



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**

**FACULTAD DE  
QUÍMICOFARMACOBIOLOGÍA**

**Análisis Histológico de Páncreas e Hígado de Ratas Wistar tras la  
administración crónica de extractos de Hierba de la Calavera  
(*Cuphea procumbens*)**

**Tesis**

Que para obtener el título de:

**QUÍMICOFARMACOBIOLOGA**

Presenta:

**p. QFB MARÍA DEL ROSARIO GÓMEZ GONZÁLEZ**

**DIRECTORA**

**DC BERTHA FENTON NAVARRO**

**CO-DIRECTOR**

**MC MANUEL LÓPEZ RODRÍGUEZ**

MORELIA, MICHOACÁN. DICIEMBRE DEL 2019.



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Glicobiología ubicado en la División de estudios de posgrado perteneciente a la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de la D.C. Bertha Fenton Navarro y la codirección del M.C. Manuel López Rodríguez, perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Unidad Posta Veterinaria, Laboratorio de Histología.

Apoyado por: CIC-UMSNH-2018 a la D.C. Bertha Fenton Navarro.

# COMITÉ TUTORIAL

## **DIRECTOR DE TESIS:**

- D.C. BERTHA FENTON NAVARRO

## **CO-DIRECTOR DE TESIS:**

- M.C. MANUEL LOPEZ RODRIGUEZ

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS:**

- D.C. MARIA EUGENIA GRACIELA LETECHEPIA VALLEJO
- D.C. MARIA DE LOS DOLORES LOPEZ CALVILLO
- M.F.B. SARA ELIET URRUTIA HERNANDEZ
- M.C. LUZ ELENA AREVALO LEON
- Q.F.B. RAQUEL SANTILLAN GALVAN

**“DELEITATE ASI MISMO EN JEHOVÁ, Y ÉL TE CONCEDERÁ LAS PETICIONES  
DE TU CORAZÓN.**

**ENCOMIENDA A JEHOVÁ TU CAMINO, Y CONFÍA EN ÉL; Y ÉL HARÁ.”**

**Salmo 37: ver 4 y 5**

## AGRADECIMIENTOS

A:

- MITODO

“Oh Jehová, tú me has examinado y conocido. Tú has conocido mi sentarme y mi levantarme;

Has entendido desde lejos mis pensamientos.

Has escudriñado mi andar y mi reposo, y todos mis caminos te son conocidos.

Pues aún no está la palabra en mi lengua, y he aquí, oh jehová, tú la sabes toda.

Detrás y delante me rodeaste, y sobre mi pusiste tu mano.

Tal conocimiento es demasiado maravilloso para mí, alto es, no lo puedo comprender.”

Salmo 139: ver. 1 al 6

“Señor, digno eres de recibir la gloria y la honra y el poder; porque tú creaste todas las cosas, y por tu voluntad existen y fueron creadas.”

Apocalipsis 4:11

“Porque tú formaste mis entrañas; tú me hiciste en el vientre de mi madre. Te alabaré; porque formidables, maravillosas son tus obras; estoy maravillado, y mi alma lo sabe muy bien.”

Salmo 139: 13 y 14

“Mi embrión vieron tus ojos, y en tu libro estaban escritas todas aquellas cosas que fueron luego formadas, sin faltar una de ellas.”

Salmo 139: 16

+ MI DIOS:

La razón de mi vivir. Sin Él nada tendría sentido, todo es por Él y para Él por su infinita gracia y misericordia.

A ti, agradezco que me hayas dado la vida y salud, así como la oportunidad de disfrutar con mi familia y amigos una de las etapas más felices de mi vida y porque nunca me dejaste flaquear ni perder la fe en los momentos más difíciles.

- MI INICIO:

“Hijos, obedeced en el Señor a vuestro padres, porque esto es justo. Honra a tu padre y a tu madre, que es el primer mandamiento con promesa; para que te vaya bien, y seas de larga vida sobre la tierra.”

Efesios 6: ver. 1 al 3

“Oye a tu padre, a aquel que te engendró; Y cuando tu madre envejeciere, no la menosprecies.”

Proverbios 23: ver 22

“Oye, hijo mío, la instrucción de tu padre, Y no desprecies la dirección de tu madre; Porque adorno de gracia serán a tu cabeza, Y collares a tu cuello.”

Proverbios 1: ver 8 y 9

Mi padre:

Javier Gómez. (Maestro, Amigo y Ejemplar Padre)

Mi madre:

Marcelina González Chávez. (Confidente, Mi Fuerza y Enseñanza)

Que privilegio tenerlos como padres, que gran regalo crecer sin olvidar tanto esfuerzo y a veces incomprendidos, solo se le entregan a alguien muy querido, gracias por darme tanto de todo y por darme todo de ustedes. Hoy que mis estudios profesionales han sido concluidos, no hay palabras para agradecer todo su apoyo, esfuerzo, sus sacrificios y todo su amor. Este triunfo vale la pena compartirlo y con quien mejor que con mis padres, mis amigos de toda la vida.

- MI SANGRE:

“El que ama a su hermano, permanece en la luz, y en él no hay tropiezo.”

1ª Juan 2: 10

“Y nosotros tenemos este mandamiento de Él: el que ama a Dios, ame también a su hermano.”

1ª Juan 4: 21

Mis hermanos:

- Javier Vidal
- Antonio
- Luz Yadira
- Liz Marisol

Por su Tolerancia, Ejemplo, Consejos y su Cariño de toda la Vida.

A ustedes, les dedico estas palabras como un pequeño reconocimiento a su esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado en el transcurso de mi vida y mis estudios, porque han contribuido al cumplimiento de una de mis importantes metas, y porque han sido también una fuente de estímulos y dedicación.

- A QUIENES HACEN CAMINOS:

“Y Él mismo constituyó a unos, apóstoles; a otros profetas; a otros, evangelistas; a otros pastores y MAESTROS.”

Efesios 4: 11

- DC BERTHA FENTON NAVARRO.

Por su inspiración, por su conocimiento y las herramientas aportadas para este trabajo.

- MC MANUEL LÓPEZ RODRÍGUEZ.

Por su apoyo técnico, sugerencias, compañerismo, buen ambiente de trabajo y colaboración en esta investigación.

Las palabras no expresan mi eterno agradecimiento por su ayuda, enseñanzas y apoyo. Por compartir sus conocimientos, y experiencias, necesarias para mi superación profesional. Por la realización del trabajo teórico y práctico. Mil gracias.

## ÍNDICE GENERAL

viii

|                 | Página |
|-----------------|--------|
| COMITÉ TUTORIAL | iii    |

|  |      |
|--|------|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>   | v    |
| <b>ÍNDICE GENERAL</b>  | ix   |
| <b>ÍNDICE DE IMÁGENES</b>  | xi   |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>  | xiii |
| <b>RESUMEN</b>   | xiv  |
| <b>ABSTRACT</b>  | xv   |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>   | 16   |
| <b>1.1 Diabetes</b>  | 19   |
| <b>1.1.1</b> Problemática de la diabetes: prevalencia mundial, en México, en el estado de Michoacán y el gasto que representa en el presupuesto del sector salud | 19   |
| <b>1.1.2</b> Definición  | 25   |
| <b>1.1.2.1</b> Síntomas  | 26   |
| <b>1.1.3</b> Tipos de diabetes   | 26   |
| <b>1.1.4</b> Complicaciones metabólicas a largo plazo  | 28   |
| <b>1.1.5</b> Diabetes y estrés oxidativo   | 33   |
| <b>1.1.5.1</b> Mecanismos por los que se incrementa el estrés oxidativo (--hiperglucemia--)  | 36   |
| <b>1.1.5.2</b> Productos de Glicación Avanzada   | 40   |
| <b>1.2</b> Efectos sobre los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. Antioxidantes primarios y secundarios.  | 43   |
| <b>1.2.1</b> Mecanismo de defensa antioxidante del organismo   | 45   |
| <b>1.3 Páncreas</b>  | 46   |
| <b>1.3.1</b> Descripción del páncreas  | 46   |
| <b>1.3.2</b> Tipos y funciones de las células que conforman al páncreas  | 48   |
| <b>1.3.3</b> Daños en Páncreas provocados por la diabetes  | 51   |
| <b>1.3.4</b> Pérdida de Islotes pancreáticos en DM-1   | 51   |
| <b>1.3.4.1</b> Vía por la perforina/granzima   | 52   |
| <b>1.3.4.2</b> Vía del ligando Fas (FasL)  | 53   |
| <b>1.3.5</b> Pérdida de Islotes de DM-2  | 54   |
| <b>1.4 Hígado</b>  | 56   |
| <b>1.4.1</b> Descripción del hígado  | 56   |
| <b>1.4.2</b> Funciones hepáticas   | 59   |
| <b>1.4.3</b> Tipos y funciones de las células que conforman el hígado  | 61   |
| <b>1.4.3.1</b> Morfología del hepatocito   | 61   |
| <b>1.4.3.2</b> Funciones del hepatocito  | 64   |
| <b>1.5</b> Daños hepáticos provocados por la diabetes (hígado graso, cirrosis y cáncer)  | 68   |
| <b>1.6</b> Mecanismos de daño hepático por la diabetes   | 70   |
| <b>II. ANTECEDENTES</b>  | 73   |
| <b>2.1</b> Plantas medicinales   | 73   |
| <b>2.2</b> Compuestos hipoglucemiantes y antioxidantes de plantas medicinales  | 75   |

|  |     |
|--|-----|
| 2.2.1 Estructura química   | 76  |
| 2.2.2 Funciones antioxidantes  | 77  |
| 2.2.3 Síntesis, absorción y metabolismo  | 78  |
| 2.3 Efecto protector de los compuestos activos de plantas medicinales en tejidos (páncreas e hígado) | 78  |
| 2.4 Descripción taxonómica de <i>Cuphea procumbens</i> ,   | 80  |
| <b>III. JUSTIFICACIÓN</b>  | 83  |
| <b>IV. HIPÓTESIS</b>   | 84  |
| <b>V. OBJETIVO GENERAL</b>   | 84  |
| <b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES</b>  | 84  |
| <b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | 85  |
| 7.1 Obtención de órganos   | 85  |
| 7.2 Procesamiento en el equipo HISTOKINETTE.   | 86  |
| 7.3 Cortes en el micrótopo   | 89  |
| 7.4 Montaje en laminillas  | 90  |
| 7.5 Tinción Hematoxilina-Eosina  | 90  |
| 7.6 Conteo celular   | 92  |
| 7.7 Parámetros histológicos  | 92  |
| 7.8 Análisis estadístico   | 93  |
| <b>VIII. RESULTADOS</b>  | 94  |
| 8.1 Páncreas   | 94  |
| 8.2 Hígado   | 99  |
| <b>IX. DISCUSIÓN</b>   | 107 |
| <b>X. CONCLUSIONES</b>   | 116 |
| <b>XI. PERSPECTIVAS</b>  | 117 |
| <b>XII. BIBLIOGRAFÍA</b>   | 118 |

## LISTA DE FIGURAS

x

|   |             |
|---|-------------|
|   | <b>Pág.</b> |
| <b>Figura 1</b> Cifras de la diabetes en el mundo | 20          |
| <b>Figura 2</b> Control de diabetes en México     | 22          |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 3</b> Cifras de la diabetes en México  | 23 |
| <b>Figura 4</b> Distribución de pacientes por control de su enfermedad   | 24 |
| <b>Figura 5</b> Síntomas de la diabetes  | 26 |
| <b>Figura 6</b> Diabetes tipo 1  | 27 |
| <b>Figura 7</b> Diabetes tipo 2 y Diabetes gestacional   | 27 |
| <b>Figura 8</b> Reacción de reducción secuencial del oxígeno con la generación de radicales libres de oxígeno  | 34 |
| <b>Figura 9</b> Principales vías metabólicas activadas por la hiperglucemia crónica vinculadas con el desarrollo de estrés oxidativo en sujetos diabéticos | 39 |
| <b>Figura 10</b> Representación esquemática de la reacción de Maillard   | 41 |
| <b>Figura 11</b> Ubicación del páncreas en el cuerpo humano  | 47 |
| <b>Figura 12</b> Representación de la anatomía e histología pancreática  | 49 |
| <b>Figura 13</b> Representación de la embriogénesis pancreática  | 50 |
| <b>Figura 14</b> Principales vías de iniciación de la apoptosis  | 53 |
| <b>Figura 15</b> Modelo de señalización mediado por Fas  | 54 |
| <b>Figura 16</b> Ubicación del hígado  | 56 |
| <b>Figura 17</b> Anatomía morfológica del hígado   | 57 |
| <b>Figura 18</b> Aspecto tridimensional del hígado normal  | 58 |
| <b>Figura 19</b> Esquema de los tipos de lobulillos en el hígado: clásico, portal y acino hepático.  | 58 |
| <b>Figura 20</b> Anatomía segmentaria del hígado   | 59 |
| <b>Figura 21</b> Esquema de la fisiología del hígado   | 60 |
| <b>Figura 22</b> Fotomicrografía del hepatocito  | 62 |
| <b>Figura 23</b> Esquema de la ultra estructura de un hepatocito   | 63 |
| <b>Figura 24</b> Progresión del daño hepático  | 69 |
| <b>Figura 25</b> Diagrama que muestra el mecanismo del daño hepático en la diabetes mellitus   | 73 |
| <b>Figura 26</b> Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo  | 76 |
| <b>Figura 27</b> Planta y flor de <i>Cuphea procumbens</i>   | 80 |
| <b>Figura 28</b> Corte y etiquetado de los órganos   | 86 |
| <b>Figura 29</b> Equipo HISTOKYNETTE   | 87 |
| <b>Figura 30</b> Casette con tejido después de salir del equipo Histokinette   | 88 |
| <b>Figura 31</b> Bloques de parafina   | 88 |
| <b>Figura 32</b> Micrótomo   | 89 |
| <b>Figura 33</b> Montaje en laminillas de los cortes   | 90 |
| <b>Figura 34</b> Disposición del páncreas en el cuerpo de la rata  | 94 |
| <b>Figura 35</b> Corte histológico de páncreas sano  | 95 |
| <b>Figura 36</b> Islotes y células del páncreas  | 95 |
| <b>Figura 37</b> Islotes pancreáticos de los grupos de estudio en tiempo cero  | 97 |
| <b>Figura 38</b> Islotes pancreáticos de los grupos de estudio en tiempo 15 días   | 97 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 39</b> Islotes pancreáticos de los grupos de estudio en tiempo 60      | 98  |
| <b>Figura 40</b> Disposición del hígado en la rata                               | 99  |
| <b>Figura 41</b> Corte histológico de hígado sano                                | 99  |
| <b>Figura 42</b> Estructuras en el corte de hígado                               | 100 |
| <b>Figura 43</b> Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio, tiempo Cero    | 101 |
| <b>Figura 44</b> Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio, tiempo 15 días | 103 |
| <b>Figura 45</b> Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio, tiempo 30 días | 104 |
| <b>Figura 46</b> Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio, tiempo 60 días | 105 |
| <b>Figura 47</b> Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio, tiempo 90 días | 106 |

## LISTA DE TABLAS

xii

|   |             |
|---|-------------|
|   | <b>Pág.</b> |
| <b>Tabla 1</b> Principales causas de muerte en México | 23          |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 2</b> Clasificación de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus                                | 30 |
| <b>Tabla 3</b> Clasificación de los diferentes antioxidantes   | 35 |
| <b>Tabla 4</b> Evidencias de la relación entre el estrés oxidativo y la diabetes mellitus con y sin complicaciones | 36 |
| <b>Tabla 5</b> Clasificación de los antioxidantes  | 44 |
| <b>Tabla 6</b> Mecanismos de defensa   | 45 |
| <b>Tabla 7</b> Clasificación de los flavonoides  | 77 |
| <b>Tabla 8</b> Grupos experimentales en estudio  | 86 |
| <b>Tabla 9</b> Tiempos de proceso en el HISTOKYNETTE   | 87 |
| <b>Tabla 10</b> Tinción con Hematoxilina-Eosina  | 91 |
| <b>Tabla 11</b> Promedio de células beta del páncreas  | 96 |

## RESUMEN

**Introducción:** La diabetes es una enfermedad crónica que afecta a un porcentaje elevado de la población y su prevalencia va en aumento. En la diabetes existen daños a nivel hepático, donde se presenta hígado graso, condición que puede evolucionar a cirrosis y cáncer de hígado, y en muerte de células  $\beta$ -pancreáticas. Los fármacos controlan los niveles circulantes de glucosa pero no protegen a los tejidos contra el daño producido por estrés oxidativo generado por hiperglucemia, lo que sí ofrecen los extractos acuosos de plantas medicinales. Un claro ejemplo es la Hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*), la cual presenta un efecto hipoglucemiante. **Objetivo:** Evaluar el efecto protector a través de análisis histológico de la administración crónica de metformina y extracto acuoso de Hierba de la calavera (*Cuphea procumbens*) en ratas diabéticas en comparación con sanas. **Materiales y Métodos:** Páncreas e hígado de los grupo de estudio: 1) Sanos, 2) DM 2+ Metformina, 3) DM 2 + Extracto acuoso (EACP), en formol al 10%. Se procesaron en el equipo histokinette, el cual preparó los órganos para proceder a su corte en el micrótopo a 7 micrómetros y su montaje en laminillas. Se tiñeron con Hematoxilina-Eosina y se observaron con microscopía óptica con 100X y 400X. **Resultados:** En el análisis histológico de hígado en ratas diabéticas tratadas con metformina se observaron alteraciones como hígado graso, esteatosis simple. En cuanto a la morfología celular se observaron Hepatocitos con degeneración balonante, además de un infiltrado inflamatorio correspondiente a una inflamación crónica. En el caso de las ratas diabéticas tratadas con EACP se observaron características histológicas y morfológicas de las células similares a las ratas sanas. En el caso del páncreas se observó una disminución importante de la cantidad de células beta pancreáticas en DM2 + Metformina en comparación con ratas sanas y DM2 + EACP conservándose la cantidad de células beta en ratas con DM2 tratadas con EACP. **Conclusiones:** El tratamiento crónico de extracto acuoso de *Cuphea procumbens* presenta un efecto protector en las células hepáticas y células beta en ratas diabéticas tipo 2.

**Palabras clave:** Diabetes, histología, hígado, páncreas, plantas medicinales.

## ABSTRACT

**Introduction:** Diabetes is a chronic disease that affects a high percentage of the population and its prevalence is increasing. In diabetes there are liver damage, where fatty liver occurs, this condition can evolve to cirrhosis and liver cancer, and death of  $\beta$ -pancreatic cells. The drugs control the circulating glucose levels but do not protect the tissues against the damage caused by oxidative stress generated by hyperglycemia, which the aqueous extracts of medicinal plants do offer. A clear example is the creeping waxweed (*Cuphea procumbens*), which has a hypoglycemic effect. **Objective:** To evaluate the protective effect through histological analysis of the chronic administration of metformin and aqueous extract of *Cuphea procumbens* in diabetic rats compared to healthy rats. **Materials and Methods:** Pancreas and liver from the study groups: 1) Healthy, 2) DM 2+ Metformin, 3) DM 2 + Aqueous extract (EACP), in 10% formalin. They were processed in the histokinette equipment, which prepared the organs to proceed to its cutting in the microtome at 7 micrometers and its assembly in lamellae. They were stained with Hematoxylin-Eosin and observed with 100X and 400X optical microscopy. **Results:** In the histological analysis of liver in diabetic rats treated with metformin, alterations such as fatty liver, simple steatosis were observed. Regarding cell morphology, hepatocytes with ballooning degeneration were observed, in addition to an inflammatory infiltrate corresponding to chronic inflammation. In the case of diabetic rats treated with EACP, histological and morphological characteristics of cells similar to healthy rats were observed. In the case of the pancreas, a significant decrease in the amount of pancreatic beta cells in DM2 + Metformin was observed compared to healthy rats and DM2 + EACP, while the amount of beta cells was preserved in DM2 rats treated with EACP. **Conclusions:** The chronic treatment of aqueous extract of *Cuphea procumbens* has a protective effect on liver cells and beta cells in type 2 diabetic rats.

**Keywords:** Diabetes, histology, liver, pancreas, medicinal plants.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

Para todo investigador o simple estudioso de un tema médico, en ocasiones, el antecedente histórico resulta esencial para la comprensión cabal del mismo, así como para preveer o imaginar su evolución futura. Muchas veces los sucesos relacionados con un problema médico en cuestión se hallan diseminados o son insuficientes, lo que favorece que no pocas veces el investigador parta de un hecho no bien fundamentado históricamente u obvie el mismo por carecer de esta información. En el caso de la diabetes mellitus, enfermedad tan antigua como nuestra civilización, los hitos en su historia son numerosos, y muchos de importancia relevante para la ciencia. Las descripciones o investigaciones en torno a esta enfermedad a través del tiempo han sido realizadas en muchos casos por grandes hombres de ciencias que sus nombres han trascendido a la posteridad. En la época contemporánea los estudios sobre los múltiples aspectos de este mal han proporcionado que no pocos científicos alcancen renombre mundial y que incluso hayan merecido varios Premios Nobel (Álvarez Aldama, D. y Rodríguez Bebert, Y. 2009).

El conocimiento de la antigüedad de ciertas enfermedades además de su frecuencia y persistencia en determinada región, época o población contribuye, en el presente, a plantear nuevos mecanismos de prevención y ayuda a las poblaciones susceptibles de sufrir esos problemas de salud. Se sabe que el origen y mantenimiento de las enfermedades y en general de los desórdenes fisiológicos, es un proceso de alta complejidad y no reside exclusivamente en factores biológicos,

sino que está asociada causalmente a factores del ambiente físico, a la estructura social, y a la conducta humana (González Cortés, A., 1980).

La diabetes mellitus era ya conocida antes de la era cristiana. En el manuscrito descubierto por Ebers en Egipto, correspondiente al siglo XV antes de Cristo, se describen síntomas que parecen corresponder a la diabetes. Fue Areteo de Capadocia quien, en el siglo II de la era cristiana, le dio a esta afección el nombre de diabetes, que significa en griego *sifón*, refiriéndose al signo más llamativo que es la eliminación exagerada de agua por el riñón, con lo cual quería expresar que el agua entraba y salida del organismo del diabético sin fijarse en él. En el siglo II Galeno también se refirió a la diabetes. En los siglos posteriores no se encuentran en los escritos médicos referencias a esta enfermedad hasta que, en el siglo XI, Avicena habla con clara precisión de esta afección en su famoso Canon de la Medicina. Tras un largo intervalo fue Tomás Willis quien, en 1679, hizo una descripción magistral de la diabetes, quedando desde entonces reconocida por su sintomatología como entidad clínica. Fue él quien, refiriéndose al sabor dulce de la orina, le dio el nombre de diabetes mellitus (sabor a miel) (Álvarez Aldama, D., Rodríguez Bebert, Y., 2009).

En 1775 Dopson identificó la presencia de glucosa en la orina. La primera observación necrópsica en un diabético fue realizada por Cawley y publicada en el "London Medical Journal" en 1788. Casi en la misma época el inglés Rollo consiguió mejorías notables con un régimen rico en proteínas y grasas y limitado en hidratos de carbono. Los primeros trabajos experimentales relacionados con el metabolismo

de los glúcidos fueron realizados por Claude Bernard quien descubrió, en 1848, el glucógeno hepático y provocó la aparición de glucosa en la orina excitando los centros bulbares mediante pinchaduras (Álvarez Aldama, D., Rodríguez Bebert, Y., 2009).

En la segunda mitad del siglo XIX el gran clínico francés Bouchardat señaló la importancia de la obesidad y de la vida sedentaria en el origen de la diabetes y marcó las normas para el tratamiento dietético, basándolo en la restricción de los glúcidos y en el bajo valor calórico de la dieta. Los trabajos clínicos y anatomopatológicos adquirieron gran importancia a fines del siglo pasado, en manos de Frerichs, Cantani, Naunyn, Lanceraux, etc. y culminaron con las experiencias de pancreatectomía en el perro, realizadas por Mering y Minkowski en 1889 (Chena J. A. 2001).

La búsqueda de la presunta hormona producida por las células descritas en el páncreas, en 1869, por Langerhans, se inició de inmediato. Hedon, Gley, Laguesse y Sabolev estuvieron muy cerca del ansiado triunfo, pero éste correspondió, en 1921, a los jóvenes canadienses Banting y Best, quienes consiguieron aislar la insulina y demostrar su efecto hipoglucemiante. Este descubrimiento significó una de las más grandes conquistas médicas del siglo actual, porque transformó el porvenir y la vida de los diabéticos y abrió amplios horizontes en el campo experimental y biológico para el estudio de la diabetes y del metabolismo de los glúcidos (Álvarez Aldama, D., Rodríguez Bebert, Y., 2009).

## **1.1 DIABETES.**

### **1.1.1 Problemática de la diabetes: prevalencia mundial, en México, en el estado de Michoacán y el gasto que representa en el presupuesto del sector salud.**

Según las estimaciones, 422 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980. La prevalencia mundial (normalizada por edades) de la diabetes casi se ha duplicado desde ese año, pues ha pasado del 4,7% al 8,5% en la población adulta. Ello supone también un incremento en los factores de riesgo conexos, como el sobrepeso o la obesidad. En la última década, la prevalencia de la diabetes ha aumentado más deprisa en los países de ingresos bajos y medianos que en los de ingresos altos. En 2012, la diabetes provocó 1,5 millones de muertes. Un nivel de glucosa en la sangre superior al deseable provocó otros 2,2 millones de muertes, al incrementar los riesgos de enfermedades cardiovasculares y de otro tipo. Un 43% de estos 3,7 millones de muertes ocurren en personas con menos de 70 años. El porcentaje de muertes atribuibles a una glucemia elevada o la diabetes en menores de 70 años de edad es superior en los países de ingresos bajos y medianos que en los de ingresos altos (OMS, 2016).



**Fig. 1** Cifras de la diabetes en el mundo (tomado de Atlas de la Diabetes, 2017)

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 exploró el estado de diversas enfermedades crónicas en México. Entre ellas, la diabetes en la población mexicana mayor de 20 años de edad (OMENT, 2016).

Se encontró que la prevalencia de diabetes en el país pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016, esto en base a un diagnóstico previo de la enfermedad. Entre esta población:

- Las mujeres reportan mayores valores de diabetes (10.3%) que los hombres (8.4%). Esta tendencia se observa tanto en localidades urbanas (10.5% en mujeres y 8.2% en hombres) como en rurales (9.5% en mujeres, 8.9% en hombres).

- La mayor prevalencia de diabetes se observa entre los hombres de 60 a 69 años (27.7%), y las mujeres de este mismo rango de edad (32.7%) y de 70 a 79 años (29.8%) (OMENT, 2016).

De los adultos que reportaron un diagnóstico médico previo de diabetes, se encontró lo siguiente:

- El 87.7% de los adultos con diabetes recibe un tratamiento para controlar la diabetes, cifra que aumentó ligeramente de la cifra de 85% en 2012.
- El uso de insulina como tratamiento aumentó de 6.5% en 2012 a 11.1% en 2016, así como el uso conjunto de insulina y pastillas (6.6% en 2012 a 8.8% en 2016).
- Sólo 2 de cada 10 adultos con diabetes se realizó una revisión de pies en el último año (20.9%), esto es, en 21.1% de las mujeres y 20.5% de los hombres.
- La medición de hemoglobina glicosilada, que aporta información acerca del control de la glucosa de los últimos 3 meses, se realizó en 15.2% de los pacientes (12.1% de los hombres y 17.5% de las mujeres) en el año previo.
- Las complicaciones reportadas por los adultos diabéticos fueron: visión disminuida (54.5%), daño en la retina (11.2%), pérdida de la vista (9.9%) y úlceras (9.1%) en una de cada 10 personas diagnosticadas. Las amputaciones se observaron en 5.5%.
- Como complicaciones adicionales se reportó ardor, dolor o pérdida de sensibilidad en la planta de los pies en 4 de cada 10 diabéticos (41.2%), mientras que 2 de cada 10 no pueden caminar más de 6 minutos sin sentir fatiga (20.4%).

- Por último, 46.4% de los adultos con diabetes no realiza alguna medida preventiva para retrasar o evitar complicaciones (OMENT, 2016).



