



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DOCTORADO

EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

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

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Doctor en Biología Experimental

Presenta:

M. en B.E. Noe Salinas Arreortua

Codirector: José Luis Gómez Olivares

Codirector: Francisco Javier Alarcón Aguilar

Asesor: Mario García Lorenzana

Asesor: Genoveva Durán Reyes

México, D. F.

Mayo 2013.

Comité Tutorial

Codirector: José Luis Gómez Olivares

Profesor Titular C

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

Codirector: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Profesor Titular C

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

Asesor: Mario García Lorenzana

Profesor Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

Asesora: Dra. Genoveva Durán Reyes

Investigadora de la Unidad de Investigación Médica en

Bioquímica

Hospital de Especialidades

CMN SXXI, IMSS

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 y productos de glicación avanzada".

Jurado de Examen

Presidente

Dr. Mario García Lorenzana

Profesor Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Secretario

Dra. Margarita Díaz Flores

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

Vocal

Dra. Genoveva Durán Reyes

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

Vocal

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Profesor Titular D

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

	Índice general	pág.
1	Introducción	14
1.1	Incidencia y mortalidad de diabetes mellitus (DM)	14
1.2	Definición de la DM	14
1.3	Clasificación y diagnóstico de la DM	15
1.4	Complicaciones crónicas de la DM	19
2	Antecedentes históricos de la glicación	21
3	Glicación proteínica en la DM	23
3.1	Glicación de la hemoglobina	24
3.2	Utilidad Clínica	25
3.3	Fructosamina	26
3.4	Utilidad Clínica	27
4.	Productos finales de glicación avanzada (AGEs)	27
4.1	Formación de AGEs	27
4.2	Receptores AGEs	34
4.3	Oxidación proteínica	35
4.4	Química de la oxidación proteínica	36
5	Propiedades estructurales y fisiológicas de la glicina	40
6	Uso de las plantas medicinales en el tratamiento de la DM	43
6.1	Antecedentes de los usos hipoglucémicos de <i>C. ficifolia</i> en la DM	45
7	Justificación	49
8	Hipótesis	51

9	Objetivo general	51
9.1	Objetivo particulares	51
10	Material y Métodos	51
10.1	Material vegetal y preparación del extracto hipoglucemiante de <i>Cucurbita ficifolia</i>	53
10.2	Animales de experimentación	53
10.3	Inducción de diabetes experimental y administración de los tratamientos	53
10.4	Parámetros fisiológicos	54
10.5	Parámetros Bioquímicos	54
10.6	Cortes Histológicos	55
10.7	Extracción de proteínas totales	55
10.8	Western-blot (<i>AGE-BSA</i>)	55
10.9	(Oxi- blot) Oxidación de proteínas	55
11	Análisis estadístico	56
12	Resultados	57
12.1	Perfil bioquímico	57
12.2	Cuantificación de insulina	59
12.3	Estimación de la glicación proteínica	59
12.4	La correlación entre glucemia y hemoglobina glicada	60
12.5	Los efectos del tratamiento de glicina o extracto de <i>C. ficifolia</i> en los valores de fructosamina	60
12.6	El efecto del tratamiento de glicina y <i>C. ficifolia</i> sobre la oxidación proteínica en hígado o riñón de ratones diabéticos	62

12.7	La inmunodetección de AGE-modified protein en suero de ratones diabéticos después del tratamiento con glicina	64
12.8	Análisis histológico de hígado y riñón de ratones diabéticos después del tratamiento con glicina y <i>C. ficifolia</i>	65
13	Discusión	69
14	Conclusiones	80
15	Bibliografía	81
ANEXO 1		
Artículo aceptado		
	Texto artículo	94

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, fructosamina) 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 5

grupos de animales sanos y diabéticos (n=4), los cuales recibieron los siguientes tratamientos durante 25 días, respectivamente: Grupo 1 control; Grupo 2 control diabético; Grupo 3 aminoguanidín; Grupo 4 glicina (0.2 g/kg); Grupo 5 *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 midieron los niveles de glicación en hemoglobina y fructosamina. Los resultados en ratones sanos mostraron que ambos tratamientos redujeron la glucemia durante la prueba de tolerancia a la glucosa (datos no mostrados). En el caso del extracto, su administración produjo una disminución del 1.9% en los niveles de hemoglobina glicada y 1.3% correspondiente a la glicina. Por su parte, en los animales diabéticos tratados con glicina se observó una reducción del 2.3% en los niveles de fructosamina y alrededor de 1% por el extracto. Se puso de manifiesto la presencia significativa de **proteínas oxidadas** de los tejidos, mayoritariamente en riñón de ratones diabéticos sin tratamiento. Observándose una importante reducción en los valores de oxidación proteínica total en respuesta a los dos tratamientos. En cuanto a los compuestos denominados AGE los resultados demuestran que se presentan en menor proporción (**AGE-BSA**) en suero de animales diabéticos que recibieron tratamiento con glicina. Finalmente se presentó efecto protector en hígado como riñón tanto de la glicina, el extracto y la aminoguanidina debido a que son potencialmente inhibidores la glicación y formación de AGEs. Por lo tanto, los tratamientos con glicina y extracto de *C. ficifolia* contribuyen a disminuir la glicación de diferentes tipos de proteínas y a us vez aminorar el estrés carbonílico en esta patología.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) comprises a group of metabolic diseases that secharacteriza by chronic hyperglycemia due to decreased secretion and / or activity of insulin, a hormone released by pancreatic β cells. During periods of hyperglycemia, the hexoses react with proteins to form advanced glycation end products (AGEs), favoring the development of pathological complications that compromise the health of the individual and accelerate the aging process. As a direct result of glycation, it affects the biological activity of various physiologically important proteins. Due to the negative impact on the quality of life of patients with DM, it has become necessary to have alternatives that directly prevent glycation of proteins, which would be helpful to try to prevent the development of such complications. Recent studies in laboratory animals and diabetic patients indicate that intake of glycine reduces the levels of glycated hemoglobin (A1C). Also, many people also use medicinal plants to control DM. One is *Cucurbita ficifolia*, popularly known as chilacayote and whose fruits are edible. It has been demonstrated experimentally and clinically that the fruit of this plant has hypoglycemic effect through stimulation of insulin secretion, with a consequent decrease in the levels of glycated hemoglobin. Despite these alternatives, glycine and *C. ficifolia* potentially could reduce protein glycation other, until now there have been no studies.

The aim of this investigation was to determine the effect of daily administration of glycine and an aqueous extract of *C. ficifolia* on protein glycation (hemoglobin, fructosamine) in healthy mice and mice with experimental diabetes induced by intraperitoneal administration of streptozotocin. We worked with male mice CD-1 strain. 5 groups were formed healthy and diabetic animals (n = 4), which received the following treatments for 25 days, respectively: Control Group 1, Group 2 diabetic control; aminoguanidin Group 3, Group 4 glycine (0.2 g / kg); Group 5 *C. ficifolia* (0.65

mg / kg). We measured food and water intake, body weight, blood glucose without food, triglycerides, cholesterol, glutamic oxaloacetic transaminase activity (GOT) and pyruvic transaminase (GPT) levels were measured hemoglobin glycation in fructosamine. Healthy mice results showed that both treatments reduced during pruba glucose tolerance glucose (data not shown). In the case of the extract, its administration was decreased by 1.9% levels of glycated hemoglobin and 1.3% for glycine. Meanwhile, in the diabetic animals treated with glycine there was a reduction of 2.3% in fructosamine levels, and about 1% for the extract. It was revealed the significant presence of oxidized proteins from the tissues, mainly in the kidney of diabetic mice without treatment. Showing a significant reduction in total protein oxidation values in response to the two treatments. This compounds referred to the results demonstrate that AGE is present in smaller quantities (AGE-BSA) in the serum of diabetic animals treated with glycine. Finally showed protective effect on liver and kidney both glycine and extract, and aminoguanidine because they are potentially inhibitors of glycation and AGE formation. Therefore, treatment with glycine and extract *C. ficifolia* contribute to reducing the glycation of different types of proteins and reduce stress carbonyl in this pathology.

Abreviaturas

DM	Diabetes Mellitus
MODY	Maturity Onset Diabetics of the Young
CTGO	Curva de Tolerancia a la Glucosa Oral
OMS	Organización Mundial de la Salud
IFG	Impaired Fasting Glucose
ADA	Asociación Diabética Americana
A1C	Hemoglobina Glicada
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
DNA	Desoxyribonucleic Acid
ADAG	A1c-Derived Average Glucose
NBT	Nitrobluterasolium
CML	Carboxil Metil Lysine
IRS	Insulin Receptor Sustrate
RAGE	Receptor Advanced Glycation Endproducts
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
HSP	Heat Shock Protein
GHMT	Glicina Hidroximetil Transferasa
GlyR	Glycin Receptor
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido.
Cl ⁻	Cloro
Ca ⁺⁺	Calcio
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PVDF	Polyvinylidene fluoride
MO	Microscopia óptica

INTRODUCCIÓN

1.1 Incidencia y mortalidad de diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus (DM) afecta a más de 194 millones de personas en el mundo y se espera que alcance los 336 millones en 2030. La mayoría de los casos de diabetes se presenta en países en vías de desarrollo (Hossain *et al.*, 2007; International Diabetes Federation, 2010), aunque se considera como un problema de salud pública mundial, ubicándose dentro de las cinco causas principales de muerte. En nuestro país, esta enfermedad es la causa principal de mortandad, alcanzando un 14% de los decesos y siendo la segunda causa en México (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2012). En las últimas dos décadas, en el Distrito Federal el índice de mortalidad asociado con diabetes representa la segunda causa de muerte. Siendo que durante las décadas de los años 80 era la onceava y la décima en los 90's causa de muerte (Programa sectorial de salud 2007-2012). En México, en la actualidad la prevalencia de la diabetes es del 10.8% en la población adulta, representando casi 7 millones de personas, sin tener en cuenta aquellas personas que padecen la enfermedad, y carecen de diagnóstico. La prevalencia pronosticada al año 2030 será de 12.9% en personas adultas (Olaiz *et al.*, 2006)

1.2 Definición de la DM

La diabetes mellitus (DM) es una alteración metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia crónica que se acompaña, en mayor o menor medida, de alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. El origen y la etiología de la DM pueden ser muy diversos, y dan origen a alteraciones en la secreción de insulina y/o en la sensibilidad a la acción de esta hormona. La

hiperglucemia crónica en la diabetes está asociada con daño, disfunción y fallo a largo plazo de varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2008).

1.3 Clasificación y diagnóstico de la DM

La clasificación actual de los síndromes que constituyen la diabetes se ha realizado siguiendo criterios etiológicos:

La diabetes tipo 1 (conocida anteriormente como diabetes juvenil o diabetes insulino-dependiente), representa sólo del 5 al 10 % de los casos de diabetes; es consecuencia de la destrucción de las células β que normalmente llevan a la ausencia de insulina. Generalmente la destrucción de las células β del páncreas está mediada por el sistema inmune (diabetes tipo 1 autoinmune). Lo más frecuente en este tipo de pacientes es la presencia de anticuerpos frente a las células de los islotes. Este tipo de diabetes normalmente ocurre en la infancia y en la adolescencia, pero puede aparecer a cualquier edad. La destrucción autoinmune de las células β tiene una predisposición genética, aunque también está relacionada con factores ambientales aún no totalmente definidos. Estos pacientes son propensos a padecer otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Addison, vitiligo o hepatitis autoinmune. En algunos pacientes, la diabetes tipo 1 no tiene una etiología conocida

Diabetes tipo 1 idiopática. Se refiere a las formas de etiología desconocida de mínima prevalencia; en algunos casos la insulinopenia es persistente y hay tendencia a la cetoacidosis, sin evidencias de enfermedad autoinmune. Tiene una importante carga hereditaria y carece de evidencias inmunológicas para autoinmunidad celular, no vinculada al complejo HLA. (American Diabetes Association, 2008)

Diabetes tipo 2 (conocida anteriormente como diabetes del adulto o diabetes no insulino-dependiente), representa el 90-95% de los casos de diabetes. Una característica de este tipo de diabetes es debida a la combinación en la resistencia a la acción de la insulina y una secreción inadecuada de insulina. (American Diabetes Association, 2008)

En este tipo de diabetes la hiperglucemia se desarrolla gradualmente, por lo que estos pacientes tienen un riesgo elevado de desarrollar complicaciones vasculares. Los niveles de insulina son normales y con el paso del tiempo llegan a ser elevados.

De hecho, los altos niveles de glucosa hacen que las células β secreten gran cantidad de niveles de insulina, lo que conduce al "agotamiento" de las células β . (American Diabetes Association, 2008)

Por lo tanto la secreción de insulina en estos pacientes disminuye, y en consecuencia es insuficiente para compensar la resistencia a insulina (Mattaei *et al.*, 1999). Hay muchas causas de este tipo de diabetes debidos a la resistencia a la insulina que se incrementa por factores externos relacionados con hábitos de vida poco saludables como la obesidad, y el sedentarismo. Mientras que la mayoría de pacientes son obesos, existe también el diagnóstico en sujetos no obesos, especialmente en ancianos. El riesgo de desarrollarla aumenta con la edad, obesidad y la pérdida de actividad física, además es más frecuente en mujeres con antecedentes de diabetes gestacional y en individuos con hipertensión o dislipidemia. Su frecuencia varía en los diferentes subgrupos étnicos y raciales y así mismo existe una fuerte predisposición genética (American Diabetes Association, 2008).

Existen otros tipos de diabetes con etiología conocida que se incluyen en un grupo denominado otros tipos específicos de diabetes. Este grupo incluye DM causada por: defectos genéticos de la función de las células β , anteriormente llamada diabetes juvenil de inicio en el adulto (MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young); defectos genéticos en la acción de la insulina; enfermedades del páncreas exocrino, como pancreatitis, o carcinoma pancreático; endocrinopatías como la acromegalia o el síndrome de Cushing; drogas o productos químicos; infecciones como la rubeola; formas inusuales de diabetes provocadas por el sistema inmune y otros síndromes genéticos (American Diabetes Association, 2008).

La diabetes gestacional se define como algún grado de intolerancia a la glucosa con el comienzo o que se diagnostica por primera vez durante el embarazo.

Tabla 1.- Clasificación etiológica de la diabetes mellitus (American Diabetes Association 2008)

Tipo de DM	Origen
Diabetes tipo 1	Autoinmune
	Idiopática
Diabetes tipo 2	Resistencia a la insulina
	Deficiencia en la secreción de la insulina
Otros tipos específicos	Defectos genéticos de la función de las células β
	Defectos genéticos en la acción de la insulina
	Enfermedades del páncreas exocrino
	Endocrinopatías
	Inducida por drogas o productos químicos
	Infecciones
	Formas inusuales de diabetes provocadas por el sistema
Diabetes gestacional	Factores hormonales

En cuanto a los criterios para realizar el diagnóstico 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 2).

Tabla 2. 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>
<p>(Committee Report, 2000; Committee Report, 2008)</p>

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 3).

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.

Tabla 3. Alteración de la glucosa en ayunas

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

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

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 enlistan en la Tabla 3.

En cuanto al deterioro de la tolerancia a la glucosa se consideran las categorías de la Tabla 4.

Tabla 4. 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

Aunque el mecanismo que provoca estas complicaciones no es del todo conocido (Brownlee, 2001; Peppas y Vlassara, 2005), varios estudios indican que la hiperglucemia crónica es el principal iniciador de las complicaciones microvasculares de la diabetes, ya que se ha comprobado que un estricto control de la glucemia reduce el riesgo de aparición de estas complicaciones, tanto en la diabetes tipo 1 (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1995) como en la diabetes tipo 2 (UKPS Prospective Diabetes Study Group 1998). Sin embargo, la relación entre un estricto control de la glucosa y las complicaciones macrovasculares no está del todo clara (Singh *et al.*, 2001).

Los mecanismos por los que la hiperglucemia es responsable de las complicaciones a largo plazo de la diabetes son múltiples, los más estudiados son: la ruta de los polioles (Lee *et al.*, 1995), la activación de las isoformas de la proteína C cinasa (Koya y King,

1998) y la glicación de proteínas, las cuales promueven la formación de productos de glicación avanzada (AGEs).

Estos mecanismos no son independientes (Brownlee, 2001; Gugliucci, 2000). Así, el elevado flujo de metabolitos a través de la ruta de polioles produce un aumento en la generación de sorbitol, una disminución de la entrada de monoinositol y una disminución de actividad Na^+/K^+ ATPasa. La activación de la PKC causa un aumento en la permeabilidad vascular (Schmidt *et al.*, 1999; Koya y King, 1998) y finalmente los AGEs provenientes de la reacción de glicación de proteínas, los cuales tienen efectos químicos, celulares y tisulares implicados en el desarrollo y progresión de las complicaciones diabéticas (Vlassara y Palace, 2002).

Por otra parte, existe evidencia clínica y epidemiológica que muestra una relación estrecha entre la hiperglicemia y las complicaciones vasculares. Esto basado en 2 estudios clínicos prospectivos.

El primero, el estudio del control y las complicaciones diabéticas (Diabetes Control and Complications Trial, 2005). En este estudio se analizó la asociación entre la hiperglicemia y las complicaciones vasculares. El DCCT evaluó el efecto del tratamiento insulínico intensivo y el automonitoreo de la glucemia. Una de las herramientas principales fue el uso de la hemoglobina glicada para estimar el control glucémico durante períodos prolongados (DCCT, 2005). El estudio fue elaborado en pacientes con diabetes tipo 1 y se utilizó criterios bien establecidos para evaluar la glucemia como factor primordial en la génesis de la microangiopatía y neuropatía. Los resultados demostraron que la disminución de la hemoglobina (A1C) de 9% hasta niveles de 7% reduce la progresión o la aparición, o ambas, de todas las complicaciones microvasculares (UKPDS, 1998)

En cuanto al segundo estudio prospectivo de la diabetes, realizado en el Reino Unido (UKPDS), en el que se mostró el efecto del tratamiento intensivo sobre 5000 diabéticos tipo 2 (Watkins, 1998; Nathan, 1998) y en el que se analizaron diversas estrategias (dieta, agentes hipoglucemiantes orales, insulina), logrando un control estricto de la

glucemia, comparándolas con un control menos estricto; los resultados obtenidos fueron que la hipertensión arterial constituye un factor de riesgo y el tratamiento de la presión arterial fue incluido por consiguiente en el estudio (UKPDS, 1998; Watkins, 1998; Nathan, 1998). Por lo tanto el control estricto de la glucemia también aminora el riesgo de complicaciones en la diabetes tipo 2. Se estimó que la reducción de A1C de 10% a niveles de 9% disminuye el indicador de complicaciones en un 35% y las muertes relacionadas con la diabetes en alrededor del 25% (UKPDS, 1998; Watkins, 1998; Nathan, 1998). Por lo tanto, la glucotoxicidad de la diabetes tipo 2 se confirma, y esto corrobora los resultados previos del DCCT, indicando la importancia de la medición de la glicación de proteínas como una herramienta en el control y monitoreo en la DM.

