



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



MEMORIA DE TESIS:

**"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE E HIPOGLUCEMIANTE DEL BERRO
(*Nasturtium officinale*) SOBRE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN RATAS
HIPERGLUCÉMICAS"**

QUE PARA TENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:
L. N. MERCEDES VICTORIA URQUIZA MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS BERTHA FENTON NAVARRO

COMITÉ TUTORAL:
**D. EN C. SERGIO GUTIÉRREZ CASTELLANOS
M. EN C. VICTOR MANUEL FARÍAS RODRÍGUEZ
M. EN C. HÉCTOR URQUIZA MARÍN
M. EN C. MANUEL LÓPEZ RODRÍGUEZ**

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. AGOSTO 2015.

Este trabajo de tesis se realizó bajo la dirección de la
Doctora en Ciencias Fisiológicas Bertha Fenton Navarro en el
Laboratorio de Glicobiología
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
UMSNH

Apoyado por: CIC-UMSNH 16.2-2013, 2014, 2015.

La Maestría en Ciencias de la Salud pertenece al Padrón
del Programa Nacional de Posgrados de Calidad de
CONACYT y este proyecto fue realizado con apoyo de la
beca número 286672.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	v
Índice de Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
I. Introducción.....	1
1.1 Especies reactivas de oxígeno (ROS) y sus efectos en organismos.....	1
1.2 Efectos de la dieta sobre concentraciones de ROS.....	2
1.3 Plantas como fuentes de antioxidantes.....	3
1.3.1 Estructura y clase de polifenoles.....	4
1.3.2 Biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles.....	6
1.4 Enfermedades que tienen una mayor producción de ROS.....	8
1.4.1 Hiperglucemia.....	8
1.4.2 Enfermedades neurodegenerativas.....	9
1.4.3 Cáncer.....	10
1.4.4 Enfermedad cardiovascular.....	11
1.5 Productos Terminales de Glicación Avanzada.....	12
1.6 Diabetes.....	14
1.6.1 Páncreas.....	16
1.7 Galectinas.....	18
1.7.1 Galectina-3.....	18
1.8 Modificaciones por ROS en páncreas, Diabetes y papel de Galectina-3.....	20
1.8.1 Galectina-3 y ROS.....	20
1.8.2 Galectina-3 y Diabetes.....	21
1.8.3 Efecto de ROS en páncreas y galectina-3.....	23
1.9 Berro (<i>Nasturtium officinale</i>).....	24
1.9.1 Origen y generalidades del Berro.....	24
1.9.2 Clasificación taxonómica del Berro.....	25
1.9.3 Valor nutricional, propiedades y usos terapéuticos.....	26

II.	Justificación.....	28
III.	Hipótesis.....	29
IV.	Objetivos.....	29
	4.1 General.....	29
	4.2 Específicos.....	29
V.	Material.....	29
	5.1 Animales.....	29
	5.2 Reactivos de grado analítico.....	30
	5.3 Kits Comerciales RADOX para enzimas antioxidantes.....	30
	5.4 Extractos de Berro (<i>Nasturtium officinale</i>).....	30
VI.	Métodos.....	30
	6.1 Preparación de extractos.....	30
	6.1.1 Extracto Crudo de Berro (ECB).....	30
	6.1.2 Extracto Acetónicos de Berro (EAB).....	30
	6.1.3 Extracto Alcohólicos de Berro (EOHB).....	31
	6.1.4 Fracción Sin Pigmentos (FSP).....	31
	6.2 Modelo Hiperglucemia.....	31
	6.2.1 Inducción de Hiperglucemia Experimental.....	31
	6.2.1.1 Estandarización de la Dosis para inducción.....	31
	6.2.2 Parámetros para evaluar el efecto hipoglucemiante en plantas...	33
	6.2.2.1 Técnica de alimentación oral.....	33
	6.2.2.2 Curva de Glucosa en ayuno.....	33
	6.2.2.3 Curva de Tolerancia a la Glucosa.....	34
	6.2.3 Evaluación de actividad hipoglucemiante aguda.....	35
	6.2.4 Administración crónica.....	36
	6.3 Estudios realizados a los diversos Extractos.....	37
	6.3.1 Contenido de polifenoles.....	37
	6.3.2 Contenido de fenoles.....	38
	6.3.3 Contenido de flavonoides.....	38
	6.3.4 Capacidad antioxidante.....	38
	6.3.5 Concentración de proteínas.....	39
	6.4 Cuantificación de Enzimas Antioxidantes.....	39
	6.4.1 Catalasa.....	39
	6.4.2 Glutación Peroxidasa.....	39
	6.4.3 Glutación Reductasa.....	40
	6.4.4 Superóxido Dismutasa.....	40
	6.4.5 Estado Total de Antioxidantes.....	40

6.5	Grado de Lipoperoxidación (Malondialdehído).....	40
6.6	Bioquímica sanguínea.....	41
6.7	Evaluación histopatológica del daño pancreático, renal y hepático.....	41
6.8	Western-Blot.....	41
6.9	Análisis Estadístico.....	42
VII.	Resultados.....	43
7.1	Evaluación de la Capacidad Hipoglucemiante de los diversos extractos de Berro (<i>Nasturtium officinale</i>) de manera aguda.....	43
	7.1.1 Estandarización de la dosis de inducción de Aloxano.....	43
	7.1.2 Estandarización de la dosis de Extractos de Berro.....	44
7.2	Administración Crónica de Berro (<i>Nasturtium officinale</i>).....	56
7.3	Evaluación de la Actividad Antioxidante de los Extractos de Berro (<i>Nasturtium officinale</i>).....	58
7.4	Cuantificación de enzimas antioxidantes.....	61
7.5	Grado de lipoperoxidación (Malondialdehído).....	64
7.6	Bioquímica sanguínea.....	65
7.7	Evaluación histopatológica de tejidos.....	67
7.8	Evaluación de la expresión de Galectina-3 con Western Blot.....	70
VIII	Discusión.....	71
8.1	Capacidad Hipoglucemiante de los diversos extractos de Berro (<i>Nasturtium officinale</i>) de manera aguda.....	71
8.2	Administración Crónica de Berro (<i>Nasturtium officinale</i>).....	73
8.3	Actividad Antioxidante de los Extractos de Berro (<i>Nasturtium officinale</i>)...	74
8.4	Cuantificación de enzimas antioxidantes.....	75
8.5	Grado de lipoperoxidación (Malondialdehído).....	76
8.6	Bioquímica Sanguínea.....	77
8.7	Evaluación histopatológica de tejidos.....	79
8.8	Expresión de Galectina-3 con Western Blot.....	80
IX.	Conclusiones.....	83
X.	Perspectivas.....	84
XI.	Bibliografía.....	85
XII.	Anexos.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estructura de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	1
FIGURA 2.	Biodisponibilidad de polifenoles.....	7
FIGURA 3.	Interacción AGE-RAGE y la inducción de estrés oxidativo, vasoconstricción y estado procoagulante.....	13
FIGURA 4.	Funciones pro y anti tumorales de galectinas en cáncer.....	24
FIGURA 5.	Berro (<i>Nasturtium officinale</i>).....	26
FIGURA 6.	Técnica de alimentación oral con cánula.....	33
FIGURA 7.	Valores de glucosa plasmática para el diagnóstico de anomalías de la curva de Tolerancia a la glucosa.....	35
FIGURA 8.	Estandarización de la dosis de Aloxano para la inducción de hiperglucemia en ratas.....	43
FIGURA 9.	Comparación de niveles de glucosa (mg/dL) en ratas sanas e inducidas a hiperglucemia con aloxano (200mg/kg peso).	44
FIGURA 10.	Estandarización de Dosis de Extracto Crudo de Berro.....	45
FIGURA 11.	Curva de glucosa en ayuno en ratas Sanas e Hiperglucémicas + Extracto Crudo de Berro (900mg/kg).	47
FIGURA 12.	Curva de glucosa en ayuno con extracto acetónico y alcohólico 4mg/kg.	48
FIGURA 13.	Curva de Glucosa en Ayuno con Extractos Acetónicos y Alcohólicos (8mg/kg).....	49
FIGURA 14.	Curva de Glucosa en ayuno con Fracción Sin Pigmentos (FSP) a una dosis de 900mg/kg.....	50
FIGURA 15.	Curva de Tolerancia a la Glucosa con Extracto Crudo de Berro (ECB).....	52
FIGURA 16.	Curva de Tolerancia a la Glucosa con Extracto Acetónicos (EAB) y Alcohólicos de Berro (EOHB) a una dosis de 4mg/kg.....	53
FIGURA 17.	Curva de Tolerancia a la Glucosa con Extracto Acetónicos y Alcohólicos de Berro a una dosis de 8mg/kg.	54
FIGURA 18.	Curva de tolerancia a la glucosa con Fracción sin Pigmentos.	55
FIGURA 19.	Peso observado durante la Administración Crónica (8 semanas).....	56
FIGURA 20.	Niveles de glucosa durante la Administración Crónica (8 semanas).....	57
FIGURA 21.	Curva de capacidad antioxidante del ácido ascórbico, extracto crudo de berro y extracto acetónicos y alcohólicos.....	59
FIGURA 22.	Comparación de capacidad antioxidante entre EC berro y ácido ascórbico.....	59
FIGURA 23.	Catalasa en Suero.....	61

FIGURA 24.	Catalasa en tejidos.....	61
FIGURA 25.	Glutación Peroxidasa.....	62
FIGURA 26.	Glutación Reductasa.....	62
FIGURA 27.	Superóxido Dismutasa.	63
FIGURA 28.	Estado Total Antioxidante.....	63
FIGURA 29.	Grado de Lipoperoxidación (Malondialdehído) en suero.....	64
FIGURA 30.	Grado de Lipoperoxidación (Malondialdehído) en tejidos.....	64
FIGURA 31.	Bioquímica 1ª parte (Glucosa, Urea, Creatinina, Proteínas totales, Albúmina y Globulina).....	65
FIGURA 32.	Bioquímica 2ª parte (Colesterol, Albúmina/Globulina, Calcio y Fósforo).....	66
FIGURA 33.	Bioquímica 3ª parte (ALT= Alanina Aminotrasferasa, AST= Aspartato Aminotrasferasa y FA= Fosfatasa Alcalina)	66
FIGURA 34.	Cortes histológicos de páncreas (400X con técnica de hematoxilina-eosina).....	67
FIGURA 35.	Micrografías de Hígado. (400X con técnica de hematoxilina-eosina).....	68
FIGURA 36.	Micrografías de cápsulas de Bowman de Riñón a 400X (Tinción hematoxilina-eosina).....	69
FIGURA 37.	Western-Blot de páncreas.....	70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Clasificación del berro (<i>Nasturtium officinale</i>). Modificado de: <i>PLANTS Database, 2015</i>.....	25
TABLA 2. Cuantificación de Polifenoles en los diversos extractos de berro.....	59
TABLA 3. Cuantificación de Fenoles en los diversos extractos de berro.	59
TABLA 4. Cuantificación de Flavonoides en los diversos extractos de berro.	59
TABLA 5. Actividad Antioxidante de Extractos de berro (<i>Nasturtium officinale</i>).	61
TABLA 6. Número de células β pancreáticas en los diferentes grupos.....	69

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3-DG	3-desoxiglucosona	IP	Inyección intraperitoneal
8-OH-dG	8-Hidroxi-2'- desoxiguanosina	IRS1	Insulin Receptor Substrate 1
Acil-CoA	Acil coenzima A	JNK	cinasa c-Jun N-terminal
ADA	Asociación Americana de Diabetes o <i>American Diabetes Association</i>	kcal	Kilo calorías
AE	Eficiencia antirradical	Ket	Cetonas
AGE	Productos Terminales de Glicación Avanzada o <i>Advanced Glycation Endproducts</i>	Leu	Leucocitos
ALT	Alanina Aminotrasferasa	LPS	Lipopolisacárido
ALX	Aloxano	M	Mitocondria
AMPK	AMP-activated protein kinase	MAPK	Mitogen-activated protein kinases
ANOVA	Análisis de Varianza	MDA	Malondialdehído
AP-1	Proteína Activadora 1	Menadiona	Vitamina liposoluble (K3), participa en la coagulación sanguínea, producción de glucógeno y en la formación de hueso.
AST	Aspartato Aminotransferasa	mg	Miligramos
AT1	Angiotensina II	MGO	Metilglioxal
ATP	Adenosin Trifosfato	MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
Bcl-2	Linfoma de células B 2 o B-cell lymphoma 2	mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
BHA	Hidroxibutilanisol	N	núcleo
Bil	Bilirrubina	NADH-Q	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducida- Coenzima Q
BSA	Albúmina de Suero Bovina o <i>Bovine Serum Albumin</i>	NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucléotido Fosfato
C	Citoplasma	NF-κB	Factor Nuclear Kappa B

cAMP	Adenosin Monofosfato cíclico	NIH	National Institutes of Health
cLDL	Colesterol LDL (Lipoproteína de Baja Densidad o <i>Low Density Lipoprotein</i>)	Nit	Nitritos
CRD	Dominio de Reconocimiento a Carbohidrato o <i>Carbohydrate recognition domain</i>	nm	Nanómetro
DE	Densidad Específica	NO	Óxido nítrico
DM	Diabetes Mellitus	NOM	Norma Oficial Mexicana
DNA	Ácido Desoxirribonucleico o <i>Desoxiribonuclec Acid</i>	NOX	NADPH oxidasas
DPPH	2,2 Diphenil-1- picrilhidrazil	°C	Grados centígrados
EAB	Extracto Acetónico de Berro	PARP-1	Poli-ADP-ribosa polmerasa 1
EC	compartimientos endosomales	PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas o <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
EC₅₀	Concentración que causa una disminución del 50% del DPPH	PKC	Proteín cinasa C
ECB	Extracto Crudo de Berro	PM	Membrana plasmática
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético	PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
EE	Error estándar	PPAI	Péptido amiloide de los islotes
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico o <i>Epidermic Growth Factor</i>	Pro	Proteína
ENSANUT	Encuesta Nacional de Nutrición	PVPP	Polivinilpolipirrolidona
EOHB	Extracto Alcohólico de Berro	RAGE	Receptor de Producto Terminal de Glicación Avanzada o <i>Receptor AGE</i>
Ery	Eritrocitos	RL	Radicales Libres

FA	Fosfatasa Alcalina	ROS	Especies Reactivas de Oxígeno o <i>Reactive Oxygen Species</i>
FSP	Fracción sin Pigmentos	rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramos	SS	Solución Salina
GAPDH	Gliceraldehído 3- fosfato – deshidrogenasa	STZ	Streptozotocina
Glu	Glucosa	TAS	Estado Total de Antioxidantes o <i>Total antioxidant Status</i>
GLUT2	Transportador de Glucosa 2	TEC₅₀	Tiempo necesario para lograr el EC ₅₀
h	Hora	TEP	1,1-3,3-tetraetoxipropano
Hb	Hemoglobina	TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa o <i>Tumoral Necrosis Factor Alfa</i>
Hg	Hipoglucemia	TTF-1	Factor de Transcripción Tiroideo- 1 o <i>Thyroid Transcription Factor- 1</i>
IFG	Glucosa en ayuno anormal (<i>Impaired Fasting Glucose</i>)	UBG	Urobilinógeno
IGF-2	Factor de Crecimiento Insulínico tipo 2 o <i>Insulin- like Growth Factor 2</i>	UMSNH	Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
IGFBP-3	Factor de Crecimiento que se une a proteína parecido a la insulina o <i>insulin like growth factor binding protein-3</i>	VSMC	Células vasculares de músculo liso o <i>vascular smooth muscle cells</i>
IGT	Intolerancia a la glucosa (<i>Impaired Glucose Tolerance</i>)	WHO	Organización Mundial de la Salud o <i>World Health Organization</i>
IL-1	interleucina-1	μg	Microgramos
Insulina	Insulina Neutral		
NPH	Protamine Hagedorn		



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"



RESUMEN

Evaluación del efecto antioxidante e hipoglucemiante del Berro (*Nasturtium officinale*) sobre la expresión de Galectina-3 en ratas hiperglucémicas.

El berro es una planta semi acuática empleada en la medicina tradicional para resfriado, tos, como diurético, en avitaminosis, anorexia y como hipoglucemiante en la diabetes; diversos estudios científicos han evaluado dicha propiedad hipoglucemiante así como la capacidad antioxidante que posee; sin embargo, no existen reportes sobre su efecto en la expresión de lectinas, específicamente galectina-3. Ésta es una lectina que tiene afinidad por lactosa y N-Acetilactosamina, desempeña funciones dentro y fuera de la célula, se le ha relacionado con inflamación, inmunidad y cáncer, así como con complicaciones de la diabetes entre las que se destacan la nefropatía, neuropatía y retinopatía. **Objetivo:** Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de berro, su capacidad hipoglucemiante, el daño de páncreas, riñón e hígado en ratas hiperglucémicas, así como la expresión de Galectina-3 en páncreas. **Metodología:** Preparación de extracto crudo de berro, extractos acetónicos, alcohólicos y de la fracción sin pigmentos; inducción de hiperglucemia con aloxano (200mg/kg vía IP) y estreptozotocina (60mg/kg IP) a ratas macho Wistar. Evaluación aguda (Curvas de Glucosa en Ayuno y de Tolerancia a la Glucosa) de la capacidad hipoglucemiante de los extractos y crónica (8 semanas) del Extracto Crudo de Berro. Cuantificación de polifenoles, fenoles y flavonoides, pruebas de capacidad antioxidante por DPPH y cuantificación de proteínas a los extractos. Cuantificación de enzimas antioxidantes y MDA. Bioquímica sanguínea. Evaluación histopatología de páncreas, riñón e hígado. Evaluación de expresión de Galectina-3 en páncreas con Western Blot. **Resultados:** Se obtuvo una alta capacidad antioxidante así como hipoglucemiante del extracto crudo de berro, se presentó un mayor número de células β pancreáticas en ratas tratadas con berro, así como una marcada expresión de Galectina-3 en ratas hiperglucémicas tratadas con insulina vs tratadas con berro. **Conclusión:** La administración de Extracto Crudo de Berro a Ratias Hiperglucémicas: disminuye niveles de glucosa, aumenta el número de células β pancreáticas e inhibe la expresión de Galectina-3.

Palabras clave: Hiperglucemia, berro (*Nasturtium officinale*), Galectina-3, páncreas.



Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"



ABSTRACT

Evaluation of antioxidant and hypoglycemic effect of watercress (*Nasturtium officinale*) over Galectin-3 expression in hyperglycemic rats.

Watercress is a semi-aquatic plant used in traditional medicine to treat different ailments, such as flu, cough, as diuretic, in avitaminosis, anorexia and in diabetes as hypoglycemic-treatment. Several scientific studies had evaluated the hypoglycemic and the antioxidant capacity of this plant; however, there are not reports about its effect in the expression of lectins, specifically Galectin-3. This is a lectin with affinity for lactose and N-Acetilactosamine, plays a role in and out the cell, it has been related with inflammation, immunity and cancer- functions, as well as diabetic complications such as nephropathy, neuropathy and retinopathy. **Objective:** To evaluate the antioxidant activity of watercress extracts, its hypoglycemic capacity, the pancreas, kidney and liver damage in hyperglycemic rats, as well as the Galectin-3 expression in pancreas. **Methodology:** Preparation of aqueous extract of watercress, acetone extracts, alcoholic and fraction without pigments extracts; Aloxan (200mg/kg)- and streptozotocin (60mg/kg))-hyperglycemia male Wistar rats induction. Acute evaluation of hypoglycemic capacity of extracts (Fasting Glucose and Tolerance Glucose Curves) and chronic of Aqueous Extract of Watercress (8 weeks). Quantification of polyphenols, phenols and flavonoids, antioxidant capacity test by DPPH and protein quantification of extracts. Antioxidant enzymes quantification and MDA. Blood biochemistry. Histopathological evaluation of pancreas, kidney and liver. Evaluation of expression of Galectin-3 in pancreas by Western Blot. **Results:** A high antioxidant and hypoglycemic capacity was obtained from watercress aqueous extract, a mayor number of β -cells was found in pancreas rats treated with watercress, as well as a marked expression of Galectin-3 in hyperglycemic rats treated with insulin vs watercress treatment. **Conclusion:** Aqueous watercress extract administration to hyperglycemic rats: decreases glucose levels, increases number of β -cells and inhibits Galectin-3 expression.

Key words: Hyperglycemia, watercress (*Nasturtium officinale*), Galectin-3, pancreas.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) y sus efectos en organismos.

Un radical (comúnmente llamado radical libre) es un átomo o grupo de átomos que tienen uno o más electrones sin aparear. Pueden tener carga negativa, positiva o neutra. Se forman como intermediarios necesarios en una variedad de reacciones bioquímicas normales; sin embargo, si no se controla su producción o se generan en exceso, pueden causar estragos en diversas macromoléculas. Una importante característica de éstos es una gran reactividad química, lo que explica tanto sus actividades biológicas naturales como la gran capacidad de causar daño celular. Se producen ya sea por el metabolismo normal celular *in situ* o de fuentes externas como contaminación, humo de cigarro, radiación, medicamentos, etcétera (Bowen, R. 2003; Pham-Huy, LA. *et al.* 2008).

Los radicales que conciernen a sistemas biológicos son los derivados del oxígeno principalmente, se les conoce como especies reactivas de oxígeno (o *reactive oxygen species* ROS por sus siglas en inglés). Dado que el oxígeno tiene en su último nivel de energía dos electrones sin aparear en diferentes órbitas, lo hacen susceptible de formar radicales. Entre los radicales que forma podemos encontrar: el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}), el radical peróxido (RO_2^{\bullet}) y el radical alcoxilo (RO^{\bullet}), así como especies no radicales derivadas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A continuación una ilustración de su estructura (Figura 1) (Circu, ML. *et al.* 2010).

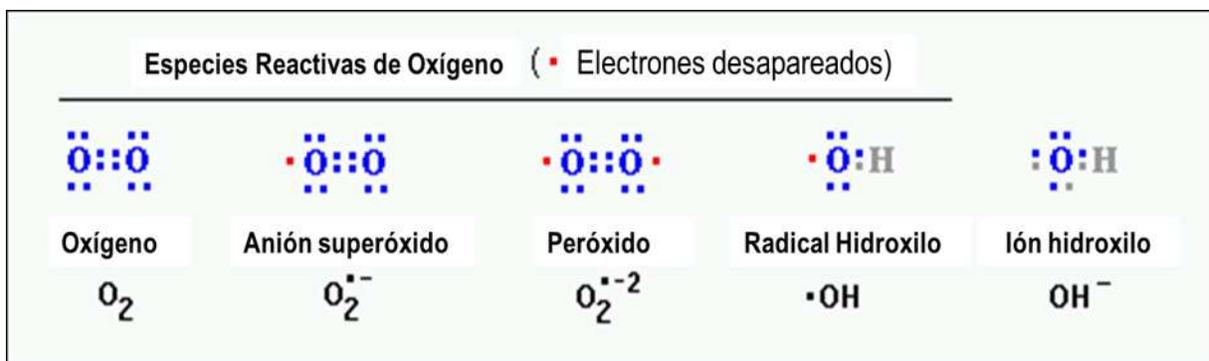


FIGURA 1. Estructura de especies reactivas de oxígeno (ROS). Modificado de: *Free Radicals and Reactive Oxygen* (Bowen, R. 2003).

Los radicales forman parte de procesos biológicos esenciales para la vida y se producen normalmente en la mitocondria cuando se reduce el oxígeno en la cadena de transporte de electrones para la producción de ATP, como intermediarios en varias reacciones enzimáticas, en defensa contra patógenos invasores por neutrófilos, en el tono vascular, señales de transducción, entre otros. Algunas de las enzimas mitocondriales responsables de dicha producción son: Q-citocromo C oxirreductasa (Complejo III), NADH-Q oxirreductasa (Complejo I) junto con ubiquinona, succinato deshidrogenasa (Complejo II), las flavoproteínas Acil-CoA deshidrogenasa y glicerol fosfato deshidrogenasa, monoamino oxidasa, dihidroratato deshidrogenasa, piruvato y α -cetoglutarato deshidrogenasa (Alfadda, A. *et al.* 2012; Kowaltowski, AJ. *et al.* 2009).

Existe evidencia que nos indica que estos radicales de oxígeno desempeñan un papel de señalizaciones inter e intracelulares como mitógenos aumentando la replicación de DNA y la proliferación celular, aunque no hay que olvidar que su gran reactividad los hace tóxicos, por ejemplo, afecta membranas celulares por un proceso denominado *peroxidación lipídica* en el que los ácidos grasos insaturados de la membrana fosfolipídica son atacados por estos radicales, causando: rigidez de la membrana, disminuyendo la capacidad de unión con enzimas, alterando la actividad de receptores membranales, alterando su permeabilidad y causando envejecimiento celular; además, produce daño a ácidos nucleicos, nucleótidos libres, proteínas, lípidos y carbohidratos causando daño, mutación, inactivación de proteínas y muerte celular (Bowen, R. 2003; Bartosz, 2009; Pham-Huy, *et al.*, 2008).

1.2 Efectos de la dieta sobre concentraciones de ROS

El organismo tiene muchos sistemas de defensa antioxidante para inactivar la presencia de radicales libres, distribuyéndose en los distintos compartimentos celulares. Un ejemplo es el sistema de defensa enzimático donde se incluyen enzimas como glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, entre otras. La nutrición juega un importante papel en el mantenimiento de dichas enzimas antioxidantes ya que algunos minerales como el selenio,

cobre, manganeso y zinc forman parte del centro catalítico de dichas enzimas. Si el aporte por la dieta de dichos minerales es inadecuado el sistema de defensa enzimático se altera (Fang, YZ. *et al.* 2002).

Una forma de clasificar los antioxidantes es la siguiente:

a) Proteínas de alto peso molecular:

Actúan por medio de reacciones redox con metales limitando la producción de radicales libres catalizada por los mismos. Entre ellas se encuentran las siguientes: Ceruloplasmina, Transferrina, Lactoferrina, Ferritina, Haptoglobina, Hemopexina, Albúmina.

b) Enzimas:

Atenúan la generación de especies reactivas de oxígeno al eliminar los potenciales oxidantes o por transformación de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en compuestos relativamente estables. Entre ellas están: Superóxido dismutasa, Catalasa, Glutación reductasa, Glutación peroxidasa, Glutación transferasa.

c) Antioxidantes de bajo peso molecular:

Su mecanismo de acción retrasando o inhibiendo el daño celular fundamentalmente lo llevan a cabo a través de su propiedad de recambio (*scavenger*) de radicales libres. Se subdividen a su vez según su solubilidad en:

- Liposolubles: tocoferol, carotenoides, quinonas, bilirrubina y algunos polifenoles.
- Hidrosolubles: ácido ascórbico, ácido úrico y algunos polifenoles (Mataix, J. 2009).

1.3 Plantas como fuentes de antioxidantes

Las plantas producen cantidades significativas de antioxidantes como flavonoides, fenoles y polifenoles (como taninos) para prevenir el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno (ROS). Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y están generalmente involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión por patógenos. Estudios epidemiológicos y meta análisis sugieren que el consumo a largo plazo

de dietas ricas en plantas con polifenoles ofrecen protección contra el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas. En los alimentos, los polifenoles contribuyen a la acidez, astringencia, color, sabor, olor y estabilidad oxidativa. Existen también sustancias con actividad estrogénica (fitoestrógenos), como las isoflavonas, los lignanos y el estilbeno resveratrol, mientras que otros como los taninos, son capaces de fijar metales y proteínas, lo que afecta a la biodisponibilidad de éstos y puede estar en el origen de algunos efectos inespecíficos, por ejemplo antimicrobianos o prevención de enfermedades neurodegenerativas (Scalbert, A. *et al.* 2005; Tomás-Barberán, FA. 2003).

Los antioxidantes obtenidos a través de la dieta, pueden actuar de dos formas: primero, previniendo la generación excesiva de radicales libres (RL), evitando así que se produzca el daño celular por efecto del estrés oxidativo. Y segundo, después que se ha producido el daño, los antioxidantes pueden controlar los niveles de RL evitando que el daño continúe avanzando y con ello algunos síntomas de las enfermedades producidas por el efecto del estrés oxidativo pueden disminuir (Delgado, L. *et al.* 2010).

1.3.1 Estructura y clase de polifenoles

Los polifenoles son un largo y heterogéneo grupo de fitoquímicos provenientes de plantas. Más de 8,000 compuestos polifenólicos han sido identificados en varias especies de plantas. Todos los compuestos fenólicos de plantas provienen de un intermediario común: fenilalanina, o un precursor cercano, el ácido shikimico (Hanhineva, K. *et al.* 2010).

Los polifenoles se clasifican en diferentes grupos en función de los anillos de fenol que contenga y en base a los elementos estructurales que unan estos anillos con otros. Las clases principales incluyen: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos. Éstos se encuentran preferentemente en las capas más superficiales de verduras, frutas, cereales y otras semillas, para proteger de la oxidación los tejidos de las capas inferiores (Zavaleta, J. *et al.* 2005).

a) Ácidos Fenólicos

Se encuentran abundantemente en alimentos y se dividen en dos clases:

- Derivados del ácido benzoico. El contenido de ácido hidroxibenzoico en alimentos generalmente es bajo, con excepción de ciertas frutas rojas, rábano negro y cebolla, que llegan a tener concentraciones de varias decenas de mg por kilogramo de peso fresco.
- Derivados del ácido cinámico. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los anteriores y consisten principalmente de ácidos p-cumáricos, cafeicos, ferúlicos y sinápicos.

b) Flavonoides

Comprenden el grupo más estudiado de los polifenoles. Este grupo tiene como estructura base dos anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado. Se han identificado más de 4,000 variedades, muchas de las cuales son responsables de los colores atractivos de flores, frutas y hojas. Según la variación en el tipo de heterociclo involucrado, los flavonoides se dividen en seis subclases: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, antocianinas e isoflavonas. La quercetina, miricetina, catequinas, etcétera son de los flavonoides más comunes.

c) Estilbenos

Contienen dos porciones fenil conectadas por un puente de metileno de dos carbonos. Su presencia en la dieta humana es bastante baja. La mayoría de estilbenos en las plantas actúan como fitoalexinas antifúngicas, compuestos que solo se sintetizan en respuesta a infección o daño. Uno de los más estudiados, el resveratrol, se encuentra abundantemente en las uvas así como en el vino rojo.

d) Lignanos

Estos metabolitos secundarios de las plantas, son compuestos difenólicos que contienen 2,3-dibenzilbutano, estructuras formadas por la dimerización de dos residuos de ácido cinámico. Varios lignanos, como el secoisolariciresinol, se consideran como fitoestógenos. La fuente alimenticia más rica es la linaza que contiene secoisolariciresinol (más de 3.7g/kg de peso seco) y bajas cantidades de matairesinol (Pandey, KB. *et al.* 2009).

