

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE DIETAS DE EXTRACTO DE LARVAS DE GUSANO DE SEDA (*Bombyx mori*), HOJAS DE MORERA (*Morus indica*), Y PLACEBO EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA SANGUINEA EN MODELOS MURINOS MEDIANTE ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES PPAR- α , PPAR- γ y LPL

PREVIO A LA OBTENCIÓN DE GRADO ACÁDEMICO O TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ANDREA PAOLA CORDERO ARROYO

Sangolquí, 15 de abril de 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Andrea Paola Cordero Arroyo

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

DELEGADO DE LA UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

Abg. Laura López

Sangolquí, 15 de abril de 2011

CERTIFICACIÓN

Dr. Marcelo Grijalva, Ph.D.

Mat. Pedro Romero

Certifican:

Que el trabajo titulado: “Evaluación de los efectos de dietas de extracto de larvas de Gusano de seda (*Bombyx mori*), Hojas de Morera (*Morus indica*), y Placebo en la regulación de la homeostasis de la glucosa sanguínea en modelos murinos mediante análisis de expresión de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL”, realizado por Andrea Paola Cordero Arroyo, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a Andrea Paola Cordero Arroyo que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 15 de abril del 2011

Dr. Marcelo Grijalva, Ph.D.
Director del Proyecto de Grado

Mat. Pedro Romero
Codirector del Proyecto de Grado

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

ANDREA PAOLA CORDERO ARROYO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Evaluación de los efectos de dietas de extracto de larvas de Gusano de seda (*Bombyx mori*), Hojas de Morera (*Morus indica*), y Placebo en la regulación de la homeostasis de la glucosa sanguínea en modelos murinos mediante análisis de expresión de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 15 de abril del 2011

Andrea Cordero

AUTORIZACIÓN

Yo, Andrea Paola Cordero Arroyo

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo “Evaluación de los efectos de dietas de extracto de larvas de Gusano de seda (*Bombyx mori*), Hojas de Morera (*Morus indica*), y Placebo en la regulación de la homeostasis de la glucosa sanguínea en modelos murinos mediante análisis de expresión de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 15 de abril del 2011

Andrea Cordero

DEDICATORIA

Dedico la presente investigación a toda mi familia, de manera muy especial a mi mamá quien con su comprensión, ayuda y apoyo me alento a largo de mi vida estudiantil para ser hoy una profesional, a mi papi quien con sus consejos me alento siempre para seguir adelante y tambien a mis hermanos quienes siempre estuvieron a mi lado apoyandome.

A todas las personas que me animaron y estuvieron junto a mi brindandome su ayuda durante este tiempo por no dejarme vencer ante las dificultades y hacerme ver que todo es posible.

Andrea Cordero

AGRADECIMIENTO

A todos los que hicieron posible realizar esta investigación. De manera muy especial al Dr. Manuel Calvopiña docente del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Biomedicina de Universidad Central por abrirme las puertas del laboratorio, por sus consejos y ayuda en la parte práctica de esta tesis.

Al Dr. Ángel Guevara con quien inicié esta investigación y de manera especial al Dr. Marcelo Grijalva por el apoyo para la culminación del proyecto.

Al PhD. Jaime Costales, investigador del Centro de Enfermedades Infecciosas de Universidad Católica por guiarme a lo largo de esta investigación, en especial en la parte molecular, y por brindarme sus conocimientos.

Al Ing. Pedro Romero, codirector de este proyecto por guiarme en los momentos difíciles de esta tesis y apoyarme para poder terminarla.

Dr. Santiago Escalente, Director Regional (E) del Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical “Leopoldo Izquieta Pérez” y al Dr. Enrique Granizo por prestarme los equipos necesarios para esta investigación.

Agradezco a todas las personas que estuvieron conmigo durante mi vida estudiantil brindándome su apoyo. Y a mis amigos con quienes he compartido muchos momentos agradables y difíciles a la vez, pero que me apoyaron para culminar mi carrera

Andrea Cordero

INDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DECLARACION DE RESPONSABILIDAD.....	iv
AUTORIZACIÓN	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
INDICE DE CONTENIDOS	viii
LISTADO DE TABLAS	x
LISTADO DE CUADROS	xi
LISTADO DE FIGURAS	xii
LISTADO DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvi
NOMENCLATURA UTILIZADA	xvii
CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específicos.....	3
1.4 Marco Teórico.....	3
1.4.1 Diabetes Mellitus	3
1.4.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	4
1.4.3 Diabetes Mellitus Tipo 2.....	5
1.4.3.1 Definición.....	5
1.4.3.2 Etiopatogenia.....	5
1.4.3.3 Diagnóstico	6
1.4.3.4 Control Clínico.....	7

1.4.3.5	Tratamiento	17
1.4.4	Receptores Activados por Poliferadores de Peroxisomas (PPAR)	21
1.4.4.1	PPAR α	23
1.4.4.2	PPAR γ	25
1.4.5	Lipoproteína Lipasa (LPL).....	28
1.4.6	Pregunta de la Investigación	30
CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS		31
2.1	Participantes.....	31
2.2	Zona de Estudio	31
2.3	Periodo de tiempo de investigación	31
2.4	Diseño	32
2.5	Procedimientos.....	32
2.5.1	Preparación de los extractos.....	32
2.5.2	Ensayo en ratones de laboratorio	35
2.5.3	Técnicas Moleculares.....	39
2.5.3.1	Extracción de ARN	39
CAPITULO 3: RESULTADOS.....		45
3.1	Nivel de glucosa en ayunas	45
3.2	Nivel de triglicéridos.....	47
3.3	Nivel de hemoglobina glicosilada.....	49
3.4	Nivel de insulina	51
3.5	Expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL	53
CAPITULO 4: DISCUSION		57
CAPITULO 5: CONCLUSIONES		60
CAPITULO 6: RECOMENDACIONES		61
CAPITULO 7: BIBLIOGRAFIA		62
ANEXOS		71

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Cantidades y reactivos usados en la PCR de los PPARs	41
Tabla 2.2 Condiciones de la PCR para la β -actina	41
Tabla 2.3 Cantidades y reactivos usados en la primera PCR del PPAR- γ	42
Tabla 2.4 Cantidades y reactivos usados en la segunda PCR del PPAR- γ	42
Tabla 2.5 Condiciones utilizadas para la PCR anidada del PPAR- γ	43
Tabla 3.1 Tabla ANOVA para el nivel de glucosa en ayunas, en mg/dl	46
Tabla 3.2 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con p 0,05	47
Tabla 3.3 Tabla ANOVA para el nivel de triglicéridos (mg/dl) en la sangre	48
Tabla 3.4 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con p 0,05	49
Tabla 3.5 Tabla ANOVA para el nivel de hemoglobina glicosilada en la sangre	51
Tabla 3.6 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con p 0,05	51
Tabla 3.7 Tabla ANOVA para el nivel de insulina en la sangre, en μ U/ml	53
Tabla 3.8 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con p 0,05	53
Tabla 3.9 Tabla ANOVA para la expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL	56
Tabla 3.10 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para PPAR- α	56
Tabla 3.11 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para PPAR- γ	56
Tabla 3.12 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para LPL.....	56

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Características principales de los fármacos orales. (ALAD, 2006)	19
Cuadro 1.2 Efectos adversos de los antidiabéticos orales. (DeFronzo, 1999)	19

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Formas linear y anular de la glucosa (Morrison & Boyd, 1998).....	8
Figura 1.2 Estructuras del grupo hemo y cadenas de la hemoglobina (King, 2010)	9
Figura 1.3 Clasificación de las hemoglobinas (King, 2010).....	10
Figura 1.4 Conversión de la proinsulina a insulina por la sustracción enzimática del péptido C (King, 2010)	11
Figura 1.5 Mecanismo de secreción de la insulina regulada por la glucosa (Shepherd & Kahn, 1999)	12
Figura 1.6 Homeostasis de la glucosa mediante la liberación de insulina (King, 2010).....	13
Figura 1.7 Estructura de un triglicérido (Boyer, 2000).....	14
Figura 1.8 Metabolismo de los ácidos grasos. (Ros & Laguna, 2006)	16
Figura 1.9 Algoritmo de tratamiento para la DM 2. (Turner et al, 1999).....	18
Figura 1.10 Representación linealizada de los PPAR y sus dominios funcionales (Parra y Mejía, 2001).....	22
Figura 1.11 Estructura de los PPAR α agonistas. (Shearer and Hoekstra, 2002).....	25
Figura 1.12 Estructuras de las PPAR γ agonistas. (a) tiazolidinedionas PPAR γ agonistas (b) no-tiazolidinedionas PPAR γ agonistas (c) Ligando endógeno de PPAR γ . (Murphy and Holder, 2000).....	28
Figura 2.1 Extracción de alcaloides mediante el método soxhlet y su concentración en el rotavapor	33
Figura 2.2 Molienda y homogenización de las larvas del gusano se seda.....	34
Figura 2.3 Filtrado y concentración en el rotavapor del extracto de las larvas del gusano de seda	34
Figura 2.4 Extractos de hojas de morera y gusanos de seda congelados con nitrógeno líquido y liofilizador Christ Alpha 1-2.	35
Figura 2.5 Identificación de los ratones: marcas con ácido pícrico y enumerado	36
Figura 2.6 Tratamientos aplicados y su administración a los ratones	36
Figura 2.7 Toma de sangre de la cola y el suero obtenido.....	37
Figura 3.1 Nivel de glucosa en ayunas (mg/dl) respecto a los tratamientos administrados .	45
Figura 3.2 Nivel de glucosa en ayunas (mg/dl) respecto al género de los ratones	46

Figura 3.3 Nivel de triglicéridos (mg/dl) respecto a los tratamientos administrados	47
Figura 3.4 Nivel de triglicéridos (mg/dl) respecto al género de los ratones	48
Figura 3.5 Nivel de hemoglobina glicosilada respecto a los tratamientos administrados	50
Figura 3.6 Nivel de hemoglobina glicosilada respecto al género de los ratones	50
Figura 3.7 Nivel de insulina (μ U/m) respecto a los tratamientos administrados.....	52
Figura 3.8 Nivel de insulina (μ U/m) respecto al género del ratón.....	52
Figura 3.9 Expresión del ARNm de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL para los tratamientos Control y Maltosa.	53
Figura 3.10 Expresión del ARNm de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL para los tratamientos Maltosa + ELGS y Maltosa + EHM	54
Figura 3.11 Medias de la expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL según los tratamientos administrados	55
Figura 3.12 Medias de la expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL según el género.....	55

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A: Tratamiento no farmacológico de la DM 2.....	71
ANEXO B: Genes regulados por el PPAR – γ agonista.....	72
ANEXO C: Estadísticos descriptivos para el nivel de glucosa en ayunas en mg/dl.....	73
ANEXO D: Estadísticos descriptivos para el nivel de triglicéridos en mg/dl	75
ANEXO E: Estadísticos descriptivos para el porcentaje de hemoglobina glicosilada	77
ANEXO F: Estadísticos descriptivos para el nivel de insulina, en μ U/ml	79

RESUMEN

En esta investigación se probó la actividad anti-hiperglicemiante de las hojas de morera y larvas del gusano de seda, en base a la expresión de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL en ratones. Mediante la administración oral de una dieta que contenía carbohidratos (Maltosa) y los diferentes extractos (ELGS y EHM) durante 12 semanas. Los resultados de los exámenes de sangre más representativos en la detección de la DM 2: glucosa en ayunas, triglicéridos, insulina y hemoglobina glicosilada, no evidenciaron una reducción estadísticamente significativa en sus concentraciones para los diferentes tratamientos administrados (Control, Maltosa, Maltosa + ELGS, Maltosa + EHM), tampoco se evidenciaron cambios en base al género de los ratones (machos, hembra). El análisis de expresión del ARNm para el PPAR- α , PPAR- γ y LPL mostró que no existió activación de los mismos ya que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre estas proteínas y los diferentes tratamientos aplicados. El ELGS y EHM no actúan como PPARs agonistas debido a que no hubo una disminución en los niveles de glucosa en ayunas, HbA1C e insulina. Inclusive, a pesar de que hubo disminución en los niveles de triglicéridos, esta no es muy representativa tomando en cuenta el mecanismo de acción de los PPAR y el tiempo de administración de los extractos. Sin embargo, el ELGS disminuye más que el EHM debido que al alimentarse exclusivamente de las hojas de morera el gusano de seda acumula en su cuerpo 2.7 veces más los alcaloides contenidos en las hojas.

ABSTRACT

In this study the anti-hyperglycemic activity of mulberry leaves and silkworms in mice was tested, based on the expression of PPAR- α , PPAR- γ and LPL. A diet containing carbohydrates (maltose) and different extracts (ELGS and EHM) was administrated orally for 12 weeks. The results of the blood tests more representative in the detection of type 2 diabetes: fasting glucose, triglycerides, insulin and glycosylated hemoglobin did not show statistically significant reduction in their concentrations with the different treatments applied (Control, maltose, maltose + ELGS, Maltose + EHM), either no changes were observed based on gender of the mice (male, female). Analysis of mRNA expression of PPAR- α , PPAR- γ and LPL showed that there was no activation of them and no statistically significant difference between these proteins and the different treatments. The ELGS and EHM do not act as PPAR agonists because the levels of fasting glucose, HbA1C and insulin were not decreased. Even though, there was a decrease in triglyceride levels, this is not representative due the mechanism of action of the PPAR and administration time of the extracts. However, the ELGS decreases more than EHM because the silkworm only eats leaves of mulberry and this makes that in their body alkaloids accumulates 2.7 times more than in the leaves.

NOMENCLATURA UTILIZADA

- ADA:** Asociación Americana de Diabetes
- AGL:** Ácidos grasos libres
- ATP:** Trifosfato de adenosina
- DBD:** Dominio de unión al ADN
- DM:** Diabetes Mellitus
- DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2
- DNJ:** 1- deoxynojirimicina
- EHM:** Extracto de Hojas de Morera
- ELGS:** Extracto de Larvas de Gusano de Seda
- FID:** Federación Internacional de Diabetes
- GLUT:** Transportador de Glucosa
- Hb:** Hemoglobina
- HbA1c:** Hemoglobina glicosilada
- HDL:** lipoproteínas de alta densidad
- LBD:** Dominio de unión al ligando
- LDL:** lipoproteínas de baja densidad
- LPL:** Lipoproteína lipasa
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PPAR:** Receptores Activados por Proliferadores de Peroxisomas
- PPRE:** Elemento de respuesta de los proliferadores peroxisomales
- PTGO:** Prueba de tolerancia a la glucosa
- RXR:** Receptor retinoide X
- TG:** Triglicéridos o triacilgliceroles
- TZD:** Tiazolidinedionas
- VLDL:** Lipoproteínas de muy baja densidad

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La diabetes mellitus es una de las enfermedades crónico-degenerativas más frecuentes en el mundo y sus complicaciones, especialmente cardiovasculares, se encuentran entre las primeras causas de muerte en muchos países. (Hervas, 2002). Debido a su incremento a niveles alarmantes se la está considerando como una epidemia y es una amenaza para la salud mundial. En 2003, la Federación Internacional de Diabetes (FID) calculó que había 194 millones de personas con diabetes en todo el mundo. Se calcula que para el año 2025 esta cifra aumentará hasta alcanzar los 333 millones debido en gran medida al crecimiento de la población, el envejecimiento, la urbanización y la vida sedentaria, lo cual significa que el 6,3% de la población mundial vivirá con diabetes, por lo que se convertiría en la enfermedad más común del mundo. (FID, 2004)

Actualmente, la diabetes es la cuarta causa de muerte en la mayoría de países desarrollados y el número de nuevos casos sigue en aumento. Se estimó que 1 de cada 3 niños nacidos en el 2001 va a sufrir diabetes en algún momento de su vida. (Dean and McEntyre 2004)

Los remedios a base de plantas se han utilizado en la práctica médica durante muchos años en países de Asia oriental y en aproximadamente en un 80% de los tratamientos médicos en los países en desarrollo. En la última década el uso de suplementos de plantas medicinales se ha incrementado notablemente, en especial la corteza de la raíz del árbol de la morera (especie *Morus*) que tiene propiedades hipoglicemiantes. El gusano de seda *Bombyx mori*, al alimentarse exclusivamente de las hojas de morera, también presenta esta característica.

1.2 Justificación del problema

La diabetes mellitus tipo 2 supone el 80-90 % de los casos de diabetes y su frecuencia está aumentando en todo el mundo de forma acelerada. En este tipo de diabetes, además de aumentar la concentración de glucosa, la acción deficiente de la insulina se traduce frecuentemente en elevación de los niveles de colesterol y/o triglicéridos. (Clínica Universidad de Navarra, 2008)

Por otra parte, hay otras alteraciones y anomalías metabólicas capaces de generar complicaciones graves en el organismo relacionadas con la resistencia a la insulina y el hiperinsulinismo. El grupo de entidades conocidas como síndrome metabólico (obesidad, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular) ha comenzado a ser un problema de salud pública mundial. El dramático incremento en la incidencia de la obesidad en la mayor parte del mundo ha contribuido a la aparición de este conjunto de enfermedades, particularmente resistencia a la insulina y diabetes tipo 2.

En el tratamiento de la diabetes tipo 2 se encuentra un plan nutricional y ejercicios físicos, y el uso de antidiabéticos orales si el paciente no logra un buen control metabólico ni los niveles normales de glucosa por los métodos anteriores. Tradicionalmente también se ha utilizado plantas para prevenir y curar esta enfermedad, entre estas plantas se encuentra la morera (*Morus sp.*). Diversos estudios han comprobado que esta planta que tiene efectos hipoglicemiantes e hipolipemiantes debido que contiene diversos alcaloides que actúan como inhibidores de las α -glucosidasas y al ser el alimento natural del gusano de seda (*Bombyx mori*), éste acumula en su cuerpo estos alcaloides.

Debido a que las hojas de morera tienen efectos similares a los activadores convencionales de insulina, que actúan como PPAR α y PPAR γ agonistas retrasando el progreso de la diabetes tipo 2, se puede establecer un nuevo tratamiento que involucre el uso de extractos de las hojas de morera y el gusano de seda.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Correlacionar los niveles de glucosa sanguínea y la regulación del metabolismo de los lípidos mediado por PPAR- α , PPAR- γ y LPL mediante la administración de extractos de hojas de *Morus indica*, *Bombyx mori* y placebo a ratones de laboratorio

1.3.2 Objetivos Específicos

- Medir los efectos de los extractos de hojas de morera y del gusano de seda en la activación de los PPAR α y PPAR γ .
- Establecer la relación entre los niveles de glucosa y el metabolismo de los lípidos.
- Determinar el papel de los PPAR α , PPAR γ y LPL en la regulación de la glucosa sanguínea.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Diabetes Mellitus

El término Diabetes Mellitus (DM) se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por los altos niveles de azúcar en la sangre (hiperglucemia) y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, que aparecen cuando el páncreas no produce insulina suficiente y/o el organismo no utiliza eficazmente la insulina producida. La hiperglucemia crónica se asocia a largo plazo con el daño, disfunción e insuficiencia en órganos especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos. (Organización Mundial de la Salud, 1999a, 2009b)

Los síntomas clásicos de la DM se deben a la propia hiperglucemia: poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, visión borrosa e infecciones recurrentes.

1.4.2 Clasificación de la Diabetes Mellitus

En 1997 un comité de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) asesorados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) dieron nuevos criterios para el diagnóstico y clasificación, la cual se basa fundamentalmente en la etiología y características fisiopatológicas, pero adicionalmente describe la etapa de la historia natural en la que se encuentra el paciente diabético, así se las clasificó en 4 categorías:

I. Diabetes Mellitus Tipo 1

- A. Inmunomediada
- B. Idiopática

II. Diabetes Mellitus Tipo 2

III. Otros tipos específicos

- A. Defectos genéticos en la función de la célula B
- B. Defectos genéticos de la acción de la insulina
- C. Enfermedades del páncreas exócrino
- D. Endocrinopatías
- E. Inducida por tóxicos o agentes químicos
- F. Infecciones
- G. Formas no comunes de diabetes inmunomediada
- H. Otros síndromes genéticos asociados ocasionalmente con diabetes

IV. Diabetes Mellitus Gestacional

Además, en 1999 la OMS recomendó que los términos “diabetes mellitus insulino-dependiente” y “diabetes mellitus no insulino-dependiente” así como sus siglas DMID y DMNID, respectivamente, ya no sean usadas debido a que estos términos son confusos y frecuente se clasificaba a los pacientes basados en el tipo de tratamiento y no en la patogénesis.