2. Antecedentes históricos de la glicación

Debido que 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, favoreciendo la reacción denominada Maillard, que se describirá a continuación.

Ha sido descrita desde 1908. Esta reacción entre azúcares y grupos amino proteínicos (Ling *et al.*, 1908) son responsable del cambio de color observado durante la cocción de alimentos. Esta hipótesis fue confirmada en 1912 por Maillard, quien describe la formación de productos de color marrón, que se originan al reaccionar aminoácidos con carbohidratos. Esta reacción es más intensa con pentosas que con hexosas y conduce a la formación de compuestos fuertemente coloreados e insolubles, similar a lo observado en el proceso de caramelización (Maillard, 1912).

Posteriormente, en 1929 Amadori demostró que la incubación de glucosa con aminas forma un compuesto estable, que nombró base de Schiff (Amadori, 1929). Finalmente en 1953 Hodge describió los pasos de la reacción de Maillard, proponiendo que ésta se inicia mediante la formación de una Base de Schiff, cuya evolución mediante la

transposición de Amadori genera los productos de Amadori, cuya degradación da lugar a los productos finales de la reacción de Maillard (Hodge, 1953).

Una de las primeras proteínas en las que se demostró su patrón de glicación fue la hemoglobina. Rahbar (1968) analizó una variante anormal de esta proteína en plasma de personas con DM. Su caracterización demostró que se generaban productos de Amadori debido a la reacción de la glucosa sobre los residuos de lisina de la hemoglobina (Koenig, 1975), conociéndose actualmente como hemoglobina glicada A1C. El descubrimiento de la A1C, que más adelante se describirá con profundidad, llevó a resaltar la importancia fisiopatológica de la reacción de Maillard *in vivo*, proceso conocido en la actualidad como glicación proteínica. En la Figura 1 se muestra el mecanismo general del proceso de glicación, que se inicia con la condensación de la forma acíclica de la glucosa con los grupos ϵ -amina de las cadenas laterales de aminoácidos.

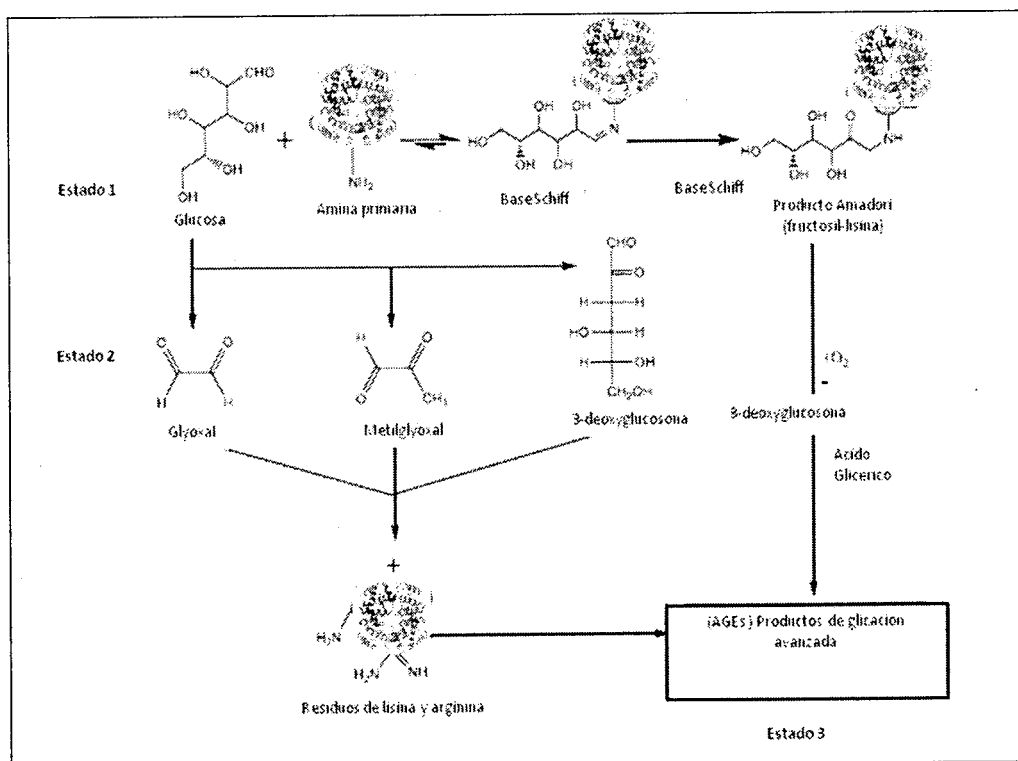


Figura 1. Esquema de la reacción y resumen de las diferentes etapas de la glicación. El paso inicial (etapa 1) es de aminación reductora, resultando la formación de una base de Schiff, seguido por la formación de un producto de Amadori. La segunda etapa se caracteriza por la oxidación de los azúcares libres para formar glicoxal, metilglicoxal, y 3-deoxiglucosone. La etapa final de las primeras reacciones de glicación se caracteriza por la formación de productos de glicación avanzada (AGEs) (Tomado y modificado de Barnaby *et al.*, 2011)

Finalmente, al formarse una base de Schiff de naturaleza glúcida, el grupo hidroxilo en el carbono adyacente a la imina posibilita el reordenamiento de Amadori y la formación del producto de Amadori. Este producto se transforma mediante un conjunto complejo de reacciones, que finalizan en la generación de un grupo heterogéneo de compuestos, conocidos como los productos finales de la glicación (AGEs). Sin embargo, cabe señalar que la verdadera importancia de la glicación proteínica recae sobre las reacciones colaterales en la oxidación de la glucosa y especialmente de las base de Schiff y la formación de productos de Amadori. Dichas oxidaciones producen radicales libres y compuestos carbonílicos y dicarbonílicos altamente reactivos. Los radicales libres y el estrés carbonílico pueden actuar sobre las cadenas laterales de una gran mayoría de aminoácidos, contribuyendo también a la formación de AGEs y potenciándole aún más el daño estructural provocado por la glicación (Ledl *et al.*, 1990; Brinkmann *et al.*, 1998; Ulrich *et al.*, 2001; Rahbar *et al.*, 2002; Monnier, 2003).

Es conocido que la acción de los radicales y los compuestos dicarbonílicos provenientes de la glicación proteínica no solo ataca a las proteínas sino también al ADN y aminofosfolípidos (Bucala *et al.*, 1984; Bucala *et al.*, 1993). Además, se conoce que la concentración de proteínas glicada en diabéticos ($\approx 140 \mu\text{M}$) se incrementa entre 2 y 3 veces con respecto a personas sanas (Kato, 1989), lo que se traduce en un aumento en los niveles de compuestos carbonílicos formados como producto de su degradación, y potencializa el daño en personas con esta enfermedad metabólica.

3. Glicación proteínica en la DM

3.1 Glicación de la hemoglobina

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; Bucala *et al.*, 1993; Gugliucci *et al.*, 2000).

A finales de la década de los 60 se comprobó que las fracciones menores de la hemoglobina, identificadas mediante electroforesis o cromatografía de intercambio iónico, se encontraban elevadas en diabéticos. Esto llevó a la caracterización de estas fracciones menores como combinaciones de glucosa y hemoglobina formadas por modificaciones post-trasduccionales, a las que se denominó hemoglobina glicada (Bunn *et al.*, 1975; Bunn, 1981). Se ha determinado que en las semanas siguientes a un buen control de la DM, la A1C tiende a disminuir lentamente, mientras que aumenta al empeorar el control de la enfermedad.

Con base en este hecho, la determinación de la A1C es considerada el “estándar de oro” para la valoración del control metabólico durante las semanas precedentes, como una herramienta más en el monitoreo de glucosa en DM (Gabbay *et al.*, 1977; Shamon *et al.*, 1986). En la tabla 5 se muestra la A1C que está directamente relacionada con las concentraciones de glucosa sanguínea y la vida media de los eritrocitos ~120 días (ADA, 2008).

La fracción glicada más importante de la hemoglobina es A1C, que se forma por la adición de glucosa a los grupos valina terminales de las cadenas beta de la hemoglobina (Yue *et al.*, 1982). En condiciones normales, la hemoglobina glicada refleja la glucemia media que ha tenido el paciente durante los 2 a 3 meses anteriores al análisis (Dennis, 1989). Debido a que la vida media del glóbulo rojo es de 120 días, la concentración de la cetoamina reflejará la glucemia a la que ha estado expuesto durante este tiempo ya que, sin ser un producto totalmente estable, la reversibilidad se produce a una velocidad tal que no es apreciable durante la corta vida media del glóbulo rojo (Bunn, 1981).

Media de glucosa en plasma		
A1C %	mg/dl	mmol/l
6	126	7.0
7	154	8.6
8	183	10.2
9	212	11.8
10	240	13.4
11	269	14.9
12	298	16.5

Tabla 5. Estimaciones basadas en datos de ADAG representando el promedio de 2.700 mediciones de glucosa durante 3 meses, cada medición de A1C se realizó a 507 adultos con diabetes tipo 1 y 2, y no diabéticos. La correlación entre el nivel de A1C y el promedio glucosa fue de 0,92. El cálculo para la conversión de resultados de A1C, es el promedio estimado de glucosa, en mg / dl o mmol / l.(disponible en <http://professional.diabetes.org/eAG>). (ADA, 2008).

3.2 Utilidad Clínica

La hemoglobina glicada ha probado ser un buen marcador del control glucémico durante la vida media del eritrocito. Su uso se considera hoy de máxima importancia en la práctica clínica debido a que es la evaluación del control metabólico, especialmente de las últimas 48 semanas (Koenig *et al.*, 1975; Bunn, 1981). Cuando el control del azúcar es muy inestable se reduce la correlación con la glucemia media (Beach, 1979; Boden *et al.*, 1980; Pecoraro *et al.*, 1982). La hemoglobina glicada también se correlaciona con otra serie de parámetros de control glucémico, como glucosa plasmática basal y postprandial, desviación estándar de la glucemia, suma de las concentraciones de glucosa pre y postprandiales, glucosurias de 24 horas, etc.).

Por otra parte se presentan reacciones de Amadori subsiguientes que dan lugar lentamente a productos finales de glicación avanzada, que no están en equilibrio y que se acumulan indefinidamente en moléculas de vida más larga, produciéndose de este modo un nexo de unión entre la hiperglucemia crónica y los procesos patofisiológicos que producen las complicaciones en la DM (Brownlee *et al.*, 1984; Steffes y Mauer, 1991).

En general, podríamos decir que la determinación de hemoglobina glicada es herramienta especialmente útil para los pacientes, logrando un buen control metabólico optimizado, como durante el embarazo, aunque también es un instrumento muy esencial en cualquier otro tipo de paciente diabético.

3.3 Fructosamina

La fructosamina es el conjunto de proteínas glicada que se produce continuamente en pacientes diabéticos, producto de reacciones no enzimáticas e irreversibles entre la glucosa y el grupo amino de las proteínas plasmáticas previamente descritas. La fructosamina, al ser un reflejo de los niveles plasmáticos de glucosa en el tiempo, y en la valoración de la DM, este *pool* de proteínas plasmáticas glicadas se utiliza como herramienta para supervisar el control glucémico obtenido durante un período de tres semanas (Dronge, 2006). Por lo tanto, es de gran utilidad al momento de diagnosticar y controlar al paciente diabético. Johnson, en el año de 1982, propuso un método simple, rápido y preciso para la medición de proteínas plasmáticas glicadas (Johnson *et al.*, 1983), el cual posteriormente fue modificado por Baker (Baker *et al.*, 1985). El método se conoce como el de fructosamina y se basa en la capacidad del residuo cetoamina, en pH alcalino, para reducir las sales de azul tetrazólium (NBT). La prueba de la fructosamina nos permite mostrar el enfoque analítico alternativo para el cálculo del conjunto de las proteínas glicadas en suero de pacientes con DM.

Por lo tanto la fructosamina refleja la glicación total de las proteínas séricas, casi el 90% de su concentración corresponde a la albúmina glicada (Baker *et al.*, 1985). Aunque se ha propuesto ajustar los resultados de la fructosamina al contenido de albúmina o proteínas totales en suero (Mc Cance *et al.*, 1987), esto no parece ser necesario en pacientes que no padezcan enfermedad aguda o nefropatía severa, ya que aumenta los costos en reactivos, equipo y técnica sin aportar un beneficio clínicamente apreciable (Howey *et al.*, 1989; Brown y Grunberger, 1991).

3.4 Utilidad Clínica

La cuantificación de la fructosamina presenta una ventaja adicional de consistir en un ensayo automatizado, con una utilidad clínica similar a la de la hemoglobina y considerablemente más económico y rápido. (Winocour *et al.*, 1989; Sobel y Abbassi, 1991). Además, a pesar de detectar cambios en el control glucémico a menor corto plazo debido al promedio de vida de la albumina ante la hemoglobina glicada, no se afecta por las modificaciones agudas de la glucosa, midiendo sólo el componente cetoamina y siendo independiente de la glucemia en el momento de la prueba (Sobel y Abbassi, 1991).

4. Productos finales de glicación avanzada (AGEs)

4.1 Formación de AGEs

La formación de los productos finales de glicación (por sus siglas en inglés AGEs) ocurre naturalmente con el envejecimiento y de forma acelerada en situaciones de hiperglucemia como la diabetes, así como en estados inflamatorios y oxidantes como en la aterosclerosis (Hudson *et al.*, 2003). La glicación ocurre preferentemente en las proteínas, pero también en otras biomoléculas que presentan grupos funcionales capaces de reaccionar con el grupo aldehído de la glucosa, como los lípidos y los ácidos nucleicos. Este fenómeno es dependiente del grado y duración de la hiperglucemia, la vida media de la proteína y la permeabilidad del tejido a la glucosa (Ahmed, 2005), así como en depósitos de proteínas patológicas, tales como el β -amiloide, la cual genera la formación de placas amiloides siendo característico en la enfermedad de Alzheimer y depósitos β 2-microglobulina y en pacientes con hemodiálisis (Miyata *et al.*, 1994; Miyasaky *et al.*, 2005).

Por otra parte, estas proteínas modificadas con AGE están involucradas en la etiopatogenia o la progresión de diversas enfermedades relacionadas con la edad, incluyendo la enfermedad de Alzheimer y las complicaciones en la DM y hemodiálisis (Smith *et al.*, 1994; Vlassara, 1994).

Por lo tanto, las consecuencias patológicas de la formación de AGE han estimulado la investigación para desarrollar fármacos que inhiben los primeros pasos (inhibidores de la glicación) y los pasos finales (inhibidores de la AGEs).

El fármaco con el que se han tenido más estudios en este campo, es la aminoguanidina, que disminuye el nivel de AGE y la magnitud de las complicaciones renales de la diabetes en varios animales modelos (Vlassara *et al.*, 1994).

Mientras el mecanismo de los primeros pasos es bien entendido, hay una inmediata necesidad de ampliar nuestros conocimientos sobre el medio y pasos finales en la formación de los AGE para crear una base racional para la desarrollo de la terapéutica. Numerosas vías oxidantes y no oxidantes han sido sugeridas para los siguientes pasos del reordenamiento Amadori, que son, la caracterización estructural de los productos finales de glicación (AGEs).

Estos compuestos (AGEs) se definen como estructuras complejas y heterogéneas, con entrecruzamientos intra- e intermoleculares, son marrones y algunos son fluorescentes, aunque no todos comparten estas propiedades (Wautier y Schmidt, 2004; Huebschmann *et al.*, 2006) (Figura 2).

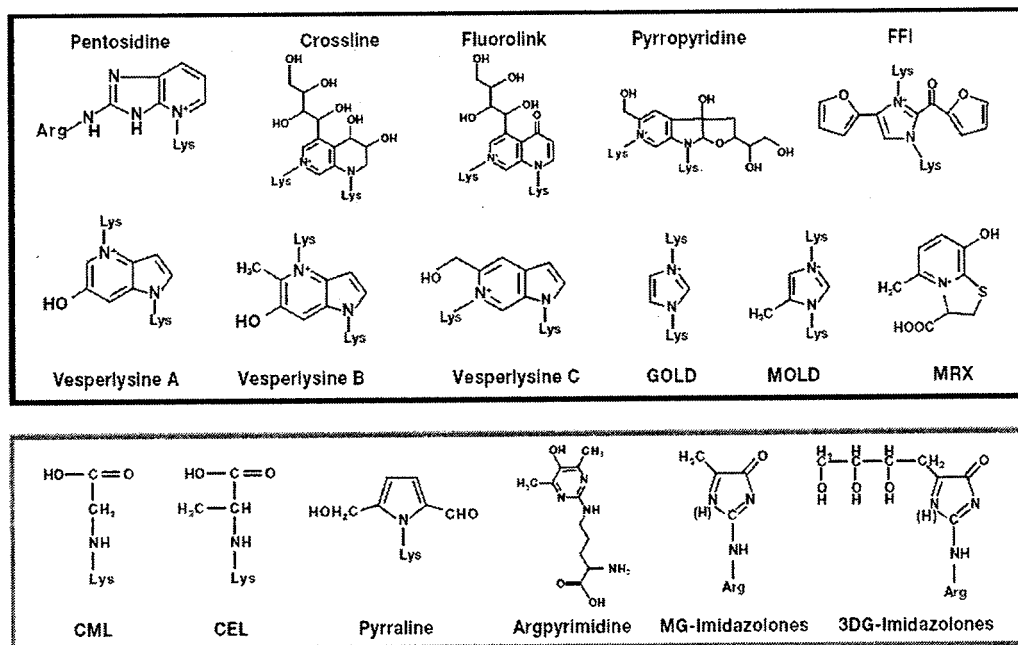


Figura 2. Estructura y diversos productos de glicación avanzada

Esta reacción espontánea y reversible hasta la formación del producto de Amadori, una vez formados los aductos AGEs proteínas, son bastante estables e irreversibles (Ahmed, 2005). Debido a que la glucosa no es el único precursor de AGEs, otras aldosas reaccionan más rápidamente con las proteínas que la glucosa, incluyendo metabolitos procedentes de la glucólisis y de la ruta de los polioles (Bierhaus *et al.*, 1997; Ahmed, 2005). Existen mecanismos alternativos para la formación de AGEs, como el denominado estrés carbonilo o rutas no dependientes de glucosa (Huebschmann *et al.*, 2006). Cabe señalar la asociación directa de los AGEs con el estrés oxidante ya que en condiciones donde se encuentra incrementado el estrés oxidante, como la inflamación o en pacientes con fallo renal, la formación de AGEs está aumentada (Schmidt *et al.*, 1999; Baynes *et al.*, 2000).