**Fig. 2** Control de diabetes en México (tomado de Instituto Nacional de Salud Pública, 2016)

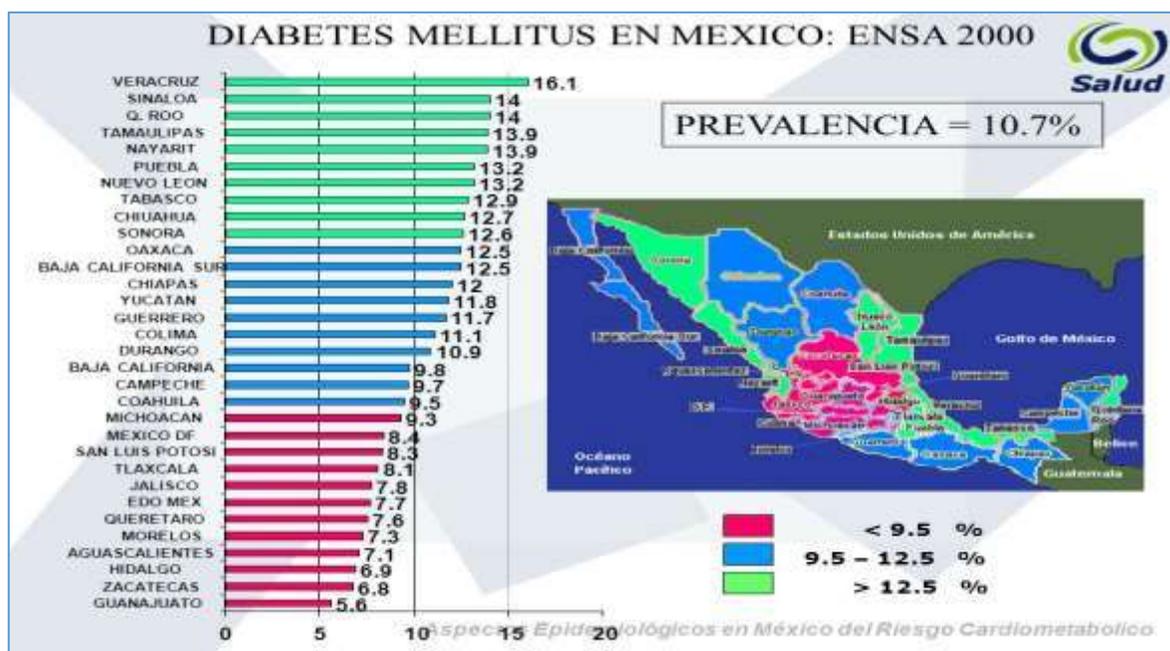
En México, las estimaciones existentes son muy variables con cálculos de costos de atención por paciente que van desde 700 hasta 3,200 dólares anuales (Rodríguez-Bolaños R. A. y col, 2010), lo que se traduce en 5 a 14% del gasto en salud destinado a la atención de esta enfermedad y sus complicaciones, inversión que de acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes se relaciona directamente con la tasa de mortalidad por esta causa (Federación Internacional de Diabetes, 2012).

En México, la mortalidad por diabetes mellitus se ha incrementado constantemente desde 1998 hasta 2014, llegando hasta las 94,029 defunciones, y se posicionó como la causa número uno de mortalidad a nivel nacional, según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Historia (INEGI) desde 2013. (INEGI, 2014).

**Tabla 1. Principales causas de muerte en México**

| Causa de muerte                             | Número de defunciones (%) |
|---|---------------------------|
| <b>1. Diabetes Mellitus</b>                 | 80,788 (24.7 %)           |
| <b>2. Enfermedades cardiovasculares</b>     | 71,072 (21.73 %)          |
| <b>3. Enfermedades cerebrovasculares</b>    | 31, 236 (9.55 %)          |
| <b>4. Cirrosis y enfermedades hepáticas</b> | 28,392 (8.68 %)           |
| <b>5. Homicidios / Violencia</b>            | 27,213 (8.32 %)           |
| <b>6. Enfermedad pulmonar</b>               | 27,213 (8.32 %)           |
| <b>7. Hipertensión</b>                      | 18,942 (5.79 %)           |
| <b>8. Accidentes vehiculares</b>            | 16,615 (5.08 %)           |
| <b>9. Enfermedades respiratorias</b>        | 16,401 (5.01 %)           |
| <b>10. Nefritis y Enfermedades renales</b>  | 13,858 (4.24 %)           |

(INEGI, 2013)



**Fig. 3** Cifras de la diabetes en México (tomado de ENSANUT, 2000)

En Michoacán, existe una tasa de prevalencia de entre el 7.6 y el 8 por ciento de diabetes, que comparado con otros estados es menor, ya que existen entidades donde la cifra alcanza hasta un 12 por ciento. Es decir, que, por cada 100 personas 7 tienen esta enfermedad.

Los especialistas precisan que, del total de la población con diabetes, solo el 25 por ciento cuenta con metas de control, es decir, que puede hacer una vida sin complicaciones, ya que de lo contrario puede derivar en ceguera o alguna amputación (Agencia Quadratín. 2018).

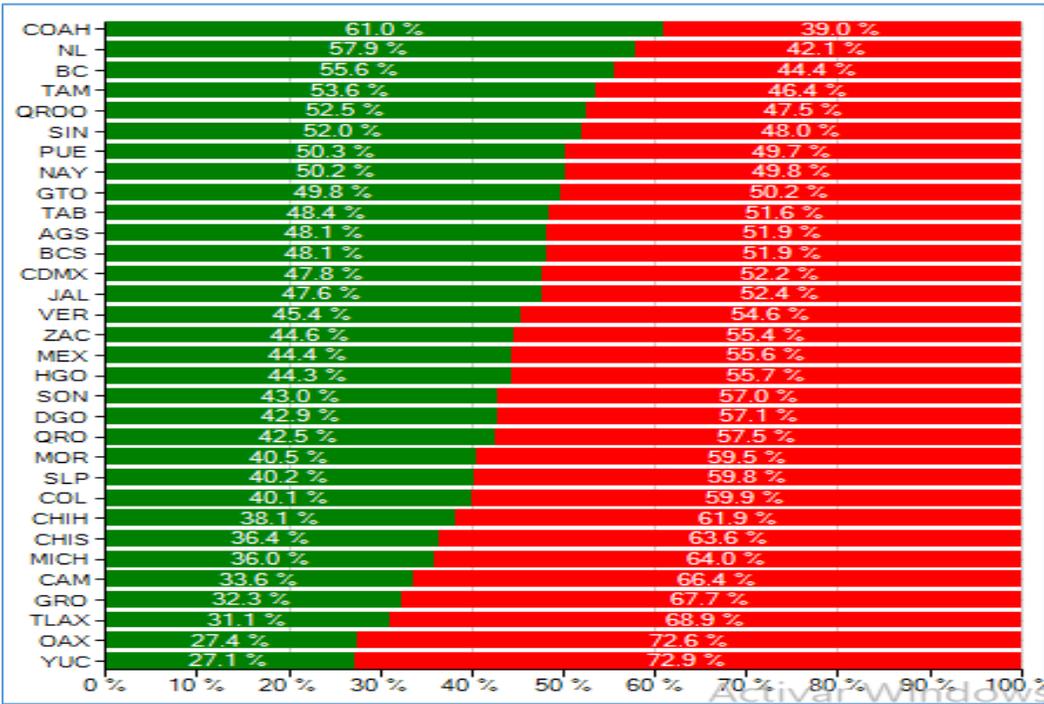


Fig. 4 Distribución de pacientes por control de la enfermedad (OMENT. 2019)

## **Gasto que representa la diabetes mellitus.**

El costo a nivel mundial, así como las enfermedades concomitantes y complicaciones de la diabetes asciende a los \$376,000 mil millones de dólares. Para 2030 este número ascenderá a los 490,000 mil millones de dólares (FDI, 2010).

### **1.1.2 Definición**

La diabetes es una grave enfermedad crónica que se desencadena cuando el páncreas no produce suficiente insulina (una hormona que regula el nivel de glucosa, en la sangre), o cuando el organismo no puede utilizar con eficacia la insulina que produce (OMS, 2016).

La diabetes es un importante problema de salud pública y una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) seleccionadas por los dirigentes mundiales para intervenir con carácter prioritario. En las últimas décadas han aumentado sin pausa el número de casos y la prevalencia de la enfermedad (OMS, 2016).

La diabetes mellitus (DM) engloba varios padecimientos crónico-degenerativos que actualmente han ido en aumento y constituyen un serio problema de salud pública (Olvera Granados, C. P, y col. 2008).

Las hiperglucemias se clasifican principalmente en la DM de tipo 1 (también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia) se caracteriza por una producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona. Se desconoce aún la causa de la diabetes de tipo 1 y no se puede prevenir con el conocimiento actual. Sus síntomas consisten, entre otros, en excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia), hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio. Estos síntomas pueden aparecer de forma

súbita. Por otro lado, la DM de tipo 2 (también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta) se debe a una utilización ineficaz de la insulina. Este tipo representa la mayoría de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo y a la inactividad física. Los síntomas pueden ser similares a los de la diabetes de tipo 1, pero a menudo menos intensos (OMS, 2016).

### 1.1.2.1 Síntomas

Los niveles altos de glucosa en la sangre pueden causar diversos síntomas, como:

- Visión borrosa
- Sed excesiva (polidipsia)
- Fatiga
- Micción frecuente (poliuria)
- Hambre (polifagia)
- Pérdida de peso
- Cambio de ánimo



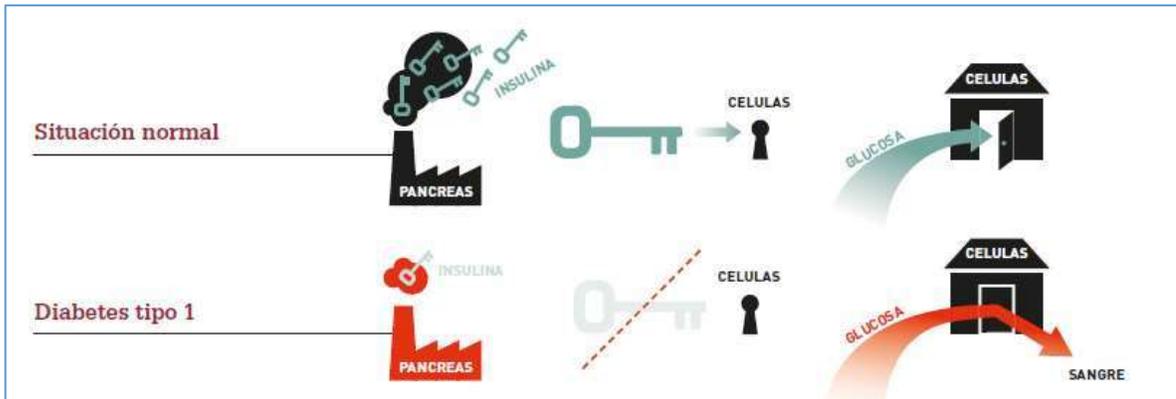
**Fig. 5** Síntomas de la diabetes (Tomado de ADA, 2018).

Debido a que la diabetes tipo 2 se desarrolla lentamente, algunas personas con niveles altos de glucemia son completamente asintomáticas. Los síntomas de la diabetes tipo 1 se desarrollan en un período de tiempo corto y las personas pueden estar muy enfermas para el momento del diagnóstico (OMS, 2016).

### 1.1.3 Tipos de diabetes.

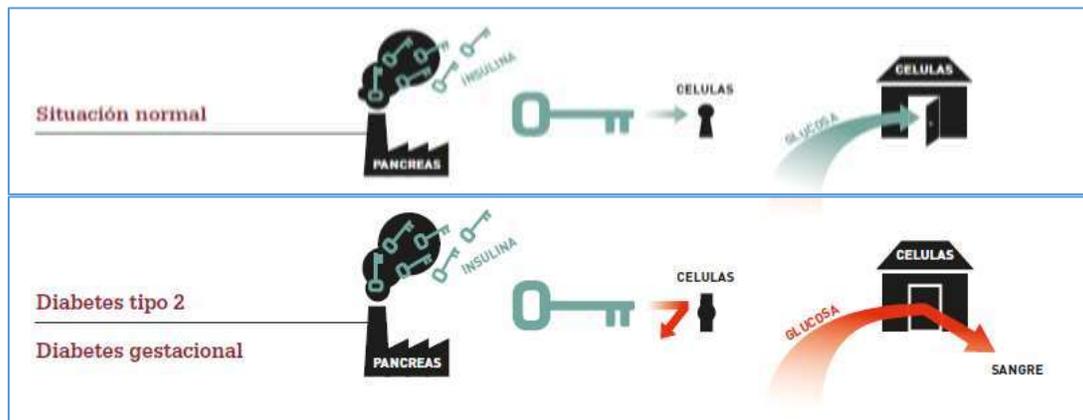
Hay tres grandes tipos de diabetes. Las causas y los factores de riesgo son diferentes para cada tipo (Asociación Americana de Diabetes (ADA), 2018):

- *Diabetes tipo 1*: puede ocurrir a cualquier edad, pero se diagnostica con mayor frecuencia en los niños, los adolescentes o adultos jóvenes. En esta enfermedad, el cuerpo no produce o produce poca insulina y se necesitan inyecciones diarias de esta hormona. La causa exacta se desconoce (Asociación Americana de Diabetes, 2018).



**Fig. 6** Diabetes tipo 1 (Tomado de Atlas de la Diabetes de la FID, 2013)

- *Diabetes tipo 2*: corresponde a la mayoría de los casos de diabetes. Generalmente se presenta en la edad adulta, aunque ahora se está diagnosticando en adolescentes y adultos jóvenes debido a las altas tasas de obesidad. Muchas personas con este tipo de diabetes no saben que padecen esta enfermedad (Asociación Americana de Diabetes, 2018).



**Fig. 7** Diabetes tipo 2 y Diabetes gestacional (Tomado de Atlas de la Diabetes de la FID, 2013).

- *Diabetes gestacional*: la glucosa es alta en la sangre que se presenta en cualquier momento durante el embarazo en una mujer que no tiene diabetes (Asociación Americana de Diabetes, 2018).

#### **1.1.4 Complicaciones metabólicas a largo plazo.**

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica en la cual los niveles de glucosa en la sangre aumentan. El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas que transcurren en todos los seres vivos, en orden al mantenimiento de la vida, al crecimiento de los individuos y a la reproducción de los mismos. Los diabéticos presentan un trastorno del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, debido a diversos factores: puede resultar como consecuencia de una invasión viral, puede deberse a una predisposición genética, la obesidad puede ser un factor de riesgo, y puede tener como causa otros factores o la combinación de varios de ellos (pancreatitis, pancreatectomía, patología en glándula tiroides y en glándulas suprarrenales, etc.) (Carrillo Aguado, J. L., Perales Acosta, L. H. R., 2000).

En la diabetes tipo 1 las alteraciones del metabolismo se deben a la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas. A medida que ésta progresa, los niveles de insulina decrecen produciendo un aumento en la concentración de glucosa en la sangre:

- La falta de la hormona produce una disminución de la entrada de glucosa al músculo y al tejido adiposo.
- Por otro lado, la disminución de insulina en el hígado, así como el relativo exceso de glucagón, producen un aumento en la degradación del glucógeno

y de la glucogénesis, lo que ocasiona un incremento adicional de la glucosa sanguínea.

- El exceso en la concentración de glucosa en sangre sobrepasa la capacidad de reabsorción en el riñón y como consecuencia se elimina la glucosa por orina arrastrando consigo agua y sales.
- La escasez de glucosa como fuente de energía da como consecuencia la necesidad de utilizar las grasas y degradar las proteínas, principalmente musculares, para la obtención de aminoácidos.
- La degradación proteica aumenta la producción de urea y un balance negativo de nitrógeno y la lipólisis también se favorece por la falta de glucosa en el adipocito, además, el aumento relativo de glucagón produce la salida de ácidos grasos, parte de los cuales se utilizan como combustible y /o se transforman a cuerpos cetónicos en el hígado (Fernández M., 1996).

En la forma más avanzada de la diabetes tipo 1, el catabolismo del glucógeno, proteínas y en especial de lípidos, sobrepasa las necesidades nutricionales del paciente y ocasiona un exceso de cuerpos cetónicos, provocando cetoacidosis y coma diabético. La cetoacidosis es una característica clínica diferencial entre la diabetes tipo 1 y 2; la diferencia radica en la cantidad de insulina producida entre los dos tipos del padecimiento, aparentemente, la pequeña cantidad de insulina producida en la diabetes de tipo 2 es capaz de bloquear la producción de ácidos grasos a partir de la lipólisis, lo que evita la sobreproducción de cuerpos cetónicos (Brito M., y col. 1996).

En general, los desarreglos metabólicos en la diabetes tipo 1 se explican por la falta de insulina, sin embargo, las bases metabólicas de la diabetes tipo 2 no son tan evidentes (Fernández M., 1996).

Bajo el término de complicaciones crónicas de la DM se agrupa un conjunto de procesos causados a largo plazo por las alteraciones metabólicas características de la DM. Una clasificación de dichas complicaciones se puede observar en la siguiente tabla 2 (López de la Torre, M. y col., 1997):

**Tabla 2. Clasificación de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.**

|  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"><li><b>1. Complicaciones microvasculares</b><ul style="list-style-type: none"><li>• Nefropatía diabética.</li><li>• Neuropatía diabética.</li><li>• Retinopatía diabética.</li></ul></li><li><b>2. Complicaciones macrovasculares</b><ul style="list-style-type: none"><li>• Arteriopatía periférica.</li><li>• Enfermedad cerebrovascular.</li><li>• Cardiopatía isquémica.</li><li>• Miocardiopatía diabética.</li></ul></li><li><b>3. Complicaciones no vasculares</b><ul style="list-style-type: none"><li>• Oculares: glaucoma, cataratas.</li><li>• Renales: necrosis papilar renal, infecciones urinarias.</li><li>• Cutáneas.</li><li>• Determinadas formas de neuropatía.</li></ul></li></ol> |
|--|

(López de la Torre, M. y col., 1997).

Las alteraciones metabólicas de la Diabetes mellitus son:

**1) La microangiopatía**, esto es, los problemas circulatorios causados por el daño de la pared de vasos sanguíneos pequeños por glicosilación proteica (aumento de glucosa en la sangre que se combina con las proteínas debido a un tratamiento inadecuado) que altera las funciones de la capa interna de los vasos sanguíneos,

matando a las células por falta de oxígeno y los tejidos se empiezan a lesionar, alterándose su función, por ejemplo: insuficiencia renal, retinopatía, y gangrena en miembros inferiores (gangrena seca, debido a que no hay microbios, y húmeda en caso de infección) (Carrillo Aguado, J. L., Perales Acosta, L. H. R., 2000).

**2) La macroangiopatía**, que afecta la pared de los grandes vasos, y forma aterosclerosis, placas de ateromas que cierran la circulación. En este caso, la glicosilación se produce sobre las lipoproteínas, se obstruye la luz o flujo del vaso, una placa de ateroma obstruye un tramo del vaso por dentro (algo parecido a lo que ocurre cuando hay colesterol, en cuyo caso es arterioesclerosis) y puede producir infarto al miocardio (Carrillo Aguado, J. L., Perales Acosta, L. H. R., 2000).

Las complicaciones principales de la diabetes mellitus son:

**a) Retinopatía.** Causada por la microangiopatía (según explicamos líneas arriba), que altera todas las células del organismo. El exceso de glucosa provoca glicosilación de las proteínas y altera la retina. Se presentan pequeñas hemorragias en la parte inferior de la retina, que la van desprendiendo de su sitio anatómico y se pierde la visión. Es una complicación a largo plazo, que tarda aproximadamente 15 años en presentarse. Hay que tener mucho cuidado en mantener los niveles adecuados de glucosa para retardarla o evitarla, ya que provoca ceguera irreversible. El control se favorece con determinaciones trimestrales de hemoglobina glicosilada.

**b) Nefropatía**, alteración patológica del riñón, que por la microangiopatía cae progresivamente en insuficiencia renal hasta que alcanza una fase terminal, que deriva en la muerte. Es debido a esta complicación que se aplican tratamientos

como diálisis o hemodiálisis y trasplantes renales para corregir la falla del riñón. Hay dos riñones, se puede vivir con uno, pero en el caso de la microangiopatía, se lesionan ambos riñones.

**c) Coma diabético.** El mal manejo en el control del nivel adecuado de glucosa en la sangre deriva en falta de insulina o en insulina de baja calidad, lo que ocasiona el aumento del nivel de la glucosa plasmática, que no es introducida en la célula. La célula es como una fábrica que necesita de combustible, y si el energético (glucosa) no es aprovechado, se encuentra situado fuera de la célula, lo que aumenta la presión osmótica, que atrae el agua de la célula, la deshidrata y la obliga a quemar las grasas por falta de otros nutrientes. Lo que ocurre en seguida es la obtención de glicerol y ácidos grasos libres (por la degradación de las grasas), que metabolizan a la formación de cuerpos cetónicos de naturaleza ácida y sobreviene un desequilibrio del pH (potencial de hidrógeno, que indica el equilibrio o la dominación de ácidos o bases en un ambiente dado), lo que altera la homeóstasis o equilibrio general del organismo. La glucosa en sangre atrae agua, que es eliminada por el riñón, lo que produce deshidratación y sale el azúcar en la orina, que es mucha, lo que le provoca polifagia y polidipsia al paciente, debido a una necesidad de recuperar energía. La alteración metabólica producida así se denomina cetoacidosis diabética, y cuando altera el sistema nervioso y provoca una encefalopatía, se produce una pérdida de conciencia, que se denomina estado de coma. Cuando a través del coma diabético se llega a la muerte, se trata de un coma hiperglucémico.

**d) Infarto al miocardio.** Este es debido a la obstrucción de alguna de las arterias coronarias por placas de ateroma, provocando hipoxia y muerte en una zona del músculo cardíaco, lo que en consecuencia altera la función primordial del corazón.

**e) Coma hipoglucémico.** Otra alteración metabólica aguda de la diabetes mellitus ocurre cuando se inyecta insulina o se dan medicamentos hipoglucemiantes (que bajan el nivel del azúcar en la sangre) en exceso, la glucosa se metaboliza en las células y se baja el nivel de glucosa en sangre. Se cae en un coma por hipoglicemia, más peligroso aún que el coma diabético, por baja cantidad de azúcar. El paciente está inconsciente, tembloroso, causado por excesiva dosificación de insulina o hipoglucemiantes. El diagnóstico se determina con una glicemia, donde se establece una baja alarmante en el nivel de glucosa (Carrillo Aguado, J. L., Perales Acosta, L. H. R., 2000).

#### **1.1.5 Diabetes y estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo (EOx) es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas con respecto a los antioxidantes a favor de los primeros con implicaciones en la homeostasis del organismo por daño a nivel celular, tisular y sistémico. El EOx ha sido asociado con el mecanismo fisiopatológico de más de 100 enfermedades crónico-degenerativas, entre las que se pueden destacar a la aterosclerosis, el cáncer, la artritis reumatoide, enfermedad de Alzheimer y la DM (Rosado Pérez, J. y col. 2007).

Los RL no son moléculas que deban considerarse estrictamente como dañinas, ya que se generan de manera natural durante el metabolismo, el proceso de respiración, en la fagocitosis, en las reacciones donde intervienen enzimas de la familia de las NADPH oxidasas asociadas al metabolismo del ácido araquidónico como la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, el citocromo P450 y como respuesta a la



lugar de desintoxicar a las células; condiciones como la presencia de iones metálicos reductores, compuestos derivados de nitrógeno o deficiencia en los donadores de electrones necesarios para remover o estabilizar a los RL puede causar un exceso de éstos (Figura 8) (Halliwell, y col. 1992).

El medio por el cual el organismo contrarresta la acción potencialmente nociva de las especies oxidantes son los sistemas antioxidantes y su eficiencia depende de su capacidad de actuación tanto intra como extracelularmente. Así, un antioxidante se define como aquella sustancia que presente en bajas concentraciones en relación a un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de tal sustrato. Los antioxidantes utilizan varios mecanismos de acción y con base en esto se han clasificado en primarios y secundarios (Tabla 3) (Rosado Pérez, J. y col. 2007).

**Tabla 3. Clasificación de los diferentes antioxidantes.**

| Antioxidantes primarios.   | Antioxidantes secundarios   |   |
|----------------------------|-----------------------------|---|
| Enzimas                    | Proteínas                   |   |
| Superóxido dismutasa (SOD) | Transferrina                | Vitamina C<br>Vitamina E  |
| Glutati6n peroxidasa (GPx) | Ceruloplasmina              | Vitamina A y carotenos  |
| Catalasa (CAT)             | Albúmina<br>Metalotioneínas | Ácido úrico<br>Bilirrubinas<br>Albúmina<br>Melatonina<br>Estr6genos |

(Rosado Pérez, J. y col. 2007)

Los antioxidantes primarios actúan en la prevención de la formación de los RL y en la captura de compuestos que propician su transformación en radicales más dañinos. Entre éstos encontramos a los end6genos como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutati6n peroxidasa (GPx), la SOD dismutasa

al radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual a su vez es descompuesto por la CAT o la GPx hasta agua; entre este tipo de antioxidantes también encontramos a las proteínas atrapadoras de metales que evitan la interacción de los radicales ya formados con los cationes metálicos para proteger a las células de generación del radical más dañino que es el hidroxilo (Niki E., 1999). Los antioxidantes secundarios actúan una vez formado el radical, evitan su propagación al cederle electrones y convertir a sí mismos en un radical menos reactivo y más fácil de eliminar, entre éstos hay endógenos como los estrógenos, ácido úrico y bilirrubinas o exógenos como las vitaminas (Niki E, 1999).

#### 1.1.5.1 Mecanismos por los que se incrementa el estrés oxidativo (--hiperglucemia--)

En la tabla 4 se presentan algunas evidencias de la presencia de EOx en los sujetos diabéticos y su incremento en el caso de presentar complicaciones (Rosado Pérez, J. y col. 2007).

**Tabla 4. Evidencias de la relación entre el estrés oxidativo y la diabetes mellitus con y sin complicaciones.**

| <b>Autor-año</b>         | <b>Objetivo</b>  | <b>Universo de estudio</b>                  | <b>Parámetros determinados</b>                                    | <b>Hallazgos</b>  |
|--------------------------|--|---|---|---|
| Caplés y cols. 2001      | Evaluar niveles de marcadores de EOx en diabéticos.          | Humanos                                     | MDA-TBA, actividad de SOD, CAT y GSH.                             | Niveles de MDA significativamente mayores en diabéticos, CAT Y GSH menores y SOD menor sin significancia. |
| Davidson y cols. 2002    | Determinar RL usando resonancia spin electrón en diabéticos. | Humanos                                     | Radicales libres, Hidroperóxidos, MDA-TBA, vitamina E, vitamina C | Sujetos con DM mayores niveles de RL y de hidroperóxidos, no hubo diferencia en MDA; Vit. E               |
| Vander Jagt y cols. 2001 | Evaluar marcadores de  | Humanos sanos, diabéticos s/complicaciones, | Organoperóxidos, MDA-TBA, vitamina E,                             | Organoperóxidos mayores en sujetos con DM, niveles de   |

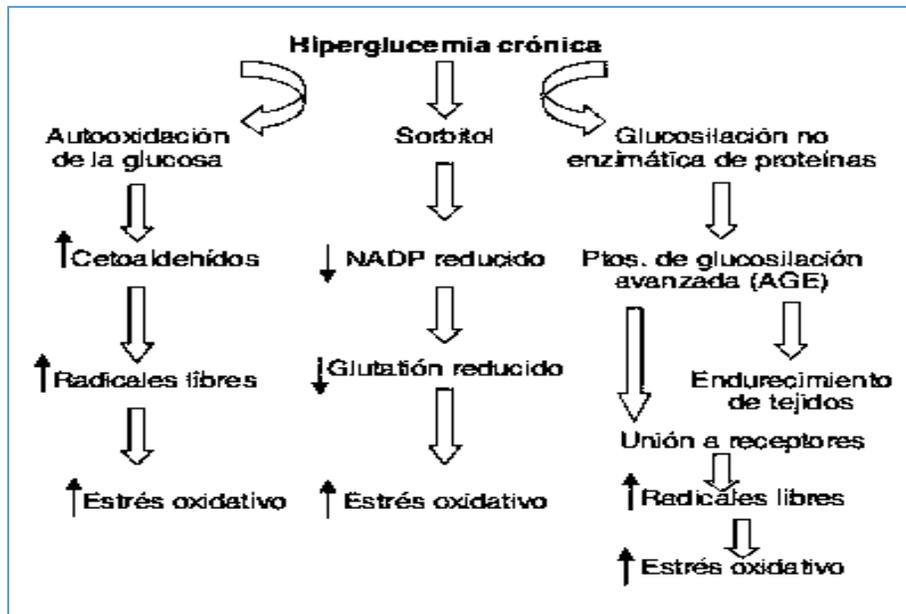
|                               |   |  |  |  |
|-------------------------------|---|--|--|--|
|                               | EOx en sujetos con DM1.   | diabéticos c/ complicaciones.  | vitamina C y GSH en leucocitos.  | TBARS y Vit. E sin diferencia, Vit. C y GSH menor en diabéticos al comparar con sanos.   |
| Varvarovska y cols.           | Confirmar presencia de EOx en niños con DM.   | Niños sanos, niños con DM.   | Actividad de SOD, GSH, daño al ADN (ruptura de hebras), capacidad de reparación. | Menor actividad de SOD y GSH en los diabéticos, no diferencia en el daño al ADN, mayor capacidad de reparación en diabéticos.                        |
| Bhatias y cols. 2003          | Evaluar EOx en pacientes con DM2 con y sin neuropatía.  | Humanos sanos, diabéticos c/neuropatía, diabéticos s/ neuropatía.            | MDA, nitritos, nitratos, actividad de SOD, GSH, CAT.                             | MDA mayor en diabéticos vs controles, en sanos nitritos menores y mayor SOD y CAT; CAT y GSH menor en DM c/nefropatía vs sanos y vs DM s/nefropatía. |
| Ziegler y cols. 2004          | Evaluar marcadores de EOx y relación con neuropatía.  | Humanos sanos, diabéticos c/neuropatía, diabéticos s/neuropatía.             | 8-isoprostaglandina anión superóxido, peroxinitrilo, vitamina C, vitamina E.     | EOx es mayor en sujetos con DM vs sanos, independientemente de la neuropatía, mayor grado de EOx en sujetos con neuropatía.                          |
| Saxena y cols. 2005           | Evaluar EOx e hipertrigliceridemia postprandial en sujetos con DM2.   | Humanos sanos, diabéticos c/complicación macrovascular y diabéticos si ésta. | TBAR, actividad de GSH y SOD eritrocitaria.                                      | Menor actividad de SOD y GSH en diabéticos, TBAR mayor en sujetos con complicaciones vs sujetos sin complicaciones o sanos.                          |
| Sakai y cols. 2003            | Evaluar efecto de especies reactivas de oxígeno (ERO) sobre secreción de insulina en células beta pancreáticas. | Cultivo celular MIN6, islotes pancreáticos de rata y humano.                 | ERO, secreción de insulina.  | Hiperglucemia inducida genera ERO mitocondriales, éstos inhiben la primera fase de secreción de insulina en células beta.                            |
| Blanco-Hernández y cols. 2004 | Determinar grado de EOx en adultos mayores con DM2 vs sanos.  | Ancianos con y sin DM2   | MDA-TBA, actividad SOD, GPx y capacidad antioxidante total (AT).                 | Actividad de SOD y AT menor en ancianos con DM2.   |

**EOx:** estrés oxidativo; **MDA-TBA:** malondialdehído-ácido tiobarbitúrico; **SOD:** superóxido dismutasa; **GSH:** glutatión; **CAT:** catalasa; **RL:** radicales libres; **DM:** diabetes mellitus; **GPx:** glutatión peroxidasa.  
(Rosado Pérez, J. y col. 2007)

Como muestran las evidencias, el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes se ve alterado en los sujetos diabéticos, independientemente del grupo de estudio, ya que se observa una disminución en la actividad de los antioxidantes, mientras se da un incremento de los productos de oxidación, el cual es detectable con técnicas más finas o cuando existe mayor daño e incluso complicaciones. Al respecto, se ha propuesto la determinación de los marcadores biológicos de estrés oxidativo (EOx) en los sujetos diabéticos como parte del protocolo diagnóstico y pronóstico, además de recomendar el uso de antioxidantes con fines preventivos y terapéuticos en estos enfermos (Villa Caballero L. y col., 2000). En este sentido, el estrés oxidativo (EOx) presente en los sujetos diabéticos se asocia con la hiperglucemia crónica que caracteriza a esta enfermedad, ya que ante un exceso de glucosa circulante se activan varias vías metabólicas no muy usuales en el organismo, lo que conduce a la generación de otros metabolitos entre los cuales se encuentran RL de oxígeno (Ceriello A. 2003).