1.3.2. Biodisponibilidad y metabolismo de polifenoles

Biodisponibilidad es la proporción de nutrientes que se digieren, absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación; por lo que, además de conocer la cantidad de polifenoles en los alimentos, es más importante conocer la cantidad de polifenoles que es biodisponible dentro del contenido total de un alimento (Quiñones, M. *et al.* 2012).

La mayoría de los polifenoles están presentes en los alimentos como ésteres, glucósidos o polímeros, formas que no se pueden absorber. Éstas sustancias deben hidrolizarse por enzimas intestinales como la β -glucosidasa y la lactasa-florizina hidrolasa, o deben ser degradadas por la microflora del colon, que hidroliza glucósidos en agliconas y metaboliza masivamente las agliconas en distintos ácidos aromáticos (como ácido benzoico, equol, enterolactona y enterodiol), antes de poder asimilarse. Durante el proceso de absorción, los polifenoles sufren diversas modificaciones; de hecho, estos compuestos se conjugan en las células del intestino y posteriormente sufren procesos de metilación, sulfatación y/o glucoronidación en el hígado. Los polifenoles y sus derivados se excretan por vía urinaria o vía biliar, como se muestra en la Figura 2 (Quiñones, M. *et al.* 2012; Tomás-Barberán, FA. 2003).

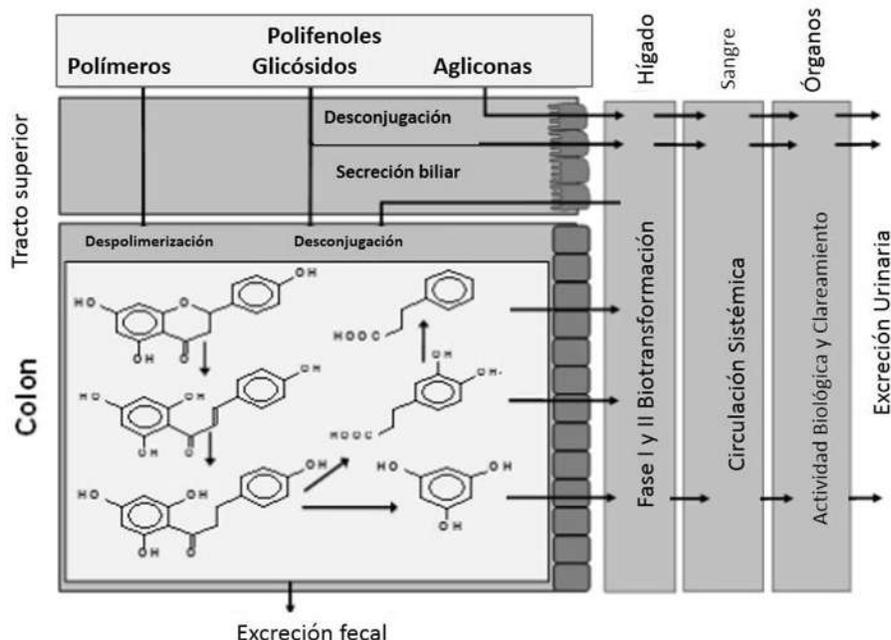


FIGURA 2. Biodisponibilidad de polifenoles.

Dentro del organismo, los productos de los polifenoles de la dieta y su bio-conversión microbiana atraviesan exitosamente el metabolismo hepático de la fase I y II, se absorben en la circulación sistémica, interactúan con los órganos y finalmente, se excretan en la orina o las heces. Modificado de: *van Duynhoven, J. et al. 2011.*

Así en general, los polifenoles que llegan a la sangre y a los tejidos son diferentes a los que se localizan originalmente en los alimentos. Diversos estudios *in vivo* han sugerido que solo el 5% del total de polifenoles ingeridos diariamente son absorbidos en el duodeno, y de este porcentaje solo un 5%, principalmente flavonoles, alcanzan la circulación sanguínea sin cambios en su estructura. El resto del total de polifenoles ingeridos (95%) va a llegar al colon, donde son fermentados por la microflora colónica y dan lugar a metabolitos microbianos que se absorben y aparecen como derivados conjugados en el plasma. Una vez absorbidos y metabolizados, los polifenoles pueden volver al duodeno a través de la circulación enterohepática, prolongando su presencia en el organismo. Finalmente, antes de ser eliminados por la orina o la bilis, los polifenoles circulantes en el plasma se unen ampliamente a la albúmina, la afinidad de los polifenoles por la albúmina varía dependiendo de su estructura química y se desconoce si su función es independiente de ésta o junto con ésta,

posteriormente son capaces de incorporarse a los tejidos, particularmente a aquellos donde son metabolizados (tejido hepático, estomacal, intestinal, colónico y nefrítico), pero además pueden acumularse en tejidos diana específicos como el tejido pulmonar, pancreático, cerebral, cardíaco y esplénico (Granado-Serrano, AB. 2009; Pandey, KB. *et al.* 2009).

1.4 Enfermedades que tienen una mayor producción de ROS.

Cuando el ambiente interno de la célula se ve perturbado por infección, enfermedad, toxinas o un desbalance nutricional, la mitocondria desvía el flujo de electrones de sí misma, formando especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, disminuyendo así su consumo de oxígeno. Esta barrera oxidativa funciona como un mecanismo de defensa ya sea para disminuir el consumo de toxinas patógenas o químicos del ambiente o para matar la célula por apoptosis y así evitar su propagación a células vecinas. Por lo tanto, la formación de ROS es una respuesta fisiológica al estrés (Lazo-de-la-Vega, ML. 2013).

1.4.1 Hiperglucemia

Una de las causas principales de complicaciones asociadas con la diabetes y la obesidad es la producción aumentada de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria por hiperglucemia. La exposición extendida a concentraciones altas de glucosa, que imita condiciones de diabetes mal controlada, provoca un prolongado y periódico incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno relacionado con el cambio morfológico mitocondrial. La inhibición de la ruptura mitocondrial previene fluctuaciones periódicas de la producción de especies reactivas de oxígeno durante la exposición a alta concentración de glucosa. La generación de estrés oxidativo juega un papel importante en la etiología de complicaciones en la diabetes tales como complicaciones vasculares, catarata diabética, nefropatía diabética y complicaciones neurológicas ya que diversos estudios indican que diversas vías bioquímicas relacionadas con hiperglucemia pueden incrementar la producción de radicales libres; además, los pacientes con diabetes tienen

reducidas las defensas antioxidantes y sufren de un mayor riesgo de daño mediado por radicales libres (Yu, T. 2005; Evans, JL. 2002; Chen, HY. 2006).

Se ha propuesto que la producción mitocondrial de superóxido inducido por hiperglucemia activa diversas vías que causan daño mediante la inhibición de la enzima Gliceraldehído-3-P- deshidrogenasa o GAPDH (parte de la glucólisis). Las ROS inhiben dicha enzima mediante un mecanismo que involucra la activación de la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1); ésta enzima está relacionada con la reparación de DNA y vías de apoptosis. Al ser inactivada la GAPDH aumentan los intermediarios de la glucólisis que ésta no modifica, entre ellos el gliceraldehído, su acumulación activa dos vías principales relacionadas con las complicaciones de hiperglucemia: 1) activa la vía de los AGE (productos terminales de glicación avanzada) que deriva al gliceraldehído fosfato y dihidroxiacetona fosfato en la síntesis no enzimática de metilglioxal. 2) El aumento de gliceraldehído 3 fosfato favorece la producción de diacilglicerol que activa la vía de la PCK (proteín cinasa C). Además, el gliceraldehído 3 fosfato al acumularse, se autooxida; ésta autooxidación genera H_2O_2 , que contribuye posteriormente con el estrés oxidativo. Finalmente, la acumulación de GADPH promueve la acumulación del primer metabolito de la glucólisis, glucosa. Lo que aumenta el flujo a la vía del polioliol, consumiendo NADPH en el proceso (Giacco, F. 2010).

1.4.2 Enfermedades neurodegenerativas.

Uno de los órganos más activos metabólicamente es el cerebro, consume el 20% del oxígeno total que ingresa al organismo, contradictoriamente presenta niveles bajos de enzimas que metabolizan reactantes basados en oxígeno a especies inocuas. Además de factores ambientales y genéticos, el estrés oxidativo lleva al ataque de células neurales por radicales libres y contribuye al fatídico desarrollo de la neurodegeneración. Un metabolismo desequilibrado y la excesiva generación de especies reactivas de oxígeno culminan en una serie de desórdenes como la enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson,

envejecimiento y otros desórdenes neurales. La toxicidad de los radicales libres contribuye al daño de proteínas y DNA, la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, inflamación, lesiones de tejido y la subsecuente apoptosis celular (Uttara, B. 2009; Shukla, V. 2011).

También se ha observado que la mitocondria juega un papel importante, no solo como productora de ATP por fosforilación oxidativa, sino también como regulador intracelular de la homeostasis de Ca^{++} y como productor endógeno de ROS. Y son estas funciones las que desempeñan un rol relevante en el daño celular por excitotoxicidad, un proceso resultante de la sobrestimulación de los receptores glutamato. La estimulación ionotrópica de dichos receptores es responsable de la entrada aumentada de Ca^{++} y se relaciona con la muerte neuronal, degeneración sináptica y mayor producción de ROS. La sobrecarga intracelular de Ca^{++} se ha descrito que induce tanto apoptosis como necrosis (Rego, AC. *et al.* 2003).

1.4.3 Cáncer

Entre las moléculas que se ven afectadas por las ROS, se encuentra el DNA. Las ROS inducen varias clases de daño al DNA, incluyendo la ruptura de cadenas, modificación de bases y la unión cruzada con proteínas. El 8-Hidroxi-2'-desoxiguanosina, (8-OH-dG) es un producto base mayormente modificado por oxidación del DNA, se sabe que para su formación participan el radical Hidroxilo ($\cdot OH$), el oxígeno singulete (oxígeno molecular energéticamente excitado) o la acción fotodinámica. Carcinomas en humanos de células renales tienen un mayor contenido de 8-OH-dG que el tejido renal no tumoral adyacente y se han encontrado resultados similares en tumores de otros órganos, lo que indica que el DNA de tejido neoplásico se encuentra más expuesto a ROS que su contraparte no tumoral (Toyokuni, S. 1995).

Estudios relacionados con el consumo de frutas y verduras en el papel de la prevención de cáncer (pulmón, colon, seno, cérvico-uterino, esófago, cavidad oral, estómago, vejiga,

páncreas y ovario), mostraron que en personas que consumían bajas cantidades de éstos (<500mg/día) tenían el doble de riesgo de presentarlos a comparación de las personas que consumen altas cantidades (500-1000mg/día) (Williamson, G. 2008).

Mientras que en células normales existe una producción baja de ROS que regula la proliferación estable de éstas, en células cancerígenas se ha observado que su producción se encuentra aumentada. Además, las ROS se encuentran estrechamente relacionados con la iniciación tumoral, progresión y mantenimiento, su aumento es debido a la constante activación de factores transcripcionales como NF- κ B y AP-1. El estrés oxidativo también puede inducir daño al ADN que lleva a una inestabilidad genómica y que puede contribuir a la progresión del cáncer. Dentro de los factores relacionados con cáncer y ROS se encuentran: factores de crecimiento como EGF y PDGF (que aumentan la producción de ROS en células expuestas a éstos), la actividad mitogénica de Ras es dependiente de superóxido, la sobreexpresión de Mox1 (subunidad catalítica de NADPH oxidasa) induce la generación de superóxido y la transformación de células produciendo tumores agresivos, niveles elevados de ROS se han relacionado también con la activación de MAPK (Mitogen-activated protein kinases) que lleva la progresión maligna de diversas líneas celulares (Benhar, M. 2002).

1.4.4 Enfermedad Cardiovascular

Niveles fisiológicos de ROS se aprecian en la señalización de moléculas para la regulación de un amplio rango de procesos en el sistema cardiovascular y contribuyen al mantenimiento de su homeostasis. Sin embargo, el exceso o el aumento sostenido de la generación de ROS (estrés oxidativo) tiene un rol importante en el inicio, progresión y consecuencias clínicas de la enfermedad cardiovascular incluyendo hipertensión, dislipidemia, aterosclerosis, infarto al miocardio, angina de pecho y falla cardiaca. El estrés oxidativo induce la proliferación celular, hipertrofia, apoptosis e inflamación por medio de diversas cascadas de señalización y factores transcripcionales sensibles a redox.

Se presenta la peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas que inducen la superexpresión de genes redox, sobrecarga intracelular de calcio y fragmentación de DNA resultado en daño a células vasculares de músculo liso (VSMC –*vascular smooth muscle cells*-), células endoteliales y del miocardio (Csányi, G. 2014; Higashi, Y. 2009).

Algunos mecanismos por los que los ROS afecta el sistema cardiovascular es mediante la activación del receptor para Angiotensina II (AT1), que estimula la NAPH oxidasa no fagocítica y la generación de superóxido y H₂O₂ en varios tipos celulares vasculares incluyendo células de musculo liso vasculares, células endoteliales y fibroblastos. Los ROS intracelulares modifican la actividad de tirosin-cinasas, así como MAPK y pueden inhibir la actividad de las proteínas tirosin fosfatasas contribuyendo a la activación de proteínas tirosin-cinasas. En cuanto a la prevención de enfermedad cardiovascular, se ha correlacionado inversamente al consumo de flavonoides con niveles de colesterol total en plasma y cLDL, con menor riesgo de enfermedad coronaria arterial (Hai Liu, 2003; Touyz, RM. 2004).

1.5 Productos Terminales de Glicación Avanzada

Los productos terminales de glicación avanzada (o AGEs –Advanced Glycation Endproducts- por sus siglas en inglés), son aductos no enzimáticos que se forman en un ambiente pro-oxidante y se acumulan en una gran variedad de tejidos. Éstos se generan cuando los azúcares reductores como la glucosa, reaccionan de manera no enzimática con el grupo amino de las proteínas, lípidos o ácidos nucleicos mediante una serie de reacciones formando bases de Schiff y productos de Amadori, a este proceso también se le conoce como reacción de Maillard. La hiperglucemia crónica lleva a la acumulación de estos productos no enzimáticos de glicación en proteínas, incluyendo el colágeno de paredes arteriales por ejemplo. Una propiedad crítica de los AGEs es su capacidad de activar al receptor de productos terminales de glicación avanzada o RAGE, un receptor de señalización de transducción de la superfamilia de

inmunoglobulinas. En dicha interacción, los AGEs tienen un potente impacto en tejidos, estimulando procesos ligados a la inflamación y sus respectivas consecuencias. Se ha observado que los AGEs causan perturbaciones en diversas enfermedades como diabetes, inflamación, neurodegeneración y envejecimiento debido a la rápida generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como se esquematiza en la Figura 3 (Bierhaus, A. *et al.* 2005; Ramasamy, R. 2005; Makita, Z. 1991).

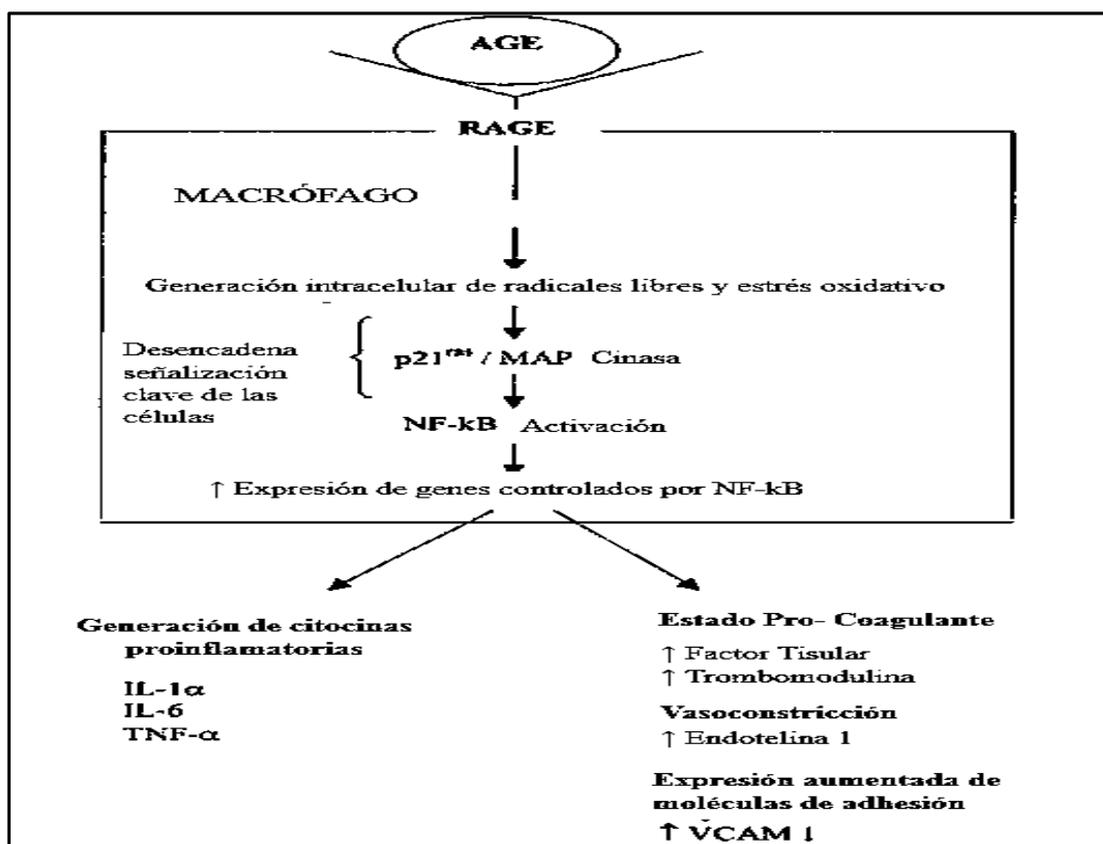


FIGURA 3. Interacción AGE-RAGE y la inducción de estrés oxidativo, vasoconstricción y estado procoagulante.

Modificado de: Singh, R. *et al.* *Diabetología*. 2001.

En la reacción de Maillard se forman productos intermedios durante el rearrreglo de Amadori que son reactivos, esos se conocen como α -dicarbonilos u oxoaldehídos e incluyen productos como 3-desoxiglucosona (3-DG) y metilglioxal (MGO). El 3-DG se forma a partir de fructosa 3-

fosfato, que es un producto de la vía del poliol. El MGO se forma de mecanismos no oxidativos de la glucólisis anaeróbica y de la descomposición oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados. Estos productos inducen al estrés oxidativo y la apoptosis celular (Singh, R. 2001).

1.6 Diabetes

Se define a la diabetes mellitus como un grupo de enfermedades o síndromes metabólicos caracterizados por la aparición de hiperglucemia secundaria a defectos de la secreción de insulina, de la acción de la insulina o de ambas. Además, aunque la alteración del metabolismo hidrocarbonado sea la más significativa, no podemos olvidar que el proceso también afecta al metabolismo proteico y lipídico. Debemos tener presente que la duración de la hiperglucemia y su gravedad son los factores más importantes en la aparición a medio y largo plazo de complicaciones de muy diversa índoles. Las manifestaciones clínicas más evidentes son las siguientes: pérdida de visión que puede llegar a ceguera, afectación renal que puede llegar a insuficiencia renal terminal que precise hemodiálisis y trasplante renal, afectación de los grandes vasos que puede condicionar patologías tan importantes como la insuficiencia arterial de extremidades inferiores que terminaría en la amputación a diversos niveles, cardiopatía isquémica con infarto de miocardio como manifestación más frecuentes y, por supuesto, también un incremento de la enfermedad vascular cerebral o una mayor incidencia de enfermedad isquémica intestinal. Sin embargo, el grupo de complicaciones más prevalentes son las que acontecen en el sistema nervioso, tanto en el sistema nervioso periférico como en el autonómico e incluso en el central (WHO, 1999).

La falta de acción insulínica, sea de la etiología que sea, inducirá una mala utilización de la glucosa que dará lugar, sobre todo, a la tríada clásica de poliuria, polidipsia y polifagia, pero, junto a estos síntomas, existirá un espectro clínico muy amplio que puede ir desde manifestaciones puramente catabólicas como la pérdida de peso, a otras que son la consecuencia de la afectación progresiva de los diferentes órganos y aparatos (ADA. 2004).

Clasificación de la diabetes:

a) Diabetes tipo 1

La destrucción de las células β del páncreas conduce a una deficiencia absoluta de insulina. Representa entre 5-10% de la DM. Hay 2 subtipos:

- DM mediada por inmunidad. Destrucción autoinmune de las células β del páncreas, en fases iniciales se encuentran en sangre anticuerpos contra las propias células (anticuerpos anti-islole o ICA), contra la insulina (anticuerpos anti-insulina), contra la descarboxilasa del ácido glutámico (anticuerpos anti-GAD₆₅) o contra las tirosinofosfatasas (anticuerpos anti-IA-2 e IA-2 β). Se desarrolla antes de los 25 años de edad, con igual presentación en ambos sexos y diferente incidencia según raza y hábitat geográfico.
- DM idiopática. Se desconoce su etiología.

b) Diabetes tipo 2.

Tipo más frecuente 90-95%. Patogénicamente, se caracteriza por la presencia de resistencia a la acción periférica de la insulina, secreción de insulina defectuosa o ambas. Lo característico es la multi-factorialidad con ausencia de destrucción autoinmune de las células β .

La obesidad abdominal está presente en más de un 85% de estos pacientes. Si bien su diagnóstico se realiza normalmente en la edad adulta (más de 40 años), cada vez la edad de diagnóstico es menor, estando presentándose en adolescentes y ocasionalmente niños con obesidad importante y/o gran resistencia a la insulina.

c) Otros tipos de DM

- Defectos genéticos de las células β . Déficit en la secreción de insulina, se les llama MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young).
- Defectos en la acción de la insulina de etiología genética. Determinadas por alteraciones del receptor o a nivel postreceptor.

- Enfermedades del páncreas exocrino. Numerosos procesos exocrinos pueden llegar a afectar el páncreas endocrino y producir DM, ejemplo: la pancreatitis, traumatismos graves, infecciones, pancreatectomías y cáncer de páncreas.
- Endocrinopatías. Concentraciones anormales de hormonas contra-insulares del tipo de la hormona del crecimiento, glucagón, cortisol o catecolaminas antagonizan la acción insulínica.
- Inducidas por fármacos u otras sustancias químicas. Actúan causando una disfunción secretora, insulino-resistencia, destruyendo las células β , entre otras.
- Infecciones. Ciertos virus se han asociado a la destrucción de las células β .
- Otros síndromes genéticos a veces asociados a diabetes. Entre los que se encuentran: Down, Klinefelter, Turner, Wolfram, ataxia de Friedreich, corea de Huntington, Laurence-Moon-Biedl-Rozabal, Prader Willi, distrofia miotónica o porfiria, entre otros.

d) Diabetes mellitus gestacional

Aparición de intolerancia a la glucosa e hiperglucemia de gravedad variable que específicamente no debe ser conocida antes del embarazo y debe manifestarse y ser diagnosticada durante el mismo (Tébar, FJ. 2009).

1.6.1 Páncreas

El páncreas de humano adulto mide alrededor de 15 a 18 cm de longitud por 3 a 5 cm de grosor, y pesa 60 a 100 g. Su superficie es de color café amarillento pálido, finamente nodular y firme a la palpación. No tiene una cápsula verdadera y está rodeado por una capa muy delgada de tejido conjuntivo, de la que se forman tabiques que entran a la profundidad del tejido pancreático y lo dividen en lóbulos. Cada lóbulo drena por una pequeña rama al conducto pancreático principal, el cual desemboca en la segunda

porción del duodeno para la secreción exocrina. Se ha dividido anatómicamente en cabeza, cuello, cuerpo y cola (Alvisouri, M. *et al.* 2000).

En las ratas, el páncreas es difuso y de color rosado, tiene forma de numerosas masas tisulares diseminadas en el mesenterio del intestino delgado, el carácter difuso del órgano resulta en una red de conductos que se unen formando un conducto común (de Costa, J. 1993).

El componente endocrino del páncreas está formado por 500 000 a 1 000 000 de pequeñas unidades glandulares, cuyo volumen comprende 1.5 a 2% del total de la glándula. Los islotes están conformados por células epiteliales endocrinas separadas de la porción exocrina por una capa de fibras de colágena; se han identificado cuatro tipos de células, en las cuales se secreta específicamente determinado tipo de hormonas:

- Células Alfa, secreta la hormona Glucagon.
- Células Beta, secreta la hormona Insulina.
- Células Delta, secreta la hormona Somatostatina.
- Células D1, secretan péptido intestinal vasoactivo.
- Células F o PP, secretan polipéptido pancreático.

La interacción facilitada por la estrecha cercanía de las células de los islotes determina un efecto paracrino, importante para el control de la secreción de cada una de las células de los islotes. El mismo estímulo que provoca la liberación de insulina tiene efecto inhibitor sobre las células alfa, y también sobre la secreción de las células delta y glucagón (Hernández, S. *et al.* 2000).

Las células beta se localizan en el cuerpo, cola y porción anterior de la cabeza del páncreas, constituyen 70-80% de las células endocrinas de los islotes. Su importancia radica en la producción de insulina y tienen la capacidad de secretar amilina o péptido amiloide de los islotes (PPAI). Su secreción inicia con la entrada de glucosa a la célula beta mediante difusión

pasiva facilitada por GLUT2 de forma extremadamente rápida. Una vez dentro de la célula, el paso determinante del metabolismo de la glucosa como estímulo para la liberación de la insulina es la fosforilación de la glucosa por medio de la glucocinasa. El calcio tiene participación importante en la regulación de la secreción de insulina. Los gránulos de las células beta que contienen insulina están unidos en forma lineal a microtúbulos, los cuales se contraen cuando se exponen a altas concentraciones de calcio intracelular. Otros mecanismos observados que apoyan la función fundamental del calcio son: 1) incremento de la captura de este elemento cuando hay estimulación de la célula beta por la glucosa, 2) retraso del flujo de calcio de la célula condicionado por la acción de la glucosa y 3) movilización de calcio de las mitocondrias producido por inducción del cAMP inducido por hexosa. Como principales factores inhibidores se encuentran el efecto alfa adrenérgico, catecolaminas, somatostatina y fármacos como diazóxido, fenitoína, vinblastina y colchicina.

Los receptores de insulina tienen dos subunidades: la alfa, que es extracelular y que se encarga de recibir, uniéndose a cada molécula de insulina; y la beta citoplásmica, con una cinasa de tirosina que se activa durante el acoplamiento con insulina y se autofosforila. Posteriormente se da un secuestro intracelular del complejo, para después dirigirse de nuevo a la superficie celular y facilitar la internalización de nutrientes al tejido sensible a la insulina. Además, se promueve el crecimiento por interacción con los receptores de IGF-II (Hernández, S. *et al.* 2000).

1.7 Galectinas

1.7.1 Galectina-3

De acuerdo a su estructura, las galectinas se han clasificado en: prototipo, tipo quimera y tipo repetición en tándem. Galectina-3 es la única en forma de quimera dentro de la familia de galectinas. En solución se encuentra como un monómero con dos dominios funcionales,

además cuenta con un dominio largo y flexible N-terminal (100-150 residuos de aminoácidos) capaz de ser fosforilado para ser secretada por un mecanismo nuevo no-clásico. Tiene afinidad por lactosa y N-Acetilactosamina. Galectina-3 ha sido detectada en macrófagos activados, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, epitelio de los tractos gastrointestinal y respiratorio, en riñones y en algunas neuronas sensoriales (Krzeslak, A. 2004).

La Galectina-3 contiene un dominio de reconocimiento a carbohidrato (CRD –*carbohydrate recognition domain*-) carboxilo terminal y una parte no-lectina en el amino-terminal que consiste principalmente de pequeñas repeticiones en tándem. Se encuentra ampliamente distribuido en tejidos y se le halla en células epiteliales, fibroblastos, células dendríticas y en células inflamatorias. En muchos tipos de células estudiadas, la galectina-3 se encuentra difundida en citoplasma, pero también es localizada en el núcleo y estructuras subcelulares como mitocondria, fagosomas y exosomas, en condiciones específicas. Es secretada por varios tipos de células incluyendo monocitos, macrófagos y células epiteliales, y la proteína extracelular puede unirse a un gran número de diferentes glicoconjugados en las superficies celulares y en las matrices extracelulares. La galectina-3 puede formar dímeros a través de interacciones intermoleculares que involucran al dominio N-terminal y pueden funcionar bivalentemente. Así, tiene el potencial de enlazar glicoproteínas de la superficie celular, causando activación celular (como mediador de la liberación y producción de superóxido). La galectina-3 se encuentra abundantemente presente dentro de las células y se ha demostrado que desempeña un importante papel en algunas respuestas biológicas por medio de acciones intracelulares. Se ha identificado como reguladora del ciclo celular, apoptosis y fagocitosis. Los mecanismos detrás de estas funciones no se han dilucidado, pero probablemente involucre la regulación de vías de señalización intracelular. De hecho, se ha mostrado que la galectina-3 regula procesos celulares tan fundamentales como el *splicing* del pre-mRNA. También se ha demostrado que interactúa con un regulador de apoptosis Bcl-2 y estimula la actividad de unión DNA de un factor transcripcional TTF-1 (Rabinovich, G. *et al.* 2001).

La expresión de galectina-3 es desregulada en la transformación de células normales en células tumorales. Está altamente expresada en hepatoma, subtipos de linfomas y carcinoma tiroideo, aunque no expresado por las células normales correspondientes. La expresión de galectina-3 es pro-regulada en neoplasias inducidas por virus, luz ultravioleta o químicos. En fibroblastos de ratón, la expresión de galectina-3 está regulada en manera comparable con otros genes mitógenos activados, incluyendo los oncogenes c-fos y c-myc. El gen de la galectina-3 contiene un elemento sensible al supresor tumoral p53 y la expresión de galectina-3 es contra regulada por p53. Las funciones conocidas de la galectina-3 sugieren un papel de ésta lectina en la invasión de células tumorales. Se ha mostrado que la presencia de galectina-3 en células transformadas puede promover un fenotipo invasivo (Nakahara, S. *et al.* 2005).