Las reacciones de oxidación pueden llevar a la formación de AGEs, de hecho han sido identificados en lesiones ateroscleróticas en pacientes no diabéticos (Schmidt *et al.*, 1999). Por otro lado, la reacción de glicación se caracteriza por la producción de especies reactivas de oxígeno que en conjunto propician aún más la formación de los AGEs (Kikuchi *et al.*, 2003). Debido a la heterogeneidad de los AGEs generados *in vivo* y la complejidad de las reacciones implicadas en su formación, sólo se ha determinado la estructura de algunos AGEs. La carboximetil-lisina (CML, el principal AGE encontrado *in vivo*) la pentosidina y pirralina son los mejor caracterizados (Figura 2). Ambos se acumulan en el colágeno de la piel al envejecer y de forma acelerada en la diabetes mellitus (Bierhaus *et al.*, 1998). El entrecruzamiento de proteínas por AGEs da lugar a la formación de agregados de proteínas insolubles y resistentes a proteasas (Kikuchi *et al.*, 2003).

Debido a su formación lenta, en un principio se pensó que los AGEs sólo se formaban a partir de proteínas extracelulares de vida media larga, y en función del tiempo, representando una forma de senescencia molecular. Sin embargo, los AGEs también se forman a partir de moléculas de vida media corta, como las proteínas del plasma y los lípidos (Makita *et al.*, 1994; Vlassara y Palace, 2002). Esta modificación de moléculas de vida media corta implica la oxidación de proteínas y lípidos, altera su conformación molecular, modifica sus actividades enzimáticas, reduce su capacidad de degradación y

resulta en un reconocimiento y aclaramiento anormal por parte de receptores (Vlassara y Palace, 2002).

Estas moléculas (AGEs) son reconocidos por macrófagos, endocitados y degradados parcialmente y, como consecuencia, se liberan a la circulación AGEs de bajo peso molecular conocidos como AGEs de "segunda generación". Estos péptidos contienen intermediarios dicarbonílicos de la reacción de Maillard y son mucho más reactivos que la glucosa, por lo que pueden amplificar el daño tisular (Peppas y Vlassara, 2005), siendo todos estos daños los que se resumen en la tabla 6.

Tabla 6. Efectos de los productos finales de glicación avanzada AGEs en la patología vascular y DM

Estabilidad de colágeno por conferir alta resistencia alta colagenasa
Incremento de la formación de la matriz vascular y estrechamiento de la luz de los vasos
Aumento en la deposición de la membrana basal
Hipertrofia glomerular y glomeruloesclerosis
Aumento en la secreción de matriz mesangial
Deterioro de la matriz extracelular (heparán sulfato y proteoglicanos)
Incremento de la permeabilidad endotelial
Inducción de citocinas y factores de crecimiento (IL-1 α , TNF, IGF-1A, PDGF.) mediados por monocitos, y macrófagos
Inducción de células de músculo liso a proliferación
Inducción en la proliferación de fibroblastos
Estimulación de células T e inducción de la síntesis de interferón- γ
Activación del receptor RAGE
Inducción de la unión de AGE-loaded eritrocitos a las células endoteliales
Pérdida en la actividad mitogénica en células endoteliales debido a cambios en bFGF
Inducción autocrina en la síntesis vascular VEGF
Aumento en la actividad procoagulante expresión TF
Deterioro de la actividad anticoagulante expresión de trombosmodulina.
Inducción de moléculas de adhesión (VCAM-1)
Inducción de la quimiotaxis polipéptido JErMCP-1 en células musculares lisas
Inducción de la quimiotaxis en células mononucleares, la activación y migración trans-endotelial
Daño en los efectos vasodilatadores y blanqueamiento de NO
Aumento en la vasoconstricción mediante inducción de endotelina-1
Inducción de estrés oxidante intracelular y activación NF-kB
Peroxidación lipídica
Reducción en los mecanismos de defensa antioxidante intracelular (GSH, vitamina C)
Incremento en la activación de macrófagos, formación de ateroma AGE-LDL
Incremento en la tasa de mutación del ADN

Todos estos péptidos son excretados por el riñón, parte se reabsorben y se catabolizan en el túbulo contorneado proximal y el resto se excreta por la orina; por tanto su eliminación efectiva es dependiente de la función renal (Makita *et al.*, 1991; Peppas y Vlassara, 2005). Estudios *in vitro* han propuesto que la insulina también contribuye a la eliminación de los AGEs desde el plasma a través de la ruta mediada por el receptor de sustrato de insulina (Insulin Receptor Substrate, IRS) y la activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (Sano *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2001). A nivel celular existen sistemas protectores intracelulares que limitan la acumulación de intermediarios reactivos de AGEs. Uno de estos sistemas es el de las enzimas degradativas glioxalidas (Shinohara *et al.*, 1991; Peppas y Vlassara, 2005).

Se han realizado experimentos con exposición de precursores de AGEs o proteínas modificadas por AGEs, las cuales producen enfermedad vascular similar a la originada por las complicaciones diabéticas. Estudios en células vasculares *in vitro*, utilizando proteínas modificadas por AGEs, han sugerido el papel importante de la glicación de proteínas, las cuales provocan una alteración bioquímica unida a las complicaciones de la DM. Asimismo, se han realizado estudios con inhibidores sobre formación de los AGEs, como el caso de la aminoguanidina, que en modelos animales de diabetes experimental se han observado una disminución en el desarrollo de las complicaciones vasculares (Ahmed y Thornalley, 2007).

Además de la DM se han descrito otras enfermedades en las que los niveles de AGEs están incrementados: artritis reumatoide, enfermedades asociadas con formación de péptidos amiloides (amiloidosis secundaria) y la enfermedad de Alzheimer previamente mencionadas. Otros mecanismos donde se ha relacionado con la toxicidad de los AGEs son debidos a una alteración en la estructura y función de proteínas intracelulares. Los AGEs no sólo se forman en proteínas extracelulares, sino también, ocurre la rápida formación de AGEs intracelulares, a través de intermediarios altamente reactivos del metabolismo de la glucosa, pueden alterar la estructura y función de proteínas intracelulares, principalmente en células que no requieren insulina para el transporte de glucosa, es el caso de las células endoteliales de la microvasculatura y las neuronas (Brownlee, 2000). El factor de crecimiento de fibroblastos es una de las proteínas modificadas por AGEs (Giardino *et al.*, 1994; Brownlee, 2001). Aunado a lo anterior, también se presenta la alteración de proteínas de la matriz extracelular la cual afectan las propiedades principales de la matriz, dando lugar a alteraciones en la interacción matriz-matriz y matriz-célula (Brownlee, 2000). Debido a esto, las proteínas que constituyen la matriz extracelular y las membranas basales vasculares, están entre las proteínas con una vida media más larga, y por tanto, son altamente susceptibles a la modificación por los AGEs. Lo cual altera funcionalmente los entrecruzamientos en la membrana basal mediados por los AGEs, reduciendo la solubilidad y disminuyendo la digestión enzimática de proteínas (Vlassara y Palace, 2002).

En cuanto la colágena, se producen enlaces covalentes intermoleculares producidos por los AGEs (Tanaka *et al.*, 1988). Lo que conlleva que los AGEs de la colágena tipo IV interfieran en el correcto ensamblado de otras proteínas en la formación de la matriz extracelular (Brownlee, 2000). También, se ha presenciado el estrechamiento luminal, característico de los vasos sanguíneos en diabéticos, los cuales se debe en gran parte a la acumulación en el subendotelio de proteínas del plasma, como la albúmina, las lipoproteínas de baja densidad e inmunoglobulinas gamma, que quedan atrapadas por los AGEs en el colágeno tipo I de la membrana basal.

La formación de los AGEs en la laminina de la matriz extracelular, disminuye la unión de otros componentes principales de la membrana basal, como la colágena y el heparán sulfato (Charonis *et al.*, 1988), que es la molécula que proporciona la carga negativa a la membrana basal en el glomérulo. Como consecuencia se produce proteinuria y además se estimula la producción de otros componentes de la matriz en la pared de los vasos (Brownlee, 2000; Goldin *et al.*, 2006).

La formación de los AGEs en la matriz extracelular, también altera las interacciones de las proteínas de la matriz con los receptores de las células (integrinas). Por ejemplo, la modificación de los dominios de unión de la colágena tipo IV a células produce una disminución de la adhesión por parte de las células endoteliales (Haitoglou *et al.*, 1992).

Todas las anomalías en la matriz extracelular alteran la estructura y función de los vasos (Goldin *et al.*, 2006). Con todo esto se confirma la fuerte relación entre la formación de los AGEs y los cambios fisiológicos observados en la enfermedad vascular, diabetes, aterosclerosis y envejecimiento (Bierhaus *et al.*, 1998), modificando así la estructura y función de proteínas intracelulares, alteración de proteínas de la matriz extracelular e interacción con receptores celulares.

4.2 Receptores de los elementos de glicación avanzados

Se ha establecido en ciertos tipos celulares la expresión de receptores de los AGEs, que promueven efectos dependientes de la activación de sus receptores (Koyama *et al.*, 2007). El receptor más ampliamente estudiado es el denominado receptor para los AGEs (RAGE), pero otros receptores identificados son los receptores para AGEs 1, 2 y 3 (AGE-R1, AGE-R2 y AGE-R3/galectina-3) la familia de ezrin, radixin y moesin (McRobert *et al.*, 2003).

El RAGE pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y la interacción de los AGEs con su receptor desencadena la activación de segundos mensajeros, tales como la proteína quinasa C y la translocación del NF- κ B al núcleo, donde promueve un incremento en la transcripción de diversas proteínas, incluyendo ICAM-1, E-selectina, endotelina-1, factor tisular, VEGF y citocinas proinflamatorias (Yan *et al.*, 1994; Schiekofer *et al.*, 2003; Goldin *et al.*, 2006).

En la región del promotor del RAGE se presentan elementos funcionales para la unión del NF- κ B (Li *et al.*, 1997) y una consecuencia de la translocación del NF- κ B es la desregulación del RAGE, creando de este modo un círculo vicioso que facilita un estado de inflamación persistente. Consecuentemente, el objetivo de los tratamientos en el paciente con DM es disminuir o controlar los niveles de glucosa elevados. Sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollan las complicaciones durante la evolución de la enfermedad, motivo por el cual muchas de las investigaciones se han enfocado a desarrollar terapias que no sólo corrijan la hiperglucemia sino que, también disminuyan el estrés oxidante y modifiquen el metabolismo de los lípidos (Haffner, 1998), así como controlar la presencia de componentes que desencadenan el proceso inflamatorio y la resistencia a la acción de la insulina. Sin embargo, es necesario encontrar opciones terapéuticas a la atención médica científica que, por principio, no puede ofrecer la curación, sino sólo el control de la DM.

En investigaciones recientes se ha encontrado que la glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico que se origina en una amplia variedad de estados patológicos, tales como trauma, shock hemorrágico, sepsis, quemaduras y procesos de isquemia/reperfusión, relacionados con la activación de macrófagos que liberan potentes mediadores inflamatorios tipo citocinas, los cuales desempeñan un importante papel en la respuesta inflamatoria progresiva, característica de la DM.

4.3 Oxidación proteínica

En general, cualquier factor que ocasione estrés oxidativo puede causar oxidación proteínica; a) Disminución en la eficacia de los sistemas antioxidantes de defensa, b) Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species ERO), c) Disminución en la capacidad de reciclar las proteínas oxidadas o un aumento en la susceptibilidad de las proteínas para ser oxidadas (Dukan *et al.*, 1998, 1999, 2000; Ji *et al.*, 1990; Nyström, 2002), c) Cambios en la concentración intracelular de hierro que favorezcan la producción de las EROs y la carbonilación de proteínas (Stadtman, 1992; Stadtman *et al.*, 2000).

Un aumento en la producción de las EROs se lleva a cabo por un estancamiento en el flujo de electrones, lo que aumenta la probabilidad de reducir parcialmente la molécula de oxígeno. También, la actividad del proteosoma se disminuye en células viejas, en diversos tejidos humanos, en cultivos primarios y en bacterias, lo cual produce la acumulación de proteínas dañadas por diversos medios de estrés, que tienden a desnaturalizarse y agregarse en complejos hidrofóbicos cuya proteólisis es sumamente difícil y con frecuencia requiere de proteínas accesorias que desagreguen dichos complejos (Friguet *et al.*, 2000; Sitte *et al.*, 2000; Shringarpure *et al.*, 2002).

Adicionalmente, la oxidación de proteínas ocurre cuando aumenta la producción de sustratos más susceptibles, esta susceptibilidad en este caso se debe al mal plegado de las proteínas o a la producción de péptidos incompletos por errores en la traducción, ya sea, por el uso de antibióticos que interfieren con la traducción o bien por mutaciones que afectan la capacidad de los ribosomas de corregir errores.

Esta oxidación es poco específica, comparada con la encontrada en células viejas pues cualquier sustrato no plegado o cuya síntesis fue interrumpida siendo un posible blanco de oxidación (Dukan *et al.*, 2000; Ballesteros *et al.*, 2001).

4.4 La química de la oxidación proteínica

La oxidación es la donación o pérdida de electrones de los átomos de un elemento. A nivel molecular, la pérdida de electrones promueve el cambio en el grado de oxidación de un grupo químico, ya sea por la reacción directa con especies reactivas de oxígeno o por reacción indirecta con productos secundarios del estrés oxidante. Varias especies reactivas de oxígeno pueden reaccionar potencialmente con cualquier molécula dentro de la célula, como los ácidos nucleicos, lípidos o proteínas, y oxidarla. Cada ERO presenta un potencial de oxidación diferente de acuerdo a su reactividad. El daño oxidativo en el ADN y los lípidos, ya se ha descrito (Esterbauer *et al.*, 1991; Sie *et al.*, 1992; Sie, 1993; Humphrie *et al.*, 1998;).

El estudio de la oxidación de proteínas mediada por radicales libres comenzó a principios del siglo XX. Dakin (1906) estudió sobre la oxidación de aminoácidos en sistemas de Fenton y Hopkins, éste último autor describió el papel del glutatión como un molécula anti- y pro-oxidante, dependiendo de la ausencia o presencia de metales de transición (Dean *et al.*, 1997). Por otra parte, las proteínas poseen diversos grupos con diferentes grados de oxidación, los cuales pueden sufrir varios grados de modificación al exponerse ante agentes oxidantes. Esto es, dependiendo de la especie reactiva de oxígeno a la que se expongan las proteínas, la oxidación puede ser específica (como en el caso de oxidación catalizada por un metal, que daña a las proteínas con cúmulos de hierro-azufre o con hierro libre por formación de radical hidroxilo) o inespecífica (como ocurre en la oxidación por radiación en la que se produce oxígeno singulete).

Carácter reversible o irreversible de la oxidación de proteínas

La oxidación reversible

Esta constituye en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox, como en el caso de la formación de los puentes disulfuro entre grupos tioles de los residuos de las cisteínas cercanas dentro de la conformación tridimensional de una proteína. Otras formas de oxidación reversible son la glutationilación y la S-nitrosilación (Requena *et al.*, 2003).

La oxidación irreversible

Se considera, que está dada por cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones son ocasionadas por reacción de proteínas con las EROs, algunos de los cuales son radicales libres generados por radiación ionizante y por oxidación catalizada por un metal. La oxidación por la generación de grupos carbonilo, se lleva a cabo químicamente por cuatro rutas principales; 1) La oxidación directa de prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con ERO; los productos de la oxidación de dichos aminoácidos son: 2-pirrolidona a partir de prolina, semialdehído a partir de lisina, semialdehído glutámico a partir de arginina, prolina y ácido 2-amino-3-cetobutírico a partir de treonina. Recientemente, se demostró que los productos carbonilados, que cuantitativamente representan la mayor parte de una medición de carbonilación, son el semialdehído glutámico y en menor grado, el semialdehído aminoacético (Requena *et al.*, 2003).

2) La formación de grupos carbonilo involucra la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico lo cual conlleva a la formación de péptidos en los cuales el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado cetoacilo.

3 y 4) Implican reacciones secundarias con las moléculas que presentan grupos carbonilo reactivo formado previamente por reacción directa de biomoléculas con ERO (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Aunque en principio, cualquier proteína puede ser oxidada por carbonilación, los análisis de diversos organismos han demostrado que existe un patrón específico hacia la oxidación por carbonilación en organismos filogenéticamente no relacionados. Por ejemplo, en *Escherichia coli* se identificó que el proteoma no se carbonila por igual, y que los blancos específicos de carbonilación no dependen de la cantidad de cierta proteína en un momento dado en el citoplasma. Las proteínas DnaK y GroEL (chaperonas de la familia de las HSP70 y HSP60, respectivamente. Heat Shock Protein, HSP), la proteína tipo histona H-NS, los factores de elongación EF-Tu y EF-G, glutamino sintetasa, glutamato sintasa, aconitasa, malato deshidrogenasa y piruvato cinasa son los blancos de oxidación preferenciales en *E. coli*, (Tamari *et al.*, 1998) y homólogos de estas proteínas también han sido identificadas como blancos específicos en plantas (Johansson *et al.*, 2004) y en cerebros de pacientes con Alzheimer (Castegna *et al.*, 2002). Debido a esto, existen consecuencias metabólicas de la oxidación proteínica, y se podrían clasificar de la siguiente forma:

- A) La oxidación proteínica y las chaperonas moleculares
- B) Oxidación y proteólisis
- C) Envejecimiento y carbonilación
- D) Enfermedades en humanos y carbonilación

- i. Enfermedades inflamatoria*
- ii. Diabetes.*
- iii. Daño renal crónico*
- iv. Enfermedad de Alzheimer*
- v. Cataractogénesis*

La posibilidad de predecir blancos proteínicos de oxidación en ciertas circunstancias o patologías, podrían ser de más relevancia a nivel fisiológico. Sin embargo, con parámetros de la cinética clásica esto ha resultado poco representativo de lo que sucede *in vivo*. Todas estas variables ofrecen sin duda un campo interesante para la investigación de la oxidación proteínica. Por otra parte, todas estas consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas, es aún un tema de gran debate, pues en la mayoría de los casos no puede definirse con precisión si la oxidación es causa o consecuencia.