De lo anterior, se han descrito varias rutas metabólicas vinculadas con el estrés oxidativo (EOx) e implicadas en las complicaciones de la diabetes mellitus 2, entre ellas encontramos la ruta del sorbitol (o de la aldosa-reductasa), la de la glucosilación no enzimática de proteínas, la auto-oxidación de la glucosa, la modificación de la actividad de la protein-quinasa C, la pseudohipoxia, el metabolismo alterado de lipoproteínas y la alteración vía citocinas (Gugliucci, 2000).

De entre todas las mencionadas, las vías de la auto-oxidación de la glucosa, la del sorbitol y la glucosilación no enzimática de proteínas han sido las más estudiadas (Figura 9).



**Fig. 9** Principales vías metabólicas activadas por la hiperglucemia crónica vinculadas con el desarrollo de estrés oxidativo en sujetos diabéticos (Gugliucci, 2000).

Durante la auto-oxidación de la glucosa se generan productos oxidantes a partir de la enolización de la glucosa (forma acíclica, principalmente en solución alcalina), de entre ellos se ha demostrado que el gliceraldehído en presencia de metales pesados, como el  $\text{Fe}^{+2}$ , puede formar el radical anión superóxido, y éste, como se ilustra en la figura 8 puede ser convertido en agua a través de las enzimas antioxidantes o generar otros radicales más dañinos dependiendo de las condiciones (Robertson P. R. y col., 2004).

Con relación a la vía del sorbitol, se propone que, dados los niveles altos de glucosa circulantes en la sangre, se sigue la vía metabólica de la enzima aldosa reductasa, ésta es de baja afinidad a concentraciones normales de glucosa, genera sorbitol a partir de la glucosa y utiliza al NADPH (nicotinamida adenindinucleótido fosfato)

como cofactor. Debido a que el potencial antioxidante del glutatión depende del suministro de NADPH (pues lo requiere para su regeneración), el flujo de este cofactor por otra vía, como la del sorbitol, altera el balance oxidantes-antioxidantes hacia el lado de los primeros propiciando estrés oxidativo (EOx) (Gugliucci A., 2000). Además, se ha demostrado que el sorbitol así generado tiene efectos sobre la fisiología de las células, que toman libremente la glucosa (y que contienen la enzima aldosa reductasa) como son el lente del cristalino, las neuronas, los glóbulos rojos y las nefronas, que sufren cambios osmóticos y en la permeabilidad por el incremento de sorbitol, propiciándose la opacidad en el cristalino, la disminución en la velocidad de conducción nerviosa, alteraciones de las funciones de la nefrona, etc. complicaciones típicas de los pacientes diabéticos (Triana M. M., 2001).

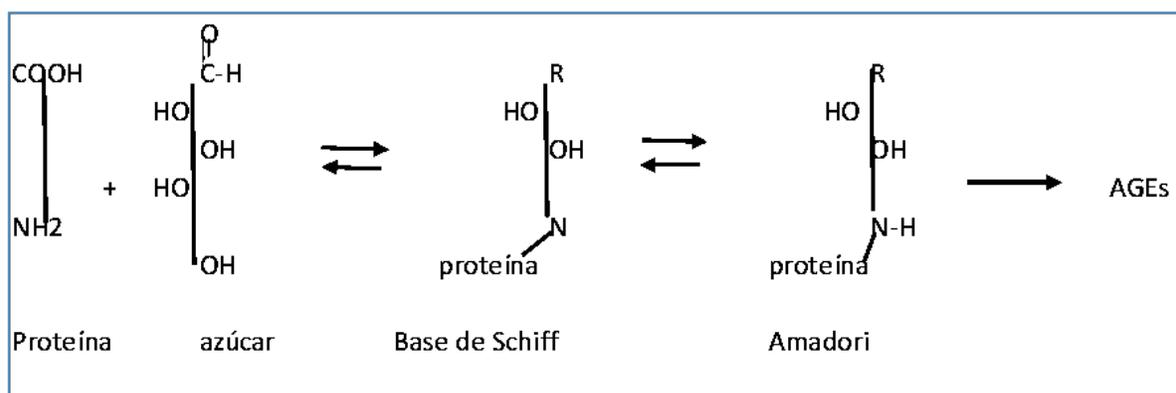
#### **1.1.5.2 Productos de Glicación Avanzada**

Los productos finales de glicación avanzada (advanced glycation end products, AGEs) son un grupo heterogéneo de moléculas generadas por medio de reacciones no enzimáticas de glicación y de oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Carvajal, C., 2015).

Los AGEs son un espectro de compuestos heterogéneos que derivan de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que son glicados y oxidados en forma no enzimática en un proceso llamado reacción de Maillard (Hegab, Z. y col., 2012). La glucosa tiene un papel primordial en el proceso debido a su alta concentración en el plasma, aunque otros azúcares reductores son implicados también (fructosa, galactosa, manosa y xilosa) (Piarulli, F. y col., 2013).

La reacción de Maillard se inicia como una reacción entre el grupo carbonilo de un azúcar reductor y el grupo amino libre de una proteína, de un lípido o de un ácido nucleico y lleva a la formación de una Base de Schiff inestable. Esta reacción es reversible y requiere de pocas horas para ocurrir (Watkins, N. G. y col., 1985).

A través de varias semanas estos compuestos lábiles originan un producto Amadori más estable. Posteriormente y en plazo de meses a años una pequeña parte de los compuestos Amadori sufre otras reacciones irreversibles (oxidación, deshidratación y degradación) originando los AGEs, que son compuestos altamente estables (Figura 10) (Schalkwijk, C. & Miyata, T., 2012). En las proteínas los AGE se forman sobre residuos de lisina o arginina predominantemente (Ramasamy, R. y col., 2012). Además de la reacción de Maillard otras vías pueden originar los AGEs, como por ejemplo la auto-oxidación de la glucosa y la peroxidación de los lípidos que originan derivados dicarbonílicos a partir de un incremento del estrés oxidativo (Luevano, C. & Chapman, K., 2010).



**Fig. 10** Representación esquemática de la reacción de Maillard (Schalkwijk, C. & Miyata, T., 2012)

Químicamente hablando es una reacción que sucede en tres etapas, la **primera etapa** se da por la adición de un grupo amino primario (de una proteína o de fosfolípidos) al grupo carbonilo del azúcar, formándose una base de Schiff, este es un compuesto poco estable pero si no disminuye la concentración de glucosa circulante puede avanzar hacia la **segunda etapa** de la reacción con la formación de un compuesto que se ha llamado genéricamente como compuesto de Amadori, en el cual se da nuevamente un re-arreglo interno para mayor estabilidad pero que genera más carbonilos reactivos; hasta este punto la reacción es todavía reversible y puede regresar hacia la base de Schiff e incluso hasta la parte inicial si disminuye la concentración de glucosa; sin embargo, si la reacción no se revierte, los grupos carbonilos de los productos de Amadori son capaces de reaccionar nuevamente con grupos amino de proteínas y originar moléculas más grandes por el entrecruzamiento del azúcar con otras proteínas (**tercera etapa**), los compuestos así generados se han denominado productos finales de glicosilación no enzimática o AGEs que son estructuras fluorescentes, que se forman lentamente en reacciones fuertemente desplazadas hacia la derecha, es decir hacia la formación de los productos y que se ven propiciadas por la presencia de oxígeno y metales reductores (Flecha L. G., y col., 2000).

Esta reacción puede afectar la funcionalidad de las células, ya que la glicosilación afecta la actividad biológica de las proteínas, por medio de tres mecanismos generales: la modificación de proteínas extracelulares (de bajo recambio), el desencadenamiento de procesos intracelulares por unión a receptores extracelulares y alteraciones de proteínas intracelulares (Vlassara H., Palace M. R., 2002).

En los sujetos diabéticos, donde se conjuntan las condiciones para que se generen los AGEs, se ha descrito la unión de éstos a receptores específicos del tipo de las gammaglobulinas, en la superficie celular de macrófagos, monocitos y células endoteliales, desencadenando la liberación de RL de oxígeno y EOx (Flecha L. G., y col., 2000).

Es así como la hiperglucemia crónica se ha vinculado con el EOx en los pacientes diabéticos, en los cuales se han descrito niveles elevados de marcadores de oxidación, además de asociación con el control glucémico y los AGEs (Flecha L. G., y col., 2000).

Por otro lado, se ha vinculado al EOx con los niveles bajos de insulina en los pacientes diabéticos, ya que se ha demostrado que las células beta del páncreas no son inmunes al daño por los RL, así que ya instalada la enfermedad es posible que empeore la situación del sujeto diabético, dado que disminuye la secreción de insulina en el páncreas por interferencia de los RL sobre el proceso normal de producción y secreción de insulina (Rosado-Pérez, J., Mendoza-Núñez V. M., 2007).

## **1.2. Efectos sobre los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. Antioxidantes primarios y secundarios.**

Como se menciona anteriormente el estrés oxidativo (EOx) es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre la producción de radicales libres (RL) o especies reactivas con respecto a los antioxidantes a favor de las primeras con implicaciones en la homeostasis del organismo por daño a nivel celular, tisular y sistémico. (Rosado Pérez, J. y col. 2007).

Por lo que las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos celulares, ya que dichas reacciones involucran la transferencia de electrones que

producen RL (Sohal R. E., 1993). Esta situación es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. A estas defensas se les denomina *antioxidantes* y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interactuar con un RL. El antioxidante al colisionar con él, le cede un electrón oxidándose y transformándose en un RL débil no tóxico (Turnes J. 1994), (Rodríguez C, y col. 1995), (Montero E., 1996).

No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos, catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los RL. De lo dicho anteriormente se deduce que los antioxidantes pueden ser enzimáticos o no. Estos se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (ingresan a través de la dieta) (tabla 5) (Mayor-Oxilia, R. 2010).

**Tabla 5. Clasificación de los antioxidantes.**

| <b>Exógenos</b>   | <b>Endógenos<br/>No enzimáticos.</b>                                       |
|-------------------|--|
| Vitamina E (VE)   | Glutati6n. Coenzima Q  |
| Vitamina C (VC)   | Ácido ti6tico.   |
| Betacaroteno (BC) | Enzimáticos. Cofactor.   |
| Flavonoides       | Super6xido dismutasa (SOD), cobre, manganeso, zinc. Catalasa (CAT), hierro |
| Licopeno          | Glutati6n peroxidasa (GPX)<br>Selenio                                      |

(Mayor-Oxilia, R. 2010)

- A. Vitamina C: Neutraliza el ox6geno singulete. Captura radicales hidroxilo. Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
- B. Vitamina E: Neutraliza el ox6geno singulete. Captura radicales hidroxilo. Captura an6n super6xido. Neutraliza per6xidos.
- C. Betacarotenos: Neutraliza el ox6geno singulete ( átomo de ox6geno en un estado excitado).
- D. SOD: Eliminan el an6n super6xido.
- E. CAT y GPX: Previene la reducci6n del per6xido de hidr6geno para formar el radical hidroxilo (Jim6nez I. y col. 2000).

Dentro de los antioxidantes es importante destacar a ciertos oligoelementos cuya incorporación al organismo es necesaria por constituir parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes. Estos oligoelementos son: cobre, zinc, selenio, magnesio y hierro (Jiménez I. y col. 2000).

### 1.2.1 Mecanismo de defensa antioxidante del organismo.

Los mecanismos de defensa del organismo son variados, pero no suficientes para prevenir la oxidación. Un mecanismo de caída del antioxidante produciría un desbalance que podría causar efectos, llamado estrés oxidativo (Speisky H., 2006). En la tabla 6 se observa la función de las enzimas, que representan la importancia en la defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno (Veiga E. y col, 1997).

**Tabla 6. Mecanismos de defensa.**

| Mecanismo de defensa. | Referencias   | Función  | Participante   |
|-----------------------|---|--|--|
| <b>Enzimático</b>     | Conjunto de proteínas. Si bien los alimentos no contribuyen a las enzimas, contribuyen a los micros minerales requeridos para la biosíntesis de tales enzimas.          | Favorece la remoción de radicales libres de especies pro oxidante. | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzimas</li> <li>• Glutación peroxidasa</li> <li>• Catalasa</li> <li>• Superóxido dismutasa</li> </ul>  |
| <b>No enzimáticos</b> | Conjunto de moléculas que interactúa con los radicales libres. La mayor parte de las moléculas contribuyen a la defensa antioxidante, proviene de nuestra alimentación. | Defensa antioxidante en el organismo.                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha</math>-tocoferol (Vitamina E)</li> <li>• Ácido ascórbico (Vitamina C)</li> <li>• Beta caroteno o Provitamina A</li> <li>• Proteínas transportadoras de metales de transición.</li> <li>• Captadores de radicales libres (polifenoles)</li> </ul> |

(Veiga E. y col. 1997).

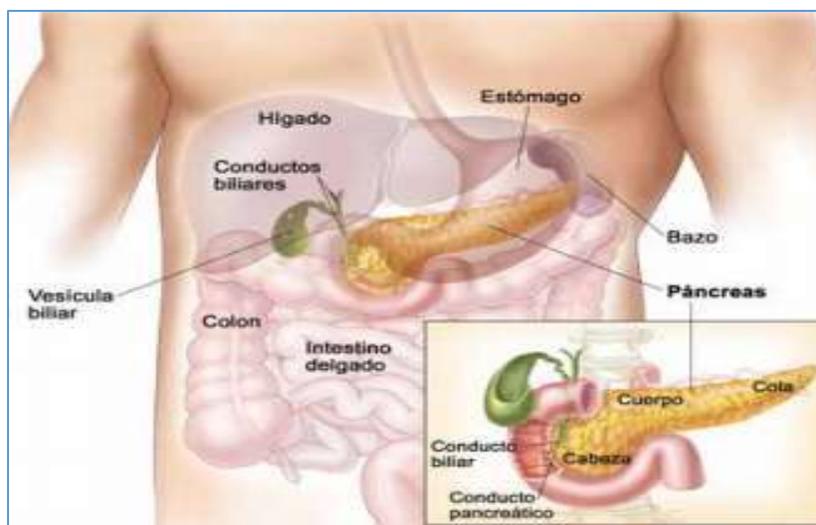
## **1.3. Páncreas**

### **1.3.1 Descripción del páncreas**

El páncreas es una glándula con forma de pera, que ocupa una posición profunda en el abdomen a nivel de la primera y segunda vértebras lumbares y por detrás del estómago, próximo al intestino delgado, el hígado, el bazo, y la vesícula biliar. Forma parte del contenido del espacio retroperitoneal. Mide entre 15 y 23 cm de largo, 4 de ancho y 5 de grueso, con un peso que oscila entre 70 y 150 g. Se divide en varias regiones llamadas cabeza, cuello, cuerpo y cola. Está en íntimo contacto con estructuras vasculares vitales como la vena cava inferior, la arteria aorta, y las arterias que irrigan el intestino y el hígado (Carrato Mena, A., 2017).

El páncreas posee cuatro partes bien diferenciadas: 1) La cabeza, que es la parte ancha que se encuentra en la parte derecha. 2) El cuello, que es la parte que une el cuerpo a la cabeza y se encuentra bajo el duodeno. 3) El cuerpo, que es la parte central del páncreas con forma de prisma de 3 caras. 4) La cola, que es la prolongación del cuerpo y se extiende hasta el bazo

Es un órgano muy difícil de palpar y en consecuencia no siempre se detectan sus anomalías a través de un examen físico (Carrato Mena, A., 2017).



**Fig. 11** Ubicación del páncreas en el cuerpo humano (Carrato Mena, A., 2017).

El páncreas tiene una parte exocrina cuya función es digestiva y una parte endocrina con funciones metabólicas (Carrato Mena, A., 2017):

- **Función exocrina:** Es fundamental en el proceso de la digestión. El páncreas secreta enzimas (las más conocidas la amilasa y lipasa) cuya función consiste en descomponer químicamente las grasas y proteínas ingeridas en pequeñas porciones que pueden ser absorbidas por el intestino. Por lo tanto, una de las primeras consecuencias de procesos que afectan la correcta excreción de estos enzimas, como determinados tumores pancreáticos o la pancreatitis crónica, es una rápida pérdida de peso y tendencia a la diarrea por falta de absorción de grasas y proteínas y presencia de grasas en las heces, respectivamente. La función exocrina se encuentra presente en todo el páncreas, aunque con un claro predominio en la cabeza pancreática (Carrato Mena, A., 2017).

- **Función endocrina o de producción de hormonas:** La más importante de ellas es la insulina, fundamental para la regulación de los niveles de glucosa en la sangre. Las células responsables de la producción de estas hormonas no se encuentran distribuidas de forma homogénea por todo el páncreas, sino que se concentran en grupos de células que se denominan islotes de Langerhans. A diferencia de la función exocrina, la función endocrina se concentra principalmente en el cuerpo y la cola del páncreas, si bien pueden hallarse “islotes de Langerhans” en todo el páncreas. Estos islotes de Langerhans o islotes pancreáticos son unos acúmulos de células que se encargan de producir hormonas como la insulina y el glucagón, con función netamente endocrina (Carrato Mena, A., 2017).

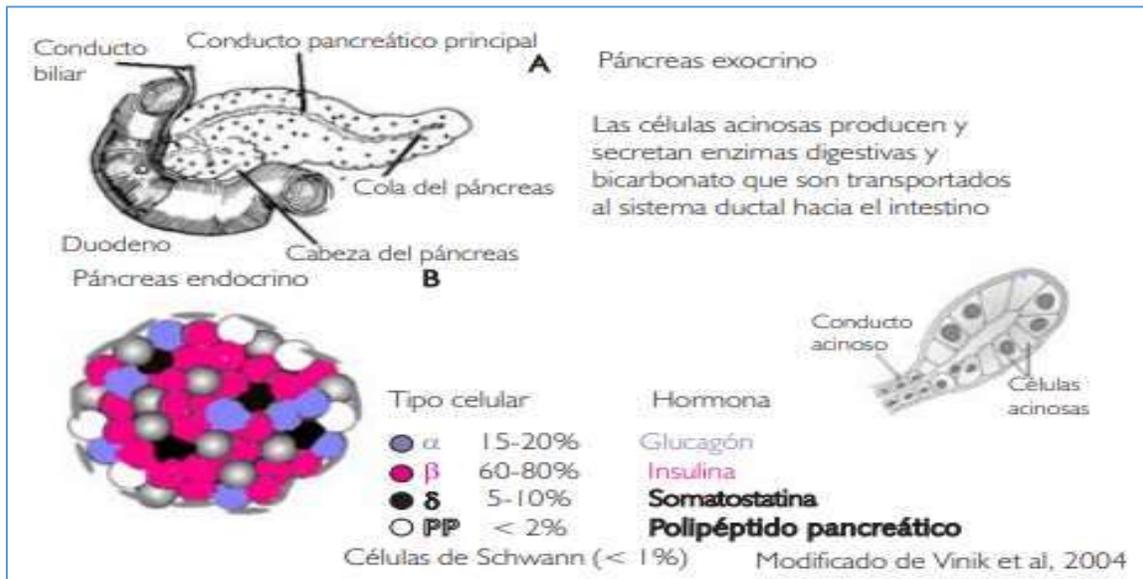
### **1.3.2 Tipos y funciones de las células que conforman al páncreas**

El páncreas está cubierto por una capa de tejido conectivo, rico en células mesoteliales, con finos tabiques que dividen a la glándula en lóbulos. Las células de los islotes están delimitadas en forma incompleta por una capa delgada de tejido conectivo reticular que se continúa en el interior de los islotes en escasa cantidad (Ross, M., y col. 1997)

El tejido endocrino adulto contiene cuatro tipos celulares diferentes, con mayor densidad en la zona de la cola. Estas células son: 1) Células productoras de insulina o  $\beta$ , que representan 70%; 2) Células productoras de glucagón o  $\alpha$ , que representan 20%; 3) Células productoras de somatostatina o  $\delta$ , que representan entre 5 a 10%, y 4) Las células productoras del polipéptido pancreático o PP, que abarcan alrededor de 2% (Olvera G. C. P. y col. 2008).

Existen algunos tipos celulares secundarios, las células productoras del polipéptido intestinal vasoactivo (VIP o células DI) y las células secretoras mixtas (EC o enterocromafines). Estos grupos están contenidos en una estructura altamente organizada, donde las células  $\beta$  están en el interior del islote y el resto de los grupos celulares se encuentra en la periferia. La organización del aporte vascular permite llevar la sangre del núcleo a la periferia y se le conoce como BAD ( $\beta$ - $\alpha$ - $\delta$ ) por su forma centrífuga de aporte vascular (Olvera G. C. P. y col. 2008).

Otro tipo celular, recientemente encontrado en la periferia del islote pancreático, es el parecido a las células neuronales de Schwann, ocupan menos de 1% y se cree que podrían ser importantes en la regeneración pancreática (Olvera G. C. P. y col. 2008).

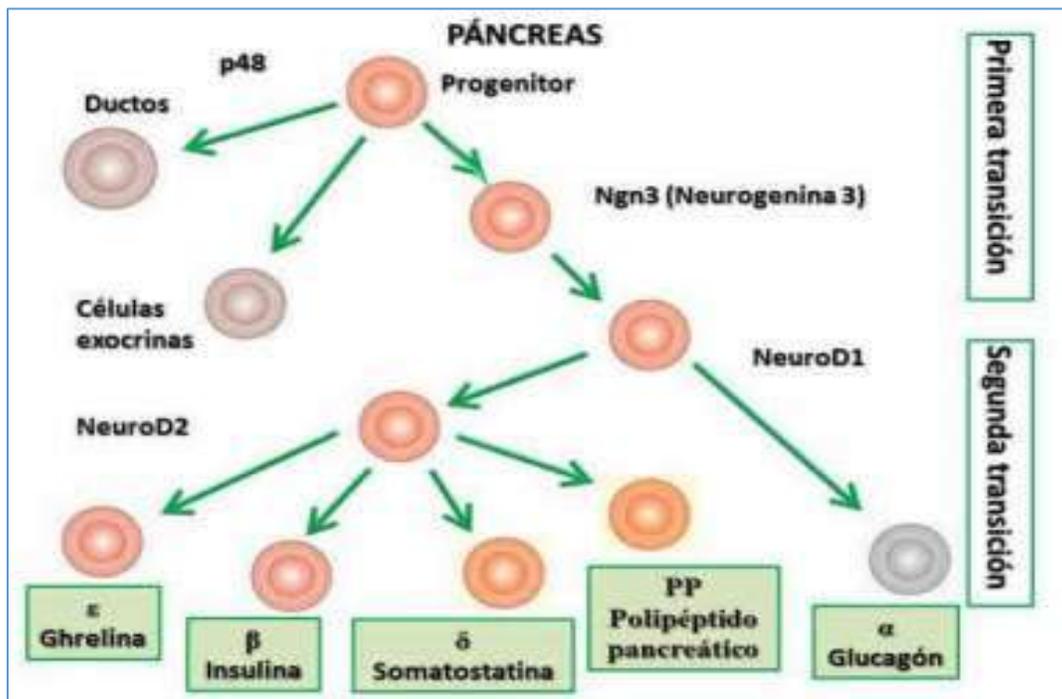


**Fig. 12** Representación de la anatomía e histología pancreática (Olvera G. C. P. y col. 2008).

Se postula que existen dos fases en la embriogénesis pancreática: la primera transición y la segunda transición (Brandan, N. C. y col. 2011).

En la *primera transición*, a partir de células madre pluripotenciales del endodermo se inicia la diferenciación en células madre exocrinas, que formarán conductos y acinos, y en células madre precursoras de las células neuroendocrinas.

En la *segunda transición* se inicia el proceso de diferenciación desde la célula pluripotencial neuroendocrina en los distintos tipos celulares endocrinos: células  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , PP y  $\epsilon$ . Este proceso está modulado por factores de transcripción que favorecen la diferenciación endocrina (Pdx1, PAX, neurogenina 3) y otros que la bloquean (señales de Noct) (Brandan, N. C. y col. 2011).



**Fig. 13** Representación de la embriogénesis pancreática (Brandan, N. C. y col. 2011).

### **1.3.3. Daños en Páncreas provocados por la diabetes**

El páncreas es un órgano situado en el abdomen donde se encuentra un grupo de células, llamadas células beta, que desempeñan un papel esencial en el control de los niveles de glucosa en sangre (FMD, 2015).

Las células beta tienen la capacidad de detectar cambios en los niveles de glucosa en sangre, de forma que cuando aumenta la glucosa, estas células incrementan la producción de insulina. En el ser humano, la insulina es la única hormona que puede hacer descender los niveles de glucosa en sangre (FMD, 2015).

De una u otra manera, la alteración de la función de las células beta está presente en todos los tipos de diabetes mellitus (FMD, 2015).

En la diabetes tipo 1 las células beta son destruidas y, por tanto, se produce una carencia absoluta de insulina. En la diabetes tipo 2, el factor inicial es la resistencia a la insulina. En este caso, las células beta, al principio, si producen insulina adecuadamente, pero esta insulina no es capaz de ejercer correctamente su acción y actuar sobre el músculo, hígado o tejido graso para disminuir la glucosa en la sangre (FMD, 2015).

### **1.3.4 Pérdida de Islotes pancreáticos en DM-1**

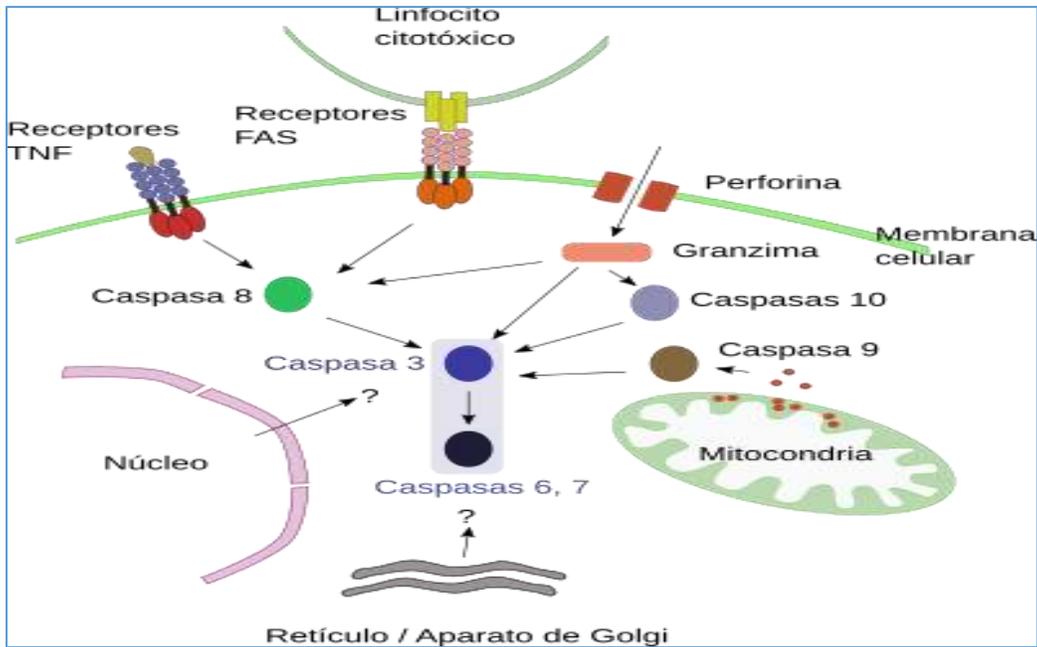
Los mecanismos de destrucción o muerte de las células  $\beta$ -pancreáticas son diversos, pero involucran una respuesta autoinmune mediada por anticuerpos específicos contra proteínas de las células  $\beta$ , así como la actividad directa de células

inmunes, como células T citotóxicas (CTc) y *natural killer* (NK) (Cervantes-Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013).