1.4.3 Diabetes Mellitus Tipo 2

1.4.3.1 Definición

La diabetes tipo 2 (DM2) es la forma más frecuente de diabetes y supone el 80 – 90% de los casos (FID, 2004). En este tipo de diabetes el páncreas produce insulina pero no funciona o es insuficiente. La glucosa no ingresa en las células y se acumula en la sangre por lo que el páncreas produce aún más insulina para lograr que la glucosa ingrese en las células, pero finalmente se agota debido a este esfuerzo excesivo. En consecuencia, se produce la hiperglucemia (altos niveles de azúcar en la sangre). (ADA, 2009).

1.4.3.2 Etiopatogenia

Su naturaleza genética se ha identificado por transmisión familiar, aunque se han reconocido errores genéticos puntuales que explican la etiopatogenia de algunos casos, en la gran mayoría se desconoce el defecto, siendo lo más probable que existan alteraciones genéticas múltiples (poligénicas). (Yki-Jarvisen, 1994)

El primer evento en la secuencia que conduce a la diabetes tipo 2 es una resistencia insulínica que lleva a un incremento en la síntesis y secreción de la insulina e hiperinsulinismo compensatorio, capaz de mantener la homeostasia metabólica por años. Una vez que se quiebra el equilibrio entre resistencia insulínica y secreción, se inicia la expresión bioquímica (intolerancia a la glucosa) y posteriormente la diabetes clínica. Los individuos con intolerancia a la glucosa y los diabéticos de corta evolución son hiperinsulinémicos y esta enfermedad es un componente frecuente en el llamado Síndrome de Resistencia a la Insulina o Síndrome Metabólico. Otros componentes de este cuadro y relacionados con la insulino-resistencia y/o hiperinsulinemia son hipertensión arterial, dislipidemias, obesidad, gota, aumento de factores protrombóticos, defectos de la fibrinólisis y aterosclerosis. Por ello, estos sujetos tienen aumentado su riesgo cardiovascular. La obesidad y el sedentarismo son factores que acentúan la insulino-resistencia. (Sacks & MacDonald, 1996)

Para que se inicie la enfermedad, que tiene un carácter irreversible en la mayoría de los casos, debe asociarse a la insulino-resistencia un defecto en las células beta. La DM2 es una enfermedad progresiva en que a medida que transcurren los años su control metabólico se va empeorando producto de la resistencia a la insulina y a mayor deterioro de su secreción.

1.4.3.3 Diagnóstico

La DM 2 es una enfermedad poco sintomática, por lo que su diagnóstico se efectúa en alrededor del 50% de los casos por exámenes de laboratorio solicitados por otra causa y no por sospecha clínica. La escasa sintomatología clásica determina, con alta frecuencia, que se diagnostique tardíamente y en presencia de complicaciones crónicas. Actualmente se recomienda realizarse exámenes a las personas que presentan alguno de los siguientes factores de riesgo (MINSAL, 2006):

1. Todo sujeto mayor de 45 años: Si la glicemia es normal, (<100 mg/dl), repetir cada 3 años.

2. Menores de 45 años con sobrepeso con una o más de las siguientes condiciones:
 - Parientes de primer grado diabéticos (padres, hermanos)
 - Mujer con antecedente de recién nacido macrosómico (≥ 4 Kg) o historia de diabetes gestacional.
 - Hipertensos ($\geq 140/90$ mmHg)
 - HDL ≤ 35 mg/dl y/o triglicéridos ≥ 250 mg/dl
 - Examen previo con intolerancia a la glucosa.
 - Estados de insulino resistencia. (Síndrome de ovario poliquístico, acantosis nigricans)
 - Historia de enfermedad vascular.

De acuerdo con el Comité de Expertos de la ADA y OMS (1997) el diagnóstico de diabetes debe plantearse en tres situaciones:

- 1) Síntomas de diabetes (poliuria, polidipsia, baja de peso) y una glicemia 200 mg/dl, realizada a cualquier hora del día.
- 2) Glicemia de ayuno 126 mg/dl (8 horas sin ingesta calórica)
- 3) Glicemia 200 mg/dl a las 2 horas durante la prueba de tolerancia a la glucosa (PTGO), efectuada según las recomendaciones de la OMS (glicemia basal y 2 h post carga de 75 g de glucosa).

Si no existe una hiperglicemia larga y síntomas claros de DM, debe confirmarse el diagnóstico repitiendo el examen un día diferente.

El grupo de expertos define además dos estados prediabéticos:

- 1) Intolerancia a la glucosa, >140 y <200 mg/dl a las 2 horas en la PTGO.
- 2) Anormalidad de la glicemia en ayunas: >110 mg/dl y <126 mg/dl.

1.4.3.4 Control Clínico

Para lograr un buen control de la DM 2 se debe vigilar cada uno de los parámetros que contribuyen al riesgo de desarrollar complicaciones crónicas. Es recomendable realizarse regularmente exámenes de laboratorio: glicemia en ayunas y/o post-prandial, hemoglobina A1c (HbA1c), perfil lipídico, creatinina sérica, examen de orina completo (glucosa, cetonas, proteínas y sedimento).

- ***Glucosa en sangre***

La glucosa es un monosacárido (azúcar sencillo) con fórmula empírica $C_6H_{12}O_6$. Es una hexosa (6 átomos de carbono) y aldosa (grupo carbonilo en el extremo). Es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza y fuente primaria en la síntesis de energía de las células, mediante su oxidación catabólica. También es la unidad estructural básica de los polisacáridos más abundantes, tales como el almidón y la celulosa. (Morrison & Boyd, 1998)

Al ciclarse los átomos se reacomodan de tal forma que donde había un grupo aldehído, aparece un grupo hidroxilo, el cual puede ubicarse por debajo o por encima del plano de la molécula, originando formas α o β , respectivamente. (Lehninger, 1980)

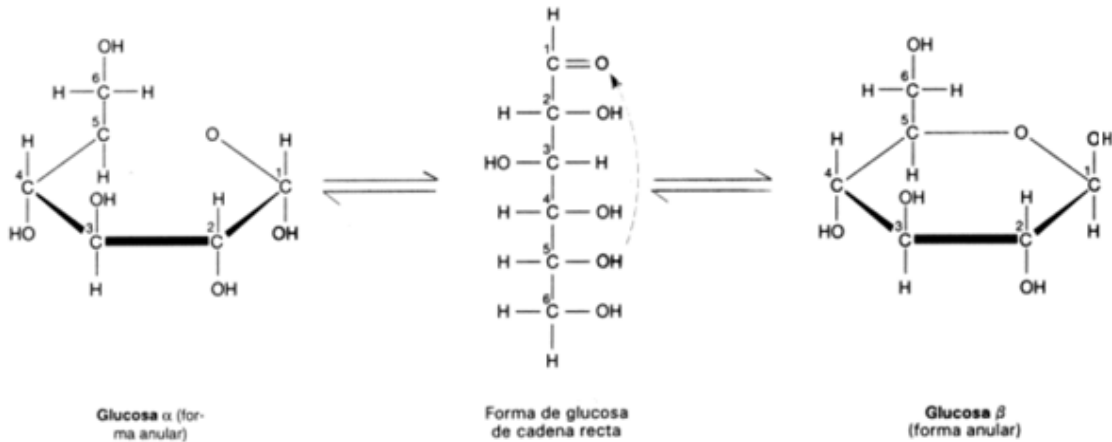


Figura 1.1 Formas lineal y anular de la glucosa (Morrison & Boyd, 1998)

La glucosa se obtiene de la alimentación y se almacena principalmente en el hígado. Para que los niveles de la glucosa se mantengan y el almacenamiento en el hígado sea adecuado, se precisa de la insulina (producida por el páncreas). Cuando la insulina es insuficiente, la glucosa se acumula en la sangre y si esta situación se mantiene, da lugar a una serie de complicaciones en distintos órganos. Su determinación es útil para el diagnóstico de numerosas enfermedades metabólicas, fundamentalmente de la diabetes mellitus.

Existen varios tipos de pruebas de glucosa en sangre (ADA, 2009):

- **Nivel de glucosa en ayunas**, mide la cantidad de azúcar en la sangre después de no comer por lo menos 8 horas. Es la primera prueba para verificar la prediabetes y diabetes.
- **Nivel de glucosa postprandial de 2 horas**, mide la cantidad de azúcar en la sangre exactamente a las 2 horas de comer.
- **Nivel de glucosa aleatorio**, mide la cantidad de azúcar en la sangre independientemente de la última vez que se come. Esta prueba es útil porque los niveles de azúcar en las personas sanas no varían mucho durante el día.

➤ **Prueba de tolerancia oral a la glucosa**, se utiliza para diagnosticar la prediabetes y la diabetes. Es una serie de mediciones de glucosa en sangre después de beber un líquido dulce que contiene glucosa.

- **Hemoglobina glicosilada**

La hemoglobina (Hb) es una hemoproteína que se encuentra en los eritrocitos, donde es la responsable de unirse al oxígeno en los pulmones y de transportar el oxígeno al cuerpo donde es utilizado en los mecanismos metabólicos aerobios. Al interactuar con el oxígeno toma un color rojo escarlata, color de la sangre arterial y al perder el oxígeno toma un color rojo oscuro, color de la sangre venosa. (King, 2010)

En la mayoría de los seres humanos, la molécula de hemoglobina es un conjunto de cuatro subunidades de proteínas globulares (cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas α idénticas y dos cadenas β también idénticas). Cada subunidad se compone de una cadena de proteínas estrechamente asociada con un grupo hemo no proteico. El grupo hemo consiste en un ión de hierro (Fe), unido a un anillo heterocíclico (porfirina). Este anillo consta de cuatro moléculas de pirrol unidas cíclicamente con el hierro en el centro. Los iones de hierro, que es el sitio de unión del oxígeno, se coordinan con los cuatro nitrógenos en el centro del anillo. (Lehninger, 1980)

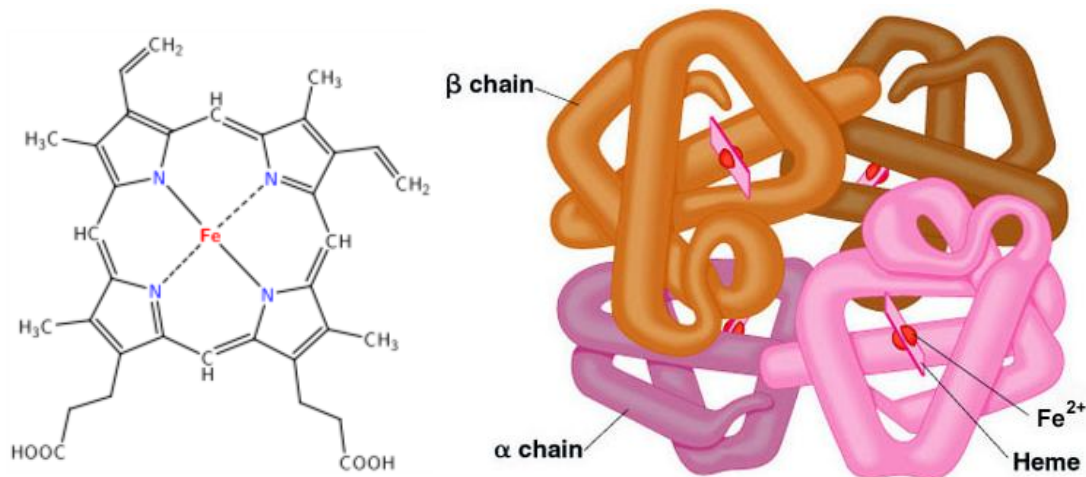


Figura 1.2 Estructuras del grupo hemo y cadenas de la hemoglobina (King, 2010)

La hemoglobina de los individuos sanos está compuesta por tres variedades denominadas hemoglobina A (HbA), hemoglobina A2 (HbA2) y hemoglobina F (HbF). La hemoglobina A es la más abundante (97%). A su vez, dentro de la fracción de hemoglobina A, se pueden distinguir varios grupos con distinta movilidad. Así, se observan variedades de hemoglobina A de movilidad rápida denominadas HbA1a, HbA1b y HbA1c.

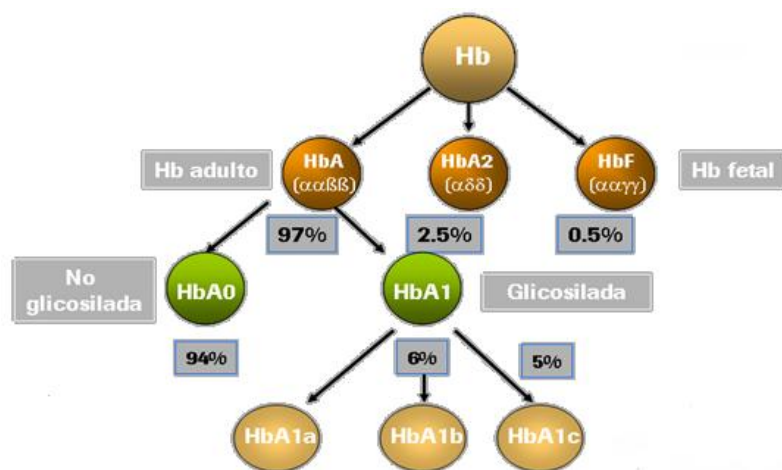


Figura 1.3 Clasificación de las hemoglobinas (King, 2010)

La HbA1c es la más abundante de las hemoglobinas del tipo A1. Se trata de una molécula de hemoglobina que incorporó mediante un proceso no enzimático e irreversible glucosa en la porción N-terminal de la cadena β .

Debido a que el promedio de vida de un eritrocito es de 120 días, el análisis del porcentaje de hemoglobina glicosilada brinda información sobre el nivel de glucosa en sangre en un período previo de cuatro meses. Esta evaluación tiene una clara ventaja sobre el análisis directo de la glucosa debido a que la medición de hemoglobina glicosilada está libre de las fluctuaciones, como el momento del día, el consumo de alimentos y la actividad física, que se observan durante el análisis de glucosa en sangre. (Robles & Martínez, 1999)

La prueba de hemoglobina glicosilada es muy importante, sin embargo no puede sustituir el monitoreo de glucosa, ya que ésta no puede medir el control diario y por lo tanto no permite ajustar la dosis de insulina e ingesta de alimentos en el día a día. La ADA

recomienda que los valores de HbA1c sean inferiores al 7 %. Si este porcentaje se eleva por encima del 8 %, entonces se deben introducir cambios en el tratamiento del paciente.

- **Insulina**

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, producida y secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, las cuales la fabrican en etapas. La primera etapa es la producción de la proinsulina: una molécula formada por una cadena proteínica de 81 aminoácidos, que es precursora de la insulina. Las células β del páncreas procesan la proinsulina convirtiéndola en insulina por la sustracción enzimática del péptido C, que es una estructura de 30 aminoácidos que conecta las cadenas A y B (de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente), y uniendo los dos fragmentos restantes mediante puentes disulfuro. (Orci et al., 1986)

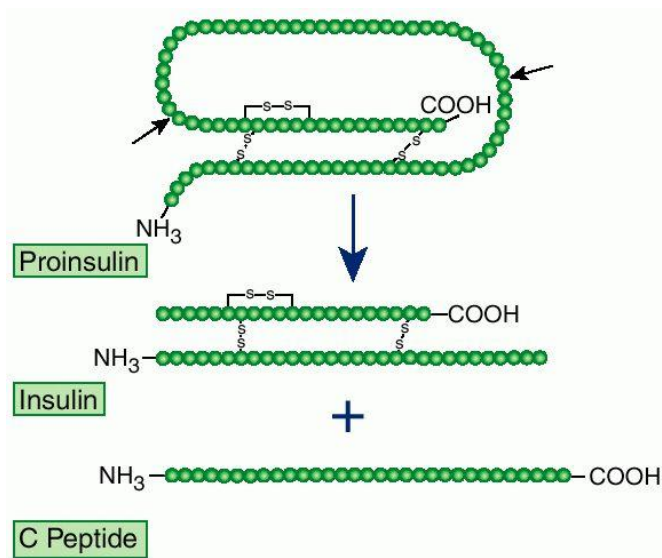


Figura 1.4 Conversión de la proinsulina a insulina por la sustracción enzimática del péptido C (King, 2010)

Las concentraciones de glucosa que pasan de 70 mg/ml estimulan la síntesis de insulina primordialmente al intensificar la traducción y el procesamiento de la proteína. La glucosa comienza a estimular la secreción de insulina cuando aquella es introducida en las células β por el transportador de glucosa GLUT2. La fosforilación de la glucosa por la

glucosinasa es lo que controla la secreción de insulina regulada por glucosa. El metabolismo de la glucosa 6-fosfato por la vía de la glucólisis genera trifosfato de adenosina (ATP), que inhibe la actividad de un canal de K^+ sensible a ATP que a su vez induce la despolarización de la membrana de la célula β , lo que abre canales de calcio dependientes de voltaje (con entrada consecuente de calcio en la célula) y estimula la secreción de insulina. Las comidas y otros estímulos inducen grandes descargas (incrementos de cuatro a cinco veces el valor basal) de secreción de insulina que suelen durar 2 a 3 h antes de volver a la cifra de referencia. Los trastornos de estos patrones secretorios normales constituyen uno de los signos más tempranos de disfunción de la célula β en la diabetes mellitus. (Pilkis & Park, 1974)

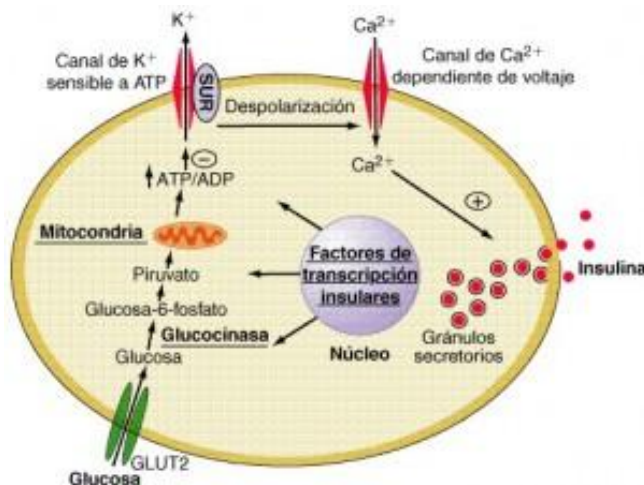


Figura 1.5 Mecanismo de secreción de la insulina regulada por la glucosa (Shepherd & Kahn, 1999)

Una vez que se secreta la insulina hacia la sangre venosa portal, casi 50% de ella se degrada en el hígado. La insulina que no extrae el hígado llega a la circulación general, donde se fija en receptores de sus sitios diana que provocan los amplios efectos metabólicos y de la insulina. (Pessin & Saltiel, 2000)

La homeostasis de la glucosa refleja un equilibrio preciso entre la producción hepática de glucosa y la captación y utilización periféricas de esta sustancia. La insulina es el regulador más importante de este equilibrio metabólico, pero los efectos de otras vías,

como aferencias nerviosas, señales metabólicas y hormonas (p. ej., el glucagon) generan un control integrado del aporte y la utilización de glucosa. En el estado de ayuno, las concentraciones bajas de insulina incrementan la producción de glucosa al promover la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepáticas. El glucagon estimula también la glucogenólisis y la gluconeogénesis por el hígado y la médula renal. Las concentraciones bajas de insulina disminuyen la síntesis de glucógeno, reducen la captación de glucosa en los tejidos sensibles a insulina y promueven la movilización de los precursores almacenados. En el período posprandial la carga de glucosa incrementa la concentración de insulina y disminuye la de glucagon, lo que tiene como consecuencia inversión de estos procesos. La mayor parte de la glucosa posprandial es utilizada por el músculo esquelético, efecto que se debe a la captación de glucosa estimulada por insulina. Otros tejidos, principalmente el cerebral, utilizan la glucosa de una manera independiente de la insulina. (Shepard & Kahn, 1999)