Así, la galectina-3 es un regulador pleiotrópico involucrado en diversas funciones, tanto dentro como fuera de la célula. Mientras que las funciones extracelulares son más comúnmente encaminadas a la unión de proteínas con glicoconjugados, las funciones intracelulares probablemente no involucren interacciones lectina-carbohidrato. Las abundantes repeticiones en tándem inusuales en la galectina-3 de prolina, glicina y tirosina en la región N-terminal pueden contribuir a su multifuncionalidad, dado que estas repeticiones en tándem pueden ser adecuadas para interacciones con otros componentes intracelulares. Información disponible sugiere que la galectina-3 puede tener un importante papel en una variedad de procesos fisiológicos incluyendo la inflamación, transformación neoplásica, así como inmunidad innata y adquirida. Estudios de deficiencia de galectina-3 en ratones presentan evidencia de su papel en la respuesta inflamatoria (Fu-Tong, L. *et al.* 2003).

1.8 Modificaciones por ROS en páncreas, Diabetes y papel de Galectina-3

1.8.1 Galectina-3 y ROS.

Existe numerosa evidencia que involucra a la galectina-3 en la activación de varios tipos celulares, particularmente aquellos que participan en respuesta inmune. Galectina-3 potencia la producción de interleucina-1 (IL-1) inducida por lipopolisacárido (LPS)

desencadenando la producción del anión superóxido por neutrófilos y monocitos en sangre periférica humana. El incremento en la respuesta oxidativa es paralelo al incremento de la unión de galectina-3 a la superficie celular mediante CD66a y CD66b que se sugiere son receptores funcionales de galectina-3 en neutrófilos (Dumic, J. *et al.* 2006).

Existen reportes que indican que cuando la membrana mitocondrial se despolariza aumenta la generación de anión superóxido en diversas células y a su vez, se relaciona con necrosis y apoptosis. La galectina-3 desempeña un papel de interferencia en la generación de ROS, ya que su sobreexpresión atenúa significativamente su presencia. Lo que sugiere que galectina-3 puede interferir en etapas tempranas de muerte celular que están asociadas con la perturbación de la homeostasis mitocondrial y la subsecuente formación de ROS, al interferir con TNF- α y menadiona y modificar el estado redox de la célula. Sin embargo, se le ha relacionado a la galectina-3 como componente del complejo de receptores de los AGEs, modulando efectos en una gran variedad de células y tejidos como procesos ligados a inflamación ya que la activación de RAGEs y AGEs desencadena la generación de ROS (Matarrase, P. 2000).

1.8.2 Galectina-3 y Diabetes

Mientras que la mayoría de galectinas son antiinflamatorias, galectina-3 parece desempeñar ambos roles: anti y pro inflamatoria dependiendo del tipo celular, la localización celular y la condición patofisiológica. Galectina-3 modula la respuesta de inmuno-inflamación y se une específicamente a productos terminales de glicación avanzada, lipoproteínas modificadas y endotoxinas. El desarrollo de exceso de adiposidad y la inflamación sistémica en la deficiencia de galectina-3 se asoció con intolerancia a la glucosa en ayuno y expresión reducida de adiponectina por el tejido adiposo. Lo que sugiere un rol protector de galectina-3 en obesidad y diabetes tipo 2. En otro estudio observaron que en ratones con el gen *apagado* de galectina-3 desarrollaron glomerulopatía después de inducirles diabetes contra aquellos ratones que conservaron el

gen activo para galectina-3. En los ratones deficientes en galectina-3 se presentó una proteinuria pronunciada y expansión mensangial asociadas con una marcada acumulación glomerular de AGEs comparada con los ratones con galectina-3 activa. Estos datos sugieren que la deficiencia de galectina-3 puede causar una remoción menor de moléculas glicadas irreversiblemente, resultado en un daño mediado por AGEs mayor en el tejido (Pejnovic, N. *et al.* 2013; Pricci, F. *et al.* 2000).

Diversos estudios *in vitro* sugieren que galectina-3 es un amplificador de la respuesta inflamatoria. Primero, galectina-3 está presente en el líquido extracelular y es capaz de activar a varias células, a su vez, estas células activadas pueden activar a otras. Esta lectina puede mediar la interacción célula-célula y célula-proteínas de la matriz extracelular, así como interacciones homotípicas célula-célula, haciéndolo apto para promover la respuesta inflamatoria. Galectina-3, además, puede inhibir la muerte programada celular. Al menos alguno de los mecanismos antes mencionados contribuyen a la función proinflamatoria que se le atribuye (Hsu, DK. *et al.* 2000).

Pugliese, G. *et al.* (2000) por otro lado, establecen que en medio diabético induce o pro-regula la producción de galectina-3, siendo que en condiciones normales, galectina-3 no es detectable a nivel glomerular/mensangial. Sin embargo, el envejecimiento tiene una influencia importante en su expresión, presentándose un aumento a mayor tiempo. La prorregulación de galectina-3/AGE-R3 inducida por diabetes y envejecimiento sugieren que la acumulación de AGEs que ocurren en estas condiciones, son capaces de modificar el patrón de expresión del complejo de receptores AGE (R1, R2 y R3). Dado que la exposición de células mesangiales y endoteliales a AGEs resulta en la expresión incrementada de galectina-3 (Pricci, F. *et al.* 2000).

Las complicaciones vasculares representan la mayor causa de morbi-mortalidad en la diabetes. La progresiva vasodegeneración de los lechos microvasculares son los mayores factores detrás del inicio y progresión de la nefropatía diabética, impotencia en hombres,

neuropatía y retinopatía. Además, se le ha relacionado con la falta de angiogénesis ya sea por isquemia y/o por inflamación local. Creciente evidencia sugiere que la formación de AGEs y la activación de sus receptores (entre ellos galectina-3 o R3) en el estado diabético contribuyen a la falla en el potencial angiogénico (Sititt, AW. *et al.* 2005).

1.8.3 Efecto de ROS en páncreas y Galectina-3

Miao Li y colaboradores (2012) asocian a las especies reactivas de oxígeno (ROS) con la patogénesis de la diabetes tipo 2, ya que inducen la disfunción y apoptosis de células β del páncreas, perjudicando su función y alterando la homeostasis de la glucosa. Las ROS, como ya se mencionó, se producen por la cadena transportadora de electrones mitocondrial, la sintasa de óxido nítrico, la xantina oxidasa, así como la familia de NADPH oxidasas (NOX). La fuente de ROS en células β pancreáticas se ha considerado tradicionalmente como la cadena transportadora de electrones mitocondrial; sin embargo, recientemente se ha probado que las ROS derivadas de NOX (NADPH oxidasas) pueden llevar a la disfunción de las células β . Ésta disfunción y apoptosis de las células β , parece estar mediado, al menos en parte por ROS derivados de NOX2 a través de vías JNK (cinasa c-Jun N-terminal) y p53, que como ya se mencionó regula a la galectina-3, es decir, desempeña una función aceleradora de apoptosis inducida rápidamente (Li, M. 2012; Hoyer, K. 2004).

Usando métodos de Western y Northern Blot, se estudió la expresión de Galectina-3 en cáncer primario de páncreas y en tumores metastásicos en comparación con el páncreas sano, los resultados muestran que galectina-3 estaba fuertemente sobreexpresada en el cáncer pancreático en humanos comparado con células pancreáticas normales; también se concluyó que galectina-3 puede tener impacto en la formación de metástasis, como se observa en la Figura 4, desempeña diversas funciones en el cáncer (Krzeslak, A. *et al.* 2004).

Dependiendo del tipo de cáncer, una galectina puede tener propiedades pro/anti tumorales. Dicha característica de las galectinas se puede explicar por la gran diversidad

de componentes a los que se une y por el patrón de expresión de dichos componentes, que varían de manera contingente al tipo celular. Otra hipótesis que apoya la dualidad de las funciones de las galectinas en cáncer está basada en la diversa compartimentalización de las proteínas en la célula (Vladoiu, MC. *et al.* 2014).

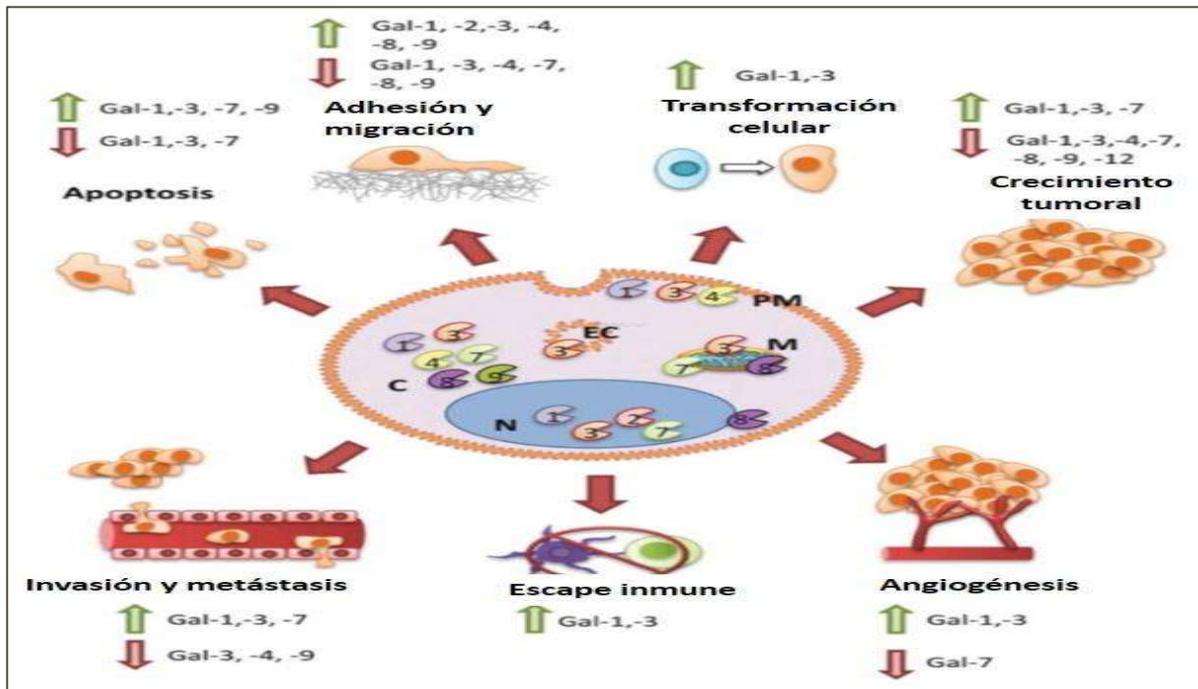


Figura 4. Funciones pro y anti tumorales de galectinas en cáncer.

Las galectinas se encuentran en el citoplasma (C), en la mitocondria (M), en el núcleo (N), en compartimientos endosomales (EC), y dentro de la membrana plasmática (PM). Son capaces de modular diversos aspectos de la progresión tumoral como la adhesión y migración celular, el escape inmune, transformación celular, apoptosis, angiogénesis, crecimiento tumoral, invasión y metástasis. Modificado de: *Vladoiu, MC. et al.* 2014.

1.9 Berro (*Nasturtium officinale*)

1.9.1 Origen y generalidades del Berro

Es una planta perenne común en arroyos, torrentes de aguas claras y pantanos, originaria de Europa y Asia Central. Se considera uno de los vegetales más antiguos consumidos por el ser humano. Actualmente se ha extendido por todo el mundo por ser una planta de consumo

doméstico muy apreciada en ensaladas. Se ha convertido en una especie invasora en la región de los Grandes Lagos, donde fue localizada por primera vez en 1847.

Es una planta perenne, acuática o semiacuática de entre 10 a 50 cm de altura que se agrupa en grandes colonias. Los tallos ascendentes son huecos y algo carnosos. Las hojas, de color verde oscuro, son glabras, bipinnadas y con limbo ancho. Las flores, pequeñas y blancas, se reúnen en ramilletes o panículas terminales.

(Sitio web: http://es.wikipedia.org/wiki/Nasturtium_officinale. 2013)

1.9.2 Clasificación taxonómica del Berro

Es una planta de la familia de las crucíferas o brasicáceas a la que pertenecen plantas como la col, las coliflores, las coles de Bruselas, etc. Crece de 10 a 60cm de altura, tiene tallos con raíces, son carnosos y ramificados. Las hojas alcanzan hasta 1.5cm de largo y están muy divididas; con las flores blancas o blanco violáceas. Sus frutos son vainas alargadas. Con el género **Rorippa *Nasturtium-aquaticum* (L.)** Schinz & Thell sinónimo de *Nasturtium officinale* R. Br. o conocida como berro de agua o cresón (CONABIO, 2009), en la Tabla 1 se puede observar su clasificación.

TABLA 1. Clasificación del berro (*Nasturtium officinale*). Modificado de: *PLANTS Database, 2015*.

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión	Spermatophyta (plantas con semilla)
División	Magnoliophyta (plantas con flor)
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Dilleniidae
Orden	Capparales
Familia	Brassicaceae/Cruciferae –Familia de la mostaza
Genero	<i>Nasturtium</i> R. Br.
Especie	<i>Nasturtium officinale</i> W. T. Aiton -berro

Originaria de regiones boreales y australes, localizado en clima semicálido, semi-seco, seco y templado entre los 1500 y los 2850msnm. Planta silvestre, crece frecuentemente a orillas de ríos y riachuelos y en zonas anegadas o extremadamente húmedas, asociada a bosques de encino, de pino y mixto de pino-encino y ocasionalmente a matorral xerófilo, se muestra una imagen en la Figura 5.

(Sitio web:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7248>. 2009; Infoagro, 2003).



Figura 5. Berro (*Nasturtium officinale*). Tomado de: plantasdemitierra.blogspot.com.es

En México podemos encontrarla en: Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Querétaro, Sonora, Tlaxcala, Veracruz (CONABIO, 2009).

1.9.3 Valor nutricional, propiedades y usos terapéuticos

100 gramos de berro aportan: 20.20kcal, 94.6% de agua, 2.03g de Hidratos de Carbono, 1.47g de Fibra, 1.60g de Proteínas, 0.3g de Lípidos. Contiene además: calcio, yodo, hierro, magnesio, sodio, potasio, vitamina A, C y ácido fólico, entre otros (Muñoz de Chávez, M. 2002).

Es una excelente fuente de vitaminas antioxidantes A y C, así como vitamina K, un micronutriente esencial para la salud ósea. También es una rica fuente natural de luteína y zeaxantina, dos carotenoides que tienen habilidad de proteger la visión y mantener la salud cardiovascular.

(Sitio web: http://www.lef.org/magazine/mag2007/nov2007_sf_watercress_01.htm. 2007)

Hoseini y colaboradores (2009) realizaron un estudio sobre niveles de glucosa en ratas diabéticas tratadas con extractos de berro (de etil acetato, acuoso y metanol), solo el extracto de metanol obtuvo una disminución significativa en éstos niveles a corto plazo (1 semana), a largo plazo (2 meses) fue el de etil acetato el que tuvo un resultado significativo y comparable con la glibenclamida, un fármaco anti diabético. En otro estudio, se utilizaron extractos acuosos de berro en ratas diabéticas para medir su efecto en glucosa y lípidos plasmáticos; se les dio una dosis baja (25mg/kg) y una alta (75mg/kg) por 4 y 8 semanas, en ambas dosis hubo reducción en los niveles de glucosa pero fue en la administración crónica donde se observó una reducción mayor y significativa, inclusive más importante que la insulina (Shahrokhi, N. *et al.* 2009).

Como en otros *Brassicaceae*, los flavonoides encontrados en el berro (*Nasturtium officinale*), fueron derivados glicosilados y acilados de quercetina y kaempferol, mostrando un patrón de glicosilación característico con ramnosa en la 7ª posición (Cartea, ME. 2011). Estudios hechos en ratas diabéticas tratadas con quercetina, muestran una reducción significativa en los niveles de glucosa alcanzando valores normales, pero no muestran ningún efecto en animales normoglucémicos. El mecanismo propuesto para este efecto es mediante un aumento en la actividad de la hexocinasa glucocinasa y un aumento en el número de los islotes pancreáticos (Vessal, M. 2003).

II. JUSTIFICACIÓN

Dada la gran prevalencia de Diabetes mellitus en México (9.2% según la ENSANUT 2012) y el mundo, así como su inminente aumento, los costos que representa y la merma en la calidad de vida de las personas que la padecen, es relevante investigar los mecanismos por los cuales ésta complicada patología se desarrolla, en aras de buscar mecanismos con que combatirla.

Si bien, se tienen tratamientos estandarizados y bien establecidos para su control, persisten las complicaciones que se presentan a pesar de ellos. Por lo que cada vez más se recurre a métodos alternativos como el uso de plantas medicinales que además de ser accesibles, presentan menos efectos secundarios a comparación de ciertos fármacos, por lo que la gente los usa ampliamente. Entre sus componentes se encuentran metabolitos secundarios con diversas funciones bioactivas, entre ellas antioxidantes.

Una de las fuentes más antiguas de los medicamentos, indiscutiblemente, han sido las especies vegetales. Casi todos los pueblos del planeta, usan vegetales como fuentes antiguas y modernas de “medicamentos”. En México, a los productos derivados de las plantas no se les denomina medicamentos, por lo que su regulación pasa al rubro de complementos alimenticios, y se expenden sin receta médica. Lo que resalta la necesidad de realizar su evaluación fitofarmacológica para garantizar los efectos benéficos y la seguridad para los consumidores (Figueroa Hernández, JL. 2009).

Es relevante evaluar la expresión de la Galectina-3 en páncreas, ya que diversos estudios muestran su relación con procesos inflamatorios y tumorales, hasta el momento no se tiene registro de qué efecto puedan desempeñar las plantas medicinales antidiabéticas como el berro (*Nasturtium officinale*) en la expresión de ésta galectina, pero que se espera disminuya y así poder reducir las complicaciones a largo plazo de las que son responsables las especies reactivas de oxígeno en la diabetes. El presente trabajo constituye el primer reporte de las variaciones de Gal-3 en la diabetes en respuesta a la administración oral del berro.

III. HIPÓTESIS

La administración oral de extracto de berro (*Nasturtium officinale*) disminuye niveles de glucosa sanguínea y atenúa la expresión de galectina-3 en páncreas de ratas Hiperglucémicas.

IV. OBJETIVOS

4.1 General:

Evaluar los cambios de expresión de Galectina-3 en páncreas en ratas hiperglucémicas tratadas con administración oral de extractos de berro (*Nasturtium officinale*) con actividad antioxidante e hipoglucemiante.

4.2 Específicos:

- 1) Evaluar la actividad antioxidante del extracto de berro (*Nasturtium officinale*).
- 2) Evaluar la capacidad hipoglucemiante de los diversos extractos de berro de manera aguda.
- 3) Evaluar el daño pancreático en un modelo de hiperglucemia *in vivo*.
- 4) Evaluar las variaciones en la expresión de Gal-3 en modelos experimentales de ratas.

V. MATERIAL

5.1 Animales.

Ratas macho Wistar de 250-350 g. Los animales se mantendrán en jaulas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h) y temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

El protocolo de investigación se encuentra aprobado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (CIC-UMSNH, 16.2-2013). Los procedimientos experimentales se realizarán de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de

especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y con la Guía de los institutos de Salud de los Estados Unidos de Norte América (NIH) para el uso y cuidado de animales de laboratorio (publicación NIH nº 80-23, 1996). Se tomaron las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales.

5.2 Reactivos de grado analítico.

5.3 Kits Comerciales RANDOX para enzimas antioxidantes.

5.4 Extractos de berro (*Nasturtium officinale*).

VI. MÉTODOS.

6.1 Preparación de extractos

Se obtuvo el berro fresco de un mercado conocido de la ciudad de Morelia, Michoacán. Una muestra fue llevada al Herbario de la UMSNH para su identificación y clasificación taxonómica (Anexo 1).

6.1.1 Extracto Crudo de Berro (ECB).

Se separaron las hojas del tallo y se sanitizaron con una solución de cloro al 5% por 15 minutos. Se filtraron y lavaron con agua destilada y posteriormente se homogenizaron en un mortero con agua destilada, se filtró el homogenizado y se centrifugó a 3000rpm por 15 minutos. Al sobrenadante se le denominó Extracto Crudo.

6.1.2 Extracto Acetónico de Berro (EAB).

Se separaron las hojas del tallo y se sanitizaron. Se hicieron lavados con acetona para extraer clorofila α y β , así como carotenoides y catequinas (Toledo, T. *et al.* 2004; Monge, E. *et al.* 1984). Se separaron dichos componentes del solvente acetona mediante destilación simple y evaporación con baño María, obteniendo finalmente los extracto acetónicos en forma de una pasta suave verde oscuro.

6.1.3 Extracto Alcohólico de Berro (EOHB).

Posterior a la extracción acetónica, se realizó la extracción alcohólica. Se realizaron lavados con alcohol de 70°, donde se obtuvieron los componentes altamente hidroxilados (como polifenoles) o glicosiladas como tilirósido, astragalina y quercetina (Avilés, D. *et al.* 2008). De igual manera se separaron por destilación simple y evaporación con baño María, obteniendo de igual manera una pasta suave verde oscuro.

6.1.4 Fracción sin Pigmentos (FSP).

Finalmente a las hojas sin pigmentos, se les homogenizó en un mortero con agua destilada y se le centrifugó a 3000rpm durante 15 minutos. Al sobrenadante se le denominó fracción sin pigmentos.

6.2 Modelo Hiperglucemia

6.2.1 Inducción de Hiperglucemia Experimental.

6.2.1.1 Estandarización de la Dosis para inducción.

- Se inició con una dosis de Aloxano de 60mg/kg de peso corporal disuelto en agua estéril, se inyectó intraperitonealmente (IP); dado el bajo índice de inducción que se obtuvo se aumentó la dosis a 75mg/kg en agua estéril vía IP. Se hizo un nuevo aumento a 150mg/kg en agua estéril vía IP sin tener un resultado satisfactorio. Por lo que se probó una dosis de 200mg/kg preparado en solución salina fría vía IP y se le dejaron 30 minutos post inyección sin alimento, se obtuvo un mejor resultado; sin embargo, se empleó una última dosis de 250mg/kg preparada en solución salina fría vía IP que resultó en un alto número de mortalidad en los animales. Por lo que se decidió continuar con la dosis de 200mg/kg.

El mecanismo de acción del aloxano consiste en inducir la secreción de insulina por un periodo corto de tiempo seguido de una supresión total de la respuesta del islote a la

glucosa. Al reducirse el aloxano se forma el ácido dialúrico, que es la forma re-oxidada del aloxano y entra en un ciclo redox en el que se generan especies reactivas de oxígeno y radicales superóxido, que dañan el DNA de las células beta pancreáticas. Adicionalmente se presenta una alteración en la homeostasis intracelular del calcio aumentándolo y de la mano de lo anterior mencionado resulta el daño en las células beta del páncreas y por ende un tipo de diabetes insulino dependiente (Rohilla, A. *et al.* 2012).

Los animales se mantienen en ayuno, se induce la diabetes con una inyección intraperitoneal de una sola dosis de aloxano (Sigma) recién preparada en solución salina con una dosis de 200 mg/Kg peso corporal (Dunn, JS. *et al.* 1943). Se continúa con el ayuno por 30 minutos más y posteriormente se les otorga comida y agua *ad libitum*.

También se indujo a hiperglucemia con estreptozotocina (Sigma) a una dosis de 60mg/kg (Ganda, OP. 1976) preparada en agua estéril con ácido cítrico (1mg/ml), tras un ayuno de 12 horas se inyectaron intraperitonealmente a las ratas y se les otorgo agua y comida *ad libitum* posteriormente a 30 minutos de espera postinyección.

La estreptozotocina es tomada por la célula beta pancreática vía el transportador GLUT2, causa daño al DNA por alquilación atribuido a su mitad nitrososea, a la producción de NO y de especies reactivas de oxígeno, disminuyendo la síntesis y secreción de insulina, éste fármaco permite inducir tanto diabetes insulino dependiente como no insulino dependiente, ésta se induce al inyectar intravenosa o intraperitonealmente 100mg/kg a ratas recién nacidas, a las 8-10 semanas de edad muestran la hiperglucemia así como una disminución de la sensibilidad de las células β a la glucosa (Szkudelski, T. 2001).

Los animales se consideraron hiperglucémicos, si sus niveles de glucosa sanguínea (evaluada con un glucómetro Accu-Chek® Performa de Roche de una muestra de sangre de la cola) se encontraron entre 180-600 mg/dl o >15mmol/L en el segundo día subsecuente a la inyección de aloxano o estreptozotocina, cabe considerar que los niveles de glucosa en rata sana son de 4.1 a 7.33 mmol/L o entre 73.8 y 132 mg/dl (Packer, JT. *et al.* 1970).

6.2.2 Parámetros para evaluar el efecto hipoglucemiante en plantas.

6.2.2.1 Técnica de alimentación oral

Se llevó a cabo sujetando al animal e introduciendo la Cánula de alimentación oral (Animal feeding needles 16X3" 76.2mm w/3, Cadence Science, Inc.) que llega hasta el estómago evitando que lo administrado llegue a vías respiratorias.



FIGURA 6. Técnica de alimentación oral con cánula.

6.2.2.2 Curva de Glucosa en Ayuno

Parámetro empleado en la clínica para diagnosticar Diabetes Mellitus, valora la producción hepática de glucosa (gluconeogénesis) a partir de glucógeno, lactato o aminoácidos durante el ayuno. En personas con la enfermedad se presentan valores mayores a 126mg/dl en ayuno igual o mayor a 8 horas y es útil para diagnosticar a

personas asintomáticas. Por otro lado, al valorar la capacidad hipoglucemiante en plantas, ésta prueba es útil para valorar el efecto del producto de interés (planta) en el metabolismo hepático de la glucosa, específicamente sobre la gluconeogénesis. Consiste en dejar 10 a 12 horas de ayuno al animal, se toma una muestra de sangre para obtener glucosa basal, se administra el extracto de interés y se mide la glucosa a los 30, 60, 120, 280, 240 y 300 minutos (Andrade-Cetto, A. 2012).

6.2.2.3 Curva de Tolerancia a la Glucosa

Ésta es una prueba empleada para medir la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa, en la práctica clínica se emplea para diagnosticar a sujetos con Diabetes Mellitus o resistencia a la insulina. Consiste en dejar al sujeto en ayuno de 10 a 12 horas, posteriormente se toma una muestra de sangre basal, en la que si los valores de glucosa son iguales o mayores a 126mg/dl se le considera como positivo en la enfermedad de Diabetes mellitus y se cancela la prueba ya que puede implicar un riesgo a su salud si se continua con ella; o si tiene valores menores a los indicados se le administra una concentración de 1.75g/kg peso de glucosa (hasta un máximo de 75g) en 250ml de agua y se mide la glucosa a intervalos regulares de tiempo durante 2 a 3 horas. Si es igual o mayor a 200mg/dl al final de la prueba, se diagnostica DM, en la Figura 7 se observan los parámetros para establecer los diagnósticos correspondientes. En la valoración de plantas medicinales, sirve para evaluar el efecto de la planta en la absorción de glucosa, su metabolismo hepático (glucogénesis) o en los tejidos periféricos, así como valorar la producción pancreática de insulina; se inicia tomando una muestra basal de sangre para medir glucosa, posteriormente se le proporciona al modelo de experimentación de 1.5 a 3g/kg de peso corporal de glucosa y posteriormente el extracto a evaluar, se hacen mediciones periódicas (15, 30, 60, 120, 180, 240 minutos) de glucosa y se grafican para evaluar su comportamiento (Attanayake, AP. *et al.* 2013).

mg/dl	D I A G N Ó S T I C O					
≥ 200	D I A B E T E S	*	*	*	D I A B E T E S	
< 200					I G T	
≥ 140	I F G	N	N	N	N	
< 140		O	O	O		
≥ 126	N O R M A L	M	M	M	O	
< 126		A	A	A		
≥ 100	N O R M A L	A	A	A	M	
< 100		L	L	L		
≥ 60	N O R M A L	hg	hg	hg	L	
< 60		0	30	60		90
					120	
		Tiempo de toma de la muestra [minutos]				

FIGURA 7. Valores de glucosa plasmática para el diagnóstico de anomalías de la curva de Tolerancia a la glucosa.

*= Diagnóstico provisional de DM. Debe probarse con una prueba subsecuente. IFG= Impaired Fasting Glucose (glucosa en ayuno anormal). IGT= Impaired Glucose Tolerance (Intolerancia a la glucosa). hg= hipoglucemia. Tomado de: *Trujillo, H. 2007.*

Debido a que la absorción de plantas medicinales/productos naturales y la acción de sus compuestos activos es más lenta, se evalúan tiempos más largos en los dos parámetros antes mencionados, alcanzando hasta las 8 horas de evaluación.

6.2.3 Evaluación de actividad hipoglucemiante aguda.

Se realizaron administraciones agudas de: solución salina, insulina NPH (4UI/kg), extracto crudo de berro (900mg/kg concentración obtenida después de la estandarización de la dosis), fracción sin pigmentos (900mg/kg) y extractos acetónicos y alcohólicos (4mg/kg y 8mg/kg) en forma de curvas de glucosa en ayuno (en la que se mide la glucosa a los 0, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos) y de tolerancia la glucosa (en el que se administra una carga de glucosa de 1.5g/kg y después alguno de los tratamientos sugeridos, se mide la glucosa a los 0, 15, 30, 60, 120, 180 y 240 minutos), tanto a ratas sanas como hiperglucémicas (n=6 cada grupo) (*Attanayake, AP. et al. 2013*).

Los grupos para la dosis aguda (Curvas de glucosa en ayuno y de tolerancia a la glucosa) quedaron de la siguiente manera:

- **Grupo I Grupo Control:** Sanas.
- **Grupo II Control + extracto planta:** (900 mg/Kg peso) con una administración oral única.
- **Grupo III Grupo Control Ratas Hiperglucémicas:** Hiperglucémicas + solución salina.
- **Grupo IV Grupo Hiperglucémicas + Extracto Crudo de Berro** (900 mg/Kg peso) administración oral única.
- **Grupo V Grupo Hiperglucémicas + Extractos acetónicos o alcohólicos:** (4 y 8mg/kg peso) administración oral única.
- **Grupo VI Grupo Hiperglucémicas + Fracción sin pigmentos:** (900 mg/kg peso) administración oral única.
- **Grupo VII Grupo Hiperglucémicas + Insulina** (4UI por kilogramo de peso, insulina NPH) administración subcutánea única.