En el diagnóstico de diabetes tipo 1, los primeros anticuerpos detectados son contra insulina. Los auto anticuerpos pueden ser transferidos desde la madre diabética tipo 1 al feto durante el embarazo. Los anticuerpos contra insulina permanecen en el neonato por un año, y los dirigidos contra GAD (descarboxilasa del ácido glutámico), hasta más de 18 meses. La destrucción de las células  $\beta$  se asocia principalmente con la activación de dos vías apoptóticas: la vía por la perforina-granzima y la vía del ligando Fas (FasL) (Cervantes-Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013).

#### **1.3.4.1 Vía por la perforina/granzima.**

Los linfocitos T citotóxicos son capaces de matar a células que contienen patógenos mediante la activación de los receptores de muerte y disparar el proceso apoptótico. Sin embargo, existe otra vía mediante la cual crean inicialmente un poro en la membrana e introducen una molécula que activarán la vía apoptótica en el propio citosol. Los linfocitos T citotóxicos poseen unos gránulos que contienen dos tipos de proteínas: las perforinas y las granzimas. El contenido de estos gránulos es excitado cuando el linfocito detecta la presencia de una célula infectada o cuando la reconoce como tumoral. La perforina se insertará en la membrana de la célula diana y creará un poro por el cual entrarán en el citoplasma las granzimas. La granzima (hay dos tipos, A y B) activará a las caspasas-10 y 3 y también estimulará a la mitocondria para que se inicie el proceso apoptótico como si de una señal interna se tratara (Megías, M. y col. 2017).



**Fig. 14** Principales vías de iniciación de la apoptosis (Megías, M., 2017).

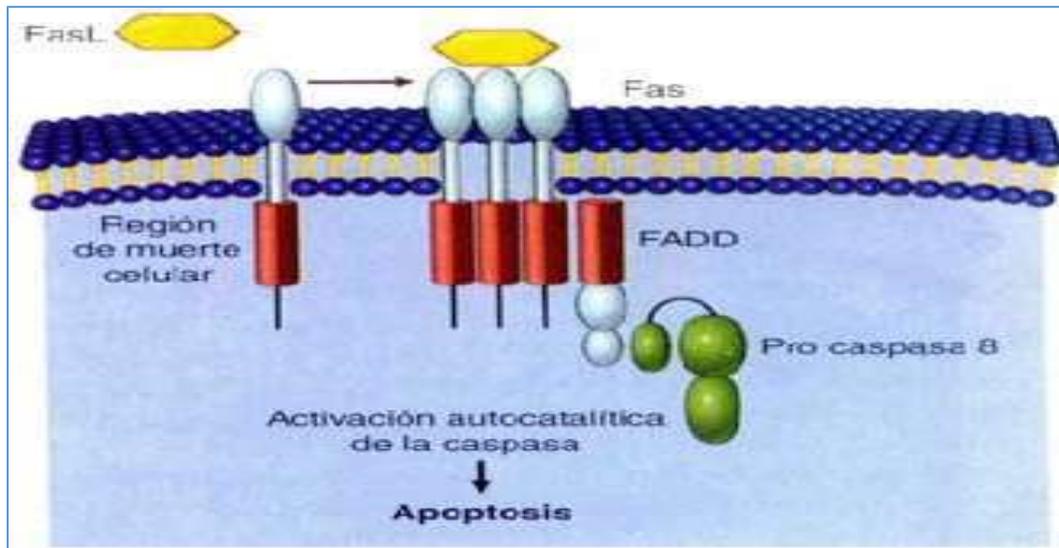
#### 1.3.4.2 Vía del ligando Fas (FasL):

El ligando Fas (FasL o CD95L) es una citoquina que se une al receptor Fas, son proteínas pertenecientes a la familia FNT, que juega un papel primordial en la inducción de apoptosis celular (Mountz J. D. y col. 1999). Se expresa en linfocitos T activados, en células NK, en neuronas y en astrocitos.

Es la molécula efectora más importante de los linfocitos T citotóxicos y está implicada tanto en fenómenos de tolerancia inmunológica como en el suicidio de células T maduras estimuladas por antígeno; esto último con el fin de limitar las respuestas inmunes.

La relación FasL- Fas provoca el acoplamiento de la proteína adaptadora FADD (proteína con región de muerte asociada a Fas) y a su vez esta proteína se une a la caspasa iniciadora pro-caspasa 8 integrando así al complejo señalizador de inducción. Lo que conlleva a fragmentación de ADN y posteriormente a muerte

celular. Las células  $\beta$  expresan Fas en respuesta al ataque de las células inmunológicas auto reactivas (Magnusson C, Vaux DL. 1999).



**Fig. 15** Modelo de señalización mediado por Fas (Apoptosis y Ciclo celular. 2009).

### 1.3.5 Pérdida de Islotes de DM-2.

La mayoría de los triglicéridos del cuerpo se encuentran en el tejido adiposo (>95%), y la lipólisis determina el suministro de ácidos grasos sistémicos; la insulina y las catecolaminas son los principales reguladores de este proceso. La insulina tiene un efecto anti-lipolítico, y durante la diabetes se pierde, incrementa la lipólisis e induce hipertrigliceridemia mediante la producción de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), proceso que contribuye a la aterogénesis (Cervantes-Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013). Las cadenas largas de ácidos grasos en el plasma normalmente son reguladas por la insulina, y durante la resistencia a la insulina, incrementan y producen toxicidad de células  $\beta$  (lipotoxicidad), que junto con la toxicidad de la glucosa dan el fenómeno diabético (glucolipotoxicidad) (Cervantes-Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013).

El tejido adiposo tiene la capacidad de liberar diversas proteínas diabetogénicas como el TNF, la IL-6, leptina, adipocitocinas, resistina y ácidos grasos libres, los cuales incrementan en la obesidad y pueden afectar a las células  $\beta$ , mientras que la adiponectina disminuye. La leptina es una hormona sintetizada en el tejido adiposo; actúa en el centro de saciedad localizado en el hipotálamo, donde disminuye el apetito al inducir la sensación de saciedad; durante la obesidad, el receptor para leptina en el sistema nervioso se desensibiliza, lo cual evita la saciedad y favorece el incremento gradual en la ingesta de alimento (Cervantes-Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013).

Mientras tanto, en el páncreas la leptina puede inducir apoptosis en las células  $\beta$  porque inhibe la biosíntesis de insulina, incrementa reacciones inflamatorias y produce estrés oxidativo. Durante la diabetes autoinmune, la administración de leptina acelera el proceso diabetogénico, fenómeno que relaciona a la obesidad con la diabetes. La resistina produce aumento de citocinas como la IL-6 y TNF al activar el NF $\kappa$ B, mientras que la adiponectina es anti-inflamatorio por supresión de fosforilación de I $\kappa$ B y, por lo tanto, inactivación de NF $\kappa$ B (Cervantes-Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013).

En general, la pérdida en el equilibrio en la concentración local y sistémica de citocinas deletéreas y protectoras de la función de las células  $\beta$  culmina con la muerte celular.

La lipólisis es el proceso en el que los triglicéridos son hidrolizados a mono- y diglicéridos intermedios hasta ácidos grasos y glicerol mediante la activación de la lipasa sensible a hormona (HSL). La insulina estimula la lipasa de lipoproteína (LPL), que se encarga de fraccionar en partículas a las lipoproteínas unidas a

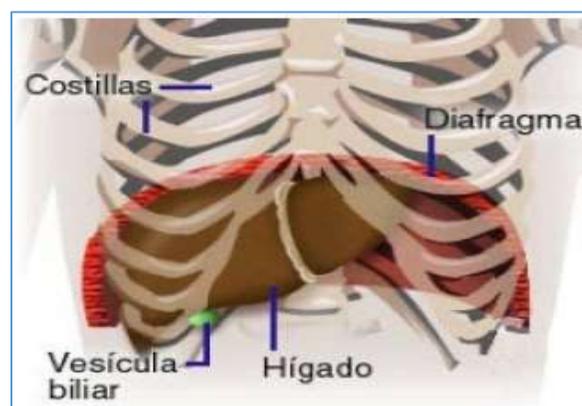
triglicérido para que, de esta manera, puedan incorporarse al tejido adiposo (Cervantes-Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013).

Algunos ácidos grasos libres y lipoproteínas son pro-apoptóticos para la célula  $\beta$ , otros son protectores, de tal manera que la exposición prolongada (por ejemplo, de palmitato) parece ser altamente tóxica, mientras que el ácido graso mono saturado (como el oleato) protege a la célula  $\beta$  de apoptosis inducida por el palmitato y la glucosa (Donath M. Y. y col. 2005).

## 1.4 Hígado.

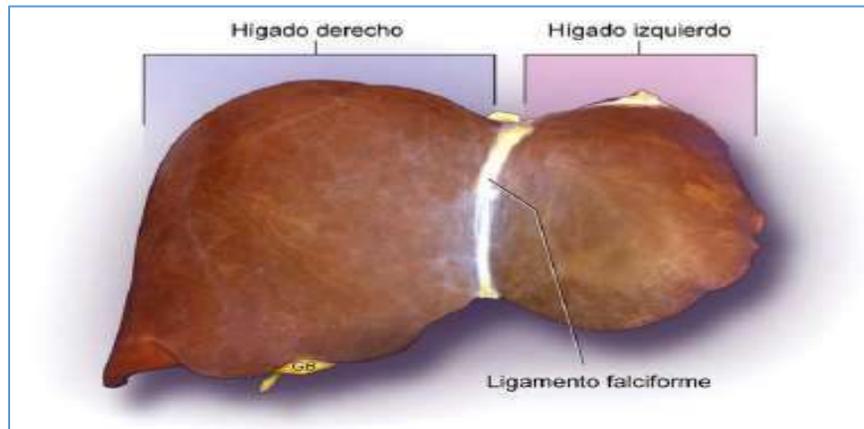
### 1.4.1 Descripción del hígado.

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano y uno de los más importantes en cuanto a la actividad metabólica que desarrolla en el organismo. El hígado está situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos (Fig. 16). (Franciscus, A., Highleyman, L. 2012).



**Fig. 16** Ubicación del hígado (Franciscus, A., Highleyman, L. 2012).

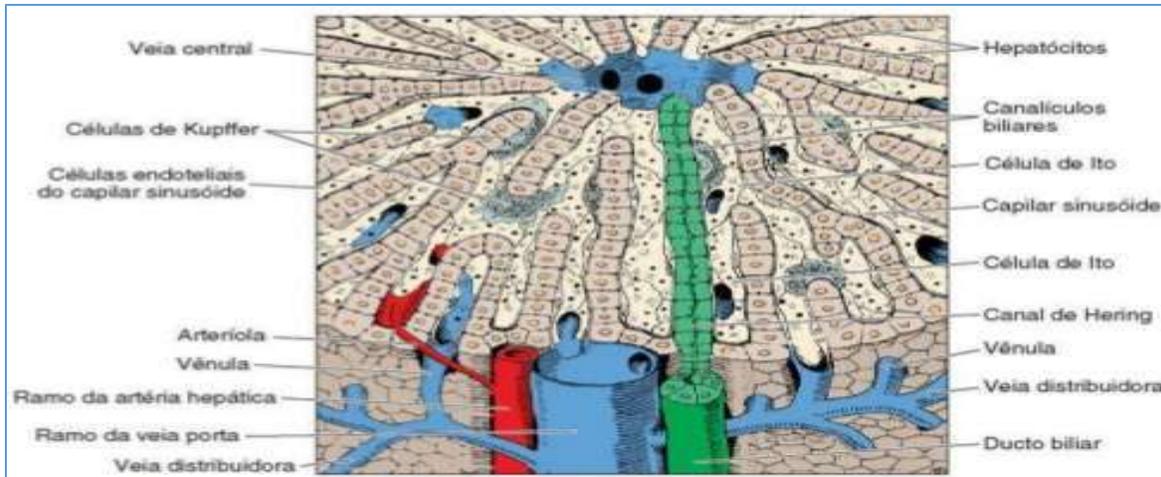
El hígado es un órgano de color marrón rojizo oscuro con forma de cono que pesa alrededor de 1200 a 1550 g (Fig. 17) (Lena Sibulesky, M. D., 2013).



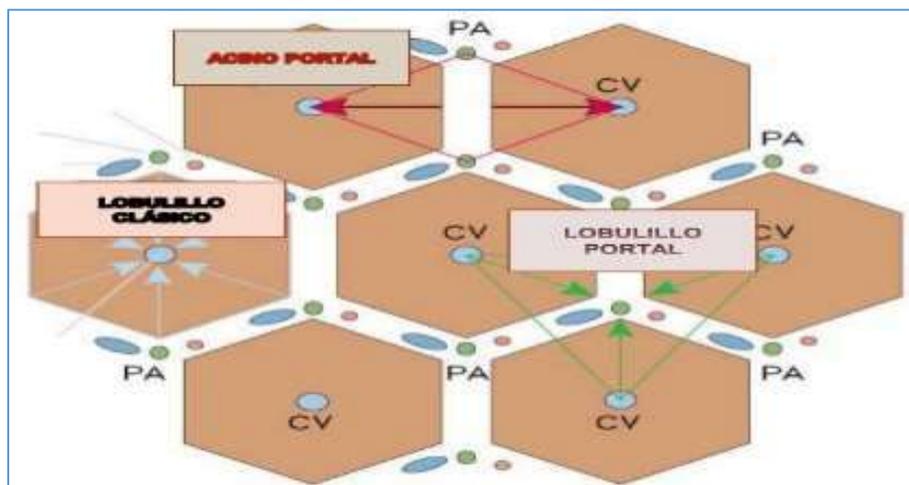
**Fig. 17** Anatomía morfológica del hígado (Lena Sibulesky, M. D., 2013).

El hígado recibe irrigación sanguínea a través de las siguientes dos fuentes: 1) La sangre oxigenada que circula hacia el hígado por la arteria hepática y 2) La sangre rica en nutrientes que llega al hígado por la vena porta hepática (Limardo, A. C., 2011).

El hígado contiene aproximadamente el 13% de la sangre total del cuerpo en todo momento. Consta de dos lóbulos principales. Estos están formados cada uno por ocho segmentos que contienen 1,000 lóbulos (lobulillos) (Fig. 18). Estos se conectan con pequeños conductos (tubos) que, a su vez, se conectan con conductos más grandes que forman el conducto hepático común. El conducto hepático común transporta la bilis producida por las células hepáticas hacia la vesícula biliar y el duodeno (la primera parte del intestino delgado), a través del conducto biliar común, lo que se muestra en la Fig. 18 (Lena Sibulesky, M. D., 2013).



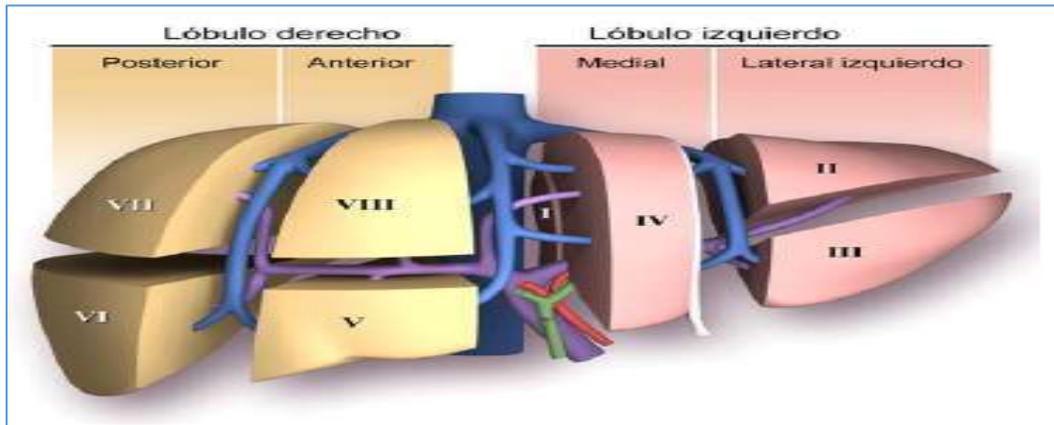
**Fig. 18** Aspecto tridimensional del hígado normal (Ross, M. H. 2008)



**Fig. 19** Esquema de los tipos de lobulillos en el hígado: clásico, portal y acino hepático. (Ross, M. H. 2008)

Los segmentos se numeran en el sentido de las agujas del reloj. Los segmentos II y III, conocidos como segmento anterior y posterior del lóbulo izquierdo, respectivamente, también reciben el nombre conjunto de “segmento lateral izquierdo del hígado” y “lóbulo izquierdo topográfico”. El segmento IV es el segmento medial del lóbulo izquierdo. Los segmentos II, III y IV forman

conjuntamente el lóbulo izquierdo funcional del hígado. A su vez, el lóbulo derecho funcional está formado por los segmentos V y VIII (segmentos anteriores) y los segmentos VI y VII (segmentos posteriores). El segmento I, o lóbulo caudado, se encuentra en la parte posterior (Fig. 20) (Lena Sibulesky, M. D., 2013).



**Fig. 20** Anatomía segmentaria del hígado (Lena Sibulesky, M. D., 2013).

#### 1.4.2 Funciones hepáticas

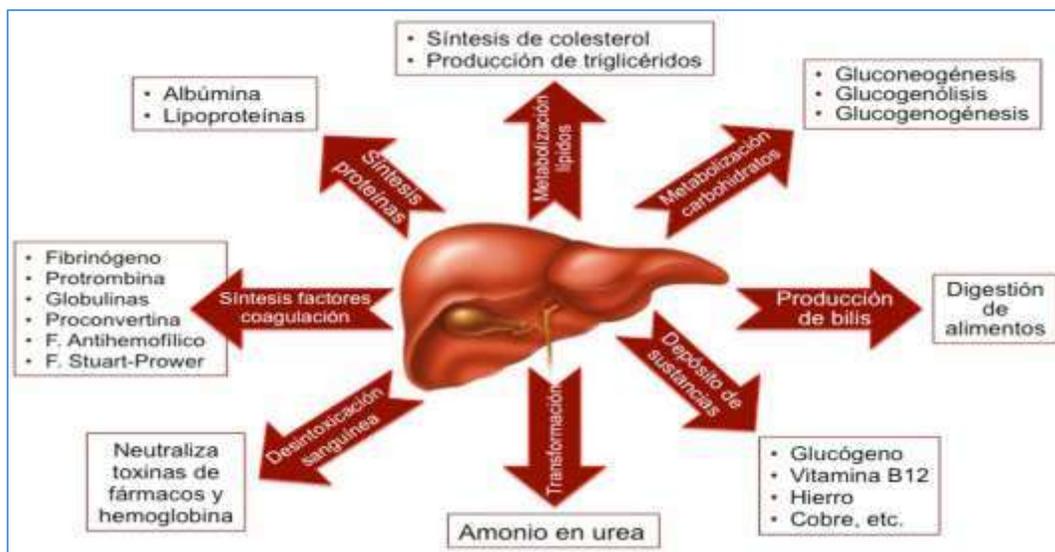
El hígado regula la composición química de la sangre de numerosas formas. De manera adicional, produce y secreta la bilis, la cual se almacena y concentra en la vesícula biliar antes de su descarga en el duodeno (García Martín, M., Zurita Molina, A., 2010).

Entre sus innumerables funciones se destacan (Fig. 21):

- 1) Almacenamiento de glucógeno;
- 2) Síntesis de ácidos grasos (AG) y conversión a cetonas, formación de lipoproteínas, colesterol y fosfolípidos;
- 3) Síntesis de proteínas plasmáticas, conversión y desaminación de aminoácidos y formación de urea;
- 4) Metabolismo y almacén de vitaminas;

- 5) Síntesis, liberación y degradación factores de coagulación;
- 6) Catabolismo y excreción de hormonas;
- 7) Detoxificación de sustancias endógenas (Bilirrubina), bacterias, subproductos y sustancias exógenas (fármacos);
- 8) Formación de bilis: secretora y excretora;
- 9) Mantenimiento del balance hidro-electrolítico y
- 10) Barrera defensiva por medio de células del SER (García Martín, M., Zurita Molina, A., 2010).

El hígado regula la composición química de la sangre de numerosas formas. De manera adicional, produce y secreta la bilis, la cual se almacena y concentra en la vesícula biliar antes de su descarga en el duodeno (Manterola, C. y col. 2017).



**Fig. 21** Esquema de la fisiología del hígado (Manterola, C. y col. 2017).

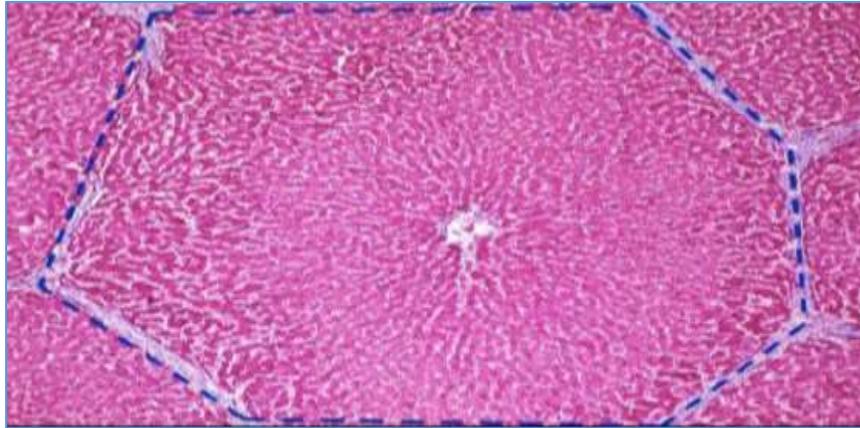
### **1.4.3 Tipos y funciones de las células que conforman el hígado.**

Aunque el hígado es el órgano interno más grande, tiene, en cierto sentido, sólo una a dos células de grosor; ello se debe a que las células hepáticas, o **hepatocitos**, forman **placas hepáticas** que tienen un grosor de una a dos células. Las placas están separadas unas de otras por grandes espacios capilares llamados **sinusoides (planos, ramificados, ubicados entre las placas hepáticas)**.

Los hepatocitos son las células del hígado y forman aproximadamente el 80 % de este órgano. Se disponen formando láminas de una célula de espesor que se unen unas con otras formando estructuras tridimensionales a modo de esponja (Megías, M. y col. 2018). Tienen una vida relativamente larga, puesto que son renovadas aproximadamente cada 5 meses, aunque depende de si hay procesos de regeneración o no. Cuando hay daños en el hígado los hepatocitos tienen una gran capacidad de proliferación y regeneración de la parte dañada (Megías, M. y col. 2018).

#### **1.4.3.1 Morfología del hepatocito**

Se suele decir que los hepatocitos son células poliédricas, es decir, que tienen varias caras. Normalmente 6 caras, aunque el número es variable (Fig. 22). Las caras pueden estar en contacto con un espacio sinusoidal o con otro hepatocito. Son células grandes, de unos 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro. Poseen núcleos redondeados y centrados en la célula, y en hígados adultos muchos hepatocitos (hasta un 25 % del total) presentan dos núcleos (Megías, M. y col. 2018).



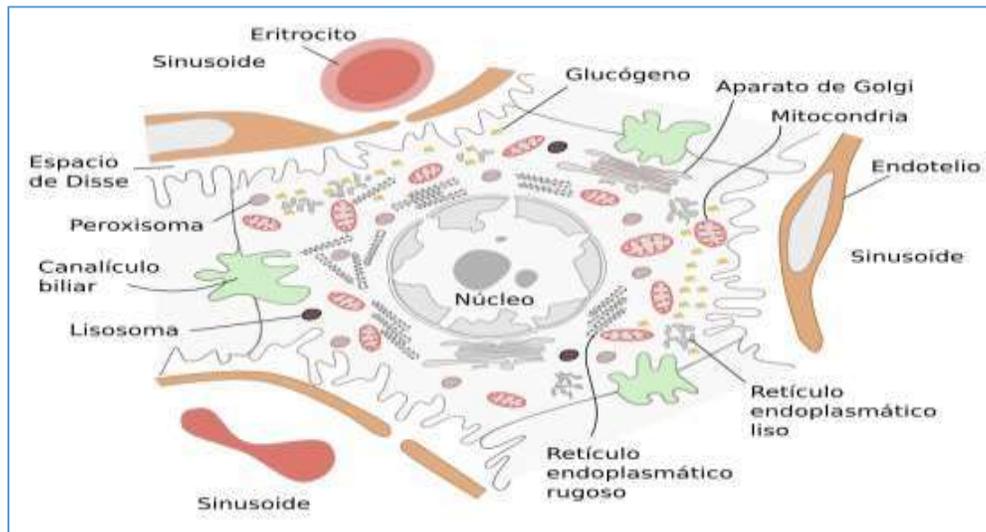
**Fig. 22** Fotomicrografía del hepatocito (Ross, M. H. 2008).

La mayoría de los núcleos de los hepatocitos son tetraploides, es decir, tienen el doble de contenido de ADN que una célula normal diploide. El tamaño de los núcleos es variable y está relacionado con el grado de poliploidía, la cual aumentan con la edad del individuo. Poseen heterocromatina dispersa y uno o más nucléolos bien patentes. Es raro encontrar hepatocitos en mitosis (1 mitosis por cada 10000 0 20000 hepatocitos), pero sí son frecuentes cuando hay algún proceso de regeneración hepática. El aspecto del citoplasma es variable y depende de su estado fisiológico, sobre todo influido por la presencia de almacenes de grasa o glucógeno (Megías, M. y col. 2018).

El citoplasma del hepatocito posee pequeñas y abundantes mitocondrias, 800 a 1000 por célula. Se ha estimado que una célula hepática puede contener unos 50 complejos de Golgi, que suelen formar pilas de 3 a 5 cisternas con las zonas laterales de las cisternas ensanchadas y con cuerpos densos. Las pilas de cisternas

están un tanto esparcidas, localizadas sobre todo en las proximidades de los canalículos biliares (Megías, M. y col. 2018).

Los hepatocitos contienen una gran cantidad de peroxisomas (entre 200 y 300), más que otros tipos celulares. En las proximidades de los canalículos biliares también se pueden observar numerosos lisosomas, pero también en el resto del citoplasma (Ross, M. H. 2008).



**Fig. 23** Esquema de la ultra estructura de un hepatocito (Megías, M. y col. 2018).

Los hepatocitos poseen abundantes depósitos de glucógeno, inclusiones lipídicas (el aspecto granular en las tinciones de hematoxilina y eosina se deben al hueco que dejan dichos depósitos e inclusiones) y cuerpos residuales con lipofucsina. Uno de los orgánulos que destaca por su abundancia es el *retículo endoplasmático liso*, aunque su cantidad depende del estado metabólico. Donde hay depósitos de glucógeno suele haber abundante retículo endoplasmático liso. Dentro de un lobulillo hepático suele haber diferencias morfológicas entre los hepatocitos periféricos y los centrales debido al riego sanguíneo (Fig. 23). Por

ejemplo, tras la comida los hepatocitos periféricos son los primeros en almacenar glucógeno y los últimos en movilizarlo por la demanda fisiológica del cuerpo. Mientras que la acumulación de grasa es primero en las células centrales del lobulillo, que también suelen tener más retículo endoplasmático liso (el retículo rugoso tiene un 50 % más de superficie que el liso en las zonas periféricas y medias del lobulillo) (Megías, M. y col. 2018).

#### **1.4.3.2 Funciones del hepatocito**

La principal función de los hepatocitos es metabolizar sustancias procedentes de la digestión. Esto es posible porque el hígado se encuentra irrigado por las venas porta, que recogen las moléculas resultantes de la digestión del intestino. Aparte de terminar de degradar sustancias digeridas, también tienen un papel importante en la detoxificación de moléculas potencialmente dañinas para el organismo. Por otra parte, los hepatocitos sintetizan y secretan la bilis, la cual será liberada en el tubo digestivo para ayudar en la digestión. Para ello se encuentran en un lugar privilegiado, formando una capa entre los canales sinusoidales (que traen las sustancias del digestivo) y los canalículos biliares (que transportan la bilis) (Megías, M. y col. 2018).

Entre otras funciones se encuentran:

- ❖ **Niveles de glucosa.** Los hepatocitos captan la glucosa de la digestión y la almacenan en forma de glucógeno, que será movilizado cuando el organismo necesite energía. El glucógeno se localiza normalmente próximo al retículo endoplasmático puesto que es en este orgánulo donde se encuentra la enzima

glucosa-6-fosfatasa, encargada de convertir glucosa-6-fosfato, resultante de la degradación del glucógeno, en glucosa libre que puede salir de la célula y pasar al torrente sanguíneo.

❖ **Síntesis de moléculas.** Sintetizan sales biliares, las cuales serán necesarias para la digestión de las grasas. En el retículo endoplasmático liso se encuentran numerosas enzimas relacionadas con la síntesis del colesterol y otros lípidos. Pero, además, los hepatocitos sintetizan las lipoproteínas necesarias para transportar lípidos por la sangre. También sintetizan fibrinógeno para la coagulación de la sangre cuando hay heridas, así como albúminas plasmáticas. Como metabolito resultante del metabolismo de la degradación de las proteínas producen urea, que si se acumula en el organismo puede ser peligrosa. También almacenan vitaminas A y B, y heparina.

❖ **Metabolismo lipídico.** En los numerosos peroxisomas que poseen los hepatocitos se produce la beta-oxidación.