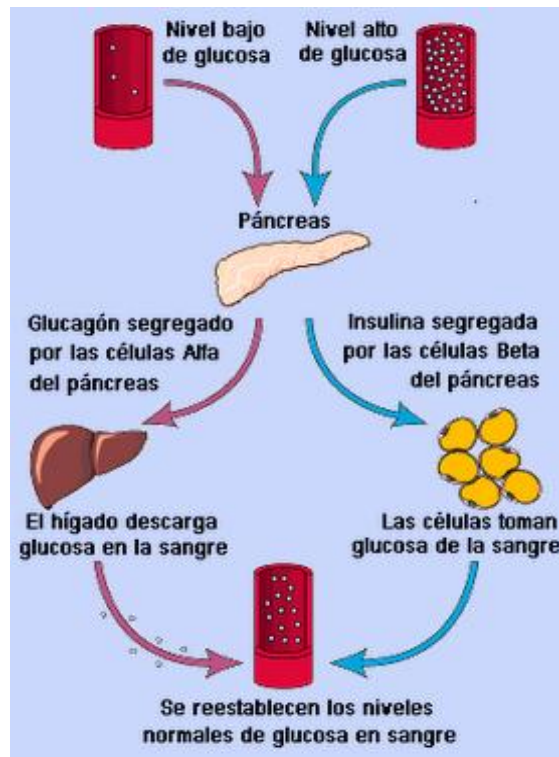


Figura 1.6 Homeostasis de la glucosa mediante la liberación de insulina (King, 2010)

La resistencia a la insulina se define como la disminución de la respuesta biológica a la actividad de la hormona. La resistencia a la insulina tiene una alta prevalencia en la población general. Se presenta asociada con algunas situaciones fisiológicas especiales y entidades nosológicas frecuentes: obesidad, diabetes mellitus tipo II, hipertensión arterial esencial, hiperuricemia, hipertrigliceridemia/bajos niveles de colesterol - HDL, aterosclerosis sin factor de riesgo identificado. El problema de la reducción de la sensibilidad es específico para un sustrato (glucosa) y afecta predominantemente a la vía metabólica intracelular, la no oxidativa. (Canova et al, 2002)

- **Triglicéridos (TG)**

Los triglicéridos son acilgliceroles, un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxilo por tres ácidos grasos, saturados o insaturados. Son el lípido más común y se almacenan principalmente en forma de una gran gota ocupando todo el citoplasma del adipocito (célula especializada en almacenar grasa). Son gradualmente liberados y metabolizados entre las comidas, de acuerdo con las necesidades de energía del organismo. (Lehninger, 1980; Boyer, 2000)

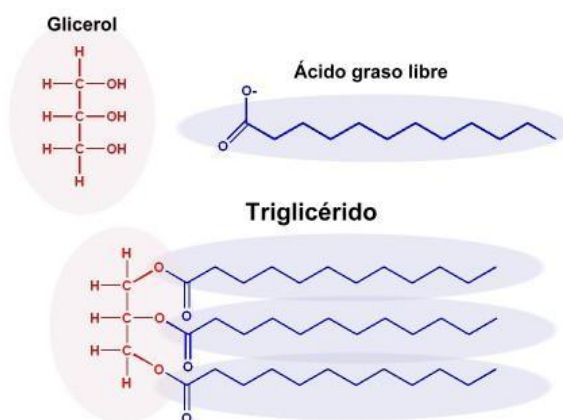


Figura 1.7 Estructura de un triglicérido (Boyer, 2000)

Los TG presentes en plasma derivan de dos fuentes diferentes: de los alimentos grasos ingeridos, o de la síntesis del hígado a partir de otros nutrientes. El hígado transforma el exceso de calorías, grasas o hidratos de carbono consumidos en TG.

La digestión de los TG se realiza en el duodeno e íleo proximal, donde son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos. La mayor parte de la digestión tiene lugar por acción de las lipasas intestinales y pancreáticas y de los ácidos biliares.

Los ácidos grasos de cadena larga se unen con otras moléculas de proteínas, fosfolípidos y colesterol que son transportadas por los quilomicrones (lipoproteínas esféricas compuestas en un 90% por TG, 7% de fosfolípidos, 1% colesterol, y un 2% de apoproteínas, proteínas especializadas que sirven para aglutinar y estabilizar las partículas de grasa en un entorno acuoso como el de la sangre), mientras que los ácidos grasos de cadena corta y media se transportan fijados a la albúmina en la circulación portal. La circulación sanguínea transporta quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a todos los tejidos del organismo. (Ros & Laguna, 2006)

Los quilomicrones salen del intestino por el sistema linfático y entran a la circulación por la vena subclavia izquierda. En la circulación sanguínea, los quilomicrones adquieren apoC-II y apoE de las HDLs del plasma. En los capilares de los tejidos adiposo y del músculo esquelético, los ácidos grasos son eliminados de los TG por la acción de la lipoproteína lipasa (LPL), que se encuentra en la superficie de las células endoteliales de los capilares. La apoC-II en los quilomicrones activa a la LPL en presencia de fosfolípidos. Los ácidos grasos libres entonces ingresan a los tejidos y el esqueleto de glicerol de los TG se devuelve, por la sangre, al hígado y a los riñones. (Mesa et al., 2006)

El hígado absorbe los quilomicrones restantes de modo que estos desaparecen de la sangre en dos o tres horas. Los restantes TG, junto con los TG adicionales sintetizados en el hígado, son empacados de nuevo como VLDL y secretados en la sangre desde el hígado.

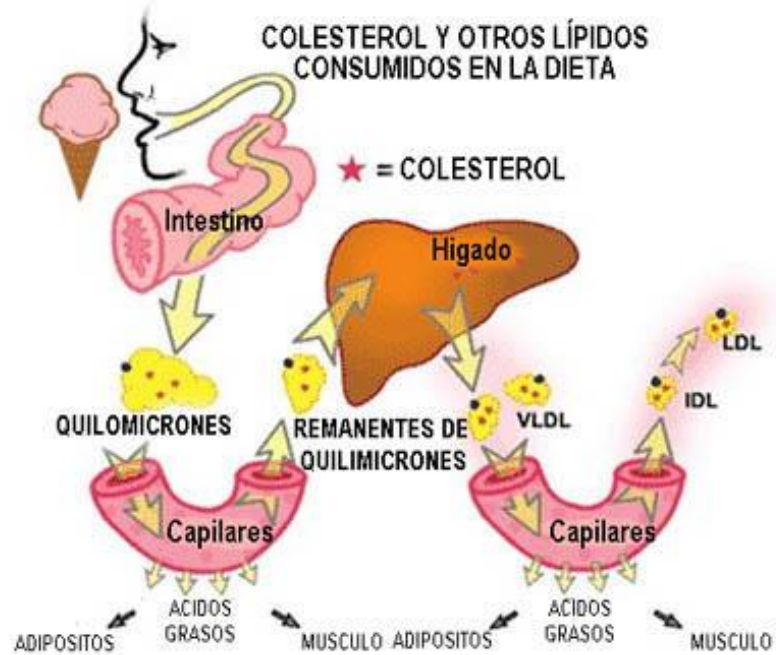


Figura 1.8 Metabolismo de los ácidos grasos. (Ros & Laguna, 2006)

Cuando los TG aumentan en sangre por arriba de los valores normales, este trastorno se denomina hipertrigliceridemia y puede estar asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardíaca y accidente cerebrovascular, lo cual se intensifica si hay presencia de otras condiciones, como diabetes, síndrome metabólico y obesidad, que incrementan la probabilidad de desarrollo de enfermedad cardiovascular. (Ros & Laguna, 2006)

Valores normales:

- **Normal:** menos de 150 mg/dl
- **Límite de alto riesgo:** 150 a 199 mg/dl
- **Alto:** 200 a 499 mg/dl
- **Muy alto:** ≥ 500 mg/dL

Entre las funciones conocidas de los TG están: almacén de ácidos grasos, fuente de calor, envoltura protectora de los órganos vitales con capacidad de amortiguar golpes y aislante térmico. (Boyer, 2000)

1.4.3.5 Tratamiento

El tratamiento de la DM 2 se fundamenta en eliminar los síntomas relacionados con la hiperglicemia, reducir el riesgo cardiovascular, debido a que es la principal causa de muerte en pacientes diabéticos tipo 2 y asegurar que el individuo consiga un estilo de vida tan normal como sea posible.

Los objetivos de un control adecuado se obtiene con niveles de glicemia en ayuno de 72 a 108 mg/dl, glicemias postprandiales entre 90 y 144 mg/dl (180 mg/dl en > 60 años) y concentraciones de hemoglobina glicosilada A1c menores a 6% - 7% (8% en ancianos).

- *Tratamiento no farmacológico*

El tratamiento no farmacológico y la reducción de peso en el obeso, son la base fundamental del plan terapéutico y, en algunos pacientes, la única intervención necesaria, ya que sigue siendo el único tratamiento integral capaz de controlar simultáneamente la mayoría de los problemas metabólicos de la persona con DM 2, incluyendo la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la hipertrigliceridemia y la hipertensión arterial.

El tratamiento no farmacológico comprende tres aspectos básicos: plan de alimentación, ejercicio físico y hábitos saludables. (Lenhgard & Gottschalk, 2002). En el anexo A se presenta un algoritmo para el tratamiento no farmacológico de la DM 2.

- *Tratamiento farmacológico*

El tratamiento farmacológico debe plantearse cuando después de un período razonable de 3 a 4 meses de tratamiento no farmacológico no se consiguen los objetivos de control, especialmente HbA1c > 8%, ya que ésta indica si debe haber un cambio en el escalón terapéutico. (ADA, 1995)

La monoterapia es el tratamiento de primera elección en la mayor parte de diabéticos tipo 2, tanto por su efectividad como por su seguridad, excepto cuando existen criterios de insulinización inmediata. La metformina se ha constituido en el tratamiento de elección en el paciente con sobrepeso. En presencia de peso normal sería preferible un secretagogo, sulfonilureas o repaglinida, Los inhibidores de las alfa-glucosidasas constituyen una alternativa válida cuando predominan las glucemias posprandiales o cuando existe contraindicación para alguno de los fármacos de primera elección. En el Cuadro 1.1 se presenta las características de los principales fármacos orales disponibles en el mercado y en el Cuadro 1.2 se describen los efectos adversos de estos fármacos. (DeFronzo, 1999; Turner et al, 1999)

Si tras un período de respuesta al tratamiento en monoterapia se observa un empeoramiento del control metabólico, independientemente del fármaco utilizado, se recomienda añadir un segundo fármaco oral. La Figura 1.9 presenta un algoritmo de tratamiento para la DM 2. (Turner et al, 1999; DeFronzo, 1999)

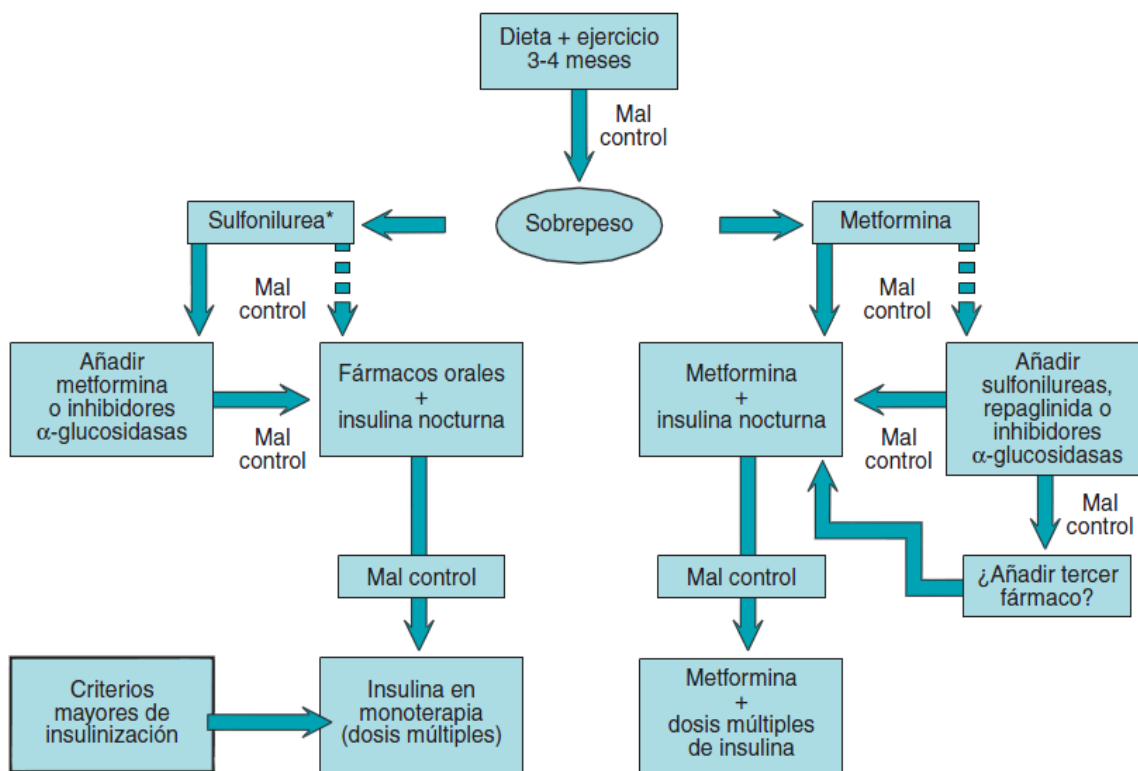


Figura 1.9 Algoritmo de tratamiento para la DM 2. (Turner et al, 1999)

Cuadro 1.1 Características principales de los fármacos orales. (ALAD, 2006)

Clase	Mecanismo acción/efectividad	Efectos secundarios	Contraindicaciones
Metformina (biguanidas)	Tiene su mayor efecto a nivel hepático donde inhibe la gluconeogénesis y por lo tanto la producción hepática de glucosa durante el ayuno, aunque también tiene un importante efecto sensibilizador de la insulina a nivel periférico y las personas que la toman ganan menos peso que con otros ADOs.	Con frecuencia produce intolerancia gastrointestinal, especialmente si no se tiene cuidado en dosificarla gradualmente. Sin embargo, la intolerancia puede presentarse meses o años después.	Está contraindicada en presencia de insuficiencia renal o hepática y en alcoholismo, porque se puede producir acidosis láctica.
Sulfonilureas	Tienen su principal efecto como secretagogos de insulina, aunque algunas de última generación como la glimepirida y la gliclazida tienen efectos adicionales favorables sobre el sistema cardiovascular, la función endotelial y la célula beta.	Su principal efecto secundario es la hipoglucemia que es menos frecuente con las de última generación y en particular con las de acción prolongada que se administran una vez al día. Muy rara vez se pueden presentar reacciones cutáneas, hematológicas o hepáticas.	Algunas, como la glibenclamida, están contraindicadas en falla renal porque sus metabolitos hepáticos conservan acción hipoglucemiante.
Meglitinidas	Tienen su principal efecto como secretagogos de insulina	Su principal efecto secundario es la hipoglucemia aunque se presenta menos que con las sulfonilureas, por tener una acción mas corta. Rara vez se pueden presentar reacciones gastrointestinales	Por su metabolismo hepático, se deben evitar en falla severa de éste órgano. Además, la nateglinida se debe evitar en falla renal severa.
Tiazolidinedionas	Tienen su principal efecto como sensibilizadoras de la insulina, aunque cada vez se encuentran mas efectos antiinflamatorios/ antiaterogénicos derivados de su acción sobre las citoquinas producidas por el tejido adiposo. El efecto sobre los lípidos es variable dependiendo del tipo de glitazona.	Su principal efecto secundario es el edema (especialmente en combinación con insulina) y la ganancia modesta de peso	Están contraindicadas en pacientes con insuficiencia cardíaca severa (grados III y IV de la clasificación de NY)
Inhibidores de alfa-glucosidasas	Su principal efecto es la inhibición parcial de la absorción de disacáridos, por lo cual retardan la absorción post-prandial de carbohidratos	Su principal efecto secundario es la flatulencia, especialmente si no se tiene cuidado en dosificarla gradualmente.	Bloquea la absorción de disacáridos como el azúcar, por lo cual en el caso de hipoglucemia se debe ingerir solo glucosa

Cuadro 1.2 Efectos adversos de los antidiabéticos orales. (DeFronzo, 1999)

	Secretagogos (SU y repaglinida)	Metformina	Inhibidores alfa-glucosidasas
Gastrointestinales	Vómitos, náuseas	Náuseas, sabor metálico, dolor abdominal, diarrea (30%), malabsorción vitamina B ₁₂	Dolor abdominal, diarrea, flatulencia y meteorismo (30-60%)
Metabólicos	Hipoglucemias (17%)		
Otros (infrecuentes)	Leucotrombopenia Agranulocitosis Dermatitis exfoliativa Eritema nodoso Colestasis	Acidosis láctica	Elevación de transaminasas

Los remedios a base de plantas se han utilizado en las prácticas médicas durante muchos años en países de Asia oriental y aproximadamente en un 80% de los tratamientos médicos en los países en desarrollo. En la última década el uso de suplementos de plantas medicinales se ha incrementado notablemente. (Park et al, 2005).

La corteza de la raíz del árbol de la morera (especie *Morus*) ha sido utilizada por los seres humanos al menos por 4000 años. Esta planta se ha utilizado como antiflogística, diurética, expectorante y anti-diabética en medicina tradicional china (Nomura, 1988; Chen et al, 1995). Un alcaloide de la piperidino (moranolina = 1 deoxinojirimicina) y glicoproteínas (Morans A y 20 K) fueron aislados como agentes antidiabéticos de la corteza y/o de las hojas. (Singad et al., 2005)

La posibilidad de prevenir la diabetes tipo 2 utilizando la morera ha despertado la atención de varios investigadores; así, Hikino et al, (1985), descubrieron que el extracto de corteza de raíz de *Morus alba* tiene efectos antihiper glucémicos en ratones normales e inducidos hiper glucemicamente con alloxan. Kimura et al, (1995), encontró que el extracto de hojas de morera tiene un potente efecto antihiper glucémico en ratones diabéticos tratados con estreptozotocina. Andallu y Vardacharyulu (2001) mostraron que las hojas de morera son efectivas en bajar las concentraciones de lípidos y glucosa en la sangre. Además reportó sus efectos hipoglicemiantes, y antiinflamatorios. Asano et al, (2001) aisló 18 alcaloides incluyendo a la 1-deoxinojirimicina de las hojas y raíz de la morera y encontró que algunos de ellos son potentes inhibidores de las α -glucosidasas de los mamíferos.

Las hojas de morera contienen todas las sustancias nutritivas necesarias para el total desarrollo de *Bombyx mori*, gusano de seda, siendo también su única fuente de alimento natural brindándole los nutrientes necesarios para su desarrollo. Sin embargo, la calidad nutricional de la hoja influye en el desempeño del gusano de seda, tanto en las etapas de su desarrollo como en la producción del capullo (Pelicano et al, 2003). Asano et al., (2001) comprobó que al alimentarse exclusivamente de las hojas de morera el gusano de seda acumula en su cuerpo 2.7 veces más de los alcaloides contenidos en las hojas.

