuoso de *T. usneoides* se realizó un estudio agudo en el que se midió la glucemia a 5 grupos de ratones conformados por 5 ratones macho CD-1 cada uno.

Los animales fueron sometidos a 12 horas de ayuno y se les determinó la glucemia al inicio (t=0); posteriormente al grupo 1 se les administró solución salina, al grupo 2 (control positivo) se les administró glibenclamida (500 mg/Kg) y a los tres grupos restantes se les administraron 100, 250 y 500 mg/Kg respectivamente, del extracto acuoso de *T. usneoides*. La glucemia se midió a los 120 (t=1) y 240 minutos (t=2) con el glucómetro Accu-Chek Performa de Roche®.

7.4 Cultivo de la línea celular RINm5F

La línea celular RINm5F productora de insulina proveniente de islotes pancreáticos tumorales se adquirió comercialmente con American Type Culture Collection (ATCC); se sembró en medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1 mM de piruvato, 1 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina y 100 U/mL de gentamicina; con una atmósfera húmeda a 37° C y 5% de CO₂, hasta llegar a confluencia (aproximadamente 72 h). Para resembrarlas se utilizó tripsina 0.025% en PBS-EDTA 2mM y se sembraron en botellas de plástico estériles de 75 mm² (Corning, Acton, MA, EUA) para iniciar tratamientos. Con este propósito se pusieron 2.5 x 10⁶ células en cada botella con 10 mL de medio RPMI 1640

suplementado. Al día siguiente se les cambió el medio y al segundo día se adicionaron los tratamientos

7.5 Viabilidad celular (prueba de azul de tripano)

La viabilidad celular se determinó por recuento de células vivas por exclusión con azul de tripano. Este método se basa en que las células vivas (viables) no captan el azul de tripano, mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Se cuentan como muertas las células teñidas de azul y como vivas las células refringentes. Se sembraron 200,000 células/pozo en placa de 24 pozos (Nunc) con medio RPMI-1640 suplementado y se dejaron crecer por 24 h a 37 °C. Después se lavaron con solución PBS y se les cambió el medio por uno sin SFB, que contenía 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL del extracto de *T. usneoides* por 24 h. Posteriormente se les retiró el medio y se centrifugó a 12000 rpm por 5 min, se guardó el botón y se le agregaron las células previamente desprendidas con tripsina 0.025% en PBS-EDTA 2mM, se homogenizaron y se prepararon alícuotas de cada muestra (10 µL) en tubos Eppendorff de 0.6 ml y se les agregaron 40 µL de azul de tripano al 0.4 % (Sigma). Se mezcló y se 10 µL de esta solución en la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular en un microscopio óptico y objetivo 10X. No se consideraron las células que estaban fuera del cuadrante de referencia y se realizó el cálculo correspondiente. (Phillips, 1973). La concentración de células en la muestra (Nº células / mL) se obtuvo sacando el promedio de los 4 cuadrantes, multiplicado por el factor de la cámara (10.000) y por el factor de dilución empleado.

$$\text{Viabilidad} = \left[\frac{\text{N}^\circ \text{ células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ células vivas} + \text{N}^\circ \text{ células muertas}} \right] \times 100$$

7.6 Funcionalidad celular (Prueba de MTT)

Para determinar la viabilidad celular se utilizó la prueba de MTT reportada por Mosmann (1983), que se basa en la capacidad de las deshidrogenasas de la célula para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) soluble en agua (amarillo), a formazán (azul) insoluble en agua. Se sembraron 5000 células/pozo en placa de 96 pozos (Nunc) con medio RPMI-1640 suplementado y se dejaron crecer por 24 h a 37 °C. Después se lavaron con PBS y se les cambió el medio por uno sin SFB, conteniendo las concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL del extracto de *T. usneoides* por 24 h. Posteriormente se les retiró el medio y se agregó una solución de 0.1 mg/mL de MTT en PBS a pH 7.5. Se incubaron por 3 h a 37 °C y 95% de humedad. A continuación se les retiró el medio (color amarillo) y se les agregó 200 µL de una solución de HCl 0.04 M en 2-isopropanol, durante 15 min, para disolver el formazán. El cambio de absorbencia se leyó a 570 nm en un lector de ELISA. La funcionalidad se determinó por el porcentaje del cambio de extinción del MTT (Mosmann, 1983; Stockert *et al.*, 2012).

7.7 Extracción de ARN total

Para la extracción del ARN total de las células RINm5F se empleó la técnica descrita por Chomczynski (1987). Se sembraron 1×10^6 células por cada tratamiento en placas de 6 pozos (Nunc); después de 24 h se colectó el medio de cultivo y fueron lavadas con PBS. Posteriormente se agregó 1 mL de Trizol y se levantaron con un gendarme de goma estéril. El homogenado se depositó en tubos Ependorff en donde se les dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agregaron 0.2 mL de cloroformo y se agitó el tubo por 15 segundos. Las muestras se centrifugaron a 11700 g durante 15 minutos a 4 °C. Se colectó la fase acuosa (superior) y se le agregó 0.5 mL de isopropanol; se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 11700 g durante 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó a 11700g durante 15 minutos a 4 °C. El precipitado (ARN total) obtenido se secó al vacío y el botón de ARN se resuspendió en una solución de dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% o agua libre de ARNasas. Finalmente se cuantificó el ARN por espectrofotometría mediante el sistema EPOCH®. Así mismo se observó su integridad mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

7.7.1 Cuantificación de la expresión del ARNm de insulina

Transcripción en Reversa acoplado a Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en tiempo real.

El ADNc se sintetizó a partir de 2 µg de ARN total por retrotranscripción utilizando la transcriptasa reversa ImProm II (Promega), también se utilizaron iniciadores al azar (random primers 0.5 µg/L). El volumen total de reacción (20 µL) se incubó en el termociclador de Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 con el siguiente programa de ciclos: inicio 25 °C por 5 minutos, seguido por la extensión a 42 °C por 55 min, se detuvo la reacción por inactivación de la enzima a 70 °C por 15 minutos y enfriando a 4 °C por 5 minutos.

La amplificación del ADNc se realizó por PCR tiempo real con el estuche “DNA master plus SYBR Green 1” (Applied Biosystems) para el gen a estudiar: insulina, y β-actina como gen de normalización. El proceso se llevó a cabo empleando la tecnología SYBR Green con el equipo Rotor Gene. La mezcla de reacción con un volumen final de 10 µL contenía 0.5 mM de oligonucleótidos del gen de insulina y β-actina como gen de referencia (Figura 4) y la mezcla de reacción 1X que contenía la enzima Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y MgCl₂ 3.5 mM. La expresión del ARNm se determinó por el método del método del Ct comparativo.