6.2.4 Administración crónica

Se realizó la administración crónica de insulina Glargina (4UI/kg) y extracto crudo de berro (1,200mg/kg), a ratas hiperglucémicas (aloxano y Estreptozotocina), a las que se midió la glucosa y el peso antes de iniciar y cada semana hasta completar 8 semanas de administración diaria (n=6 cada grupo) (Sharhokhi, N. *et al.* 2009).

Los grupos para la dosis crónica quedaron de la siguiente manera:

- **Grupo I Grupo Control:** Sanas.
- **Grupo II Grupo Hiperglucémicas + Extracto Crudo de Berro** (inducido con Aloxano 200 mg/Kg).
- **Grupo III Grupo Hiperglucémicas + Extracto Crudo de Berro** (inducido con Estreptozotocina 60mg/Kg).

- **Grupo IV Grupo Hiperglucémicas + Insulina** (4U por kilogramo de peso, insulina Glargina) administración subcutánea única diaria por 8 semanas.

El peso corporal se midió una vez a la semana hasta que se completó el periodo. Los niveles sanguíneos de glucosa se midieron utilizando un Glucómetro (Accu-Chek® Performa de Roche) cada semana durante el periodo experimental.

Al término del periodo experimental, los animales se sacrificaron 24 h posteriores al último tratamiento con inyección intraperitoneal del barbitúrico pentobarbital (1ml/kg peso) (De Segura, IAG. 2001). Se tomaron muestras de: sangre, páncreas, riñón e hígado. Los tejidos se lavaron utilizando solución salina estéril. Dos partes de los tejidos se guardaron congelados para su procesamiento por el método de Western Blot y la evaluación de MDA (malondialdehído) y en formol (10%) para su procesamiento histológico posterior. Se repartió la sangre en 2 muestras una de tubo seco y otra con EDTA.

6.3 Estudios realizados a los diversos Extractos.

6.3.1 Contenido de polifenoles.

Se basó en el método de Folin-Ciocalteu (1927) y Singleton y Rossi (1965). El procedimiento a seguir consiste en el método Folin-Ciocalteu, donde la concentración de polifenoles se detecta mediante formación de sales de tungsteno y molibdeno, cuantificable en espectrofotometría a 760 nm. Para evitar posibles interferencias, se tratará parte de la muestra con polivinilpolipirrolidona (PVPP) insoluble, que se une específicamente a los polifenoles en medio ácido. De esta forma, la diferencia de absorbancias entre el extracto tratado y no tratado con PVPP refleja la concentración de polifenoles. Se usa como referencia al floroglucinol del que se realiza una curva patrón y posteriormente se interpola la muestra problema. Los resultados se expresaron en mg de floroglucinol equivalentes a polifenoles/gramo de peso fresco.

6.3.2 Contenido de fenoles.

Se realizó en base al método de Folin-Ciocalteu (Kin. *et al.* 2003) la reacción es la misma a la que se describe para polifenoles. Se usa como referencia al ácido gálico, del que se realiza una curva patrón evaluando la absorbancia a 750 nm y posteriormente se interpola la muestra problema. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico/gramo de extracto.

6.3.3 Contenido de flavonoides.

Se determinó utilizando el método Dowd el cual consiste en mezclar 5 ml de tricloruro de aluminio al 2% en metanol con el mismo volumen de extracto (Ramamoorthy, PK. *et al.* 2007). Se leyó la absorbancia a 415nm en espectrofotómetro manual (Jenway Modelo 6305) por 10 minutos y se interpoló con una curva patrón de quercetina. El contenido total de flavonoides se expresó en mg equivalentes de quercetina/g de extracto.

6.3.4 Capacidad antioxidante.

Se realizó mediante el método de DPPH de Bondet, V y Brand-Williams (1997), que se basa en la medición de la habilidad reductora del antioxidante contra el DPPH (2,2 *Diphenil-1-picrilhidrazil*) que posee un color púrpura y conforme se reduce vira a amarillo, dicha medición se realiza por espectrofotometría a 517nm. El porcentaje de DPPH remanente se calcula mediante la fórmula:

$$\%DPPH_{rem} = 100 \times [DPPH]_{rem} / [DPPH]_{T=0}$$

El porcentaje obtenido es proporcional a la concentración del antioxidante. La concentración que causa una disminución del 50% del DPPH se le denomina EC₅₀. El tiempo necesario para alcanzar un estado estable de EC₅₀ se define como T_{EC50}. Posteriormente Sánchez-Moreno (1998) y colaboradores introdujeron otro parámetro la “eficiencia antirradical (AE)”, que se define como: $AE = 1/EC_{50}T_{EC50}$.

Este ensayo se realizó con extracto crudo de berro, extracto acetónicos y extracto alcohólicos, se mezclaron con el DPPH, se dejaron en oscuridad por 30 minutos y se observó la absorbancia pasados los 30 y 60 minutos. De ésta manera se obtuvieron los parámetros antes mencionados.

6.3.5 Concentración de proteínas.

Método de Bradford, MM (1976), se basa en la utilización del colorante Coomassie, que vira de rojo a azul en presencia de proteínas, dependiendo de la concentración de éstas varía la tonalidad. Éste colorante se une selectivamente a la arginina y lisina de las cadenas polipeptídicas. Se valora por espectrofotometría a 595nm y se usa una curva patrón con BSA (Albúmina de Suero Bovina) en la que se interpola la muestra problema.

6.4 Cuantificación de Enzimas Antioxidantes

6.4.1 Catalasa

Se realizó en tejidos (páncreas, hígado y riñón) y suero con el método de Aebi, H (1984), el cual consiste en mezclar: buffer de fosfatos (pH 7), muestra (citosol o suero) y peróxido de hidrógeno; se mide por espectrofotometría (Jenway Modelo 6305) a 240nm en tiempo inicial y a los 30 segundos. Los resultados se reflejan en unidades CAT/mg proteína.

6.4.2 Glutati6n Peroxidasa

Para su valoración se empleó el kit comercial RANSEL de la marca Randox, cuya metodología se basa en la establecida por Paglia y Valentine (1967): técnica cinética compuesta NADPH-dependiente. Los análisis se realizaron en un espectrofot6metro manual (Jenway Modelo 6305). Los resultados se expresaron en U/L de sangre entera.

6.4.3 Glutación Reductasa

Se valoró en eritrocitos de forma manual mediante el kit comercial GLUTATHIONE REDUCTASE de la marca Randox. Glutación reductasa cataliza la reducción de Glutación en presencia de NADPH, que es oxidado a NADP⁺. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro manual (Jenway Modelo 6305). Los resultados se expresaron en U/L de sangre entera.

6.4.4 Superóxido Dismutasa

Se empleó sangre entera para su valoración con el kit comercial RANSOD de la marca Randox. Este método emplea xantina y xantina oxidasa como generadoras de superóxido y se valora su inhibición por colorimetría. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro manual (Jenway Modelo 6305). Los resultados se expresaron en U/mL de sangre entera.

6.4.5 Estado Total de Antioxidantes

Se realizó con el kit comercial TAS (TOTAL ANTIOXIDANT STATUS) de la marca Randox, en suero. Se basa en la reducción del radical ABTS⁺ en la presencia de componentes antioxidantes mediante valoración colorimétrica. Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro manual (Jenway Modelo 6305). Los resultados se expresaron en mmol equivalentes de Trolox /L de plasma.

6.5 Grado de Lipoperoxidación (Malondialdehído)

Se evaluó en tejidos (páncreas, hígado y riñón) y suero mediante la metodología de Shmedes y Holmer (1989). Se partió de una curva patrón hecha con TEP (1,1-3,3-tetraetoxipropano), en la que se interpolaron los valores obtenidos de las muestras; dichos valores fueron analizados con espectrofotometría a 532nm (Jenway modelo 6305). Los valores obtenidos se expresaron en mg MDA/mL.

6.6 Bioquímica Sanguínea

Se evaluó mediante el sistema automatizado de Química Clínica: An. Química Automatizado ES-218.

Se evaluaron los siguientes analitos: Glucosa y Colesterol (para evaluar el metabolismo de carbohidratos y lípidos respectivamente), Urea y Creatinina (son pruebas de funcionamiento renal), Albúmina, Globulina, Proteínas, Albúmina/Globulina, Alanin Aminotrasferasa, Aspartato Aminotransferasa y Fosfatasa Alcalina (son pruebas de funcionamiento hepático), Calcio y Fósforo (que indican el metabolismo óseo y mineral). Todo ello para valorar el correcto funcionamiento de los biosistemas bajo los tratamientos empleados (Velázquez, B. 2009).

6.7 Evaluación histopatológica del daño pancreático, renal y hepático.

Pequeñas porciones de los tejidos se fijaron utilizando formol al 10%. Se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se realizaron cortes de 5 µm de grosor. Se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (Culling, 1974) y se evaluaron al microscopio óptico a 100X y 400X para un análisis histopatológico.

6.8 Western-Blot

Las células de las muestras de páncreas fueron lisadas utilizando un amortiguador con 1% de Triton X-100, 10 Mm Tris (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 10 mg/MI aprotinina, 10 mg/MI leupeptina y 25 mg/MI fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF) por 5 min en hielo. Las células fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 10 min a 4°C, el sobrenadante se colectó. Una alícuota se mezcló con el amortiguador de cargado 2X y se desnaturizó 100°C por 5 min.

La concentración de proteínas se realizó con Bradford, a cada carril se administraron 100 mg/carril en el gel. Posterior a la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas

de nitrocelulosa y expuestas a 1.3 mg del anticuerpo anti-galectina-3 o a 1 mg del anticuerpo anti-ratón CD3ε Ab (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Se utilizaron posteriormente segundos anticuerpos contra cada uno y fueron revelados con quimioluminiscencia (Amersham, Arlington Heights, IL).

6.9 Análisis Estadístico

Se usaron las medidas de tendencia central: media y error estándar (E.E) así como un análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey, Área bajo la curva, ajuste del punto de inicio (para que todos los grupos inicien del mismo punto, se aprecia aún mejor cuáles grupos y cuánto es el descenso de los niveles de glucosa) y t de Student. Se consideró un p significativa <0.05. Se empleó el programa estadístico GraphPad Prism 6.0.

VII. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la Capacidad Hipoglucemiante de los diversos extractos de Berro (*Nasturtium officinale*) de manera aguda.

7.1.1 Estandarización de la dosis de inducción de Aloxano.

En la siguiente Figura (8) se muestra la efectividad en porcentaje que tuvieron las diversas dosis de inducción, en base a la estandarización mencionada anteriormente en Metodología. Se observa como la dosis de 200mg/kg fue la que mostró mayor efectividad.

A continuación se observa el promedio de los niveles de glucosa en el grupo sano y el grupo con hiperglucemia inducida con Aloxano (200mg/kg), mostrando niveles de glucosa de 86 ± 2.6 mg/dL vs 389 ± 57.2 mg/dL (Figura 9). Lo que muestra la efectividad del aloxano para inducir hiperglucemia.



FIGURA 8. Estandarización de la dosis de Aloxano para la inducción de hiperglucemia en ratas.

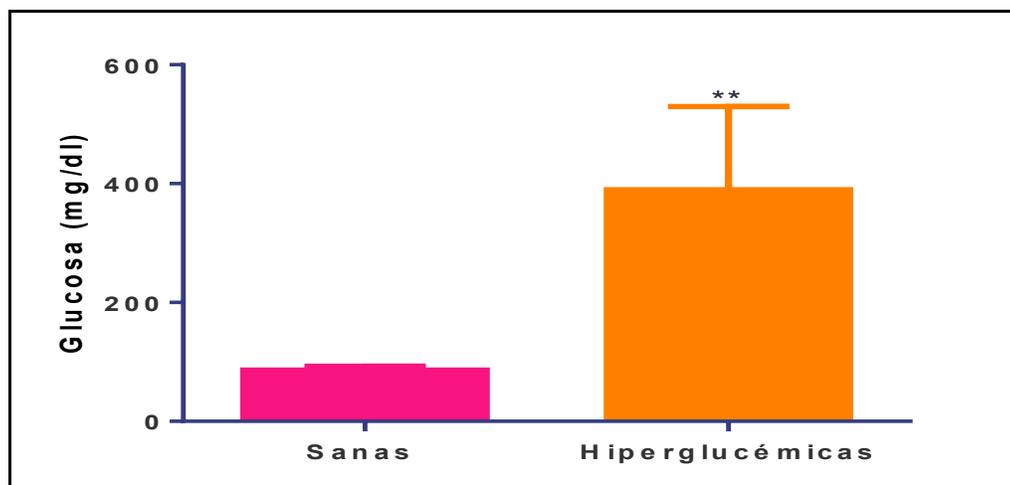


FIGURA 9. Comparación de niveles de glucosa (mg/dL) en ratas sanas e inducidas a hiperglucemia con aloxano (200mg/kg peso).

n=6 en cada grupo. Se comparó con t de Student pareada (**p<0.002).

7.1.2 Estandarización de la dosis de Extractos de Berro.

Para determinar la dosis adecuada para obtener el efecto hipoglucemiante, se inició con una dosis de 100mg/kg de peso de ECB (Hoseini, HF.et al. 2009) y se valoró con curva de glucosa en ayuno, se obtuvo un descenso de 8% sobre la glucosa inicial. Se aumentó la dosis a 300mg/kg peso, no se obtuvieron resultados. Posteriormente se realizaron las pruebas con 600mg y 900mg/kg peso de dosis obteniendo un descenso en la glucosa de 1.66% y 20% respectivamente, una dosis mayor (1,200mg/kg peso) reflejo solamente 12.3% de efectividad. Por lo que se determinó utilizar la dosis de 900mg/kg de peso del ECB y FSP para realizar las evaluaciones.

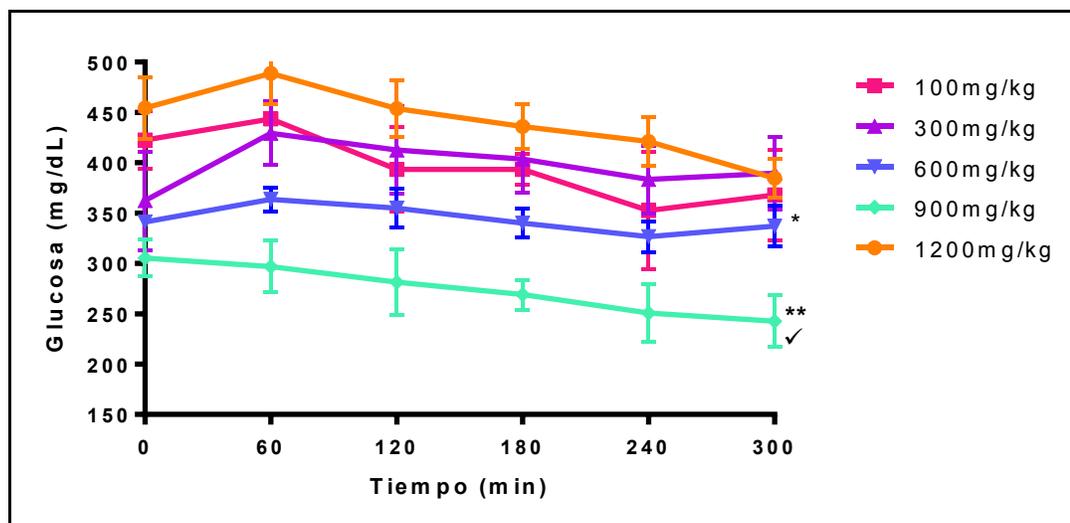


Figura 10A.

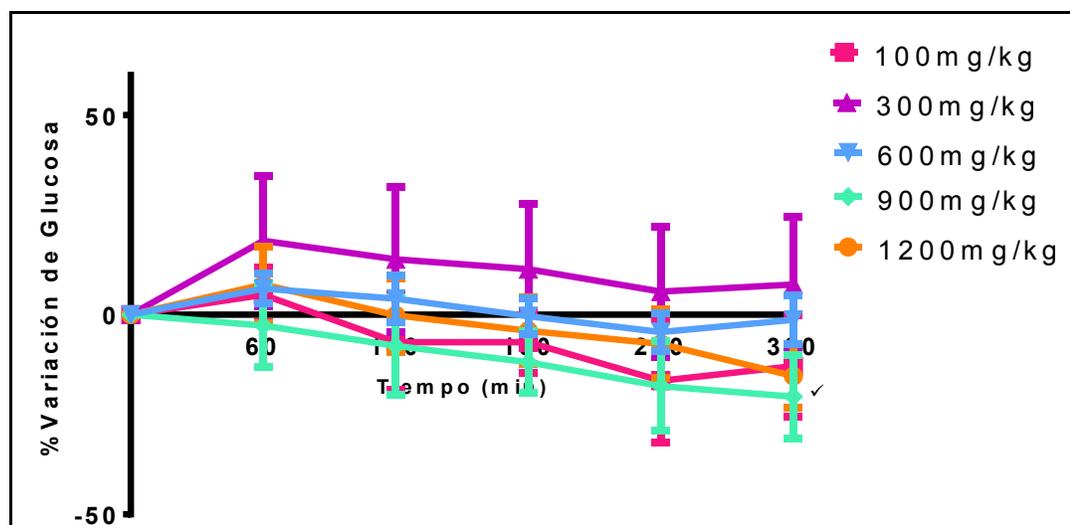


Figura 10B.

FIGURA 10. Estandarización de Dosis de Extracto Crudo de Berro.

10A. Curva de diferentes dosis de ECB * $P < 0.05$ 1,200mg/kg vs 600 mg/kg, ** $p < 0.001$ 1,200mg/kg vs 900mg/kg.

10B. Ajuste del punto de inicio, se muestra en porcentaje cuales dosis tuvieron un mayor descenso y en verde, la dosis seleccionada (900mg/kg).

El Área Bajo la Curva de la estandarización de la Dosis de ECB, mostró los siguientes resultados: A la dosis de 100mg/kg se le dio un valor de 100, la de 300mg/kg 101.8, la de 600mg/kg 81.35,

la de 900mg/kg 71.23 y la de 1200mg/kg 197.10. Como se observa, la de mejor resultado fue la dosis de 900mg/kg.

Para evaluar la actividad del extracto se utilizan concentraciones en base a estudios de toxicidad aguda (OECD 420, 2001) y al uso reportado en plantas medicinales donde se dosifican en una manera gradual las dosis fijas de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg siendo más utilizadas las dosis de 200 a 400 mg/Kg en administraciones crónicas. En este trabajo se decidió analizar el efecto de dosis bajas en los animales de experimentación, siendo las dosis de 4 y 8 mg/Kg para el caso de los extractos acetónicos y alcohólicos (Kavinshankar, N. *et al.* 2011; Munna, S. 2013; OECD, 2001).

Curva de Glucosa en ayuno.

En la Figura 11 se muestran los resultados de la curva de glucosa en ayuno con administración oral de extracto crudo de berro a 900mg/kg a ratas sanas e hiperglucémicas, insulina NPH y solución salina.

En la siguiente Figura (12) se muestra el comportamiento de la glucosa en ratas que fueron administradas con Extracto Acetónico de Berro (EAB) y Extracto Alcohólico de Berro (EOHB) a una dosis de 4mg/kg así como los controles: positivo Insulina NPH (4UI/kg) y negativo solución salina (0.9% de NaCl).

Se probó una dosis mayor para evaluar si se tenía un mejor efecto. A continuación se observa la curva de glucosa en ayuno con EAB y EOHB a una dosis de 8mg/kg (Figura 13).

Posteriormente se analizó la capacidad hipoglucemiante de la fracción sin pigmentos (FSP), ya que se analizó la presencia de componentes activos, los resultados se muestran en la siguiente Figura (14) se observa la curva de glucosa en ayuno con la Fracción Sin Pigmentos (FSP) a una dosis de 900mg/kg de peso corporal, no existen reportes previos que indiquen alguna función hipoglucemiante de éste extracto de la planta, por lo que los resultados que se presentan son relevantes e innovadores.

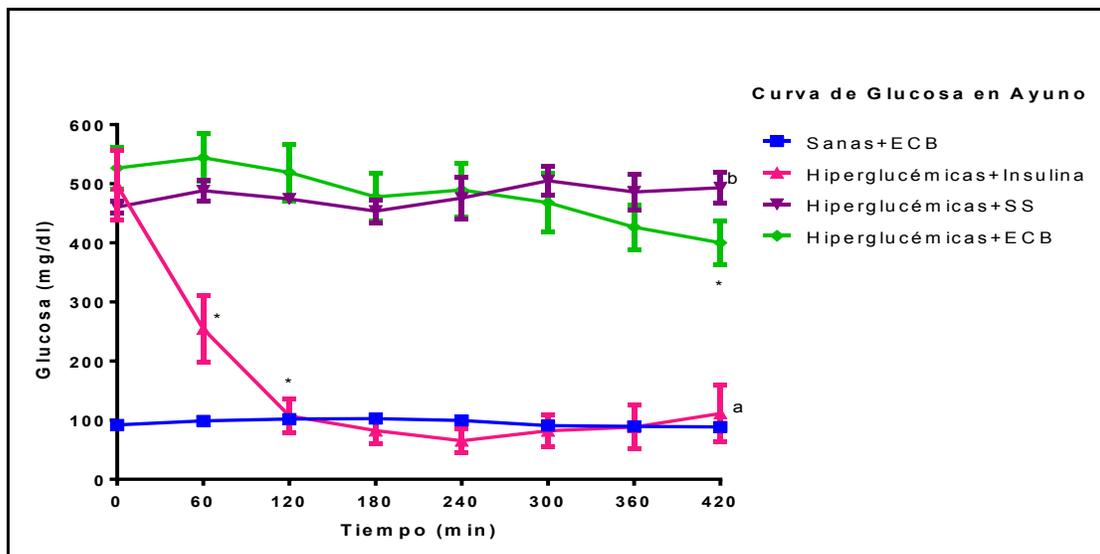


Figura 11A.

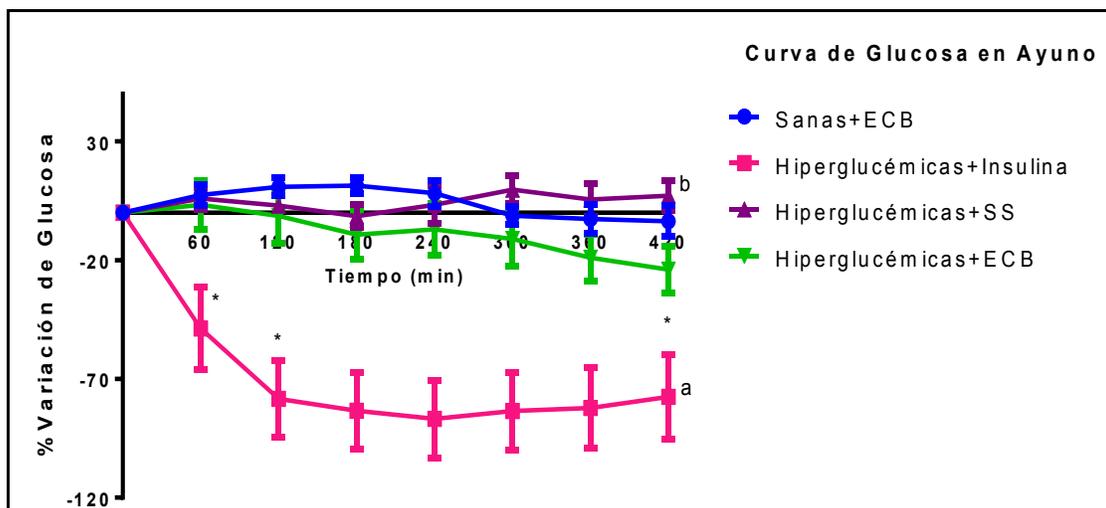


Figura 11B.

FIGURA 11. Curva de glucosa en ayuno en ratas Sanas e Hiperglucémicas + Extracto Crudo de Berro (900mg/kg). (n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo, a y b=p<0.05 Insulina vs Solución Salina).

Se muestra la media de cada grupo así como el error estándar. Se hicieron comparaciones inter e intra grupo ANOVA.

11A. En el grupo de ratas sanas, no se observa modificación en los niveles de glucosa, en el grupo hiperglucémico con ECB se observa un descenso de 20%, el grupo de insulina que tiene un descenso del 77.5% y el de solución salina que termina incrementando un 5% el nivel de glucosa, respecto a la glucosa inicial. No se obtuvo diferencia significativa entre el grupo de Hiperglucémicas+ ECB vs Hiperglucémicas +SS. El análisis de Área Bajo la Curva arrojó los siguientes resultados: Sanas+ECB= 1.29; Hiperglucémicas con: Insulina= 16.42, Solución Salina= 100 y ECB= 101.07. **11B.** Esta gráfica muestra un ajuste en el punto de inicio: Sanas+ECB se mantuvo igual, Hiperglucémicas + Insulina disminuyó 77.5%, con SS aumento 5% y con ECB disminuyó 20%.

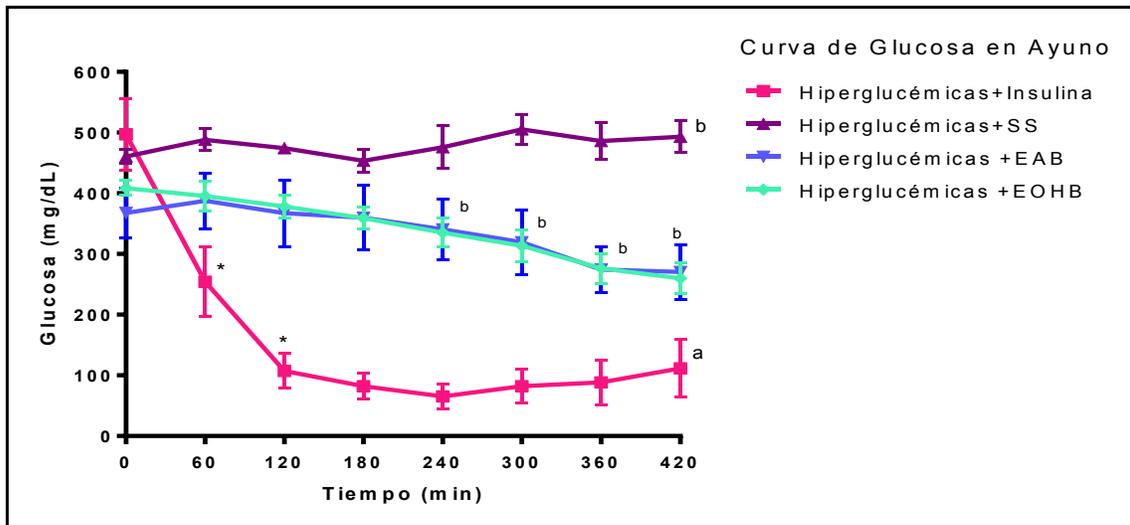


Figura 12A.

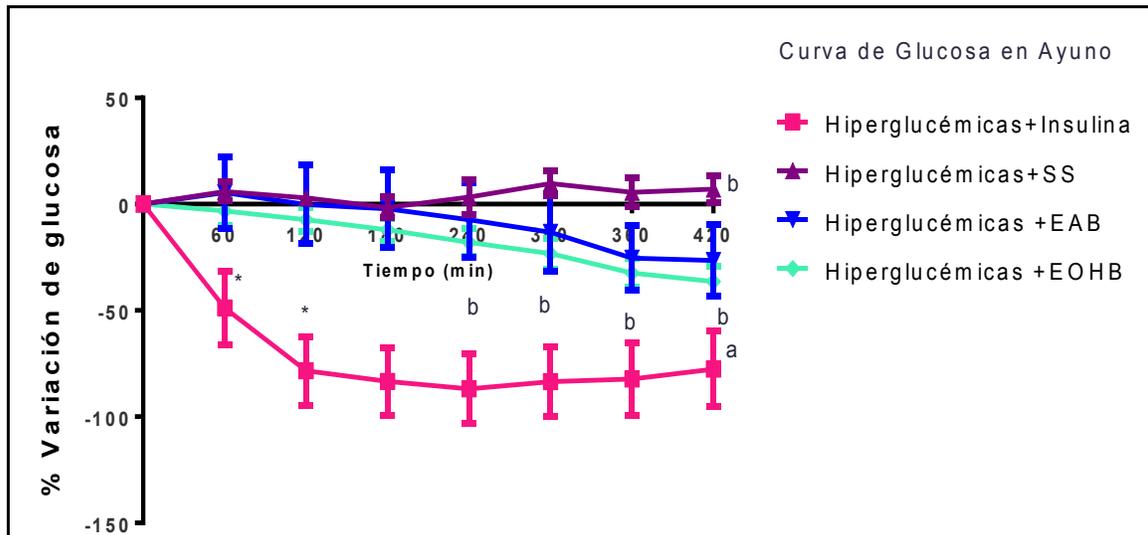


Figura 12B.

FIGURA 12. Curva de glucosa en ayuno con extracto acetónico y alcohólico 4mg/kg.

(n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo, b= p<0.05 EAB y EOHB vs SS).

12A. Se observa un descenso del 26.4% en el caso de los EAB y un 36.4% en el caso de los EOHB b= p<0.05 SS vs EAB y EOHB. El Área Bajo la Curva de los Extractos Acetónicos y Alcohólicos resultó en: 62.7 (EAB) y 63.6 (EOHB) vs 16.4 Insulina y 100 Solución Salina. **12B.** Se observa un ajuste del punto de inicio y los resultados en porcentajes. El EAB y el EOHB fueron significativamente diferentes (p<0.05) vs SS a partir del minuto 240.

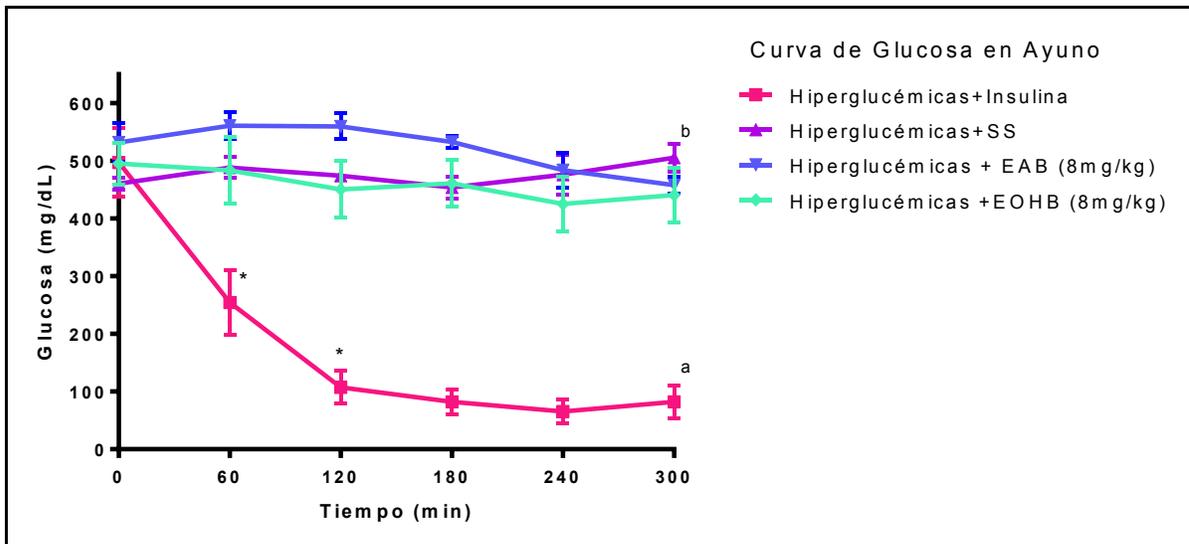


Figura 13A.