Lo que es claro es la correlación entre el envejecimiento y una disminución en la capacidad de división celular o reproducción, y ciertas patologías con aumento de proteínas oxidadas. Desde un punto de vista molecular, la posibilidad de que la oxidación sea un antecedente de la ubiquitinación para la degradación de proteínas representaría un mecanismo de marcaje no explorado y aún utilizado no sólo en procariontes sino posiblemente en eucariontes. A nivel de diagnóstico clínico es de poca relevancia, pues muchas enfermedades ocasionan la oxidación inespecífica de proteínas en el plasma. A menos que se encontraran blancos específicos e invariables en fases tempranas de alguna enfermedad, esta herramienta molecular podría ser utilizada en diagnosis para diferentes patologías y sería importante para la evaluación de los pacientes con DM. Es evidente que estos hechos han estimulado la búsqueda y el desarrollo de nuevas alternativas pues, en el mundo hay una epidemia de diabetes y, al igual que como ocurre con el cáncer, la naturaleza de esta enfermedad nos ha hecho ver que un solo medicamento es suficiente para dar un tratamiento adecuado. Las alternativas pueden ser buenas, pero ninguna por sí misma es suficiente para revertir por completo la elevación del azúcar en sangre y sus complicaciones. Precisamente esta búsqueda y el mejor conocimiento sobre la diabetes han dado origen a la aplicación de aminoácidos, que penetrarán en breve y que ayudarán a que los pacientes mejoren su calidad de vida. Por lo tanto la glicina y los extractos bien caracterizados de las plantas medicinales podrían ser una alternativa en el tratamiento de esta enfermedad aminorando las complicaciones de la misma.

5. Propiedades estructurales y fisiológicas del aminoácido, glicina

Se trata del aminoácido más sencillo, se encuentra dentro del grupo de los aminoácidos no esenciales y está compuesto por una molécula de carbono enlazada a un grupo amino y a un grupo carboxilo. Éste aminoácido es sintetizada por la enzima glicina hidroximetiltransferasa (GHMT), con la eliminación de una unidad C-1 del C-3 de la serina; se trata de una reacción muy compleja, descrita en detalle por (Schirch y Szebenyi, 2005).

La glicina es especialmente importante en la síntesis de colágeno y elastina, debido a que constituye la tercera parte del total de residuos de aminoácidos en las dos proteínas. Además, se utiliza generosamente en el metabolismo como reactivo químico para la síntesis de muchos compuestos como bases púricas y aminoácidos llamados no esenciales como la histidina y otros como: el glutatión que juega un papel principal en la lucha contra el estrés oxidante. La glicina también participa en la desintoxicación de ácido benzoico (Melendez *et al.*, 2008) y actúa como neurotransmisor inhibitor en el sistema nervioso central.

En diversos modelos experimentales, se le ha atribuido 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 efectos benéficos de protección permanecen sin comprenderse (Mancilla *et al.*, 2002).

Las funciones atribuidas a la glicina se adjudican 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 éste aminoácido 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 éste 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, los monocitos, los neutrófilos y los linfocitos (Ikejima *et al.*, 1997; Stachlewitz *et al.*, 1999). También, se expresa en otras células como los hepatocitos, las células endoteliales y las 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, el péptido bacteriano formilmetionina-leucina-fenilalanina, ácidos biliares, D-galactosamina, proliferadores peroxisomales, ciclosporina A, prostaglandina E2, fenilepinefrina, factor de crecimiento vascular del endotelio, concanavalina A y anticuerpo dirigidos contra-CD3 (Ikejima *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001).

El incremento de calcio intracelular induce la señalización para la producción de citocinas y mediadores de inflamación, activación de enzimas tipo proteasas y de la fosfolipasa A, que inducen proliferación y muerte celular. La activación de los macrófagos lleva a la producción de EROs y de nitrógeno. La activación del GlyR suprime estos eventos dependientes de calcio al inducir la entrada 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 3).

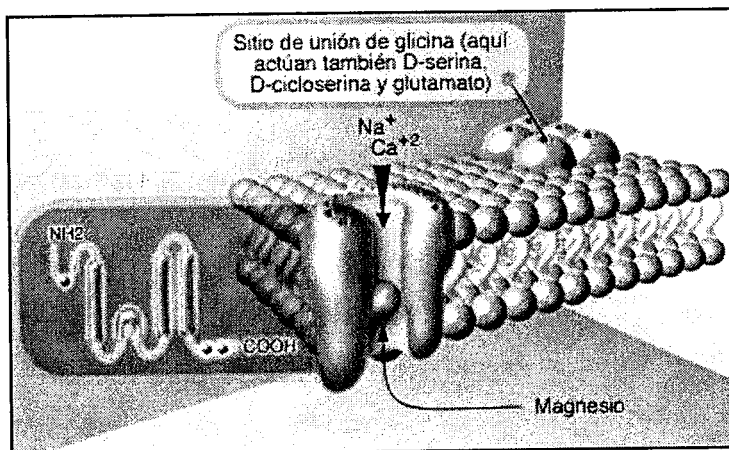


Figura 3. La activación del canal de cloro dependiente de glicina es uno de los mecanismos propuesto para los efectos de la glicina, siendo un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. El efecto inhibitorio se ejerce al unirse a su receptor (GlyR) localizado en la membrana postsináptica 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; Vázquez *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; Vázquez *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.*, 1998).

6. Uso de las plantas medicinales en el tratamiento de la diabetes mellitus

En América Latina se reportan muchas especies de plantas que se han usado desde un punto de vista etnofarmacológico para aminorar los síntomas de la diabetes mellitus (Saxena *et al.*, 2004). Estas plantas representan más de 725 géneros en 183 familias, incluyendo algas marinas y hongos. Derivado de esta diversidad, se ha dado un aumento en el número de investigaciones clínicas dirigidas a la validación de las propiedades antidiabéticas de estos recursos (Barbosa *et al.*, 2005).

En la medicina mexicana tradicional más de 500 plantas se han usado como medicamentos naturales para el tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones (Cetto *et al.*, 2005). Muchas de las plantas empleadas se han valorado farmacológicamente para demostrar su actividad hipoglicemiante y para aislar sus componentes químicos que pueden ser utilizados como prototipos para nuevos agentes hipoglicemiantes. En una revisión acerca de la literatura sobre estudios farmacológicos relacionados con la descripción de plantas y compuestos con actividad hipoglicemiante en América Latina, se señaló que dentro de las diez principales familias se encuentra la familia *Cucurbitaceae* (Cetto *et al.*, 2005).

Tabla 7. Distintos nombres y empleos de *Curcubita ficifolia* "chilacayote" su estado de maduración en América Latina.

País	Nombres comunes	Uso terapéutico	No terapéutico	Parte de la planta	Desarrollo/estado de la planta	Preparación	Modo de empleo
Argentina	Cayote		Alimento	Fruto	Maduro/fresco	Al horno	Dulces y sopas
Bolivia	Blanca, Lacayo, Lacayota, Lacayute						
Colombia	Auyama, Mexicana, Victoria, Vitoriera						
Costa Rica	Chiverre		Alimento	Fruto	Inmaduro	Hervido: La miel de chiverre es un dulce en forma de fibra pastosa que se utiliza como relleno en repostería y sirve de postre en las comidas habituales.	De flores, brotes y palmitos
Ecuador	Tambo, Zambo	Anti-parasitario	Tónico para el cabello, Utensilio cocina	Semillas Fruto	Maduro/fresco Maduro seco	Machado	Ingestión y aplicación tópica almacenamiento granos Dulce con miel o leche
Guatemala	Ayote-chilacayote, Chilacayote, Cidracoyote		Alimento	Fruto			Dulce
Honduras	Chiverre		Alimento	Fruto			Alimento
Salvador	Chilacayote		Alimento	Fruto			Dulce
México	Puebla		Alimento	Fruto	Inmaduro	Hervido, al vapor, tostado	Capeado En tortitas Sopas Al vapor Caldos Guisados
	Hidalgo (Pipian)	Anti-parasitario		Semillas			
	Edo. México		Alimento	Semillas	Maduro	Tostado	Botana, Palanqueta
	Edo. México		Alimento	Fruto	Maduro		Dulces y conservas Dulce cristalizado
	Oaxaca (Chilacayote)	Cura Enfermedad Newcastle en guajolotes		Fruto	Maduro		Agua de beber o ingesta forzada
Perú	Chiclayo (9), Calabaza, Calabaza blanca, Lacayota, Calabaza serrana		Alimento		Fruto	Maduro	Dulce, bebida
Venezuela	Zapallo o Zapayo						

En México se emplean cuando menos ocho especies de la familia *Cucurbitaceae* como métodos alternativos para el tratamiento de la DM. Entre ellas, se encuentra *Cucurbita ficifolia*, conocida con el nombre común de “chilacayote”. En la tabla 7 se denotan los distintos nombres y usos de las partes del chilacayote y su estado de maduración en América Latina. Dentro de su área de distribución, las flores, tallos jóvenes, frutos tiernos y maduros se consumen como verdura. En el caso de los frutos, los preparados se elaboran después de ser lavados y hervidos varias veces para producir dulce confitado y agua fresca; dicho proceso quita el sabor amargo que les confieren las cucurbitacinas presentes en la pulpa (Hilgert *et al.*, 1999; Valente *et al.*, 2004; Cetto *et al.*, 2005; Kvist *et al.*, 2006; Tene *et al.*, 2007; González, 2008).

En cuanto a la aplicación en la medicina, se ha informado que el chilacayote se emplea en el tratamiento de parásitos intestinales, quemaduras, erupciones de la piel, hemorroides y DM, a partir de macerado en agua del fruto maduro (Lopez *et al.*, 1986; Román *et al.*, 1991, 1992, 1995; Herranz *et al.*, 2001; Tene *et al.*, 2007). Simultáneamente, las semillas se consumen asadas, tostadas, enteras o molidas, y constituyen el principal ingrediente de salsas usadas para la elaboración de palanquetas, y otros guisos (pipián, mole verde, entre otros).

Además, contienen elevados niveles de aceite (39 %) y proteína (44 %), y su consumo es bastante común después de un proceso de tostado y aderezadas con sal en zonas urbanas de México y otros países de América Central. Algunas pociones son preparadas en agua y usadas para estimular la producción de leche materna (López *et al.*, 1986; Gonzalez, 2008).

6.1 Antecedentes de los usos hipoglucémicos de *C. ficifolia* “chilacayote”

En la tabla 8, se compara el efecto glucémico de extracto de chilacayote elaborado por diversos métodos de preparación, vías de administración y/o dosis en varios animales de experimentación. 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). Asimismo, 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, 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). En un análisis de inmunolocalización en el tejido pancreático de ratas diabéticas se establecieron cambios en el patrón de distribución de las células- β positivas a la insulina comparados con los de las ratas control. Asimismo, se observaron cambios en el patrón entre células diabéticas sin y aquellas tratadas con el extracto de chilacayote (Xia y Wang, 2007).

A partir de estudios *in vitro* con líneas celulares expuestas a diferentes epímeros del mioinositol, se ha sugerido que un posible mecanismo de la actividad hipoglucemiante se relaciona a que el D-qui-roinositol 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 y otras proteínas.

Tabla 8. El efecto hipoglucémico del extracto del chilacayote

Estado de desarrollo	Modo de preparación	Organismos	Vía administración y dosis (mg/kg)	Agente diabetizante (mg/kg peso)	Actividad hipoglucémica	Dosis efectiva (mg/kg)	Dosis Letal (mg/kg peso)	Referencia
Maduro	Jugo fresco	Conejos hiperglucémicos	Intragástrica	Aloxana	Activa			Roman-Ramos et al., 1991
Inmaduro	Extracto crudo	Humanos diabéticos tipo II	Oral		Activa			Acosta-Patiño, 2001
Maduro	Extracto crudo (jugo liofilizado)	Ratones diabéticos	Intraperitoneal	Aloxana (450 mg/kg, tres inyecciones)	Activa (> 240 min)	500		Hernández-Galicia et al., 2002
Maduro	Extracto crudo (jugo liofilizado)	Ratones sanos	Intraperitoneal		Activa (> 240 min)		625	Hernández-Galicia et al., 2002
Maduro	Extracto crudo (jugo liofilizado)	Ratones diabéticos	Oral	Aloxana (450 mg/kg, tres inyecciones)	Activa (> 240 min)	500		Hernández-Galicia et al., 2002
Maduro	Extracto crudo (jugo liofilizado)	Ratones sanos	Oral: 1000, 2000, 2923.5, 3419		Activa (> 240 min)		3689	
Maduro	Jugo fresco	Ratones diabéticos	Intraperitoneal	Aloxana (450 mg/kg, tres inyecciones)	Activa	500		Alarcon-Aguilar et al., 2002
Maduro	Jugo liofilizado	Ratones sanos	Intraperitoneal		Activa		625	Alarcon-Aguilar et al., 2002
Maduro	Jugo liofilizado	Ratas diabéticas	Oral, 1000 mg/kg	Aloxana				
Maduro	Deshidratado	Ratas diabéticas		Estreptozotocina (60 mg/kg pc)	Activa (15 y 30 d)	300 y 600 mg/kg/d		Xia y Wng, 2006
Inmaduro	Extracto acuoso	Ratones diabéticos	Intraperitoneal		Activa (> 240 min)	500 mg/kg		Banderas-Dorantes, TR 2006 (2)
Fruto maduro	Jugo liofilizado	Ratones diabéticos	Oral (1000, 2000, 2923.5, 3419.0, 4000 mg/kg)	Aloxana (450 mg/kg)	Activa (> 120 min)		3689 mg/kg	Hernández-Galicia, 2002
Fruto maduro	Jugo liofilizado	Ratones diabéticos	Intraperitoneal (500 mg/kg)	Aloxana (450 mg/kg)	Activa (> 120 min)	500 mg/kg		Vázquez-Carrillo (2002)
Fruto maduro	Jugo liofilizado	Ratas diabéticas	Intragástrica (500 mg/kg)	Aloxana (450 mg/kg)	Activa (> 120 min)	500 mg/kg		Vázquez-Carrillo (2002)
Fruto maduro	Extracto acuoso	Ratones diabéticos	Intraperitoneal (500 mg/kg)	Aloxana (150 mg/kg) iv	Activa (> 240 min)	500 mg/kg		Banderas-Dorantes, TR 2006
Fruto maduro	Tradicional	Ratones diabéticos	Intraperitoneal (250 mg/kg)	Estreptozotocina (200 mg/kg)	Activa (> 120 min)	250 mg/kg		Salinas-Arreortua, 2008
Fruto maduro	Tradicional	Ratones diabéticos	Oral (250 mg/kg)	Estreptozotocina	Activa (> 120 min)	250 mg/kg		Salinas-Arreortua, 2008
Fruto inmaduro		Ratones diabéticos	Intraperitoneal	Estreptozotocina (450 mg/kg)	Activa (> 49 días)			Angeles-Mejía, 2007

Continuando con el uso de *C. ficifolia*, (Xia y Wang, 2009) observaron en ratas diabetizadas con estreptozotocina, que el efecto hipoglucémico de administración oral de jugo de chilacayote dependía de la duración del tratamiento. Los niveles de glucosa disminuyeron a los 15 días de administración en un 31% y en un 49% a los 30 días.

El estudio del efecto del extracto de chilacayote sobre el número de células pancreáticas con capacidad de sintetizar insulina mostró que éste fue menor en ratas diabéticas sin tratamiento comparado con los animales control. El número de células positivas a insulina en relación al islote fue mayor en animales diabéticos tratados con chilacayote que en ratas diabéticas sin tratamiento. Estos resultados señalaron la presencia de algún metabolito secundario de *C. ficifolia* que, al parecer, ejerció su efecto protector, impidiendo la muerte de células β y/o permitiendo la recuperación del tejido pancreático, favoreciendo la sobrevivencia células capaces de sintetizar insulina.

Por otra parte, se ha determinado que el metabolismo que depende del oxígeno juega un papel importante en la funcionalidad de la célula β pancreática. En la diabetes, las EROs y el estrés oxidante parecen ser un factor importante en las complicaciones secundarias en esta enfermedad (Bayness *et al.*, 2000). Durante los períodos de hiperglucemia se generan ERO que causan la lipoperoxidación y daño en las membranas (Bayness *et al.*, 2000). En años recientes, se han realizado estudios en ratas diabéticas que han mostrado un aumento en la peroxidación de los lípidos plasmáticos. En ratas diabéticas por tratamiento con estreptozotocina se ha encontrado un aumento en los niveles de lipoperoxidación, cuando se evalúa éste como contenido de malonaldehído. En relación, con lo anterior, se observó que los valores disminuyeron en un 28% cuando las ratas diabéticas se alimentaron con extracto de chilacayote (Díaz-Flores *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que el mecanismo involucrado en este efecto benéfico está relacionado con la presencia algunos compuestos antioxidantes (vitaminas, carotenos y flavonoides), que impiden la lipoperoxidación.

A partir de estos hallazgos se ha propuesto que la administración como suplemento alimenticio del extracto del chilacayote a sujetos diabéticos ayudaría a mostrar un buen control glucémico y metabólico, impidiendo las complicaciones orgánicas a largo plazo.

7. Justificación

Cada vez existen más evidencias acerca de que los niveles altos de glucosa sanguínea favorecen la glicación de las proteínas y por consecuencia la glicación proteínica, así como la oxidación de proteínas en el organismo. Estas modificaciones de las proteínas existentes en el plasma, las proteínas estructurales y otras macromoléculas, se incrementan en la DM, como consecuencia del aumento de la glicación (secundaria a la hiperglucemia), la consiguiente formación de los AGEs y al incremento en el estrés oxidante. Estos efectos combinados, tanto de glicación como de oxidación de proteínas, contribuyen al desarrollo de complicaciones macrovasculares y microvasculares en el sujeto que padece DM. En los últimos años se han investigado diversas proteínas cuya función pudiera estar alterada por la glicación y la oxidación. A este respecto se ha propuesto a la albúmina, además de la hemoglobina A1C, como un marcador importante para evaluar el control de los pacientes diabéticos y, en un futuro, para identificación de daño más preciso, la determinación de cada compuesto de glicación avanzada, como el AGE proveniente de la albumina y el reservorio de proteínas oxidadas, serán de gran utilidad.

En estudios con pacientes que sufren diabetes tipo 2 y animales con diabetes experimental, se ha observado que la administración del aminoácido glicina produce efectos benéficos, tales como mejora la sensibilidad a la insulina y reducción en las concentraciones de la hemoglobina A1C independientemente de los niveles de glucosa en sangre.

Por lo tanto, resulta interesante determinar si la glicina disminuye la glicación de proteínas y la formación de los AGEs, así como el daño estructural de órganos en hígado y riñón, cuya función se encuentra alterada en la DM. 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 y su posible efecto antioxidante debido a la composición química del fruto. Sin embargo, aún no es claro cuál es el efecto de ambos tratamientos, solos o en combinación, sobre la glicación y la oxidación de proteínas, así como la protección que puedan tener estos tratamientos sobre diferentes órganos. Por lo tanto, resulta interesante determinar si la glicina y/o el extracto acuoso activo de *C. ficifolia* disminuyen la glucotoxicidad y las complicaciones a nivel micro-y macrovascular en la DM.