1.4.4 Receptores Activados por Poliferadores de Peroxisomas (PPAR)

El PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor; o, receptor activado por proliferadores peroxisomales) es una proteína nuclear de aproximadamente 56 kD que pertenecen a la superfamilia de los receptores hormonales de ubicación nuclear. Se ha determinado que el sistema PPAR estimula la proliferación de los peroxisomas y cumple un papel importante en la regulación de vías metabólicas relacionadas con el balance energético (metabolismo lipídico mediante la oxidación de las grasas al incrementar la actividad de varias enzimas responsables de la β y co-oxidación de los ácidos grasos, gluconeogénesis y termogénesis). Asimismo, participa en la producción de citoquinas involucradas en el proceso inflamatorio debido a que interfiere con los factores pro-inflamatorios (NF- κ B, AP-1 y STAT), en el control del crecimiento-diferenciación celular normal (adipogénesis, desarrollo de macrófagos) y también, en la proliferación celular neoplásica. (Uauy et al., 2000)

Esta familia de receptores nucleares media los efectos, a nivel del control de la expresión génica, de las hormonas esteroidales, de los glucocorticoides, de la tiroxina, del ácido retinoico y de la vitamina D. Se conocen 3 isoformas de PPAR, denominadas α , β (o δ) y γ , que son codificadas por genes individuales con alto grado de similitud. (Parra y Mejía, 2001)

Características estructurales y funcionales

Al igual que otros miembros de la familia de receptores nucleares, los PPAR están compuestos de tres dominios principales: la región NH₂ terminal, el dominio de unión al DNA (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD), la cual es una región altamente conservada a través de las isoformas de los PPAR. (Parra y Mejía, 2001)



Figura 1.10 Representación linealizada de los PPAR y sus dominios funcionales (Parra y Mejía, 2001)

El DBD está formado por 2 dedos de zinc que se unen específicamente a los PPRES (elementos de respuesta de los proliferadores peroxisomales), elementos de repetición directa (DR-1) formados por dos hexanucleótidos con una secuencia consenso AGGTCA, separadas por un nucleótido. (Murphy and Holder, 2000). Esta secuencia se encuentra presente en los genes inducibles por PPAR incluyendo la acil-CoA oxidasa y la proteína de unión adipocito-ácido graso. (Takano and Komuro, 2009)

El LBD, ubicado en el C-terminal, se compone de 13 hélices α y 4 láminas β pequeñas. Aquí se encuentra el dominio de activación dependiente del ligando, AF-2, región relacionada con la generación del sitio de unión con el coactivador. Mientras que en el N-terminal se encuentra el sitio de activación independiente del ligando, AF-1, que puede conferir una actividad constitutiva al receptor y es regulada negativamente mediante la fosforilación (Murphy and Holder, 2002). El sitio de unión del ligando parece ser bastante grande en comparación con la de otros receptores nucleares, lo que permite a los PPAR interactuar con una amplia gama de ligandos estructuralmente diferentes tanto naturales y sintéticos. (Berger and Moller, 2002)

Los PPARs forman heterodímeros con el receptor retinoide X (RXR), PPAR:RXR, el cual se une al PPRE. Los RXR tienen tres isoformas distintas: RXR α , β , y γ , los cuales son activados por el agonista endógeno del ácido 9-cis retinoico (Uauy et al., 2000). RXR agonistas sintéticos (“rexinoides”) pueden activar el complejo PPAR:RXR y así obtener resultados antidiabéticos similares a los observados en los agonistas de PPAR. (Murphy and Holder, 2000)

Diferentes proteínas cofactores, coactivadores y correpresores median la capacidad de los receptores nucleares para iniciar (o suprimir) el proceso de transcripción. Los coactivadores interactúan con los receptores nucleares en una forma agonista-dependiente a través de un motivo conservado LXXLL (donde X es cualquier aminoácido). Este dominio del coactivador está orientado por una "pinza de carga" formado por los residuos entre la hélice 3 y el la hélice 12 del AF-2 del LBD. Posteriormente se unen a una hendidura hidrofóbica en la superficie del receptor formado por las hélices 3, 4, y 5 y la hélice AF-2. (Berger and Moller, 2002) Después de esta unión, la conformación del receptor se altera formando interacciones de alta afinidad con el coactivador, lo cual remodela la cromatina y activa la maquinaria de transcripción celular. Así, se incrementa la tasa de activación transcripcional de los genes que contienen PPREs y su ARNm niveles son elevados. (Berger et al., 2005)

1.4.4.1 PPAR α

Se encuentra en el brazo largo del cromosoma 22 (22q12-q13.1). Estos receptores se expresan en tejidos donde ocurre el catabolismo de los ácidos grasos: músculo esquelético, corazón, riñón e hígado. También se encuentran en los tejidos adiposos blanco y marrón, monocitos, células del músculo liso aórtico, endotelio vascular, músculo liso vascular y macrófagos /células espumosas. En el hígado la expresión del ARNm de los PPAR α es estimulada por los glucocorticoides, tanto por estrés como por las variaciones diurnas propias de estas hormonas. (Parra y Mejía, 2001)

La activación de los PPAR- α media efectos tales como el catabolismo de los ácidos grasos a través de la estimulación de la oxidación lipídica mitocondrial e induciendo a las enzimas involucradas en esta vía. Controla en forma importante el metabolismo extracelular de los lípidos alterando los niveles de lipoproteínas. Los agonistas de los PPAR- α incrementan la captación hepática y la esterificación de los ácidos grasos libres (AGL), previniendo su eflujo, mediante la estimulación de la proteína transportadora de ácidos grasos 1 (FATP-1) y la expresión génica de la acil-Coenzima A sintetasa, la cual interviene en la transcripción de ácidos grasos de cadena larga y la enzima CYP4A que

cataliza la ω -hidroxilación de los ácidos grasos, vía que se activa en estados de ayuno y diabetes. En el músculo esquelético y en el miocardio, los PPAR- α incrementan la captación mitocondrial de AGL y por consiguiente su oxidación, para la obtención de la energía, al estimular la carnitina palmitoil transferasa I, la cual cataliza el desplazamiento de los ácidos grasos activados a través de la membrana mitocondrial interna. (Berger and Moller, 2002)

El efecto de los fibratos que conducen al catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL), se debe a la estimulación de la lipoproteína lipasa (LPL) dependiente de los PPAR- α con inhibición simultánea de la apolipoproteína C-III, mientras que el incremento del HDL-colesterol depende de la sobreexpresión de las apolipoproteínas A-I y A-II. (Parra y Mejía, 2001)

El ayuno es una de las situaciones fisiológicas en las cuales el PPAR α , activado por ácidos grasos, podría aumentar la lipólisis y el nivel plasmático de ácidos grasos libres. Además, el ayuno se asocia a un aumento en la gluconeogénesis mediada por fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK). El gen que codifica esta enzima porta un PPRE para PPAR α . La activación de PPAR α por el agonista WY-14,636 induce otra de las enzimas involucradas en la homeostasis de glucosa, la piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (PDK4), observación que avala el papel de esta isoforma de PPAR en la modulación del metabolismo de glucosa. La activación de esta isoenzima estimula la fosforilación del complejo piruvato deshidrogenasa, regulando la disponibilidad de glucosa en los tejidos. (Uauy et al, 2000).

El PPAR α se une a un conjunto diverso de ligandos, entre ellos, metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos), plastificantes y fibratos sintéticos (Figura 1.11), incluyendo el clofibrato, fenofibrato y bezafibrato. Sin embargo, ningún ligando natural de alta afinidad ha sido identificado, proponiéndose que la acción fisiológica del receptor puede ser detectar el flujo total de ácidos grasos en los tejidos clave. (Shearer and Hoekstra, 2002)

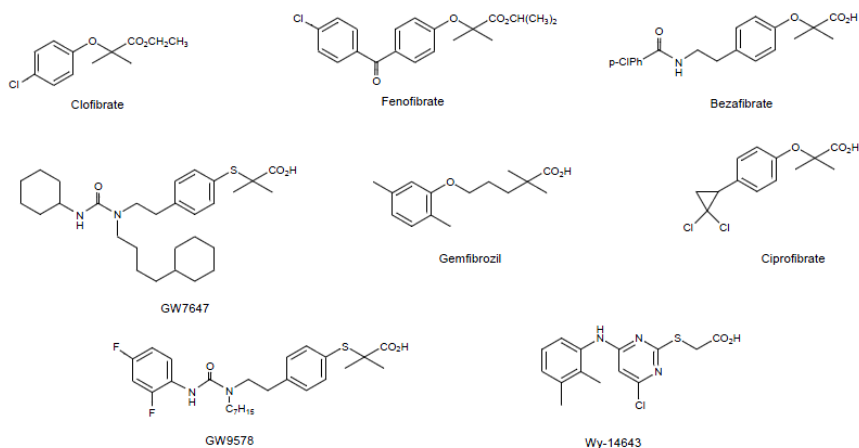


Figura 1.11 Estructura de los PPAR α agonistas. (Shearer and Hoekstra, 2002)

La presencia de PPAR- α y/o PPAR- γ en la expresión de células vasculares como en el endotelio y en las células musculares lisas, monocitos, macrófagos derivados de monocitos y células espumosas de las placas ateroscleróticas sugieren un potencial antiaterosclerótico a través de mecanismos multifactoriales, incluyendo mejoras en los lípidos circulantes, efectos anti-inflamatorios sistémicos y locales, y potencialmente la inhibición de la proliferación de células vasculares. (Berger and Moller, 2002). La activación de los PPAR- α también induce apoptosis en los macrófagos derivados de monocitos, probablemente a través de la inhibición del factor nuclear κ B. También incrementan la producción de óxido nítrico, lo cual indica que tienen un efecto vasodilatador protector. (Berger et al., 2005)

1.4.4.2 PPAR γ

Su gen, conformado de nueve exones, se encuentra en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25). Tiene dos isoformas proteicas distinguibles, PPAR γ 1 con la más amplia expresión tisular y PPAR γ 2, que se produce por empalme alternativo del ARNm, generando una proteína con 28 aminoácidos adicionales en la región N terminal. Los adipocitos presentan una alta expresión de este tipo de receptores (especialmente de PPAR γ 2), pero también se han encontrado en otros tejidos como en músculos esquelético y cardíaco, hígado, riñón, intestino delgado, colon, vejiga, bazo, células del sistema inmune y retina. (Parra y Mejía, 2001)

El PPAR γ es necesario para diferenciar los adipocitos, interactúa directamente con el elemento *cis* que regula la expresión de la proteína de unión de los ácidos grasos, aP2, específica de los adipocitos. En los adipocitos, el PPAR γ regula la expresión de numerosos genes (Anexo B) que participan en el metabolismo de los lípidos. También controla la expresión de genes implicados en la absorción de lípidos. Estos genes han demostrado poseer PPREs dentro de sus regiones reguladoras. Por otra parte, la diferenciación de los adipocitos tendría repercusión en la respuesta inmune, dada la secreción de citoquinas, como adiposina y TNF α . (Berger and Moller, 2002)

El PPAR γ también regula los genes que controlan la homeostasis de la energía celular. Se ha demostrado que aumenta la expresión de las proteínas de desacoplamiento mitocondrial, UCP-1, UCP-2 y UCP-3. También regula negativamente la leptina, una proteína adipocito-selectiva que inhibe la alimentación y aumenta el metabolismo catabólico de los lípidos. (Uauy et al, 2000)

La participación de PPAR γ en la homeostasis de glucosa involucra tanto la modulación de la producción de citoquinas del tipo de TNF- α y leptina por los adipocitos (que afectan el metabolismo de glucosa en el músculo), como el metabolismo de lípidos, mediante el control de la expresión de genes vinculados a la lipogénesis, lo que aumenta la sensibilidad a insulina.

PPAR γ se ha asociado con varios genes que afectan la acción de la insulina. El TNF- α induce la resistencia a la insulina. En la línea celular de los adipocitos 3T3-L1, los efectos inhibidores del TNF- α en la señalización de insulina puede ser superado mediante el tratamiento con tiazolidinedionas y otros agonistas de PPAR- γ -RXR. Los PPAR γ agonistas inhiben la expresión de TNF α en el tejido adiposo y aumentan la expresión del sustrato receptor de insulina (IRS-1 e IRS-2), una proteína involucrada en la transducción de señal de la insulina en tejidos sensibles a la insulina. (Murphy and Holder, 2000)

Se ha determinado que PPAR γ estimula la transcripción del gen que codifica el transportador de glucosa GLUT4 y aparentemente, también la del gen CAP, proteína

asociada al protooncogen c-Cbl que se expresa sólo en tejidos que son sensibles a insulina (adiposo, hepático y muscular). CAP es una proteína adaptadora con dominios SH-3 que une Cbl al receptor de la insulina y favorece su fosforilación. Una vez fosforilado, Cbl inicia una vía de señalización esencial para el transporte de la glucosa. (Balasubramanyam and Mohan, 2000)

Los ligandos naturales y sintéticos que se unen al PPAR γ cambian la conformación y la activación del PPAR γ . El 15d-PGJ₂ fue el primer ligando endógeno en ser descubierto y es el más potente ligando natural. Las drogas antidiabéticas, tiazolidinedionas (TZDs), como la troglitazona, pioglitazona, ciglitazona y rosiglitazona, usadas en el control de la concentración de la glucosa en pacientes con diabetes, son ligandos farmacológicos del PPAR γ . (Balasubramanyam and Mohan, 2000)

Los ligandos se unen al PPAR γ con diversas afinidades y es posible que ejerzan sus efectos sensibilizantes a la insulina e hipoglucemiantes mediante la activación de PPAR γ . Los TZDs parecen mediar sus efectos fundamentalmente a través del tejido adiposo, debido a que las TZD alteran el nivel de expresión de genes involucrados en la absorción de lípidos, el metabolismo lipídico y la acción de la insulina en los adipocitos. Las TZD mejoran la señalización de la insulina en el adipocito y reducen la liberación de ácidos grasos libres. Las TZD también disminuyen la inflamación del tejido adiposo inducido por la obesidad y contribuyen a aumentar la resistencia a la insulina. Las TZD mejoran la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético y el hígado, los principales órganos sensibles a la insulina, a través de estas acciones adipocentricas múltiples. (Takano and Komuro, 2009)

Los TZDs sintéticos fueron la primera clase de compuestos en ser identificados como ligandos de los PPAR γ . Las propiedades de activación de los PPAR γ en la sensibilidad a la insulina por parte de las TZDs se debe a la alta correlación entre la potencia del PPAR γ agonista y la eficacia de los antidiabéticos. También, agonistas no-TZDs también mejoran la sensibilidad a la insulina. (Murphy and Holder, 2000)

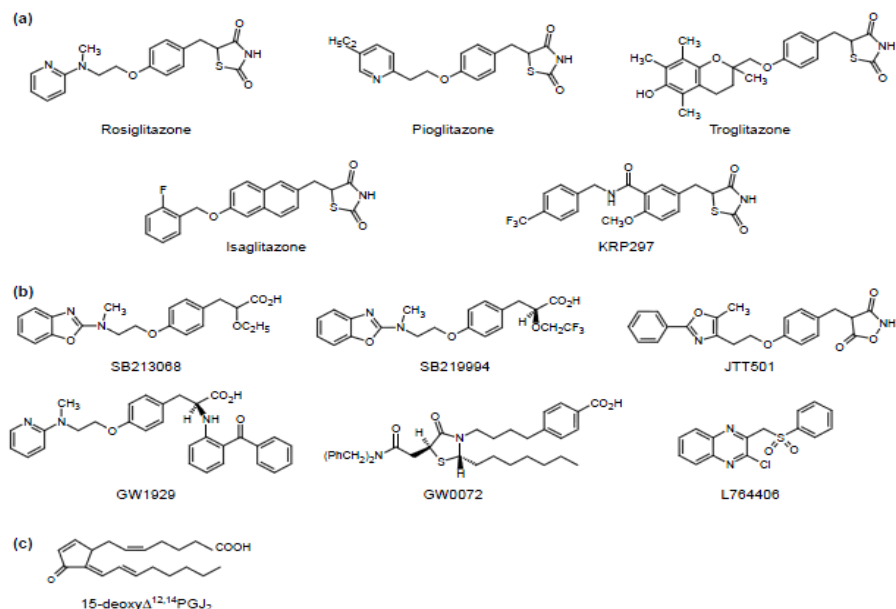


Figura 1.12 Estructuras de las PPAR γ agonistas. (a) tiazolidinedionas PPAR γ agonistas (b) no-tiazolidinedionas PPAR γ agonistas (c) Ligando endógeno de PPAR γ . (Murphy and Holder, 2000)

1.4.5 Lipoproteína Lipasa (LPL)

La lipoproteína lipasa (LPL) es una glicoproteína de 55 kDa, secretada principalmente por los adipocitos y células musculares (cardíaco y esquelético) a la circulación, donde se une mediante glucosaminoglicanos a la superficie luminal de las células endoteliales. Sin embargo, la actividad de esta enzima se ha detectado en macrófagos, cerebro, placenta, pulmones, bazo, células pancreáticas β y el tejido esteroideogénico. (Santamarina-Fojo and Brewer, 1994)

A la LPL se le han asignado cuatro actividades fisiológicas que afectan el perfil de las lipoproteínas plasmáticas y el metabolismo celular de los ácidos grasos y lípidos. Primero: LPL hidroliza la fracción de triglicéridos de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que proporciona ácidos grasos a los tejidos subyacentes. Segundo: LPL es capaz de interactuar con lipoproteínas independientemente de su actividad lipolítica, lo que permite sujetar lipoproteínas a la pared del vaso facilitando la hidrólisis de los triglicéridos y captación de partículas. Tercero: LPL actúa como ligando para el receptor LDL y otros miembros de la familia del

receptor LDL lo que resulta en la captación de las lipoproteínas. (Mead et al, 2002). Cuarto: LPL puede mediar en la captación selectiva de lipoproteínas asociadas a lípidos y las vitaminas lipofílicas (vitamina A y E), sin la captación de las partículas de la lipoproteína. (Preiss-Landl et al, 2002)

La LPL tiene dos regiones estructuralmente distintas, que consisten en un dominio N-terminal de mayor tamaño (residuos 1-312) y un extremo C- terminal más pequeño (residuos 313-448). La función catalítica se encuentra en la región N- terminal, mientras que el dominio C- terminal está involucrado en la interacción de los lípidos (Santamarina-Fojo and Brewer, 1994).

Varios dominios funcionales son necesarios para el normal funcionamiento de la actividad hidrolítica de la LPL. Así se supone que la LPL tiene un sitio TBR de interacción con los lípidos así como un sitio catalítico, donde se produce la hidrólisis de los triglicéridos. Además, hay dominios separados que median la unión de la LPL con la apoC2. (Santamarina-Fojo and Brewer, 1994).

Los triglicéridos ricos en lipoproteínas son partículas muy grandes para atravesar el endotelio capilar en la mayoría de los tejidos. El sitio de acción de la LPL es la superficie luminal de las células endoteliales capilares a la que se une mediante cadenas altamente cargadas de heparán sulfato proteoglicanos (HSPG) a la membrana. La forma activa de la LPL es un homodímero no covalente y requiere la apolipoproteína C2 como su activador específico o cofactor. Esta reacción involucra la interacción de los residuos negativos del C-terminal de la apoC2 con las cargas positivas del LPL. (Mead et al, 2002)

La LPL juega un papel crucial en el metabolismo de los lípidos y su transporte, catalizando el paso limitante de la hidrólisis del componente TG de los quilomicrones y VLDL circulantes, lo que proporciona ácidos grasos no esterificados (NEFA, siglas en inglés) y 2-monoacilglicerol para la utilización en los tejidos. Además, los ácidos grasos se oxidan para proporcionar una fuente de energía en el corazón y para regular la termogénesis en el tejido marrón. (Lim et al, 2009)

Después de la hidrólisis los quilomicrones restantes, de pequeño tamaño, son transportados al hígado, donde un receptor específico reconoce la apolipoproteína E (apoE) que permite su absorción en los hepatocitos. Por lo general, todos los quilomicrones desaparecen de la circulación dentro de las 12-14 horas después de una comida grasosa. En el caso de las VLDL las partículas de lipoproteína se hacen más pequeñas después de la hidrólisis por la LPL, pero todavía tienen ésteres de colesterol por lo que se les llama lipoproteínas de densidad intermedia. Se forman las lipoproteínas de muy baja densidad (LDL) después de varias hidrólisis más por parte de la LPL y la pérdida de los TG restantes y las fracciones de apoE. Las LDL constituyen el mayor reservorio de colesterol para la síntesis de esteroides, ácido biliar y su uso en la membrana. (Mead et al, 2002)

La regulación del LPL proporciona un mecanismo de control para la captación de ácidos grasos libres (AGL), lípidos y lipoproteínas resultando en una distribución eficaz de los nutrientes y lípidos entre los tejidos. Por otro lado, una mala expresión de LPL tiene importantes consecuencias metabólicas en la homeostasis de la energía y el metabolismo de las lipoproteínas. Un desequilibrio en esta función de mantenimiento está correlacionado con la acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo o los macrófagos, mecanismos involucrados en la patogénesis de la obesidad y la aterosclerosis. En las células pancreáticas β , los AGL derivados de la LPL están implicados en la regulación de la secreción de insulina y el desarrollo de resistencia a la insulina. La LPL por lo tanto juega un papel fundamental en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. (Preiss-Landl et al, 2002)

1.4.6 Pregunta de la Investigación

Los extractos de hojas de morera (*Morus* sp.) y gusano de seda (*Bombyx mori*) administrados a ratones de laboratorio influyen en la regulación de la expresión de los PPARs causando efectos hipolipemiantes e hipoglicemiantes

CAPITULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación se realizó gracias al financiamiento de la Cooperazione allo Sviluppo del Ministero degli Affari Esteri de Italia mediante el convenio entre el Instituto Italo Latinoamericano, la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) y la Red Andina de la Seda bajo el proyecto: “Apoyo al Desarrollo de la Sericultura en el Ecuador”.