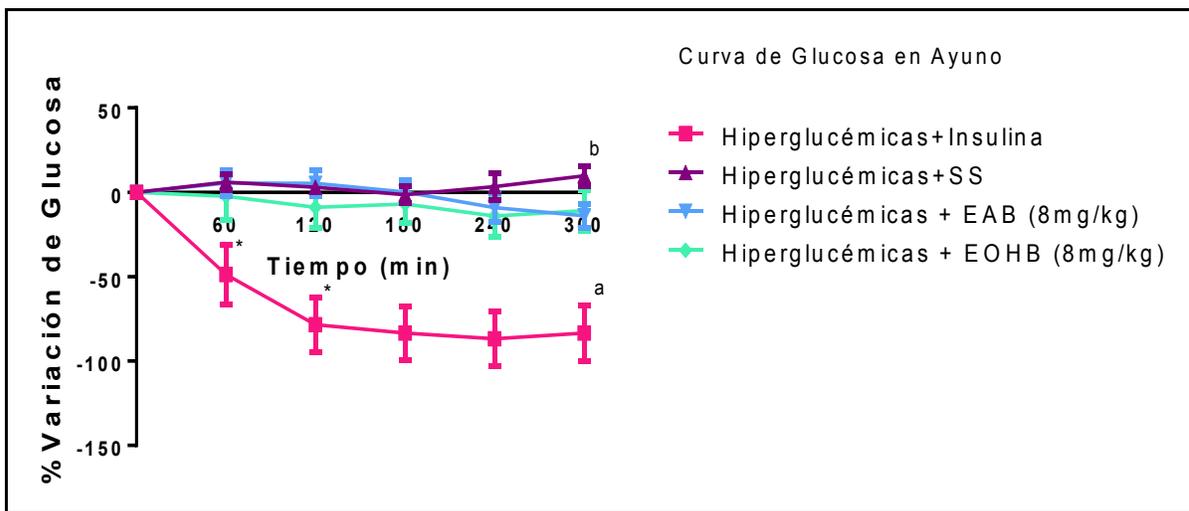


Figura 13B.

FIGURA 13. Curva de Glucosa en Ayuno con Extractos Acetónicos y Alcohólicos (8mg/kg).

(n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo)

13A. Se observa un descenso de glucosa del 14% para PAB y 11% para EOHB. No se obtuvo diferencia significativa a estas dosis contra la solución salina. El Área Bajo la Curva resulto en: 22.2 para insulina, 100 para solución salina, 113 para Extracto Acetónico de Berro y 95.33 para Extracto Alcohólico de Berro.

13B. Se muestra un ajuste del punto de inicio, como puede observarse no hubo un descenso significativo de los niveles de glucosa con los extractos acetónicos y alcohólicos a ésta dosis.

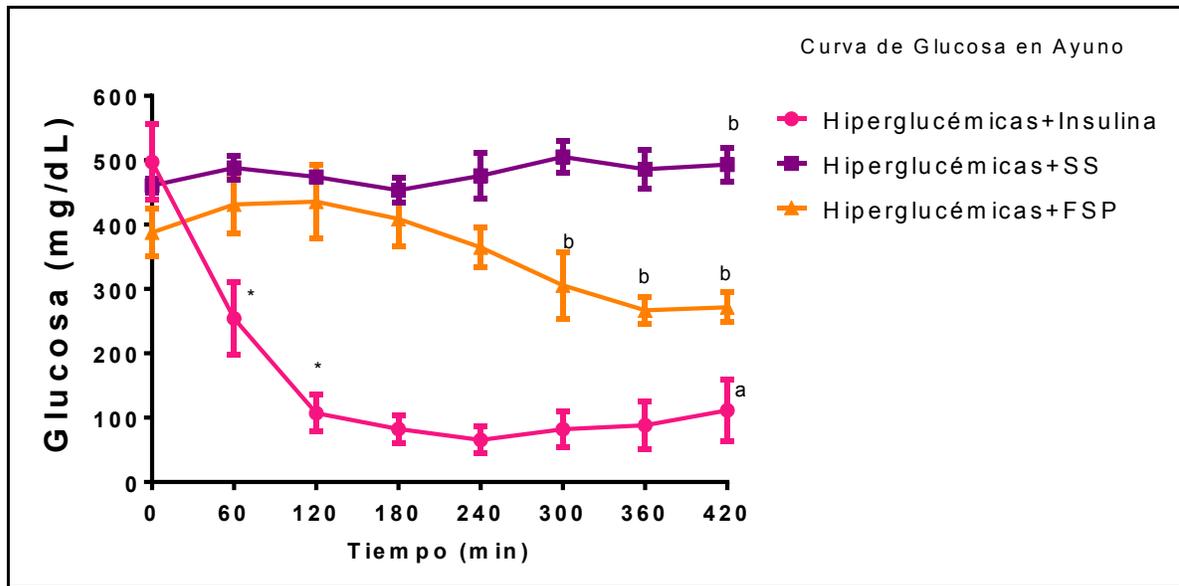


Figura 14A.

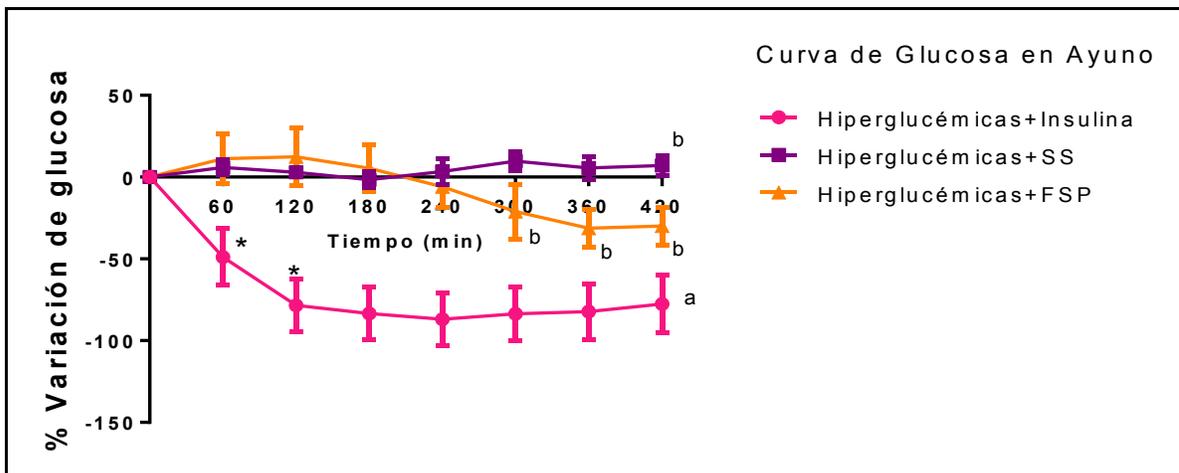


Figura 14B

FIGURA 14. Curva de Glucosa en ayuno con Fracción Sin Pigmentos (FSP) a una dosis de 900mg/kg.

(n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo, b= p<0.05 respecto a SS)

14A. La FSP presentó un descenso del 30%, mostrando diferencia significativa contra la solución salina a partir del minuto 300 (b= p<0.05). El Área Bajo la Curva resultó en: Insulina 16.4, SS 100 y FSP 69.2.

14B. Se muestra un ajuste del punto de inicio, se destaca el descenso de los niveles de glucosa con la FSP *p<0.05 Respecto a la Solución Salina.

Curvas de Tolerancia a la Glucosa.

Las gráficas a continuación muestran los resultados obtenidos con la prueba de Tolerancia a la glucosa, en la que se administró 1.5g/kg de peso del animal de solución de glucosa previo a la administración del extracto a evaluar.

En la Figura 15 se muestran los resultados del empleo del Extracto Crudo de Berro (ECB) a una dosis de 900mg/kg.

En la Figura 16, se observa el comportamiento de la glucosa en la prueba de Tolerancia a la Glucosa con los Extracto Acetónico de Berro (EAB) y los Extracto Alcohólico de Berro (EOHB) a una dosis de 4mg/kg de peso corporal.

Se evaluó una dosis mayor de EAB y EOHB. En la Figura 17, se muestra la curva de Tolerancia a la Glucosa con los Extracto Acetónicos y Alcohólicos de Berro a una dosis de 8mg/kg de peso corporal.

En la Figura 18 se muestra la curva de tolerancia a la glucosa con la Fracción sin Pigmentos, de la que no existen reportes previos de su función hipoglucemiante.

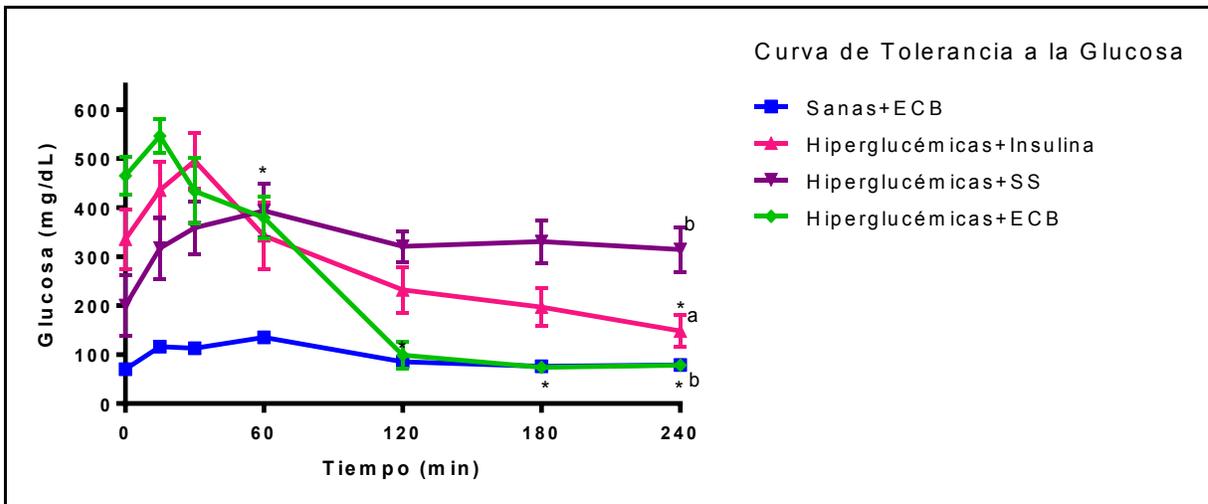


Figura 15A.

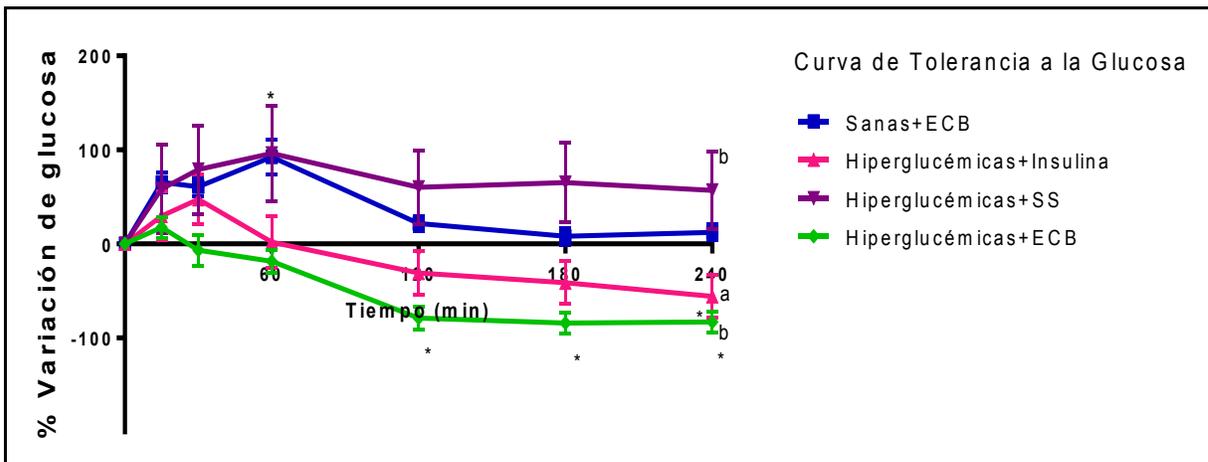


Figura 15B.

FIGURA 15. Curva de Tolerancia a la Glucosa con Extracto Crudo de Berro (ECB).

(n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo, b= p<0.05 respecto a SS).

15A. Se observa un descenso en el control positivo (Insulina NPH 4UI/kg) del 55.8% de la glucosa inicial y el negativo (Solución Salina) aumento un 57%, en el grupo de Sanas+ECB no hubo variación, en el grupo Hiperglucémicas + ECB los niveles de glucosa bajaron un 76.6%, porcentaje mayor incluso que la insulina (*p<0.05 contra SS). El Área Bajo la Curva resultó en: Sanas+ECB 7.97, Hiperglucémicas con: Insulina 73.9, SS 100 y ECB 64.3.

15B. Se muestra un ajuste del punto de inicio, el porcentaje de disminución del ECB es significativamente menor al de la solución salina (b= p<0.05).

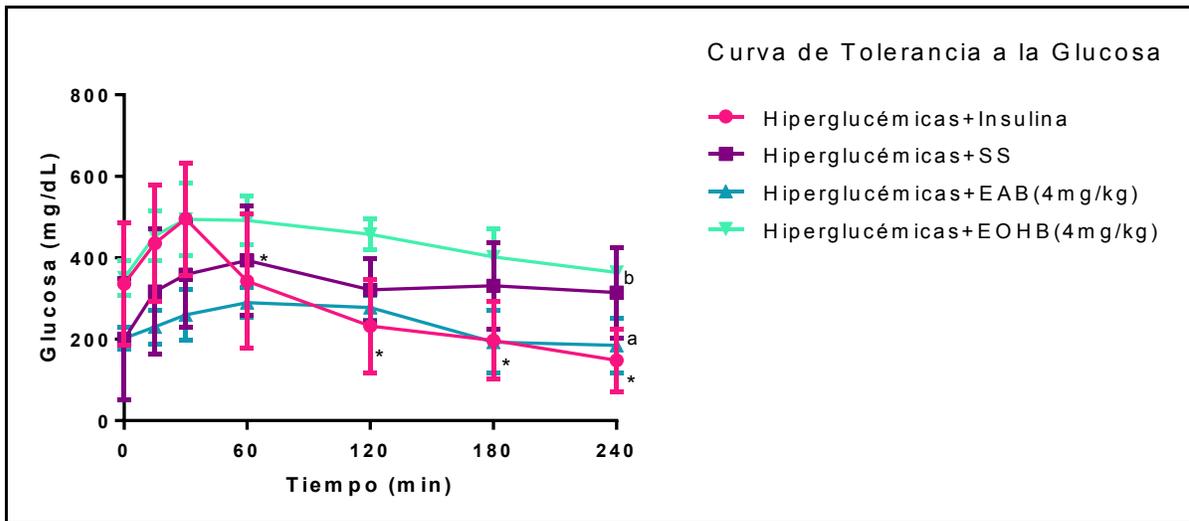


Figura 16A.

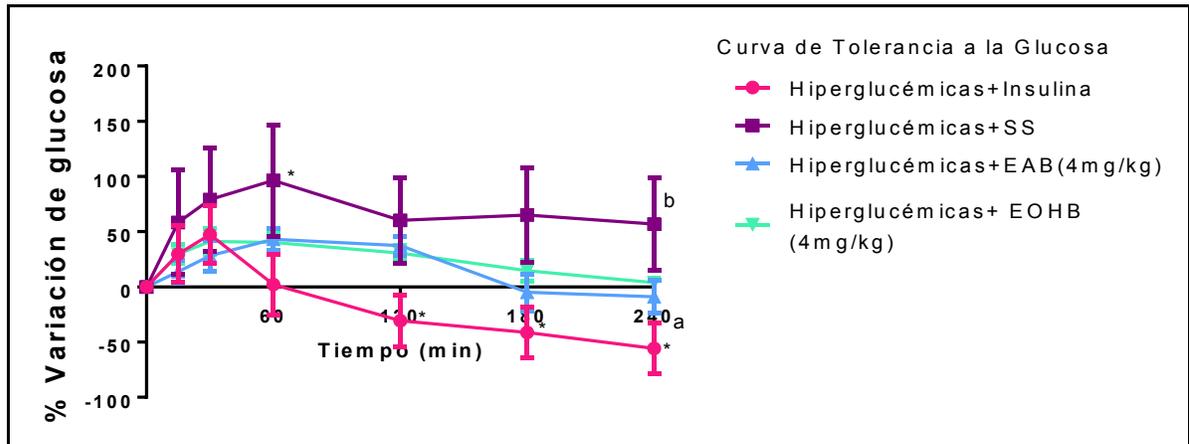


Figura 16B.

FIGURA 16. Curva de Tolerancia a la Glucosa con Extracto Acetónicos (EAB) y Alcohólicos de Berro (EOHB) a una dosis de 4mg/kg.

(n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo, b= p<0.05 respecto a SS)

16A. Se observó un descenso en los niveles de glucosa del 8.8% para los EAB y en el caso de los EOHB no se observó descenso (*p<0.05). El Área Bajo la Curva resultó en: Insulina 73.9, SS 100, EAB 59.4 y EOHB 143.4.

16B. Se muestra un ajuste del punto de inicio, a pesar de no haber disminución de los niveles de glucosa del EOHB sale significativamente diferente al control negativo SS.

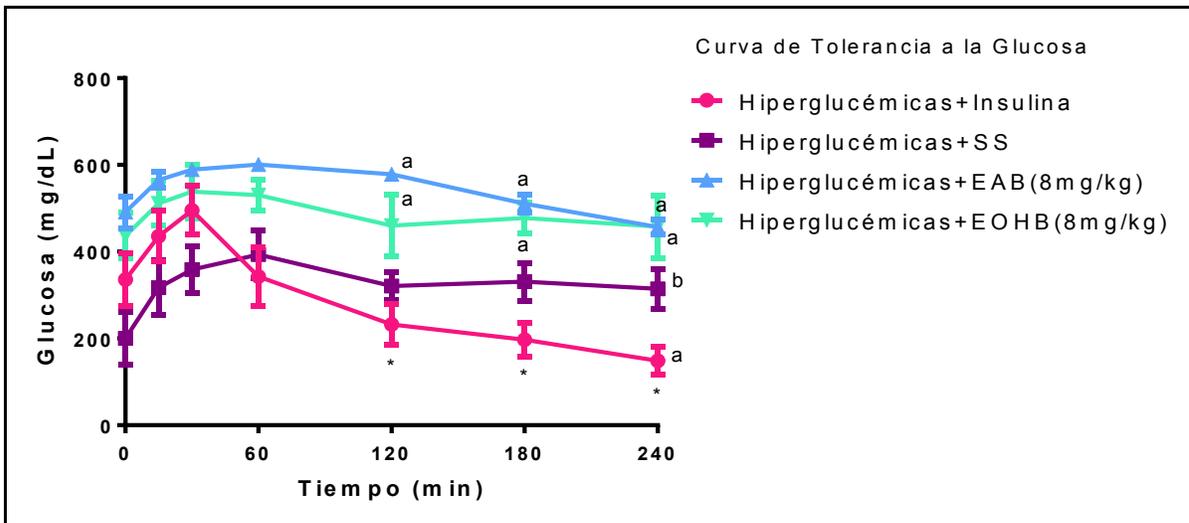


Figura 17A.

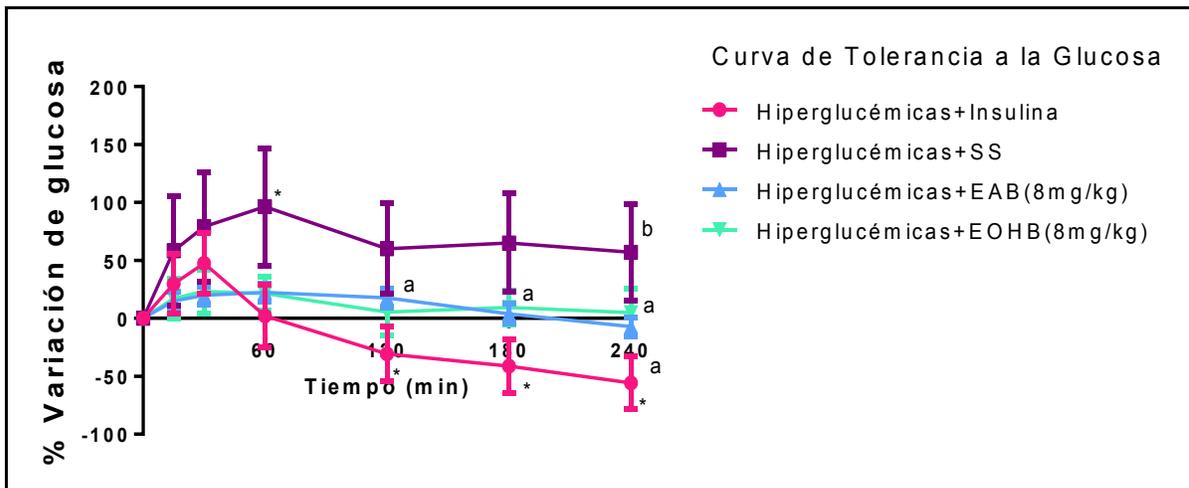


Figura 17B.

FIGURA 17. Curva de Tolerancia a la Glucosa con Extracto Acetónicos y Alcohólicos de Berro a una dosis de 8mg/kg.

(n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo, a= p<0.05 respecto a Insulina).

17A. En dichas curvas se observa un descenso de glucosa de 7% para los EAB y nulo para los EOHB. Ambos mostraron diferencia significativa vs SS. El Área Bajo la Curva resultó en: Insulina 73.9, SS 100, EAB 190.05 y EOHB 164.22.

17B. Se muestra un ajuste del punto de inicio, si bien los porcentajes de glucosa no disminuyen en gran medida respecto al inicio, ambos presentaron diferencia significativa respecto a SS (*p<0.05).

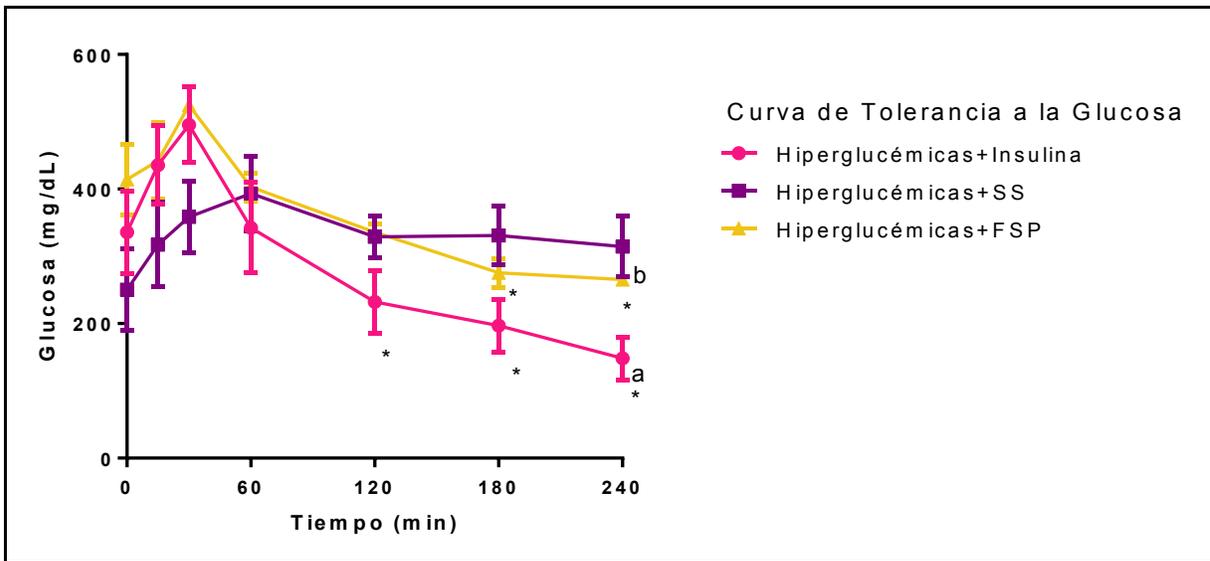


Figura 18A.

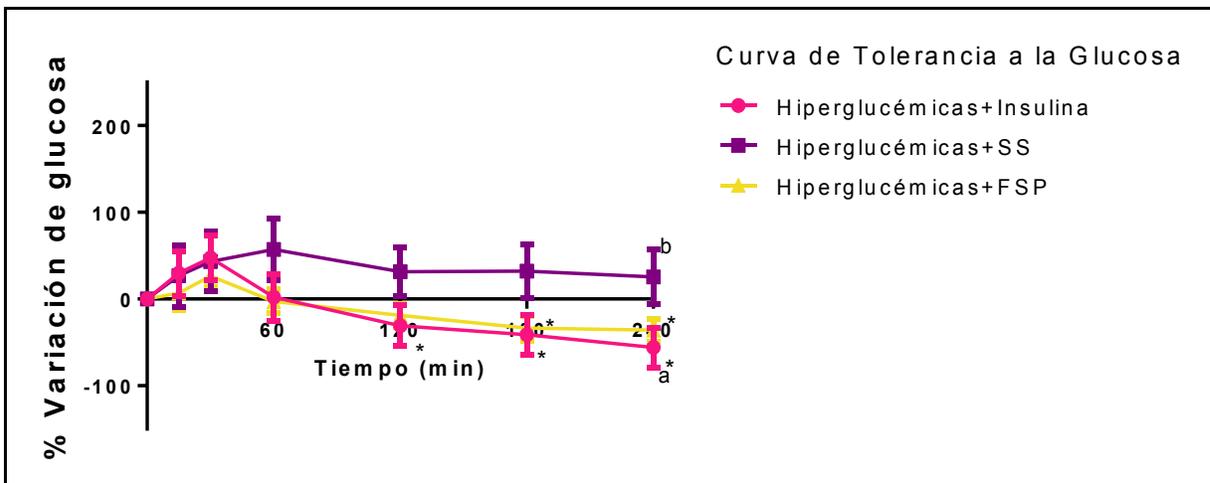


Figura 18B.

FIGURA 18. Curva de tolerancia a la glucosa con Fracción sin Pigmentos.

(n=6, * p<0.05 intragrupo respecto al tiempo)

Figura 18A. Se observa un descenso en los niveles de glucosa del 22% *p<0.05 en comparación con SS. El Área Bajo la Curva resultó en: Insulina 73.3, SS 100 y FSP 105.7.

Figura 18B. Se muestra un ajuste del punto de inicio, la FSP no presenta un aumento tan pronunciado de los niveles de glucosa en los primeros 60 minutos, como se ve en los controles.

7.2 Administración Crónica de Berro (*Nasturtium officinale*).

A continuación se muestran el peso y niveles de glucosa presentados durante las 8 semanas de administración crónica de Extracto Crudo de Berro (ECB) tanto a ratas inducidas a hiperglucemia con Aloxano (200mg/kg) como de Estreptozotocina (60mg/kg), se empleó un grupo de ratas sanas sin intervención a manera de control y uno de ratas hiperglucémicas inducidas con Aloxano + Insulina (Glargina 4UI/kg), n=6 (Figuras 19 y 20).

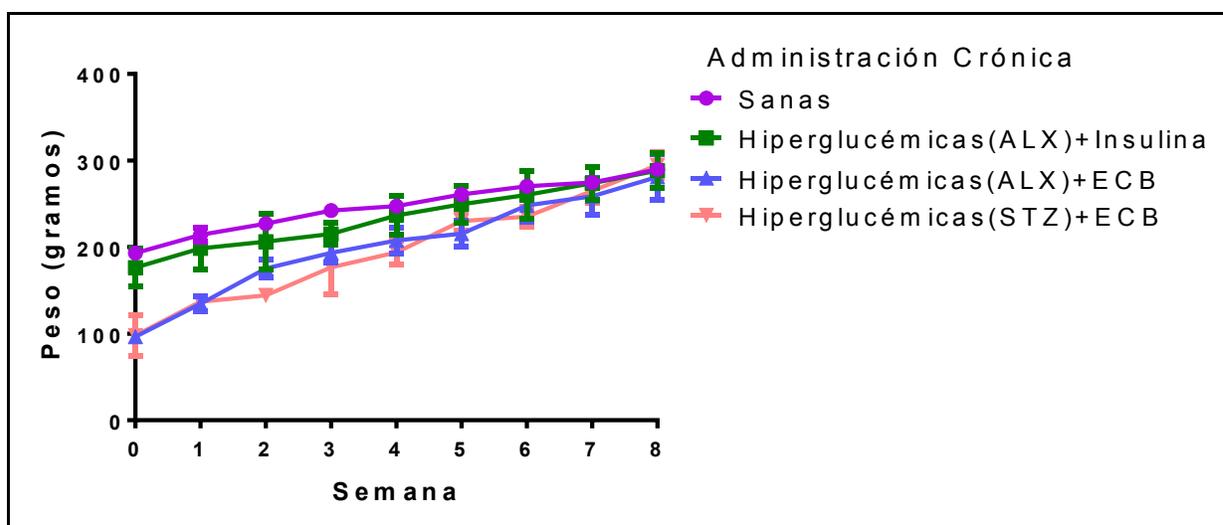


FIGURA 19. Peso observado durante la Administración Crónica (8 semanas).

Se observa el aumento de peso constante y sin diferencia significativa entre los grupos.

El análisis de Área Bajo la Curva reflejó los siguientes resultados: Sanas 100, Hiperglucémicas con: Insulina 91.08, ALX+ECB 69.83 y STZ+ECB 66.10. Dichos resultados concuerdan con que no hay diferencia significativa entre los grupos.