Primer	Secuencia sentido/antisentido
Insulina (Rata)	5'-TGCCCAGGCTTTTGTCAAAC-3'
β- actina (Rata)	5'-GTGGGTATGGGTCAGAAGGA-3'

Figura 4. Secuencia de los primers de insulina y β-actina

7.8 Cuantificación de la secreción de insulina por el método de ELISA

La técnica de ELISA se basa en un inmunoensayo tipo sandwich con anticuerpos monoclonales específicos para insulina, inmovilizados en una microplaca de 96 pozos en una fase sólida. Después de los tratamientos se colectó el medio RPMI y se añadió a los pozos apropiados con una enzima peroxidasa de rábano y un anticuerpo monoclonal marcado (conjugado), lo que hace que las moléculas de insulina queden intercaladas entre la fase sólida y el conjugado. Después de incubar por 2 horas en un agitador mecánico a temperatura ambiente, se lavaron los pozos con buffer de lavado para eliminar el conjugado no unido. Posteriormente se adicionó a cada pozo el sustrato proporcionado por el proveedor, incubando nuevamente la microplaca en un agitador mecánico a temperatura ambiente por 15 minutos para permitir la reacción del sustrato con el conjugado unido en los pozos; pasado el tiempo de incubación se detuvo la reacción, añadiendo "stop solution", cambiando el color de azul a amarillo. Finalmente se midió la absorbencia con un lector de microplacas a 450 nm y a 620 nm, los valores de la última longitud de onda sirven para corregir las imperfecciones en la placa y se restan de los valores a 450 nm. La intensidad del color generado es directamente proporcional a la cantidad de insulina en la muestra.

7.9 Cuantificación intracelular de Ca^{2+}

Para determinar el contenido de Ca^{2+} intracelular se utilizó el método de Bellomo *et al.* (1982), el cual se basa en la medición espectrofotométrica del complejo formado por Arsenazo III (ácido 2, 2' dibencenoarsónico) y el Ca^{2+} libre intracelular. Se tomaron 5 μL de fracción citosólica a la cual se le adicionó 1 mL del indicador Arsenazo III (30 μL) preparado en HEPES 5.0 mM a pH 7.4. El complejo formado Arsenazo III- Ca^{2+} se leyó a una longitud de onda de 675 y 685 nm. La concentración intracelular de Ca^{2+} se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$C = \Delta\text{Abs} / (\epsilon - \epsilon') I$$

Donde:

C: es la concentración de Ca^{2+} intracelular,

ΔAbs : diferencia de las absorbencias leídas a las longitudes de onda de 675 y 685 nm.

ϵ es el coeficiente de extinción molar ($2.80 \times 10^4 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) del complejo Arsenazo III- Ca^{2+}

ϵ' : es el coeficiente de extinción molar ($0.19 \times 10^4 \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) del Arsenazo III libre de Ca^{2+}

I: es la longitud del paso de luz de la celda (1cm).

Los resultados se expresan como moles de Ca^{2+} libre intracelular/mg de proteína.

7.9.1 Cuantificación de proteínas.

El contenido de proteínas en las muestras se determinó por el método de Lowry, con el estuche comercial Dc Protein assay kit (Bio Rad). Se hizo una dilución 1:10; la cuantificación se realizó tomando como referencia una curva patrón de albúmina sérica bovina en un rango de 0 a 17.5 µg/ml. Posteriormente se leyó la absorbencia a 590 nm en un lector de ELISA y se determinó la concentración de proteína total.

7.9.2 Análisis estadístico

Cada experimento se realizó por triplicado en eventos independientes. El análisis estadístico de los resultados se hizo mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba Múltiple de Duncan con el programa NCSS y un nivel de significancia del 95%.

8.- RESULTADOS

8.1 Efecto hipoglucémico del extracto acuoso de *T. usneoides*.

La glucemia del grupo de ratones a los que se les administró 100 mg/Kg del extracto acuoso de *T. usneoides* mostró una disminución significativa respecto al grupo control, misma que se mantiene hasta el minuto 240. El grupo al que se le administraron 250 mg/Kg del extracto presentó un aumento en la glucemia al minuto 120, sin embargo tuvo un drástico descenso al minuto 240, similar al de glibenclamida y estadísticamente significativo respecto al control. El grupo tratado con 500 mg/Kg registró un aumento desde el minuto 120, mismo que se mantuvo hasta el 240, sin embargo no fue estadísticamente diferente al control (Fig. 5); en estos animales además se observó letargo, disminución de la motricidad e hipotermia.

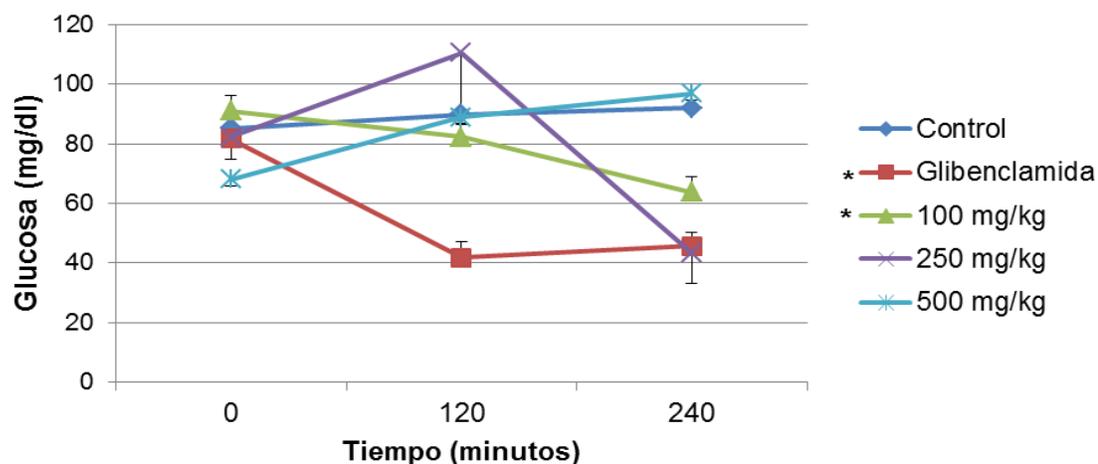


Figura 5. Niveles séricos de glucosa en ratones tratados con diferentes concentraciones del extracto de *T. usneoides*.(n=5 * p< 0.05)

8.2 Viabilidad y funcionalidad celular

8.2.1 Prueba de viabilidad celular por azul tripano en las células RINm5F

Se observa que las células tratadas con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *T. usneoides* mantuvieron una viabilidad cercana al control hasta la concentración de 1 µg/ml; posteriormente se observa una disminución significativa con respecto al control después de 2.5 µg/mL de extracto *T. usneoides* en respuesta al aumento en la concentración (Fig. 6).