8 Hipótesis

Determinar la administración de glicina y *C. ficifolia*, en la disminución de la glicación y oxidación de proteínas, formación de AGEs y desarrollo de complicaciones diabéticas.

9. Objetivo general

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de la administración diaria de glicina y *C. ficifolia* sobre la formación de compuestos derivados de la glucotoxicidad en ratones con diabetes experimental inducida con estreptozotocina

9.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto producido por la administración de glicina y *C. ficifolia* sobre los niveles de colesterol total, triglicéridos y de insulina.
- Determinar los índices de glicación de hemoglobina y fructosamina en ratones diabéticos tratados con glicina y *C. ficifolia*.
- Evaluar el efecto el efecto sobre la oxidación de las proteínas plasmáticas debido a los tratamientos.
- Evaluar el efecto de los tratamientos sobre la formación AGE-BSA.
- Determinar el desarrollo de complicaciones renales debidas a la diabetes y determinar el efecto producido por la administración diaria de los tratamientos sobre estas complicaciones mediante cortes histológicos.
- Determinar el posible daño hepático producido por la DM y determinar el efecto producido por la administración diaria de los tratamientos sobre estas complicaciones mediante cortes histológicos

10. Material y Métodos

- 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
- Placas de ELISA para insulina (R&D)
- Gluco-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)
- anticuerpo monoclonal específico anti-AGE-BSA
- anticuerpo monoclonal específico AGE-BSA Millipore
- Kit Oxi-blot (Millipore, E.U.A.)
- Paraformaldeído al 10%
- Medio de inclusión tisular Paraplast®

10.1 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 3Kg) 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.

10.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 20 animales (ratones cepa CD-1 machos, con edad de 8 semanas y peso de 38 a 40 g). Todos los animales fueron alojados en el bioterio de la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana a temperatura y humedad controlada. Se les permitió el libre acceso a alimento con una dieta estándar. El cuidado de los animales de laboratorio se realizó de acuerdo con las reglas de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999, revisado en 2001), y los lineamientos del Comité de Ética de la Universidad Autónoma Metropolitana (CDCBS.127.08).

10.3 Inducción de diabetes experimental y administración de los tratamientos

Los ratones fueron separados en 4 grupos experimentales de 4 animales cada uno: Grupo 1: control sano (CS; 4 animales); Grupo 2: control diabético; Grupo 3: diabético tratado con aminoguanidina (0.1 g/kg); Grupo 4 diabético tratado con glicina (0.2 g/kg). Grupo 5 diabético tratado con extracto de *C. ficifolia* (0.2 g/kg). La diabetes experimental fue inducida con estreptozotocina (Sigma) por vía intraperitoneal a una dosis de 135.7 mg/kg disuelta en un buffer de citrato de sodio 0.05 M (pH 4.5). Estos tratamientos se administraron diariamente durante 25 días. La vía de administración,

tanto del extracto como de la glicina, fue oral, disuelta en el agua de consumo diario. Como control positivo se administró aminoguanidina por vía oral disuelta en agua, compuesto que inhibe la glicación y la formación de AGEs (Li Y *et al.*, 1996). Durante los tratamientos se cuantificó el consumo de líquidos y alimento; al final se midió el peso corporal.

10.4 Parámetros fisiológicos

Se cuantificó, al inicio (t=0) y al final de los tratamientos: 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 de las enzimas hepáticas transaminasas glutámico pirúvica (GPT) y glutámico oxalacético (GOT), y se cuantificaron los contenidos de colesterol y triglicéridos usando tiras reactivas que se leyeron en un aparato Reflotrón Plus (Roche, México).

10.5 Parámetros bioquímicos

La cuantificación de parámetros bioquímicos se realizó al final del tratamiento. A las 3 semanas y media de tratamiento los animales fueron sacrificados para la obtención de muestras de sangre y órganos. La determinación de hemoglobina A1C se realizó con un cuantificador de hemoglobina glicada A1C de Bayer; la glucosa en sangre se determinó por el método de referencia enzimático empleando hexoquinasa (Acutrend sensor, Roche. Francia). En cuanto a la fructosamina, ésta se midió por el método propuesto por Johnson (1983), basándose en la reducción en medio alcalino de las sales de azul de nitrotetrazolio (NBT) a 0.574 mM, disueltas en un buffer de carbonato 0.2 M a pH 10.3. El formazán es proporcional a la concentración de proteínas glicadas séricas. El colesterol total, GPT, GOT, TG y urea se determinaron por métodos colorimétricos, posterior a la reacción enzimática con peroxidasa, en el Reflotrón (Roche. Francia).

10.6 Cortes Histológicos

Los animales se sacrificaron a las 3 semanas y media de tratamiento. Las biopsias de riñón e hígado fueron procesadas para microscopía óptica (MO). Los fragmentos de riñón e hígado fueron fijados en paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos a pH de 7.4 (Prophet *et al.*, 1992). El procesamiento se realizó con equipo automático (Tissue-Tek® VIP, Miles Scientific) de acuerdo a protocolo de rutina. Se incluyeron en paraplast plus y se obtuvieron cortes de 7 μm que se tiñeron con Hematoxilina de Harris y Eosina amarillenta (Presnell *et al.*, 1997). Las secciones de tejido fueron analizadas bajo el microscopio de campo claro (Axioskope II, Carl Zeiss) y las imágenes analizadas (Axiovision 4.5, Carl Zeiss). Las micrografías fueron tomadas con un AxioCamMRc5 (Carl Zeiss).

10.7 Extracción de proteínas totales

Se llevó a cabo la extracción de proteínas totales de hígado, riñón y suero de la siguiente manera: se lavaron los tejidos con PBS. Se homogeneizaron 100 mg de tejido en 100 μL de detergente SDS al 12% (P/V). Se incubaron 15 min en hielo, y posteriormente se centrifugaron a 14,000 x g durante 5 min; se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas por medio de la técnica de Bradford.

10.8 Western-blot (AGE-BSA)

Se realizó electroforesis del antígeno soluble total de *AGE-modified protein* (Millipore) a una concentración de 20 μg por pozo, diluido en buffer de carga. Se usó un marcador de proteínas de pesos moleculares de BIO-RAD (USA). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis de poliacrilamida (SDS-PAGE), en sistema discontinuo y concentración de gel de 10 %. La electrotransferencia se realizó en membrana de PVDF. Se incubó con el anticuerpo *AGE-modified protein* con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón 1:2500 (Santa Cruz, E.U.A.).

10.9 (Oxi-blot) Oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas se determinó mediante la medición de los niveles de los grupos carbonilos que se utilizan en la detección de proteínas oxidadas (OxyBlot Kit. Millipore, E.U.A.). Las muestras se derivatizaron con 2,4-dinitrofenilhidrazona. Las proteínas de tejidos se separaron por medio de un gel de poliacrilamida por electroforesis y Western Blot. A partir de 5 µg de proteína, se determinaron los niveles de proteína oxidada, siguiendo las especificaciones del proveedor.

11. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media y desviación estándar de 4 eventos. Las diferencias entre los grupos fueron analizados por ANOVA con prueba complementaria de Duncan, con un nivel mínimo de significancia de $P < 0.05$.

12. Resultados

En las tablas posteriores se muestran los consumos de líquidos, alimento y la variación en el peso corporal, así como los parámetros bioquímicos de los animales al final de los tratamientos.

En la Tabla 9 se puede observar que no se presentaron diferencias significativas en cuanto al peso entre los animales diabéticos. Se observa reducción significativa en el consumo de líquidos con ambos tratamientos y un descenso significativo marcado del tratamiento con aminoguanidina. En cuanto al consumo de alimento, los animales que recibieron los tratamientos manifestaron una reducción significativa durante los 25 días de tratamiento.

Tabla 9. Alimentación diaria por animal. Consumo de líquidos, alimentos y peso al final del tratamiento (media±desviación estándar)

Grupos	S		D		D/AMG		D/GLY		D/EXT	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Consumo diario por animal										
Líquido (ml)	8.93	±0.65	31.31	±9.47	8.05	±1.60	15.81	±6.41	13.06	±3.23
Alimento (g)	7.02	+1.51	12.36	±2.58	8.14	±2.05	6.51	+0.94	7.43	±1.68
Peso (g)	37.27	+3.88	34.49	±2.10	34.49	±2.10	31.77	+2.64	36.22	±2.58

S, Control Sano; D, Control Diabético; D/AMG, Diabético aminoguanidina; D/GLY, Diabético glicina; D/EXT, Diabético extracto. *Diferentes tratamientos analizados con ANOVA usando como prueba comparativa Duncan.n=4

12.1. Perfil bioquímico

En la tabla 9 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 aminoguanidina, glicina y el extracto. Las transaminasas hepáticas (GOT, GPT) mostraron una disminución significativa por los tratamientos pero fue más acentuada en los que recibieron tratamiento con el extracto.

En cuanto al colesterol total, triglicéridos y urea no se presentaron diferencias entre el grupo de animales diabéticos con respecto a todos los animales que recibieron tratamientos.

Tabla 8. Efecto del tratamiento de glicina o extracto de *C. ficifolia* sobre diversos parámetros bioquímicos al final del experimento*(media±desviación estándar).

Grupos	S		D		D/AMG		D/GLY		D/EXT	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Glucosa (mg/dl)	112.6	±13.44	573.5	±53.0	309.9	±134.0	507.5	±20.14	349.5	±111
GPT (U/L)	28.42	±1.10	64.09	±2.62	45.20	±0.53	35.67	±2.26	*25.67	±2.26
GOT (U/L)	70.17	±1.74	147.89	±5.62	87.72	±1.37	140.67	±5.36	140.67	±5.36
Colesterol total (mg/dl)	65.33	±1.33	131.75	±2.47	123.50	±1.89	133.1	±2.19	133	±2.19
Triglicéridos (mg/dl)	86.66	±1.54	173.50	±1.06	128.75	±7.34	183.0	±3.94	183	±3.94
Urea (mg/dl)	57.10	±1.29	57.55	±3.77	50.42	±0.57	79.12	±1.56	69.12	±1.56

S, Control Sano; D, Control Diabético; D/AMG, Diabético aminoguanidina; D/GLY, Diabético glicina, D/EXT, Diabético extracto.

*Diferentes tratamientos analizados con ANOVA usando como prueba comparativa Duncan. n=4

12.2 Cuantificación de insulina

En la figura 4 se muestran las variaciones en la concentración de insulina en ratones diabéticos después del tratamiento de glicina y extracto de *C. ficifolia*. Como se observa, los ratones diabéticos que recibieron la glicina y el extracto presentaron una disminución significativa, y sólo en los ratones control sanos mantuvieron valores normales, en tanto que los expuestos a la aminoguanidina presentaron un ligero incremento en la producción de insulina.

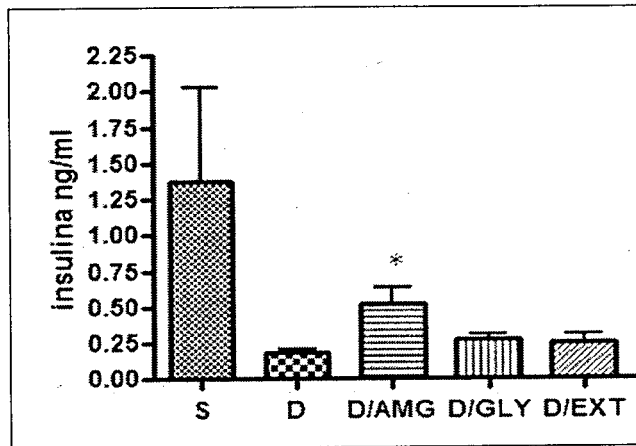


Figura 4. Contenido insulina sérica en ratones diabéticos durante 25 días de tratamiento con extracto de glicina y *C. ficifolia*. Los datos representan la media \pm DS (n=4), *diferencia significativa con respecto al control diabético ($p < 0.05$).

12.3 Estimación de la glicación proteínica

Los animales diabéticos tratados con glicina y extracto de *C. ficifolia* mostraron un descenso en los niveles de hemoglobina glicada (1.3% y 1.9%, respectivamente) representando un descenso muy importante que podría resultar en la disminución del riesgo de desarrollar complicaciones diabéticas (Figuras 5 y 6).

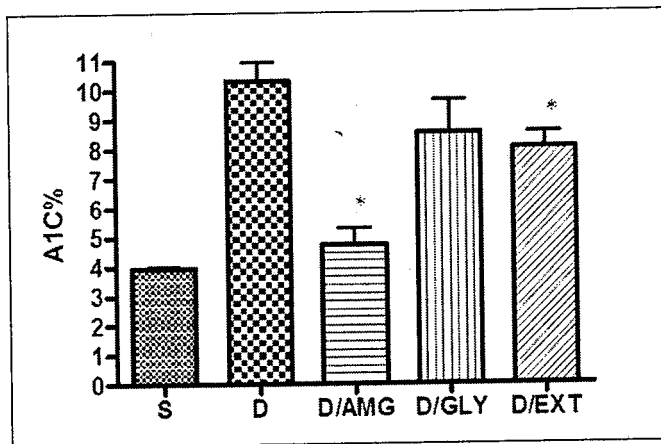


Figura 5. En ratones diabéticos, el tratamiento con glicina o extracto de *C. ficifolia* durante 25 días produjo una disminución en los niveles de hemoglobina glicada (A1C %). Los datos representan la media \pm DS (n=4), *Diferencia significativa con respecto al control diabético ($p < 0.05$).

12.4. La correlación entre glucemia y hemoglobina glicada

Se decidió evaluar una posible correlación entre la glucemia y los niveles porcentuales de hemoglobina A1C reportados en American Diabetes Association (2008) (Figura 6), observándose que ocurre una relación proporcional entre el porcentaje de hemoglobina glicada y la concentración de glucosa plasmática promedio.

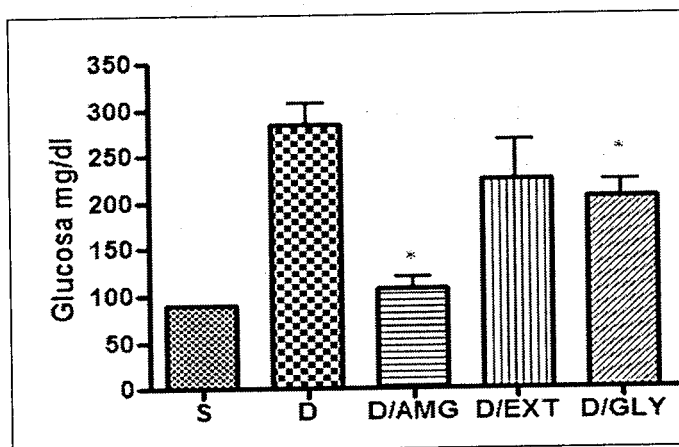


Figura 6. Los niveles de glucosa en ratones diabéticos bajo tratamiento con glicina o extracto de *C. ficifolia* durante 25 días, que fueron calculados a partir de las estimaciones de la hemoglobina glicada.

12.5 Los efectos del tratamiento de glicina o extracto de *C. ficifolia* en los valores de fructosamina

Fructosamina es el nombre genérico para denominar a las cetoaminas de proteínas plasmáticas que se originan por unión no enzimática de la glucosa con los grupos amino de las proteínas (mayoritariamente la albúmina). La medición de fructosamina se utiliza para conocer la concentración media de glucosa en sangre durante un período de tiempo de 2 a 3 semanas en personas con diabetes mellitus. Debido a que la concentración de fructosamina refleja cambios glucémicos a corto plazo y diferentes de la hemoglobina glicada, se ha recomendado la determinación de ambas. Los niveles de proteínas glicadas son un valioso complemento a las determinaciones de glucosa en sangre en la valoración del control glucémico. Sin embargo, estas proteínas no son fiables para el diagnóstico de la diabetes mellitus.

En cuanto a la glicación el cual representa el conjunto de proteínas glicadas en plasma existe una baja, lo cual podría representar aun mas a contribuir esta disminucion en la glicación de las proteínas de una vida media corta y así aminorar los efectos que tiene esta reacción en el desarrollo de complicaciones en la DM.

En la figura 7 se muestran los valores de fructosamina en suero de ratones controles, diabéticos con tratamiento de extracto de glicina y *C. ficifolia*, donde se observa que ambos tratamientos produjeron una disminución significativa en el nivel de fructosamina, siendo más intenso en el tratamiento con glicina comparado con los ratones diabéticos sin tratamiento.

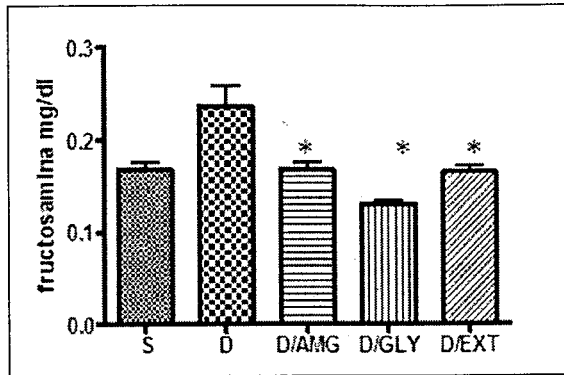


Figura 7. El tratamiento de ratones diabéticos con glicina y *C. ficifolia* durante 25 días de tratamiento provocaron una disminución en el contenido sérico total de fructosamina. Los datos representan la media \pm D.E. (n=4), *diferencia significativa con respecto al control diabético ($p < 0.05$).

12.6 El efecto del tratamiento de glicina y *Cucurbita ficifolia* sobre la oxidación proteínica en hígado o riñón de ratones diabéticos

En la Figura 8 se puso de manifiesto la presencia significativa de proteínas oxidadas de diversos pesos moleculares en los tejidos, mayoritariamente en riñón de ratones diabéticos sin tratamiento. También se observó una importante reducción en los valores de oxidación proteínica total en respuesta a los dos tratamientos. En futuros estudios se debe establecer la identificación precisa de las moléculas afectadas por estos procesos.