❖ **Detoxificación.** Los hepatocitos reciben directamente las sustancias nutritivas de la digestión, pero también son los primeros en recibir sustancias potencialmente tóxicas. El etanol consumido en las bebidas alcohólicas es degradado principalmente en el hígado, más concretamente en los abundantes peroxisomas que estas células poseen. Aproximadamente la mitad del alcohol ingerido es convertido en acetaldehído en los peroxisomas de los hepatocitos. En el retículo endoplasmático liso se encuentran enzimas

que participan en la eliminación de toxinas y fármacos. Cuando hay que eliminar muchas de estas sustancias al mismo tiempo, por ejemplo, durante un tratamiento farmacológico o por consumo continuado de alcohol, el retículo puede convertirse en el orgánulo más voluminoso de la célula. La eliminación de fármacos es normalmente por conjugación de éstos con otras moléculas. Por ejemplo, la glucoroniltransferasa se puede conjugar con los barbitúricos.

❖ **Almacén y regulación del hierro.** Los hepatocitos funcionan como almacenes de hierro, el cual se acumula en depósitos en el citosol unido a ferritina. Pueden captar hierro en diversas formas: unido a transferrina, no unido a transferrina, en grupos hemo y en grupos no hemo. El unido a transferrina lo hace mediante endocitosis mediada por el receptor TRF1. La acidificación de las endosomas provoca que la transferrina libere el hierro  $Fe^{3+}$ , que se convierte en  $Fe^{2+}$  y es sacado al citosol por DMT1 (transportador de metales divalentes). El hierro de los grupos hemo también se incorpora por endocitosis y el grupo hemo-hierro atraviesa la membrana de los endosomas por el transportador HRG1. Sin embargo, la mayor parte del hierro se incorpora directamente desde el plasma por el transportador ZIP14 localizado en la membrana de los hepatocitos que dan hacia los sinusoides. Una vez en el citosol, el hierro se almacena en depósitos citosólicos unido a ferritina, puesto que el ion libre es tóxico. La liberación de hierro desde el medio interno hacia el exterior del hepatocito es mediante el transportador ferroportina localizado en la membrana sinusoidal (Megías, M. y col. 2018).

Además del hepatocito, el hígado está conformado por otras células como, por ejemplo, célula biliar, célula endotelial, célula de Kupffer, células estelares de Ito, miofibroblasto:

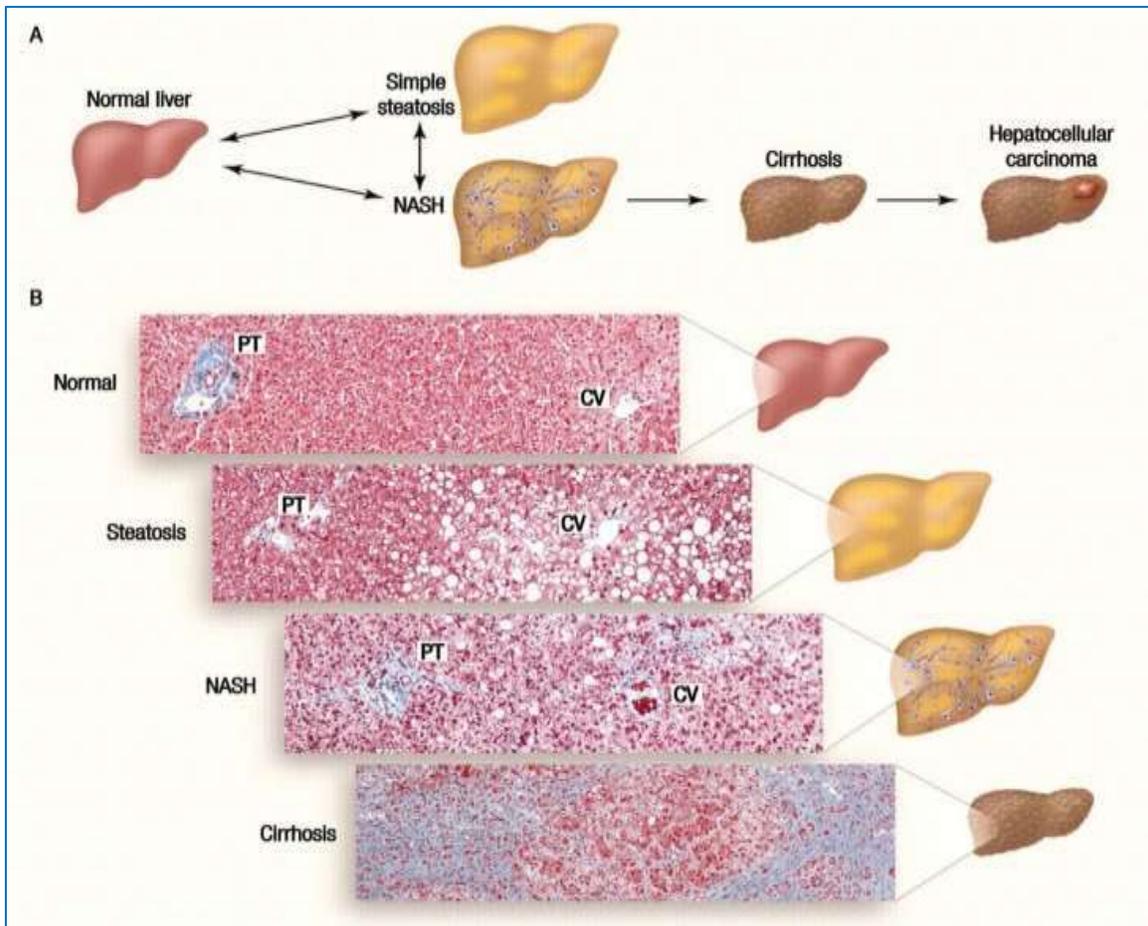
- **Célula biliar:** constituye el 90% de todas las células del hígado y se distribuyen formando hileras dobles alrededor del espacio portal. Entre las hileras dobles se encuentra el espacio sinusoidal constituido por canales a través de los cuales fluye la sangre. Entre las células hepáticas se encuentra el canalículo biliar, a través del cual el hígado elimina diversas sustancias de desecho y para coadyuvar al proceso digestivo.
- **Células endoteliales:** responden a estímulos para aumentar o disminuir el flujo de sangre. Las células endoteliales están separadas de los hepatocitos por una lámina basal discontinua y espacio subendotelial, espacio o de Disse.
- **Células de Kupffer:** son como auténticos soldados que eliminan microbios. Las células de Kupffer son macrófagos “anclados” al espacio de Disse se hallan en la superficie luminal de las células endoteliales. Su función principal es metabolizar los hematíes (eritrocitos) viejos, digerir la hemoglobina, secreción de proteínas y la destrucción de bacterias.
- **Células estelares de Ito:** son lipocitos (acumulan gotas de grasa) asociadas al espacio de Disse. Contienen inclusiones lipídicas ricas en vitamina A. desempeñan la función de captación, almacenamiento y liberación de retinoides y secreción de varias proteínas. Eventualmente pueden activarse y transformarse en "miofibroblastos" y producir colágena (proteína que se deposita en forma excesiva en la cirrosis hepática).

## **1.5 Daños Hepáticos provocados por la diabetes (hígado graso, cirrosis y cáncer)**

Se han identificado varias vías críticas que causan daño hepático en pacientes diabéticos. La resistencia a la insulina, la principal causa de hiperglucemia e hiperinsulinemia compensatoria, es el factor causante predominante. Como una colección de tejidos sensibles a la insulina, el hígado se encuentra entre los órganos primarios susceptibles a los efectos del estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia, que puede provocar lesiones en el tejido hepático (Jamaludin M. y col. 2016).

A esto le sigue el desajuste del metabolismo de las proteínas, los carbohidratos y los lípidos, lo que lleva a un aumento del estrés oxidativo y desencadena aún más la cascada inflamatoria. Tanto el estrés oxidativo como las respuestas inflamatorias actúan como agentes dañinos al agravar la condición patológica de la DM (Jamaludin M. y col. 2016).

En algunos casos, la DM causa una acumulación excesiva de células grasas en el hígado, lo que resulta en un hígado graso y, en consecuencia, NAFLD. Posteriormente, 2-3% de los pacientes con NAFLD experimentan inflamación hepática, necrosis y fibrosis, que son síntomas de una afección conocida como esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés). Los hígados lesionados o fibróticos se volverán cirróticos, formarán CHC y, eventualmente, ingresarán en insuficiencia hepática (figura 24) (Jamaludin M. y col. 2016).



**Fig. 24** Progresión del daño hepático (Jamaludin M. y col. 2016).

En la diabetes mellitus, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia causan la enfermedad del hígado graso no alcohólico y progresan a esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que se manifiesta como inflamación y necrosis. La NASH prolongada conducirá a fibrosis hepática, conocida como cirrosis, finalmente a carcinomas hepatocelulares y enfermedad hepática en etapa terminal. NASH= esteatohepatitis no alcohólica; **PT**= triada portal; **CV**= vena central (Jamaludin M. y col. 2016).

## 1.6 Mecanismos de daño hepático por la diabetes

El hígado desempeña un papel vital en la regulación de los niveles de glucosa en estados fisiológicos y patológicos como la diabetes mellitus (Jamaludin M. y col. 2016).

En la **diabetes mellitus tipo 2**, la resistencia a la insulina en el hígado causará hiperglucemia y una mayor distorsión del metabolismo de la glucosa. Incluso en condiciones de hiperglucemia severas, el hígado no detecta la disponibilidad de glucosa y produce más a través de la acción combinada de unas pocas enzimas como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, fructosa-1,6-difosfato, hexocinasa y glucoquinasa (Jamaludin M. y col. 2016).

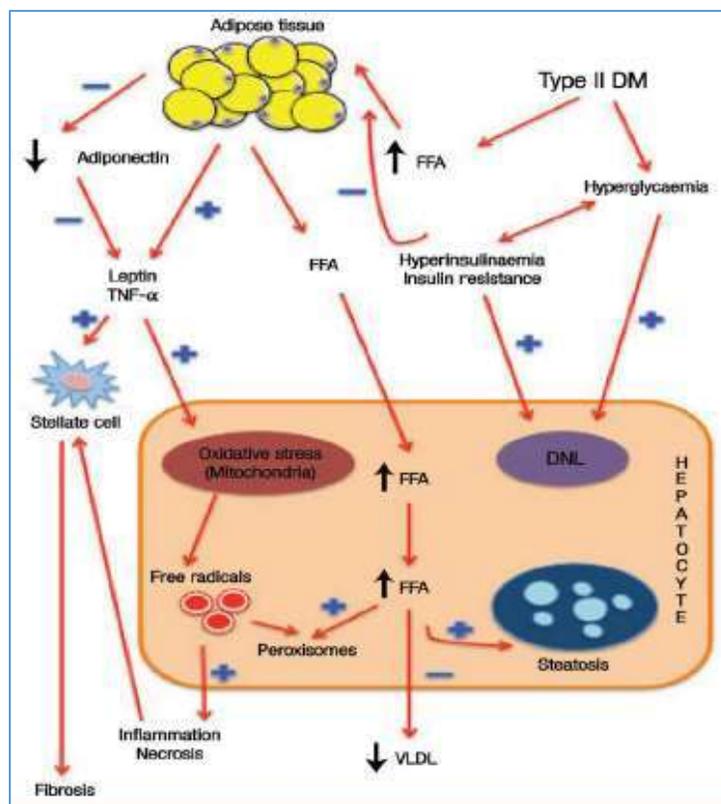
El hígado también regula la homeostasis de la glucosa mediante la modulación de la expresión de varios tipos de genes que codifican proteínas secretoras (es decir, hepatocinas). Diferentes tipos de hepatocinas a través de diferentes vías activan mecanismos de retroalimentación positiva o negativa para controlar el proceso del metabolismo. Existen tres hepatocinas dominantes: *fetuin-A*, *betatrofina / proteína similar a la angiopoyetina 8 (ANGPTL8)* y *factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21)*. La *Fetuin-A* produce un aumento de la inflamación y resistencia a la insulina al inhibir la tirosina quinasa receptora de insulina en el tejido muscular esquelético y los hepatocitos. Por el contrario, *ANGPTL8* es conocido por su acción de proliferación en las células beta del páncreas, mientras que el *FGF21* es reconocido como una hormona sensibilizadora de la insulina. Estas hepatocinas exacerbaban significativamente la condición diabética, especialmente en la diabetes mellitus tipo 2, mediante la regulación de la inflamación subclínica (Jamaludin M. y col. 2016).

Ciertos estudios realizados mencionan que la señal aberrante que promueve la producción de glucosa en el hígado durante la diabetes mellitus supuestamente también aumenta la oxidación de los ácidos grasos debido a la falta de demanda de combustible. Sin embargo, otra investigación ha encontrado que el hígado deja de oxidar los ácidos grasos y los usa en su lugar para sintetizar triglicéridos que luego se acumulan de manera anormal en el hígado (Jamaludin M. y col. 2016).

Por otra parte, en la **diabetes mellitus tipo 1**, la deficiencia de insulina regula al alza la lipasa sensible a las hormonas en los tejidos adiposos, lo que posteriormente provoca un aumento de la lipólisis y la circulación de ácidos grasos libres, que posteriormente se acumulan en el hígado. Estos procesos mejoran la captación hepática de lipoproteínas de muy baja densidad y la síntesis de triglicéridos. Al mismo tiempo, los niveles elevados de glucagón inhiben la producción de triglicéridos hepáticos. Por lo tanto, la acumulación de grasa en el hígado puede deberse a un desequilibrio en la absorción, síntesis, exportación y oxidación de ácidos grasos libres en el hígado. Vale la pena señalar que una acumulación de adipocitos en el hígado causará resistencia a la insulina hepática. Las condiciones ambientales y los rasgos genéticos también contribuyen a la expresión fenotípica de la resistencia a la insulina; estos factores actúan en combinación con la hiperinsulinemia para aumentar la masa grasa y la lipólisis y elevar el nivel de ácidos grasos libres. Al mismo tiempo, la señalización de la insulina se reduce de manera dependiente de la dosis, lo que eventualmente aumenta la glucosa hepática y la lipotoxicidad (Jamaludin M. y col. 2016).

Sin embargo, las modificaciones de la secreción de adipocitocina en la hiperinsulinemia se producen al desencadenar la expresión génica de citoquinas pro-inflamatorias, como la leptina y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); estas modificaciones no solo están involucradas en el desarrollo de la resistencia a la insulina, sino que también interfieren con la señalización de la insulina, empeorando así la diabetes mellitus. Un aumento en las adipocitocinas puede contribuir al estrés oxidativo mitocondrial y desencadenar la formación de radicales libres y peroxisoma. Un aumento en el estrés oxidativo mitocondrial también causará daño por mutación del ADN y desencadenará una serie de efectos perjudiciales sobre la cadena respiratoria mitocondrial al producir especies reactivas de oxígeno (ROS). Este círculo vicioso escalará exponencialmente a un nivel incompatible, que será contrarrestado por retroalimentación fisiológica normal y por lo tanto conducirá a daño hepático (Jamaludin M. y col. 2016).

La hiperinsulinemia puede disminuir la adiponectina, lo que conduce a la lipogénesis hepática y disminuye aún más la oxidación de ácidos grasos libres. Por lo tanto, la hiperinsulinemia puede actuar como un importante contribuyente a la progresión del daño hepático. Los hepatocitos inflamatorios y necróticos y las adipocitocinas liberarán varios tipos de mediadores químicos que activarán las células estrelladas para producir el factor de crecimiento del tejido conectivo y el colágeno y causarán una acumulación en la matriz extracelular, favoreciendo así la fibrosis (fig. 25).



**Fig. 25** Diagrama que muestra el mecanismo del daño hepático en la diabetes mellitus (Jamaludin M. y col. 2016).

## II ANTECEDENTES

### 2.1 Plantas medicinales

De acuerdo con la **OMS** una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Cruz Hernández D., López Silva V. N., 2002).

Se están utilizando más de 1000 especies de plantas para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en todo el mundo (Trojan-Rodrigues M. y col. 2011). En las partes del mundo donde la población tiene acceso restringido al sistema de salud, el uso de plantas medicinales para el tratamiento de la DMT2 está muy extendido.

La diabetes es un síndrome tan presente en la cotidianidad de la población mexicana que prácticamente todos tenemos a nuestro alrededor un familiar, un amigo o un conocido que padece esta enfermedad. Es natural que esta misma población busque algunas opciones terapéuticas a la atención médica científica que por principio no puede ofrecer la curación (Trojan-Rodrigues M. y col. 2011).

En muchos casos, se sabe muy poco sobre el mecanismo de acción de las plantas antidiabéticas usadas tradicionalmente, lo que evita que se utilicen en la atención estándar de la diabetes (Coman, C. y col. 2012).

Las ventajas del empleo de las plantas radican en que, junto a sus principios activos, existen en muchos casos otros constituyentes de acción sinérgica, que potencian su acción y las hacen más completa y duradera que el principio o principios activos aislados.

Las plantas medicinales son beneficiosas porque:

- Son muy accesibles en cuanto a la recolección y su uso.
- Ejercen una acción global sobre el organismo a causa de la interacción de sus principios activos.
- El efecto puede ser más lento que el de los medicamentos convencionales pero es más duradero.

- Tienen a estimular acciones de protección y regulación de las funciones del organismo y presentan menores efectos secundarios, lo que permite tratamientos más largos.
- Sirven de complemento a tratamientos con medicamentos convencionales.
- Tienen relación con el medio cultural, es decir, con la concepción del mundo y del ser humano que se tiene en cada región.
- No implica gasto de dinero, ni de mucho tiempo para su preparación.
- No requieren de conocimientos ni de ninguna habilidad especial para ser aplicadas.
- Al hacer uso de las plantas la gente adquiere sus propios recursos económicos.
- Son eficaces, durante años han resuelto muchos de los problemas de salud en las comunidades (Olaya & Méndez, 2003).

## **2.2 Compuestos hipoglucemiantes y antioxidantes de plantas medicinales**

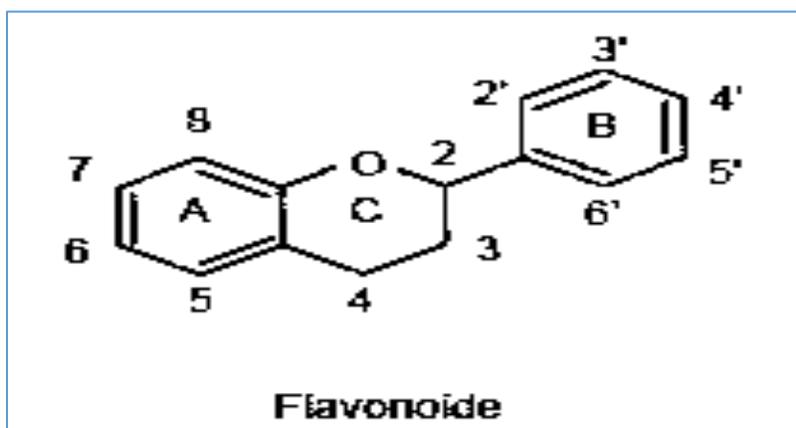
La diabetes es una enfermedad crónica que afecta a un porcentaje elevado de la población y su prevalencia va en aumento. Por ello, además de las medidas preventivas y el uso de fármacos dirigidos a reducir la glucemia, es importante que éstos presenten pocos efectos adversos. En este sentido, el empleo de fitoterapia en el tratamiento de la diabetes puede ser de utilidad en combinación con la terapéutica convencional, pues hay plantas medicinales con actividad hipoglucemiante comprobada, eficaces y con una baja incidencia de efectos adversos en tratamientos prolongados (Martínez M. A., 2005).

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- $\gamma$ -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos (Cartaya, O., Inés Reynaldo, C. 2001).

Los flavonoides provienen del latín *flavus* y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el del oro; y *flavonoide*, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas (Escamilla Jiménez, C. I., y col. 2009).

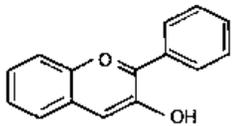
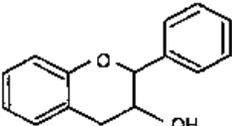
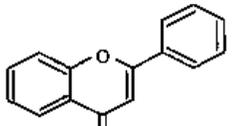
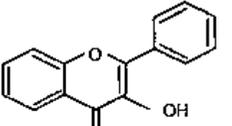
### 2.2.1 Estructura química.

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (figura 26), común en la mayoría de los flavonoides. Y gracias a las variaciones del pirano se logran clasificar como se muestra en la tabla 7 (Martínez Flórez S. y col, 2002).



**Fig. 26** Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo (Martínez Flórez S. y col. 2002).

**Tabla 7. Clasificación de los flavonoides.**

| Nombre         | Descripción  | Ejemplo       | Estructura   |
|----------------|--|---------------|--|
| Antocianidinas | Tiene un grupo –OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 de anillo C. | Antocianidina |   |
| Flavanos       | Con un grupo –OH en posición 3 del anillo C.   | Catequina     |   |
| Flavonas       | Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C 3.              | Diosmetina    |   |
| Flavonoles     | Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C  | Quercetina    |  |

(Escamilla Jiménez, C. I., y col. 2009).

## 2.2.2 Funciones antioxidantes

Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo (Escamilla Jiménez, C. I., y col. 2009).

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos (Escamilla Jiménez, C. I., y col. 2009).

### **2.2.3 Síntesis, absorción y metabolismo**

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades de acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides. Posteriormente se forman los derivados glicosilados o sulfatados (Martínez Flórez S. y col. 2002).

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina, parecen tener lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon (Martínez Flórez S, y col. 2002).

### **2.3 Efecto protector de los compuestos activos de plantas medicinales en tejidos (páncreas e hígado)**

Desde tiempos antiguos, las plantas se utilizan para tratar muchas enfermedades. India tiene alrededor de 45,000 especies de plantas y se ha afirmado que varios miles poseen propiedades medicinales (Grover, J. K. y col. 2002).

Las plantas medicinales utilizadas para tratar condiciones hipoglucémicas o hiperglucémicas son de gran interés para la comunidad etno-botánica, ya que se

reconoce que contienen propiedades medicinales valiosas en diferentes partes de la planta y varias plantas han mostrado un grado variable de actividad hipoglucémica y antihiperoglucémica (Grover, J. K. y col. 2002).

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatorias (Martínez Flores S. y col. 2002).

En el hígado se ha descrito que la Quercetina es capaz de inhibir la activación de las células estrelladas así como la producción de óxido nítrico, alterando vías de expresión de proteínas celulares y en estudios *in vitro* se ha comprobado que diversos flavonoides inhiben la expresión de la óxido nítrico sintetasa y la formación de óxido nítrico en macrófagos estimulados por LPS (Martínez Flores S. y col. 2002). Por otra parte, en el páncreas, los flavonoides ejercen en las células beta pancreática una protección.

## 2.4 Descripción taxonómica de *Cuphea procumbens*



**Fig. 27** Planta y flor de *Cuphea procumbens* (Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2005).

*Cuphea procumbens* pertenece a la familia LYTHRACEAE, es una planta herbácea anual, hispido-glandulosa, con pelos largos predominando sobre pelos cortos, y además con pelos diminutos aplicados muy difíciles de apreciar, hasta de 60 cm de alto, tallo bastante ramificado; hojas opuestas, subsésiles o con un peciolo hasta 10



mm de largo, láminas lanceoladas, de 3 a 7 cm de largo por 0.5 a 2 cm de ancho, ápice obtuso o agudo, borde entero, revoluto, base redondeada a cuneada, nervio medio manifiesto sobre todo en el envés; flores solitarias, interpeciolares,

sobre pedicelos de 3 a 10 (20) mm de largo, con un par de pequeñas bractéolas cerca de su ápice; tubo calicinal amarillento con tintes morados, de 1.2 a 2 cm de

largo, con el diente dorsal manifiestamente mayor que los demás, giba basal conspicua, algo cocleada; 6 pétalos, violáceos a morados, unguiculados, con frecuencia con la uña casi filiforme, los 2 dorsales obovados, de 5 a 10 mm de largo; con 11 estambres, por lo menos algunos de los filamentos lanosos cerca del ápice; con óvulos de 11 a 35; cápsula elipsoide, de unos 8 mm de largo; semillas lenticulares, de 2.5 a 3 mm de largo (Fig. 27). (Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2005).

Es una especie del Eje Neo volcánico, nativa de México. Introducida en Estados Unidos y Bolivia. Su distribución en México está presente en el Ciudad de México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla, Oaxaca, Tlaxcala y Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998). Los nombres comunes con los que se conoce a *Cuphea procumbens* son (Graham, 1994): 1) Calavera, 2) Hierba de la Calavera, 3) Hierba del cáncer, 4) Nube azul, 5) Atlanchana, 6) Macachampa de milpa, 7) Pegajosa.

### **Hábitat**

Su habitad es el Bosque caducifolio. Se encuentra a su vez en campos cultivados de suelo húmedo, orillas de caminos, campos bajos inundables, en los márgenes de ríos y en otros sitios cenagosos perturbados (Graham, 1994).

### **Ciclo de vida**

Es una planta anual, florece y fructifica de julio a diciembre, especialmente en septiembre y octubre; y en Veracruz de julio a diciembre (Graham, 1994).

## **Usos**

Se utiliza en la medicina popular, también ha sido utilizada para afecciones como catarro, empacho y cáncer (Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, 2005).

En nuestro grupo de trabajo, existe un trabajo previo donde se realizó un análisis de actividad hipoglucemiante en DM tipo 1 y DM2 en animales de experimentación a los que se les administró extractos acuosos de la planta. Se comprobó el efecto hipoglucemiante en DM1 de un 28% y en DM2 normaliza las concentraciones circulantes de glucosa (Orozco Montes F. M. y Fenton Navarro B, 2018).

### III JUSTIFICACIÓN

La diabetes y sus complicaciones son un problema de salud mundial por lo que representan un alto porcentaje en los recursos del sector salud. Por lo que se están buscando alternativas terapéuticas que nos ayuden a coadyuvar los síntomas de dicha enfermedad.

Por ello, además de las medidas preventivas y el uso de fármacos dirigidos a reducir la glucemia, es muy importante que éstos presenten pocos efectos adversos al organismo del diabético.

En este sentido, el empleo de la fitoterapia en el tratamiento de la diabetes puede ser de gran utilidad en combinación con la terapéutica convencional, pues existen plantas medicinales con actividad hipoglucemiante comprobada, eficaz y con una baja incidencia de efectos adversos en tratamientos prolongados.

En esta investigación se analizaron distintas muestras de órganos (específicamente hígado y páncreas) para identificarlos diferentes cambios histológicos haciendo una comparación en los grupos de estudio: ratas sanas, ratas con DM2 tratadas con metformina y ratas con DM2 administradas con el extracto acuoso de la Hierva de la Calavera (*Cuphea procumbens*), por lo que esta investigación es de utilidad para comprobar el efecto que tiene dicha planta en el organismo donde existe el daño provocado por la enfermedad.

#### **IV HIPÓTESIS**

El extracto acuoso de *Cuphea procumbens* proporciona un efecto protector en las células beta pancreáticas y células hepáticas en ratas diabéticas.

#### **V OBJETIVO GENERAL**

Analizar los cambios histológicos en ratas diabéticas tratadas con metformina y con extracto acuoso de hierba de la calavera en comparación con ratas sanas.

#### **VI OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Análisis Histológico del páncreas de ratas sanas y de ratas diabéticas con tinción de Hematoxilina-Eosina.
2. Conteo de número de células beta en islotes de Langerhans en ratas diabéticas tratadas con metformina Vs número encontrado en páncreas de ratas tratadas con extracto acuoso.
3. Análisis histológico del hígado de ratas sanas Vs diabética
4. Evaluación de las diferencias hepáticas de ratas diabéticas tratadas con metformina Vs tratadas con extracto acuoso.

## VII MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Obtención de órganos

El modelo experimental utilizado fue tratado con fructuosa al 60% durante un periodo de 3 meses con administración crónica, en el cual se valora como se encuentra el animal con diabetes mellitus realizando las siguientes pruebas:

- Nivel de glucosa circulante
- Parámetros de orina (12 parámetros)
- Hemoglobina glicosilada

Por consiguiente se procedió a la recolección de órganos de acuerdo a los tiempos establecidos para su obtención (Tabla 8).

El hígado se obtuvo de los siguientes grupos de estudio.

- I. Sanos (tiempo cero)
- II. Sanos + Extracto Acuoso de Calavera (EACP) (15 días, 30 días, 60 días y 90 días)
- III. DM2 + EACP (15 días, 30 días, 60 días y 90 días)
- IV. DM2 + Metformina (15 días, 30 días, 60 días y 90 días)

El páncreas se obtuvo de los siguientes grupos de estudio

- I. Sanos (tiempo cero)
- II. Sanos + EACP (15 días, 60 días)
- III. DM2 + EACP (15 días, 60 días)
- IV. DM2 + Metformina (15 días, 60 días)

**Tabla 8. Grupos experimentales en estudio.**

| Grupos experimentales | Administración oral |         |         |         |         |
|-----------------------|---------------------|---------|---------|---------|---------|
|                       | Día cero            | 15 días | 30 días | 60 días | 90 días |
| Sanos                 | ● X̄                | ● X̄    | ●       | ● X̄    | ●       |
| DM2 + Metformina      |                     | ● X̄    | ●       | ● X̄    | ●       |
| DM2 + EACP            |                     | ● X̄    | ●       | ● X̄    | ●       |

EACP: Extracto Acuoso de Calavera (*Cuphea procumbens*), ● = Hígado, X̄ = Páncreas

Los órganos obtenidos permanecieron en formol al 10 % (solución fijadora), por un periodo de 4 meses.

### 7.2 Procesamiento en el equipo HISTOKINETTE.

Pasado este tiempo, se procedió a realizar los respectivos cortes de los tejidos para prepararlos para su procesamiento en el procesador de tejidos (Fig. 28).