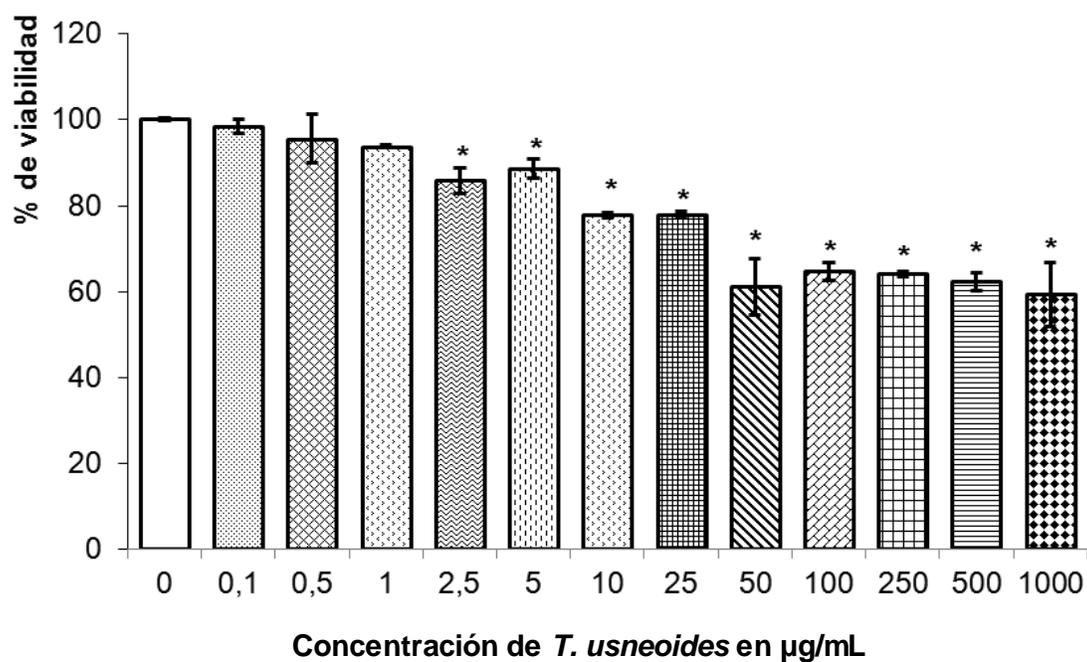


Figura 6. Células RINm5F cultivadas con diferentes concentraciones del extracto de *T. usneoides* (n=24; * Diferencia significativa respecto al control p< 0.05).

8.2.2 Prueba de funcionalidad celular en las células RINm5F por MTT

Las células tratadas con el extracto acuoso de *T. usneoides* mantuvieron una funcionalidad mayor al 95% en un rango de 0.1 a 10 µg/mL, por lo que las concentraciones elegidas para los tratamientos posteriores fueron 0.1 y 1 µg/mL, ya que ambas figuran en el rango de aceptación tanto en la prueba de viabilidad como en la prueba de funcionalidad celular (Fig. 7).

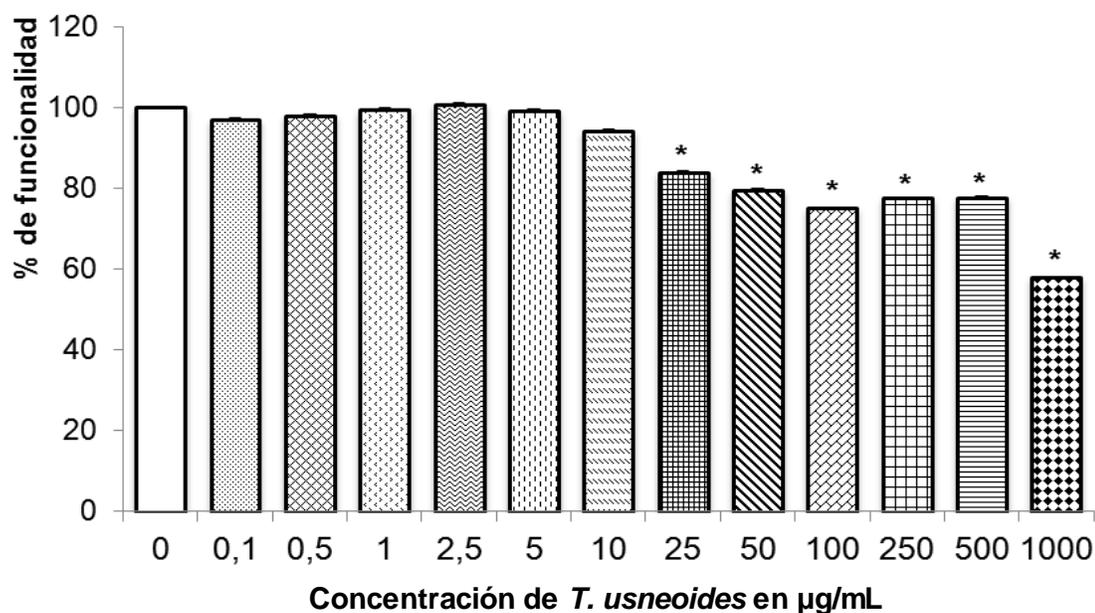


Figura 7. Funcionalidad de las deshidrogenasas en células RINm5F tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *T. usneoides* (n=24; * Diferencia significativa respecto al control p< 0.05).

8.3 Extracción de ARNm de células RINm5F

La extracción del ARN total así como su integridad se corroboró mediante electroforesis un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 8).

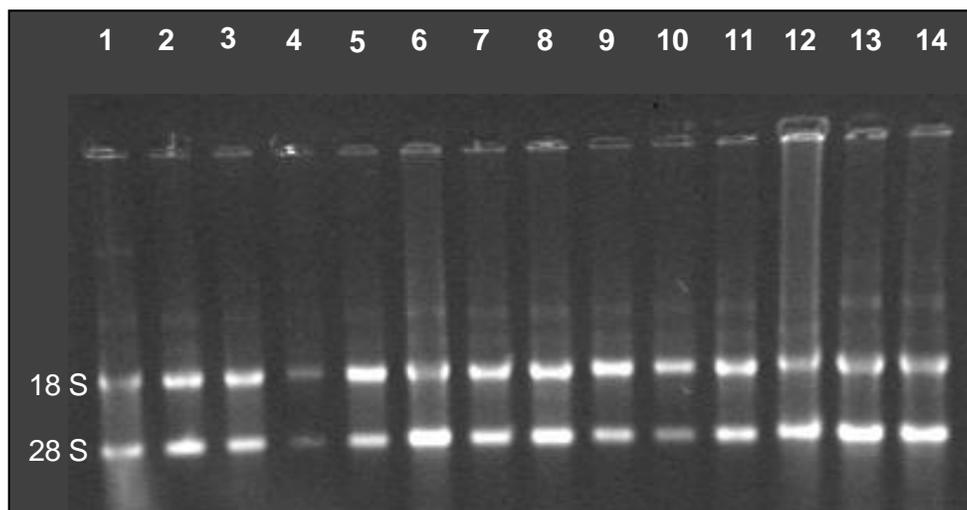


Figura 8. Análisis de la integridad del ARN en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1 y 2 corresponden a células control (11 mM), los carriles 3 y 4 a células cultivadas con alta glucosa (30 mM), carriles 5 y 6 a glibenclamida, carriles 7 y 8 a células tratadas con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *T. usneoides* y 11mM de glucosa, carriles 9 y 10 a células tratadas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *T. usneoides* y 11 mM de glucosa, carriles 11 y 12 a células tratadas con 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *T. usneoides* y 30mM de glucosa y los carriles 13 y 14 a células tratadas con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *T. usneoides* y 30 mM de glucosa.