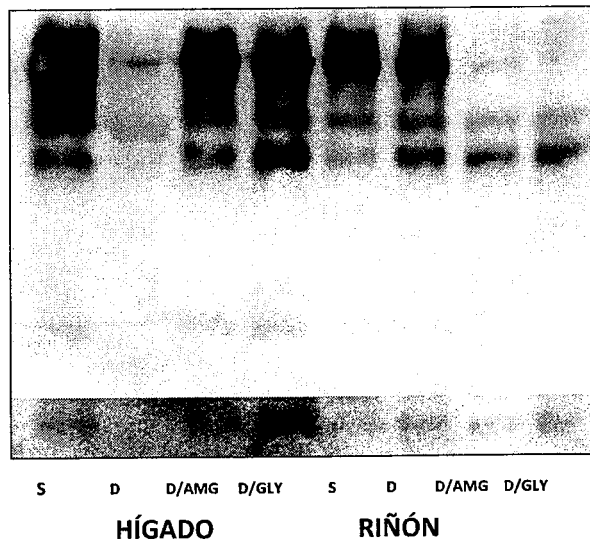
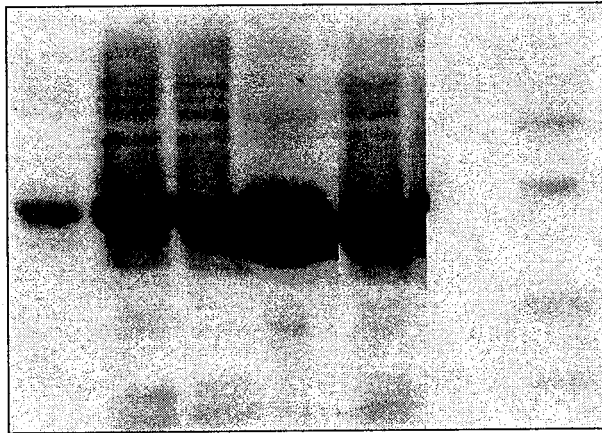


Figura 8. Detección de proteínas oxidadas en tejidos de ratón diabético bajo tratamiento de glicina mediante Oxi-blot, previamente derivatizados con DNPH. (S-sano, D-diabético, D/AMG- diabético con aminoguanidina, D/GLY- diabético con glicina).



Albúmina D D/Gly D/Ext S Cont(-) Cont(+)

Figura 9. Detección de proteínas oxidadas en suero mediante Oxi-blot, previamente derivatizados con DNPH. (S-sano, D-diabético, D/AMG- diabético con aminoguanidina, D/GLY- diabético con glicina, D/EXT- diabético extracto).

12.7 La inmunodetección de AGE-modified protein en suero de ratones diabéticos después del tratamiento con glicina.

De las muestras obtenidas de los ratones que recibieron tratamiento se les extrajo el suero. Como se observa en la Figura 10, mediante el análisis por Western blot y utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra AGE-proteína modificada, fue reconocido específicamente por el anticuerpo que tiene el tamaño correspondiente al AGE-BSA (~69 kDs), presentándose incrementado en diabetes. Estos resultados indican el correcto monitoreo de estos compuestos en relación con la producción de AGE en estas patologías. Los resultados demuestran que se presentan en menor proporción en suero de animales diabéticos que recibieron tratamiento con glicina.

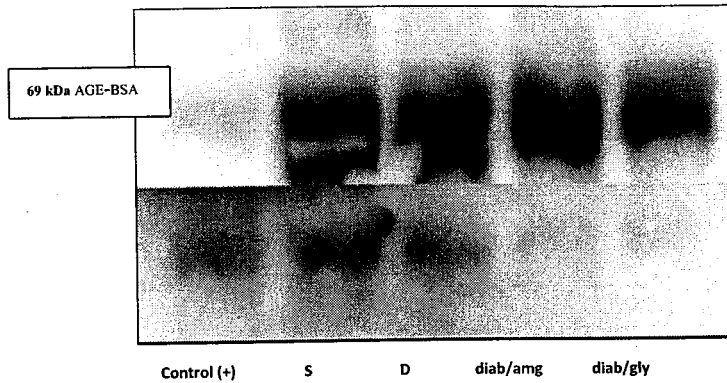
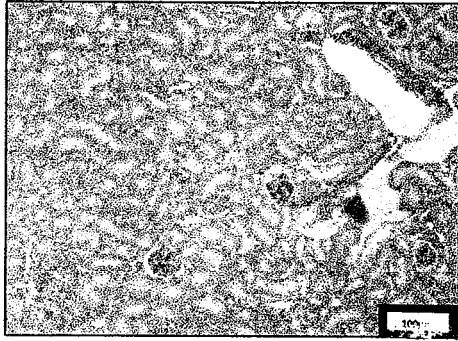


Figura 10. Detección del anti-AGE proteína modificada mediante Western blot. Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico (anti-AGE, dilución 1:1000) se cargaron 20 µg de proteína en cada carril. AGE-BSA modificada como control.

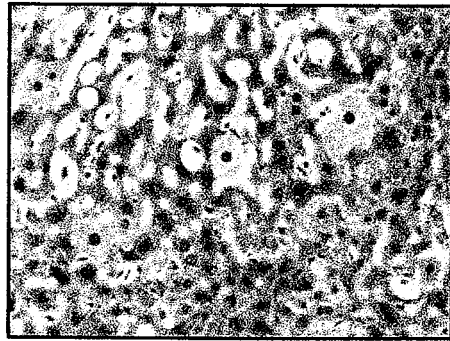
12.8 Análisis histológico de hígado y riñón de ratones diabéticos después del tratamiento con glicina y *C. ficifolia*

En cuanto a los cortes de hígado (x400), en donde se aprecia: A) hígado sano, mostrando la arquitectura normal, B) hígado de ejemplares diabéticos en los que se observa desorganización de las trabéculas de Remak, hepatocitos con degeneración hidrópica de diferente grado y algunos en proceso necrótico, así como congestión vascular e infiltrado leucocitario incipiente, mostrando un severo daño estructural por la DM inducida. Por lo que respecta a los ejemplares tratados con aminoguanidina, glicina, y extracto (D, E, y F), respectivamente, se observa menor desorganización en las trabéculas y si bien se presenta degeneración hidrópica se observa un mayor número de hepatocitos binucleados que, en conjunto, sugieren una posible regeneración del parénquima hepático (Figura 11).

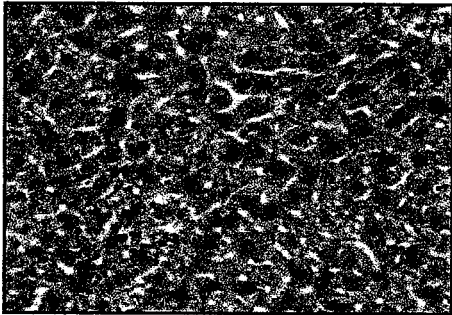
A)



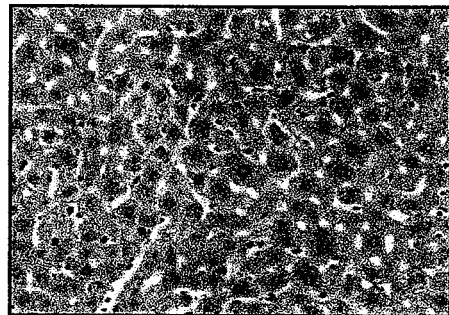
B)



C)



D)



E)

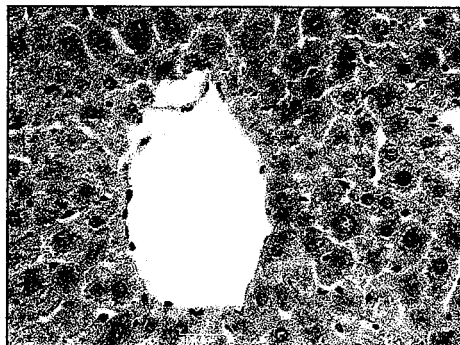


Figura. 11 Análisis histológico de hígado de ratones. A) Sano, B) Diabético, C) Diabético después de tratamiento con aminoguanidina, D) Diabético después de tratamiento con glicina y E) Diabético después de tratamiento con extracto de *C. ficifolia*. Las micrografías representan una ampliación X400

En relación con los cortes histopatológicos de riñón vistos a un aumento a X400, se observaron las siguientes características: A) riñón sano con disposición celular normal, B) diabético sin tratamiento, se aprecia glomeruloesclerosis nodular por la presencia de los Nódulos de Kimmelstiel-Wilson y con amplios espacios en el tejido mesangial). En los ejemplares tratados con aminoguanidina, glicina, y extracto de *C. ficifolia* D, E, F, respectivamente, la nodularización y los espacios disminuyen conservando la estructura glomerular debido a los tratamientos. (Figura 12)

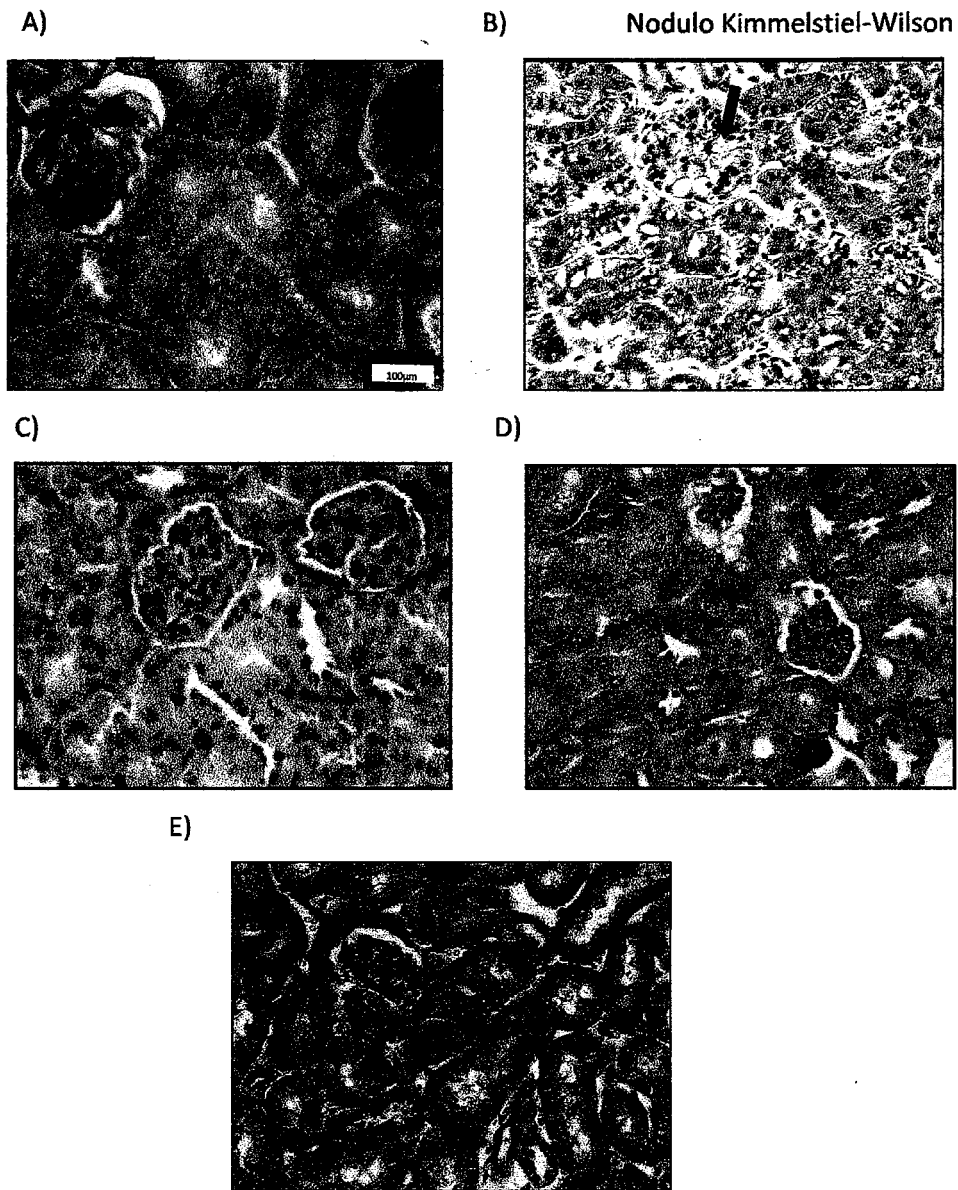


Figura 12. Análisis histológico de riñón de ratones. A) Sano, B) Diabético, C) Diabético después de tratamiento con aminoguanidina, D) Diabético después de tratamiento con glicina y E) Diabético después de tratamiento con extracto de *C. ficifolia*. Las micrografías representan una ampliación X400

13. Discusión

La estreptozotocina provoca deficiencia en la producción de insulina, alteración en el metabolismo de carbohidratos, glicación de proteínas y formación de compuestos de glicación avanzada, generando complicaciones características de DM. El presente estudio muestra evidencias de que la administración de la glicina y el extracto de *C. ficifolia* en ratones con DM experimental, a los cuales se les administró tratamiento durante 25 días, producen reducción en la glucemia. Estudios previos, informaron que la glicina y el extracto de *C. ficifolia* 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 y favorecer la captura de glucosa. Posiblemente relacionado un mecanismo similar al de insulina, el cual favorece la señalización e inducción en la translocación de los transportadores de glucosa hacia la membrana plasmática de células 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).

En cuanto a los parámetro fisiológicos, el consumo de líquidos de los ratones tratados con glicina y con extracto de *C. ficifolia* aumentó a lo largo del tratamiento debido quizá a un agravamiento progresivo de la diabetes, generando complicaciones y síntomas característicos como las microcomplicaciones y la poliuria.

En relación con las variaciones del peso corporal, los tratamientos produjeron cambios importantes. El grupo tratado con glicina mostró una marcada disminución del peso corporal; es probable que la glicina mimetice la acción de la insulina, teniendo un mecanismo similar al 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 podría provocar un efecto anabólico sobre el metabolismo de proteínas, aumentando la captación de aminoácidos, acelerando el metabolismo y, como consecuencia, una disminución en el peso corporal (Olivares *et al.*, 2008).

C. ficifolia causó un incremento significativo del peso corporal en comparación con los ratones sin tratamiento. Este aumento en peso podría deberse a que pertenece a la misma familia de *cucurbitáceas*. Sin embargo, presenta propiedades nutritivas propias. Su principal componente es el agua, seguido de los hidratos de carbono y pequeñas cantidades de grasa y proteínas. Todo esto, unido a su aporte moderado de fibra, convierte al extracto de *C. ficifolia* en un alimento de bajo aporte calórico, idóneo para incluir en la dieta de personas con exceso de peso o problemas en cuanto al metabolismo y así corregir el parámetro de pérdida de peso que sufren los pacientes diabéticos. En relación con su contenido de compuestos, destaca la presencia discreta de folatos, seguido de la vitamina C. También, contiene vitaminas del grupo B, como B1, B2 y B6, pero en menores cantidades.

Con relación a los parámetros bioquímicos estimados en los ratones diabéticos que recibieron ambos tratamientos no se observaron cambios significativos con respecto al control. En cuanto a la concentración del colesterol y triglicéridos se obtuvieron valores similares a los diabéticos sin tratamiento. Asimismo, se presentó una disminución significativa de GPT de los animales que recibieron tratamiento con el extracto de *C. ficifolia* con respecto al control sin tratamiento, propiciando una reducción en las complicaciones debido probablemente a una disminución de la permeabilidad de la membrana plasmática, asociado a una reacción hepatocelular no específico (Pratt *et al.*, 2000). La GOT no presentó disminución por los tratamientos. Cabe señalar, que en cualquier enfermedad hepática que interviene un daño necroinflamatorio ocurre aumento en los niveles de la actividad de las transaminasas en el suero.

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 del todo 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.

En consecuencia con la administración de estos tratamientos y el estado bioquímico de los animales en experimentación se procedió a cuantificar la insulina. Esta es una hormona liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas. La incapacidad de las células blanco de responder a la insulina, debido presumiblemente a defectos en su señalización, estado conocido como resistencia a la insulina, siendo una de las principales características de manifestación patológicas asociadas con la DM. Se encontró que todos los animales a los que se les indujo la DM experimental sufrieron un daño en la producción de la hormona y los tratamientos no lograron restablecer la producción de la insulina, mostrando una clara reducción en relación con el control.

Cabe señalar que el agente con el que se induce la DM experimental es un agente químico llamado estreptozotocina, el cual genera la destrucción específica de las células beta pancreáticas. Este compuesto es un derivado nitroso aislado de *Streptocomyces achromogenes*, de capacidad alquilante que interfiere en el transporte de glucosa (Bono, 1976), la función de la enzima glucocinasa (Wang *et al.*, 1998) e induce daños en el ADN produciendo rompimientos en las cadenas, que finalmente conlleve a la muerte celular (Bolzan *et al.*, 2002). Algunas evidencias indican que la

toxicidad de la estreptozotocina está mediada por el reconocimiento específico de receptores sobre la célula beta pancreática (Rakieten *et al.*, 1963). Provocando un decremento en los niveles del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), ya que puede disminuir tanto su síntesis, como incrementar su hidrólisis. El NAD protege a los animales contra la citotoxicidad tanto de estreptozotocina como de aloxana. Por otra parte se sabe que estos efectos pueden ser prevenidos por algunos carbohidratos como: la 3-O-metilglucosa, siendo muy efectiva (Agius *et al.*, 1985).

En diferentes estudios la administración de una sola dosis alta de la STZ produce hiperglicemia debido a una rápida destrucción de las células beta pancreáticas. Por otra parte, los modelos de administración de una única dosis baja de STZ en días consecutivos (*multiple low-dose streptozotocin*. MLDS) permite la obtención de un daño progresivo en el que se ha descrito la presencia de mecanismos de inflamación propios de la DM, que se traduce en la observación de insulinitis en los islotes de Langerhans (Amirshahrokhin *et al.*, 2008). Sin embargo, este agente mediante el modelo MDLS es capaz de producir el fenotipo diabético en ausencia de la acción del sistema inmune (células T y B).

En cuanto a la relación de proteínas glicadas, el extracto de *C. ficifolia* en los ratones diabéticos redujo el índice en 1.3 porcentual el nivel de la A1C. 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-quiró-inositol, 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 el efecto fue más contundente, de alrededor del 1.9%, esto acorde con otros trabajos como los de (Vásquez *et al.*, 2003 y 2006). 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).

Se realizó la correlación de la A1C con sus respectivos valores de concentración de glucosa, observándose una reducción de alrededor de 60 mg/dl con ambos tratamientos.

Se ha propuesto que los niveles de A1C y la fructosamina reflejan diferentes períodos de la situación metabólica en el sujeto diabético. Por lo que, se puede considerar que ambas se complementarían, para que los pacientes presenten un buen control metabólico a corto y largo plazo en el promedio de sus glucemias.

Por otro lado, la prueba de la fructosamina 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 fructosamina para conocer el control a corto plazo por parte de los tratamientos a los que fueron sometidos. Los resultados mostraron que los ratones diabéticos tratados con glicina y el extracto de *C. ficifolia* redujeron este parámetro. Por lo tanto, es probable que estos tratamientos reduzcan el riesgo de presentar daño renal, ya que se ha utilizado como marcador bioquímico en esta patología, que genera microalbuminuria. Aunque ésta no fue analizada, se define como presencia en la orina de 20 a 200 mg por minuto o 30 a 300 mg por 24 h de la proteína más abundante en sangre, la albúmina (Iglesia de la Cruz *et al.*, 2003).