Como director del proyecto el Dr. Marcelo Grijalva M.D., Ph.D., docente del Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la ESPE.

2.2 Zona de Estudio

Las hojas de morera (*Morus indica*) variedad Kanva II y las larvas de gusano de seda (*Bombyx mori*), se obtuvieron del Instituto Agropecuario Superior Andino (IASA II) de Santo Domingo de los Tsáchilas. La parte experimental se desarrollo en los laboratorios de la Unidad de Parasitología Molecular del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, Campus de Medicina y en los laboratorios de Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Vida, Ingeniería en Biotecnología de la ESPE, Campus Sangolquí.

2.3 Periodo de tiempo de investigación

El inicio del proyecto fue en el mes de octubre del 2009 y su finalización fue en septiembre del 2010.

2.4 Diseño

Para evaluar el efecto de las hojas de morera, el gusano de seda y placebo en la regulación de la homeostasis de la glucosa sanguínea en ratones se utilizó un modelo lineal mixto en el que se va a estudiar el efecto de los factores medicamentos (tratamientos) y género (hembras, macho) sobre la glucosa sanguínea en ayunas, insulina, hemoglobina glicosilada y triglicéridos en la sangre.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Preparación de los extractos

2.5.1.1 Extracto de Hojas de Morera

Para esta investigación se utilizaron hojas de morera variedad Kanva II de dos meses de edad las cuales fueron recolectadas del IASA II de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Las hojas fueron clasificadas descartando las que presentaban daños considerables. Las hojas seleccionadas fueron limpiadas con agua y papel absorbente, se extendieron en papel periódico y se dejaron secar a temperatura ambiente con aireación y poca cantidad de luz durante dos semanas para luego pulverizarlas.

Se desengrasó las hojas pulverizadas colocándolas en frascos ámbar y cubriéndolas con hexano por 15 días. Se filtró y se volvió a cubrir con hexano por 15 días más. Se volvió a filtrar y se dejó evaporar el hexano restante de las hojas.

Una vez secas las hojas pulverizadas desengrasadas se comenzó la extracción de alcaloides cubriéndolas con metanol y dejando macerar por 15 días. Se filtró y se continuó la extracción mediante el método soxhlet. Se dejó las hojas pulverizadas en reflujo con metanol por 2 horas a 64,5°C. El extracto obtenido se concentró en el rotavapor Heidolph Laborota 4001 a 64,5°C y 50 rpm por una 1 hora. El concentrado se refrigeró a -20°C hasta su utilización.



Figura 2.51 Extracción de alcaloides mediante el método soxhlet y su concentración en el rotavapor

2.5.1.2 Extracto de larvas del gusano de seda

Para esta investigación se utilizaron 4 kilogramos de larvas de gusano de seda correspondientes al tercer día del quinto instar, las cuales fueron enviadas del IASA II de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Se pesaron 100 gramos de larvas para determinar la humedad. Para ello se secaron las larvas en un crisol de porcelana a 50°C por 5 días. El porcentaje de humedad se calculó de acuerdo a los valores de los pesos húmedo y seco. El resto de larvas fueron inmediatamente congeladas a -80°C hasta su utilización.

Las larvas se lavaron con agua destilada a 4°C y se molieron en un mortero. Las larvas trituradas con agua destilada a 4°C fueron homogenizadas en un homogenizador Polytron, Kinematica Inc., modelo PT 10-35 hasta que no se encuentren restos visibles de larvas.



Figura 2.52 Molienda y homogenización de las larvas del gusano se seda

La extracción de alcaloides polihidroxisados se realizó según el procedimiento descrito por Naoki Asano (2001). El homogenizado se mezcló con etanol anhidro hasta alcanzar una concentración 50% de etanol y 50% de agua, de manera que la mezcla final tenga 100 gramos de peso seco de larvas por cada litro de solución etanólica al 50%. La mezcla se dejó en maceración por 72 horas a una temperatura de 4°C.

Se filtró con papel filtro de 75 gramos y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Hettich, modelo Universal 32 R. El sobrenadante se concentró en un rotavapor Heidolph Laborota 4001 a 50° C y 150 rpm, hasta que se evapore el etanol.



Figura 2.5.3 Filtrado y concentración en el rotavapor del extracto de las larvas del gusano de seda

El concentrado se congeló en nitrógeno líquido y se secó en frío en un liofilizador Christ Alpha 1-2 a -46°C y 145×10^{-3} mbar, durante 24 horas. El extracto liofilizado se secó en una estufa a 40°C por una semana.



Figura 2.54 Extractos de hojas de morera y gusanos de seda congelados con nitrógeno líquido y liofilizador Christ Alpha 1-2.

2.5.2 Ensayo en ratones de laboratorio

2.5.2.1 Aplicación de los tratamientos

Para esta investigación se utilizaron 32 ratones *BALB/c* los cuales se obtuvieron del bioterio de la Universidad Central del Ecuador. La edad de los ratones fue de dos meses y su peso promedio 30 g.

Se mantuvo a los ratones durante 12 semanas en jaulas plásticas con rejillas metálicas como techo, con libre acceso a comida (balanceado granulada) y agua, a temperatura ambiente y con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Para la administración de los tratamientos se los dividió en 4 grupos de 8 unidades experimentales (4 machos, 4 hembras), los cuales fueron marcados con ácido pícrico y enumerados.

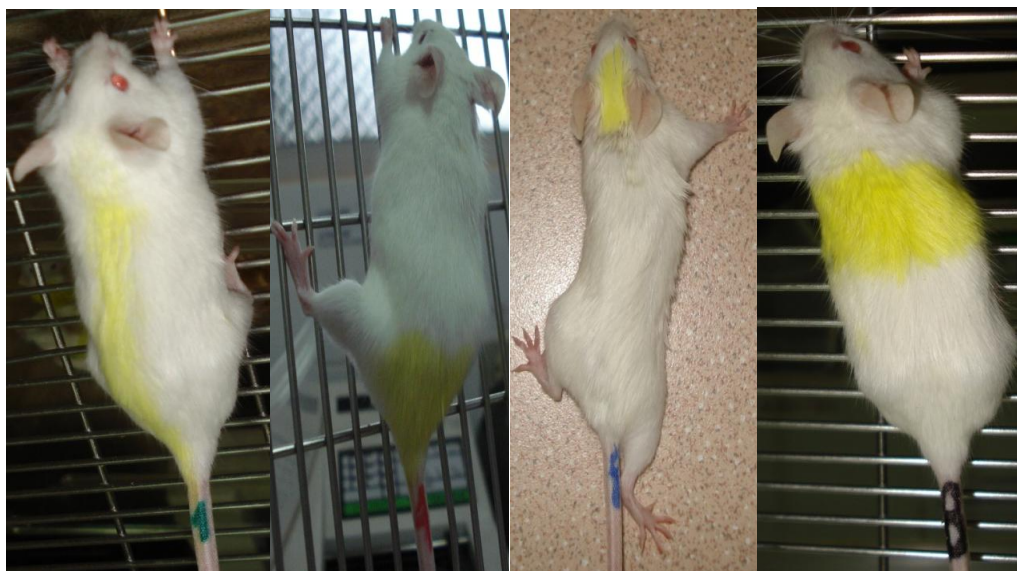


Figura 2.55 Identificación de los ratones: marcas con ácido pícrico y enumerado

Diariamente se administró a cada grupo vía oral 50 μ l de uno los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 1: Agua
- Tratamiento 2: Solución de maltosa (2g de maltosa/ kg de ratón)
- Tratamiento 3: Solución de maltosa + Extracto de larvas de gusano de seda (60mg/ml)
- Tratamiento 4: Solución de maltosa + Extracto de hojas de Morera (12mg/ml)



Figura 2.56 Tratamientos aplicados y su administración a los ratones

2.5.2.2 Pruebas bioquímicas

Cada 2 semanas se tomó muestras de sangre de la cola de cada ratón para lo cual siguiendo el procedimiento descrito por Janet Hoff (2000) se adaptó un tubo plástico de 50 ml como dispositivo de inmovilización. Una vez ubicado correctamente el ratón se cortó 5 mm de la cola con una tijera, la sangre se recogió en tubos capilares heparinizados TECNAN de 75 mm de largo. Finalmente, se cauterizo la herida con un bisturí caliente. Los tubos se centrifugaron a 8000 rmp por 8 minutos en una centrifuga Clay Adams Compact II y se colocó el suero en tubos de 1.5 ml debidamente identificados.



Figura 2.57 Toma de sangre de la cola y el suero obtenido.

2.5.2.2.1 Medición de la glucosa en ayunas

A los ratones se les privó de alimento durante 12 horas antes de la toma de sangre. Una vez cortada la cola se colocó una gota de sangre en las tiras reactivas para la determinación de la glucemia, la cual se midió en un glucómetro Accu Chek Active, Roche, Mannheim, Alemania. El principio del test es la reacción de glucosa deshidrogenasa mediador dependiente de PQQ, que hace que cambie el color de zona reactiva de la tira. El medidor registra este cambio de color y calcula el valor de la glucosa.

2.5.2.2.2 Medición de los triglicéridos

Se midió los triglicéridos utilizando 10 µl de suero mediante el kit triglycerides de Analyticon Biotechnologies, Lichtenfels, Alemania. El método enzimático colorimétrico se basa en la utilización de la lipoproteína lipasa para una rápida y completa hidrólisis de los triglicéridos en glicerol seguida por la oxidación al fosfato dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con el 4-aminofenazona y 4-clorofenol bajo la acción catalítica de la peroxidasa para formar un colorante rojo.

2.5.2.2.3 Medición de la hemoglobina glicosilada

Se midió la hemoglobina glicosilada a la semana 0 y la semana 12, utilizando 100 µl de sangre con heparina mediante el kit Hemoglobin A1, Ion Exchange Batch Method de Biocon Diagnostik, Marienhagen, Alemania. El método colorimétrico se basa en mezclar la sangre total con un reactivo de lisis que contiene un detergente y una alta concentración de iones borato para eliminar la base de Schiff. El hemolizado se coloca en una resina de intercambio catiónico para separar la glicohemoglobina, fracción rápida de la hemoglobina, de la hemoglobina no glicosilada que se une a la resina. Se separa el sobrenadante en el que se encuentra la glicohemoglobina.

2.5.2.2.4 Medición de la insulina

Se midió la insulina a la semana 0 y la semana 12, utilizando 50 µl de suero mediante el kit Accu-Bind de Monobind Inc., Lake Forest CA, USA. En el método inmunoenzimométrico la enzima conjugada e inmovilizada en la superficie de la microplaca interacciona con la estreptavidina que cubre la placa y el anticuerpo biotinilado monoclonal de insulina que es añadido. Se produce una reacción en la que se mezcla el anticuerpo monoclonal biotinilado, la enzima- anticuerpo marcado y el suero que contiene el antígeno nativo, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo sándwich soluble. Una vez alcanzado el equilibrio, la fracción del anticuerpo unido se separa del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática en

la fracción del anticuerpo unido es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo.

2.5.3 Técnicas Moleculares

2.5.3.1 Extracción de ARN

Una vez finalizada la administración de los tratamientos se sacrificó a los ratones mediante la inhalación de éter. Inmediatamente se extrajo el hígado, se pesó y congeló en hielo seco hasta su utilización.

Se realizó la extracción de ARN total usando el reactivo TRIzol® LS de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, y 100 mg de hígado de ratón. El método se basa en una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Durante la homogenización el TRIzol® LS mantiene la integridad del ARN mientras se rompe a la célula y disuelve sus componentes. La adición de cloroformo seguida de una centrifugación separa la solución en una fase acuosa y una orgánica. El ARN se mantiene exclusivamente en la fase acuosa y es recuperado mediante precipitación con isopropanol.

2.5.3.2 Transcripción Reversa

Utilizando una gota del ARN extraído en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 de Thermo Scientific, Wilmington, MN, USA, se cuantificó y se determinó el radio A_{260}/A_{280} .

Una vez determinada la cantidad de ARN (ng/ul) se utilizó DNasa I de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA, para eliminar el ADN, ya que ésta digiere las cadenas simples y dobles de ADN a oligodeoxy-ribonucleótidos que contienen un 5' fosfato.

Se realizó la transcripción reversa usando el kit Reverse Transcription System de Promega, Madison, WI, USA, con 1 ug del ARN purificado. La reacción se realizó en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler de MJ Research, Ramsey, MN, USA. Se utilizó ARN poliadenilado de 1.2kb como control positivo.

2.5.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR)

El cADN que se obtuvo del procedimiento anterior se utilizó para PCR. Para ello se utilizaron 4 pares de primers: 2 para PPARs (PPAR- α , PPAR- γ), 1 para LPL y el restante para β -actina como control positivo. Las secuencias de los primers se obtuvieron del estudio realizado por Park et al., (2005) siendo estos específicos para los sitios a analizar. Los primers fueron sintetizados por de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

La secuencia de los primers es la siguiente:

β -Actina

Forward: 5`GAG CTA TGA GCT GCC TGA CG 3`

Reverse: 5`AGT TTC ATG GAT GCC ACA GGA 3`

PPAR- α

Forward: 5`CCT CTT CCC AAA GCT CCT TCA 3`

Reverse: 5`CGT CGG ACT CGG TCT TCT TG 3`

PPAR- γ

Forward: 5`GGT TGA ACA AGA GAT GCC ATT CT 3`

Reverse: 5`AAT GCG AGT GGT CTT CCA TCA 3`

LPL

Forward: 5`CGC TCC ATT CAT CTC TTC A 3`

Reverse: 5`CTT GTT GAT CTC ATA GCC CA 3`

Para la reacción de PCR se utilizó el Go Taq Green Master Mix de Promega, Madison, WI, USA, el cual contiene Go Taq (ADN polimerasa), DNTPs y MgCl₂ en concentraciones estandarizadas.

Para cada muestra se preparó un tubo de reacción con las cantidades indicadas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.51 Cantidades y reactivos usados en la PCR de los PPARs

Reactivo	Cantidad
GoTaq Green Master Mix 2X	6,25 ul
Primer Forward 100 uM	0,5 ul
Primer Reverse 100 uM	0,5 ul
cADN	2 ul
Agua libre de nucleasas	3,25 ul
Volumen Final	12,5

El procedimiento de amplificación se realizó en el termociclador PTC-100 Peltier Thermal Cycler de MJ Research, con las condiciones indicadas en la Tabla 2.2.

Tabla 2.52 Condiciones de la PCR para la β -actina

Temperatura	Tiempo	
95 °C	2 minutos	
Inicialización		
95 °C	30 segundos	30 ciclos
Desnaturalización		
56 °C	30 segundos	
Alineamiento		
72 °C	30 segundos	
Extensión		
72 °C	10 minutos	
Extensión final		
4 °C	Hasta analizar los productos en gel de agarosa	

Se utilizaron las mismas condiciones de PCR (número de ciclos y temperaturas) para los primers PPAR- α y LPL, a excepción de la temperatura de alineamiento que fue específica para cada par de primers (58°C y 52°C, respectivamente).

Para el PPAR- γ se realizó PCRs anidadas (dos PCR seguidas). En la primera PCR se preparo un tubo de reacción utilizando las cantidades indicadas en la Tabla 2.3.

Tabla 2.53 Cantidades y reactivos usados en la primera PCR del PPAR- γ

Reactivo	Cantidad
GoTaq Green Master Mix 2X	6,25 ul
Primer Forward 100 uM	0,5 ul
Primer Reverse 100 uM	0,5 ul
cADN	2 ul
Agua libre de nucleasas	2,25 ul
MgCl ₂ 50mM	1 ul
Volumen Final	12,5

En la segunda reacción de PCR se utilizaron los reactivos en las cantidades que se indican en la Tabla 2.4.

Tabla 2.54 Cantidades y reactivos usados en la segunda PCR del PPAR- γ

Reactivo	Cantidad
GoTaq Green Master Mix 2X	6,25 ul
Primer Forward 100 uM	0,5 ul
Primer Reverse 100 uM	0,5 ul
Producto de la primera PCR	2 ul
Agua libre de nucleasas	3,25 ul
Volumen Final	12,5

Las condiciones de amplificación fueron idénticas en ambas PCR (Tabla 2.5).

Tabla 2.55 Condiciones utilizadas para la PCR anidada del PPAR- γ

Temperatura	Tiempo	
95 °C Inicialización	2 minutos	
95 °C Desnaturalización	30 segundos	30 ciclos
58 °C Alineamiento	30 segundos	
72 °C Extensión	30 segundos	
72 °C Extensión final	10 minutos	
4 °C	Hasta analizar los productos en gel de agarosa	

2.5.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar las bandas de los genes amplificados se preparó un gel de agarosa al 2% en TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X con SybrGreen (1ul/10ml). En una cámara de electroforesis horizontal se colocó 2ul de cada muestra (producto del PCR) y se dejó migrar en TAE 1X a 80 voltios por 50 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA Ladder de 250ul (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Para visualizar las bandas se utilizó una cámara de luz ultravioleta UV Transilluminator BioDoc-it Imaging System de UVP, Upland, CA, USA.

2.5.3.5 Análisis de datos

Los datos de los niveles de glucosa en ayunas, triglicéridos, hemoglobina glicosilada e insulina en la sangre se analizaron mediante los paquetes de software libres InfoStat v. 2010l y R v. 2.11.0, en el que se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de rangos múltiples de Tukey para un modelo lineal mixto y para determinar las diferencias significativas entre los diferentes tratamientos administrados y el sexo de los ratones. Se consideró un nivel de significación α del 5%.

Los geles de agarosa se analizaron en el programa ImageJ 1.43u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Nivel de glucosa en ayunas

El gráfico de medias del nivel de glucosa en ayunas, en mg/dl, respecto a los tratamientos administrados a los ratones se presenta en la Figura 3.1. El tratamiento de maltosa + ELGS tiene un mayor efecto hipoglicemiante que el tratamiento de maltosa + EHM. El tratamiento con maltosa sola muestra el menor efecto hipoglicemiante.

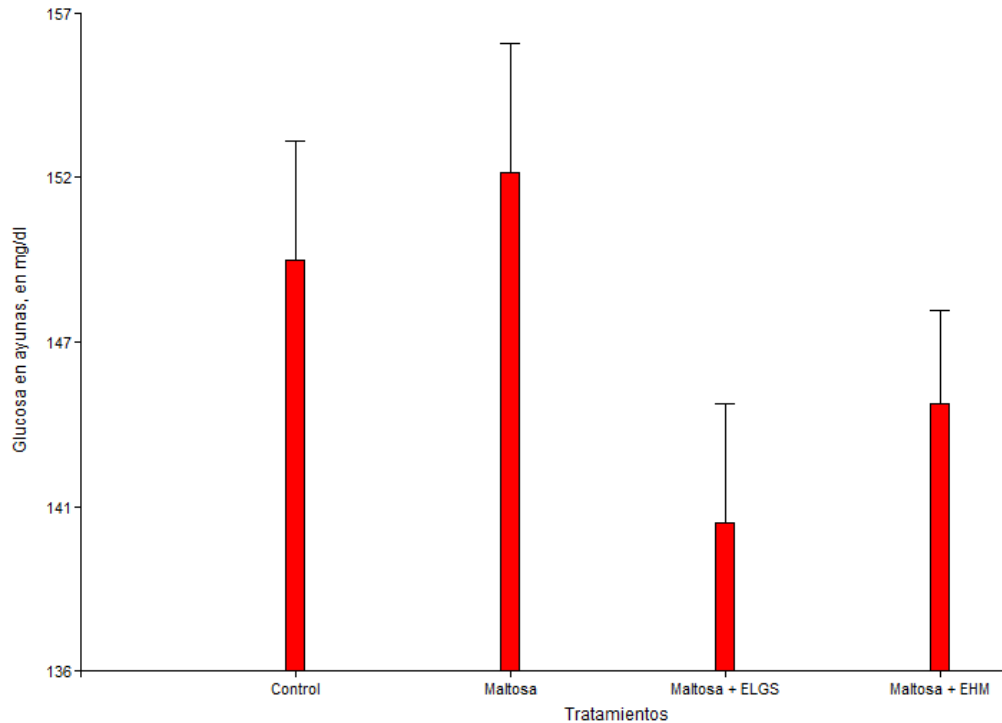


Figura 3.1 Nivel de glucosa en ayunas (mg/dl) respecto a los tratamientos administrados

En la Figura 3.2 se presenta una comparación entre las medias de machos y hembras para los diferentes tratamientos administrados. El tratamiento de maltosa + ELGS disminuye más el nivel de glucosa con relación al tratamiento de EHM en ambos géneros, sin embargo, en los machos se observa una mayor disminución.