8.4 Expresión del gen de insulina

La adición del extracto acuoso de *T. usneoides* a concentraciones de 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ a las células RINm5F cultivadas con 11 mM de glucosa por 24 horas no afecta la expresión del ARNm de insulina (Figura 9). Sin embargo cuando las células se cultivaron con alta glucosa (30mM) y se les adicionó el extracto de *T. usneoides* a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ d por 24 horas, se observó una disminución significativa en la expresión del gen de insulina con respecto al control ($p < 0.05$). Cuando se aumentó la concentración del extracto a 1 $\mu\text{g/ml}$ la expresión de insulina incrementó significativamente con respecto a 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y al control (Figura 10)

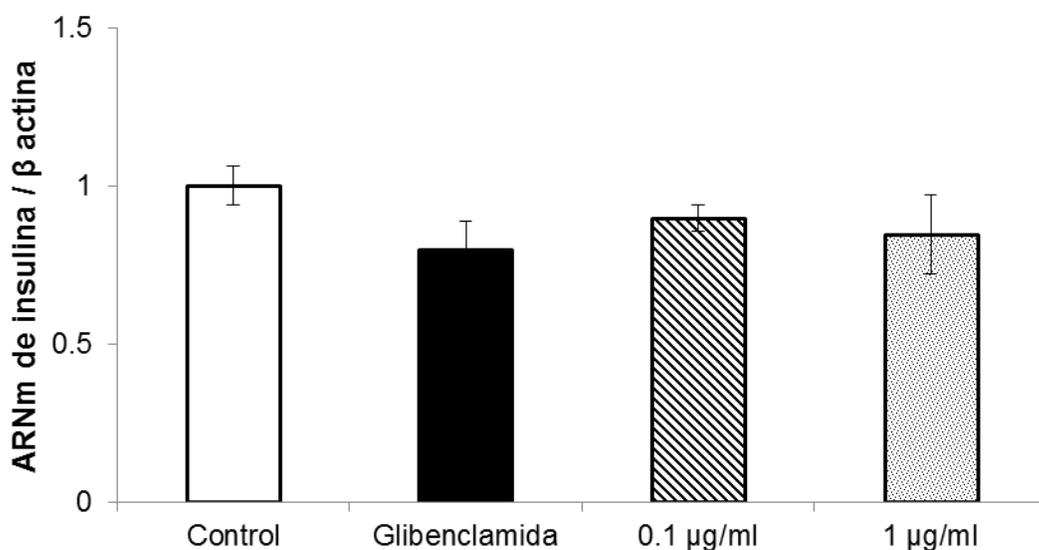


Figura 9. Células RINm5F cultivadas con 11mM de glucosa y *T. usneoides*. n= 6

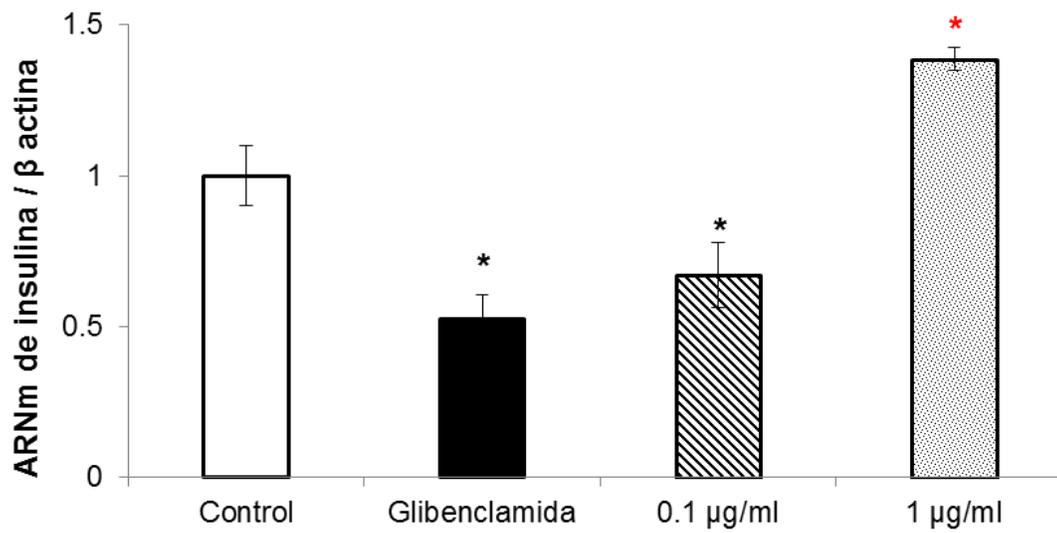


Figura 10. Células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa y *T. usneoides*.

(n= 6 * diferencia significativa respecto al control p < 0.05 con respecto al control)

8.5 Cuantificación de la secreción de insulina

El tratamiento con el extracto de *T. usneoides*, (diferentes concentraciones) durante 24 horas, no afectó la secreción de insulina en las células RINm5F cultivadas tanto con 11mM como con 30 mM de glucosa (Figuras 11 y 12).

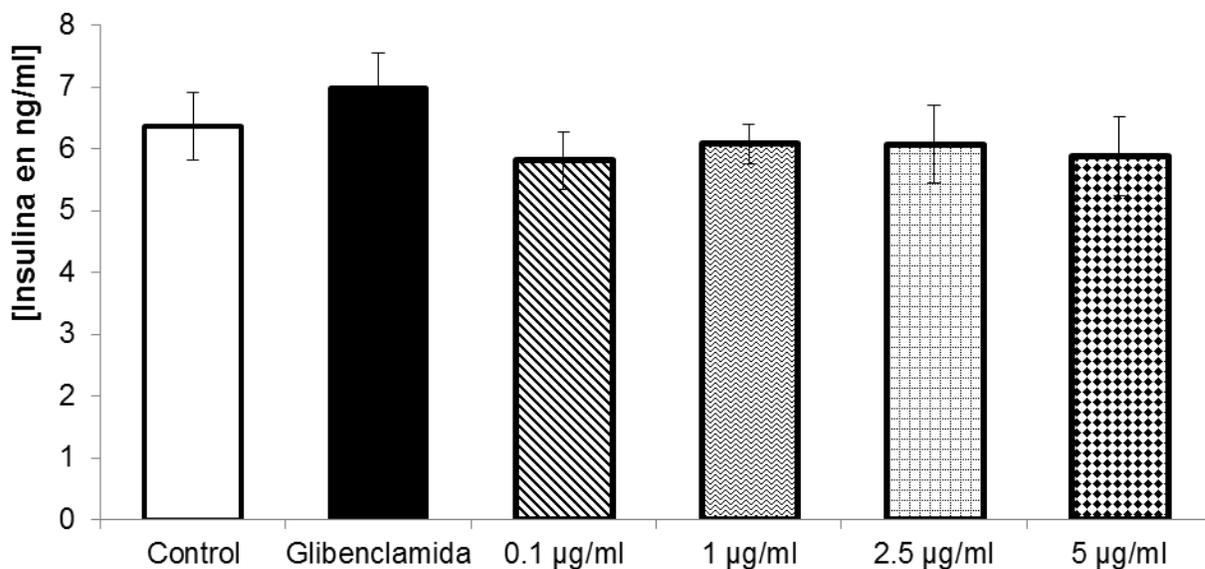


Figura 11. Secreción de insulina en células RINm5F cultivadas con 11mM de glucosa y *T. usneoides* n= 6