**Fig. 28** Corte y etiquetado de los órganos.

Posteriormente, se metieron en el equipo de deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina llamado procesador de tejidos o Histokinette (marca MICROM) (Fig. 29).



**Fig. 29** Equipo Histokinette.

Con las siguientes condiciones partiendo del siguiente esquema de 15 horas:

**Tabla 9. Tiempos de proceso en el Histokinette.**

|   |     |
|---|-----|
| Tiempo cero 15 horas PM,  |     |
| Fijado en formol neutro amortiguado que se cambia todos los días al 10 por 100, los tejidos son lavados en agua destilada por | 4 h |
| Alcohol etílico al 70 por 100   | 1 h |
| Alcohol etílico al 80 por-100   | 1 h |
| Alcohol etílico al 96 por 100   | 1 h |
| Alcohol etílico al 100 por 100  | 1 h |
| Alcohol etílico al 100 por 100  | 1 h |

|                                |     |
|--------------------------------|-----|
| Alcohol etílico al 100 por 100 | 1 h |
| Xileno, -tolueno o cloroformo  | 1 h |
| Xileno, tolueno o cloroformo   | 1 h |
| Xileno, tolueno o cloroformo   | 1 h |
| Parafina, histosec o paraplant | 1 h |
| Parafina, histosec o paraplant | 1 h |

(López Rodríguez, M., Sánchez Orozco A. 2018)

Transcurrido el tiempo de las muestras en el Histokinette (Fig. 30), se procedió a realizar los bloques de parafina (Fig. 31), los cuales nos permitirán realizar los cortes del tejido en estudio (hígado, páncreas).



**Fig. 30** Casette con tejido después de salir del equipo histokinette.

**Fig. 31** Bloques de parafina.



Una vez que se han hecho los bloques de parafina se dejaron en solidificación por lo menos 24 horas antes de comenzar a realizar los cortes del tejido.

### **7.3 Cortes en el micrótopo.**

Obtenidos los cubos de parafina se procedió a realizar los cortes del tejido (hígado o páncreas) con ayuda del equipo micrótopo, se hicieron cortes de 7 micra de espesor (Fig. 32), los cuales se montaron en laminillas para su respectiva identificación (Fig. 33).

Los tejidos deben ser cortados en láminas delgadas para posibilitar su observación con el microscopio, los instrumentos utilizados para la obtención de cortes son los micrótopos. Básicamente, todos los tipos de micrótopo constan de una navaja muy afilada que seccionará el bloque histológico de parafina y un mecanismo de avance automático regulable de a unos pocos micrones (usualmente entre 5 y 8) (López Rodríguez, M., Sánchez Orozco A, 2018).



**Fig. 32** Micrótopo

#### 7.4 Montaje en laminillas.

Los cortes así obtenidos presentan pequeños pliegues y arrugas que pueden eliminarse si se los flota en agua tibia, debido a la elevada tensión superficial del agua (Fig. 33). Luego de ello se recogen sobre delgadas láminas de vidrio llamada portaobjetos (López Rodríguez, M., Sánchez Orozco A, 2018).



**Fig. 33** Montaje en laminillas de los cortes.

#### 7.5 Tinción Hematoxilina-Eosina

Las estructuras contenidas en las preparaciones histológicas, poseen poco contraste o carecen de él completamente, por lo que no se pueden distinguir al microscopio. Este inconveniente queda salvado por la propiedad que tienen los distintos componentes celulares y tisulares de incorporar con variable intensidad sustancias colorantes. En la Técnica Histológica corriente solo nos interesa dos colorantes: **Hematoxilina y Eosina** (Panreac Química S.L.U. an ITW Company, 2017).

Método de tinción de rutina en histología y citología. Es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateina, formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una gradación entre el rosa, y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación (López Rodríguez, M., Sánchez Orozco A, 2018). La tinción de Hematoxilina-Eosina se llevó a cabo con las siguientes condiciones partiendo del siguiente esquema de horas (Tabla 10):

**Tabla 10. Tinción con Hematoxilina y Eosina**

| PASO                    | REACTIVO               | TIEMPO          | OBSERVACIONES                                   |
|-------------------------|------------------------|-----------------|---|
| 1                       | XILOL 1                | 3 min           | DESPARAFINAR                                    |
| 2                       | XILOL 2                | 3 min           | DESPARAFINAR                                    |
| 3                       | XILOL 3                | 3 min           | DESPARAFINAR                                    |
| SECAR AL MEDIO AMBIENTE |                        |                 |   |
| 4                       | ALCOHOL ABSOLUTO       | 3 min           | HIDRATACIÓN                                     |
| 5                       | ALCOHOL 96°            | 3 min           | HIDRATACIÓN                                     |
| 6                       | ALCOHOL 80°            | 3 min           | HIDRATACIÓN                                     |
| 7                       | ALCOHOL 70°            | 3 min           | HIDRATACIÓN                                     |
| 8                       | ALCOHOL 50°            | 3 min           | HIDRATACIÓN                                     |
| 9                       | AGUA DESTILADA         | PASE            | HIDRATACIÓN                                     |
| 10                      | HEMATOXILINA DE HARRIS | 5 min           | COLORACION BASOFILICA                           |
| 11                      | AGUA DESTILADA         | PASE            | ENJUAGE   |
| 12                      | AGUA AMONIACAL         | 10 pases        | FIJAR COLORANTE AL NUCLEO                       |
| 13                      | ALCOHOL ACIDO          | 1 min (3 pases) | LIBERAR EXEDENTE "H" DEL CITOPLASMA             |
| 14                      | ALCOHOL 70°            | PASE            | LIBERAR EL ALCOHOL ACIDO                        |
| 15                      | ALCOHOL 70°            | 3 min           | PREPARAR LA MUESTRA PARA EL SIGUIENTE COLORANTE |

|                         |                   |       |                                     |
|-------------------------|-------------------|-------|-------------------------------------|
| 16                      | EOSINA ALCOHOLICA | 5 min | COLORACION ACIDOFÍLICA              |
| 17                      | ALCOHOL 70°       | 3 min | DESHIDRATAACION DE LA MUESTRA       |
| 18                      | ALCOHOL 80°       | 3 min | DESHIDRATAACION DE LA MUESTRA       |
| 19                      | ALCOHOL 96°       | 3 min | DESHIDRATAACION DE LA MUESTRA       |
| 20                      | ALCOHOL ABSOLUTO  | 3 min | SECAR ANTES No. 19                  |
| SECAR AL MEDIO AMBIENTE |                   |       |                                     |
| 21                      | XILOL 3           | 5 min | HACER EL TEJIDO MISIBLE A LA RESINA |
| 22                      | XILOL 4           | 5 min | HACER EL TEJIDO MISIBLE A LA RESINA |

(López Rodríguez, M., Sánchez Orozco A., 2018).

## 7.6 Conteo celular.

Se realizó la observación y conteo de las células beta en los cortes histológicos del páncreas, realizando un análisis estadístico en cual se hizo un promedio del número de células beta pancreática.

## 7.7 Parámetros histológicos

Recordar que en todos los tejidos son parámetros a estudiar genéricamente para facilitarlos el reconociendo del tejido:

- ✓ La existencia de los tejidos básicos, sus características fundamentales y los criterios de clasificación de cada uno de ellos.
- ✓ La celularidad, si existe un solo tipo o varios tipos celulares; la forma de las células y su tamaño; las características nucleares, número y posición en el citoplasma, la afinidad del citoplasma por los colorantes, las diferenciaciones celulares de superficie y su relación con las células vecinas.
- ✓ La existencia de matriz intercelular o su falta; la naturaleza y cuantía en relación con la celularidad; las particularidades y modificaciones en cuanto a su grado de hidratación, la disposición espacial de sus componentes, o la existencia de mineralización.

- ✓ Las adaptaciones funcionales de los conjuntos celulares; su grado de actividad o estado de reposo; la existencia de estructuras modificadas por el envejecimiento o la inmadurez del tejido; y las particularidades por el organismo donante.
- ✓ Y en cualquier caso no olvidar que se trata de cortes histológicos y hay que pensar en la estructura tridimensional y como esta puede mostrar distintos aspectos según la sección, así como la indeseable presencia de artefactos de la técnica histológica.

### **7.8 Análisis estadístico**

Se realizó por medio de estadística descriptiva donde se utilizaron las medidas de tendencia central y dispersión de valores (media  $\pm$  Desviación Estándar). Asimismo, en caso de ser normal la distribución de datos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para determinar las diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) se realizó un análisis post-hoc con la prueba de Tukey.

## VIII RESULTADOS

Se realizaron comparaciones entre los grupos de experimentación a los cuales se les aplicó el tratamiento en diferentes tiempos, tanto en páncreas como en hígado:

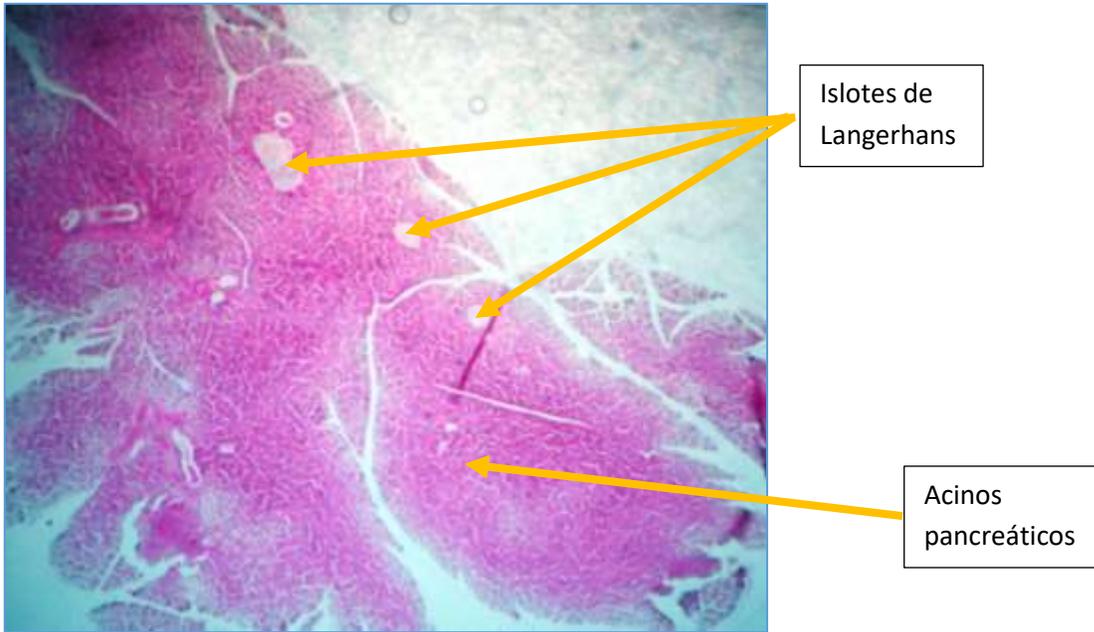
- Grupo sano (tiempo cero, 15 días, 30 días, 60 días, 90 días).
- Grupo DM2 + Metformina (tiempo cero, 15 días, 30 días, 60 días, 90 días).
- Grupo DM2 + EACP (tiempo cero, 15 días, 30 días, 60 días, 90 días).

### 8.1 Páncreas:

Se realizó un análisis histopatológico del páncreas de los animales seleccionados, por cada grupo de experimentación, en la figura 34 se muestra la disposición del tejido en el cuerpo del animal; en la figura 35 se muestra uno de los cortes histológicos de páncreas realizado al grupo **sano** en experimentación.

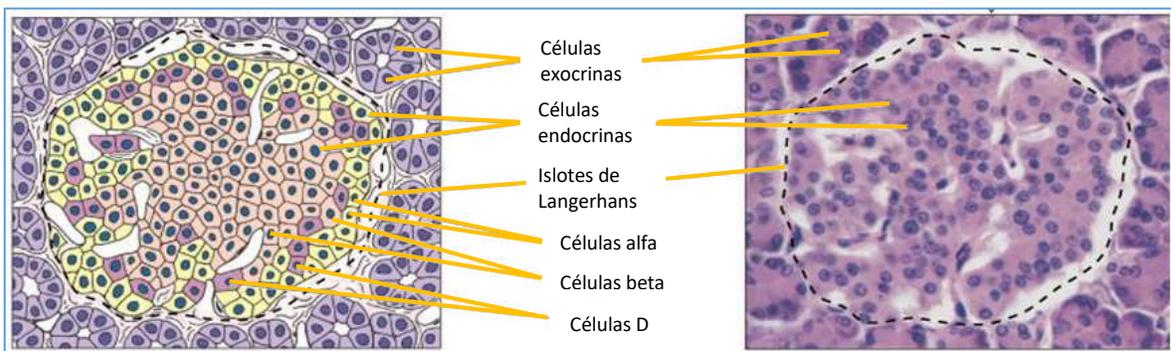


**Fig. 34** Disposición del páncreas en el cuerpo de la rata (Möller Bredo, R. & Vazquez Odo, N. 2011).



**Fig. 35** Corte histológico de páncreas sano.

Se observa un tejido pancreático conservado con los acinos pancreáticos bien formados. Los islotes de Langerhans están formados por cordones celulares que se unen y en conjunto forman una red entre cuyas mallas se encuentran numerosos capilares sanguíneos. En la figura 36 se observa un esquema ilustrativo de la disposición de las células que conforman los acinos y las células que lo constituyen, al igual que un corte histológico del páncreas.



**Fig. 36** Islotes y células del páncreas (Loya L. G. 2012)

A continuación, se presentan los resultados obtenidos al realizar el conteo de células  $\beta$  en los grupos de experimentación (Tabla 11, Figura 37: A, B y C).

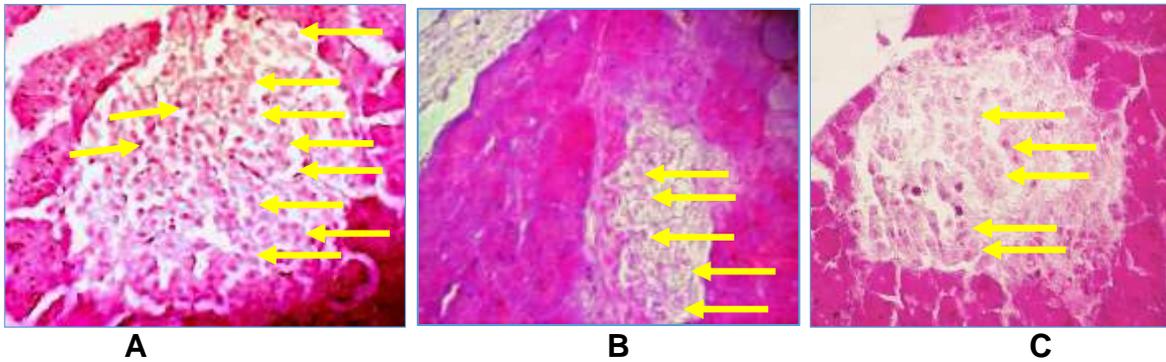
Se puede apreciar que en las ratas sanas se conservó el número de células  $\beta$ -pancreáticas a lo largo del estudio. En el grupo de ratas diabéticas tratadas con metformina se observó una disminución en el número de células en los tiempos 15 y 60 días. Por último, en el grupo de ratas diabéticas tratadas con el extracto de hierba de la calavera (EACP), se observó una pequeña disminución no significativa a los 15 días y en los 60 días se aprecia que el número es menor pero no es significativamente diferente respecto al tiempo cero (Tabla 11).

**Tabla 11. Células  $\beta$ -pancreáticas en los grupos de estudio.**

|                 | <b>T=0</b>   | <b>T=15</b> | <b>T=60</b>   |
|-----------------|--------------|-------------|---------------|
| <b>Sanas</b>    | 232±63.5 * a | 200±20* a   | 206±12* a     |
| <b>DM+M</b>     | 219±94 * a   | 153±15 ** b | 150±14 * b    |
| <b>DM+ EACP</b> | 284.5±95 * a | 221±20 * a  | 253.6±59 ** a |

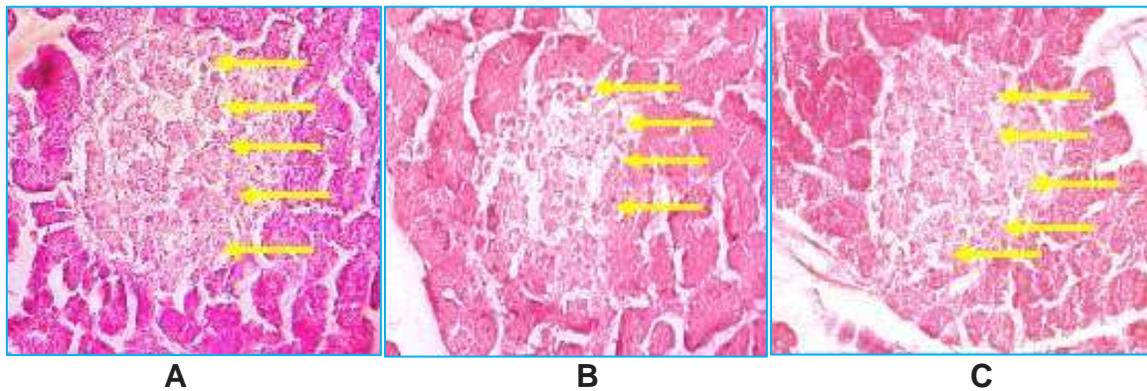
Los valores representan la media de 6 islotes pancreáticos de 6 ratas. \*, \*\*: Representan diferencias significativas entre los tiempos. Las letras representan diferencias significativas entre grupos.  $p \leq 0.05$

En la Figura 37 se muestran los Islotes de Langerhans Pancreáticos en Tiempo **Cero** de Grupos experimentales. Se observan un mayor número de células  $\beta$ -pancreáticas en ratas sanas en comparación con diabéticas en tiempo cero (Fig. 37).



**Figura 37.** Islotes pancreáticos de los grupos de estudio en tiempo cero. **A)** Sanas, **B)** D+M, **C)** D+EACP. 400X. Las flechas señalan los núcleos de las células  $\beta$ -pancreáticas.

En la Figura 38 se muestran los Islotes de Langerhans Pancreáticos en Tiempo **15 días** de los Grupos experimentales.

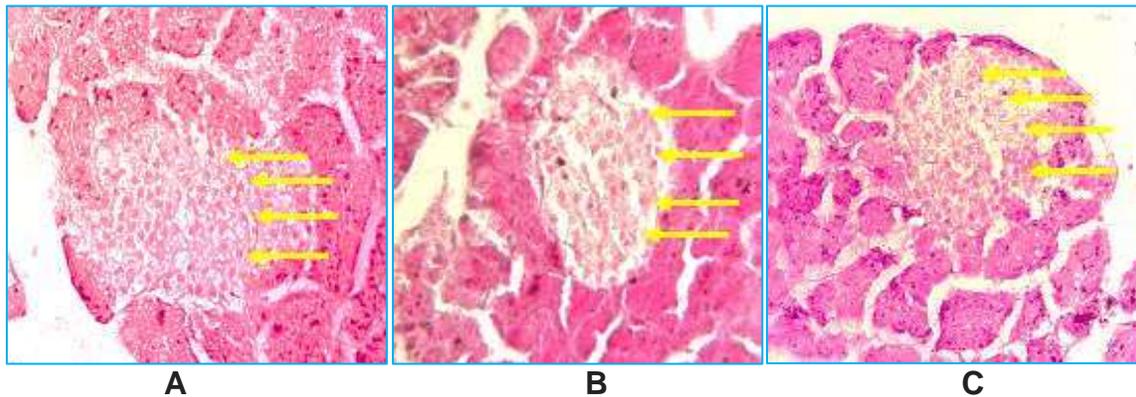


**Figura 38.** Islotes pancreáticos de los grupos de estudio en tiempo 15 días. **A)** Sanas, **B)** D+M, **C)** D+EACP. 400X. Las flechas señalan los núcleos de las células  $\beta$ -pancreáticas.

Se conserva el número de células  $\beta$ -pancreáticas en ratas sanas en comparación con diabéticas, en las diabéticas tratadas con metformina se nota una diferencia significativa al observar una disminución de células pancreáticas como se observan

en las micrografías, mientras que en las ratas tratadas con EACP no hay diferencia significativa al mantener el número de células pancreáticas al compararlas con las sanas.

En la Figura 39 se muestran los Islotes de Langerhans Pancreáticos en tiempo **60 días** de los Grupos experimentales.



**Figura 39.** Islotes pancreáticos de los grupos de estudio en tiempo 60 días. **A)** Sanas, **B)** D+M, **C)** D+EACP. 400X. Las flechas señalan los núcleos de las células  $\beta$ -pancreáticas.

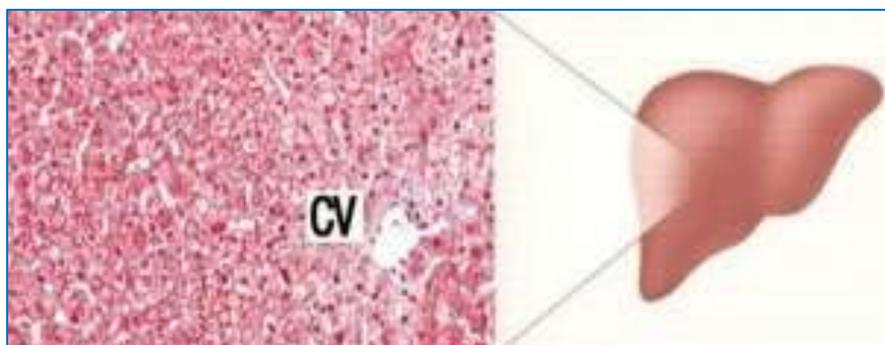
Al igual que en el tiempo 15, se puede observar que el número de células  $\beta$ -pancreáticas en ratas sanas se conserva en comparación con diabéticas, en las diabéticas tratadas con metformina se nota una diferencia significativa al observar una disminución de células pancreáticas como se observan en las micrografías, mientras que en las ratas tratadas con EACP no hay diferencia significativa al mantener el número de células pancreáticas al compararlas con las sanas.

## 8.2 Hígado:

Se realizó un análisis histopatológico del hígado de los animales seleccionados, por cada grupo de experimentación, en la Figura 40 se muestra la disposición del tejido en el cuerpo del animal; en la figura 41 se muestra uno de los cortes histológicos de hígado realizado al grupo **sano** en experimentación.

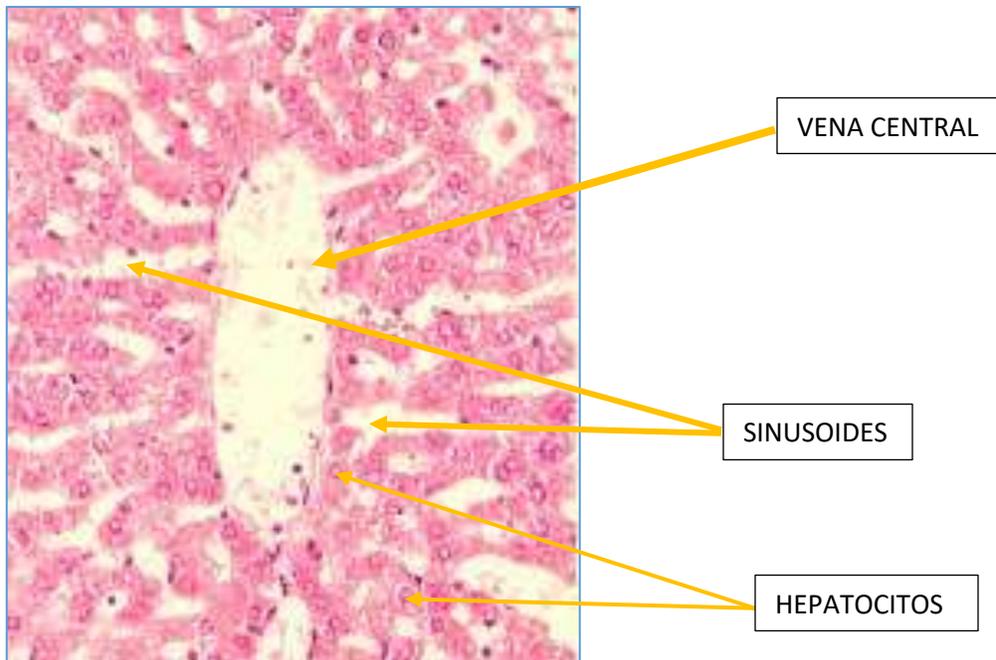


**Fig. 40** Disposición del hígado en la rata (Möller Bredo, R. & Vazquez Odo, N. 2011).



**Fig. 41** Corte histológico de hígado sano (Jamaludin M. y col., 2016).

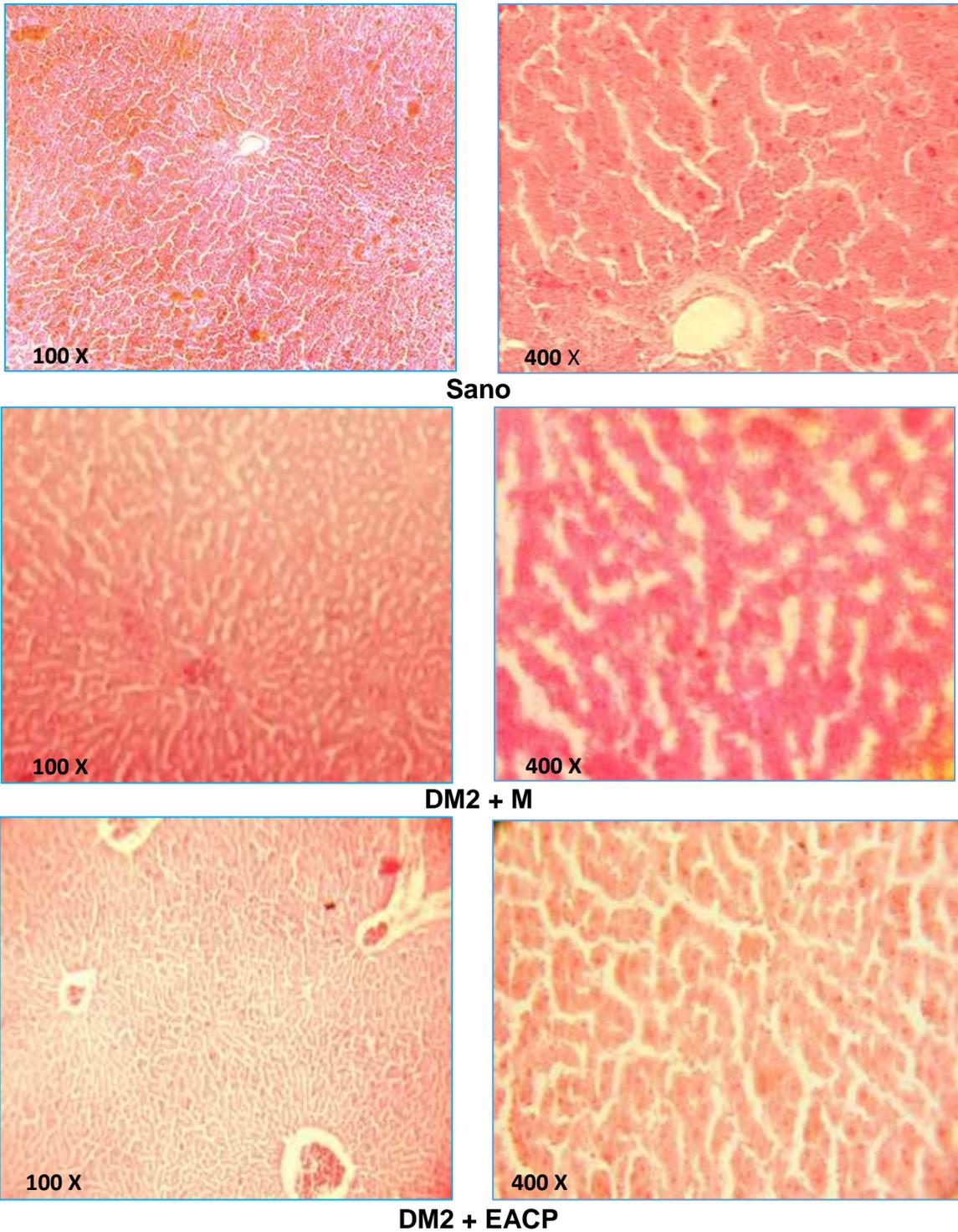
Las estructuras más comunes que se pueden identificar en un corte histológico (Fig. 42) en el hígado son las siguientes:



**Fig. 42** Estructuras en el corte de hígado, 400X.

Al igual que en el páncreas, se realizó un análisis histopatológico del hígado del grupo de animales en estudio en los tiempos: cero, 15, 30, 60 y 90 días respectivamente y se observó a 100X y 400X. Lo que se muestra a continuación.

En la Figura 43 se muestran las micrografías obtenidas de los cortes histológicos de hígado, correspondientes al tiempo **cero** en los grupos de estudio. Se puede observar que en los grupos de ratas tratadas con metformina y con el extracto acuoso de *Cuphea procumbens* (EACP) se presenta una inflamación inicial leve, en la cual se comienza a distorsionar la disposición de los hepatocitos en comparación con el corte de la rata sana en la cual se observan la disposición de los hepatocitos.