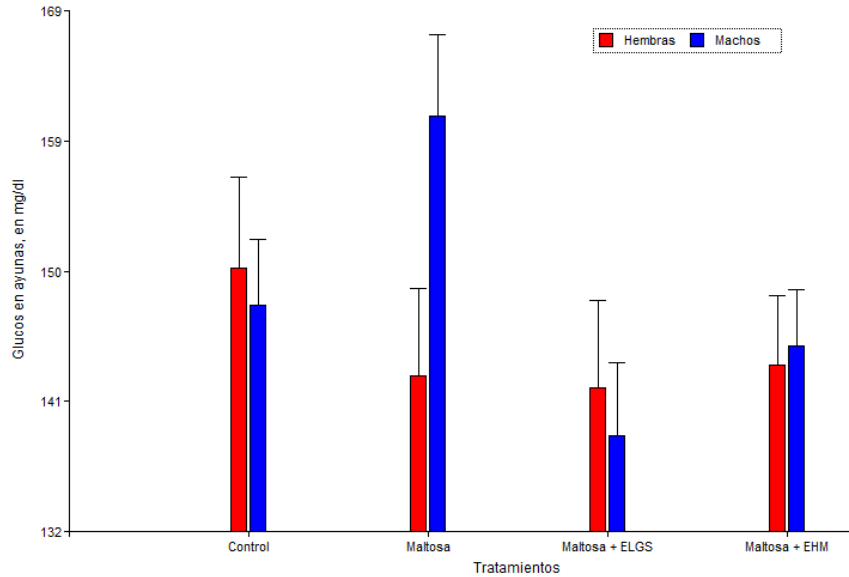


Figura 3.2 Nivel de glucosa en ayunas (mg/dl) respecto al género de los ratones

En el análisis de varianza que se muestra en la Tabla 3.1, se puede observar el valor de p para los diferentes tratamientos administrados (0,145) y para género (0,375). Los estadísticos descriptivos se presentan en el Anexo C.

Tabla 3.1 Tabla ANOVA para el nivel de glucosa en ayunas, en mg/dl

<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>MC</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Medicamento</i>	4396,964	3	1465,655	1,816286	0,145
<i>Género</i>	637,875	1	637,875	0,790475	0,375
<i>Medicamento * Género</i>	4204,946	3	1401,649	1,736967	0,160
<i>Error</i>	174301,6	216	806,9517		
<i>Total</i>	183541,4	223			

En la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para los tratamientos administrados (Tabla 3.2) se obtuvo un subconjunto, lo cual confirma los resultados de la Tabla ANOVA y en especial del valor p .

Tabla 3.2 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con p 0,05

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto</i>
		1
Maltosa + ELGS	56	140,64
Maltosa + EHM	56	144,59
Control	56	149,34
Maltosa	56	152,21
Significación		,139

3.2 Nivel de triglicéridos

El gráfico de medias del nivel de triglicéridos en la sangre, en mg/dl, respecto a los tratamientos administrados a los ratones se presenta en la Figura 3.3. El tratamiento de maltosa + ELGS disminuye más el nivel de triglicéridos con respecto al tratamiento de maltosa + EHM. El tratamiento de maltosa sola muestra menor disminución en los niveles de triglicéridos.

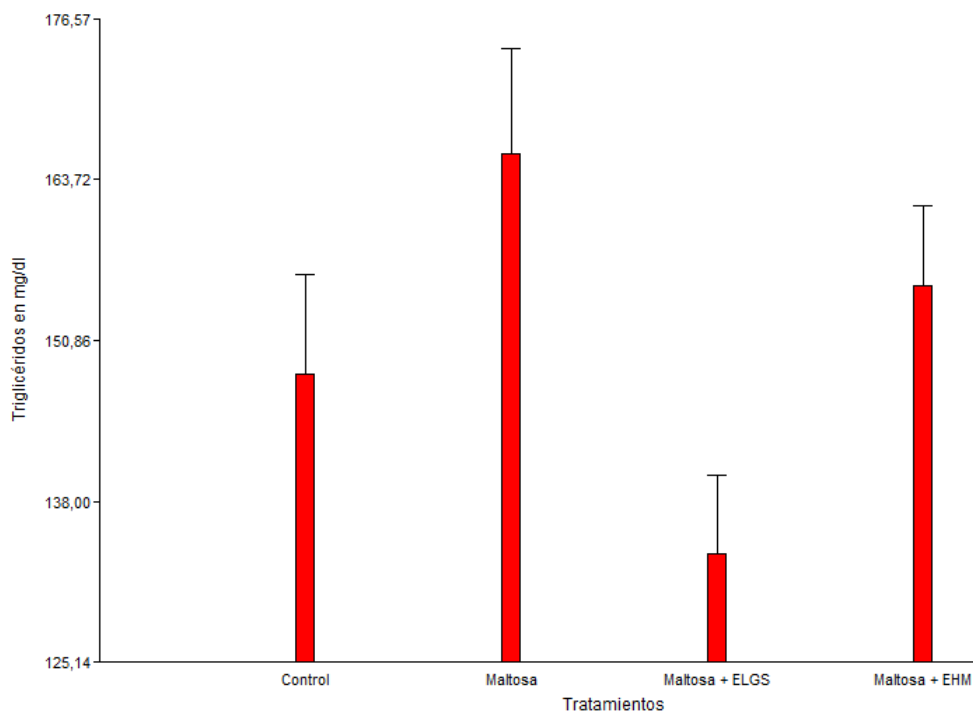


Figura 3.3 Nivel de triglicéridos (mg/dl) respecto a los tratamientos administrados

En la Figura 3.4 se presenta una comparación entre las medias de los niveles de triglicéridos en machos y hembras para los diferentes tratamientos administrados. El tratamiento de maltosa + ELGS disminuye más los niveles de triglicéridos con relación al tratamiento de maltosa + EHM en ambos géneros, sin embargo, en las hembras se observa una mayor disminución.

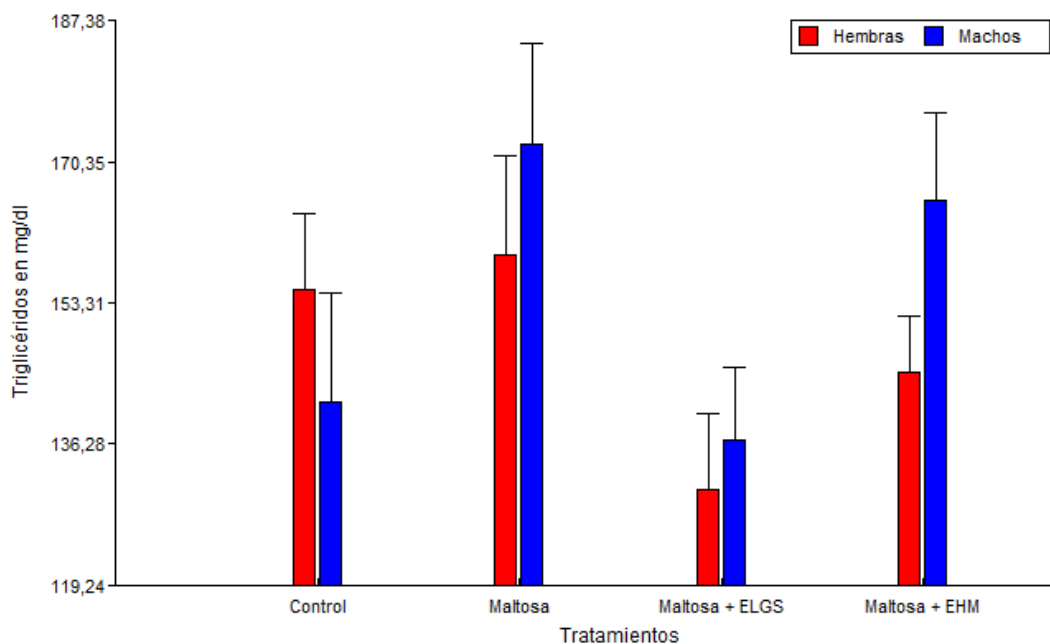


Figura 3.4 Nivel de triglicéridos (mg/dl) respecto al género de los ratones

En el análisis de varianza que se muestra en la Tabla 3.3, se puede observar el valor de p para los diferentes tratamientos (0,019) y para género (0,370). Los estadísticos descriptivos se presentan en el Anexo D.

Tabla 3.3 Tabla ANOVA para el nivel de triglicéridos (mg/dl) en la sangre

<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>MC</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Medicamento</i>	30392,6	3	10130,87	3,367457	0,019
<i>Género</i>	2423,743	1	2423,743	0,805642	0,370
<i>Medicamento * Género</i>	9131,313	3	3043,771	1,011737	0,388
<i>Error</i>	649827,9	216	3008,462		
<i>Total</i>	691775,5	223			

En la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para los tratamientos administrados (Tabla 3.4) se obtuvieron dos subconjuntos, lo cual confirma los resultados de la Tabla ANOVA y en especial del valor p .

Tabla 3.4 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con p 0,05

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto</i>	
		1	2
Maltosa + ELGS	56	133,7591	
Control	56	148,1409	148,1409
Maltosa + EHM	56	155,2823	155,2823
Maltosa	56		165,8061
Significación		,164	,324

3.3 Nivel de hemoglobina glicosilada

El gráfico de medias del nivel de hemoglobina glicosilada respecto a los tratamientos administrados a los ratones se presenta en la Figura 3.5. El tratamiento de maltosa + ELGS disminuye más el nivel de hemoglobina glicosilada con respecto al tratamiento de maltosa + EHM. El tratamiento de maltosa sola tiene el nivel más elevado.

En la Figura 3.6 se presentan una comparación entre las medias de los valores de hemoglobina glicosilada para machos y hembras según los diferentes tratamientos administrados. El tratamiento con maltosa + ELGS disminuye más el nivel de hemoglobina glicosilada con relación al tratamiento de maltosa + EHM en ambos géneros, sin embargo, en los machos se observa una mayor disminución.

En el análisis de varianza que se muestra en la Tabla 3.5, se puede observar el valor de p para los diferentes tratamientos administrados a los ratones (0,101) y género (0,707). Los estadísticos descriptivos se presentan en el Anexo E.

En la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para los tratamientos administrados (Tabla 3.6) se obtuvo un subconjunto, lo cual confirma los resultados de la Tabla ANOVA y en especial del valor p .

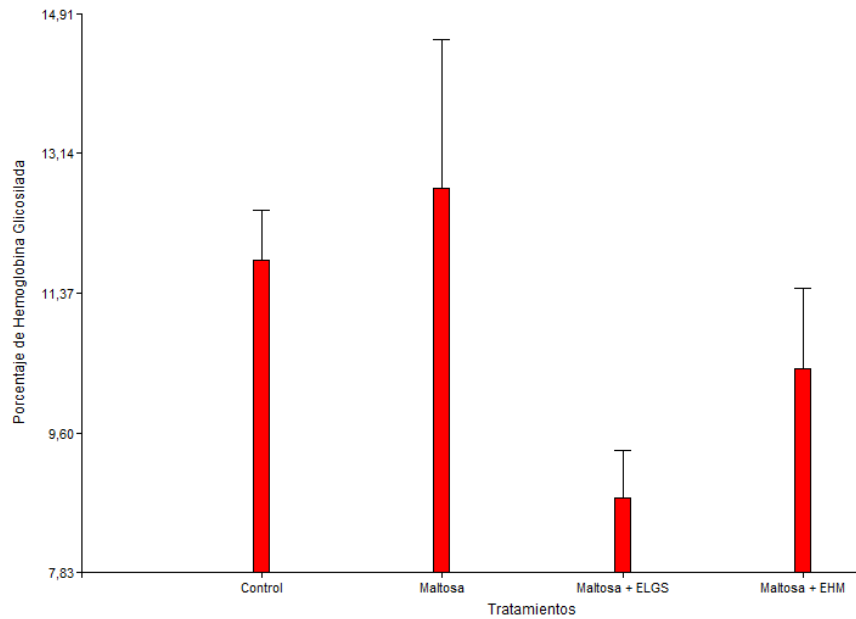


Figura 3.5 Porcentaje de hemoglobina glicosilada respecto a los tratamientos administrados

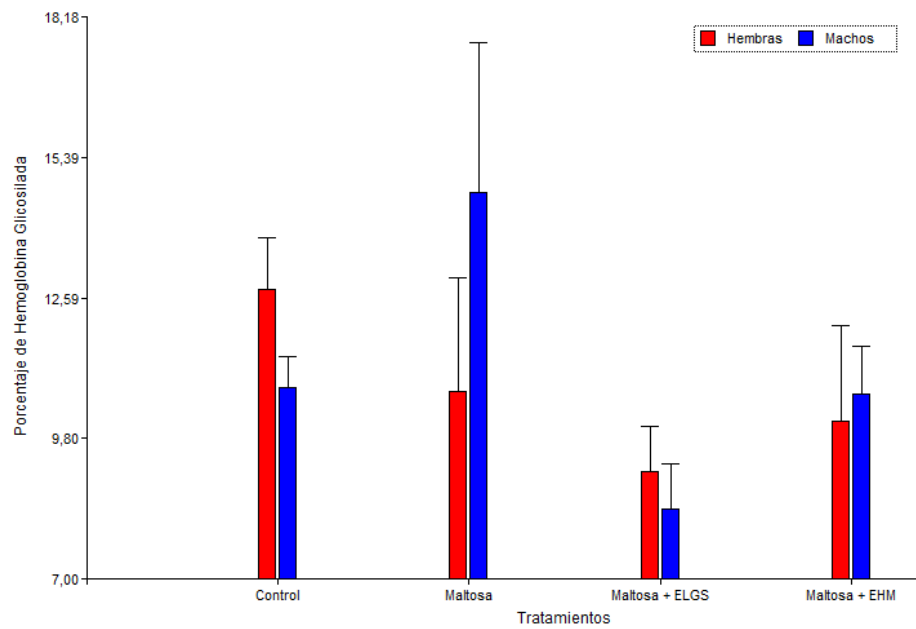


Figura 3.6 Porcentaje de hemoglobina glicosilada respecto al género de los ratones

Tabla 3.5 Tabla ANOVA para el nivel de hemoglobina glicosilada en la sangre

<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>MC</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Medicamento</i>	141,2175	3	47,07251	2,177722	0,101
<i>Género</i>	3,163952	1	3,163952	0,146374	0,703
<i>Medicamento * Género</i>	77,77408	3	25,92469	1,199358	0,318
<i>Error</i>	1210,467	56	21,61548		
<i>Total</i>	1432,623	63			

Tabla 3.6 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con $p < 0,05$

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto</i>
		1
Maltosa+ELGS	16	8,7663
Maltosa+EHM	16	10,4113
Control	16	11,7894
Maltosa	16	12,7013
Significación		,090

3.4 Nivel de insulina

El gráfico de medias del nivel de insulina, en $\mu\text{U/ml}$, respecto a los tratamientos administrados a los ratones se presenta en la Figura 3.7. El tratamiento de maltosa + ELGS disminuye más el nivel de insulina con relación al tratamiento de maltosa + EHM mientras que el grupo de individuos con tratamiento de maltosa sola muestra los niveles más elevados de insulina.

En la Figura 3.8 se presentan una comparación entre las medias de machos y hembras para los diferentes tratamientos administrados, el tratamiento de maltosa + ELGS disminuye más su nivel con relación al tratamiento de maltosa + EHM en ambos géneros, sin embargo, en las hembras se observa una mayor disminución.

En el análisis de varianza que se muestra en la Tabla 3.7, se puede observar el valor de p para los diferentes tratamientos administrados a los ratones (0,074) y género (0,549). Los estadísticos descriptivos se presentan en el Anexo F.

En la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para los tratamientos administrados (Tabla 3.8) se obtuvo un subconjunto, lo cual confirma los resultados de la Tabla ANOVA y en especial del valor p .

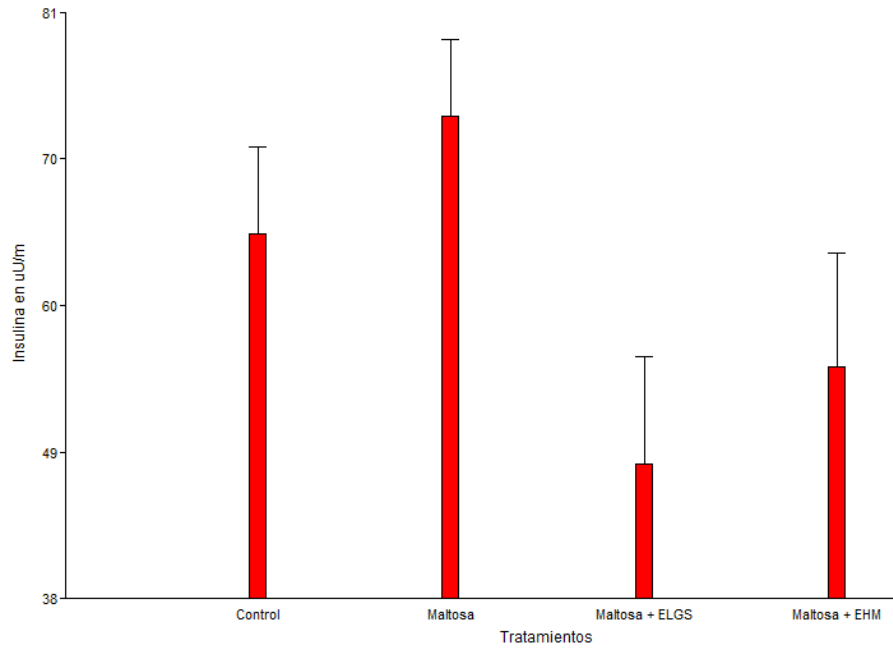


Figura 3.7 Nivel de insulina ($\mu\text{U}/\text{m}$) respecto a los tratamientos administrados

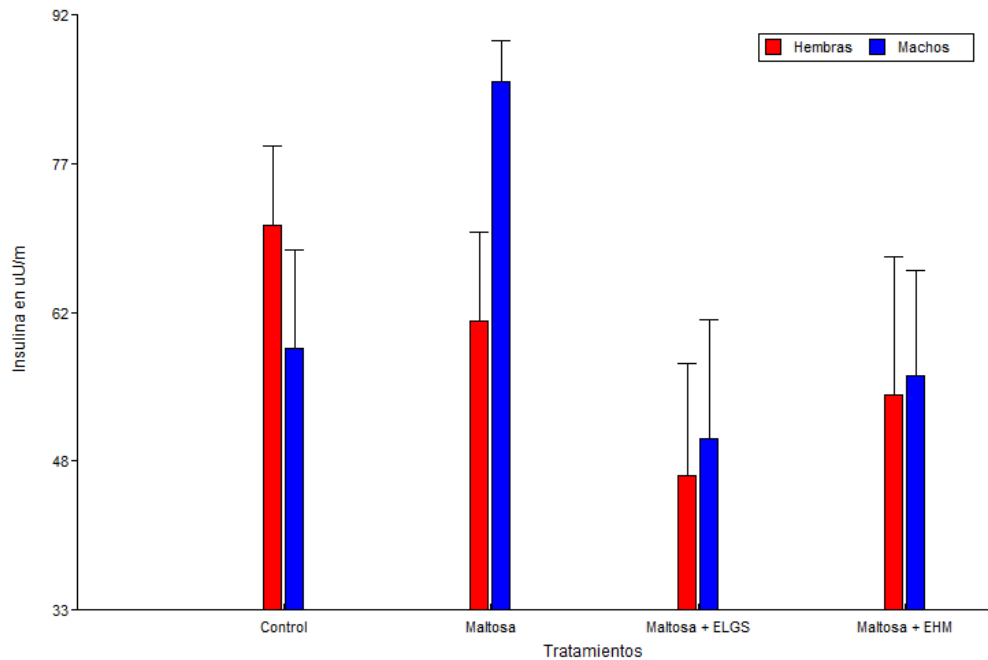


Figura 3.8 Nivel de insulina ($\mu\text{U}/\text{m}$) respecto al género del ratón

Tabla 3.7 Tabla ANOVA para el nivel de insulina en la sangre, en $\mu\text{U/ml}$

<i>Fuente</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>MC</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Medicamento</i>	6083,047	3	2027,682	2,437779	0,074
<i>Género</i>	301,8906	1	301,8906	0,362948	0,549
<i>Medicamento * Género</i>	2686,922	3	895,6406	1,076783	0,366
<i>Error</i>	46579,38	56	831,7746		
<i>Total</i>	55651,23	63			

Tabla 3.8 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey con p 0,05

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto</i>
		1
Maltosa + ELGS	16	47,88
Maltosa + EHM	16	55,13
Control	16	64,94
Maltosa	16	73,63
Significación		,067

3.5 Expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL

En la Figura 3.9 y 3.10 se muestra la expresión del ARNm de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL para los diferentes tratamientos administrados después de realizar la electroforesis en gel de agarosa.