En cuanto a la glucosa, existe diferencia significativa en las primeras 3 semanas y posteriormente se estabiliza a niveles comparables a las ratas sanas.

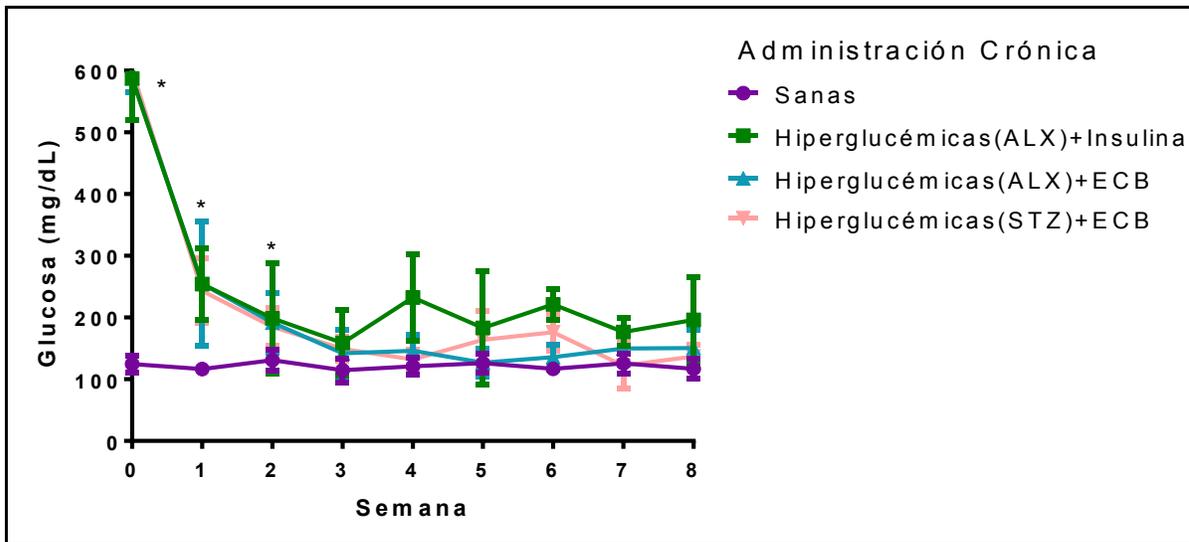


FIGURA 20. Niveles de glucosa durante la Administración Crónica (8 semanas) * $p > 0.05$ Respecto al grupo de Ratas Sanas.

El análisis de Área Bajo la Curva reflejó los siguientes resultados: Sanas 100, Hiperglucémicas (ALX) + Insulina 589.3, Hiperglucémicas (ALX) + ECB 415.3 e Hiperglucémicas (STZ) + ECB 429.2.

7.3 Evaluación de la Actividad Antioxidante de los Extractos de Berro (*Nasturtium officinale*).

Se evaluaron tanto el contenido de polifenoles, fenoles y flavonoides de los extractos crudo, acetónico y alcohólico de berro, se muestran los resultados a continuación:

TABLA 2. Cuantificación de Polifenoles en los diversos extractos de berro.

Polifenoles	
Extracto	mg Floroglucinol/ml extracto
ECB	50.25
EAB	19.51
EOHB	17.98

ECB= Extracto Crudo de Berro, EAB= Extracto Acetónico de Berro, EOHB= Extracto Alcohólico de Berro.

TABLA 3. Cuantificación de Fenoles en los diversos extractos de berro.

Fenoles	
Extracto	mg GA/g extracto
ECB	172
EAB	211.8
EOHB	153.6

ECB= Extracto Crudo de Berro, EAB= Extracto Acetónico de Berro, EOHB= Extracto Alcohólico de Berro, GA= Ácido Gálico.

TABLA 4. Cuantificación de Flavonoides en los diversos extractos de berro.

Flavonoides	
Extracto	mg QE/g extracto
ECB	16.32
EAB	134.17
EOHB	159.33

ECB= Extracto Crudo de Berro, EAB= Extracto Acetónico de Berro, EOHB= Extracto Alcohólico de Berro, QE= Quercetina.

En la Figura 21 se muestra la capacidad antioxidante del berro vs ácido ascórbico, se observa como para el ECB la concentración es menor para lograr un mayor porcentaje de inhibición, lo que lo hace un antioxidante comparable al ácido ascórbico.

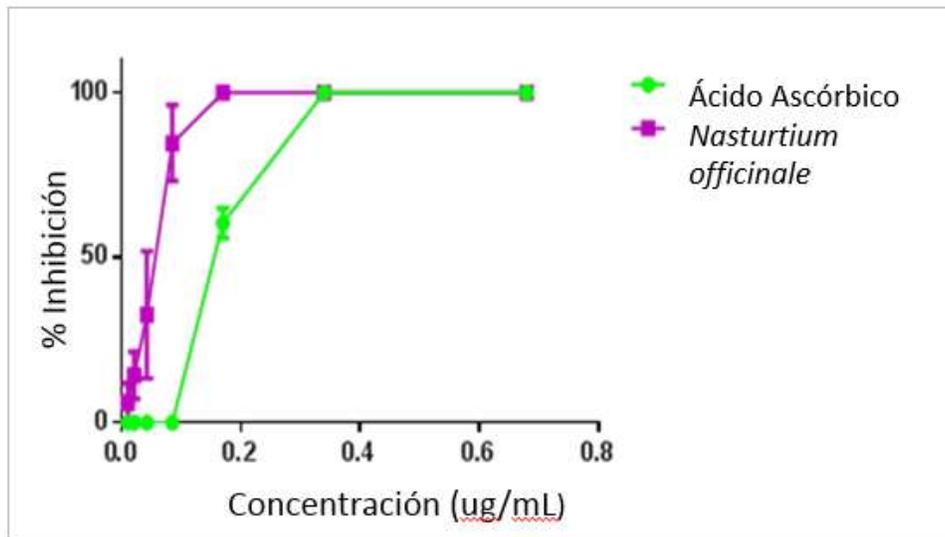


FIGURA 21. Comparación de capacidad antioxidante entre EC berro y ácido ascórbico.

La Figura 22 muestra la cinética antioxidante con el reactivo DPPH tanto con ácido ascórbico como con Extracto Crudo de berro (ECB) y extractos tanto acetónicos como alcohólicos (EAB y EOHB), se observa cómo el ECB presenta una acción más gradual a comparación del control (Ácido Ascórbico) y casi igual de efectiva, no así en los Extracto Acetónicos y Alcohólicos donde su acción fue menos pronunciada y se estabilizó al poco tiempo.

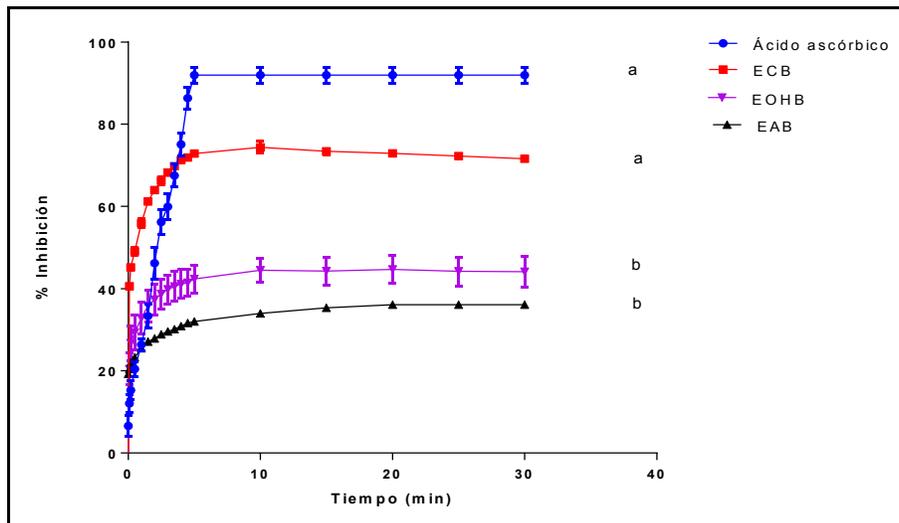


FIGURA 22. Curva de capacidad antioxidante del ácido ascórbico, extracto crudo de berro y extracto acetónicos y alcohólicos.

ECB= Extracto crudo de Berro, EOHB= Extracto Alcohólico de Berro, EAB= Extracto Acetónico de Berro.

La capacidad antioxidante del berro (Tabla 5), en forma de extracto crudo, extractos acetónicos y alcohólicos de berro muestra como el EC₅₀ (la concentración necesaria para disminuir al 50% el valor del DPPH) es tres veces menor para los extractos acetónicos y alcohólicos a comparación del ácido ascórbico. El TEC₅₀ y la EA son mejores para el ECB y el EAB, incluso que el Ácido Ascórbico.

TABLA 5. Actividad Antioxidante de Extractos de berro (*Nasturtium officinale*).

Muestra	EC ₅₀ g/g DPPH	TEC ₅₀ (min)	EA=(1/EC ₅₀ ·TEC ₅₀)
Ácido ascórbico	25	2.0	0.08
Extracto Crudo	13.2	0.5	0.037
Extracto Acetónico	8	0.1	0.0125
Extracto Alcohólico	8	10	1.25

7.4 Cuantificación de enzimas antioxidantes.

Se cuantificaron las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa, así como el Estado Total de Antioxidantes en los grupos de ratas: sanas (control), hiperglucémicas (aloxano y estreptozotocina) + ECB, hiperglucémicas + insulina Glargina. Mostrando los siguientes resultados:

- Catalasa: Figuras 23 y 24. En éstas se observa diferencia significativa del grupo control (sanas) vs el grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con insulina en suero y respecto a los tejidos en riñón, no así con los otros dos grupos (Aloxano y Estreptozotocina) que recibieron ECB por 8 semanas.

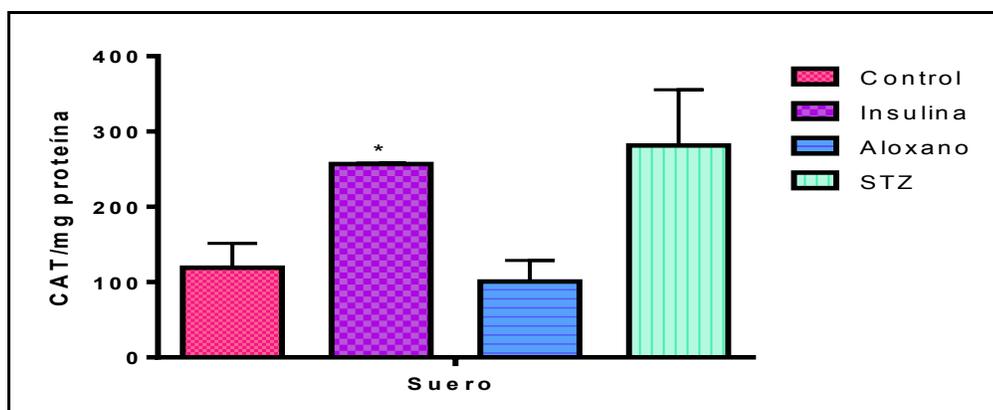


FIGURA 23. Catalasa en Suero. * $p < 0.05$ Respecto a Control

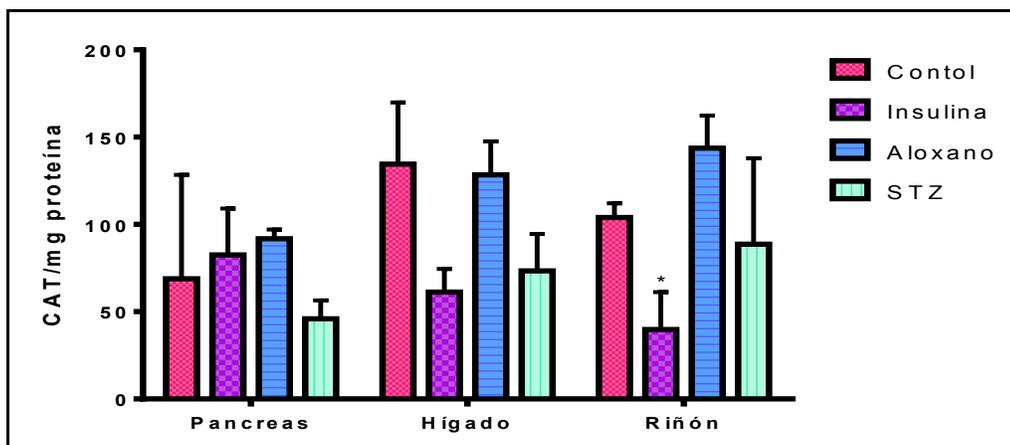


FIGURA 24. Catalasa en tejidos * $p < 0.05$ Respecto a Control

- Glutación Peroxidasa: Figura 25. Es ésta se observa como todos los grupos se encuentran en niveles similares. Se demuestra con el análisis estadístico que no reflejó diferencia significativa entre ellos.

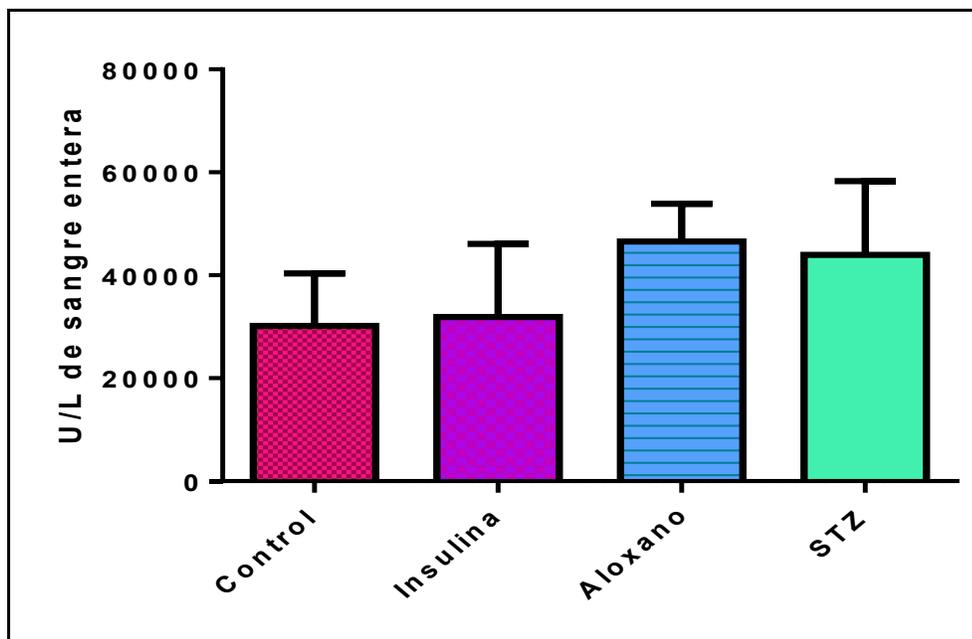


FIGURA 25. Glutación Peroxidasa.

- Glutación Reductasa: Figura 32. En ésta se muestran niveles bajos en los grupos de ratas con hiperglucemia.

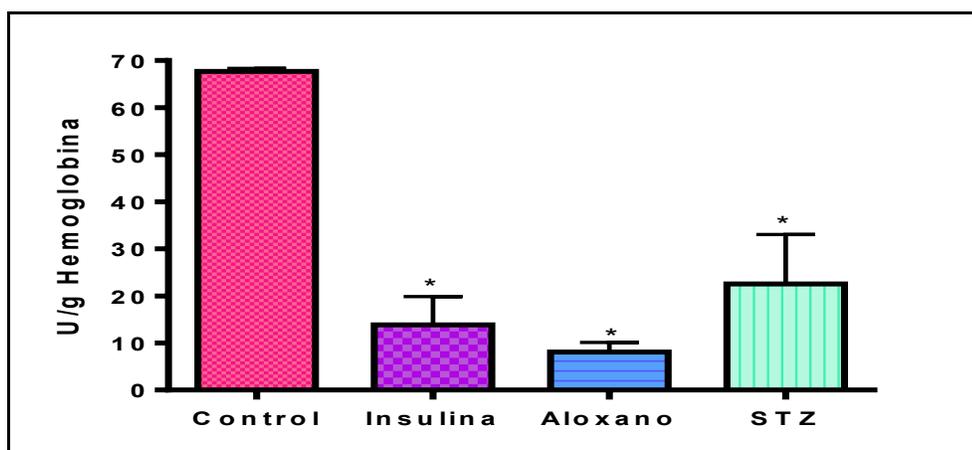


FIGURA 26. Glutación Reductasa * $p < 0.05$ Respecto a Control

- Superóxido Dismutasa: Figura 33. En ésta figura observamos niveles similares en todos los grupos sin mostrar diferencia significativa.

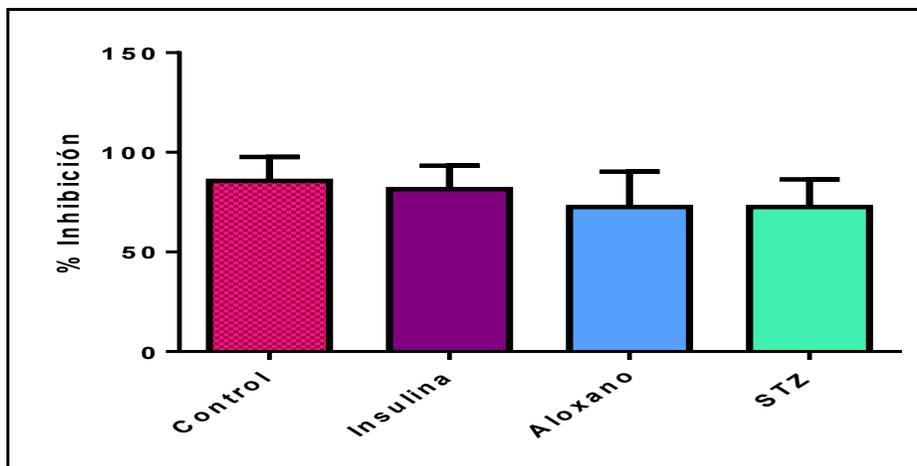


FIGURA 27. Superóxido Dismutasa.

- Estado Total de Antioxidantes: Figura 34. En ésta se observan niveles más altos para el grupo control y Alozano a comparación del de insulina, sin embargo, no se obtuvo diferencia significativa.

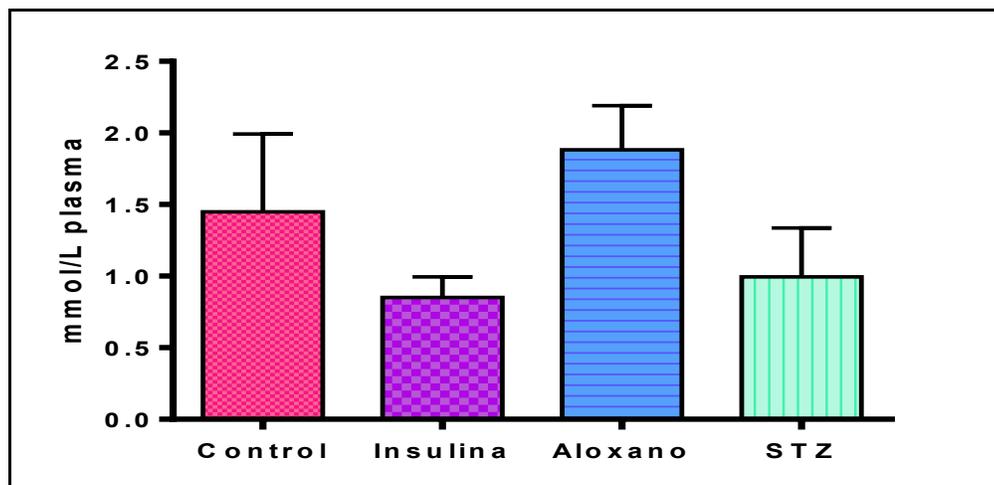


FIGURA 28. Estado Total Antioxidante

7.5 Grado de lipoperoxidación (Malondialdehído)

-En suero: Figura 35. Se obtuvo diferencia significativa respecto al control en los grupos de insulina y Estreptozotocina, no así, con el grupo aloxano.

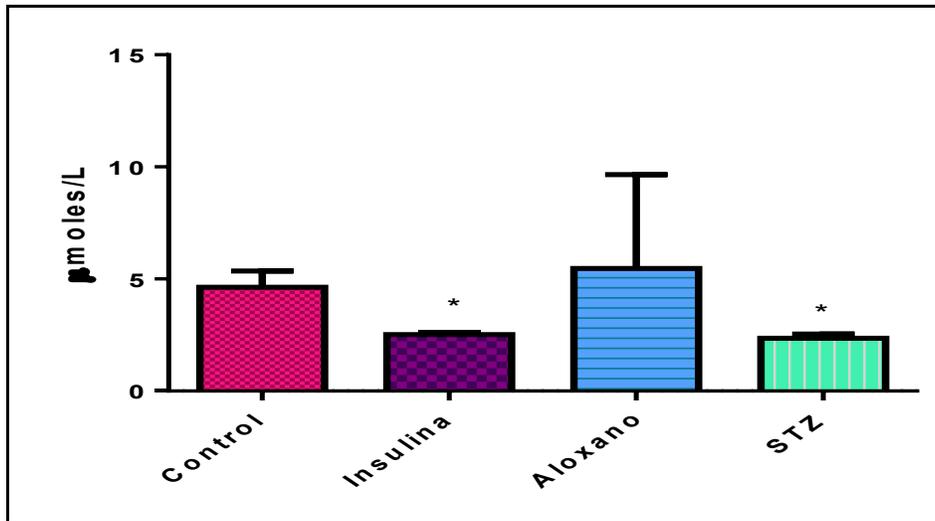


FIGURA 29. Grado de Lipoperoxidación (Malondialdehído) en suero. * $p < 0.05$ Respecto a Control

En tejidos: Figura 36. Se muestra únicamente diferencia significativa del grupo insulina vs Estreptozotocina en el hígado. Los otros grupos no mostraron diferencia.

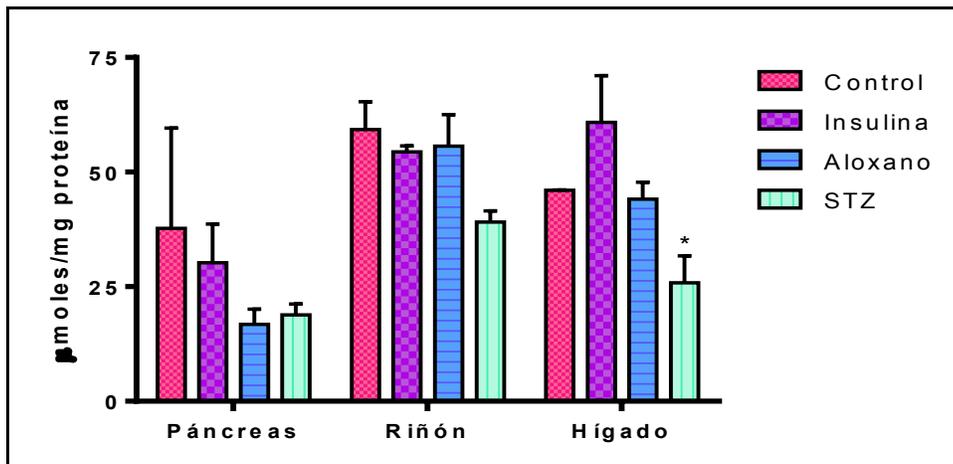


FIGURA 30. Grado de Lipoperoxidación (Malondialdehído) en tejidos. * $p < 0.05$ Respecto a Insulina.

7.6 Bioquímica Sanguínea

Los resultados se muestran por partes en las Figuras 31, 32 y 33. En la 1ª parte, se observan los resultados obtenidos de glucosa, urea, creatinina, proteínas totales, albúmina y globulina, mostrando con un * aquellos que mostraron diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control.

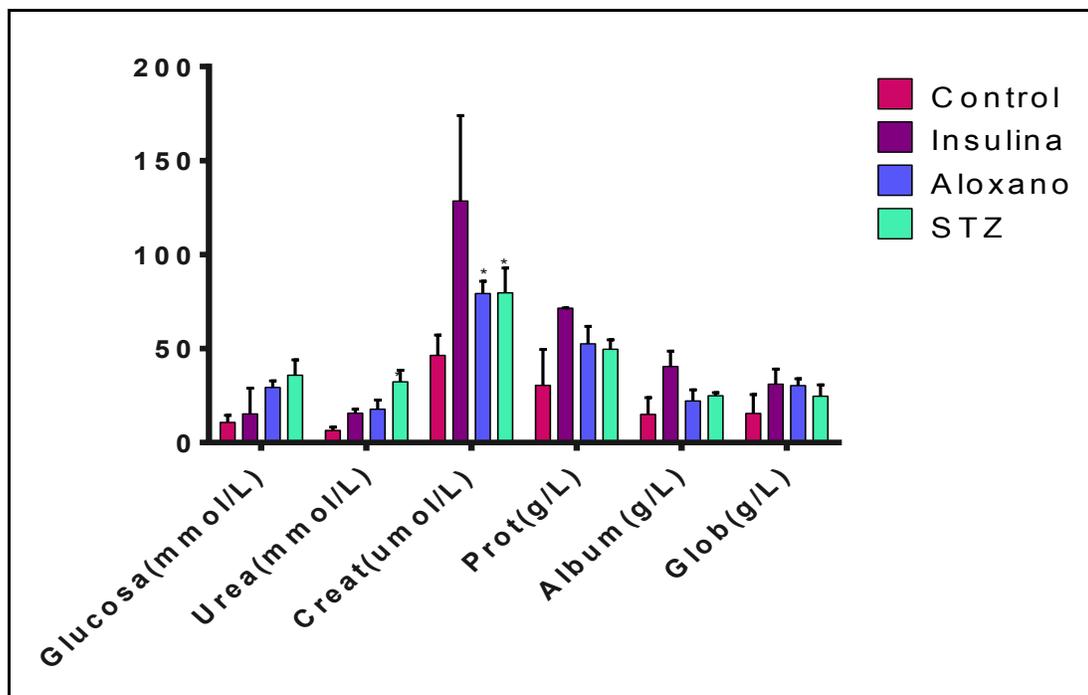


FIGURA 31. Bioquímica 1ª parte (Glucosa, Urea, Creatinina, Proteínas totales, Albúmina y Globulina). * $p < 0.05$ Respecto a Control

En la segunda parte, se muestran los resultados obtenidos de Colesterol, Albumina/Globulina, Calcio y Fosforo. Y en la tercera parte, se observan los resultados que presentaron los diferentes grupos (Control, Insulina, Alozano y Estreptozotocina) en las enzimas Alanina Aminotrasferasa, Aspartato Aminotransferasa y Fosfatasa Alcalina. Nuevamente se marcaron con * aquellos grupos que presentaron diferencia significativa respecto al control.

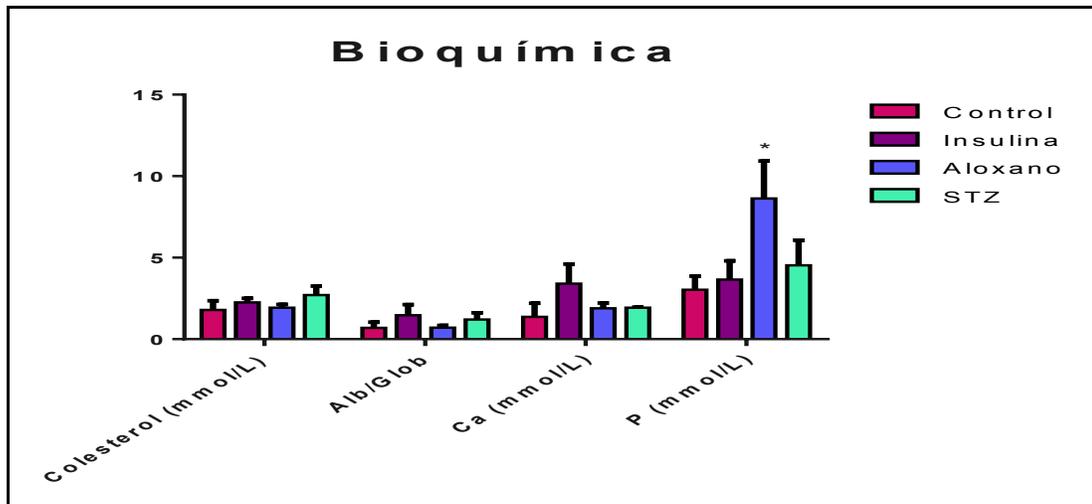


FIGURA 32. Bioquímica 2ª parte (Colesterol, Albúmina/Globulina, Calcio y Fósforo) *p<0.05 Respecto a Control.

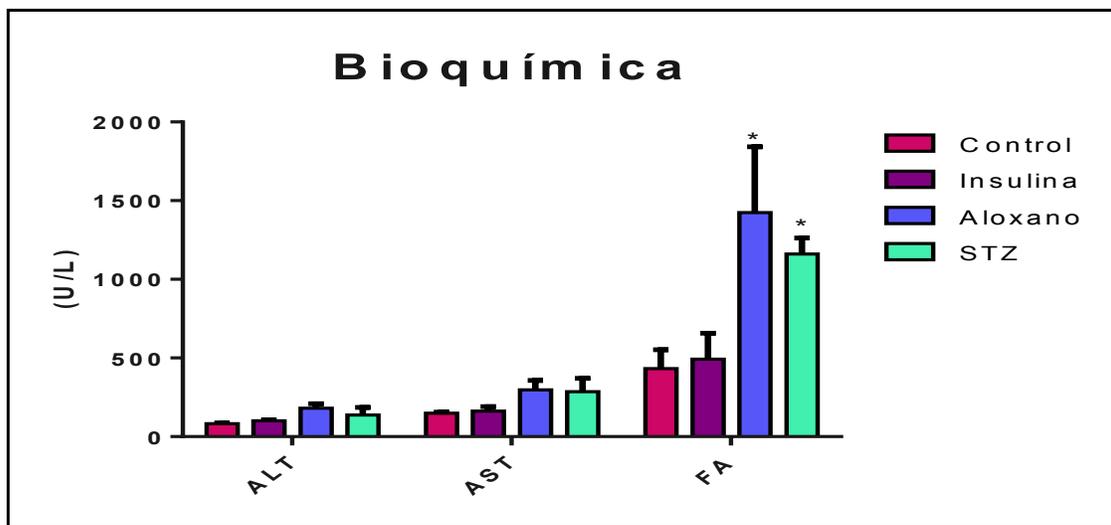


FIGURA 33. Bioquímica 3ª parte (ALT= Alanina Aminotrasferasa, AST= Aspartato Aminotrasferasa y FA= Fosfatasa Alcalina) *p<0.05 Respecto a Control

7.7 Evaluación histopatológica de tejidos.

A continuación se observan (Figura 34) los cortes histológicos de páncreas realizados posteriormente a la dosis crónica tanto a ratas Hiperglucémicas tratadas con insulina como con extracto crudo de berro (Aloxano y Estreptozotocina), en la Tabla 6, se concentran los resultados del promedio y EE del conteo de células β pancreáticas para cada grupo.