El análisis comparativo entre el efecto sobre la fructosamina producido por la glicina y el producido por el extracto acuoso de *C. ficifolia* mostró un mayor efecto debido a 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, favoreciendo la formación de glucosilglicina (Gugliucci, 2000). Esto es, siendo la glicina un intermediario entre la glucosa y las proteínas presentes en suero, podría provocar la unión covalente del carbohidrato al aminoácido, como se muestra en la Figura 13.

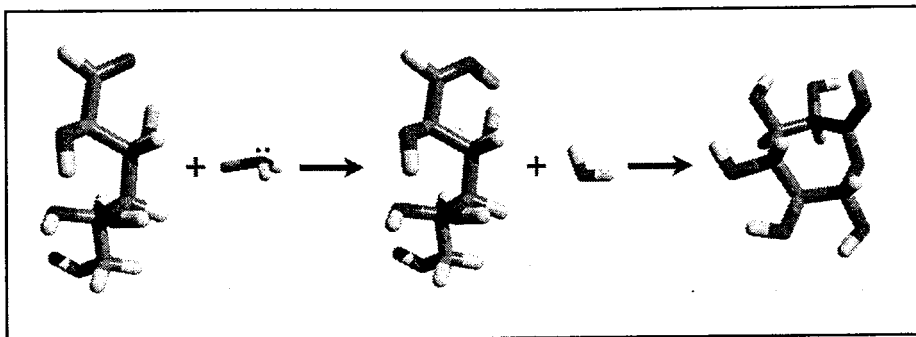


Figura 13. La reacción de inhibición de la glicación por la glicina se realizó con en el programa Avogadro versión 1.0 (Cada estructura se minimizó su energía empleando el algoritmo: Conjugate Gradient usando el potencial MMFF94s con el mismo programa Avogadro). Se muestra los carbonos en gris, blanco hidrógenos, azul nitrógeno, rojo oxígeno y en verde el grupo R.

En cuanto a los ratones tratados con el extracto acuoso de *C. ficifolia*, se observó una disminución significativa en cuanto al reservorio de glicación de las proteínas presentes en suero. Esta reducción de las proteínas glicadas es de suma importancia, ya que en el caso de la A1C el descenso en una unidad porcentual, se ha propuesto que tiene un impacto positivo en la reducción de las complicaciones relacionadas con la DM (hasta en un 35%), y hasta en un 25% con las muertes relacionadas con la DM (Gugliucci, 2000).

Uno de los puntos importantes de esta patología es la modificación oxidativa de proteínas que está asociada a ciertos procesos fisiológicos y patológicos. Aminoácidos, péptidos y proteínas son susceptibles de ser sustrato de radicales libres o especies reactivas oxidantes. Como se explicó anteriormente, las ERO pueden oxidar directamente las proteínas o bien originar derivados oxidados de tipo lipídico o glucídico que reaccionen con los grupos funcionales de las proteínas. El contenido de carbonilos en las proteínas puede ser usado como medida del daño producido en las mismas por procesos de oxidación. En los resultados obtenidos en los Oxiblot en muestras de suero presentaron una ligera disminución en la oxidación proteínica debido a los tratamientos. La glicina disminuyó la oxidación proteínica del conjunto proteínas en suero de mayor peso molecular.

Se analizaron también muestras de hígado y riñón de los animales tratados. Sólo en las muestras de riñón se observó menor oxidación, probablemente porque en el hígado se llevan a cabo los procesos de remoción de estos compuestos de glicación avanzada y su mayor concentración se encuentra en ese órgano. En tanto que, en riñón, se ha observado que disminuye la nefrotoxicidad inducida por el fármaco inmunosupresor ciclosporina A (Zhong *et al.*, 1998) a través de la reducción en la formación de radicales libres inducida por ciclosporina A (Zhong *et al.*, 1998).

Por lo tanto, la glicina puede ser útil en enfermedades con procesos inflamatorios, ya que disminuye la formación de citocinas proinflamatorias (Li *et al.*, 2001; Tsune *et al.*, 2003). También, podría actuar sobre la actividad de las enzimas antioxidantes. Derivando en el bloqueo de la activación de las células Kupffer, que son productoras de radicales libres, tanto de oxígeno como de nitrógeno, y de citocinas (Ikejima *et al.*, 1996; Stachlewitz *et al.*, 1999).

En relación con el extracto, no se observaron resultados contundentes, por lo que, se prosiguió el estudio de los compuestos carbonílicos empleando sólo glicina. Durante la exposición crónica a la hiperglucemia y debido a que la albúmina es una de las mayores proteínas presentes en la sangre, se generan en circulación, los compuestos conocidos como AGE-BSA glicolaldehído modificado. Estos AGEs son moléculas versátiles, ya que poseen múltiples acciones en el pared vascular, producen cambios en la liberación de citocinas, inducción de la expresión de moléculas de adhesión celular, deterioro de la vasodilatación endotelial y desencadenan la inflamación crónica (Wang *et al.*, 2009). En este estudio se cuantificó la formación de AGEs en suero de los animales que recibieron el tratamiento con glicina. Los animales presentaron menor producción de estos compuestos debido al tratamiento con glicina. Estos hallazgos son consistentes con los estudios realizados por (Lezcano *et al.* 2003), en los cuales se encontró que la administración de glicina disminuye la glicación de la hemoglobina. Varios reportes también han mostrado que la arginina y otros aminoácidos, junto con la aminoguanidina, inhiben *in vitro* la glicación enzimática y la producción de AGE.

El efecto protector de la glicina, podría relacionarse con un mecanismo de bloqueo en una etapa temprana la reacción de Maillard de forma no reactiva al sustituir productos de Amadori con su grupo guanidinio, en un mecanismo parecido al de la arginina, para que el aminoácido reaccione con los compuestos dicarbonilos (productos de descomposición de Amadori) que resulta en menos producción de AGEs y el estrés carbonílico (Pai *et al.*, 2010).

En trabajos anteriores se ha demostrado que la suplementación oral de arginina no disminuye los compuestos de glicación en plasma con respecto a los ratones diabéticos (Reyes *et al.*, 1994). Pero los autores postularon que existía un efecto protector de la función del órgano visto en las ratas diabéticas (tendón de la cola) con el tratamiento de arginina, presentando una menor formación de los productos de glicación (Reyes *et al.*, 1993). En nuestro estudio, los órganos examinados, hígado y riñón, también presentaron disminución de los AGEs debido a los tratamientos, lo cual es congruente con el estudio histopatológico que se les realizó a los animales.

En general, se acepta que el desarrollo de las lesiones de la microangiopatía diabética son proporcionales a la severidad y duración de la diabetes, así como a la concentración de los AGEs. Debido a la hiperglucemia de los animales de experimentación, se produjeron lesiones en riñón e hígado, similares a la nefropatía diabética y esteatosis, respectivamente. La contribución de los AGEs en la glomerulosclerosis es evidente en ratones diabéticos. Los efectos protectores, tanto del extracto de *C. ficifolia* como de la glicina fueron marcados, siendo potencialmente inhibidores de estas complicaciones debidas en parte a la disminución de la glicación de proteínas.

En los riñones de los ratones diabéticos se observaron cambios morfológicos que afectaron a los glomérulos y a los túbulos contorneados, edema, tumefacción, atrofia y/o necrosis. Cabe mencionar, que la mayoría de los glomérulos presentaron formaciones nodulares eosinófilas a nivel mesangial, junto con un marcado engrosamiento de la membrana basal glomerular y tubular. También, existe un

importante engrosamiento concéntrico e hialino de la pared arteriolar, todo esto en animales que no recibieron tratamiento.

Por su parte, en las alteraciones observadas en los riñones de los animales diabéticos tratados con glicina y *C. ficifolia*, se observó menor glomeruloesclerosis y degeneración hidrópica. Por lo que respecta al hígado, el parénquima hepático de los individuos diabéticos mostró severas alteraciones con posible esteatosis; en los animales tratados con aminoguanidina y glicina la condición de esteatosis no se observa. Por lo tanto el tratamiento con glicina aminora estas complicaciones propias de la DM.

Por otra parte, existen otros mecanismos por los que la glicina podría estar contribuyendo a la citoprotección y, debido al estímulo citotóxico que representa la glucosa, se sugiere que este aminoácido podría ejercer su efecto benéfico activando los canales de Cl^- localizados en la membrana plasmática de las células, disminuyendo así la entrada de Ca^{2+} citosólico. Debido a que este mecanismo se ha observado en células de Kupffer del hígado y en otras células de la serie blanca, se puede deducir una disminución en la activación de las células del sistema inmunológico, en particular de macrófagos, neutrofilos y linfocitos, reduciendo así la producción de citocinas inflamatorias y eicosanoides, que en DM se encuentran elevadas (Wheeler *et al.*, 1999).

Otros mecanismos propuestos están directamente relacionados con la actividad que la glicina ejerce en la preservación de la estructura celular, debido a la inhibición de enzimas de degradación, que afectan a proteínas del citoesqueleto (Nichols *et al.*, 1994; Edelstein *et al.* 1997; Tijssen *et al.*, 1997), o mediante la inhibición del desarrollo de poro inespecíficos en la membrana plasmática de las células como consecuencias del daño celular, que induciría ruptura de la membrana plasmática y provocar muerte celular (Frank *et al.*, 2000; Nishimura *et al.*, 2001; Estacion *et al.*, 2003). Además, la glicina podría actuar mediante la inhibición de la cascada apoptótica (Zhang *et al.*, 2000; Jacob *et al.*, 2003; Omasa *et al.*, 2003), con efectos antiangiogénicos y con efecto antioxidante (Matilla *et al.*, 2002; Amin *et al.*, 2003; Shunhei *et al.*, 2007).

Los posibles mecanismos propuestos en este trabajo 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; 3) que actúe a través del receptor asociado a RAGEs (*Receptor for advanced glycation elements*), modulando la producción de 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.; 5) preservación en la integridad celular debido a la concentración de glicina existente.

En resumen, el presente trabajo muestra que la administración de glicina a ratones diabéticos reduce los niveles de proteínas glicadas, la producción de los AGEs y la oxidación de proteínas. Estos resultados son consistentes con la histopatología, que muestra menor daño de la arquitectura celular en hígado y riñón, debido a la administración de glicina. Estos resultados sugieren que la glicina, en consecuencia, podría aminorar los daños debidos a las complicaciones de la DM.

En relación con el extracto de *C. ficifolia*, cabe señalar que la preparación del extracto usado en los tratamientos se realizó con jugo fresco y la fracción metanólica del fruto maduro. Las vías de administración usadas con mayor frecuencia son la vía oral e intraperitoneal. En la mayoría de los estudios se ha observado que la administración causó efecto hipoglucémico en corto tiempo, relacionado con la presencia en el extracto de compuestos fenólicos, antioxidantes, inositoles (d-qui-ro-inositol), entre otros, los cuales poseen propiedades fisiológicas para la sobrevivencia de las células β -pancreáticas, promoviendo un aumento en el contenido de insulina plasmática funcional. Sin embargo, es importante señalar que no se tiene conocimiento de todos los metabolitos secundario del extracto que pudieran influir en la actividad hipoglucemiante.

Se puede concluir que todos los sistemas biológicos del ser humano pueden, en situaciones especiales, generar ERO provenientes de la auto-oxidación de la glucosa,

los cuales son dañinos para el organismo como las EROs, los AGEs y las especies reactivas del nitrógeno (como el radical peroxinitrito). La producción de todos estos componentes de estrés está limitada en el organismo sano por las defensas antioxidantes, pero cuando se rompe el equilibrio redox, ya sea por un aumento de la generación de este estrés carbonílico o por una disminución de los sistemas defensivos antioxidantes, se producen lesiones en los diferentes tejidos y órganos. La elevación de los niveles de las EROs se ha relacionado con la aparición de las complicaciones vasculares crónicas en los sujetos que padecen DM, independientemente de cuál sea el tipo de ésta. Así, se ha comprobado que en los diabéticos existe un incremento del estrés oxidativo, en comparación con los individuos supuestamente sanos, e incluso que éste es mayor en los enfermos con mal control metabólico y complicados, que en quienes no presentan complicaciones crónicas y tiene control óptimo de la enfermedad, por lo que se considera que el alcance de esta meta es el primer paso en el tratamiento del estrés oxidativo que se relaciona con la diabetes mellitus, además de que pueden usarse otras terapias antioxidantes a base de glicina o el extracto de el fruto de *C. ficifolia* y, en un futuro, su posible combinación.

14. Conclusiones

Se observa reducción significativa en el consumo de líquidos y de alimento con ambos tratamientos.

En cuanto a la glucosa se presentó una disminución debido a los tratamientos con glicina, extracto de *C. ficifolia* y aminoguanidina.

Las transaminasas hepáticas (GOT, GPT) mostraron una disminución significativa por los tratamientos pero fue más acentuada en los que recibieron tratamiento con el extracto de *C. ficifolia*.

Los ratones diabéticos que recibieron la glicina y el extracto no presentaron una mejora en la producción de insulina, en tanto que los expuestos a la aminoguanidina presentaron un ligero incremento en la producción de esta hormona.

Por lo que respecta a la fructosamina se observa que ambos tratamientos produjeron una disminución en este parámetro, siendo más efectivo con glicina. En cuanto a la A1C los dos tratamientos disminuyeron significativamente esta proteína glicada.

La oxidación de proteínas en suero y riñón fueron disminuidas tanto por la glicina y el extracto respectivamente.

La glicina disminuyó la formación de AGE-BSA glicolaldehído.

Se presentó efecto protector en hígado como riñón tanto de la glicina y el extracto de *C. ficifolia* como de la aminoguanidina debido a que son potencialmente inhibidores la glicación y formación de AGEs

15. Bibliografía

Agius C., Gidari A.S. Effect of streptozotocin on the glutathione s-transferases of mouse liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.* 1985.34:811-819.

Ahmed N. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 2005.67: 3-21.

Ahmed N, Thornalley P.J. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications?. *Diabetes, Obesity and Metabolism.* 2007.9:233-245.

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 medica. 2005.

Amadori M. The product of the condensation of glucose and pphenetidine. *Atti. Reale Accad. Nazl. Lincei.* 1929: 9-68.

American Diabetes Association. Standars of Medical Care in Diabetes-2008. *Diabetes Care.* 2008. 31;S12-S54.

Amin K., Li J., Chao W., R Dewhirst M. W., Haroon Z. A. Dietary glycine inhibits angiogenesis during wound healing and tumor growth. *Cancer Biol Ther.* 2003. 2:173-178.

Amirshahrokhi K., Dehpour A. R., Hadjati J. Methadone ameliorates multiple-low-dose streptocn-induced type 1 diabetes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008.232(1):119-24.

Armbruster D.A. Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. *Clin. Chem.* 1987.12:2153-2163.

Barnaby O.S., Ronald L. Cerny W.C., David S. Hage Quantitative analysis of glycation patterns in human serum albumin using ¹⁶O/ ¹⁸O-labeling and MALDI-TOF MS. *Clinica Chimica Acta.* 2011. 412:1606-15.

Ballesteros M., Fredriksson A. Henriksson J., Nyström T. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. *EMBO J.* 2001.20:5280-89.

Baynes J.W., Thorpe S.R. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2000.28:1708-16.

Baker I.R., Metcalf P.A., Johnson R.N., Ncwman D., Rietz P. Use of protein basal standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin Chem.* 1985.31: 155-04.

Barbosa-Fihlo J.M., Vasconcelos T.H.C., Alencar A.A., Bautista L.M., Oliveira R.A.D., Guedes D.N., Falcao H., Moura M.D., Diniz F. M., Modesto-Filho J. Plants and their active constituents from South, Centro, and North America with hypoglycemic activity. *Braz. J. Pharmacognosy*. 2005.15:392-413.

Beach K.W. A theoretical model to predict the behavior of glycosylated hemoglobin levels. *J Theor Biol*.1979. 81:547-61.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001. 414:813-820.

Brinkmann E, Degenhardt T.P, Thorpe S.R, Baynes J.W. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. *J. Biol. Chem*.1998. 273:187-14.

Bono V, H. Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas. *Cancer Treat Rep*. 1976.1:121-34

Bolzan A. D., Bianchi M. S. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res*.2002.512:121-34.

Bucala R., Model P., Cerami A. Modification of DNA by reducing sugars: A possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci*.1984. 1: 81-105.

Bucala R., Makita Z., Koschinsky T., Cerami A., Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1993, 90: 643-4.

Boden G., Master R.W., Gordon S.S., Shuman C.R., Owen O,E. Monitoring metabolic control in diabetic outpatients with glycosylated hemoglobin. *Ann Intern Med*.1980.92: 357-60.

Brownlee M., Vlassara H., Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*.1984.101:527-37.

Brown E.M., Grunberger G. Usefulness of albumin based and total protein based fructosamine correction formulas in diabetes practice. *Diabetes Care*.1991.14:35-34.

Bierhaus A. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*.1997. 9:1481-90.

Bunn H.F., Higgins P.J. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*.1981.213:222-4.

Bunn H.F., Gabbay K.H., Gallop P.M. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science*.1978. 7:21-27.

- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*.2001.414:813-20.
- Brownlee M. Negative Consequences of Glycation. *Metabolism*.2000.49(1):9-13.
- Bierhaus A., Hofman M.A., Ziegler R., Nawroth P.P. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus I. The AGE concept. *Cardiovascular research*.1998.37:586-600.
- Castegna A. Protein identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I: creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Rad.Biol.Med*.2002.33:562-571.
- Cetto A., Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes *J. of Ethnopharmacol.* 2005. 99:325-348.
- Cefalu W.T., Parker T.B. Validity of fructosamine as index of short-term glycemic control in diabetic outpatients. *Diabetes Care*.1988. 11:662-667.
- Charonis A.S., Reger L.A, Dege J.E, Kouzi-Koliakos K, Furch L.T, Wohlhueter R.M, Tsilibary E.C. Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glycosylation. *Diabetes*.1998. 39:807-814.
- 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.
- Czech P.M., Corvera S. Signaling Mechanisms That Regulate Glucose Transport. *J. Biol. Chem.* 1999. 274:1865-78.
- Dakin H.D. The oxidation of aminoacids with the production of substances of biological importance. *J.Biol.Chem.*.1906. 1:171-176.
- Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. 1997. 324:1-18.
- Dennis J.S. Glycosylated hemoglobins indogs. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1989.11: 717-726.
- Díaz-Flores M., Angeles-M., Baiza-G., Medina-N., Hernández-S.D., Ortega-C.C., Roman-R.R., Cruz M., Alarcon-Aguilar F.J. Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes.2012. 144: 1 101-108.
- Dronge A. Diabetes Control Benefits Surgery. *Arch. Surgery*. 2006. 141:375-380.