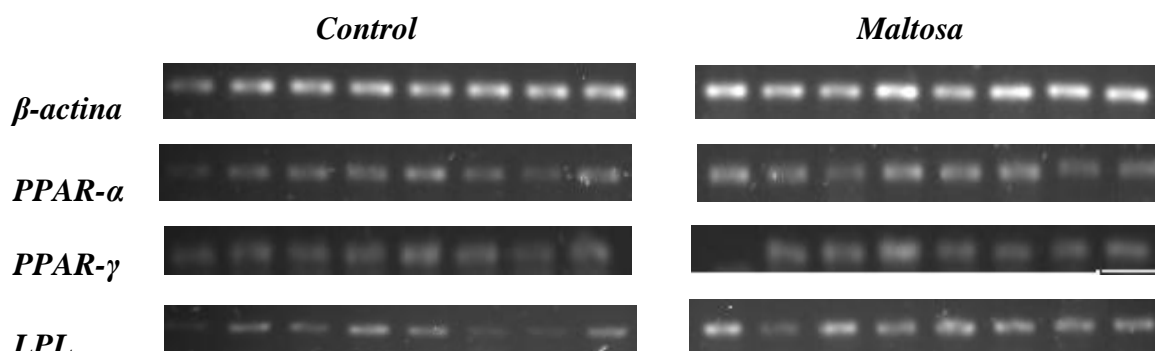


Figura 3.9 Expresión del ARNm de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL para los tratamientos Control y Maltosa.

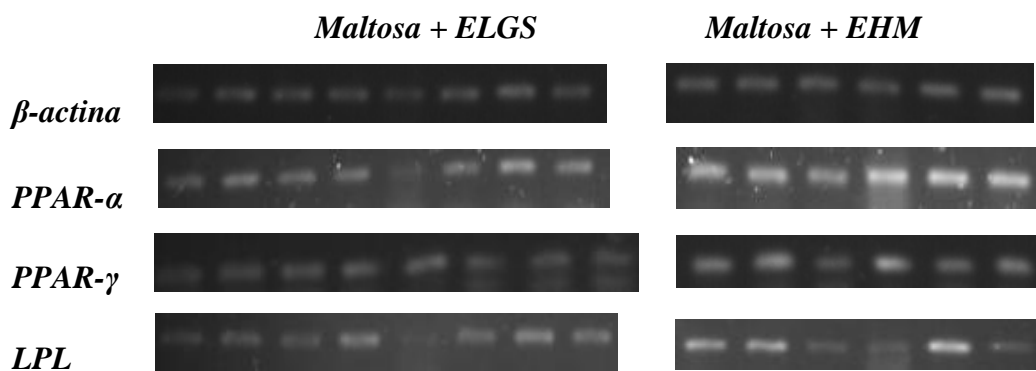


Figura 3.10 Expresión del ARNm de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL para los tratamientos Maltosa + ELGS y Maltosa + EHM

El gráfico de la expresión del ARNm de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL, respecto a los tratamientos administrados a los ratones se presenta en la Figura 3.11. PPAR- γ es el que más se expresa.

En la Figura 3.12 se presenta una comparación entre la expresión del ARNm de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL entre machos y hembras para los diferentes tratamientos administrados. PPAR- γ es el que más se expresa en hembras mientras que en machos es el LPL.

En la Tabla 3.9 se presenta el análisis de varianza para el PPAR- α , PPAR- γ y LPL según los tratamientos administrados y el género de los ratones. Los valores de p para los tratamientos son: 0,997; 0,926 y 0,997; respectivamente mientras que los valores p del género son: 0,996; 0,319; 0,303; respectivamente.

En la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para los tratamientos administrados para el PPAR- α , PPAR- γ y LPL (Tablas 3.10; 3,11 y 3,12; respectivamente) se obtuvo un subconjunto, lo cual confirma los resultados de la Tabla ANOVA y en especial de los valores p .

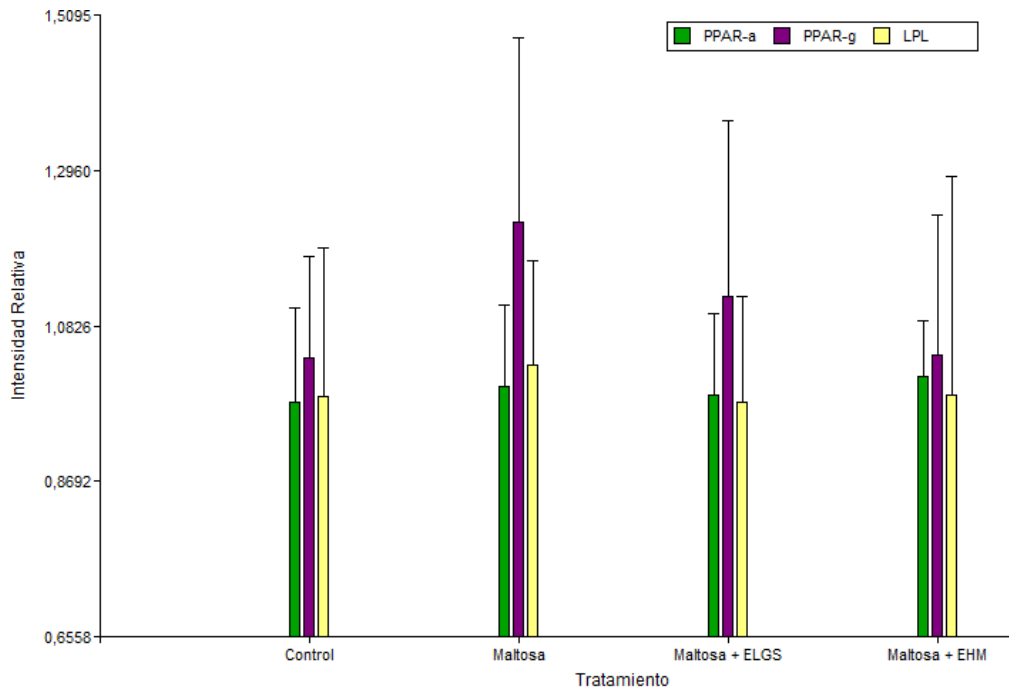


Figura 3.11 Medias de la expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL según los tratamientos administrados

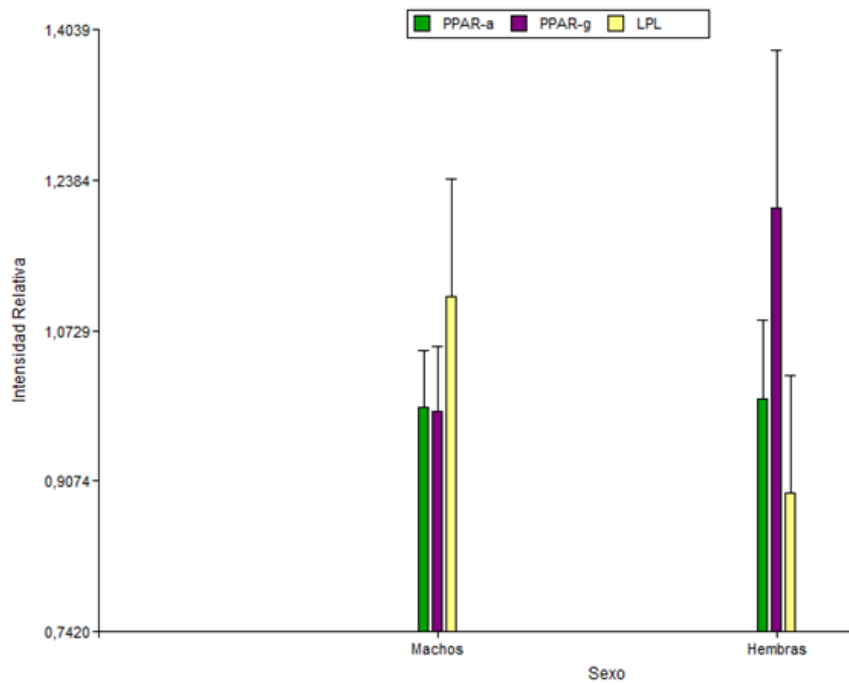


Figura 3.12 Medias de la expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL según el género

Tabla 3.9 Tabla ANOVA para la expresión del ARNm del PPAR- α , PPAR- γ y LPL

<i>Fuente</i>	<i>gl</i>	<i>PPAR-α</i>		<i>PPAR-γ</i>		<i>LPL</i>	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>Tratamiento</i>	3	0,02	0,997	0,15	0,926	0,01	0,997
<i>Género</i>	1	0,0025	0,996	1,04	0,319	1,11	0,303
<i>Tratamiento * Género</i>	3	0,61	0,617	0,45	0,717	0,13	0,94

Tabla 3.10 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para PPAR- α

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto</i>
		1
Control	8	0,98
Maltosa + ELGS	8	0,99
Maltosa	8	1,00
Maltosa + EHM	6	1,01

Tabla 3.11 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para PPAR- γ

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto</i>
		1
Maltosa + EHM	6	1,01
Control	8	1,04
Maltosa + ELGS	8	1,12
Maltosa	8	1,21

Tabla 3.12 Subconjuntos de la Prueba de Rangos Múltiples de Tukey para LPL

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>N</i>	<i>Subconjunto</i>
		1
Maltosa + ELGS	8	0,98
Control	8	0,99
Maltosa + EHM	6	1,02
Maltosa	8	1,03

CAPITULO 4

DISCUSION

A pesar de que la hoja de morera ha sido utilizada exclusivamente para la alimentación de los gusanos de seda, en las últimas décadas su uso se ha extendido de tal manera que hoy en día es apreciada por su fruto, propiedades medicinales e incluso por paisajismo, como un vegetal, además sirve en la alimentación de rumiantes y otros animales. (Zepeda, 1991)

En el campo farmacológico, China y Corea han utilizado la corteza de la raíz del árbol de morera para el tratamiento de la diabetes (Kim et al, 1999). Sin embargo, la reducción de la glucosa sanguínea es sólo una de las propiedades medicinales atribuidas a la morera, otros ejemplos, son la reducción de los niveles del colesterol y lípidos, combate las placas ateromatosas y tiene efectos antiflogístico, diurético, expectorante, hipotensor, antiinflamatorio y antipirético (Andallu y Vardacharyulu, 2001)

En esta investigación se probó la actividad hipoglicemiante de las hojas de morera y larvas del gusano de seda, en base a la expresión de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL en ratones. El estudio se basó en la administración oral de una dieta que contenía carbohidratos (maltosa) y los diferentes extractos (ELGS y EHM) durante 12 semanas.

Se realizaron los exámenes de sangre para la detección de la DM 2: glucosa en ayunas, triglicéridos, insulina y hemoglobina glicosilada (HbA1C), el cual constituye un marcador a largo plazo del nivel de glucosa. Los resultados de la determinación de los niveles de glucosa en ayunas, triglicéridos, insulina y HbA1C no evidenciaron una reducción estadísticamente significativa para los diferentes tratamientos administrados (control, maltosa, maltosa + ELGS, maltosa + EHM), tampoco se evidenciaron diferencias significativas en base al género de los ratones. Sin embargo, se encontró que el tratamiento que contiene el ELGS fue el más efectivo en reducir los niveles de glucosa en ayunas,

HbA1C e insulina. En cuanto al nivel de triglicéridos se demostró una reducción del 13% en el tratamiento con ELGS con respecto al tratamiento con maltosa.

El análisis de expresión del ARNm para el PPAR- α , PPAR- γ y LPL, en el cual se usó como control a la expresión de β -actina, una de las proteínas más abundantes en las células de los tejidos no musculares, muestra que no existió activación de los mismos ya que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa para los diferentes tratamientos aplicados. Sin embargo, el PPAR- γ es el que presenta una mayor expresión, lo que se observó en la reducción significativa del nivel de triglicéridos plasmáticos ya que el PPAR- γ regula la formación de las células grasas y su normal funcionamiento. Adicionalmente, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el género de los ratones y los niveles de expresión de los genes investigados, este resultado era esperado debido a que el mecanismo de acción de estas proteínas es el mismo en hombres y mujeres.

El estudio realizado muestra que EHM no actúa como PPARs agonista (compuestos que estimulan la activación de los PPARs) debido a que no hubo disminución significativa en los niveles de glucosa en ayunas, triglicéridos, HbA1C e insulina. Mientras que ELGS puede actuar como agonista del PPAR- γ por la disminución del nivel de triglicéridos (13%), sin embargo, esta reducción no se observó en el nivel de glucosa debido a la relación indirecta que existe entre el metabolismo lípidico y la regulación de la glucosa.

La activación farmacológica del PPAR- γ en el tejido adiposo mejora su habilidad de almacenar lípidos mediante la reducción de la lipotoxicidad (acumulación anormal de triglicéridos y acil-CoA en el músculo e hígado que resulta en resistencia a la insulina), activa genes que codifican moléculas que promueven una combinación entre el almacenamiento de lípidos y la lipogénesis, como la LPL, lo que causa una redistribución de los lípidos en todo el cuerpo, aumentando el contenido de triglicéridos en el tejido adiposo y reduciendo los ácidos grasos libres y triglicéridos de la circulación, hígado y músculo, mejorando a su vez la sensibilidad a la insulina. Adicionalmente, los PPAR

regulan la liberación de moléculas de señalización de la grasa, inhiben la expresión de TNF- α y la resistina, los cuales promueven la resistencia a la insulina. Por último, estimulan la producción de adiponectina, la cual promueve la oxidación de los ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina en los músculos e hígado. Como resultado, la producción hepática de glucosa se reduce y la utilización de la glucosa por parte de los músculos aumenta.

Los PPAR- α agonistas disminuyen los triglicéridos en el plasma, reducen la adiposidad y disminuyen la esteatosis hepática y muscular, por lo tanto mejoran la sensibilidad a la insulina.

Los resultados obtenidos se explican debido a que los ratones utilizados en la investigación no fueron diabéticos por lo que pudo haber una disminución de los niveles de glucosa e insulina después de la administración de los extractos. Sin embargo, al tratarse de ratones sanos se activó el mecanismo compensatorio que reguló los niveles de glucosa en la sangre. Adicionalmente, la administración de los extractos conjuntamente con la maltosa posiblemente no permitió la acción de éstos. Se pudo observar, sin embargo, que el tratamiento con ELGS disminuye más los niveles de glucosa que el tratamiento con EHM, así como también los niveles de insulina, Hb1AC y triglicéridos. Ello se explica que al alimentarse exclusivamente de las hojas de morera, el gusano de seda acumula en su cuerpo más alcaloides que los contenidos en las hojas.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

- Existe una relación indirecta entre los niveles de glucosa sanguínea y la regulación del metabolismo de los lípidos mediado por los PPAR- α , PPAR- γ y LPL, los PPARs estimulan la sensibilidad a la insulina en el hígado y músculo mediante la regulación de la oxidación de los ácidos grasos e inhibición la expresión de genes vinculados a la lipogénesis. Mientras que la expresión de la LPL también ayuda a la sensibilidad a la insulina pero en tejidos no adiposos.
- El extracto de las hojas de morera no actúa como agonista para el PPAR- α y PPAR- γ debido que no hubo una reducción significativa en los niveles de glucosa en ayunas, insulina, triglicéridos y hemoglobina glicosilada.
- El extracto de larvas de gusano de seda puede actuar como agonista del PPAR- γ debido a que reduce el nivel de triglicéridos de manera favorable.
- El género de los ratones no influye en la reducción de los niveles de glucosa en ayunas, triglicéridos, insulina y hemoglobina glicosilada ni en la expresión de los PPAR- α , PPAR- γ y LPL.
- El extracto de larvas de gusano de seda fue más efectivo en reducir los niveles de glucosa en ayunas, triglicéridos HbA1C e insulina en comparación con el extracto de hojas de morera.
- La HbA1c es un indicador crónico en la detección de la DM 2 debido a que es la concentración promedio de la glucosa en la sangre durante las semanas anteriores y no se ve afectada por la dieta, la insulina o ejercicio.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

- Seguir investigando las propiedades hipoglicemiantes de los extractos de las hojas de morera y las larvas de gusano de seda en ratones diabéticos y administrando exclusivamente los extractos sin carbohidratos.
- Estudiar los efectos de los extractos de las larvas de gusano de seda y las hojas de morera como una medicina preventiva para pacientes con alto grado de probabilidades de tener diabetes.
- Encontrar un método más eficiente para la preparación de los extractos, el cual garantice su pureza y permita la conservación de los alcaloides y demás metabolitos que pueden tener propiedades medicinales.
- Investigar el nivel de expresión de los PPAR con la administración de los extractos no solo en el hígado sino también en el tejido adiposo debido a que este se encuentra involucrado en la homeostasis de la glucosa y es blanco en la acción de los PPAR.
- Incentivar el estudio de las propiedades medicinales de las hojas de morera y el gusano de seda a fin de poder explotar todos sus beneficios y no solo utilizarlos en el área de la sericultura.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFIA

- American Diabetes Association. (1995) The pharmacological treatment of hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes Care*; vol. 18 no. 11, 1510-1518
- American Diabetes Association, (2009) Type 2 Diabetes.
<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/type-2/>
- American Diabetes Association, (2009) Standards of Medical Care in Diabetes-2009. *Diabetes Care*; Volume 32, Supplement 1, S13-S61.
- Andallu B, Vardacharyulu NC. (2001) Effect of Mulberry leaves on diabetes. *Int J Diab Dev Ctries*; 21: 147-51.
- Asano Naoki, Yamashita Toru, Yasuda Kayo, Ikeda Kyoko, Kizu Haruhisa, Kameda Yukihiro, Kato Atsushi, Nash Robert J., Heui Lee Sam, and Sun Ryu Kang, (2001) Polyhydroxylated Alkaloids Isolated from Mulberry Trees (*Morus alba* L.) and Silkworms (*Bombyx mori* L.). *J. Agric. Food Chem.*; 49 (9), 4208-4213.
- Asociación Latinoamericana de diabetes (ALAD), (2006). Guías de diagnóstico, control y tratamiento de la Diabetes Mellitus tipo 2. Volumen XIV - N°4.

- Balasubramanyam M. and Mohan V. (2000) Current concepts of PPAR- γ in signaling in diabetes mellitus. *Current Science*; Vol. 79, No. 10 November
- Berger Joel and Moller David, (2002). The mechanism of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.*; 53:409–35
- Berger Joel P., Akiyama Taro E., Meinke Peter T., (2005) PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends in Pharmacological Sciences*; Vol.26 No.5 May
- Boyer Rodney (2000). Conceptos de bioquímica. International Thomson Editores, S.A. México.
- Canova Carlos, Castañeda Omar, Coloma Emmanuel, Cruzado Rubén, Díaz Edgar, (2002) Resistencia a la Insulina. *Revista Peruana de Endocrinología y Metabolismo* 5 (1-2): 23-32
- Chen, F.-J., Nakashima, N., Kimura, I., Kimura, M., (1995). Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium Mori*) and *Cortex Mori radices* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Yakugaku Zasshi* 115, 476–482.
- Dean Laura and McEntyre Jo (2004). The Genetic Landscape of Diabetes. National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1667/>

- DeFronzo RA, (1999) Pharmacological therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.*; 131: 281-303.
- Federación Internacional de Diabetes, (2004) Combate la obesidad, Prevén la diabetes.
- Garcia de los Rios, M; Mujica, V; Munoz, S; Durruty, P; Larenas, G; Lopez, M I; Kuzmanic, A; Perez, J; Flaskamp, R; Cumsille, F. (1997) Experiencia clínica con un inhibidor de la alfa glucosidasa (acarbosa) en el tratamiento de la diabetes no insulino dependiente. Estudio multicentrico. *Rev Med Chil.* Aug; 125(8):856-62.
- Gavin III James R , Alberti K , Davidson Mayer, DeFronzo Ralph, et al (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; Jul 1997. Vol. 20, Iss. 7; pg. 1183
- Hernández Herrera Juan Manuel (2008) Uso de las tiazolidinedionas en pacientes diabéticos tipo 2. (Revisión bibliográfica). *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica.* LXV (582) 53-58
- Hervas H. (2002). *Diabetes Mellitus: La gran epidemia de nuestro siglo.* Ecuador: Segunda Edición
- Hikino, H.; Mizuno, T.; Oshima, Y.; Konno, C. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of moran A, a glycoprotein of *Morus alba* root barks. *Planta Med.*; 51, 159-160.