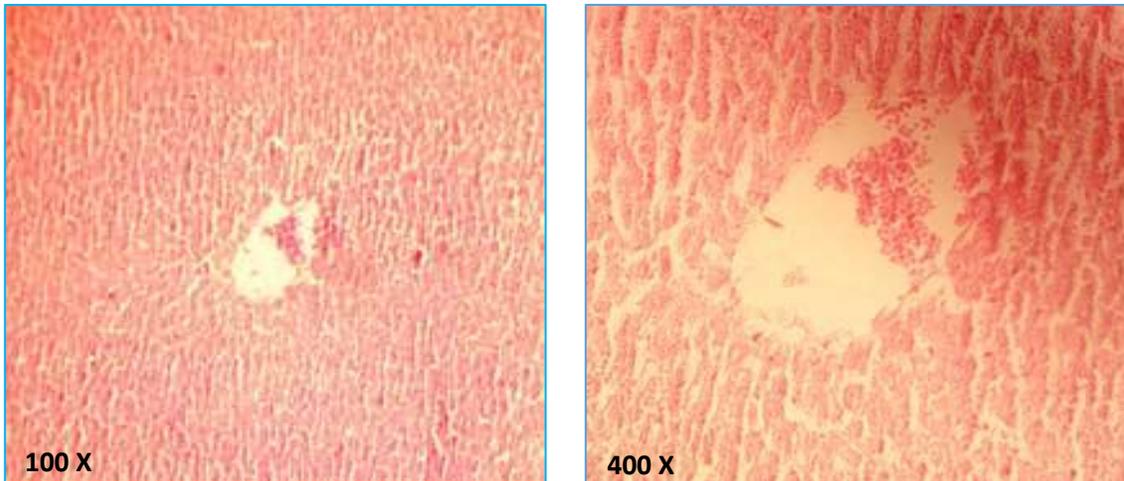


**Fig. 43. Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio.** Se presentan micrografías con 100X y 400X. Grupos SANO, METFORMINA, EACP, tiempo Cero.

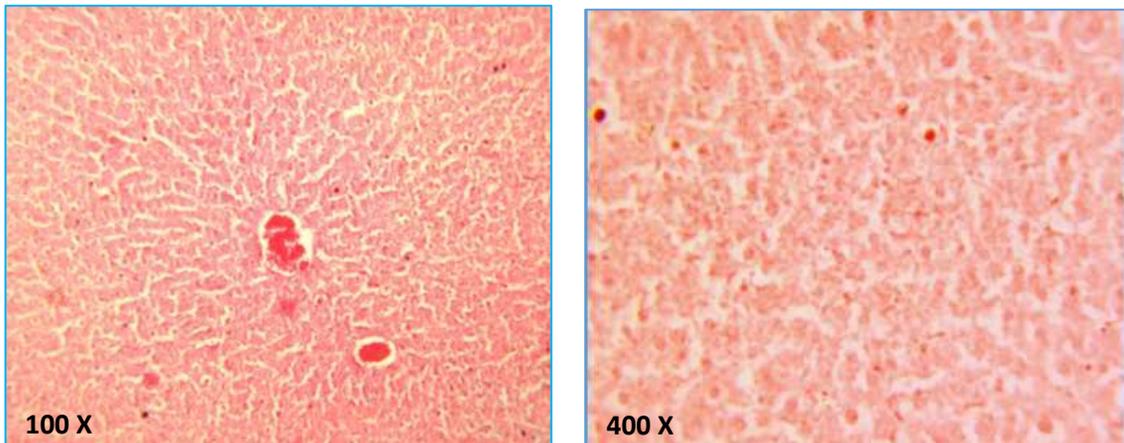
En las imágenes posteriores se muestran los cortes de los animales en estudio de los tiempos 15 días (Fig. 44), 30 días (Fig. 45), 60 días (Fig. 46) y 90 días (Fig.47); en el análisis histológico de las ratas tratadas con metformina se observó que a partir de los 15 días en adelante hay presencia de inflamación en el tejido por lo que no se puede distinguir la disposición y morfología de los hepatocitos en el transcurso del tiempo.

Entre los tiempos 60 y 90 días, en las ratas tratadas con metformina, se observa la acumulación de grasa en los hepatocitos, la cual podemos observar como espacios blancos lo que nos confirma la existencia de Esteatosis hepática (Fig. 46 y Fig. 47)

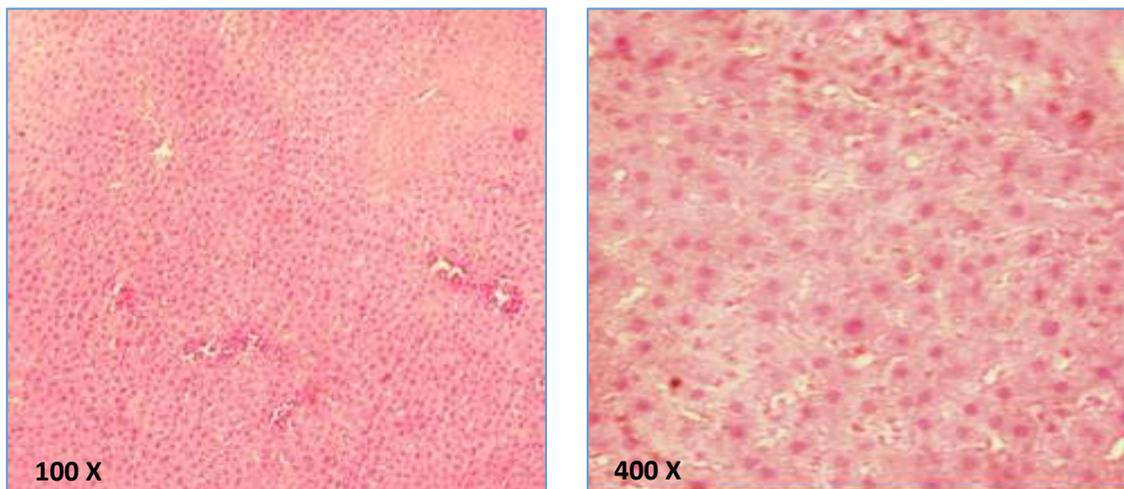
En cuanto a las ratas diabéticas tratadas con extracto acuoso de *Cuphea procumbens* (EACP), se observa que el daño hepático es menor en comparación con las ratas diabéticas tratadas con metformina al observar que el tejido hepático se conserva mejor ante el daño provocado por la enfermedad (Figura 46).



**Sanos**

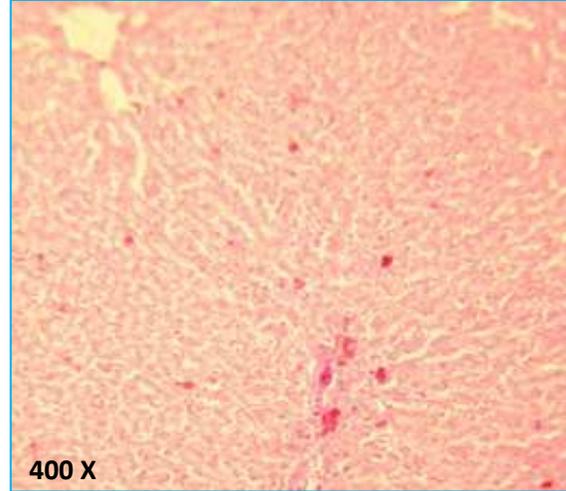
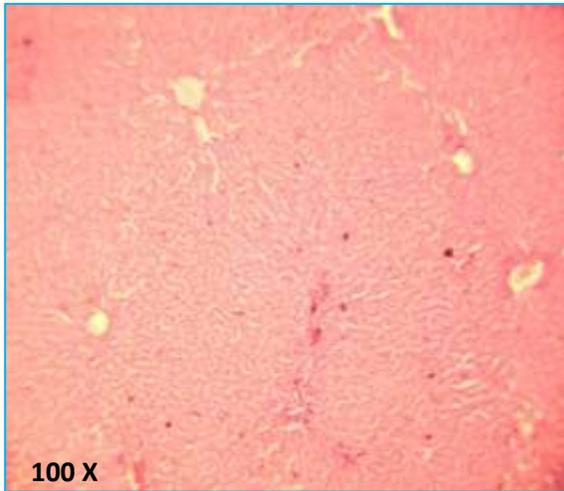


**DM2 + METF.**

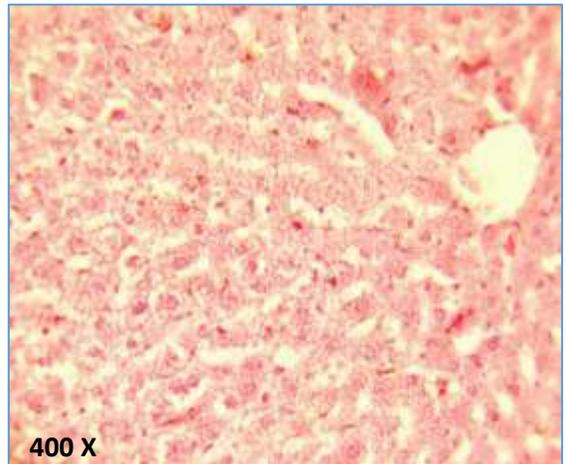
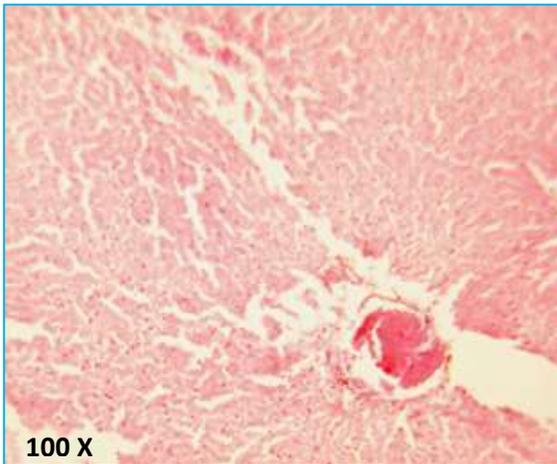


**DM2 + EACP**

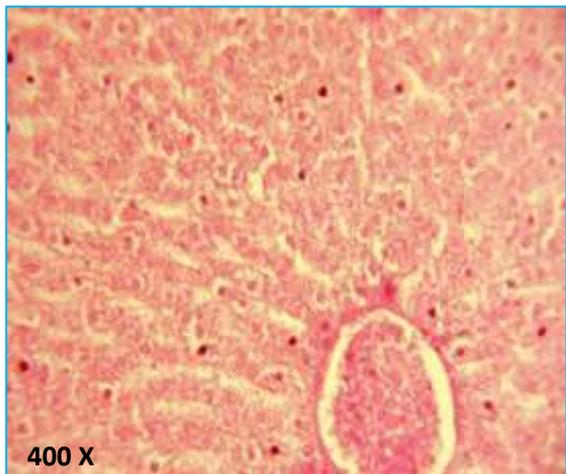
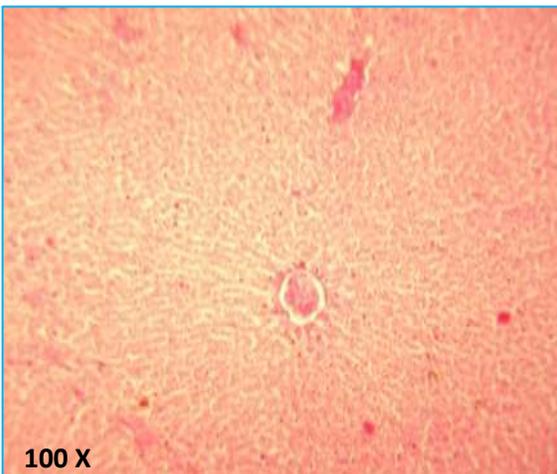
**Fig. 44. Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio.** Se presentan micrografías con 100X y 400X. Grupos SANO, METFORMINA, EACP, tiempo 15 días.



**Sanos**

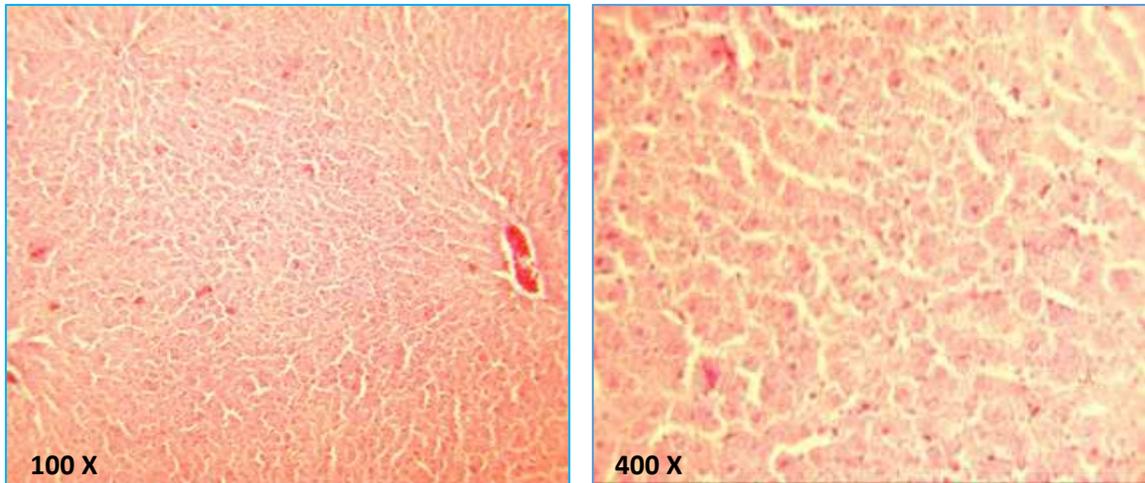


**DM2 + METF.**

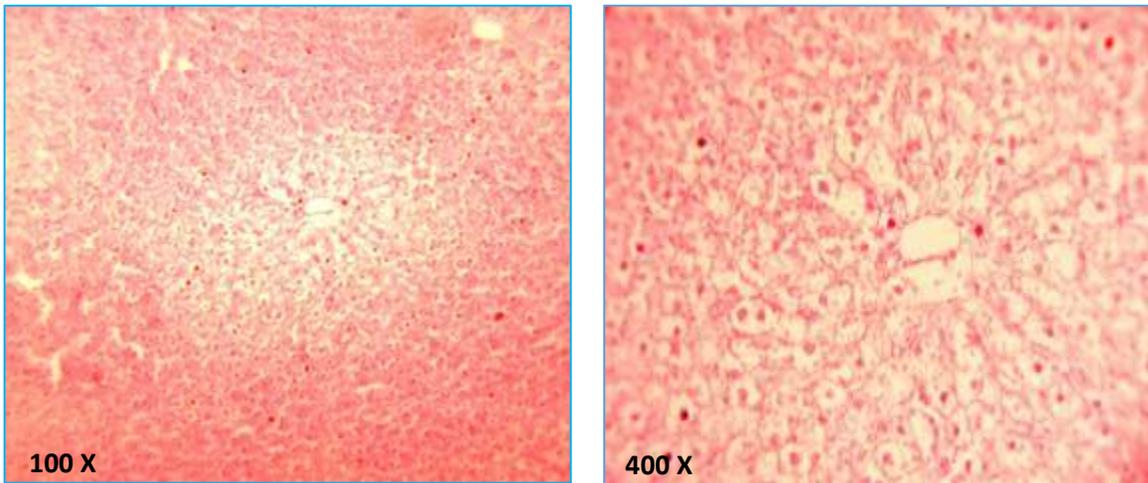


**DM2 + EACP**

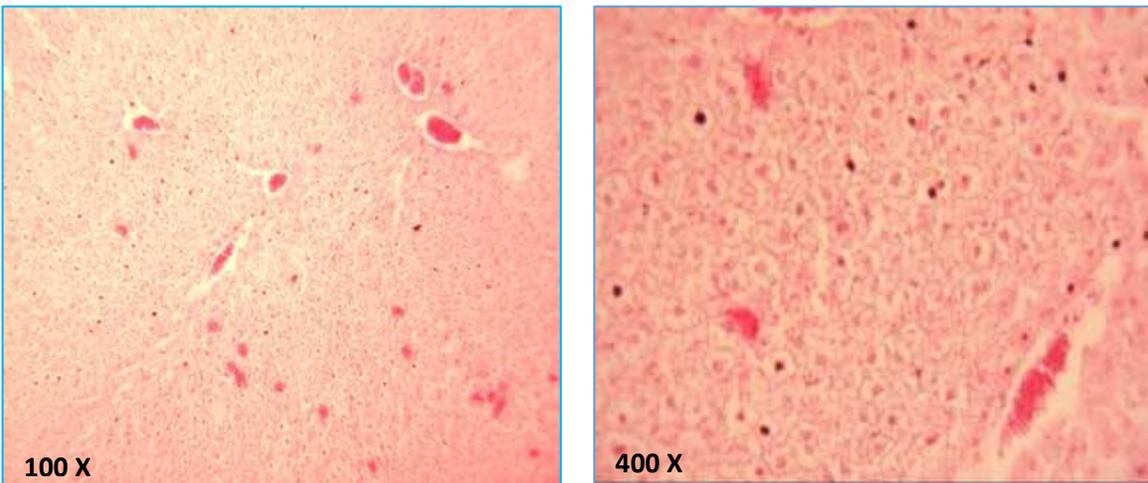
**Fig. 45 Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio. Se presentan micrografías con 100X y 400X. Grupos SANO, METFORMINA, EACP, tiempo 30 días.**



**Sanos**

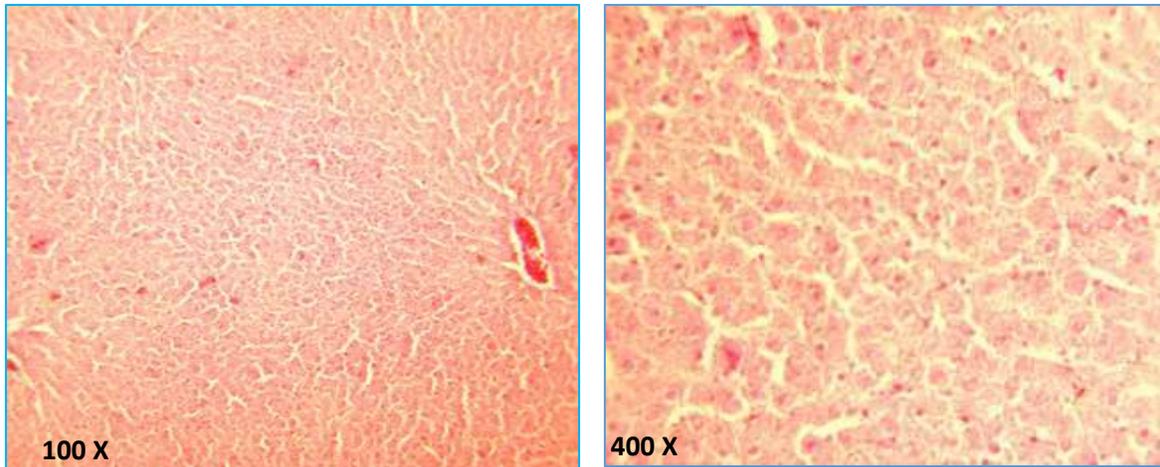


**DM2 + METF.**

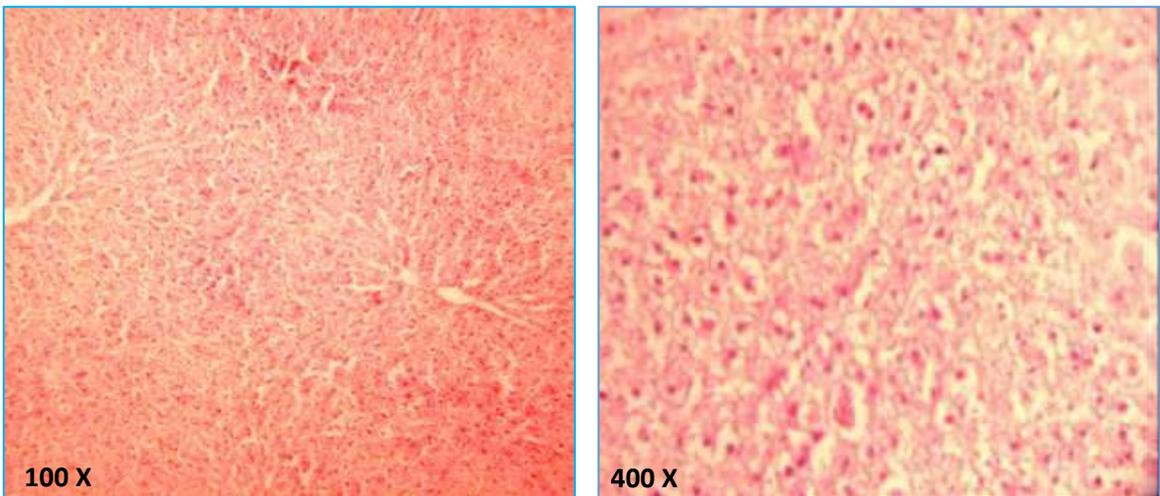


**DM2 + EACP**

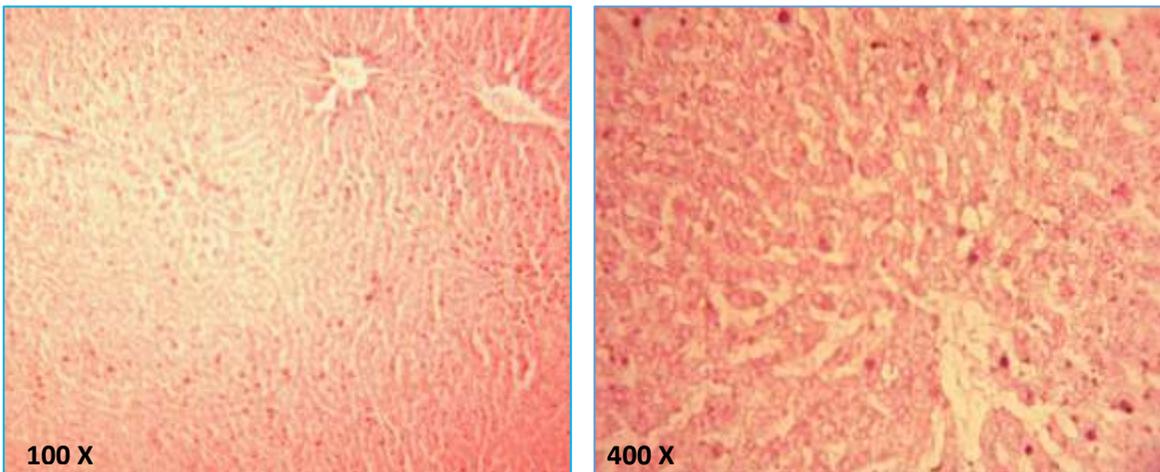
**Fig. 46. Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio. Se presentan micrografías con 100X y 400X. Grupos SANO, METFORMINA, EACP, tiempo 60 días.**



**Sanos**



**DM2 + METF.**



**DM2 + EACP**

**Fig. 47. Micrografías Hepáticas de los grupos de estudio. Se presentan micrografías con 100X y 400X. Grupos SANO, METFORMINA, EACP, tiempo 90 días.**

## IX DISCUSIÓN

La diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia del siglo XXI y es un reto de salud global. Como se ha venido mencionando la diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por una concentración elevada de glucosa en sangre (OMS, 2016).

Por ello, en la diabetes se presentan problemas sistémicos, debido a elevadas concentraciones de carbohidratos que generan productos de glicación avanzada en distintos órganos, como por ejemplo en ojos (perdida de la visión), corazón (arritmias), sistema circulatorio (falta de circulación que conlleva al pie diabético y como consecuencia la amputación de miembros), riñones (insuficiencia renal crónica), hígado (cetoacidosis, hígado graso) y páncreas (falla en la secreción de insulina) (Asociación Americana de Diabetes, 2018; Asociación Americana de Diabetes, 2019). Debido a esto, se hizo un análisis del efecto de la hierba de la calavera en los principales tejidos afectados en la diabetes que son el páncreas e hígado.

En este trabajo se utilizaron animales con diabetes tipo 2, inducido con fructuosa al 60% que se administraron durante un periodo de 3 meses para que se presente la enfermedad, en éste periodo no se le administraron tratamientos.

Se utilizaron tres grupos: Sanos, diabéticos (DM2) tratados con metformina y diabéticos tratados con el extracto acuoso de la hierba de la calavera (EACP). Estos grupos corresponden a una investigación previa de nuestro grupo de trabajo (Orozco M. F. M. y Fenton N. B. 2018) del efecto hipoglucemiante de la planta Hierba de la Calavera (*Cuphea procumbens*).

A continuación, se discuten los resultados obtenidos en los tejidos analizados.

## **Páncreas.**

En la diabetes (todos los tipos) existe daño en las células  $\beta$ -pancreáticas. Los mecanismos de destrucción o muerte son diversos, pero involucran una respuesta autoinmune mediada por anticuerpos específicos contra proteínas de las células  $\beta$ , así como la actividad directa de células inmunes, como células T citotóxicas (CTc) y natural killer (NK) (Cervantes Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013).

En el diagnóstico de diabetes tipo 1, los primeros anticuerpos detectados son contra la insulina. La destrucción de las células  $\beta$  se asocia principalmente con la activación de dos vías apoptóticas: la vía por la perforina-granzima y la vía del ligando Fas (FasL) (Mandrup Poulsen T, 2001). Estos inductores apoptóticos son sintetizados en células T citotóxicas (CTc) y natural killer (NK); la perforina, la granzima y algunas citocinas inflamatorias son liberadas sobre la superficie de la célula objetivo (Mandrup Poulsen T, 2001). Por otro lado, el FasL se localiza como una proteína integral en la membrana de la célula T y reconoce a un receptor de la muerte conocido como Fas o CD95, el cual se encuentra implicado en el desarrollo de diabetes tipo 1 y 2 (Henkler F. y col. 2005).

En cuanto a la diabetes tipo 2, la mayoría de los triglicéridos del cuerpo se encuentran en el tejido adiposo (>95%), y la lipólisis determina el suministro de ácidos grasos sistémicos; la insulina y las catecolaminas son los principales reguladores de este proceso. La insulina tiene un efecto anti-lipolítico, y durante la diabetes se pierde, incrementa la lipólisis e induce hipertrigliceridemia mediante la producción de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), proceso que contribuye a la aterogénesis (Coppack S. W. y col. 1996). Las cadenas largas de ácidos grasos en el plasma normalmente son reguladas por la insulina, y durante la resistencia a

la insulina, incrementan y producen toxicidad de células  $\beta$  (lipotoxicidad), que junto con la toxicidad de la glucosa dan el fenómeno diabético (glucolipotoxicidad) (Maedler K. 2008, Kluth O. y col. 2011).

En el páncreas, la diabetes tipo 2 es el factor inicial de la resistencia a la insulina, en este caso, las células beta, al principio, si producen insulina adecuadamente, pero esta insulina no es capaz de ejercer correctamente su acción y actuar sobre el músculo, hígado o tejido graso para disminuir la glucosa en la sangre (FMD, 2015).

Se ha demostrado que la disfunción de la célula  $\beta$  pancreática es un defecto importante en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2. Kulkarni y col, demostraron en modelos de ratones con inactivación específica del receptor de insulina en la célula  $\beta$ , que los defectos en la señalización de esta hormona se asocian con disfunción de célula  $\beta$ . Por ende si en la diabetes mellitus tipo 2 existe una resistencia de la célula  $\beta$  a la acción de la insulina, se podría asumir que un fenómeno similar ocurre en las células  $\alpha$ , lo cual llevaría a una incapacidad para controlar la secreción de glucagón mediada por insulina (Kulkarni R. N. y col. 1999).

En el análisis del corte del tejido del páncreas, en el cual se hizo el conteo del número de células beta del páncreas en los diferentes grupos de estudio, comparando cada grupo en los distintos tiempos se observó que en el grupo sano no hay diferencia significativa al observar que el promedio de células  $\beta$ - pancreáticas se mantiene conforme transcurre el tiempo. Mientras que en los grupos tratado con metformina y con el extracto acuoso de *Cuphea procumbens* (EACP), existe una diferencia significativa al presentar una disminución de células beta del páncreas en el grupo de estudio tratado con metformina. Mientras que en el grupo de estudio

tratado con el extracto acuoso de *Cuphea procumbens* se conserva el número aproximado de células beta del páncreas en comparación con el grupo sano.

La metformina es un fármaco oral perteneciente a la familia de las biguanidas, con un potente efecto sensibilizante a la insulina, y es un tratamiento efectivo para muchos pacientes con diabetes de tipo 2. No se metaboliza, sino que se elimina rápidamente del citoplasma a través del riñón (Olivera González, S. y col. 2010), es por ello que se utiliza como primera opción el sistema de salud de México (Castro Serna D. y Castro Martínez M. G. 2006). Su acción actúa por tres mecanismos, retrasa la absorción intestinal de glucosa, reduce la producción hepática de glucosa y en el músculo incrementa la sensibilidad a insulina y mejora la captación de glucosa periférica y su utilización y retrasa la absorción intestinal de glucosa (Vademécum, 2016). El tratamiento a largo plazo con metformina ha mostrado ser seguro, tolerable y que ejerce efectos protectores contra enfermedades macrovasculares en diabetes tipo 2 (Gelin L y col. 2018). Se ha demostrado que la metformina tiene numerosos efectos benéficos en islotes aislados de pacientes con DM2, incluyendo: Un incremento en el número de gránulos, expresión de mRNA de insulina y la secreción de insulina estimulada por la glucosa, y también una reducción en la apoptosis y en el estrés oxidativo (Marchetti P y col., 2004)

La metformina inhibe la hiperplasia celular compensatoria en células  $\beta$ -pancreáticas inducida por dietas altas en grasas por 8 semanas en ratones, pero a largo plazo en 60 semanas no lo inhibe (Tajima K. y col. 2017).