Dukan S. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc.Natl.Acad.Sci.*2000. **97**:5746-49.

Dukan S., Nyström T. Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes Dev.*1998.12:3431-41.

Dukan S., Nyström T. Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J. Biol.Chem.* 1999. 274:26027-26032.

Estacion M., Weinberg J.S., Sinkins W.G., Schilling W.P. Blockade of maitotoxin-induced endothelial cell lysis by glycine and L-alanine. *Am.J Physiol Cell Physiol.* 2003. 284:1006-1020.

Edelstein C.L., Ling H., Gengaro P.E., Nemenoff R.A., Bahr B.A., Schrier R.W. Effect of glycine on prelethal and postlethal increases in calpain activity in rat renal proximal tubules. *Kidney Int.*1997. 52:1271-1278.

Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad.Biol.Med.* 1991. 11:81-128.

Friguet B., Bulteau A.L., Chondrogianni N., Conconi M., Petropoulos I. Protein degradation by the proteasome and its implications in aging. 2000. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 908:143-154.

Frank A., Rauen U., De Groot H. Protection by glycine against hypoxic injury of rat hepatocytes: inhibition of ion fluxes through nonspecific leaks. *J Hepatol.* 2000. 32:58-66.

Gannon M.C., Nutall F.Q. The metabolic response to ingest glycine. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002. 76:1302-7.

Gabbay K., Hasty K., Breslow J., Ellison R., Bunn H., Gallop P. Glycosylated hemoglobin and long term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.*1977. 44: 859-64.

Giardino I., Edelstein D., Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycoylation in diabetes. *The Journal of Clinical. Investigation.*1994. 110-117.

González A.R. De flores, brotes y palmitos olvidados. *Agronomía Costarricense.*2008. 32: 183-192.

Goldin A., Beckman J.A., Schimdt A.M., Creager M.A. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006. 114:597-605.

Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *JAOA*. 2000.10:621-634.

Haitoglou C.S., Tsilibary E.C., Brownlee M., Charonis A.S. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J. Biol Chem*. 1992.267:12404-7.

Herranz A. *El español hablado en Honduras*. Tegucigalpa. 2001. 299 pp.

Hilgert N.I. Las plantas comestibles en un sector de las Yungas meridionales (Argentina). *Anales Jard. Bot. Madrid*. 1999.57: 117-138.

Hodge J.E. Dehydrated foods: chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem*.1953. 1-928.

Howey J.E.A., Bennett W.M., Browning C.K, Jung R.T., Fraser C.G. Clinical utility of assays of glycosylated haemoglobin and serumfructosamine compared: use of data on biological variation. *Diabetic Med*.1989. 6: 793-6.

Hossain P., Kavar B., El Nahas M. Obesity and Diabetes in the Developing World -A Growing Challenge. *N. Eng. J. Med*. 2007. 356: 213-215.

Hudson B.I., Bucciarelli L.G., Wendt T., Sakaguchi T., Lalla E., Qu W., Lu Y., Lee L., Stem D., Naka Y., Ramasamy R., Yan S D., Yan S.F., D'Agati V.S., Chmidt A. M. Blockade of receptor for advanced glycation end products: a new target for therapeutic intervention in diabetic complication and inflammatory disorders. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.2003.419:80-88.

Huebschmann A.G., Regensteiner J.G., Vlassara H., Reusch J.E. Diabetes and advanced glycosilation end products. *Diabetes Care*. 2006. 29:1420-1432.

Humphries K.M., Sweda, L. I. Selective inactivation of a ketoglutarate deshydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry*. 1998.37:15835-15841.

International Diabetes Federation. *Diabetes: atlas 2010*. <http://www.eatlas.idf.org>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México). *Boletín de estadísticas vitales 2010 / Instituto Nacional de Estadística y Geografía*. México: INEGI,c2012.

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 glycinegated chloride channel. *Am. J. Physiol*. 1997. 272:1581-1586.

Jacob T., Ascher E., Hingorani A., Kallakuri S. Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model. *Surgery* .2003.134:457-466.

Ji L.L., Dillon, D. Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am.J.Physiol.*1990.258:918-923.

Johnson R.N., Metcalf P.A., Baker J.R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosyl protein: an index of diabetic control. *Clin Chim Acta.*1983 127: 87-95.

Johansson E., Olsson O., Nyström T. Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J.Biol.Chem.* 2004. 279:22204-22208.

Kato H., Hayase F., Shin D.B., Oimimi M., Baha S. 3-deoxyglucosone, an intermediate product of the Maillard reaction. In: Baynes, J.W., Monnier, V.M., eds. *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*. New York: Alan Liss Inc.; 1989:69-84.

Koya D., King G.L. Protein Kinase C Activation and the Development of Diabetic Complication. *Diabetes* 1998.47: 859-866.

Koenig R.J., Cerami A. Synthesis of haemoglobin A1c in normal and diabetic mic: potential model of basement membrane thickening. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1975. 72:36-87.

Kikuchi S., Shinpo K., Takeuchi M., Yamagishi S., Makita Z., Sasaki N., Tashiro K. Glycation –a sweet tempter for neuronal death. *Brain Research Reviews.* 2003. 41:306-323

Kvist L.P., Aguirre Z., Orlando S.O. Bosques montanos bajos occidentales en Ecuador y sus plantas útiles. *Botánica Económica de los Andes Centrales.* 2006.205-223.

Koyama H., Yamamoto H., Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: Potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med.* 2007.13:625-635.

Lee A.Y., Chung S.K., Chung S.S. Demotration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductasa gene in the lens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* .1995.92: 2780-84.

Ledl F., Schleicher E. New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990. 29:565.

López B.J. Aproximación histórica al uso de plantas medicinales en veterinaria, a través de la tradición oral. *Memorias de la I Jornada sobre Herbolaria Medicinal en Veterinaria Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.*1986 México, D. F. pp 8 – 11.

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.

Li Y.M., Mitsuhashi T., Wojciechowicz D., Shimizu N., Li J., Stitt A., He C., Banerjee D., Vlassara H. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: Relationship of p60 to OST-48 and p90 to membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996. 93:11047-11052.

Li J., Schmidt A.M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 1997.272:16498-506.

Makita Z., Bucala R., Rayfield E.J., Friedman E.A., Kaufman A.M., Korbet S.M.. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet* 1994;343:1519-22.

Makita Z., Radoff S., Rayfield E.J., Yang Z., Skolnik E., Delaney V. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1991;325:883-4.

Mancilla A.L.G., Gómez-P.F.J. Diagnóstico y clasificación de la diabetes mellitus. Conceptos actuales. *Rev. Endocrinol. Nutr.* 2002. 10:63-68.

Meléndez-Hevia E., de Paz-Lugo P. Branch-point stoichiometry can generate weak links in metabolism: the case of glycine biosynthesis. *Journal of Biosciences.* 2008.33(5):771-780.

Matilla B., Mauriz J.L., Culebras J.M., Gonzalez-Gallego J., Gonzalez P. Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient. *Nutr.Hosp.* 2002. 17: 2-9.

Maillard L.C. Reaction generale des acides amines sur les sucres: ses consequences biologiques. *Presse medicale.*1912.71:546.

Monnier V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. 419-1.

Mc Cance D.R., Coulter D., Smye M., Kennedy L. Effect of fluctuations in albumin on serum fructosamine assay. *Diabetic Med.*1987.4: 43-46.

Miyata T., Inagi R., Iida Y., Sato M., Yamada N., Oda O. Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and

macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest* 1994;93:521-8.

Nathan D. Some answers, more controversy, from UKPDS. *United Kingdom Prospective Diabetes Study. Lancet* 1998; 352: 832-3.

Nishimura Y., Lemasters J.J. Glycine blocks opening of a death channel in hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death.Differ.* 2001.8, 850-858.

Nichols J.C., Bronk S.F., Mellgren R.L., Gores G.J. Inhibition of nonlysosomal calcium-dependent proteolysis by glycine during anoxic injury of rat hepatocytes. *Gastroenterology.*1994.106:168-176.

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.

Nyström T. Translational fidelity, protein oxidation and senescence: lessons from bacteria. *Aging Res.Rev.*20021:693-703.

Olaiz F.G., Rivera D.J., Shamah L.T., Rojas R., Villalpando H.S., Hernández A.M., Sepúlveda A.J. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. México: Instituto Nacional de Salud Pública.* 131 pp.

Olivares R., Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB.* 2008. 27: 9-18.

Omasa M., Fukuse T., Toyokuni S., Mizutani Y., Yoshida H., Ikeyama K., Hasegawa S., Wada H. Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model. *Transplantation.* 2003. 75:591-598.

Peppas M., Vlassara H. Advances glycation end products and diabetic complication: A General overview. *Hormones.* 2005. 4:28-37.

Pecoraro R.E., Chen M.S., Porte D. Glycosylated hemoglobin and fasting plasma glucose in the assessment of outpatient glycemic control in NIDDM. *Diabetes Care.* 1982. 4:592-9.

Pratt S.D., Marshall M.K. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N. Eng. Jour. Med.* 2000. 342:1266-1271.

Presnell J.K., Schreiber M.P. *Animal Techniques.* Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1997, p572.

Prophet E.B., Mills B. Arrington J.B., Sobin L. H. *AFIP Laboratory Methods in Histotechnology.* American Registry of Pathology. 1992. USA. p 254

Rahbar S., Figarola J.L. Inhibitors and breakers of advanced glycation endproducts (AGEs): a review. *Curr. Med. Chem. Immun. Endocrinol. Metab. Agents.*2002. 2:135.

Rahbar S. An abnormal haemoglobin in red cells of diabetics. *Clin. Chim. Acta* .1968. 22: 296.

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. Exp. Res.* 1993. 57:623-628.

Rakieten N., Rakieten M.L., Nadkarni M.V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherap. Rep.*1963. 29:91-998

Requena J.R., Levine R.L., Stadtman E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids.* 2005. 25:221-226.

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.

Saxena A. Vikram N.K. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: a review. *J. Alt. Comple. Med.* 2004.10: 369-378.

Sano H., Higashi T., Matsumoto K., Melkko J., Jinnouchi Y., Ikeda K., Ebina Y., Makino H., Smedsrod B., horiuchi S. Insulin enhances macrophage scavenger receptor-mediated endocytic uptake of advanced glycation end products. *The Journal of Biological Chemistry.*1998.273:8630-37.

Schirch V., Szebenyi D. M. Serine hydroxymethyltransferase revisited. *Current Opinion in Chemical Biology.* 2005. 9:482-487.

Schiekofer S., Andrassy M., Chen J., Rudofsky G., Schneider J., Wendt T. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes.* 2003.52:621-33.

Sitte N., Merker K., Von Zglinicki T., Grune T., Davies K. J. A. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I-effects of proliferatives senescence. *FASEB J.* 2000. 14:2495-2502.

Schmidt A. M., Yan S. D., Wautier J.L., Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circulation Research*. 1999. 84: 489-497.

Shamoon H., Mazze R., Pasmantier R., Lucido D., Murphy J. Assessment of Longterm glycemia in type 1 diabetes using multiple blood glucose values stored in a memory containing reflectometer. *Am J Med*. 1986. 80:1086-92.

Shringarpure R., Davies K.J. Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Rad.Biol.Med*. 2002.32:1084-1089.

Shinohara M., Thornalley P.J., Giardino I., Beisswenger P., Thorpe S.R., Onorato J., Brownlee M. Overexpression of glyoxalase-I in bovine endothelial cells inhibits intracellular advanced glycation endproducts formation and prevents hyperglycemia-induced increases in macromolecular endocytosis. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998. 101:1142-47.

Shunhei Y., Kenichi I., Ivan R., Nobuhiro S. Glycine as a potent anti-angiogenic nutrient for tumor growth. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007. 22 1:S62-4.

Sies H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat. Res*. 1993.299:183-191.

Sies H., Menck C.F. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat.Res*. 1992. 275:367-375.

Singh A., Barden A., Mori T., Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetology*. 2001. 44:129-146.

Smith M.A., Taneda S., Richey P.L., Miyata S., Yan S.D., Stern D. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994.91:5710-4.

Sobel D.O., Abbassi V. Use of fructosamine test in diabetic children. *Diabetes Care*.1991. 14: 578-83.

Secretaría de Salud. Programa sectorial de salud 2007-2012. http://portal.salud.gob.mx/contenidos/programa_nacional/programa_07.html

Stadtman E.R. Protein oxidation and aging. *Science*.1992. 257:1220-1224.

Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 2000. 899:191-208.

Steffes M.W., Mauer S. M. Toward a basic understanding of diabetic complications. *N Engl J Med*.1991. 325: 883-4.

- Stachlewitz R. F., Seabra V., Bradford B. Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. *Hepatology*. 1999. 29:737-745.
- Tanaka S., Avigad G., Brodsky B., Eikenberry E.F. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *Journal of Molecular Biology*. 1998. 203: 495-505.
- Tijssen M. J., Peters S. M., Bindels R. J., Van Os C. H., Wetzels J. F. Glycine protection against hypoxic injury in isolated rat proximal tubules: the role of proteases. *Nephrol.Dial.Transplant*. 1997.12:2549-2556.
- The Diabetes Control and Complications Trial Data Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*. 1995. 44: 968-83
- The United Kingdom Prospective Diabetes Study Data Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998. 352: 837-53.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group 1998. Intensive Blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998. 352:837-853.
- Ulrich P., Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent. Prog. Horm. Res*. 2001. 56-1.
- Vlassara H., Palace M. R. Diabetes and advanced glycation end products. *Journal of Internal Medicine*. 2002. 251:87-101
- Vlassara H., Striker L.J., Teichberg S., Fuh H., Li Y.M., Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proct Natl Acad Sci U S A*. 1994.91:11704- 8.
- Valente L.M.M. Cucurbitacinas e suas principais características estruturais. *Quím. Nova*. 2004. 27: 944-948.
- 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., Montañó F., Zenteno E. Oral Glycine administration attenuates diabetic complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 2006. 79:225- 232.
- Watkins P. UKPDS: a message of hope and a need for change. *United Kingdom Prospective Diabetes Study*. *Diabet Med* 1998.6:895-6.

Wang Z., Gleichman H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes*, 1998. 47(1).p.50-6.

Winocour P.H., Bhatnagar D., Kalsi P., Hillier V.E., Anderson D.C. Relative clinical usefulness of glycosylated serum albumin and fructosamine during short term changes in glycemic control in IDDM. *Diabetes Care*.1989.12: 665-72.

Wautier J.L., Schmidt A.M. Protein Glycation: A Firm Link to Endothelial Cell Dysfunction. *Circulation Research*. 2004. 95: 233-238.

Werman R., Davidoff R. A., Aprison M.H. Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature*. 1967. 214:681-683.

Wheeler M.D., Ikejima K., Enomoto N., Stacklewitz R.F., Seabra V., Zhong Z., Yin M., Schemmer P., Rose ML., Rusyn I., Bradford B., Thurman R.G. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol Life Sci*.1999. 56:843-856.

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.

Xia T., Wang Q. Effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract on lipid profile and oral glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of food biochemistry*. October 10, 2007 pag 410-424.

Xia T., Wang Q. Effect of *Cucurbita ficifolia* fruit extract on lipid profile and oral glucose tolerance in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Food. Biochem*. 2009. 33(3):416-424.

Yue D., McLennan S., Church D.B., Turtle J.R. The Measurement of Glycosylated Hemoglobin in Man and Animals by Aminophenylboronic Acid Affinity Chromatography *Diabetes*. 1982. 31:701-705.

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.

Yan S.D., Smith M.A., Anderson G.M., Zhang J., Brett J., Zou Y.S. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptor/binding proteins. *J. Biol Chem* 1994;269:9889-97.

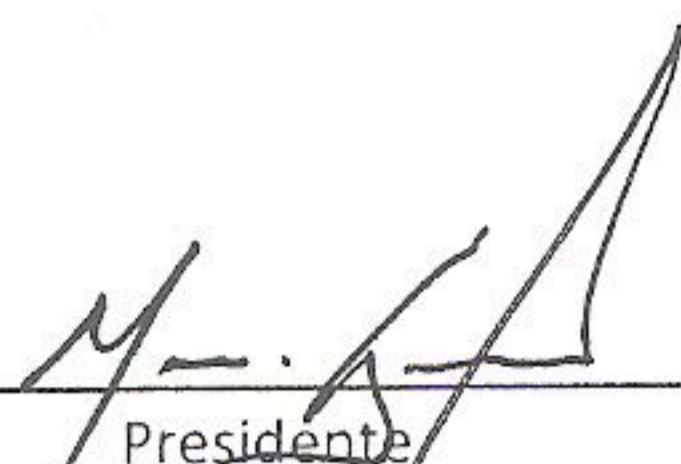
Yin M., Ikejima K., Arteel G.E. Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998. 286:1014-1019.

Zhong Z., Wheeler M.D., Li X., Froh M., Schemmer P., Yin M., Bunzendaul H., Bradford B., Lemasters J. L-Glycine a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2003. 6:229-240.

Zhang Y., Ikejima K., Honda H., Kitamura T., Takei Y., Sato N. Glycine prevents apoptosis of rat sinusoidal endothelial cells caused by deprivation of vascular endothelial growth factor. *Hepatology.* 2000. **32**, 542-546.

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 y productos de glicación avanzada".

Jurado de Examen



Presidente

Dr. Mario García Lorenzana

Profesor Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción.
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa



Secretario

Dra. Margarita Díaz Flores

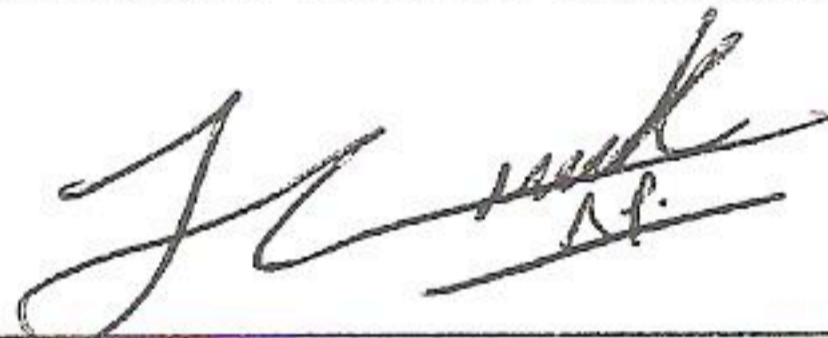
Unidad de Investigación Médica en Bioquímica
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS



Vocal

Dra. Genoveva Durán Reyes

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



Vocal

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Profesor Titular D

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