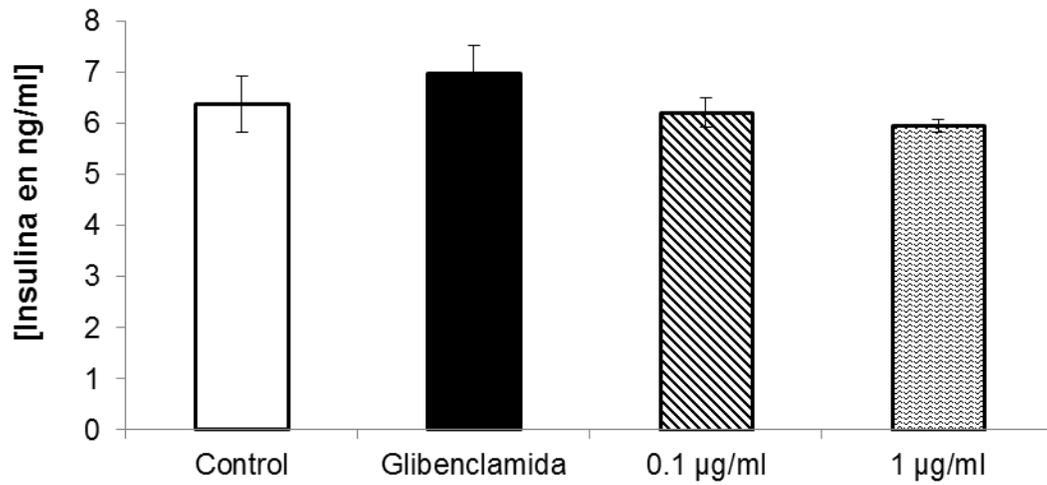


Figura 12. Secreción de insulina en células RINm5F cultivadas con 30 mM de glucosa y *T. usneoides*. En esta condición únicamente se emplearon las dos concentraciones elegidas para los experimentos. n=6

8.6 Cuantificación de Ca^{2+} intracelular

El contenido de Ca^{2+} en las células cultivadas con 11mM en presencia de 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto de *T. usneoides*, disminuyó significativamente ($p < 0.05$), con respecto al control. (Figura 13).

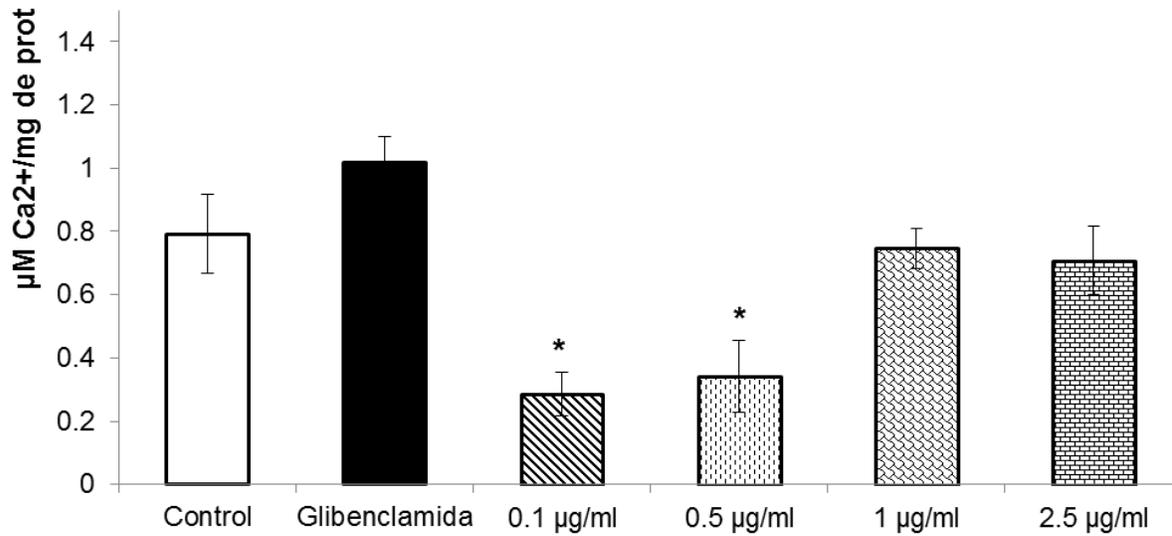


Figura 13. Contenido de Ca^{2+} intracelular en las células RINm5F ($n=6$; * Diferencia significativa respecto al control $p < 0.05$)

9. Discusión

Todos los pueblos del mundo han usado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud, ya sea por una idealización de lo natural o por la situación de pobreza de grandes sectores de la población. El uso de las plantas para curar diversos males es una práctica que ha ido en aumento en los últimos tiempos; sin embargo pocas están validadas científicamente y por lo tanto se desconoce su seguridad y eficacia.

Si bien las plantas pueden poseer propiedades curativas, por distintas causas pueden transformarse en factores de intoxicación. En el proceso de infusión y decocción, algunas alcanzan una gran concentración de sus sustancias activas. Por lo tanto, es necesario conocer con exactitud la cantidad de hierba a usar, el volumen de agua y el tiempo de cocción. Aunque la utilización de plantas curativas es una medicina alternativa válida, en algunas ocasiones su uso es empírico y hasta fraudulento, por lo que pueden aparecer cuadros tóxicos derivados de su consumo afectando principalmente a niños desde el nacimiento, ancianos y mujeres en gestación o lactancia (Marinoff *et al.* 2009).

Las plantas medicinales pueden presentar dos tipos de toxicidad:

a) Toxicidad intrínseca, en la cual la planta produce metabolitos tóxicos para el ser humano. La presencia de síntomas dependerá de la dosis (intoxicación aguda) o del tiempo de empleo (intoxicación crónica). Ejemplos de metabolitos tóxicos: alcaloides,

algunos flavonoides, glicósidos cardiotónicos y cianogenéticos, ácidos. aristolóquicos, derivados terpenoides (taxol, ascaridol, cucurbitacinas).

b) Toxicidad extrínseca, la planta no produce sustancias potencialmente tóxicas, pero éstas provienen de la presencia de contaminantes (mezclas con especies tóxicas, metales pesados, pesticidas de la agricultura, micotoxinas o alta carga microbiana) (Marinoff *et al.* 2009).

Entre las plantas medicinales usadas en México se encuentra *Tillandsia usneoides* Linneo, la cual es empleada contra padecimientos como bronquitis, diabetes, riñones y como antiepiléptico, también se le atribuyen propiedades astringentes.

Su empleo es principalmente en cocimiento y administrada por vía oral. (www.medicinatradicional.unam.mx).

Esta planta también es utilizada como ornamento de los “nacimientos” en épocas decembrinas, forraje para animales y como embalaje (www.conabio.gob.mx). Sin embargo, otro uso poco conocido es el que tiene como biomonitor atmosférico (Olivé *et al.* 2012).

Para comprobar su actividad hipoglucémica Keller *et al.* (1981) realizaron un estudio agudo en el que administraron 250 mg/Kg del extracto acuoso de *Tillandsia usneoides* a un grupo de ratones y a las 2 y 4 horas posteriores a la administración hubo una importante disminución de la glucosa; sin embargo, no muestran resultados a diferentes dosis, ni de toxicidad. Por lo tanto para iniciar este estudio se propuso determinar si la planta a diferentes dosis mantiene su actividad hipoglucemiante *in*

vivo. Los resultados mostraron que a diferencia de los reportes previos, el extracto de *Tillandsia usneoides* a una concentración de 100 mg/Kg disminuye la concentración sérica de glucosa; sin embargo, cuando se incrementa la concentración del extracto, también aumenta la glucemia, lo cual puede deberse a que la planta contiene carbohidratos (Whiterup *et al.*, 1995). A los 240 min, la concentración de glucosa disminuyó con 100 y 250 mg/Kg del extracto, de forma similar a lo que se observó en los animales tratados con glibenclamida. La administración de 500 mg/Kg del extracto no disminuyó la glucemia y además mostró efectos nocivos en los animales, ya que inmediatamente después de su administración, los animales quedaron inactivos presentaron disminución del tono abdominal e hipotermia.