Lo anterior explica los resultados observados en ratas diabéticas con metformina a lo largo de la administración crónica y podemos señalar que son congruentes con los hallazgos previos.

Los resultados nos muestran una protección y conservación de las células beta en el grupo tratado con el extracto acuoso de la planta *Cuphea procumbens*, esto debido a que presenta metabolitos secundarios como los polifenoles, fenoles y flavonoides, que tienen propiedades que reducen el daño en el tejido, los cuales permiten conservar intacta la estructura y función (Martínez Flores S. y col. 2002). Se ha reportado ampliamente los efectos benéficos de los polifenoles. En particular, se sabe que en el páncreas presentan un efecto protector sobre las células beta que se dañan en la diabetes debido a la hiperglucemia. Este efecto es por medio de los siguientes mecanismos: generan la disminución de inducción de citocinas por daño en las células. Aumento de la secreción de Insulina y Aumento de las vías de AMPK y aumento de IRS2 (Kim Y col. 2016).

Los compuestos naturales aumentan la secreción de insulina, previenen la apoptosis de células beta pancreáticas y modulan la diferenciación y proliferación de las células beta (Oh, Y. S. 2015).

Evidencia reciente reporta que los flavonoides pueden disparar y amplificar las vías de secreción de la insulina en las células beta pancreáticas (Ghorbani A y col, 2019).

Es por ello, que el creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones (Martínez Flores S. y col. 2002).

La planta *Cuphea procumbens* presenta un alto contenido de metabolitos secundarios: Polifenoles  $126.07 \pm 44.14$  mg Floroglucinol/g, Flavonoides:  $125.86 \pm 0.05$  mg QE/g, Fenoles:  $617.44 \pm 33.44$  mg GA/g (Orozco, 2018). Lo que explica las propiedades protectoras observadas.

Lamentablemente no se logró obtener tejido del grupo en estudio de los tiempos 60 y 90 días, debido a que se utilizó para realizar el análisis de estrés oxidativo, por lo que el tejido no alcanzó para realizar la histología del mismo tiempo.

### **Hígado**

Por otra parte, en el análisis histológico del hígado en las ratas diabéticas tratadas con metformina, en los primeros tiempos (15 días, 30 días) se observa inflamación crónica en el tejido por lo que impide que se distinga la disposición y morfología de los hepatocitos, en comparación con el grupo sano.

En el modelo que se utilizó en éste trabajo, se realizó la instalación de la diabetes tras la administración de fructosa por tres meses (Dupas, J. y col. 2016). Es un modelo ampliamente utilizado que muestra la evolución de la enfermedad de forma similar a lo que ocurre en humanos como es la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia compensatoria y el desarrollo de la hipertensión (Delbosc, S. 2005, Tran, L. T. 2009).

Por esta razón, el hígado de los animales diabéticos analizados en el tiempo cero, ya presentaron daños crónicos en el tejido, como se aprecia en la Figura 43. En el caso de la metformina, se sabe que reduce la esteatosis hepática y la inflamación

(Woo S. L. y col. 2014). Se observó una pequeña reducción en la esteatosis y una reducción en la inflamación conforme fue avanzando el tiempo del tratamiento.

Si bien sabemos que el hígado es un órgano metabólicamente complejo, ya que es el más importante para el control de los niveles sanguíneos de glucosa, lípidos y aminoácidos. Se puede considerar que el hígado funciona como centro de reprocesamiento de estas sustancias nutritivas (Gonzalo Benito, H. 2012).

Se ha demostrado que la acumulación de tejido adiposo a nivel visceral está asociada con un defecto con la acción de la insulina (Bergman R. N. y col, 1998) el tejido adiposo libera un cantidad excesiva de ácidos grasos libres que interfieren con la señalización de insulina (Boucher J. y col. 2014). Es más la resistencia a la insulina se encuentra asociada con un bajo grado de inflamación del tejido adiposo con un aumento de producción y secreción de moléculas inflamatorias como son TNF- $\alpha$ , interleucina 6 que tiene efectos sistémicos en órganos periféricos que interfieren de manera inhibitoria a la señal de la insulina (Xu H. y col, 2003). En la diabetes y en el síndrome metabólico se encuentra el hígado graso no alcohólico (Kim D, y col., 2018).

La metformina reduce la resistencia a la insulina en pacientes diabéticos principalmente al inhibir la cadena respiratoria mitocondrial en hepatocitos al reducir la producción de glucosa hepática, lo que lleva a un descenso en las concentraciones de glucosa sanguíneas (Viollet B et al 2012, Madiraju A. y col. 2014).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la acción inhibitoria de la metformina en la gluconeogénesis hepática, incluyendo cambios en actividad de las enzimas o una reducción en la captura de sustratos para la gluconeogénesis. La

acción preferencial de la metformina en los hepatocitos es debido a la expresión predominante de un transportador orgánico de cationes (organic cation transporter 1 OCT1), que se sabe facilita la captura de metformina. Además, se ha demostrado que el complejo 1 de la cadena respiratoria y no AMPK es el blanco principal de la metformina (Viollet, B, et al 2012).

Respecto al efecto de la metformina en la histología hepática, recientemente se ha reportado que no tienen mejora las características histológicas ni bioquímicas en la esteatopatitis no alcohólica, en niños, adolescentes o adultos (Farah S. y col. 2019). Lo que coincide perfectamente con nuestros resultados.

En el caso de los animales tratados con EACP de igual manera se observó en tiempo cero inflamación y esteatosis, conforme fue avanzando el tratamiento crónico se pudo observar una disminución de la inflamación y esteatosis en los 15, 30, 60 y 90 días (Figuras 44 a la 47).

Esto se puede explicar por la presencia de metabolitos secundarios activos en los extractos. Las diferentes clases de agentes que protegen el hígado diabético o disminuyen la gravedad de la lesión mediada por la hiperglucemia incluyen flavonoides, catequinas y otros compuestos polifenólicos, la curcumina y sus derivados, ciertas vitaminas, hormonas y medicamentos, oligoelementos, antioxidantes prototípicos y aminoácidos. Algunos de los cambios pronunciados mediados por los antioxidantes en el hígado expuestos a la hiperglucemia incluyen disminución del estrés oxidativo, y alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Otros mecanismos a través de los cuales los agentes mejoran la lesión hepática mediada por la hiperglucemia incluyen la disminución del daño oxidativo

del ADN y las proteínas, la restauración de la integridad estructural y funcional mitocondrial, la disminución de la inflamación y la mejora de la señalización de la insulina. Por lo tanto, los antioxidantes pueden ser un modo importante de defensa para mantener las funciones hepáticas normales en la diabetes. (Dey, A., Laksmanan, J. 2013).

Los polifenoles son un grupo muy grande y heterogeneo de compuestos fitoquímicos de origen vegetal y se dividen en flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos. Se ha demostrado que los polifenoles tienen propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias con efectos benéficos en el inicio y progresión de enfermedades metabólicas en la reducción de la presión sanguínea y el peso corporal (Amiot M. J. y col, 2016; Hussain T. y col, 2016; Russo B. y col, 2019).

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte importante se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos (Martínez Flores S. y col. 2002).

En éste trabajo se demuestra que los extractos acuosos de la hierba de calavera presentan efectos protectores en páncreas e hígado de animales diabéticos. Lo que nos lleva a proponer que en un futuro, una vez que se haya demostrado su eficiencia y seguridad en personas, se pueda considerar como alternativa para el apoyo de tratamientos farmacológicos personalizados para pacientes con diabetes.

## **X CONCLUSIONES**

- a) El tratamiento crónico de extracto acuoso de *Cuphea procumbens* presenta un efecto protector en las células hepáticas y células beta del páncreas en ratas con diabetes tipo 2.
  
- b) Los resultados permitieron evidenciar que el grupo de ratas diabéticas presenta una diferencia significativamente al presentar una disminución de las células beta del páncreas en comparación a los grupos sano y extracto acuoso de *Cuphea procumbens* (EACP).
  
- c) Se identificó en el hígado de las ratas diabéticas tratadas con metformina inflamación crónica conforme el paso del tratamiento crónico, observando daño en el tejido provocando esteatosis hepática, en comparación con las sanas y las tratadas con el extracto acuoso de la hierba de la Calavera.
  
- d) La administración crónica del EACP generó una disminución de esteatosis e inflamación.

## XI PERSPECTIVAS

- Identificar el compuesto responsable del efecto protector de *Cuphea procumbens*.
- Evaluar el efecto hipoglucemiante y protector de *Cuphea procumbens* en otros órganos como por ejemplo corazón y riñón.

## XII BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Quadratín. 2018. Tasa de mortalidad en diabetes. [En línea]: <https://www.quadratin.com.mx/sucesos/michoacan-tasa-mortalidad-80-diabetes/>
2. Álvarez Aldana, D., Rodríguez Bebert, Y. 2009. Historia de la diabetes mellitus (cronología). [En línea]: [http://articulos.sld.cu/diabetes/files/2009/07/cronologia\\_de\\_la\\_diabetes\\_mellitus.pdf](http://articulos.sld.cu/diabetes/files/2009/07/cronologia_de_la_diabetes_mellitus.pdf)
3. Amiot, M.J.; Riva, C.; A, V. 2016. Effects of dietary polyphenols on metabolic syndrome features in humans: A systematic review. *Obes. Rev.* 17, 573–586.
4. Apoptosis y Ciclo celular. UCSM. Biología Genética Molecular, 2009. <https://es.slideshare.net/guest18ad09/apoptosis-y-ciclo-celular>: 31
5. Asociación Americana de Diabetes. 2018. Clasificación y diagnóstico de la diabetes: Estándares de atención médica en diabetes. *Diabetes Care.* 2018; 41(Suppl 1): S13-S27. PMID:29222373 [En línea]: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29222373](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29222373)
6. Atlas de la Diabetes. 2017. 8va edición; publicada por la Federación Internacional de la Diabetes el 14 de noviembre de 2017, [En línea]: <http://www.elpapirodeebbers.com.ar/2018/01/diabetes-mapa-de-una-lucha-titanica.html>
7. Bergman, R.N.; Mittelman, S.D. 1998. Central role of the adipocyte in insulin resistance. *Clin. Physiol. Pharmacol.* 9, 205–221.
8. Boucher, J.; Kleinridders, A.; Kahn, C.R. 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a009191.
9. Brandan, N. C., Llanos, I. C., Miño, C. A., Rodríguez, A. 2011. Hormonas Pancreáticas. Cátedra de Bioquímica-Facultad de Medicina- U.N.N.E. Edición 2011. Pp. 2- 17
10. Brito M., Manzano P., Botella E. 1996. Pronóstico de la cetoacidosis diabética recurrente. *Endocrinología.* 43:28.

11. Carrato Mena, A. 2017. Páncreas: Guía para pacientes y familiares. 1a edición. Julio de 2017. Grupo Español de Pacientes con Cáncer (GEPAC). Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid. 1.200 ejemplares.
12. Carrillo Aguado, J. L., Perales Acosta, L. H. R. 2000. Diabetes mellitus, primer lugar en tasa de mortalidad en el país. INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL. [En línea]: [https://www.ciecas.ipn.mx/foroodm/f\\_opinion/investigaciones/archivos/Diabetes\\_Mellitus.pdf](https://www.ciecas.ipn.mx/foroodm/f_opinion/investigaciones/archivos/Diabetes_Mellitus.pdf)
13. Cartaya, O., Inés Reynaldo, C. 2001. Reseña bibliográfica FLAVONOIDES: CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. Cultivos Tropicales, 2001, Vol. 22, Núm. 2: 5-14
14. Carvajal Carvajal, C. 2015. Revisión bibliográfica, Productos finales de glicación (AGEs) y la nefropatía diabética. Vol. 32 (1). Marzo, 2015. ISSN 1409-0015 Medicina Legal de Costa Rica - Edición Virtual.
15. Castro Serna D. y Castro Martínez M. G. 2006. Biguanidas. Med Int Mex 2006; Volumen 22, Núm. 5: 439-49
16. Ceriello A. 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. Diabetes Care. 2003; 216: 1589-1596.
17. Cervantes Villagrana R. D., Presno-Bernal J. M. 2013. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. Revista de Endocrinología y Nutrición. Vol. 21, No. 3: 98-106
18. Chena J. A. 2001. Diabetes Mellitus; aspectos para educadores. Novo Nordisk Pharma, S.A. z-1745-2001.
19. Coman, C., Ruginá O. D., Socaciu, C. 2012. Plants and Natural Compounds with Antidiabetic Action. Print ISSN 0255-965X; Electronic 1842-4309. Not Bot Horti Agrobo, 2012, 40 (1): 314-325
20. Coppack, S. W., Persson M., Miles J. M. 1996. Cinética de fenilalanina en tejido adiposo humano. J Clin Invest. 1996; 98: 692-697.
21. Cruz Hernández D., López Silva V. N. 2002. Plantas Medicinales. Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002-2005. Disponible en:

[http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/fig/Plantas\\_medicinales\\_Seminario\\_Final\\_Silva\\_Nataly.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/fig/Plantas_medicinales_Seminario_Final_Silva_Nataly.pdf)

22. Delbosc, S., Paizanis, E., Magous, R., Araiz, C., Dimo, T., Cristol, JP., Cros, G., Azay J. 2005. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis*. 179(1): 43-49.
23. Dey, A., Laksmanan, J. 2013. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediaoxidative stress and injury in liver. *Food & Funtion* 4, 1148-1184.
24. Donath M. Y., Ehses J. A., Maedler K., Schumann D. M., Ellingsgaard H., Eppler E., Reinecke M. 2005. Mechanisms of  $\beta$ -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005; 54: 108-113.
25. Dupas, J., Goanvec, C., Feray, A., Guernec, A., Alain, C., Guerrero, F., Mansourati, J. 2016. Progressive Induction of Type 2 Diabetes: Effects of a Reality–Like Fructose Enriched Diet in Young Wistar Rats. *PLoS ONE*. 11(1): 1-13.
26. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. 2000. Resultados nacionales. Primera edición, D.R. © Instituto Nacional de Salud Pública.
27. Escamilla Jiménez, C. I., Cuevas Martínez, E. Y., Guevara Fonseca, J. 2009. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev. Fac. Med. UNAM Vol. 52 (2): 73-75*
28. Farah S, Nguyen T and Kelsberg G. 2019. Metformin for Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis *Am Fam Physician*. 2019 Feb 15; 99(4):262-263.
29. Federación Internacional de Diabetes (FDI). 2013. ATLAS de la DIABETES. 6ª edición. [En línea]: <file:///C:/Users/EQUIPO/Downloads/spanish-6th.pdf>
30. Federación Internacional de Diabetes (FDI). Atlas. Cuarta edición. 2010. Impacto económico de la diabetes. Recuperado de: [http://www.idf.org/sites/default/files/Economic%20impact%20of%20Diabetes\\_0.pdf](http://www.idf.org/sites/default/files/Economic%20impact%20of%20Diabetes_0.pdf)

31. Federación Internacional de Diabetes. Atlas de Diabetes. 2012. Update. 5th edición. [En línea]: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>
32. Federación Internacional de Diabetes. Atlas de diabetes. 2019. Update [En línea]: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes.html>
33. Federación Mexicana de Diabetes, A.C. (FMD). 2015. La disfunción del páncreas en la diabetes tipo 1 y tipo 2. Fuente: Bayer Diabetes Care.
34. Fernández M. 1996. Biología molecular de la diabetes mellitus. Rev. Endoc Nutr 1996; 4(3): 55-62.
35. Flecha L. G., Castello P. R., Gagliardino J. J., Rossi F. C. J. 2000 La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. Ciencia al Día Internacional 2000; 3: 1-17.
36. Franciscus, A., Highleyman, L. 2012. Introducción sobre el hígado. Hoja informativa HCSP. VERSIÓN 4 (SP).
37. García Martín, M., Zurita Molina, A. 2010. Transaminasas: Valoración y significación clínica. Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNPAE. 12: 267-275
38. Gelin L, Li J, Corbin K, Jahan I, and Nunemaker CS. 2018. Metformin Inhibits Mouse Islet Insulin Secretion and Alters Intracellular Calcium in a Concentration-Dependent and Duration-Dependent Manner near the Circulating Range Journal of Diabetes Research ID 9163052. doi.org/10.1155/2018/9163052
39. Ghorbani, A.; Rashidi, R.; Shafiee-Nick, R. 2019. Flavonoids for preserving pancreatic beta cell survival and function: A mechanistic review. Biomed. Pharmacother. 111, 947–957.
40. González Cortés, A. 1980. Lecciones de epidemiología. Editorial Méndez Cervantes, México.
41. Gonzalo Benito, H. 2012. Tesis Doctoral: Modulación de las vías de señalización celular que controlan el metabolismo energético por compuestos bioactivos presentes en soja y té verde: Implicaciones para la

- prevención del síndrome metabólico. Universidad de Lleida. Departamento de medicina experimental. 2012. 32, 52, 75: 293.
42. Graham, S. A., 1994. Revision of *Cuphea* section *Heterodon* (Lythraceae). *Systematic Botany Monographs* 20: 1-168.
43. Grover, J. K. y col. 2002. *Ethnopharmacol.* (2002) [PMID: 12020931] 81:81
44. Gugliucci A. 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc.* 2000; 100: 621-633.
45. Halliwell B, Gutteridge MC, Cross E. 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992; 119: 598-620.
46. Hegab, Z., Gibbons, S., Neyses, L. & Mamas, M. 2012. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. *World J Cardiology*, 4, 4, 90-102.
47. Henkler F., Behrle E., Dennehy KM., Wicovsky A., Peters N., Warnke C., Pfizenmaier K., Wajant H. 2005. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the 137 22 formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol.* 168: 1087-1098.
48. Hussain, T.; Tan, B.; Yin, Y.; Blachier, F.; Tossou, M.C.; Rahu, N. 2016. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID 7432797, 9 pages. [En línea]: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432797>
49. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información (INEGI) 2014. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Recuperado de: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
50. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información (INEGI). 2013. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Recuperado de: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>

51. Instituto Nacional de Salud Pública. 2016. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino. 2016. Informe Final de Resultados. [en línea]: [http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut\\_mc\\_2016-310oct.pdf](http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut_mc_2016-310oct.pdf)
52. Jamaludin M., Nazratun Nafizah A. H., Zariyantey A. H., Budin S. B. 2016. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage The role of oxidative stress and inflammation. Sultan Qaboos University Med J, Vol. 16, Iss. 2, 132–141, Epub. Doi: 10.18295/squmj.2016.16.02.002.
53. Jimenez I, Speisky C, Noran C. 2000. Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades: II mecanismo de defensa antioxidantes. *ReuChilNutr* 2000; 27 (2): 210-9.
54. Kim Y, Keogh J y Clifton P. 2016. Polyphenols and Glycemic control. *Nutrients*. 5; 8(1):1-17.
55. Kim, D.; Touros, A.; Kim, W.R. 2018. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Syndrome. *Clin. Liver Dis.* 22: 133–140
56. Kluth O., Mirhashemi F.; Scherneck S.; Kaiser D.; Kluge R.; Neschen S.; Joost H. G.; Schürmann A. 2011. Dissociation of lipotoxicity and glucotoxicity in a mouse model of obesity associated diabetes: role of forkhead box O1 (FOXO1) in glucose-induced beta cell failure. *Diabetologia* (2011). 54:605–616
57. Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. 1999. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic  $\beta$  cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* 1999; 96:329-339
58. Lena Sibulesky, M. D. 2013. Anatomía normal del hígado. *Clinical Liver Disease*, Vol 2, No S4, September 2013. 61-63.
59. Limardo, A. C., Ozcoidi, P., Herrera Camsen, S., Suárez Rua, S., Arena, F., Palermo, M. 2011. Anatomía y segmentación hepática, correlación ecográfica. *Revista de la Sociedad Argentina de Ecografía y Ultrasonografía*. Año XVI – No. 32.

- 60.**López de la Torre, M., Mediavilla, JD., Perán, F., Fernández, C. 1997. Excreción de catecolaminas urinarias y monitorización ambulatoria de la presión arterial en diabéticos normotensos y normoalbuminuricos. 40 Congreso Nacional de la SEEN. Zaragoza.
- 61.**López Rodríguez, M., Sánchez Orozco A. 2018. Manual de procedimientos del laboratorio de histopatología de la USAD. UMSNH. Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Laboratorio de Histopatología de la USAD. Pag. 34
- 62.**Loya López G. 2012. Fisiología Endócrina del Páncreas. [En línea]: <https://slideplayer.es/slide/3385363>
- 63.**Luevano, C. & Chapman, K. 2010. Dietary advanced glycation end product and aging. *Nutrients*, 2: 1247-1265.
- 64.**Madiraju A, Erion D.M. Rahimi Y. y col. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* 510 (7506): 542–546.
- 65.**Maedler K. 2008. Beta cells in type 2 diabetes –a crucial contribution to pathogenesis. *Diabetes Obes Metab.* 2008; 10: 408-420
- 66.**Magnusson C., Vaux D. L. 1999. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol Cell Biol.*1999; 77: 41-6.
- 67.**Mandrup Poulsen T. 2001.  $\beta$  cell apoptosis. *Diabetes* 2001; 50 (Suppl1): 58-63.
- 68.** Manterola, C.; Del Sol, M.; Ottone, N. & Otzen, T. 2017. Anatomía quirúrgica y radiológica del hígado. *Fundamentos para las resecciones hepáticas. Int. J. Morphol.*, 35(4):1525-1539, 2017.
- 69.**Marchetti M, Del Guerra S, Marselli L, Lupi R, Masini M, Pollera M, Bugliani M, Boggi U, Vistoli F, Mosca F, Del Prato S. 2004. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 89 (11):5535–5541.
- 70.**Martínez Flores S., González Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Los*

- flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* (2002) 17 (6) 271-278
- 71.** Martínez MA. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín, Septiembre 2005.
- 72.** Mayor Oxilia, 2010. Artículo de revisión, Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante R. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2010; 5(2): 23-29
- 73.** Megías, M., Molist, P., Pombal, M. A. 2017. La célula, Ampliaciones II. Atlas de Histología Vegetal y Animal (tejidos animales). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. Pag. 25-32
- 74.** Megías, M., Molist, P., Pombal, M. A. 2018. Tipos celulares: Hepatocito, Atlas de Histología Vegetal y Animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
- 75.** Möller Bredo, R. & Vazquez Odo, N. 2011. Anatomía del Hígado y páncreas de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *Int. J. Morphol.*, 29(1):76-79. [En línea]: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v29n1/art12.pdf>
- 76.** Montero E. 1996. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. *An FacMed (Perú)* 1996; 57 (4): 278- 81
- 77.** Mountz J. D., Zhang H. G., Hsu H. C., Fleck M., Wu J., al-Maini M. H., Zhou T. 1999. Apoptosis and cell death in the endocrine system. *Recent Prog Horm Res.* 1999; 54: 235-68; discussion 269. Review
- 78.** Niki E. 1999. Action of antioxidants against oxidative stress. In: Dizdaroglu M, Katarataya AE (Eds.) *Advances in DNA damage and repair*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pag. 313-318.
- 79.** Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles (OMENT). 2010 Sistema de Información en Enfermedades Crónicas (SIC). [En línea]: <http://oment.uanl.mx/tablero-de-control-de-enfermedades/Diabetes Mellitus>
- 80.** Oh, Y. S. (2015). Plant-Derived Compounds Targeting Pancreatic Beta Cells for the Treatment of Diabetes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1–12. doi:10.1155/2015/629863

81. Olaya Flórez, J. M., & Méndez Alzamora, J. 2003. Guía de plantas y productos medicinales. Bogotá: Convenio Andrés Bello
82. Olivera González, S., De Escalante Yangüela B., Velilla Soriano, C., Amores Arriaga, B., Martín Fortea P. y Navarro Aguilar M. E. 2010. Hepatotoxicidad por metformina. *Med Intensiva*. 2010;34 (7): 483–487
83. Olvera Granados, C. P., Leo Amador, G.E., Hernández Montiel, H. L. 2008. Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? *Bol. Med. Hospital Infantil Querétaro*. México. Vol. 65. 306 – 319.
84. OMENT. 2016. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 Informe Final de Resultados. [En línea]: [http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut\\_mc\\_2016-310oct.pdf](http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/12/ensanut_mc_2016-310oct.pdf)
85. Organización Mundial de la Salud. 2016. Diabetes. [En línea]: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
86. Orozco M. F. M. 2018. Efecto hipoglucemiante y antioxidante de la administración de *Cuphea procumbens* en un modelo de animales diabéticos. Tesis Maestría. UMSNH. 2018. Dirigida por DC Fenton NB.
87. Panreac Química S.L.U. an ITW Company. 2017. Tinción Hematoxilina-Eosina. Versión 2: JMBJUL17 CEIVD17ES, (Barcelona) España. Pag. 4. [En línea]: [https://www.itwreagents.com/download\\_file/ce\\_ivd\\_instructions/CEIVD17/es/CEIVD17\\_es.pdf](https://www.itwreagents.com/download_file/ce_ivd_instructions/CEIVD17/es/CEIVD17_es.pdf)
88. Piarulli, F., Sartore, G. & Lapolla, A. 2013. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update. *Acta Diabetol*, 50, 101-110.
89. Ramasamy, R., Yan, S. & Schmidt, A. 2012. Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids*, 42, 4: 1151-1161.

- 90.**Robertson P.R., Harmon J., Tran O. P., Poitout V. 2004. B-cell glucose toxicity, lipotoxicity and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004; 53 (Suppl. 1): S119-124.
- 91.**Rodríguez Bolaños RA., Reynales Shigematsu LM., Jiménez Ruíz JA., Juárez Márquez SA., Hernández Ávila M. 2010. Costos directos de atención médica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en México: análisis de micro costeo. *Rev. Panam. de Salud Pública*; 28: 412-420.
- 92.**Rodríguez C, Rodríguez J, Obregón O, Rodríguez M, Acosta J, Ordaz C. 1995. Radicales libres: parte II cáncer, diabetes y envejecimiento. *Rev. Cardiol*. 1995; 15 (1): 13-9. 9.
- 93.**Rosado Pérez, J., Mendoza Núñez, V. M. 2007. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes Mellitus. Unidad de Investigación en Gerontología, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, Distrito Federal. Proyecto DGAPA, UNAM, PAPIIT IN-223505-2. Volumen 32 No. 2. 58-69
- 94.**Ross, H. Michael., Wojciech P. 2008. *Histología: texto y atlas con biología celular y molecular*. 5ª edición. 2ª reimpresión. Buenos Aires; Médica Panamericana. Pag. 624-640.
- 95.**Ross, M., Romrell L. J., Kaye G. I. 1997. *Histología Texto y Atlas Color*. 3a edición. México: Panamericana; 511- 514.
- 96.**Russo B, Picconi F, Malandrucchio I and Frontoni S. 2019. Flavonoids and Insulin-Resistance: From Molecular Evidences to Clinical Trials *Int. J. Mol. Sci.* 20, 2061
- 97.**Rzedowski, GC. y Rzedowski J. 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. Pag. 1406
- 98.**Schalkwijk, C. & Miyata, T. 2012. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics. *Amino Acids*, 42, 1193-1204.

99. Sohal R. E. 1993. The free radical hypothesis of aging; an appraisal of the current status. *Aging Clin Exp Res* 1993; 5: 3-17.
100. Speisky H. 2006. Antioxidante fundamental para la salud. Instituto de Nutrición y tecnología de los alimentos de la Universidad de Chile.
101. Tajima K, Shirakawa J, Okuyama T, Kyohara M, Yamazaki S, Togashi Y, and Terauchi Y. 2017. Effects of metformin on compensatory pancreatic  $\beta$ -cell hyperplasia in mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 313: E367–E380 doi:10.1152/ajpendo.00447.201.
102. Tran, L.T., Yuen, V.G., McNeill, J.H. 2009. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem.* 332 (2): 145-159.
103. Triana M. M. 2001. La hiperglucemia y sus efectos tóxicos, un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol Vasc.* 2001; 2: 131-141.
104. Trojan Rodrigues M, Alves T. L. S., Soares G. L. G., Ritter M. R. 2011. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *J Ethnopharmacol.* 139(1):155-63.
105. Turnes J. 1994. Fuentes Intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. *Antioxidantes y calidad de vida.* 1: 16-19.
106. Vademécum. 2016. Monografías Principio Activo. Recuperado de: <https://www.vademecum.es/principios-activos-metformina-a10ba02>
107. Veiga E, Aguilar JA, Clavo B, Llanes L. 1997. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos;* 22: 201-216.
108. Villa Caballero L, Nava Ocampo A, Ponce Monter H, Frati Munari A. 2000. El estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético? *Gac Med Mex.* 2000; 136: 249-255.
109. Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- 110.**Viollet, B. Guigas, N. S. Garcia, J. Leclerc, M. Foretz, and F. Andreelli, 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science*, 122 (6): 253– 270. doi:10.1042/CS20110386
- 111.**Vlassara H, Palace MR. 2002. Diabetes and advances glycation end-products. *J Intern Med*. 2002; 251: 87-101.
- 112.**Watkins, N. G., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. 1985. Glycation of amino groups in protein. *J Biol Chem*, 260, 10629-10636.
- 113.**Woo S. L., Xu H., Li H., Zhao Y., Hu X. 2014. Metformin Ameliorates Hepatic Steatosis and Inflammation without Altering Adipose Phenotype in Diet-Induced Obesity. *PLoS ONE*. 9(3): 292-297.
- 114.**Xu, H.; Barnes, G.T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C.J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J.S.; Tartaglia, L.A.; Chen, H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112, 1821–1830.
- 115.**<https://es.slideshare.net/guest18ad09/apoptosis-y-ciclo-celular>.