- Hoff Janet (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal*; Vol. 29 No. 10, 47-53.
- Kim Eun-Sun, Park Sung-Jean, Lee Eun-Ju, Kim Bak-Kwang, Huh Hoon and Lee Bong-Jin (1999). Purification and Characterization of Moran 20K from *Morus alba*. *Arch Pharm Res.*; Vol 22, No 1, 9-12.
- Kimura, M.; Chen, F.-J.; Nakashima, N.; Kimura, I.; Asano, N.; Koya, S. (1995) Antihyperglycemic effects of *N* containing sugars derived from mulberry leaves in streptozocin-induced diabetic mice. *J.Trad. Med.*; 12, 214-219.
- Kimura Toshiyuki, Nakagawa Kiyotaka, Saito Yuko, Yamagishi Kenji, Suzukia Masahiro, Yamaki Kohji, Shinmoto Hiroshi and Miyazawa Teruo (2004). Simple and rapid determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves. *BioFactors*; 22, 341–345.
- King Michael W. (2010), Hemoglobin and Myoglobin, The Medical Biochemistry Page.
- Lehninger Albert, (1980), Bioquímica: Bases moleculares de la estructura y función celular, Segunda edición, Editorial Pueblo y Educación, La Habana.
- Lenhard J.M., Gottschalk W.K., (2002) Preclinical development in type 2 diabetes. *Advance Drug Delivery Reviews*; 54, 1199-1212.

- Lim Wai Yen Alfred, Chia Yoke Yin, Liong Shih Yeen, Ton So Ha, Kadir Khalid Abdul, and Syed Husain Sharifah Noor Akmal (2009) Lipoprotein lipase expression, serum lipid and tissue lipid deposition in orally-administered glycyrrhizic acid-treated rats. *Lipids in Health and Disease*; 8:31.
- Mead James R., Irvine Scott A., Ramji Dipak P. (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 80:753-769.
- Mesa García M. D., Aguilera García C. M., Gil Hernández A. (2006). Importancia de los lípidos en el tratamiento nutricional de las patologías de base inflamatoria. *Nutr. Hosp.*; 21 (Supl. 2) 30-43)
- Ministerios de Salud (MINSAL) – Gobierno de Chile, (2006), Guía Clínica: Diabetes Mellitus tipo 2.
- Morrison Robert Thornton & Boyd Robert Neilson, (1998), Química Orgánica, Quinta edición, Pearson Education- Addison Wesley Longman, México.
- Murphy Gregory J. and Holder Julie C., (2000). PPAR γ agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*; Volume 21, Issue 12, December, Pages 469-474.
- Nomura, T., (1988) Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; vol. 53. pp. 87–201.

- Orci Lelio Orci, Ravazzola Mariella, Amherdt Mylene, Madsen Ole, Perrelet Alain, Vassalli Jean-Dominique, Anderson Richard G. W., (1986), Conversion of Proinsulin to Insulin Occurs Coordinately with Acidification of Maturing Secretory Vesicles. *The Journal of Cell Biology*, Volume 103 (No. 6, Pt. 1), 2273-2281.
- Organización Mundial de la Salud. (1999) Definition, diagnostic, and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnostic and classification on diabetes mellitus.
- Organización Mundial de la Salud. (2009). Nota descriptiva No. 312 Noviembre 2009.
- Park Mi-Young, Lee Kwan- Seung, Sung Mi-Kyung, (2005), Effect of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- α , PPAR- γ , and LPL mRNA expressions. *Life Sciences*; 77, 3344–3354.
- Parra Sergio y Mejía Luis Carlos, (2001). REVISIÓN DE TEMA: Implicaciones farmacológicas de los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPAR). IATREIA/VOL 14/No.1/ MARZO.
- Pelicano, A. Mareggiani, G. Plante, E. Zamuner, N. & Carrizo P. (2003) Calidad de hojas de Morera y su influencia en la cría del gusano de Seda, *Bombyx mori*.

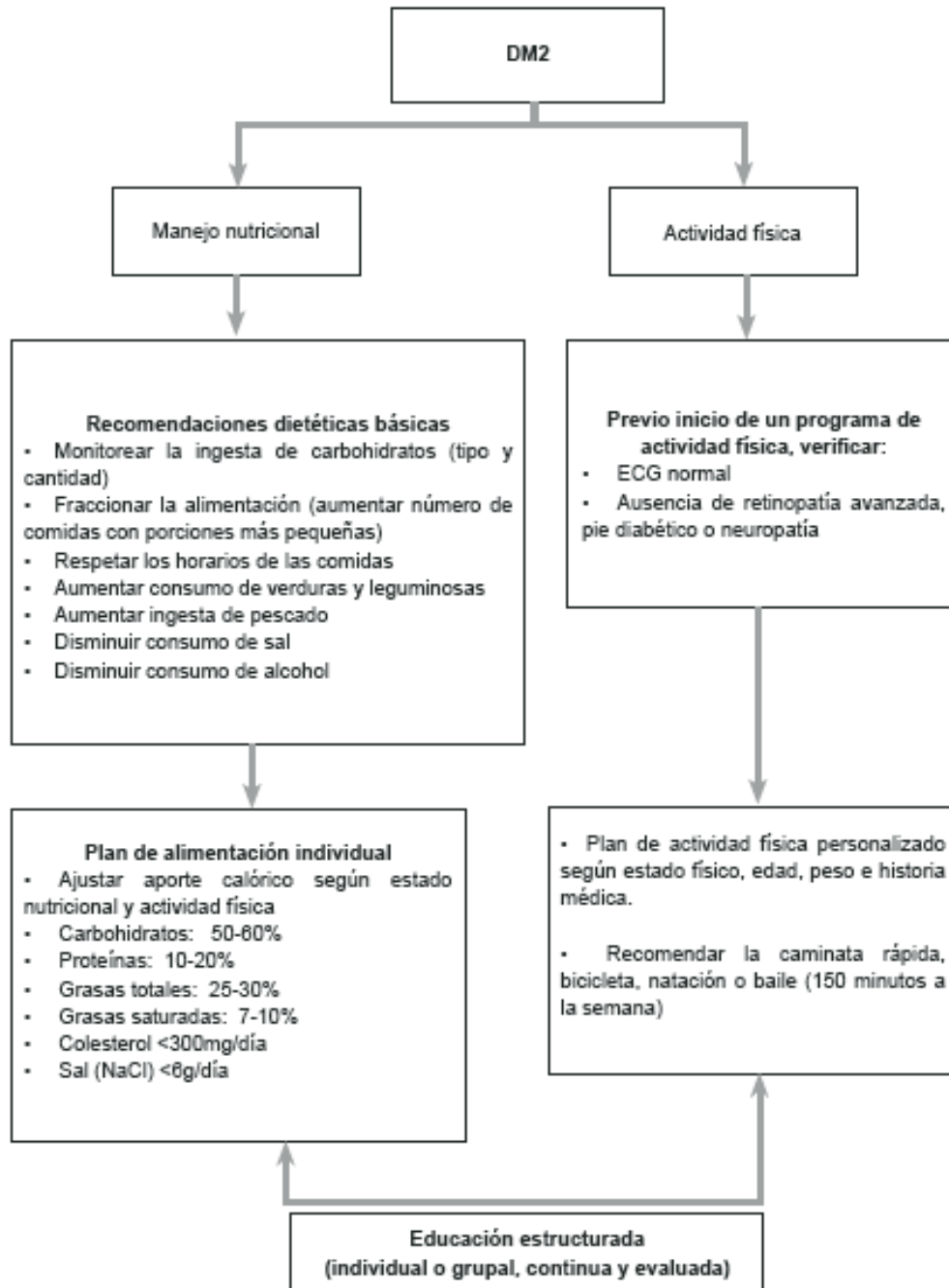
- Pessin Jeffrey E., & Saltiel Alan R., (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.*, 106(2):165–169.
- Pilkis S. J. & Park C.R. (1974). Mechanism of action of insulin. *Annual Reviews of Pharmacology*; 14:365-388.
- Preiss-Landl Karina, Zimmermann Robert, Hämmerle Günter and Zechner Rudolf (2002). Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Current Opinion in Lipidology*; 13:471-481
- Robles Martínez –Pinillos Julio Alberto, Martínez Hernández Idiana, (1999) Hemoglobina glicosilada y diabetes mellitus. Centro Municipal de Higiene, Epidemiología y Microbiología. *Revista Médica Electrónica*, 2(1)
- Ros Emilio & Laguna Juan C., (2006) Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol.* 6 (Supl D):52-61.
- Ruiz Maximino Dr., (2000). Clasificación y Diagnostico de la diabetes mellitus. Primer congreso virtual de Cardiología.
- Sacks D. & MacDonald J (1996). The pathogenesis of type 2 Diabetes Mellitus. *AJCP*; 105: 149-57

- Santamarina-Fojo Silvia and Brewer H. Bryan (1994). Lipoprotein lipase: structure, function and mechanism of action. *Int J Clin Lab Res*; 24: 143-147
- Shearer Barry G. and Hoekstra William J. (2002). Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Choreographers of Metabolic Gene Transcription. *Celltransmission*; Vol 18. No.3.
- Shepherd Peter R. & Kahn Barbara B. (1999). Glucose Transporters and Insulin Action, Implications for Insulin Resistance and Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*; 341:248-257
- Singad Abdel Nasser B., El-Beshbishy Hesham A., Yonekawa Makiko, Nomura Taro, Fukai Toshio (2005). Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: Effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*; 100: 333–338
- Takano Hiroyuki and Komuro Issei, (2009). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ and Cardiovascular Diseases. *Circulation Journal*; Vol.73, February, 214 - 220
- Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR, for the UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1999). Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus. Progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). *JAMA*; 281: 2005-2012.

- Uauy Ricardo, Martínez Jessica, Rojas Cecilia, (2000) Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en obesidad y diabetes mellitus. *Rev. méd. Chile* v.128 n.4 Santiago abr.
- Yagi M., Kouno T., Aoyagi Y. and Murai H. (1976) The structure of Moraoline, a piperidine alkaloid from *Morus* species. *Nippon Nougai Kagaku Kaishi*; 50, 571–572.
- Yki-Jarvisen H. (1994) Pathogenesis of non insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet*; 343: 91-94
- Zepeda J. (1991) El árbol de oro. Los mil usos de la morera. *Medio Ambiente (Perú)* 47, 28-29

ANEXOS

ANEXO A: Tratamiento no farmacológico de la DM 2



ANEXO B: Genes regulados por el PPAR – γ agonista

Gene	Regulation	Potential function(s)
aP2—adipocyte fatty acid binding protein	↑ WAT	Intracellular fatty acid binding
Acyl-CoA synthetase	↑ WAT	Lipogenesis and/or catabolism
PEPCK—phosphoenolpyruvate carboxykinase	↑ WAT	Glycerol synthesis (for triglycerides)
LPL-lipoprotein lipase	↑ WAT	Hydrolysis of triglyceride-containing particles
CD36	↑ WAT	Cell surface fatty acid transporter
FATP-1	↑ WAT ↓ muscle	Cell surface fatty acid transporter
Uncoupling protein 1—UCP1	↑ BAT ↑ WAT	Uncouple mitochondrial respiration
UCP3 (+/–UCP2)	↑ WAT	Uncouple mitochondrial respiration
Carnitine palmitoyl transferase1 CPT1	↑ WAT	Translocation of fatty acids into mitochondria
c-CBL-associated protein	↑ WAT	Insulin signaling toward glucose transport
Insulin receptor substrate-2—IRS-2	↑ WAT	Insulin receptor-mediated signaling
Pyruvate dehydrogenase kinase 4—PDK4	↑ WAT ↓ muscle	Inhibition of pyruvate dehydrogenase (inhibition of glucose oxidation)
Adipocyte complement-related factor 30—Acrp30	↑ WAT	Fat-specific secreted protein; beneficial metabolic effects on liver/muscle (?)
TNF α	↓ WAT	Pro-inflammatory cytokine; potential mediator of insulin resistance
Leptin	↓ WAT	Fat-derived hormone that inhibits food intake
11- β hydroxysteroid dehydrogenase 1—11 β -HSD-1	↓ WAT (↓ liver)	Controls intracellular conversion to active cortisol

*Increases or decreases in mRNA expression are noted in white (WAT) or brown (BAT) adipose tissue and skeletal muscle

ANEXO C: Estadísticos descriptivos para el nivel de glucosa en ayunas en mg/dl

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>N</i>
Control	Hembra	150,64	33,632	28
	Macho	148,04	24,380	28
	Total	149,34	29,134	56
Maltosa	Hembra	143,18	32,054	28
	Macho	161,25	29,850	28
	Total	152,21	32,015	56
Maltosa + ELGS	Hembra	142,29	32,135	28
	Macho	139,00	26,710	28
	Total	140,64	29,324	56
Maltosa + EHM	Hembra	143,93	25,329	28
	Macho	145,25	20,591	28
	Total	144,59	22,881	56
Total	Hembra	145,01	30,714	112
	Macho	148,38	26,542	112
	Total	146,70	28,689	224

Medicamento suministrado a los ratones

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	149,339	3,796	141,857	156,821
Maltosa	152,214	3,796	144,732	159,696
Maltosa + ELGS	140,643	3,796	133,161	148,125
Maltosa + EHM	144,589	3,796	137,107	152,071

Sexo del ratón

<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
			<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Hembra	145,009	2,684	139,718	150,300
Macho	148,384	2,684	143,093	153,675

Medicamento suministrado a los ratones * Sexo del ratón

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
		<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	Hembra	150,643	5,368	140,062	161,224
	Macho	148,036	5,368	137,455	158,617
Maltosa	Hembra	143,179	5,368	132,597	153,760
	Macho	161,250	5,368	150,669	171,831
Maltosa + ELGS	Hembra	142,286	5,368	131,705	152,867
	Macho	139,000	5,368	128,419	149,581
Maltosa + EHM	Hembra	143,929	5,368	133,347	154,510
	Macho	145,250	5,368	134,669	155,831

ANEXO D: Estadísticos descriptivos para el nivel de triglicéridos en mg/dl

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>N</i>
Control	Hembra	154,9357	48,40778	28
	Macho	141,3461	69,55677	28
	Total	148,1409	59,76999	56
Maltosa	Hembra	159,1582	62,61389	28
	Macho	172,4539	63,99546	28
	Total	165,8061	63,08791	56
Maltosa + ELGS	Hembra	130,8129	48,17899	28
	Macho	136,7054	46,54352	28
	Total	133,7591	47,02978	56
Maltosa + EHM	Hembra	144,9239	35,80586	28
	Macho	165,6407	55,68436	28
	Total	155,2823	47,54795	56
Total	Hembra	147,4577	50,20208	112
	Macho	154,0365	60,74642	112
	Total	150,7471	55,69679	224

Medicamento suministrado a los ratones

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	148,141	7,330	133,694	162,588
Maltosa	165,806	7,330	151,359	180,253
Maltosa + ELGS	133,759	7,330	119,312	148,206
Maltosa + EHM	155,282	7,330	140,836	169,729

Sexo del ratón

<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
			<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Hembra	147,458	5,183	137,242	157,673
Macho	154,037	5,183	143,821	164,252

Medicamento suministrado a los ratones * Sexo del ratón

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
		<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	Hembra	154,936	10,366	134,505	175,366
	Macho	141,346	10,366	120,915	161,777
Maltosa	Hembra	159,158	10,366	138,728	179,589
	Macho	172,454	10,366	152,023	192,885
Maltosa + ELGS	Hembra	130,813	10,366	110,382	151,243
	Macho	136,705	10,366	116,275	157,136
Maltosa + EHM	Hembra	144,924	10,366	124,493	165,355
	Macho	165,641	10,366	145,210	186,071

ANEXO E: Estadísticos descriptivos para el porcentaje de hemoglobina glicosilada

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>N</i>
Control	Hembras	12,7638	2,88502	8
	Machos	10,8150	1,73803	8
	Total	11,7894	2,51130	16
Maltosa	Hembras	10,7263	6,42886	8
	Machos	14,6763	8,48491	8
	Total	12,7013	7,55282	16
Maltosa+ELGS	Hembras	9,1400	2,51679	8
	Machos	8,3925	2,50227	8
	Total	8,7663	2,45498	16
Maltosa+EHM	Hembras	10,1488	5,33644	8
	Machos	10,6738	2,68005	8
	Total	10,4113	4,08839	16
Total	Hembras	10,6947	4,56930	32
	Machos	11,1394	5,02325	32
	Total	10,9170	4,76865	64

Medicamento suministrado a los ratones

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	11,789	1,162	9,461	14,118
Maltosa	12,701	1,162	10,373	15,030
Maltosa+ELGS	8,766	1,162	6,438	11,095
Maltosa+EHM	10,411	1,162	8,083	12,740

Sexo del ratón

<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Hembras	10,695	,822	9,048	12,341
Machos	11,139	,822	9,493	12,786

Medicamento suministrado a los ratones * Sexo del ratón

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
		<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	Hembras	12,764	1,644	9,471	16,057
	Machos	10,815	1,644	7,522	14,108
Maltosa	Hembras	10,726	1,644	7,433	14,019
	Machos	14,676	1,644	11,383	17,969
Maltosa+ELGS	Hembras	9,140	1,644	5,847	12,433
	Machos	8,393	1,644	5,100	11,685
Maltosa+EHM	Hembras	10,149	1,644	6,856	13,442
	Machos	10,674	1,644	7,381	13,967

ANEXO F: Estadísticos descriptivos para el nivel de insulina, en $\mu\text{U/ml}$

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. típ.</i>	<i>N</i>
Control	Hembra	71,13	22,781	8
	Macho	58,75	28,212	8
	Total	64,94	25,582	16
Maltosa	Hembra	61,63	25,275	8
	Macho	85,63	11,698	8
	Total	73,63	22,706	16
Maltosa + ELGS	Hembra	46,00	31,772	8
	Macho	49,75	33,805	8
	Total	47,88	31,751	16
Maltosa + EHM	Hembra	54,13	39,197	8
	Macho	56,13	29,580	8
	Total	55,13	33,562	16
Total	Hembra	58,22	30,416	32
	Macho	62,56	29,331	32
	Total	60,39	29,721	64

Medicamento suministrado a los ratones

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	64,938	7,210	50,494	79,381
Maltosa	73,625	7,210	59,181	88,069
Maltosa + ELGS	47,875	7,210	33,431	62,319
Maltosa + EHM	55,125	7,210	40,681	69,569

Sexo del ratón

<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Hembra	58,219	5,098	48,006	68,432
Macho	62,563	5,098	52,349	72,776

Medicamento suministrado a los ratones * Sexo del ratón

<i>Medicamento suministrado a los ratones</i>	<i>Sexo del ratón</i>	<i>Media</i>	<i>Error típ.</i>	<i>Intervalo de confianza al 95%.</i>	
		<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>	<i>Límite inferior</i>	<i>Límite superior</i>
Control	Hembra	71,125	10,197	50,699	91,551
	Macho	58,750	10,197	38,324	79,176
Maltosa	Hembra	61,625	10,197	41,199	82,051
	Macho	85,625	10,197	65,199	106,051
Maltosa + ELGS	Hembra	46,000	10,197	25,574	66,426
	Macho	49,750	10,197	29,324	70,176
Maltosa + EHM	Hembra	54,125	10,197	33,699	74,551
	Macho	56,125	10,197	35,699	76,551