Estos resultados confirman la actividad hipoglucemiante de *T. usneoides* a dosis de 100 y 250 mg/Kg. Sin embargo, su uso en la medicina tradicional debe ser precautorio, pues si bien es un producto natural, a dosis elevadas puede representar un riesgo de toxicidad, debido quizás a la presencia de metales pesados y no a la planta por sí misma, pues como se mencionó anteriormente es utilizada como biomonitor de la contaminación ambiental (Olivé *et al.*, 2012).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue determinar la concentración óptima del extracto de *T. usneoides* para las células β . Para esto, se utilizó la prueba de MTT (Mosmann *et al.*, 1983). En donde la cantidad de MTT reducido a formazán es directamente proporcional al número de células vivas (Stockert *et al.*, 2012). Las reacciones bioquímicas son realizadas por las deshidrogenasas, enzimas encargadas de llevar a cabo reacciones de óxido-reducción (Mathews *et al.*, 2002).

La fiabilidad de esta prueba permitió determinar la concentración en la que las células β tenían una viabilidad superior al 95%, al ser tratadas con el extracto acuoso de *T. usneoides* durante 24 horas, con concentraciones que fueron desde 0.1 hasta 1000 $\mu\text{g/mL}$, encontrando que las concentraciones de 0.1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ son adecuadas para tratar a las células (Fig. 7). Estos resultados se corroboraron con la prueba de azul de tripano y se determinó que las concentraciones adecuadas para los tratamientos posteriores son 0.1 a 1 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 6),

La homeostasis de glucosa depende tanto de la regulación de la secreción de insulina en las células β pancreáticas como de la sensibilidad de los tejidos periféricos a la acción de ésta hormona (Maechler, 2002).

La insulina es secretada en respuesta a glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, siendo la glucosa, el estímulo principal. Su liberación también es controlada y modulada por neurotransmisores y hormonas (glucagon, polipéptido inhibidor gástrico, péptido semejante a glucagon y la somatostatina) (Maechler, 2002).

La célula β posee gran flexibilidad para cumplir los requisitos de adaptación de la secreción de insulina en respuesta a los cambios en la sensibilidad a la insulina o insulinoresistencia por parte de tejidos periféricos, como hígado, músculo y tejido adiposo. La secreción de insulina es un evento complejo, regulado por una serie de moléculas y de segundos mensajeros que actúan solos o en conjunto. Una falla en la señalización y/o en el adecuado cierre del canal de $\text{K}^{+\text{ATP}}$ puede contribuir a la

patogénesis de la diabetes, en la que las células β ya no pueden secretar las cantidades de insulina requeridas por el organismo (Yamazaki *et al.*, 2010).

En las células cultivadas con 11 mM de glucosa y tratadas con 0.1 y 1 $\mu\text{g/mL}$ del extracto acuoso de *T. usneoides* no se encontró un aumento en la expresión del ARNm ni en la secreción de insulina (Figuras 9 y 11, respectivamente). Sin embargo en presencia de 30 mM de glucosa y 1 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de *T. usneoides* la expresión del gen aumentó significativamente. No obstante, no hubo cambios en la secreción de insulina con ninguna concentración (Figuras 10 y 12).

Estos resultados permiten elucidar que el extracto acuoso de *T. usneoides* podría actuar a nivel de la transcripción del gen de insulina más que en la secreción de la misma, puesto que la secreción no está regulada sólo por glucosa, secretagogos no glucídicos (aminoácidos y lípidos), hormonas insulínotropas y neurotransmisores (Montanya y col., 2007), sino también por las acciones combinadas de factores de transcripción necesarios para el desarrollo y la supervivencia de la célula β , como FOXO1, FOXA2, PDX1/IPF-1, PAX4, Pax6, NeuroD1/BETA2, NKX2.2, MafA, HNF, entre otros; (Lazo de la Vega-Monroy y Fernández-Mejía, 2009). Estos factores regulan la transcripción del gen de insulina en respuesta a diferentes estímulos, como glucosa y la unión de GLP-1 a su receptor.

Se sabe que BETA2 y PDX1 son reguladores directos de la transcripción de insulina (Artner-Stein, 2008) y FOXA2 regula una serie de factores que van desde los canales iónicos, enzimas metabólicas, hasta proteínas implicadas en la exocitosis de los gránulos de insulina, además de controlar genes que incluyen *Mtac2d1*, *Chgb* y

VAPB, que pueden controlar la biogénesis de los gránulos de insulina y las interacciones de las proteínas SNARE para su secreción. Así mismo la fosforilación en PDX-1 y la glucosilación en MafA y NeuroD1 son necesarias para su movilización al núcleo, donde inducen la expresión del gen de insulina (Gao *et al.*, 2007). Por esto se puede decir que *T. usneoides* probablemente esté activando a estos factores, ya que se observó un incremento en la expresión del gen de insulina de las células RINm5F tratadas con éste extracto.

Por otro lado, hay factores que inhiben la expresión del gen de insulina mediante la exposición crónica de las células β a concentraciones de glucosa superiores a las fisiológicas (30 mM), dando lugar a la disminución de la transcripción del gen de insulina. El factor de transcripción básico leucina cremallera, CCAAT/ potenciador de unión a la proteína beta (C/EBPbeta), es un represor de la transcripción del gen de insulina en condiciones de glucosa alta (Lu *et al.*, 1997).

Probablemente a la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ el extracto de *T. usneoides* esté actuando como represor del gen, ya que como se muestra en la figura 10, su expresión disminuyó significativamente, no obstante con 1 $\mu\text{g/mL}$ del extracto acuoso de *T. usneoides* la expresión del gen se incrementa.

Por lo anterior, se sugiere que el extracto acuoso de *T. usneoides* podría estar activando la transcripción del gen de insulina, de tal manera que se incremente la expresión del mismo, más no la secreción de insulina, debido quizás a alguna alteración de las proteínas involucradas en la exocitosis.

Las células tratadas con glibenclamida (4 mM), un potente agente hipoglucemiante, perteneciente a la clase de las sulfonilureas, que actúa a nivel de los canales de K^{+ATP} y que es uno de los principales fármacos disponibles para el tratamiento de la DT2, no mostraron cambios significativos en los niveles de ARNm de insulina (Fig. 9 y 10); esto concuerda con la literatura, pues el mecanismo de acción de las sulfonilureas es liberar la insulina preformada en las células β , mediante el bloqueo de los canales de K^{+ATP} para aumentar la concentración del Ca^{2+} e inducir la secreción de insulina (Florez *et al.*,1997).