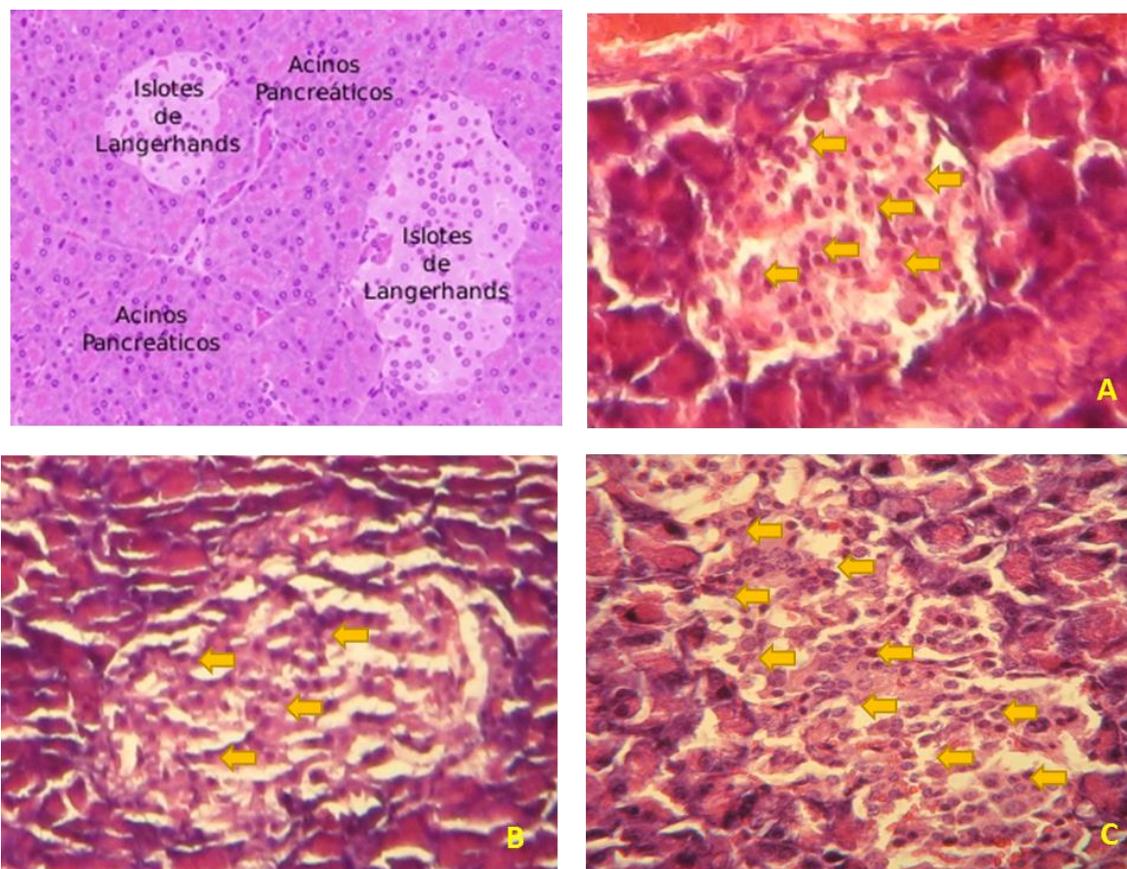


FIGURA 34. Cortes histológicos de páncreas (400X con técnica de hematoxilia-eosina).

La primera imagen muestra un corte de referencia en el que señala cómo se observan los islotes de Langerhans y los acinos pancreáticos. La imagen A muestra un islote de páncreas de rata sana, el recuadro B muestra el páncreas tratado con insulina, la C muestra el islote de una rata tratada con una dosis crónica de extracto crudo de berro. Se señalan con flechas los núcleos de las células β .

Nótese el número mayor de las células β en el tejido de las ratas tratadas con berro, a comparación de las de insulina.

TABLA 6. Número de células β pancreáticas en los diferentes grupos

Grupo	Células	EE \pm
Control (sanas)	98.3	8.41
Insulina	66.6	17.05
Aloxano	123.6*	13.2
Estreptozotocina	116*	3.7

* $p < 0.05$ respecto al grupo de Insulina. Se evaluó con ANOVA de una vía.

En la figura 35 se muestran los cortes histológicos de hígado de ratas sanas, hiperglucémicas tratadas con insulina e hiperglucémicas tratadas con ECB. En dichas micrografías no se observa diferencia aparente entre los diversos grupos ni algún signo de patología.

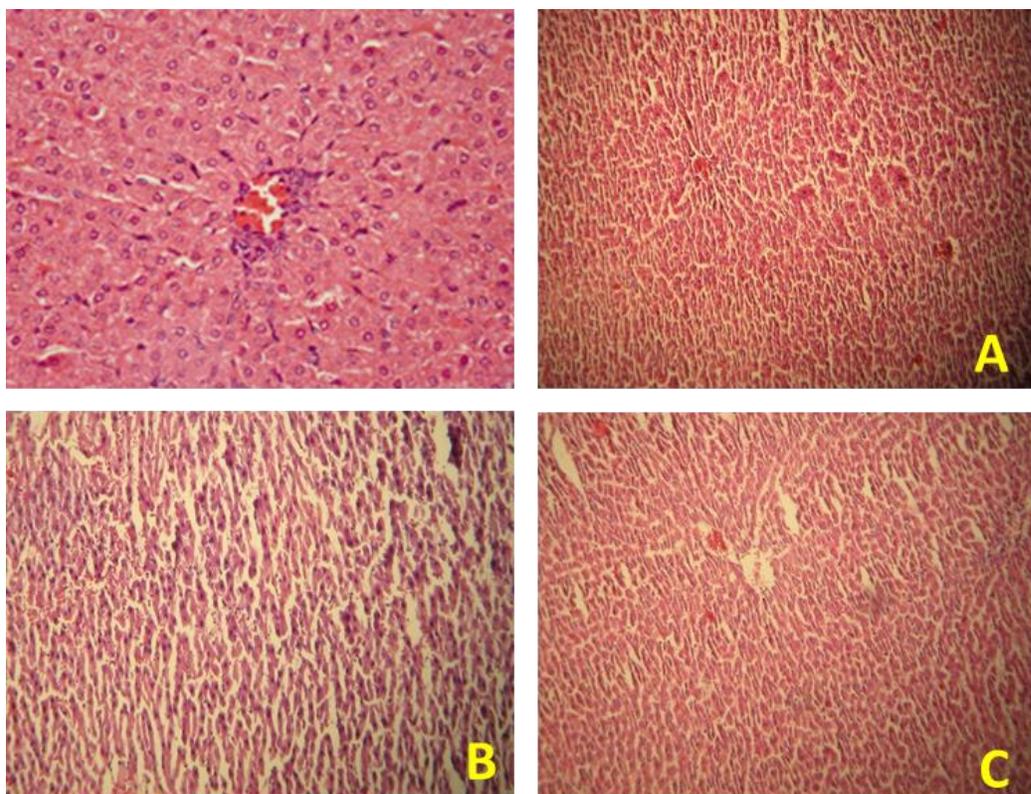


FIGURA 35. Micrografías de Hígado. (400X con técnica de hematoxilia-eosina).

La primera imagen muestra un corte de referencia. La imagen A muestra hígado de rata sana, el recuadro B muestra el hígado de ratas tratadas con insulina, la C muestra el hígado de una rata tratada con una dosis crónica de extracto crudo de berro.

Se observa que el tejido esta conservado, no hay autólisis, inflamación o daño. La separación en el recuadro B es debido a la técnica, no al tejido.

En la figura 36 se observan los cortes histológicos de riñón de ratas sanas, hiperglucémicas tratadas con insulina e hiperglucémicas tratadas con ECB. Tampoco se observan diferencias entre los grupos.

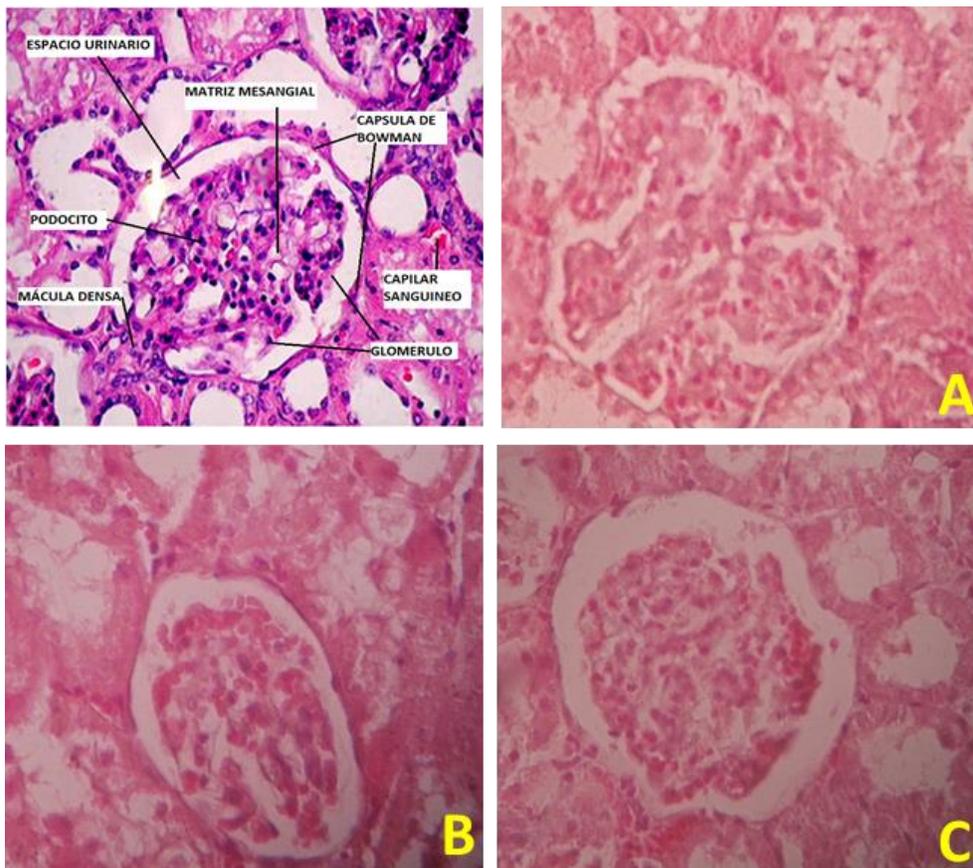


FIGURA 36. Micrografías de cápsulas de Bowman de Riñón a 400X (Tinción Hematoxilina-Eosina).

La primera imagen muestra un corte de referencia. La imagen A muestra riñón de rata sana, el recuadro B muestra el riñón de ratas tratadas con insulina, la C muestra el riñón de una rata tratada con una dosis crónica de extracto crudo de berro.

Los glomérulos se observan sin daño evidente, no presenta autólisis o inflamación.

7.8 Evaluación de la expresión de Galectina-3 con Western Blot.

Al tejido pancreático obtenido tras la administración crónica, se le realizó la técnica de Western Blot para evaluar la expresión de Galectina-3 que presentaron los diversos grupos: sanas, hiperglucémicas (aloxano) + ECB, hiperglucémicas (Estreptozotocina) + ECB e hiperglucémicas + insulina Glargina. En los que se encontró.

- Como puede observarse en la figura 37, la Galectina-3 se expresa fuertemente en el tejido de ratas hiperglucémicas tratadas con insulina, no así en el tejido de ratas hiperglucémicas tratadas con berro, que son comparables con el grupo de ratas sanas (Control) en las que tampoco hubo expresión de ésta.

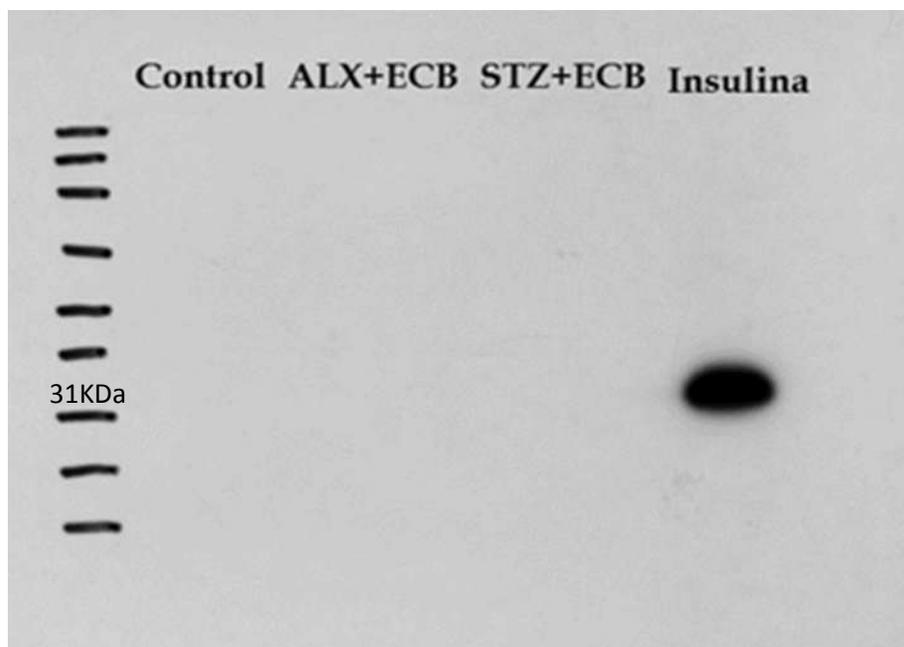


FIGURA 37. Western-Blot de páncreas.

Control= Ratas sanas, ALX+ECB= Ratas hiperglucémicas inducidas con Aloxano administradas con Extracto Crudo de Berro, STZ+ECB= Ratas hiperglucémicas inducidas con Estreptozotocina administradas con Extracto Crudo de Berro, Insulina= Ratas hiperglucémicas con administración de insulina Glargina.

VIII. DISCUSIÓN

8.1 Capacidad Hipoglucemiante de los diversos extractos de Berro (*Nasturtium officinale*) de manera aguda.

Además de las vitaminas y minerales que contiene, en el berro se encuentran compuestos resultantes de su metabolismo secundario y a los que se les ha encontrado actividad hipoglucemiante, antioxidante, anticancerígena, entre otros; éstos componentes como los flavonoides quercetina y rutina, el flavonol kaempferol, y el glucosinolato gluconasturtina (la mayoría altamente hidroxilados), se ha demostrado que participan en la utilización periférica de la glucosa, inhibiendo la acción del transportador de glucosa en el intestino, aumentando la secreción de insulina, activando a la AMPK (– AMP-activated protein kinase-) en tejido adiposo blanco y músculo esquelético, que tiene como efecto el incremento significativo de la expresión de GLUT4 y que a su vez, incrementa la absorción de glucosa en éstos (Jadhav, R. *et al.* 2012; Oyenih, AB. *et al.* 2014).

Vessal, M. *et al* (2003), realizaron un estudio para evaluar el efecto de la quercetina en ratas diabéticas inducidas con Estreptozotocina y en ratas sanas, encontrando lo siguiente:

La quercetina no tuvo efecto en la concentración de glucosa plasmática en los animales normoglucémicos, pero redujo significativamente la glucosa a los 8-10 días en la dos dosis usadas (10 y 15mg/kg) y alcanzó niveles normales al terminó de dicho periodo.

Se probó de manera aguda con la prueba de tolerancia a la glucosa y no se mostraron cambios en la glucosa de animales sanos, pero normalizó la glucosa en los animales diabéticos.

Además en este trabajo midieron la actividad de la glucocinasa y hexocinasa en hígado, en animales sanos, la quercetina no tuvo efecto en la hexocinasa hepática, en cambio en los animales diabéticos tuvieron un aumento de dicha enzima alcanzando niveles normales, así como un aumento de la actividad de la glucocinasa.

En el análisis histopatológico de páncreas, hígado y riñón, encontraron en el primer tejido un mayor número de islotes pancreáticos en las ratas que recibieron quercetina, sin notar alguna modificación patológica. Tanto en hígado como en riñón no encontraron un daño patológico significativo.

Dichos resultados sobre la capacidad hipoglucemiante concuerdan con lo encontrado en el presente estudio, se muestra en las figuras 11 (Curva de Glucosa en Ayuno con ECB), 15 (Curva de Tolerancia a la Glucosa con ECB) y 20 (Niveles de glucosa durante la Administración Crónica de ECB) y sobre el análisis histopatológico en las figuras 34, 35 y 36 (Micrografías de páncreas, hígado y riñón, respectivamente).

Respecto a los resultados obtenidos con los Extracto Alcohólicos, Hoseini, *et al* (2009), en un estudio realizado tanto por 1 semana como por 2 meses, con extracto metanólico de berro (800mg/kg y 1000mg/kg) obtuvo un resultado significativamente menor en los niveles de glucosa durante la administración aguda, lo que coincide con lo encontrado en la figura 12. Éste equipo de trabajo, sin embargo, no encontró resultados favorecedores para el extracto acuoso

De la Fracción Sin Pigmentos de Berro (Figuras 14 y 18), no se encontró información disponible, por lo que la información obtenida en el presente trabajo resulta relevante e innovadora, cabe mencionar que los componentes de dicha fracción son: 0.38mg/ml de proteínas, 0.53mg/ml de carbohidratos reductores y de éstos 0.78mg/ml hexosas y 0.74mg/ml pentosas, de acuerdo a ensayos realizados por el equipo de trabajo. Cabe mencionar que existen reportes del contenido de péptidos parecidos a la insulina protegidos por complejos polisacáridos que se han encontrado en especies vegetales como *M. charantia* y que guardan una secuencia de aminoácidos similar a la insulina de bovino lo que posiblemente se relacione con la capacidad hipoglucemiante de éste extracto (Xavier-Filho, J. *et al*. 2003). En trabajos posteriores se puede determinar a qué componentes se le atribuye el efecto hipoglucemiante y proponer un posible mecanismo de acción.

8.2 Administración Crónica de Berro (*Nasturtium officinale*).

Respecto al peso, dado que su aumento fue gradual y constante (Figura 19), esto indica que los componentes del extracto no afectan la absorción o aprovechamiento de los nutrientes que obtiene del alimento el animal. Previamente, en el equipo de trabajo se realizó la evaluación toxicológica aguda y subcrónica de berro para descartar algún daño a los animales, encontrando que éste no es tóxico (Ayala Villanueva VM. *et al.* 2014). El mantenimiento del peso en las ratas hiperglucémicas además, se relaciona con un adecuado control glucémico, ya que en la hiperglucemia se manifiesta disminución de masa muscular tanto de músculo liso como esquelético debida la proteólisis que aumenta un 30% respecto a controles sanos, pero que bajo la administración de insulina se mantiene controlada. Dicha función se ha relacionado con la disminución del Factor de Crecimiento que se une a proteína parecido a la insulina (IGFBP-3) con actividad proteasa (Smith, OLK. *et al.* 1989; Bereket, A. *et al.* 1995).

Los niveles de glucosa se comportaron de manera similar a como se reporta en el trabajo del 2009 de Shahrokhi, A *et al*, en el que se administraron por 4 y 8 semanas el extracto acuoso de berro a una dosis de 75mg/kg, mostrando el 2º periodo de tiempo un descenso en los niveles de glucosa del 96%, dicho trabajo no indica los valores semanales, sin embargo, en la administración de las primeras 4 semanas ya se observan resultados significativos respecto a la insulina lo que concuerda con el presente estudio (Figura 20). En el presente trabajo se tuvo que ajustar la dosis dado que la propuesta por los autores antes mencionados, no presentó el mismo nivel de descenso en la glucosa. Entre los posibles factores que pueden afectar éste comportamiento y su composición se encuentran: temperatura, fotoperiodo y calidad de la luz a los que fue expuesto el berro (Engelen-Eigles, G. *et al.* 2006).

Dentro de los mecanismos de acción propuestos para dicho efecto se encuentran: el alto contenido de vitamina C del berro, que compensa la deficiencia de ésta vitamina en la diabetes, mejora la función de las células β , la resistencia a la insulina y mejora su cuadro clínico gracias a la capacidad antioxidante que presenta; así como el contenido de Cu^{++} , de Mn^{++} , Fe^{++} ,

vitamina D, que se han relacionado con mejorar la sensibilidad a la insulina, así como la secreción de insulina (Abdel-Wahab, YHA. *et al.* 2002).

8.3 Actividad Antioxidante de los Extractos de Berro (*Nasturtium officinale*).

En los ensayos realizados para medir la actividad antioxidante del berro se obtuvo una alta capacidad antioxidante de éste comparado con Ácido Ascórbico. Estos datos coinciden con lo publicado por Özen, T. (2009) donde se evaluaron las propiedades antioxidantes de los extractos acuoso y etanólico del berro (*Nasturtium officinale*), en dicho estudio compararon los extractos con el hidroxibutilanisol (BHA) –sólido ceroso con propiedades antioxidantes- bajo diversos métodos, entre ellos el empleado en el presente trabajo (DPPH), donde se presentan niveles comparables de actividad antioxidante entre el berro y el BHA. Es decir, que el berro presenta una actividad antioxidante comparable contra varios antioxidantes empleados como estándar.

En otro trabajo realizado por Hassimotto, et al (2005), se evaluó el contenido de polifenoles, de vitamina C y la actividad antioxidante de varias frutas, verduras y pulpas comerciales congeladas de frutas, entre las verduras se encontró al berro. Éste fue evaluado en forma de extracto crudo metanólico y eluídos del extracto de la fase sólida, el primero presentó una alta actividad antioxidante ($73.5 \pm 5.8\%$) en un sistema de blanqueamiento de β -caroteno, el contenido de polifenoles que presentó fue $168 \pm 6 \text{mg}/100 \text{g}$ de peso fresco y un contenido de ácido ascórbico de $57.2 \text{mg}/100 \text{g}$ de peso fresco.

En un estudio realizado en 2010 (Bahramikia, S. y col) realizaron diversas pruebas para medir el efecto antioxidante en el berro (*Nasturtium officinale*), concluyendo que el extracto crudo de éste tiene una fuerte actividad antioxidante contra varios sistemas oxidativos *in vitro*, atribuyéndole dicha función a sus componentes que funcionan como fuente de recambio (*scavengers*) de radicales libres, a su actividad reductora y su habilidad para quelar metales.

Por otro lado en un estudio en humanos a los que se les administraron 85g de berro fresco por 8 semanas (Gill, ChIR. *et al.* 2007), se observó que disminuía el riesgo de cáncer relacionado con daño al DNA por radicales libres, además de que presentaron una elevación concomitante en plasma de la concentración de antioxidantes β -caroteno y luteína. Lo que indica que la capacidad antioxidante es el resultado de una combinación de una gran variedad de compuestos teniendo un efecto sinérgico entre ellos, lo que explica el que el Extracto Crudo (ECB) tenga una mayor capacidad antioxidante con respecto a los Extracto Acetónicos y Alcohólicos (Figura 22).

8.4 Cuantificación de enzimas antioxidantes.

En el contexto de la actividad de las enzimas antioxidantes, Superóxido dismutasa (SOD), por ejemplo se incrementa durante la Diabetes Mellitus, comparados con controles, especialmente en la presencia de complicaciones micro y macrovasculares. En el caso de Glutación peroxidasa y catalasa, se han detectado disminución en su actividad para ambas durante dicha patología y en presencia de complicaciones (Bandeira, SM. *et al.* 2013). El estado Total Antioxidante (TAS), se ve disminuido durante la Diabetes Mellitus, no así los indicadores de lipoperoxidación (MDA) que aumentan con dicha enfermedad debido al estrés oxidativo bajo el que se encuentra el individuo (Blanco-Hernández, R. *et al.* 2004).

En cuanto a su comportamiento en la diabetes mellitus con tratamiento de plantas medicinales, en un estudio realizado con extracto acuoso de flores de *Cassia fistula* (Manonmani, G. *et al.* 2005) en ratas sanas y diabéticas (inducidas con Aloxano) la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa mostraron diferencia significativa con respecto a las ratas diabéticas sin extracto, en las que los niveles se encontraban significativamente bajos, alcanzando niveles iguales a los del grupo control de ratas sanas, se observó un comportamiento similar en ratas tratadas con insulina. Lo que indica que el extracto acuoso de dicha flor puede reducir o inhibir el estrés oxidativo en la diabetes.

En el presente estudio Catalasa (Figuras 23 y 24) tanto en suero como en tejidos de ratas con hiperglucemia no presentó disminución con respecto al control (ratas sanas), a excepción del grupo de ratas con hiperglucemia tratadas con insulina, que fue significativamente menor al control, lo que indica susceptibilidad de padecer daño oxidativo. Glutatión peroxidasa, Superóxido dismutasa y el estado total antioxidante (Figuras 25, 27 y 28) no mostraron diferencia significativa respecto a ratas sanas, lo que señala un rol coadyuvante tanto del extracto empleado como de la insulina en el sistema antioxidante. Por otro lado, la enzima glutatión reductasa, se encontró significativamente disminuida en los grupos de ratas hiperglucémicas (Figura 26) tratadas tanto con extracto crudo de berro como con insulina, esto se debe a que en la diabetes ésta disminuye en retina y plasma, no así en corazón que aumenta; ninguno de estos efectos es revertido por antioxidantes (incluyendo ácido α -lipoico, quercetina, piperina, entre otros) (Maritim, AC. *et al.* 2003).

8.5 Grado de lipoperoxidación (Malondialdehído).

Dentro de los principales biomarcadores asociados con la diabetes mellitus se encuentra el malondialdehído, que refleja el daño oxidativo a lípidos de la membrana celular y si el organismo está bajo estrés oxidativo, en diversos estudios se le ha relacionado con la deficiencia de hierro y vitamina C en la diabetes presentando un aumento de éste (Bandeira, SM. *et al.* 2013).

En pacientes diabéticos suele encontrarse significativamente aumentado, según reportan Clapés, S. *et al.* (2001), ya que en su estudio evaluaron el estrés oxidativo en pacientes sanos y diabéticos, encontrando valores de 8.33 ± 2.9 en personas con diabetes contra 4.51 ± 1.4 nmol/mL en personas sanas.

La rutina, tiene la habilidad de neutralizar radicales libres e inhibir la lipoperoxidación, previniendo el estrés oxidativo inducido por Estreptozotocina y protegiendo a las células. Además, disminuye significativamente las especies reactivas de oxígeno elevadas y a su vez

incrementa enzimas antioxidantes endógenas en el riñón de ratas diabéticas y consecuentemente previene o controla el desarrollo de la nefropatía (Oyenihi, AB. *et al.* 2014).

En éste trabajo se observa la disminución significativa en los grupos de Estreptozotocina e Insulina en suero. En el grupo de Aloxano no mostró diferencia significativa con el grupo control (Figura 29). En tejidos (Figura 30), no hubo diferencia significativa respecto al control; sólo en el grupo de Estreptozotocina hubo una disminución significativa en hígado con respecto al grupo de insulina, por lo que puede atribuírsele dicha disminución a la administración del berro. Dichos datos coinciden con la información antes mencionada, en el que los componentes de plantas medicinales frenan el daño oxidativo y se refleja en niveles controlados de malondialdehído.

8.6 Bioquímica Sanguínea.

Los parámetros medidos en la bioquímica sanguínea, permiten conocer el estado de órganos y sistemas de manera indirecta y así, monitorear el estado de salud general del individuo. En el caso del presente estudio permite valorar si algún sistema sufrió alteración debido al tratamiento empleado para así poder determinar si resulta inocuo y poderlo utilizar en otras especies y en humanos.

La hiperglucemia diabética induce la elevación de niveles plasmáticos de urea y creatinina que se consideran como marcadores significativos de disfunción renal. Como se puede observar en la Figura 31, el grupo de Aloxano mostro Urea significativamente mayor al control y el grupo Estreptozotocina Creatinina significativamente mayor al control, lo que indica posible daño por la inducción o la hiperglucemia previa a la estabilización.

Por otro lado los niveles de Proteínas totales, Albúmina, Globulina y la proporción de Albúmina/Globulina, no reflejaron alteración alguna en los grupos experimentales, lo que

indica un correcto estado nutricional, así como funcionamiento hepático y renal adecuado de las ratas (Velázquez, R. 2009).

El incremento de la enzima hepática Fosfatasa Alcalina que se observa en la Figura 33 en los grupos tratados con berro, a comparación del grupo de insulina que no lo presenta, se debe probablemente a que la insulina (se administra de manera subdérmica) se metaboliza *in situ* a comparación de los extractos, que se administran de manera oral y que tienen que ser metabolizados por el hígado. Los niveles de enzimas Alanina Aminotrasferasa y Aspartato Aminotrasferasa (Figura 33) indican un adecuado funcionamiento hepático, que coincide con datos reportados previamente por el equipo de trabajo en el que valoraron la toxicidad sub-crónica del extracto acuoso de berro en ratas macho y hembra a una dosis de 1000mg/kg de peso donde no se encontraron diferencias con el grupo control (Ayala V y Fenton B. 2014). Otro factor que puede aumentar las enzimas hepáticas son los fármacos empleados para inducir la hiperglucemia (Aloxano y Estreptozotocina) ya que existen reportes de su hepatotoxicidad (El-Demerdash, FM. *et al.* 2005).

En un estudio realizado con una preparación polihierbal (*Glycosmis pentaphylla*, *Tridax procumbens* y *Mangifera indica*) de plantas utilizadas en la India para tratar la diabetes mellitus con ratas diabéticas inducidas con Estreptozotocina, se llevó a cabo el análisis bioquímico en los diversos grupos, mostrando lo siguiente:

Los niveles de proteínas totales fueron significativamente menores en el grupo de ratas diabéticas sin tratamiento, al compararlo con ratas sanas. Sin embargo, en las ratas tratadas con la formula herbal o el medicamento presentaron niveles normales.

El colesterol se encontró elevado en el grupo diabético control, los grupos que recibieron la preparación de las plantas y el medicamento se encontraron en niveles normales, iguales a los del grupo de ratas sanas.