La concentración de glucosa en plasma está bajo el control de retroalimentación de la insulina a través de los cambios en el metabolismo de las células β , donde es capaz de estimular la secreción de insulina mediante señales desencadenadoras y amplificadoras. Las señales que desencadenan la secreción involucran una serie de eventos bien definidos como, la entrada de glucosa por difusión facilitada, el metabolismo de ésta mediante la glucólisis, el incremento del ATP, el cierre de los canales de K^{+ATP} , despolarización de la membrana, apertura de los canales de Ca^{2+} , incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ y activación de la maquinaria de exocitosis; por lo que el concepto de que la $[Ca^{2+}]_i$ es la señal que desencadena la secreción de insulina inducida por glucosa es ampliamente aceptado (Henquin, 2000).

Las células presentan dos fuentes principales de Ca^{2+} : la extracelular y la existente en organelos intracelulares. El reservorio más importante de Ca^{2+} intracelular es el retículo endoplásmico (Díaz-Horta, 2003).

En la célula β la entrada de Ca^{2+} por el aumento en la concentración de glucosa extracelular y el incremento del contenido de ATP intracelular, lejos de provocar el vaciamiento de Ca^{2+} del retículo endoplásmico, facilita la entrada de Ca^{2+} a este organelo a través de la Ca^{2+} -ATPasa localizada en su membrana. Por otra parte, la membrana del retículo endoplásmico de las células β exhibe altos niveles de fuga pasiva de Ca^{2+} . Estas peculiaridades de la célula β en cuanto al manejo del Ca^{2+} se ajustan estrechamente a su función principal, la producción y secreción de insulina (Díaz-Horta, 2003). Además, el alto contenido de Ca^{2+} en el retículo endoplásmico, es importante para el correcto procesamiento de la proinsulina y para su transferencia a los gránulos secretores (Tengholm *et al.* 1998).

Con los resultados obtenidos en relación con la inhibición de la secreción de insulina por *T. usneoides*, se puede decir que el extracto puede estar actuando de dos maneras, una es impidiendo el cierre de los canales de K^{+ATP} , de tal manera que no permite la entrada de Ca^{2+} a la célula, pues como lo demuestran los resultados (Fig. 13), no hay aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} a ninguna de las concentraciones estudiadas. Otra vía por la que puede actuar el extracto de *T. usneoides* es alterando la expresión de las proteínas involucradas en la exocitosis y por ende no hay secreción de insulina.

10. Conclusiones

- ❖ El extracto acuoso de *T. usneoides* aumenta la expresión del ARNm de insulina, sin alterar la excreción.
- ❖ El extracto acuoso de *T. usneoides* no modifica la concentración intracelular de Ca^{2+} , por lo que la disminución de la glucosa es por otro mecanismo.
- ❖ El mecanismo de acción de *T. usneoides* probablemente esté mediado por la captación de glucosa a nivel periférico, ya que no favorece la secreción de insulina en las células β pancreáticas.

Referencias bibliográficas

- Acosta JL, Jimenez E, Juarez MA, Diaz JC. Hypoglycemic action of Cucurbita ficifolia on type 2 diabetic patients with moderately high blood glucose levels. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 77:99-101; 2001.
- ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes. Vol. 30, sup. 1; 4-41; 2007.
- ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care. Vol. 32, sup.1, 13-61; 2009.
- ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. Diabetes Care. Vol. 37, sup 1, s1-s80; 2014.
- Alarcón-Aguilar, F. J., Román-Ramos, R., Pérez-Gutierrez, S., Aguilar Contreras, A., Contreras-Weber C.C., y Flores-Saenz .J.L. Study of the antihyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. Journal of Ethnopharmacology. Vol.61, 101-110; 1998.
- Alarcón-Aguilar, F.J., Hernández-Galicia E., Campos-Sepúlveda A. E., Xolalpa-Molina S., Rivas-Vilchis J.F., Vázquez-Carrillo L.I., Roman-Ramos R. Evaluation of the hypoglycemic effect of Cucurbita ficifolia Bouche (Cucurbitaceae) in different experimental models. Journal of Ethnopharmacology. Vol.82, 185-189; 2002.
- Andrade-Cetto, M. Heinrich, Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology. 325–348; 2005.

- Arana-Conejo V., Méndez-F J. D., Fisiopatología de las complicaciones vasculares del pie diabético. Gaceta Médica de México. Vol.139 No. 3, 2003.
- Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. Diabetes care. Vol.12; 553-564; 1989.
- Bellomo G, Jewell S, Thor J, Orreniust S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 79(22):6842-6846; 1982.
- Beyra, A. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camaguey (Cuba). Anales del Jardín Botánico de Madrid. Vol.61, 182-204; 2004.
- Bhalla A, Chicka MC, Tucker WC, Chapman ER. Ca (2+)-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion. Nat Structural and Molecular Biology. Vol. 13: 301-313, 2006.
- Brandan NC., Llanos IC., Miño CA., Rodríguez A. Hormonas Pancreáticas. Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina U.N.N.E. Edición 2011.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry. Vol.162, 156-159, 1987.
- Díaz-Flores M., Baiza-Gutman LA., Ibáñez-Hernández MA, Pascoe-Lira D., Guzmán-Greenfel A. Kumate-Rodríguez J. Aspectos moleculares del daño

tisular inducido por la hiperglucemia crónica. Gaceta Médica de México. Vol. 140: 4,438-448; 2004.

- Díaz-Horta Oscar. El ión Calcio: su regulación y función en la célula β pancreática. Revista Cubana de Endocrinología. Vol. 14(3); 2003.
- Eliasson L., Abdulkader F., Braun M., Galvanovskis J., Hoppa M. Rorsman P. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. Journal of Physiology. Vol.586 (14), 3313-3324; 2008.
- ENSANUT. Encuesta nacional de Salud. Secretaria de salud pública. 2006.
- ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud. Secretaria de salud pública. 2012
- FMD. Federación Mexicana de diabetes. Comunicado de prensa conjunto OMS/Federación internacional de Diabetes. 2010.
- Florez Jesús, Armijo Juan Antonio, Media Villa África. Farmacología Humana, 3ra Edición, Ed. Masson, Capítulo 54. S. A, México. pp 927- 943; 1997.
- Fuhlendorff J., Rorsman P., Kofod H., Brand C., Rolin B., MacKay P., Shymko R., Carr R. Stimulation of Insulin Release by Repaglinide and Glibenclamide Involves Both Common and Distinct Processes. Diabetes, Vol. 47, 345-351; 1998.
- Gao N, White P, Doliba N, Golson ML, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa2 Controls Vesicle Docking and Insulin Secretion in Mature β Cells. Cell Metabolism. Vol. 6(4):267–279; 2007.

- García Lujan C, Pérez Hernández BE, Martínez Romero A, Castro Barraza F. Uso de plantas medicinales y suplementos dietéticos para el control glucémico de la diabetes. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. Vol. 8, 229-239; 2009.
- Garrow D, Egede L. Association between complementary and alternative medicine use, preventive care practices, and use of conventional medical services among adults with diabetes. *Diabetes Care*. Vol. 29; 15-19; 2006.
- Goodarz D., Finucane M., Yuan L, Singh G., Cowan M., Paciorek CJ., Lin JK., Farzadfar F., Khang Y., Gretchen A., Rao M., Mohammed K., Riley L Robinson C., Ezzati M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *The Lancet*. Vol. 378, 31-40; 2011.
- Gromada J, Høy M, Renström E, Bokvist K, Eliasson L, Göpel S., Rorsman P. CaM kinase II-dependent mobilization of secretory granules underlies acetylcholine-induced stimulation of exocytosis in mouse pancreatic β -cells. *Journal of Physiology*. Vol. 518, 745–759; 1999.
- Henquin J. C. Wggering and Arnplifjhg Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose. *Diabetes*. Vol. 49, 1751-1760; 2000.
- Hornung-Leoni C. T. Avances sobre usos etnobotánicos de las Bromeliaceas en Latinoamérica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Vol. 10, 297-314; 2011.