La urea y creatinina, se presentaron significativamente más altas en ratas diabéticas sin tratamiento, no así en las que recibieron las plantas, que se encontraron en niveles comparables al del grupo control (Petchi, RR. *et al.* 2014). Lo que coincide parcialmente con lo

encontrando en el presente estudio, ya que el grupo de Estreptozotocina que recibió ECB diariamente por 8 semanas presentó Urea más alta que el grupo control.

La hiperfosfatemia que se presentó en el grupo de Aloxano (Figura 32), puede estar relacionada con hiperparatiroidismo secundario a enfermedad renal crónica, muy común en pacientes con diabetes mellitus. Sin embargo, también se acompañaría de hipocalcemia, que no es el caso, lo que probablemente sea un error de calibración del equipo o contaminación accidental de la muestra ya que éste analito en especial es muy sensible a la contaminación (Saliba, W. *et al.* 2009).

8.7 Evaluación histopatológica de tejidos.

Los fármacos para inducir hiperglucemia como el aloxano o la Estreptozotocina, actúan afectando las células β -pancreáticas, Smirnov, AV. *et al* (2012) realizaron un análisis histológico de su efecto en el páncreas. En el caso de aloxano, encontraron una disminución del área total de células β a comparación del grupo control a partir del día 7 y continuó hasta el día 28. En cuanto a Estreptozotocina, se encontraron cambios necróticos marcados en las células endócrinas de los islotes pancreáticos, una disminución del área de las células β acompañado de hiperplasia en el núcleo.

Sin embargo, diversos estudios señalan una mejoría de dichos acontecimientos con la utilización de plantas medicinales, en donde han observado que mejora el área y la cantidad de los islotes pancreáticos (Sabu, MC. *et al.* 2002; Vessal, M. *et al.* 2003; Chakravarthy, BK. *et al.* 1982a), atribuyen dicho efecto al contenido de compuestos antioxidantes, metabolitos secundarios y polifenoles que presentan éstas, dado que los antioxidantes protegen a las células β de los efectos de la exposición crónica a niveles suprafisiológicos de glucosa, ya que éstas son especialmente susceptibles al daño por oxidación debido a las bajas cantidades que

presentan de enzimas como Superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Robertson, RP. *et al.* 2003).

Estos datos apoyan lo encontrado en el presente estudio (Figura 34 y Tabla 6), en donde al microscopio se observa una mayor área de los islotes así como un mayor número de células β conservadas en los grupos que recibieron el extracto crudo de berro, que como ya se mencionó es altamente antioxidante y rico en polifenoles. Las imágenes de hígado y riñón (Figuras 35 y 36 respectivamente), concuerdan con lo reportado, es decir, que no presentan daño aparente.

8.8 Expresión de Galectina-3 con Western Blot.

Pugliese, G. *et al.* (2000), establecen que la hiperglucemia propia de la diabetes induce o pro-regula la producción de galectina-3, siendo que en condiciones normales, galectina-3 no es detectable a nivel glomerular/mensangial. La pro-regulación de galectina-3/AGE-R3 inducida por diabetes sugiere que la acumulación de AGES que ocurren en estas condiciones, son capaces de modificar el patrón de expresión del complejo de receptores AGE (R1, R2 y R3). Dado que la exposición de células mesangiales y endoteliales a AGES resulta en la expresión incrementada de galectina-3 (Pricci, F. *et al.* 2000).

En ratones deficientes en galectina-3 se presentó una proteinuria pronunciada y expansión mensangial asociadas con una marcada acumulación glomerular de AGES comparada con los ratones con galectina-3 activa. Estos datos sugieren que la deficiencia de galectina-3 puede causar una remoción menor de moléculas glicadas irreversiblemente, resultado en un daño mediado por AGES mayor en el tejido (Pejnovic, N. *et al.* 2013; Pricci, F. *et al.* 2000). Sin embargo, en el presente estudio, el único grupo que presentó expresión de Gal-3 fue el que recibió insulina (Figura 37).

Por otro lado, la inhibición de la señalización activada por el receptor de insulina por citocinas inflamatorias, es el primer mecanismo por el cual se produce resistencia a la insulina. La

exposición de las células a TNF α (Factor de Necrosis Tumoral α) inhibe la fosforilación de IRS1 (*Insulin Receptor Substrate*), dicha inhibición condiciona la resistencia a la insulina. Es decir, durante la diabetes se presenta un círculo vicioso de inflamación-hiperglucemia, donde participan macrófagos y por lo tanto Gal-3 (Miranda-Garduño, LM. *et al.* 2007).

No se encontró información referente a la variación de la galectina 3 en modelos hiperglucémicos tratados con plantas medicinales, por lo que el presente estudio es el primer reporte internacional, lo que coincide con reportes previos que señalan que al controlar el estrés oxidativo y por ende la producción de AGEs, la expresión del R3 o Galectina 3 disminuye.

Este estudio, como se menciona anteriormente, muestra la alta capacidad antioxidante que tiene el berro (Figuras 21 y 22), además, administrado de manera crónica a ratas hiperglucémicas se observa como mantiene en niveles óptimos a las enzimas antioxidantes: Catalasa, Glutación peroxidasa, Superóxido Dismutasa y estado total antioxidante (Figuras 23, 24, 25, 27 y 28), así como controlado el daño oxidativo (lipoperoxidación) figuras 29 y 30, lo que tiene efectos benéficos en la bioquímica sanguínea (Figuras 31, 32 y 33) y en el análisis histológico (34, 35 y 36).

Relacionando lo anterior, la expresión de Gal-3, que como ya se mencionó, está altamente relacionada no sólo con hiperglucemia, sino con estrés oxidativo, envejecimiento, cáncer e inflamación, en el grupo de ratas hiperglucémicas tratadas con insulina (cuyos niveles de glucosa se mantuvieron estables a niveles normales), se encontró fuertemente expresada, lo que nos señala el amplio rol protector del uso de plantas medicinales en la diabetes, como el berro, que debido al heterogéneo y amplio grupo de bio componentes con que cuenta (vitaminas, minerales, polifenoles, flavonoides, proteínas, etc.) y que además de promover niveles de glucosa normales (en estado de hiperglucemia, no en individuos sanos), ofrece una acción altamente antioxidante *per se* y junto con las enzimas antioxidantes propias del organismo, lo que se traduce en un menor daño oxidativo (niveles controlados de malondialdehído), la estimulación para la regeneración de células β en el páncreas así como la

disminución en la expresión de Galectina-3 que se traducen en un mejor estado de salud, la presencia de menos complicaciones y una mejor calidad de vida.

El presente trabajo de investigación constituye el primer trabajo que se enfoca a estudiar el efecto de una planta medicinal con propiedades hipoglucemiantes y antioxidantes sobre la expresión de Gal-3.

IX. CONCLUSIONES

El berro posee actividad antioxidante importante debido a la interacción sinérgica de sus componentes (vitamina C, β -carotenos, polifenoles, flavonoides y glucosinolatos, entre otros). Dicha composición contribuye a tener un efecto hipoglucemiante de manera aguda en ratas hiperglucémicas inducidas con Alozano y Estreptozotocina, no solo en forma de extracto crudo (ECB), sino en sus diversos extractos (Extracto Acetónico, Extracto Alcohólico y Fracción sin Pigmentos). Sin embargo, no posee dicho efecto sobre ratas sanas normoglucémicas.

De manera crónica el ECB ayuda a estabilizar la glucosa a niveles normales a partir de la cuarta semana, promueve el aumento de células β pancreáticas, propicia la estabilidad de las enzimas antioxidantes (Catalasa, Glutación peroxidasa, Superóxido Dismutasa y al estado total antioxidante) en niveles comparables a individuos sanos, así como el daño oxidativo a células (lipoperoxidación) en cantidades controladas, pero sobre todo disminuye la expresión de Galectina 3 que se relaciona con complicaciones en la diabetes, es decir, el consumo de plantas medicinales evita que se presente el estrés oxidativo y con ello las complicaciones propias de la diabetes.

X. PERSPECTIVAS

Las perspectivas para el presente trabajo son:

- Aislar los componentes activos y evaluar su acción *in vitro* e *in vivo*.
- Valorar el tiempo mínimo desde que es regulada la expresión de Galectina-3.
- Evaluar la cantidad mínima de berro para causar dicha inhibición.
- Considerar si Galectina-3 puede tener un uso pronóstico o como marcador de daño en diabetes.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Academy of Nutrition and Dietetics. [Internet] EUA. 2013 [Consultado 26 julio 2013] Disponible en: <http://www.eatright.org/Public/content.aspx?id=6792>.
- Abdel-Wahab YHA, O`Harte FPM, Mooney MH, Barnett ChR, Flatt PR. Vitamin C supplementation decreases insulin glycation and improves glucose homeostasis in obese hyperglycemic (ob/ob) mice. *Metabolism*. 2002; 51(4): 514-517.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-126.
- Al-Amin ZM, Thomson M, Al-Qattan KK, Peltonen-Shalaby R, Ali M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutrit*. 2006; 96:660-666.
- Alfadda A, Sallam R. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *J Biomed and Biotech*. 2012; 2012: 1-14.
- Alvisouri M, Hernández R. Capítulo 2: Histología y Ultraestructura del Páncreas. En: Herrera, M. Uscanga, L. Robles, G. Campuzano, M, editores. *Campuzano Páncreas*. México. Editorial McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 11-12.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diab Care*. 2004; 27:5-10.
- Andrade-Cetto A. Effects of medicinal plant extracts on gluconeogenesis. *Botanics: Targets and Therapy*. 2012; 2:1-6.
- Asociación Mexicana de Diabetes. [Consultado 22 Julio 2013] 2013. Disponible en: http://www.amdiabetes.org/estadisticas_de_la_diabetes.php.
- Attanayake AP, Jayatilaka KAPW, Pathirana Ch, Mudduwa LKB. Study of antihyperglycaemic activity of medicinal plant extracts in alloxan induced diabetic rats. *Anc Sci Life*. 2013; 32(4): 193-198.
- Avilés D, Bermúdez K, Herrera ML. Efecto antidepresivo y caracterización química de hojas de plantas silvestres y cultivadas en condiciones de invernadero de Tilia americana var. mexicana [Tesis de Maestría]. Morelos (México). Instituto Politécnico Nacional; 2008. 71 p.
- Ayala Villanueva VM, Bravo García M, Sánchez Orozco A y Fenton Navarro B. Toxicidad aguda de los extractos acuosos de hojas de berro (*Nasturtium officinale*). XI Encuentro de la Participación de la Mujer en la Ciencia. Editorial: Centro de Investigación en Óptica. ISBN: 978-607-95228-5-8. León, Guanajuato. 2014. Sesión 2 Medicina y Ciencias de la Salud. S2-MCS19: 1-5
- Bandeira SM, Fonseca LJS, Guedes GS, Rabelo LA, Goulart MOF, Vasconcelos SML. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2013; 14:3265-3284.
- Bahramikia S, Yazdanparast R. Antioxidant Efficacy of *Nasturtium officinale* Extracts Using Various *In Vitro* Assay Systems. *J Acupunct Meridian Stud*. 2010; 3(4):283-290.
- Bartosz G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?. *Biochem Pharmacol*. 2009; 77:303-315.

- Benhar M, Engelberg E, Levitzki A. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO reports*. 2002; 3(5): 420-425.
- Bereket A, Lang CH, Blethen SL, Fan J, Frost RA, Wilson TA. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Proteolysis in children with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: A Possible Role for Insulin in the Regulation or IGFBP-3 Protease Activity. *J Clin Endocr Metab*. 1995; 80(8):2282-2288.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [Consultado 29 septiembre 2013] 2009.
Disponible en:
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7248>
- Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern D, Nawroth P. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Mol Med*. 2005; 83: 876-886.
- Blanco-Hernández R, Ruiz Ramos M, Sánchez Rodríguez MA, Mendoza Núñez VM. Lipoperóxidos, actividad antioxidante y factores prooxidantes en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2. *Bioquímica*. 2004; 29(4): 118-125.
- Botanical on line. [Consultado 30 agosto 2013]. 2013. Disponible en:
<http://www.botanical-online.com/berros.htm>.
- Bowen R. [Consultado 30 julio 2013] 2003. Disponible en:
http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc_topics/radicals.html.
- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-254.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensm Wiss Technol*. 1997; 30: 609-615.
- Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P. Phenolic Compounds in *Brassica* Vegetables. *Molecules*. 2011; 16:251-280.
- Chakravarthy BK, Gupta S, Gode KD. Functional beta cell regeneration in the islets of pancreas in alloxan induced diabetic rats by (-) epicatechin. *Life Science*. 1982a; 31: 2693-2697
- Chen HY, Yen GC. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chem*. 2006; 2(47):686-694.
- Circu ML, Yee Aw T. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48: 749-762.
- Clapés S, Torres O, Companioni M, Villariño U, Broche F, Céspedes EM. Peroxidación lipídica y otros indicadores de Estrés Oxidativo en Pacientes Diabéticos. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2001; 20(2):93-98.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad). [Consultado 2 junio 2015]. 2012. Disponible en:
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/brassicaceae/rorippa-nasturtium-aquaticum/fichas/ficha.htm>.
- Csányi G, Miller FJ. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(4): 6002-6008.

- Culling CFA. Handbook of Histopathological and Histochemical Technique. 3rd edition. London. Butterworth. 1974. 712 p.
- De Costa J, Madrid JA, Zamora S. Manual de Clases Prácticas de fisiología animal. Murcia. 1993. 236 p.
- Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera G, Sumaya Martínez MT. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. Investigación y Ciencia. 2010; 50:10-15.
- De Segura IAG. Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal. 1ª Edición. España. Editorial Interamericana. 2001. Capítulo 14: Métodos de Analgesia, anestesia y eutanasia. Pp 31.
- Dietas.net. Tablas de composición nutricional de los alimentos. 2004. [Consultado en 30 de agosto del 2013]. Disponible en: <http://www.dietas.net/tablas-y-calculadoras/tabla-de-composicion-nutricional-de-los-alimentos/verduras-y-hortalizas/verduras-frescas/berro.html>.
- Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: An open-ended story. Biochemica et Biophysica Acta. 2006; 1760: 616-635.
- Dunn JS, Kirkpatrick J, McLetchie NGB, Telfer SV. Necrosis of islets of Langerhans produced experimentally. J Pathol Bacteriol. 1943; 53(3): 245-257.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, Abou El-Naga NI. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol. 2005; 43: 57-63.
- Engelen-Eigles G, Holden G, Cohen JD, Gardner G. The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). J Agric Food Chem. 2006; 54(2): 328-334.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. Endoc Rev. 2002; 23 (5): 599-622.
- Etxeberria U, De la Garza AI, Campión AJ, Martínez JA, Milagro FI. Antidiabetic effects or natural plant extracts via inhibition of carbohydrate hydrolysis enzymes with emphasis on pancreatic alpha amylase. Epub. 2012; 16 (3): 269- 297.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition. 2002; 18(10): 872-879.
- Figueroa Hernández JL. Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. Revista Digital Universitaria UNAM. 2009; 10(9): 2-12.
- Folin O. On Tyrosine and tryptophane determinations in proteins. J Biol Chem. 1927; 73: 672-649.
- Fu-Tong L, Dan H. 2003. Galectin-3 (human). Consortium of Functional Glycomics. [Consultado en: 2 de agosto del 2013]. Disponible en: http://web.mit.edu/glycomics/moleculpages/cbp/galectins/gal3_human/.
- Ganda OP, Rossi AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. Diabetes. 1976; 25: 595-603.
- Giacco F, Brownlee M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. Circ Res. 2010; 107:1058-1070.

- Gill CHIR, Haldar S, Boyd LA, Bennett R, Whiteford J, Butler M, Pearson JR, Brandbury I, Rowland IR. Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85:504-510.
- Granado-Serrano AB. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación. [Tesis Doctorado] [Madrid] Universidad Complutense de Madrid. 2009. 187 p.
- Hai Liu R. Health Benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combination of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003; 78: 517-520.
- Hanhineva K, Torronen R, Bondia I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkanen H, Poutanen K. Impact of dietary polyphenols and carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci.* 2010; 11: 1365-1402.
- Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(8):2928-2935.
- Hernández S, Gómez FJ. Capítulo 6: Fisiología del Páncreas Endócrino. En: Campuzano Páncreas. Ed Herrera, M. Uscanga, L. Robles, G. Campuzano, M. México. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2000; p 55-57.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ J.* 2009; 73: 411-418.
- Hoseini HF, Gohari AR, Saeidnia S, Majd NS, Hadjiakhoond A. The effect of *Nasturtium Officinale* on blood glucose level in diabetic rats. *Pharmacologyonline.* 2009; 3: 866-871.
- Hoyer K, Pang M, Gui D, Shintaku P, Kuwabara I, Liu FT, Said JW, Baum LG, Teitell MA. An Anti-Apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am Jour Pathol.* 2004; 164: 895-900.
- Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the Galectin-3 Gene Results in Attenuated Peritoneal Inflammatory Responses. *Am Jour Phatol.* 2000; 156(3): 1073-1083.
- Infoagro. 2003. [Consultado 3 agosto 2013]. Disponible en: http://s3.esoft.com.mx/esofthands/include/upload_files/4/Archivos/Apio1.pdf.
- Jadhav R, Puchchakayala G. Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Int J Pharm and Pharmaceut Sci.* 2012; 4(2):251-256.
- Jiménez Corona A, Rojas Martínez R, Villalpando S, Barquera S, Aguilar Salinas C. 2012. [Consultado 22 julio 2013]. Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/doctos/seminario/M0302.pdf>.
- Kavinsankar N, Lakshmidivi S, Mahadeva Murthy HS. Diabetes and Medicinal Plants- a review. *Int J Pharm Biomed Sci.* 2001; 2(3):65-80.
- Kowaltowski AJ, De Souza Pinto NC, Calstilha RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med.* 2009; 47: 333-343.
- Krzeslak A, Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cel Mol Bio Lett.* 2004; 9: 305-328.
- Lazo-de-la-Vega-Monroy ML, Fernández-Mejía C. Oxidative Stress. En: Diabetes Mellitus and the Role of Vitamins with Antioxidant Actions en Oxidative Stress and Chronic

- Degenerative Diseases – A Role of Antioxidants. Morales-González, JA, editors; 2013. p. 209-232.
- Li M, Dou L, Jiao J, Lu Y, Guo HB, Man Y, Wang S, Li J. NADPH Oxidase 2-derived Reactive Oxygen Species are Involved in Dysfunction and Apoptosis of Pancreatic β -cells Induced by Low Density Lipoprotein. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 30: 439-449.
 - Life Extension Magazine. Watercress. Benefits for cancer protection, vision and heart health. 2007. [Consultado 29 septiembre 2013] Disponible en: http://www.lef.org/magazine/mag2007/nov2007_sf_watercress_01.htm
 - Li X, Chen H, Epstein PN. Metallothionein and Catalase Sensitize to Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *Diabetes*. 2006; 55: 1596-1603.
 - Manonmani G, Bhavapriya V, Kalpana S, Govindasamy S, Apparantham T. Antioxidant activity of *Cassia fistula* (Linn.) flowers in alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharm*. 2005; 97:39-42.
 - Makita Z, Radoff S, Rayfield E, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Fiedmad E, Cerami A, Lassara H. Advanced Glycosylation End Products in Patients With Diabetic Nephropathy. *New Engl J Med*. 1991; 325(12):836-842.
 - Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003; 17(1): 24-38.
 - Mataix Verdú J, Ramírez Tortosa MC. Estrés Oxidativo. II. Antioxidantes y alimentación. En: *Tratado de Nutrición y Alimentación*. Mataix Verdú, J, editores. Editorial Océano/ergon. Barcelona. 2009; p. 1398.
 - Matarrese P, Tinari N, Semerari ML, Natoli C, Iacobelli S, Malorni W. Galectin-3 overexpression protects from cell damage and death by influencing mitochondrial homeostasis. *FEBS Letters*. 2000; 473: 311-315.
 - Miranda-Garduño LM, Reza-Albarrán A. Obesidad, Inflamación y Diabetes. *Gac Méd Méx*. 2008; 144(1): 39-46.
 - Monge E, Val J, Heras L. Análisis cuantitativo de pigmentos en plantas superiores por HPLC. *An Estac Exp Aula Dei*. 1984; 17(1-2): 60-66.
 - Munna S, Saleem MTS. Hypoglycemic and hypolipidemic activity of *Ficus mollis* leaves. *Braz J Pharm Sci*. 2013; 23(4):687-691.
 - Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis*. 2005; 10 (2): 267-275.
 - Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. Guideline for the Testing of Chemicals 420 on Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris, France. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL420.pdf
 - Oyenihni AB, Brooks NL, Oguntibeju OO, Aboua G. Chapter 14: Antioxidant- Rich Natural Products and Diabetes Mellitus. En: *Antioxidant- Antidiabetic Agents and Human Health*. Intech. 2014; p 317-345.
 - Özen T. Investigation of Antioxidant Properties of *Nasturtium officinale* (watercress) leaf extracts. *Acta Pol Pharm*. 2009; 66(2): 187-193.
 - Paglia DE, Valetine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab ClinMed*. 1967; 70:158-169.

- Pamplona Roger JD. Salud por los alimentos. Ed. Nuevo estilo de vida. España. 2007; Pp 232-233.
- Pandey KB, Rizivi S. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev* 2009; 2: 270-278.
- Packer JT, Kraner KL, Rose SD, Stuhlman RA, Nelson LR. Diabetes mellitus in *Mystromys albicaudatus*. *Arch Pathol.* 1970; 89: 410-415.
- Petchi RR, Vijaya Ch, Parasuraman S. Antidiabetic Activity of Polyherbal Formulation in Streptozotocin- Nicotinamide Induced Diabetic Wistar Rats. *J Tradit Complem Med.* 2014; 4(2):108-117.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 2008; 4 (2): 89-96.
- Pejnovic N, Pantic J, Jovanovic I, Radosavljevic G, Djukic A, Arsenijevic N, Lukic M. Galectin-3 is a regulator of metaflammation in adipose tissue and pancreatic islets. *Adipocyte.* 2013; 2(4): 266-271.
- PLANTS Database. USDA. NRCS. 2015. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. [Consultado 2 June 2015]. Disponible en: <http://plants.usda.gov>
- Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Cordone S, Gradini R, Barsotti P, Liu FT, Di Mario U, Pugliese G. Role of Galectin-3 as a receptor for advanced glycation end products. *Kindeg International.* 2000; 58(suppl 77):S31-S39.
- Pugliese G, Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Lenti L, Sale P, Gradini R, Liu F, Di Mario U. The Diabetic Milieu Modulates the Advanced Glycation End Product-Receptor complex in the Mesangium by Inducing or Upregulating Galectin-3 expression. *Diabetes.* 2000; 49: 1249-1257.
- Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2012 ; 27 (1): 76-89.
- Rabinovich G, Rubinstein N. Galectinas: Una nueva familia de proteínas involucradas en la regulación de respuesta inmune. *Medicina.* 2001; 61: 85-92.
- Ramamoorthy PK, Bono A. Antioxidant Activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda Citrifolia* extracts from various extraction processes. *J Engineering Sci Techol.* 2007; 2(1):70-80.
- Ramasamy R, Vannucci SJ, Shi Du Yan S, Herold K, Fang Yan S, Schmidt AM. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration and inflammation. *Glycob.* 2005; 15(7): 16-18.
- Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and Reactive Oxygen Species in Excitotoxicity and Apoptosis: Implications for the pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Neurodegenerative research.* 2003; 28(10):1563-1574.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in β -cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione connection. *Diabetes.* 2003; 52:581-587.
- Rohilla A, Ali S. Alloxan induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *Int J Research in Pharm and Biomed Sci.* 2012; 3(2):819-823.
- Sabu MC, Kuttan R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *J Ethnopharm.* 2002; 81:155-160.

- Saliba W, El-Haddad B. Secondary Hyperparathyroidism: Pathophysiology and Treatment. *J Am Board Fam Med.* 2009; 22: 547-581.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto FA. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric.* 1998; 76: 270-276.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr.* 2005; 81: 215-217.
- Shahrokhi N, Hadad MK, Keshavarzi Z, Shabani M. Effects of Aqueous extract of Water Cress on Glucose and Lipid plasma in Streptozotocin- induced Diabetic Rats. *Pak J Physiol.* 2009; 5(2): 6-10.
- Shmedes A, Holmer G. A new thiobarbitur Acid (TBA) Method for Determining Free Malondaldehyde (MDA) and Hydroperoxides Selectively as a Measure of Lipid Peroxidation. *JAOCs.* 1989; 66(6): 813-817
- Shukla V, Mishra S, Pant H. Oxydative Stress in Neurodegeneration. *Advances in Pharmacological Sciences.* 2011:1-13.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advance Glycation End Products: a review. *Diabetologia.* 2001; 44: 129-146.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16: 144-158.
- Smirnov AV, Snigur GL, Vorokova MP. Chapter 9: Pancreatic Islet Beta-Cell Apoptosis in Experimental Diabetes Mellitus. *Apoptosis and Medicine.* Dr. Tobias Ntuli (Ed.), ISBN: 978-953-51-0701-9, InTech, DOI: 10.5772/51411. [Consultado 27 mayo 2015] Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/apoptosis-and-medicine/pancreatic-islet-beta-cell-apoptosis-in-experimental-diabetes-mellitus>
- Smith OLK, Wong CY, Gelfand RA. Skeletal muscle proteolysis in rats with acute Streptozotocin-induced Diabetes. *Diabetes.* 1989; 38:1117-1122.
- Stitt AW, McGoldrick C, McCaldin A, McCance D, Glenn JV, Hsu DK, Liu FT, Thorpe SR, Gardiner TA. Impaired Retinal Angiogenesis in Diabetes Role of Advanced Glycation End Products and Galectin-3. *Diabetes.* 2005; 53:785-794.
- Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50: 536-546.
- Tébar Massó FJ, Ferrer Gómez M. Concepto, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus en La Diabetes Mellitus en la Práctica Clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2009; p: 1-5.
- Toledo T, Nagem TJ, Rocha M, Marciano L, Magalhaes N. Propiedades biológicas de los tintes naturales. *Ars. Pharm.* 2004; 45(1): 5-20.
- Tomás-Barberán FA. Los polifenoles de los alimentos y la Salud. *Alim Nutri. Salud.* 2003; 10(2):41-53.
- Touyz RM. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells – implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(8): 1263-1273.
- Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS letters.* 1995; 358:1-3.
- Trujillo HM. La curva de Tolerancia a la glucose oral. Un enfoque alternativo. *Contactos.* 2007; 64:21-24.

- Uttara B, Singht AV, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7(1): 65-74.
- Van Duynhoven J, Vaughan EE, Jacobs DM, Kemperman RA, Van Velzen EJJ, Gross G, Roger LC, Possemiers S, Smilde AK, Doré J, Westerhuis JA, Van de Wiele T. Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *PNAS*. 2011; 108 (supp 1):4531-4538.
- Velázquez, R. Manual de Prácticas Bioquímica Clínica de la Universidad Autónoma de México. 2009; 50-51.
- Vessal M, Hemmati M, Vasei M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 2003; 135: 357-364.
- Vladoiu MC, Labrie M, St-Pierre Y. Intracellular Galectins in cáncer cells: Potential new targets for therapy (Review). 2014; 44: 1001-1014.
- Wautier JL, Guillausseau PJ. Advanced Glycation End Products, their receptors and Diabetic Angiopathy. *Diabetes Metab*. 2001; 27:535-542.
- Wikipedia [Internet]. *Nasturtium officinale*. 2013. [Consultado 29 septiembre 2013]. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Nasturtium_officinale
- Williamson G, Holst B. Dietary reference intake (DRI) value for dietary polyphenols: are we heading in the right direction? *Brit J of Nutr*. 2008; 99 (suppl 3): S55-S58.
- World Health Organization. 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its complications. Switzerland. [Consultado 23 marzo 2015]. Disponible en: https://www.staff.ncl.ac.uk/philip.home/who_dmg.pdf
- Xavier-Filho J, Oliveira AEA, Belarmino da Silva L, Rocha Azevedo C, Motta Venâncio C, Machado OLT, Oliva ML, Fernandes KVS, Xavier-Neto J. Plant insulin or glucokinin: a conflicting issue. *Braz J Plant Physiol*. 2003; 15(1): 67-78.
- Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *PNAS*. 2005; 103 (8): 2653-2658.
- Zavaleta J, Muñoz AM, Blanco T, Alvarado-Ortiz C, Loja B. Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides de algunos alimentos. *Acta Médica Sanimartiniana*. 2005; 1(1): 81-85.

XII. ANEXO



A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se establece la **identificación y clasificación taxonómica** de un ejemplar botánico herborizado y constituido por una ramilla sin flores, el cual fue entregado por parte de la Dra. Bertha Fenton Navarro del Laboratorio de Glicobiología de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" al personal del **Herbario de la Facultad de Biología (EBUM) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, con fecha 3 de marzo del 2015. Recolectado en el Mercado Independencia en Morelia, Michoacán, México y fue incorporado a la colección del EBUM de la facultad de Biología de la UMSNH con No de Folio **26808**.

La clasificación taxonómica se realizó con base en LAS CLAVES Y DESCRIPCIÓN DE:

Rzedowski, G.C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2ª.

Ed. 1ª reimp., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.x

Categorías taxonómicas según MOBOT 2015

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Equisetopsida C. Agardh
Orden: Brassicales Bromhead
Familia: Brassicaceae Burnett
Género: *Nasturtium* W.T. Aiton
Especie: ***Nasturtium officinale* W.T. Aiton**

El nombre fue revisado en las bases de datos disponibles en línea:

- Cite this page: Tropicos.org, Missouri Botanical Garden, 22 Jun 2015
<http://www.tropicos.org/Name/4100231>
The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>
(accessed 1st January).



y se confirma que el nombre de *Nasturtium officinale* W.T. Aiton



es un nombre aceptado.

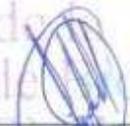
NOTA 2: algunos sinónimos de este taxa son:

- *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayek
- *Rorippa nasturtium* (Moench) Beck
- *Radicula nasturtium* (Moench) Druce
- *Rorippa officinalis* (W.T. Aiton) P. Royen

Sin otro en particular, queda de Usted.

Atentamente,


M.C. Marlene Gómez Peralta
Coordinadora General del Herbario de la Facultad
De Biología (EBUM), UMSNH


Biol. Rosa Isabel Fuentes Chávez
Curadora de la Colección de Plantas Vasculares
del Herbario de la Facultad de Biología (EBUM).

Morelia, Michoacán a 22 de junio del 2015.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE E HIPOGLUCEMIANTE DEL BERRO
(*Nasturtium officinale*) SOBRE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN RATAS
HIPERGLUCÉMICAS (2015)