- Huebschmann G. A., Regensteiner G. J., Vlassara H., Reusch J.E. B. Diabetes and Advanced Glycooxidation End Products. *Diabetes Care*. Vol. 29, 1420-1432; 2006.
- IDF (por sus siglas en inglés) Federación Internacional de diabetes. Atlas de diabetes 5ª edición. 2012.
- Johnson L, Strich H, Taylor A, Timmerman B, Malone D, Teufel-Shone N, Drummond R, Woosley R, Pereira E, Martínez A. Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytotherapy Research*. Vol. 20, 250-255; 2006.
- Keller W.J., Bourn W.M., Bonfiglio J. F. A Folk Medicine for Diabetes Mellitus. *Quarterly. Journal of. Crude Drug Research*. Vol.19 (2-3), 49-51; 1981.
- Kumar SS, Prashant Kumar R; Jaiswal D. Watal G. Evidence-based critical evaluation of glycemic potential of *Cynodon dactylon*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Vol. 5: 415-420, 2007.
- Llave Gomero F. J. Actualización en el manejo de los antidiabéticos orales en atención primaria. *Medicina de Familia (And)*. Vol. 8 (2), 98-111; 2008.
- Lam PP, Leung YM, Sheu L, Elis J, Tsushima RS, Osborne LR, Gaisano HY. Transgenic mouse over-expressing Syntaxin-1A as a diabetes model. *Diabetes*. Vol. 54:2744-54; 2005.
- Lazo-de la Vega-Monroy M. L., Fernández-Mejía C. Factores transcripcionales en la célula β adulta. *Revista de Investigación Clínica*. Vol. 61 (5), 428-446; 2009.

- Lienhart, E.G, Slot, J.W., James, D.E. y Mueckler, M.M. Absorción celular de la glucosa. *Investigación y ciencia*. Vol.186: 22-28; 1992.
- Lu M, Seufert J, Habener JF. Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272(45):28349-28359; 1997.
- Maechler P. Mitochondria as the conductor of metabolic signals for insulin exocytosis in pancreatic b-cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:1803-1818. 2002.
- Marinoff M. A., Martínez J. L., Urbina M. A. precaución en el uso de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. Vol 8 (3), 184 – 187, 2009.
- Mateos N., Zacarias R. Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Revista del Hospital General Dr. M Gea González*. Vol. 5: 33-41; 2003.
- Mathews C K, Van Holde K E, Ahern K G, *Bioquímica*. 3ª Ed. Editorial Pearson Education, S. A., Madrid, pp 544; 2002.
- Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and Cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*. Vol. 65: 55-63, 1983.
- Muñetón P. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria [en línea]*. 2009.

- Nogales-Aguado P. Arrieta-Blanco F. Incretinas: nueva opción terapéutica para la diabetes mellitus tipo 2. www.jano.es.2010.
- NOM. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Secretaría de salud. 2010.
- Olivares-Reyes J.A., Arellano-Alancarte A. Bases Moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*. Vol. 27: 9-18; 2008.
- Olivé K.I., Solís C., Martínez-Carrillo M.A., Andrade E, López C., Longoria L.C., Lucho-Constantino C.A., Beltrán-Hernández R.I. *Tillandsia usneoides* L, a biomonitor in the determination of Ce, La and Sm by neutron activation analysis in an industrial corridor in Central Mexico. *Applied Radiation and Isotopes*. Vol. 70: 589–59; 2012.
- Olvera-Granados C.P., Leo-Amador G.E., Hernández-Montiel H.L. Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina, ¿Regeneración? *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. Vol. 65, 306-319; 2008.
- OMS. Organización Mundial de la Salud Ginebra. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002 – 2005.
- Phillips, H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: P.F. Kruse and M.K. Patterson (eds.), *Tissue Culture Methods and Applications*. Academic Press, New York, pp. 406–408; 1973.

- Reusch J. Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *Journal of Clinical. Investigation.* Vol.112: 986–988; 2003.
- Roche E. Diabetes tipo 2: gluco-lipo-toxicidad y disfunción de la célula pancreática. *Ars Pharmaceutica.* Vol. 44:313-332; 2003.
- Román-Ramos, R., Flores-Sáenz, J.L., Partida-Hernández, G., Lara-Lemus, A., Alarcón-Aguilar, F. Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Archivos de Investigación Médica.* Vol. 22: 87–93; 1991.
- Román-Ramos, R., Alarcón-Aguilar, F.J., Lara-Lemus, A., Flores-Sáenz, J.L. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Archives of Medical Research.* Vol. 23, 59–64; 1992a.
- Román-Ramos, R., Lara-Lemus, A., Alarcón-Aguilar, F., Flores-Sáenz, J.L., Hypoglycemic activity of some antidiabetic plants. *Archives of Medical Research.* Vol. 23, 105–109; 1992b.
- Román-Ramos, R, Flores-Sáenz, J.L., Alarcón-Aguilar, F.J., Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *Journal of Ethnopharmacology.* Vol. 48, 25–32; 1995.
- Romero-Cerecero O, Reyes-Morales H, Aguilar-Santamaría L, Huerta-Reyes M, Tortoriello-García J. Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales.* Vol.8: 380-388; 2009.

- Sadoul K, Berger A, Niemann HU, Weller PA, Roche A, Klip WS, Trimble R, Ragazzi S, Catsicas PA, Halban. SNAP-23 is not cleaved by botulinum neurotoxin E and can replace SNAP-25 in the process of insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 272: 33023-33027; 1997.
- Sánchez LA. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. Vol. 34: 34-43; 2000.
- Stainer D.F., Rouille Y., Gong Q., Martin S., Carrol R. Chan S.J. The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: Evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes*. Vol. 22: 94-104; 1996.
- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A., MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*. Vol. 114(8):785-796; 2012.
- Tengholm, A., Hagman, C., Gylfe, E. and Hellman, B. In situ characterization of non mitochondrial Ca^{2+} stores in individual pancreatic β -cells. *Diabetes*. Vol.47, 1224-1230; 1998.
- Tesfaye S, Chatuverdi N, Eaton S, Ward J, Manes C. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *New England Journal of Medicine*. Vol. 352, 341-350; 2005.
- www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx

- Witherup K.M.,Mclaughin J.L. Identification of 3-Hidroxi-3-Metilglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of Spanish Moss (*Tillandsia usneoides*).
.Journal of Natural Products. Vol. 58(8):1285-1290; 1995.
- Yamazaki H, Zawalich K, Zawalich W. Physiologic Implications of Phosphoinositides and Phospholipase C in the Regulation of Insulin Secretion.
Journal of Nutritional Science and Vitaminology. Vol. 56(1):1–8; 2010.